

ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TRİTİKALE'DE (*X Triticosecale Wittmack*) 2,4-D BÜYÜME DÜZENLEYİCİSİNİN
FARKLI DOZLARININ EMBRİYOGENİK KALLUS OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ**

Yuşa KARATAŞLIOĞLU

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Mayıs, 2017

ERZURUM

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAYI FORMU

**TRİTİKALE'DE (*X Triticosecale Wittmack*) 2,4-D BÜYÜME DÜZENLEYİCİSİNİN
FARKLI DOZLARININ EMBRİYOGENİK KALLUS OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ**

Yrd. Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU danışmanlığında, Yuşa KARATAŞLIOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 03/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Özkan AKSAKAL *İmza*

Üye: Yrd. Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU *İmza*

Üye: Yrd. Doç. Dr. EMRE İLHAN *İmza*

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

Enstitü Müdürü

**ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

ETÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “TRİTİKALE’DE (X *Triticosecale Wittmack*) 2,4-D BÜYÜME DÜZENLEYİCİSİNİN FARKLI DOZLARININ EMBRİYOGENİK KALLUS OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03/05/2017

.....

Yuşa KARATAŞLIOĞLU

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TRİTİKALE'DE (*X Triticosecale Wittmack*) 2,4-D BÜYÜME DÜZENLEYİCİSİNİN FARKLI DOZLARININ EMBRİYONİK KALLUS OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ

Yuşa KARATAŞLIOĞLU

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

Tritikale, yaklaşık 130 yıl önce çavdar ve buğdayın melezlenmesinden yapay olarak elde edilen bir tür olup 1960 yılında ilk kez ıslahçılar tarafından kullanılmıştır. Tritikale yüksek verim kapasitesi, kaliteli dane, hastalıklara karşı dayanıklı ve değişen çevre koşullarına karşı adaptasyon kabiliyeti yüksektir. Bu çalışmada, ülkemizde yaygın olarak ekimi yapılan tritikalenin Ümran Hanım çeşidinin olgun embriyoları kullanılmıştır. Bir oksin tipinin (2,4-Dichlorophenoxyacetic asit) ve bu oksin tipine ait 3 farklı dozun (4.0 mg/l; 8mg/l; 12.0mg/l) kallus oluşumu ve embriyogenik kallus oluşumuna etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kallus oluşumu ve embriyogenik kallus oluşumu Ümran Hanım çeşidinde yüksek oranda olmuştur. Kallus oluşumu ve embriyogenik kallus oluşumu değişen üç farklı dozda değişkenlik göstermiştir. Kallus oluşumu oranı 3 dozda %85'in üstünde bulunmuştur. Kallus oluşumu oranı en yüksek 4 mg/l dozunda agarlı ortamdan alınmıştır. Embriyogenik kallus oluşum oranları ise sırasıyla %32,38, %12,86 ve %16,08 olarak hesaplanmıştır.

2017, 40 sayfa

Anahtar Kelimeler: Triticale, İn Vitro Kültür, Embriyonik Kallus, Bitki Büyüme Düzenleyicileri

ABSTRACT

MASTER THESIS

THE EFFECTS OF 2,4-D OF DIFFERENT DOSES ON EMBRYOGENIC CALLUS FORMATION IN TRITICALE

Yuşa KARATAŞLIOĞLU

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst.Prof. İsmail BEZİRGANOĞLU

Triticale is an artificial species that originated ca. 130 years ago from a cross between wheat and rye, with the first cultivars useful for breeders available in the 1960s. It exhibits high yield, potential, grain quality, resistant to pathogens favorable amino acid composition and adaptation to adverse conditions. In our study, mature embryos of Ümran Hanım triticale genotype was used as the material for this study. Response of three different doses, (4.0 mg/l; 8mg/l; 12.0mg/l) of one auxin type (2,4-D) and callus formation and embriyogenic callus formation was evaluated. According to results, Ümran Hanım triticale genotype was found highest on callus formation and embriyogenic callus formation. It was observed callus formation and embriyogenic callus formation was influenced by 3 different doses. Callus formation ratio was observed above 85% in three doses. The highest formation of callus was observed in medium containing 4 mg/l 2,4-D solidified with phytigel. Embryogenic callus formation ratio was observed %32,38, %12,86 and %16,08 respectively.

2017, 40 pages

Keywords: Triticale, in vitro culture, embryogenic callus, plant growth regulation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince görüş ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Yrd. Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu çalışma döneminde de yanımda olduklarını hissettiğim, maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma sürecinde manevi desteklerini hissettiğim, dostlarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Yuşa KARATAŐLİOĞLU

2017

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR | 8 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM..... | 15 |
| 3.1. Materyal | 15 |
| 3.1.1. Bitki Materyali | 15 |
| 3.1.1.1. Kullanılan Tritikale çeşidi ile ilgili genel özellikler | 15 |
| 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları | 16 |
| 3.1.3. Kimyasallar | 17 |
| 3.1.3.1. Sterilizasyonda kullanılan kimyasallar | 17 |
| 3.1.3.2. Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar..... | 18 |
| 3.1.3.3. MS tuzları ve vitaminleri ile birlikte kullanılan ilave kimyasallar | 20 |
| 3.1.4. Jel Yapıcı Olarak Kullanılan Maddeler | 20 |
| 3.1.5. Çalışmada Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri | 20 |
| 3.2. Yöntem..... | 20 |
| 3.2.1. Sterilizasyon Teknikleri | 21 |
| 3.2.1.1. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı..... | 21 |
| 3.2.1.2. Kullanılan aletler ve çalışma alanının sterilizasyonu | 21 |
| 3.2.1.3. Tohumların yüzey sterilizasyonu | 21 |
| 3.2.1.4. Besi yeri ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu | 21 |
| 3.2.2. Kallus Oluşum Ortamı | 22 |
| 3.2.2.1. Bitki büyüme düzenleyicilerinden stok solusyon hazırlanması..... | 22 |
| 3.2.2.2. Kallus oluşum ortamının hazırlanması | 22 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3. Çalışmada Araştırılan Konular | 23 |
| 3.2.3.1. Kallus oluşum oranı (KOO)(%)..... | 23 |
| 3.2.3.2. Embriyogenik kallus oluşumu | 23 |
| 3.2.4. Bulguların İstatistiksel Analizleri | 23 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI..... | 25 |
| 4.1. Kallus Oluşumu Oranı | 25 |
| 4.2. Embriyogenik Kallus Oluşum Oranı | 29 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 32 |
| KAYNAKLAR | 35 |
| ÖZGEÇMİŞ | 40 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 4.1.a. Kallus oluşum ortamına alındıktan bir ay karanlıkta bırakılarak 2,4-D' nin 4 mg/l'de oluşan kalluslar | 25 |
| 4.1.b. Kallus oluşum ortamına alındıktan bir ay karanlıkta bırakılarak 2,4-D' nin 12 mg/l'de oluşan kalluslar | 26 |
| 4.1.c. Kallus oluşum ortamına alındıktan bir ay karanlıkta bırakılarak 2,4-D' nin 8 mg/l'de oluşan kalluslar | 27 |
| 4.1.d. Kallus oluşum ortamına alındıktan bir ay karanlıkta bırakılarak 2,4-D' nin 4 mg/l'de oluşan beyazımsı, yumuşak ve sağlıklı kalluslar | 28 |
| 4.2. 2,4-D' nin farklı dozlarında oluşan kallus oluşum oranı grafiği..... | 29 |
| 4.3.a. Kallus oluşum ortamına alındıktan 1 ay aydınlıkta bırakılarak oluşan embriyonik özellik gösteren kalluslar | 30 |
| 4.3.b. Kallus oluşum ortamına alındıktan 1 ay aydınlıkta bırakılarak oluşan embriyonik özellik gösteren kalluslar | 30 |
| 4.4. 2,4-D' nin farklı dozlarında oluşan kallus oluşum oranı grafiği | 31 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 3.1. MS Kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları..... | 19 |
| 3.2. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan kimyasallar..... | 20 |
| 3.3. Bitki büyüme düzenleyicileri..... | 22 |
| 4.1. Farklı dozlardaki 2,4-Dichlorophenoxyacetic asit bulunan kültür ortamlarında oluşan kallus oranları..... | 28 |
| 4.2. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı (KSEKO)(%)..... | 31 |



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| <u>Simgeler ve Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u> |
|--------------------------------|---|
| % | Yüzde konsantrasyonu |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| °C | Santigrat Derece |
| ml | Mililitre |
| 2,4-D | 2,4-diklofenoksiasetik asit |
| 2,4,5-T | 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit |
| 2,4,5-TP | 2-(2,4,5- triklorofenoksil)propiyonik asit |
| 2-MCPP | 2-(2-metil-4-klorofenoksil) propiyonik asit |
| 3-CPA | 3-klorofenoksipopionamid |
| 4-CPA | 4-kloro-indolasetik asit |
| ABA | Absisik asit |
| B5 | Gamborg Besin Ortamı |
| BAP | Benzil amino pürin |
| Dikamba | 3,6-dikloro-2-metoksibenzoik asit |
| MS | Murashige ve Skoog Besin Ortamı |
| N6 | Chu Besin Ortamı |
| NAA | Naftalen asetik asit |
| MCPA | Metal-4-klorofenoksiasetik asit |
| IAA | İndol-3-asetik asit |
| IBA | İndol-3-bütirik asit |
| IPA | İndol-3-propiyonik asit |
| Pikloram | 4-amino-3,5,6-trikloropiklonik asit |
| SH | Schenk ve Hildebrant Besin Ortamı |
| WPM | Lloyd ve McCown Besin Ortamı |
| UV | Ultraviyole |
| KOO | Kallus Oluşum Oranı |

EKOO

Embriyogenik Kallus Oluşum Oranı

KSEKO

Kallus Sayısına Göre Embriyogenik Kallus Oluşumu

BNOA

β -nafloksiasetik asit



1.GİRİŞ

İnsanoğlunun artan nüfusu ile birlikte tarım yapılabilecek toprakların azalması, her geçen gün sayısı artan nüfusun besin ihtiyacını karşılayabilmek için bitkisel üretim artırılması ve yaygınlaştırılması zorunluluk olmakla birlikte tahıl grubu besinlerin hızlı bir genetik gelişimine ihtiyaç duyulmaktadır.

İki milyonu aşkın bir süredir devam etmekte olan insanoğlunun dünya üzerindeki serüveni, son on bin yıllık dönemde bitkilerin kültüre alınmasına ve bu bitkiler içerisindeki tahıllar grubunun insanların besin kaynağı olarak kullanması ve hayvanların beslenme sürecinde dolaylı olarak veya doğrudan tercih olarak görmelerine tanıklık etmektedir.

Tahıllar ve tahıla dayalı ürünler tüm dünyada olduğu gibi bizim ülkemizde de insan beslenme rejimlerinde çok hassas bir noktadadır. Dünyada insanların besin kaynağı olarak kullandığı proteinin %52'si, karbonhidrat ve enerjinin %50'si tahıllardan sağlanırken, bizim ülkemizde ise proteinin %80'i, karbonhidrat ve enerjinin %60'ı tahıllardan karşılanmaktadır (Kün 1996).

Dünyada en çok ekilen ve üretimi yapılan türler arasında buğday, çavdar, çeltik, mısır ve arpa görülmektedir. Son dönemde Tritikale (*xTriticosecale Wittmack*) adı verilen buğday ve çavdar melezi olan bu yeni üye artan nüfus, azalan tarım arazileri, beslenme sorunları gibi çözüm arayan konuların çözümünde alternatif olarak önem kazanmıştır.

İlk olarak 1875 yılında İskoçya'da Wilson adlı bir bilimadamı tarafından melezleme yapılmış olup, meydana gelen melezlerin infertil olduğu görülmüştür (NRC 1989). İlk fertil melezler, 1938 yılında buğday ve çavdar melezine kolçisin uygulayarak elde edilmiş ve İsveçli bilimadamı Arne Müntzing tarafından bulunmuştur.

Tritikale AABBDDRR ya da AABBRR genomik yapısına sahip olup çavdar ve buğday türlerinin çaprazlanması neticesinde ortaya çıkmış doğal olmayan bir tahıl

cinsidir. Bu yapay tahıl cinsinin elde edilmesi, çavdarın baba olarak buğdayın anne olarak kullanılması sürecine dayanmaktadır. Bu melezlemede kullanılan buğdayın heksaploid (*T. aestivum*) olması durumunda elde edilen tritikale, oktoploid tritikale; tetraploid (*T. durum*) olması durumunda elde edilecek tritikale, heksaploid tritikale olarak adlandırılmaktadır (Lukaszewski ve Gustafson 1987). Günümüzde başarılı olan tritikale çeşitleri, makarnalık buğday ile çavdar melezinden elde edilen heksaploid ($2n=6x=42$) genotip yapısında olan amfidiploidler olarak görülmektedir.

Tritikale insanların beslenmesi ve hayvan yemi olarak kullanıma uygun olup her geçen gün ekim alanları artmaktadır. Tritikale'nin dünyadaki ekim alanı 4.1 milyon ha, üretim 17 milyon ton ve verim ise hektarda 41.370 hektogram iken bu rakamlar ülkemizde 376.635 ha ekim alanı, 125 bin ton üretim ve hektarda 33 bin hektogram verim olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya genelinde tritikale tarımının en yaygın şekilde yapıldığı ülkeler; Almanya, Çin, Polonya, Avustralya ve Fransa olarak göze çarpmaktadır. Ülkemizde ise bu durum Tokat, Balıkesir, Denizli, Kırklareli, Kahramanmaraş, Çanakkale, Edirne ve Kütahya şeklinde dağılım göstermektedir (TÜİK 2016).

Tritikalenin kullanım alanlarının çeşitliliği göze çarpmaktadır. Tritikale unu %15-16 oranında yüksek protein içeriğine sahiptir ve bu unun buğday ununa %30 civarında eklenmesi ile ekmeğin besin değeri artmaktadır (Bishnoi ve Hughes 1979). Dünya üzerinde protein açığı hızla büyümektedir ve tritikalenin buğday ve diğer tahıllara oranla yüksek protein içeriğinin bulunması, tritikale için insan veya hayvan beslenme sürecindeki önemini artırmaktadır (Ülger ve Yağbasanlar 1989). Tritikalenin sahip olduğu zengin proteinli tane ve yeşil materyal hayvan yemi olarak kullanılmakla birlikte, tanesinin ise birçok bileşik yönünden de buğdaya göre daha verimli olduğu bilinmektedir (Barriga vd. 1979; Yağbasanlar ve Ülger 1989). Bu durum tritikalenin kümes hayvanlarının beslenmesinde kullanılması için bir alternatif olarak gösterilmesine sebep olmaktadır (Qualset vd. 1976).

Tritikale, buğdayın yüksek verim özelliği ile kalitesini, çavdarın ise zararlılara ve hastalıklara dayanıklılığı ile toprak özellikleri ve iklim şartları yönünden çok seçici

olmaması özelliklerinin bulunduğu bir serin iklim tahıldır. Değişik toprak ve iklim şartlarına uyum sağlayabilen tritikale, kurak koşullarda diğer tahıllardan daha verimli olmaktadır. Bu özelliği tritikale'yi yıllık yağış ortalamasının düşük olduğu ve sulama imkanının yetersiz olduğu alanlarda daha önemli bir konuma getirmektedir (Ali ve Rajput 1977).

Ülkemizde yapılan birçok araştırma sonucu, tritikalenin verim potansiyelinin buğdaya yaklaştığını göstermektedir. Bu durum yüksek rakımdan dolayı buğday veriminin düşük olduğu alanlarda ve hastalık problemleri ile karşılaşılan tarım alanlarında ticari amaçlı tritikale tarımına olanak sağlamaktadır (Yağbasanlar 1987).

Arpa ve buğday gibi serin iklim tahıllarına göre olumsuz iklim ve toprak koşullarına daha dayanıklı olması ve stres koşullarına verimi daha yüksek olması tritikalenin marjinal alanların değerlendirilmesinde en büyük pay sahibi olmasını sağlamıştır. Bunun yanında bitki boyunun uzun olmasına karşın sağlam ve kolay hasat edilebilir olması, buğdaya göre daha az kardeşlenmesi ve çavdarda olduğu gibi başaklarının daha kılçıklı olması dikkati çekmektedir (Müntzing 1989; Mergoum vd. 1992; Kün 1996; Sachs vd. 1999).

Tritikale diğer serin iklim tahıllarına oranla topraktan daha verimli şekilde yararlanmakta ve değişen çevre şartlarına karşı daha dayanıklı olabilmektedir. İçerdiği yüksek oranda lisin sebebiyle insan ve hayvan besini olarak kullanılma özelliğine sahiptir (Yağbasanlar 1987). Buğday yetiştirilmesine uygun olmayan kışların sert geçtiği, kıraç ve derinliği az olan topraklarda buğdaydan daha verimli olabilmektedirler.

Bütün bu ayrıntılar göz önüne alındığında, ülkemizde son derece sınırlı şekilde yetiştirilen tritikale, ülke genelindeki elverişsiz alanların değerlendirilmesinde, hayvan yemi sektöründe hammadde olarak kullanılmasında, büyükbaş hayvancılık işletmelerinin silaj hammaddesi ihtiyacının karşılanmasında, buğday ve arpa ürünlerine bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

Klasik bitki ıslahı araştırmalarından elde edilen sonuçlar kullanılarak yüksek verim ve kaliteye sahip birçok çeşit geliştirilmiş ve insanların hizmetine sunulmuştur. Buna rağmen başta hastalık ve zararlı olmak üzere bazı biyotik ve abiyotik çevresel baskılara karşı dirençte henüz arzu edilen sonuç büyük ölçüde elde edilememiştir. Klasik bitki ıslahı yöntemleri ile hedeflenen başarı, üzerinde çalışılmakta olan populyasyondaki genetik varyasyon ile doğru orantılıdır ve populyasyondaki farklılığın daha da yükseltilmesi sağlanmalıdır. Gen havuzunun daralması ile tür içindeki çeşitliliğin belirli ölçüler içinde kalması, klasik ıslah çalışmalarıyla edinilebilecek biyolojik verim artışını da sınırlandırmaktadır.

Günümüzde bitki ıslahçıları bir takım biyoteknolojik yöntemlerden faydalanma eğilimindedirler. Bu biyoteknolojik yöntemlerin, biyotik ve abiyotik etkilere dayanıklılığı, yüksek verimlilik özellikleri göstermesi arzu edilen bir durumdur. Özelliklerinden bahsettiğimiz ve biyoteknolojik uygulamalar deryasının önemli bir parçası olan uygulama doku kültürü uygulamasıdır.

Bütün bir bitki, süspansiyon hücreleri veya kallus hücreleri veya meristematik hücreler, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni bir doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi), steril koşullarda ve yapay bir besi ortamında üretilmesi, bitki doku kültürü olarak adlandırılmaktadır (Murashige 1974; Ammirato 1983).

Doku kültürü için çeşitli araştırmacılar tarafından bazı besi ortamları geliştirilmiştir. Bunlar; 1934'te White (W), 1962'de Murashige ve Skoog (MS), Morel ve Müller 1964'te (MM), 1965'te Halperin ve Watherell (HW), 1965'te Linsmaler ve Skoog (LS), aynı yıl Nitsch ve Nitsch (NN), 1968'de Gamborg vd. (B5), Schenk ve Hildebrandt 1972'de (SH), Chu vd. 1975'te (N6), Lloyd ve McCown 1981'de (WPM)'dir. Bu besi ortamlarından en çok kullanılanı MS ve B5 besin ortamlarıdır. Bu ortamlar bitki rejenerasyonu için gerekli olan mikro ve makro elementleri içerir. Enerji kaynağı olarak şeker katılaştırıcı olarak ise agar kullanılmaktadır.

Doku kültüründeki temel amaç, çeşit geliştirmek, yeni gelişmiş çeşitlerin çoğaltılması ve zor olan türlerin üretimi şeklindeyir. Bütün bir bitki rejenerasyonu,

bitkilerden izole edilmiş kök, çiçek, sürgün, yaprak, hatta organize olmamış kallus gibi dokulardan sağlanabilmektedir. In vitro ortamda hücre ve dokulardan sürgün rejenerasyonu sürecinin başarıya ulaşabilmesi için uygun eksplant seçilmeli, uygun ortam belirlenmeli ki bu ortam büyümede aktif maddeleri içermeli ve fiziksel koşullar uygun olmalıdır (Murashige 1974; Ammirato 1983).

Tahıl ıslahında kullanılan biyoteknolojik uygulamalardan etkili bir şekilde yararlanabilmek için doku ve hücre kültürlerinden iyi bir rejenerasyon yönteminin oluşturulması gerekmektedir. Bu nedenle doku ve hücre araştırmalarının başarısı güvenilir bir bitki rejenerasyonu işlemine bağlıdır (Murashige 1974; Ammirato 1983).

Bitki rejenerasyonu, bitkinin organ, hücre, meristem, doku veya embriyo gibi çeşitli parçalarından (eksplant) yeni bitki veya bitkiler meydana gelmesi olarak bilinmektedir. Bitki rejenerasyonu, kotiledon, yaprak sapı, embriyo, yumurta hücreleri, hipokotil, yumurta dokusu, gövde, çiçek taç yaprakları, yaprak, genç tomurcuklar, sürgün ucu ve kök gibi çeşitli parçacıklardan yapılabilmektedir.

Çeşitli araştırma sonuçları başarılı bitki rejenerasyonlarının, genç salkımlardan (Can vd. 2000), başaklardan (Ting vd. 1981), apikal meristemlerinden (Zhang vd. 2002; Sairam vd. 2003), kavuzlardan (Suprasanna vd. 1986), olgunlaşmamış embriyolardan (Ahloowalia 1982; Bohorova vd. 1995), fide parçalarından (Santos vd. 1984), olgunlaşmamış çiçeklerden (Pareddy ve Petolino 1990), yaprak parçalarından (Conger vd. 1987; Ray ve Gosh 1990; Ahmadabadi vd. 2007) ve olgunlaşmamış saçaklardan (Rhodes vd. 1986; Songstad vd. 1992), oluşan kalluslardan oluştuğunu göstermektedir.

Çeşitli araştırmalara göre, bitki rejenerasyonu için olgun olmayan embriyodan meydana getirilen kalluslar, diğer bitki parçacıklarından oluşan kalluslardan daha iyi sonuçlar alınmıştır (Özgen vd. 1996; Huang ve Wei 2004). Olgun olmayan embriyoların eksplant kaynağı olabilmeleri için donör bitkinin belli aralıklarda eksplant kaynağı sağlaması ve kışlık türlerde vernalizasyon ihtiyacının karşılanması için seralara ve kontrollü deneme ortamlarına ihtiyaç hissedilmektedir. Olgunlaşmış embriyolar senenin her dönemi bulunabilmektedir, kültüre alınması nispeten kolaydır ve bol

miktarda temin edilebilmektedirler. Bütün bu özellikler onların olgun olmayan embriyolara göre daha avantajlı olmalarını sağlar (Özgen vd. 1998). Ayrıca, endospermdestekli kallus oluşum yöntemi gibi bazı yeni teknikler, olgun embriyo kültürlerinden kallus oluşturmada daha başarılıdır (Bartok ve Sagi 1990; Ahmed vd. 1992; Özgen vd. 1996; Özgen vd. 1998). Bununla birlikte, doku kültürü teknikleriyle meydana getirilen bitkilerin kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve dış ortama adaptasyon aşamaları başarılı bir şekilde yapılmakta ve olgun embriyolarda daha yüksek olmayan rejenerasyon oranı, kallus ve sürgün oluşumunu yönlendiren büyüme düzenleyicilerin kullanımı ile yükseltilebilmektedir (Özgen vd. 1998).

Büyüme, bitkiler için oldukça mühim bir fizyolojik olaydır. Uzun zaman bitkilerin büyüme mekanizmaları ile ilgili olarak detaylı bilgi sağlanamamıştır. Daha sonraları bitki muhteviyatı içerisinde bulunan ve bitki büyümesini destekleyen maddelerin sentezlendiği anlaşılmış ve bunlara hormonlar denilmiştir. Zaman içerisinde yapılan çalışmalarla bitkide sadece büyümeyi sağlayan maddelerin değil, büyümeyi engelleyen maddelerinde sentezlendiği gerçeğine ulaşılmıştır. Aynı bitki içerisinde hem büyüme hem büyümeyi engelleyen maddelerin oluşu hatta aynı maddenin değişik zamanlarda ve yoğunluklarda verildiğinde değişik sonuçlar bulunduğu ortaya çıkmıştır (Westwood 1993).

Doğal büyüme düzenleyicileri iki grup şeklindedirler. Köklenmeyi, hücre gelişimini ve kallus oluşumunu görev olarak üstlenmiş olan oksinler ve bitki rejenerasyonu ve yeniden farklılaşmadan sorumlu sitokininlerdir.

Oksinler, doğal oksinler ve sentetik oksinler olmak üzere iki başlıkta incelenebilir.

Doğal oksinler, fenil asetik asit, 4-CPA (4-chloro-indole asetik asit) ve IAA (Indoleacetic acid) olarak karşımıza çıkar.

Sentetik oksinler, 2,4,5-TP (2,4,5-trichlorophenoxy propionic acid), NAA (Naphtaleneacetic acid), 3-CPA (3-chlorophenoxypropionamide), 2,4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid), 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid), BNOA (β -naphthoxyacetic acid), IBA (Indolebutyric acid) vb.'den meydana gelirler (George 2008).

2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), kallus oluşumunu başlatmak amacıyla yaygın olarak kullanılan sentetik bir oksindir. 1940'ların ortalarında Amerika Kimyasal Kozmetik A.Ş. tarafından üretilmiştir ve ana bileşimi asittir (Keller vd. 1994). 2,4-D klorofenoksi bileşikler grubuna yani klorlandırılmış fenoksi asit grubuna dahildir. Beyaz pudra görünümündedir (Hayes ve Laws 1991).

Bu çalışmanın amacı, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına bağlı Erzurum Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiş olan Ümran Hanım tritikale çeşidine uygulanan farklı dozlarda 2,4- Diklofenoksiasetik asit (2,4-D)'in kallus ve embriyogenik kallus oluşumuna olan etkilerinin incelenmesidir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yaptığımız çalışma konusu ile daha önce tritikale ile yapılan çalışmalardan benzerlik durumlarına göre baktığımızda yapılmış çalışma sayısı az olduğu için tritikale dışında farklı bitki türleri ilgili yapılmış çalışmalar ve sonuçlarından bahsedilecektir.

Ozias-Akins and Vasil (1983), Gamborg B5 ortamında 2,4-D'nin değişik dozlarının (0; 0,4; 1,0; 4,0 ve 8,0 mg/l) kallus gelişimi ve oluşumu ile ilgili etkilerini çalışmışlardır. Araştırmacılar 2,4-D dozundaki artışla beraber eksplant başına hücre sayısının ve kallus taze ağırlığının yukarı yönlü değişimi ve 2,4-D'nin 2 mg/l ve daha yüksek dozlarında büyümenin düzensiz olması, ancak hücre bölünmesinin yukarı yönlü değişimi aynı zamanda kallus oluşumu ve gelişimi için 2 mg/l 2,4-D dozunun en verimli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sitolojik çalışmalarda, asetokarmin boyama yöntemi kullanılarak hazırlanmış preparatlarla, kromozom sayısının değişmediğini ($2n=6x=42$) göstermişlerdir.

Felföldi ve Purnhauser (1992), 3 tritikale ve 44 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından kallus oluşumunu araştırmak üzere 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Genotiplere bağlı olarak kallus oluşumunda belirgin bir değişiklik görülmemiştir. Daha sonra kalluslar bitki rejenerasyonu sağlanmak üzere hormon içermeyen MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Rejenerasyon yeteneği buğdayda %1-90 oranında (ortalama %40) iken tritikalede bu oran %5-84 (ortalama %38) olarak gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, buğdayda embriyogenik kallus benzeri kalluslar %0-39 oranında (ortalama %4), tritikalede ise %0-81 oranında (ortalama %32) gözlemlenmiştir.

Bahieldin vd. (2000), dikambanın 3 farklı konsantrasyonunun (0,5; 0,1 ve 0,02 mg/l) uygulandığı üç yazlık buğday çeşidinin rejenerasyonu üzerinde etkisinin araştırıldığı bir çalışmada üç çeşitte de 0,5 mg/l'lik dikambanın kallus oluşumu üzerine etkisinin önemli derecede yüksek olduğunu gözlemlenmiştir. Buna karşın rejenerasyon oranı varyeteye bağlı olup, tüm çeşitlerde dikamba'nın 0,02 mg/l konsantrasyonunun en yüksek rejenerasyon oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Popelka ve Altpeter (2001), kendilenmiş üç çavdar hattının olgun olmayan embriyolarını MS ortamında oksin ve karbonhidrat kaynaklarının değişik dozlarında kültüre almışlardır. Yapılan çalışmalarda karbonhidrat kaynaklarının kallus oluşumu üzerine etkili olmadığını, dikamba ve pikloram içeren ortamlara nazaran 2,4-D içeren ortamın daha önemli olduğu tespit edilmiştir. Eksplant kaynağı olarak endosperm destekli olgun embriyo kullanılması halinde, somaklonal varyasyon oluşumunun önce yüksek konsantrasyonda uygulanan 2,4-D gibi oksinlerin eklendiği ortamlarda olduğu gözlemlenmiştir.

Vikrant ve Rashid (2001), tritikalenin olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyolarını N6 ve MS ortamlarında, farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D ile (4.5, 9.0, 18.0 ve 22.5 µM) kültüre almışlardır. MS ortamında en verimli kallus oluşumunu 2,4-D'nin 9.0 µM dozunda gösterdiğini, buna karşın N6 ortamında ise en yüksek kallus oluşumunun 2,4-D'nin 18 µM dozunda oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Naqvi vd. (2002), mısırdaki (*Z. mays* var. EV-2097) değişik dozlarda 2,4-D (1, 2 ve 3 mg/l) ile çalışmışlardır. İnkübatörde 25±3°C sıcaklıkta 1 ay tutularak kallusların oluşması sağlanmıştır. 1 aylık sürenin akabinde hormon olmayan ortamlara alınmış ve petripler iklimlendirme dolabında 25±3°C sıcaklık ve 8 saat karanlık- 16 saat ışık fotoperiyot protokolü ile 3 hafta tutulmuştur. Alınan sonuçlara göre kallus oluşum oranı, en az 1 mg/l 2,4-D (%16) sonra 3 mg/l 2,4-D (%18) ve en çok 2 mg/l 2,4-D (%47) konsantrasyonlarında gözlenmiştir.

Vikrant ve Rashid (2002), DT-46 tritikale çeşidinin olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyolarından oluşturulan kalluslardan somatik embriyogenesisin oluşumunu 2,4-D büyüme düzenleyicisi içeren (9-25 µM) MS ve N6 ortamı üzerinde çalışmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucu gösterdi ki, embriyogenik kallus oluşumunun olgun olmayan tritikale tohumlarından alınan embriyolardan daha iyi olduğu görülmüştür. 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak eksplantlarından kallus oluşumu görülemedi, tam tersi sürgün gelişimi bulunmuştur. MS ortamına göre daha fazla somatik embriyogenesis N6 ortamı üzerinde oluşumunun olduğu bildirilmiştir. 2,4-D içermeyen MS ortamı üzerinde embriyogenik tritikale

kalluslarından bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir.

Przetakiewicz et al. (2003), Triticale, buğday ve arpa ile yaptıkları çalışmada, olgunlaşmamış embriyoları B5 vitamini + %3 sakkaroz + MS tuzları ihtiva eden kültür ortamında 3 değişik oksin tipinin (pikloram,2,4-D,dikamba) 3 mg/l dozlarını ve kombinasyonları (1,5 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l dikamba; 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l pikloram; 1,5 mg/l dikamba + 1,5 mg/l pikloram) ile çalışarak bitki rejenerasyonu ve kallus oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışma neticesinde, genotipe göre değişkenlik gösteren oksin dozu ve tipinin olduğunu saptamışlardır.

Gürcan (2003), Ayva (*Cydonia oblonga* Mill. Cu "ekmek"), erik (*Prunus domestica* L. Cu "Stanley"), elma (*Malus x domestica* Barkh. Cv. "Gloster"), vişne (*Prunus cerasus* L. Cu "Kütahya"), kayısı (*Prunus armeniaca* L.cu "Şekerpare"), ceviz (*Juglans regia* L. "Kaman"), fındık (*Corylus avellana* L. Cu "Tombul"), Armut (*Pyrus communis* L. Cu "Ankara"), kiraz (*Prunus avium* L.cu "Dalbastı") ve limon (*Citrus limon* L. Burm. Cu "Kara limon")'da dişi organ dokularından stil, stigma ve ovaryumdan kallus oluşumu ve somatik embriyo oranları üzerine, 2,4-D oksininin 1,3 ve 5 mg/l dozları üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar erik hariç tüm türlerde özellikle 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisinde, kallus oluşumları gözlenmiştir.

Fazeliensasab vd. (2004), Buğday genotiplerinde farklı dozlarda ABA'nın olgun embriyo kültürü üzerine etkisinin incelendiği bir araştırmada olgun embriyolar MS ortamında 10 mg/l 2,4-D'ye ilave olarak 30 g/l sükroz ve 0,2,4,6 ve 8 mg/l ABA içeren ortama konulmuştur. Kültür türleri arasında kallus gelişmesi bakımından farklılıklar bulunduğu gözlemlenmiştir. Oluşan kalluslardan bitki rejenerasyonu için 1 mg/l benzylaminopurine (BAP) ve 0,5 mg/l IAA içeren MS ortamına aktarılarak araştırma sonucunda ABA ilavesinin oksin etkinliğini azalttığı bitki rejenerasyonu ve kallus oluşumunu azaltıcı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Zapata vd. (2004), arpada olgun embriyo kültüründe SH, MS, J 25-8 ve N6 ortamlarında çalışmışlardır. 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kallus oluşum oranı %35 iken en fazla kallus oluşumu %75,5 ile 2 mg/l 2,4-D içeren J 25-8 ortamında

görülmüştür.

Huang ve Wei (2004), Çin'de yetiştirilen 7 mısır hattında (Su1, C8605, 478, Qi319, 8112, Mol7 ve Zea mays 9046), kallus oluşum oranlarının in vitro koşullarda belirlenmesi üzerine araştırmalar yapılmıştır. Kallus oluşum ortamı hazırlanırken, B5 vitaminleri, 8 g/l agar, N6 bazal tuzları, 690 mg/l prolin, 30 g/l sakkaroz, 2 mg/l glisin, 1 g/l kasein hidrolizat, kullanılmıştır. Bununla birlikte, kallus oluşumundaki farklılıkları gözlemek amacıyla değişik konsantrasyonlarda 2,4-D (0, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l) oksini kullanılmıştır. 27°C karanlıkta 3 hafta süreyle bekletilen mısır embriyolarının, kallus ağırlığı ve kallus oluşumu değerleri incelenmiştir. En yüksek kallus gelişimi, 9046 ve C8605 mısır hatlarında gözlenmiş olup kallus oluşumu, %28,5 ile %97,6 arasında bulunmuştur. Kallus oluşumu için en ideal oksin ve dozu 4 mg/l 2,4-D olarak görülmüştür. Ayrıca konsantrasyonları yüksek olan 2,4-D dozlarının (5 mg/l 2,4-D ve üstü), kallus kalitesini ve kallus oluşum sayısını önemli ölçüde değiştirmeyeceği ve hatta yüksek dozlardaki 2,4-D'nin somatik mutasyona neden olabileceği vurgusu yapılmıştır.

Zale vd. (2004), yaptıkları çalışmada, *Triticum tausschii*, *Aegilops speltoides* ve *Triticum monococcum* bitkilerine ait 47 farklı buğday çeşidi ile ıslah hatlarında, olgunlaşmış embriyolardan rejenerasyon kapasitesi ve kallus oluşumu araştırılmıştır. UC 1036 (HRS), Jageer (HRW), Scarlet (HRS), Tara (SWS), Zak (SWS) ve Kyle durum buğday genotiplerinde Bobwhite ve Fielder kültür çeşitlerine göre daha fazla bitki rejenerasyonu ve kallus oluşumu görülmüştür. Kallus oluşumu ile rejenerasyon kapasitesi arasında 0.39 kallus oluşumu ile kültür arasında ise 0.42 gibi bağlantılar görülmüştür.

Özgen (2006), Tritikale (*x Triticosecale* Wittmack)'den elde edilen yaprak eksplantları ve olgun embriyolar, β -glukuronidaz (GUS: *uidA*) işaret genini içeren pBI221.23 plazmidi ile kaplanmış ve hızı arttırılmış tungsten ve altın parçacıkları ile bombardıman edilmiştir. Hedef eksplantlara olan farklı bombardıman mesafeleri (6, 9, 12, cm) ve farklı kırılma-diski basınçları (900, 1100, 1550 psi) fiziksel parametreler olarak kullanılmıştır. β -glukuronidaz gen ifadesinin olduğu mavi hücreler histokimyasal

bir analiz ile belirlenmiştir. Bombalanan explantlardaki mavi nokta sayılarındaki varyasyon gen transfer etkinliğinin belirlenmesinde ölçüt olarak kullanılmıştır. Tritikale'ye, partikül bombardımanı tekniği ile doğrudan gen aktarımında; olgun embriyoların yapraklardan daha iyi, altının ise tungstenden daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada en iyi sonuç alınan olgun embriyolara, kırılma-diski basıncının 1100 psi, bombardıman mesafesinin 6 cm olduğu belirtilmiştir.

Bezirganoğlu (2006), olgun embriyodan etkili bir kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu sistemini geliştirmek ve çavdar genotiplerinin doku kültürüne tepkilerini belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada çavdarın diploid ve tetraploid formlarının olgun embriyoları kullanmıştır. Bu çalışmada iki oksin tipinin (2,4-D dikamba) ve bunlara ait 3 farklı dozun (2,5mg/l;3mg/l;3,5mg/l) kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon kapasitesine olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre embriyogenik kallus oluşumu diploid genotipte tetraploiden daha yüksek olmuştur. Embriyogenik kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda dikambanın, 2,4-D'den daha etkili olduğu saptanmıştır. Doz uygulamalarında 2,5 ve 3,0 mg/l'nin hem embriyogenik kallus oluşumu hemde bitki rejenerasyonu kapasitesi açısından optimum olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, embriyogenik kallus oluşum oranı ile embriyogenik kallus sayısına göre rejenerasyon kapasitesi arasında önemli ve negatif, kallus sayısına göre rejenerasyon kapasitesi ile embriyogenik kallus sayısına göre rejenerasyon kapasitesi arasında ise pozitif bir ilişki tespit edilmiştir.

Çabuk (2010), İn vitro ve in vivo şartlarında yapılan araştırmanın in vitro kısmında, 6 değişik 2,4-D konsantrasyonunun (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/l) mısır çeşitlerinde bitki rejenerasyonuna ve kallus oluşumuna etkileri incelenmiştir. İn vivo kısmında ise, tüm mısır çeşitlerinin kalluslarından meydana gelen kök ucu kısımlarından numuneler alınarak, mısır hatlarının kromozom sayılarında meydana gelen farklılıkları araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, değişik konsantrasyonlarda, farklı mısır çeşitlerine 2,4-D büyüme düzenleyicisinin muamele edilmesi ile elde edilen kök uçlarının mikroskopik gözlemleri sonucunda, 10 mg 2,4-D uygulanan Pioneer 34N24 (2n=19), Pioneer 31N27 (2n=18) ve Pioneer 34N24 (2n=19) mısır çeşitlerinin kromozom sayılarının değiştiği görülmüştür. 2,4-D uygulanmasıyla gözlenen mitotik

anormalliğin aneuploidi (genomdaki kromozomların sayısının değişmesi) olduğu ve kromozom sayısının azalması (hipoploidi) şeklinde meydana geldiği belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, Türkiye’de yapılabilecek olan transgenik mısır elde etme çalışmalarında da kullanılabilir en yüksek kallus oluşturma oranını sağlayan ancak kromozomal sapmalar oluşturmayan 2,4-D dozunun, 2 mg/l olduğu belirlenmiştir.

Doğan (2010), Doku kulturu çalışmalarında sıklıkla kullanılan sentetik oksinler grubundan 2,4-D ve yeni kullanılmaya başlanan picloram oksininin karşılaştırılmak suretiyle kallus oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. En yüksek kallus oluşumu gösteren 2,4-D ve picloram konsantrasyonları bulunmuştur. Bununla birlikte her iki oksinin, kallus oluşumunda yüksek verimli olarak belirlenen konsantrasyonlarının, makarnalık buğday türlerinde herhangi bir kromozom hasarına sebep olup olmadıkları sitolojik araştırmalarla incelenmiştir. Sonuç olarak doku kulturu araştırmalarında zararı en az olan bitki büyüme dunenleyicisinin bitki biyoteknolojisi alanında kullanılmasının öncelik kazandırılması sağlanmıştır. 2,4-D ve picloram bitki büyüme dunenleyicilerinin farklı 5 tekerrurunun 0,3,6,9,12 mg/l konsantrasyonları hazırlanan ve 0 dozunun kontrol grubu olarak duşnlduğ deney düzeneğinde; her iki buğday çeşidinde en iyi kallus oluşumu 2,4-D ve picloram bitki büyüme dunenleyicisinin 3 mg/l dozunda olduğu bildirilmiştir. Devam eden süreçte bu bitkilerden elde edilen kök ularından feulgen ve aseto-karmin boyalama teknikleri tatbik edilerek yapılan sitogenetik çalışma neticesinde, 2,4-D ve picloram bitki büyüme dunenleyicilerinin 3 mg/l dozundaki ortamlarda kültüre alınan akmak-79 ve Kunduru-1149 eşitlerinin kromozomlarının morfolojik yapısında ve kromozom sayısında herhangi bir deformasyona rastlanmamıştır.

Aydın vd. (2011), Buğdayda olgun embriyolar kullanılarak embriyogenik kallus oluşumunu etkileyen kriterleri belirleyebilmek amacıyla yapılmıştır. Somatik embriyo oluşumu, embriyogenik kallus, rejenerasyon kapasitesi ve kallus oluşumuna oksin tipinin, genotipin, oksinin dozunun ve jel yapıcı maddenin etkisi çok önemli olmuştur. Buğday olgun embriyo kulturu çalışmalarında jel yapıcı madde olarak kullanılan phytagel ve agar ikilisinden phytagelin daha etkili olduğu bildirilmiştir. Bitki büyüme dunenleyicilerinde ise en etkili olan dikamba olarak gözlemlenmiştir. Bitki rejenerasyon

kapasitesinin, kallus olşumunun, embriyogenik kallus oluşumunun ve somatik oluşumunun en yuğsek değerlere ulaştığı jel yapıcı, oksin ve dozu phytigel ortamında 4mg/l dozunda dikambadır. Rejenerasyon kapasitesinin en yuğsek olduğu ortam R1 (0,1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) ihtiva eden ortamdır. Rejenerasyon kapasitesine ortamın etkisi çok önemli olduğu bildirilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Araştırmada, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına bağlı Erzurum Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü stoklarından temin edilen Ümran Hanım (*xTriticosecale Wittmack*) tritikale çeşidinin olgun embriyoları kullanılmıştır.

3.1.1.1. Kullanılan Tritikale çeşidi ile ilgili genel özellikler

3.1.1.1.1. Islah edildiği yer ve tarih

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına bağlı Erzurum Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından, 31.03.2010 tarihinde ıslah edilmiştir.

3.1.1.1.2. Morfolojik özellikler

Başakları kılçıklıdır ve sarı renklidir. Kırmızı renkte tanelidir, taneleri dolgun ve iridir.

120-130 cm'lik bitki boyları vardır. Yatmaya dayanıklıdır ve sağlam saplara sahiptir.

3.1.1.1.3. Teknolojik özellikler

Hektolitre ağırlığı 72-78 kg/hl, bin dane ağırlığı 35-46 g, protein içeriği %10-16, ham yağ oranı %1,5-2,5, ham selüloz oranı %1,8-2,3, ekmek hacmi 714 cm³, gluten oranı %30,3 şeklinde bilinmektedir.

3.1.1.1.4. Tarımsal özellikler

Arpaya alternatif bir yem bitkisidir, kesif yem bitkisi olarak kullanılabilir. Diğer yem bitkilerine göre avantajlıdır çünkü tek yıllık bir bitkidir. Orta erkenci, kışa soğuğa dayanıklı ve mutlak kışlıktır. Kardeşlenmesi iyi, arpa ve buğdaya göre kıraç koşullar daha verimlidir. Gübreye karşı reaksiyonu iyidir.

3.1.1.1.5. Hastalık ve zararlı durumu

Başak hastalıklarından rastık (*Ustilago tritici*) ve sürmeye (*Tilletia foetida*)'ya karşı dayanıklıdır. Yaprak ve sap hastalıklarından; kahverengi pas (*Puccinia recondita*), kara pas (*Puccinia graminis*), Sarı pas (*Puccinia striiformis*) ve külleme (*Erysiphe graminis*) karşı dirençlidir.

3.1.1.1.6. Yetiştirme tekniği

Ekim sıklığı m²'ye 400-450 tohum olacak şekilde ayarlanmalıdır. Mutlak kışlık olduğundan ekim kıştan önce tavsiye edilen zamanda yeşertme olarak yapılmalıdır. Ekim iyi hazırlanmış tarlaya mibzerle yapılmalıdır. Dekara 18-20 kg tohum kullanılmalıdır. Gübrelemede saf madde olarak 6 kg fosfor ekimle birlikte; 3 kg azot ekimle birlikte ve 3 kg ise sapa kalkma zamanında verilmelidir. Kardeşlenmeden sonra sapa kalkmadan önce yabancı ot mücadelesi yapılmalıdır.

3.1.1.1.7. Ekim için tavsiye edilen bölgeler

Yapılan bölge verim çalışmaları sonucunda soğuğa ve dona dayanıklılığı, kurağa ve sıcağa dayanıklılığı, kıraç şartlarda tarıma elverişliliği, yüksek verim ve kalite özelliklerinden dolayı Orta Anadolu'nun yüksek kesimleri, İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgesinin kıraç alanlarına tavsiye edilmektedir.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları

- a) Hassas Terazi: dış etkenlerden etkilenmemesi amacıyla özel cam paravanla korunan hassas terazi kullanılmıştır.
- b) Steril Kabin: Sürgülü Cam kapaklı, U.V. lambalı ve hava filtresi olan steril kabin MS ortamının hazırlanmasında, ortamlara ekim yapılmasında kullanılmıştır.
- c) Karıştırıcı (Vortex): Manuel olarak ayarlanabilen farklı hız kademelerine sahip masa tipi karıştırıcı (vortex), hazırlanan solüsyonların karıştırılması için kullanılmıştır.
- d) pH Metre: Hazırlanan solüsyonların pH'sını ölçmek ve istenen ölçüde ayarlama yapılması amacıyla pH metre kullanılmıştır.
- e) Manyetik Karıştırıcı: pH metre ile ayarlama yapılırken eklenen asidik yada bazik kimyasalların solüsyona karıştırılması için kullanılmıştır.
- f) Cam Malzemeler: 1lt'lik erlen, 500 ml'lik erlen, 250 ml'lik beher, cam huni kullanılmıştır.
- g) Buzdolabı: +4-+8°C iç sıcaklığına ve dondurucu özelliğine sahip olan buzdolabı kimyasalların muhafazası için kullanılmıştır.
- h) Otoklav: Ekim yapmak için kullanılan cam malzemelerin ve distile su hazırlamak amacıyla kullanılmıştır.
- i) Büyütme Kabini: Ayarlanabilir nem, sıcaklık ve karanlık-aydınlık süre özelliklerine sahip büyütme kabini ekimi yapılan örneklerin istenen ortam özelliklerinde bekletilmesi için kullanılmıştır.
- j) Steril filtre Kâğıdı: Eksplantların ekimi yapılırken kullanılmıştır.
- k) Petri Kabı: Eksplantların besiyerine ekilmesi için kullanılmıştır.
- l) Parafin: Ekim yapıldıktan sonra petri kabı parafin ile dış ortamdan izole edilmesi için kullanılmıştır.
- m) Bistüri: Besiyerine ekim yapılırken kullanılmıştır.
- n) Bunzen Beki: Ekim yapılırken kullanılan bistüri vs. ekipman flambajı için kullanılmıştır.

3.1.3. Kimyasallar

3.1.3.1. Sterilizasyonda kullanılan kimyasallar

Çalışmada sterilizasyon için, % 70'lik (v/v) Etil Alkol ve %1'lik Sodyum Hipoklorit kullanılmıştır.

3.1.3.2. Kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar

Bitki rejenerasyonu, kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis araştırmalarında, Murashige ve Skoog (1962) tuzları [Sigma M5524] ve vitaminleri [Sigma M3900] kullanılmıştır. MS ortamını oluşturan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. MS Kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları

Kullanılan Kimyasallar

| <u>Organik Maddeler</u> | <u>Miktar (mg/l)</u> |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Myo-inositol | 100 |
| Glisin | 2 |
| Nikotinic asit | 0,5 |
| Tiamin HCl | 0,1 |
| Pyridoksin HCl | 0,5 |

İnorganik Maddeler

| <u>Mikro elementler</u> | <u>Miktar(mg/l)</u> |
|--|----------------------------|
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,025 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 |
| Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O | 0,25 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,6 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 |
| KI | 0,83 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 16,9 |
| Fe ₂ (SO ₄).7H ₂ O | 27,8 |
| Na ₂ EDTA | 37,26 |

| <u>Makro elementler</u> | <u>Miktar (mg/l)</u> |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 180,7 |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O | 332,2 |
| KNO ₃ | 1900 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |

3.1.3.3. MS tuzları ve vitaminleri ile birlikte kullanılan ilave kimyasallar

MS vitaminleri ve tuzlarına ilave olarak kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan kimyasallar

| <u>Komponentler</u> | <u>Miktar/litre</u> |
|----------------------------|----------------------------|
| Askorbik Asit | 0,5 mg/l |
| MES | 1,95 g/l |
| Magnesium chloride | 0,75 g/l |
| Sükroz | 20 g/l |
| Casein hydrolysate | 0,1 g/l |
| <u>L-Glutamine</u> | <u>0,5 g/l</u> |

3.1.4. Jel Yapıcı Olarak Kullanılan Maddeler

Çalışmada jel yapıcı kimyasal olarak Phytigel (2g/l) kullanılmıştır.

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Çalışmada bitki büyüme düzenleyici olarak 2,4-Dichlorophenoxyacetic asit (2,4-D) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına bağlı Erzurum Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde geliştirilen Ümran Hanım tritikale (*xTriticosecale Wittmack*) çeşidinin olgun embriyoları kallus oluşumu için phytagel (2 g/l) içeren MS ortamında 2,4-Dichlorophenoxyacetic asit büyüme düzenleyicisinin 3 farklı konsantrasyonunda kültüre alınmıştır. Olgun embriyolar $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de aydınlık ortamda 4 hafta süreyle bekletilmiştir. Çalışmalar sonucunda bitki rejenerasyonu olup olmadığı gözlenmiştir. Çalışma yürütülmesi sırasında yapılan işlemler bu bölümde verilmiştir.

3.2.1. Sterilizasyon Teknikleri

3.2.1.1. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı

%70'lik alkolün hazırlanışı: %96'lık saf alkolden 730 ml alınmış ve hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

%1'lik Sodyum hipoklorit solusyonunun hazırlanışı: %5 NaOCl (sodyum hipoklorit) içeren ticari Domestos® marka çamaşır suyundan 200 ml alınarak hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.1.2. Kullanılan aletler ve çalışma alanının sterilizasyonu

Çalışma esnasında steril çalışma alanında kullanılan steril kabin içi çalışmaya başlamadan en az 10-20 dakika önce %70'lik alkolle silinerek UV çalıştırılmıştır. Kullanıma başlamadan önce UV kapatılmıştır. Kullanılacak aletler kullanımdan önce etil alkol ile muamele edilerek alevden geçirilerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Eksplantların alınması, otoklavlanmış kurutma kağıtları üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.3. Tohumların yüzey sterilizasyonu

Çalışmada kullanılacak tohumlar musluk suyu ile yıkandıktan sonra %70'lik etil alkolde 5-10 dakika muamele edildikten sonra çalışmanın yapılacağı steril kabin içerisinde 3-5 defa steril edilmiş saf suyla yıkanmıştır. Sonrasında 15-20 dakika boyunca içerisinde birkaç damla Tween 20 (Sigma) bulunan %1'lik ticari sodyum hipokloritte (%5 NaOCl içeren) bekletilmiştir. Saf su ile yıkanmak suretiyle 25°C su içerisinde 12-15 saat bekletilmiş ve olgun embriyoları alınmıştır.

3.2.1.4. Besi yeri ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu

Besi ortamlarının sterilizasyonu otoklav yardımıyla yapılmıştır. 15 dakika süreyle 105 kPa basınçta 121°C'de otoklavlanmıştır. Sıcaklık sebebiyle yapısal deformasyona uğrayan bitki büyüme düzenleyicileri ve vitaminler için 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreler (milipor) kullanılmıştır.

3.2.2. Kallus Oluşum Ortamı

3.2.2.1. Bitki büyüme düzenleyicilerinden stok solüsyon hazırlanması

Kallus oluşum ortamı için öncelikle kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonlarının hazırlanmasında çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasallar ile saklama sıcaklıkları ve çalışma konsantrasyonları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Bitki büyüme düzenleyicileri

| Oksin Tipi | Çözücü | Seyreltici | Saklama koşulu | Çalışma Konsantrasyonu |
|-------------------|---------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------|
| 2,4-D | Etıl alkol | Su | +4°C | 1mg/l |

3.2.2.2. Kallus oluşum ortamının hazırlanması

Çalışmada kullanılan kallus oluşum ortamı için sırasıyla verilmiş yol izlenmiştir.

1. 500 ml bidistile su 2 litrelik bir beher alınmıştır.
2. Murashige ve Skoog (1962) tuzları [Sigma M5524], 20 gram sükroz, 0.75g magnezyum klorit ve 1,95 g MES tartılıp eriyinceye kadar karıştırılmıştır.
3. Beherdekiler tamamen özününce manyetik karıştırıcı üzerinde 1N NaOH ve %15 HCl solüsyonları kullanılarak pH=5,8'e ayarlanmıştır.
4. 2 g Phytigel erlene boşaltılıp otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de sterilizasyona tabi tutulmuştur.
5. Isı ile bozulabilen maddeler otoklavdan sonra ilave edilmiştir. Bunun için 50 ml beherde MS vitamin stok solüsyonundan (1000X) 1ml, askorbik asit (50 mg/l) solüsyonundan 2 ml ve 0,5 g glutamine, 0,1 g casein hydrolystate tartılıp eklenmiş ve hacim bidistile su ile 15 ml'ye tamamlanarak karıştırdıktan sonra 0,22 µm porotizeteli selüloz nitrat filtrelerden geçirildikten sonra eklenmiştir.

3.2.3. Çalışmada Araştırılan Konular

3.2.3.1. Kallus oluşum oranı (KOO)(%)

Kallus oluşum ortamına alınan eksplantlar bu işlemden bir ay sonra kallus oluşum oranı belirlenmiştir. Bu işlem şu formül ile yapılmıştır.

$$\text{KOO (\%)} = \frac{\text{Kallus oluşan eksplant sayısı}}{\text{kültüre alınan eksplant sayısı}} \times 100$$

3.2.3.2. Embriyogenik kallus oluşumu (EKO) (%)

Eksplant sayısına ve eksplantlardan oluşan kallus sayısına göre belirlenmiştir.

3.2.3.2.1. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (KSEKO)

KSEKO= Embriyogenik kallus sayısı / toplam kallus sayısı x 100 formülü ile

belirlenmiştir.

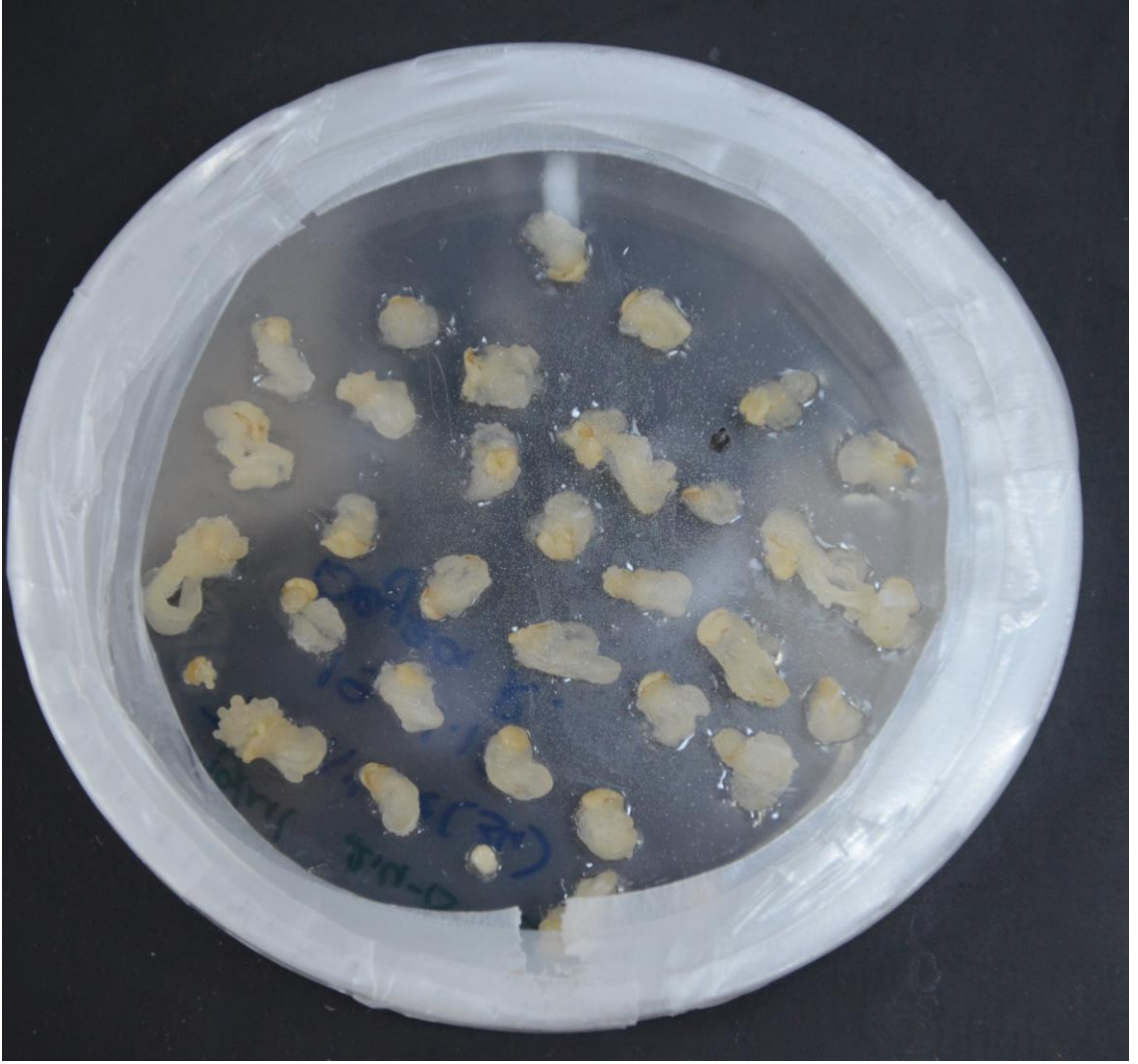
3.2.4. Bulguların İstatistiksel Analizleri

Çalışma tam şansa bağlı deneme planına göre 3 tekerrürlü yapılmıştır. Denemede tek genotip (Ümran Hanım), tek büyüme düzenleyici (2,4-Dichlorophenoxyacetic asit) ve bunların 3 farklı dozu (4.0, 8.0 ve 12.0 mg/l) kullanılmıştır. Bu faktörlerin kallus oluşum oranına ve embriyogenik kallus oluşumuna etkileri incelenmiştir. Bu amaçla her bir petri kabına 25 adet olgun embriyo konularak her bir petri kabı bir tekerrür olarak kabul edilmiştir. Gözlemler sonucunda elde edilen sayım sonuçları yüzde (%) oluşum oranı şeklinde hesaplanmış ve tam şansa bağlı deneme planı ve faktöryel deneme desenine göre varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Araştırmada incelenen parametreler arasındaki ilişkiler Pearsan Korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir.

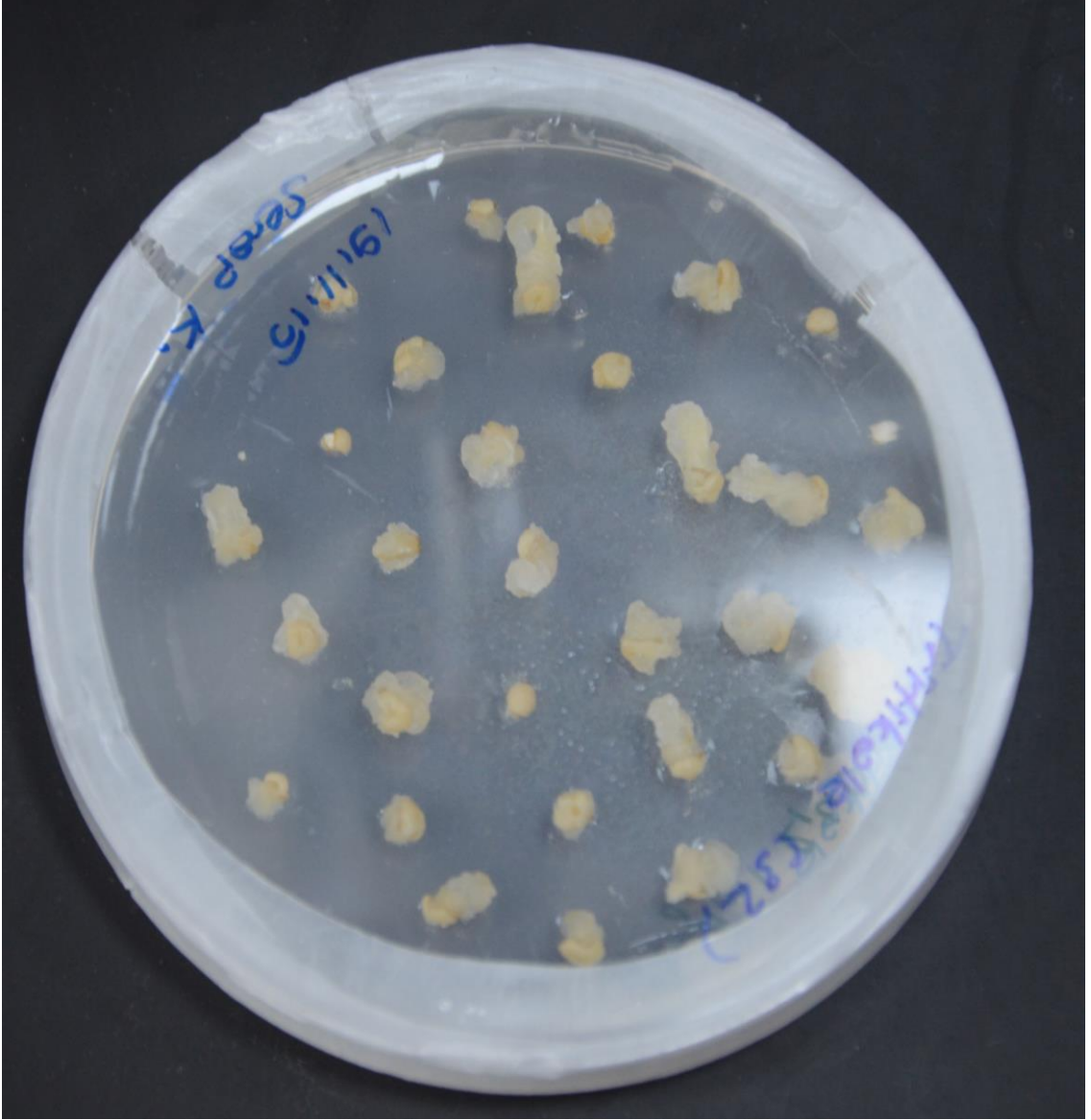
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kallus Oluşumu Oranı

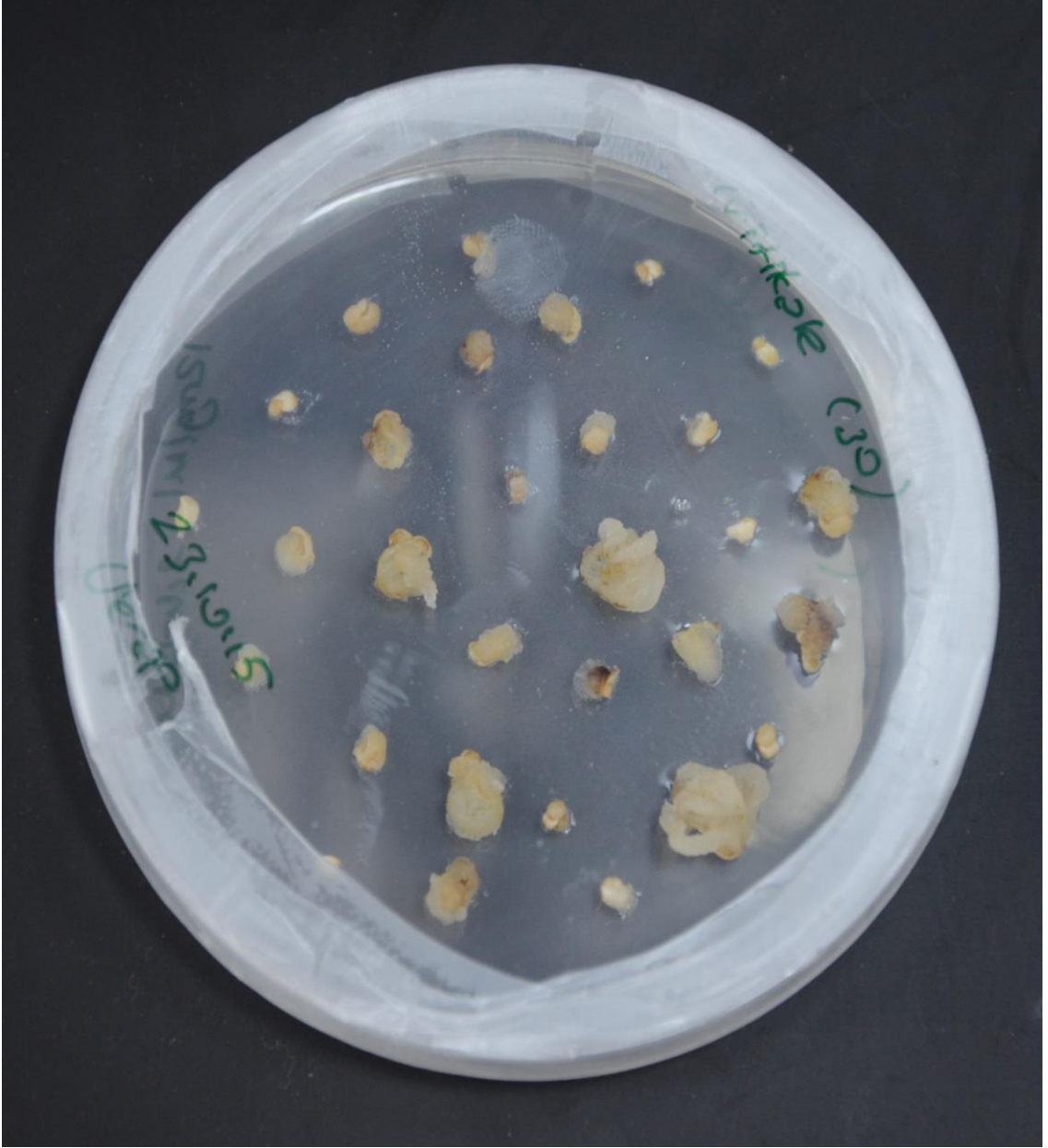
Farklı dozlarda büyüme düzenleyici bulunan kültür ortamlarına alınan eksplantlar 1 hafta sonra gözlemleri alındığında kallus oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.1.a, 4.1.b, 4.1.c ve 4.1.d). Farklı dozlardaki oksinlerin bulunduğu kültür ortamlarında oluşan kallus oranları verilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1.a. Kallus oluşum ortamına alındıktan bir ay karanlıkta bırakılarak 2,4-D' nin 4 mg/l de oluşan kalluslar



Şekil 4.1.b. Kallus oluşum ortamına alındıktan bir ay karanlıkta bırakılarak 2,4-D' nin 12 mg/l de oluşan kalluslar.



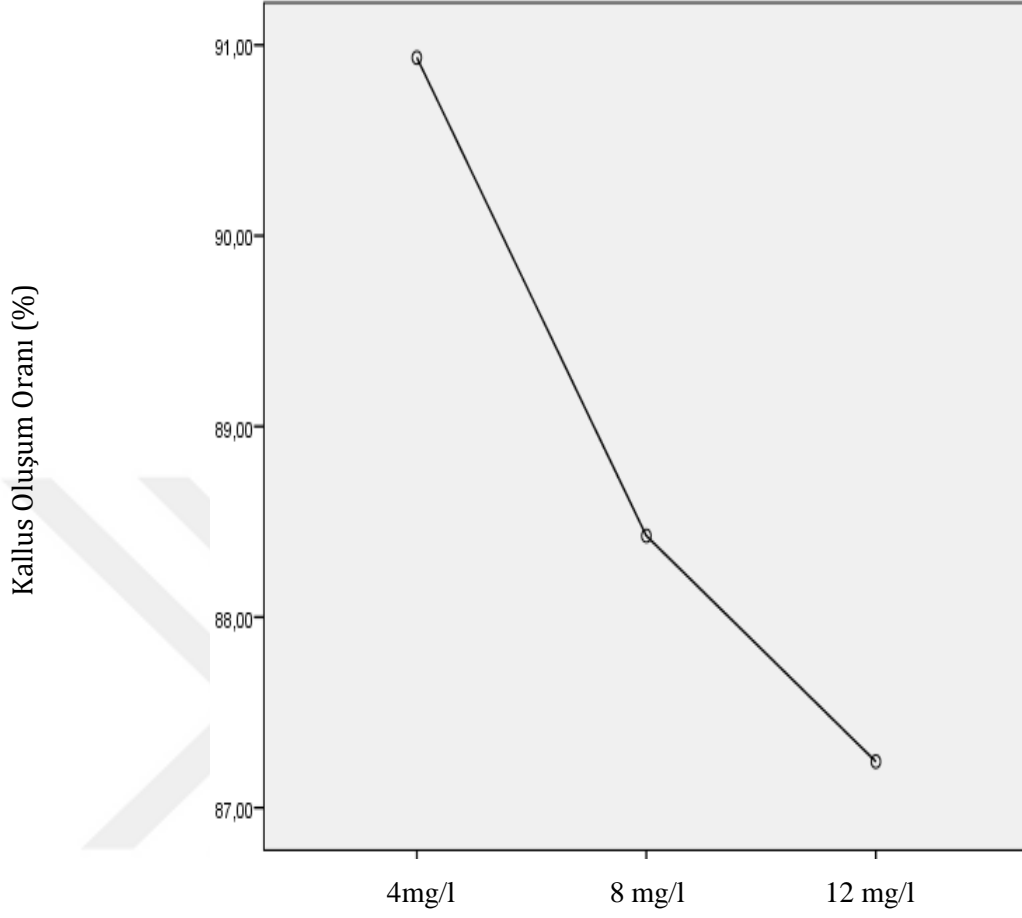
Şekil 4.1.c. Kallus oluşum ortamına alındıktan bir ay karanlıkta bırakılarak 2,4-D' nin 8 mg/l de oluşan kalluslar.



Şekil 4.1.d. Kallus oluşum ortamına alındıktan bir ay karanlıkta bırakılarak 2,4-D' nin 4 mg/l de oluşan beyazımsı, yumuşak ve sağlıklı kalluslar.

| Konsantrasyon | Kallus oluşum oranı (%) |
|----------------------|--------------------------------|
| 4 mg/l | 90,93 |
| 8 mg/l | 88,42 |
| 12 mg/l | 87,24 |
| Ortalama | 88,86 |

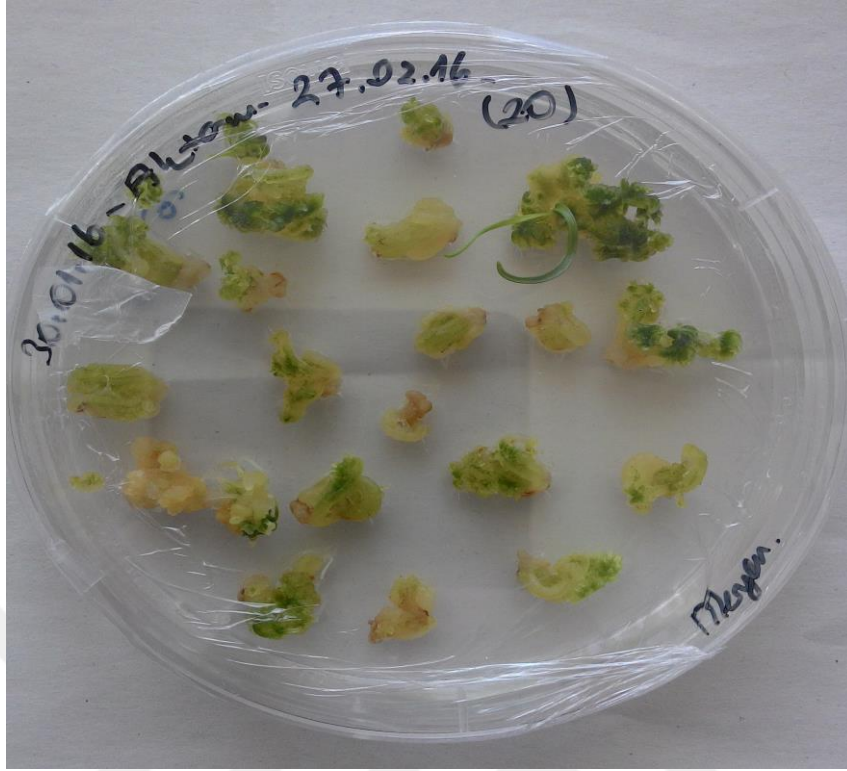
Çizelge 4.1. Farklı dozlardaki 2,4-Dichlorophenoxyacetic asit bulunan kültür ortamlarında oluşan kallus oranları



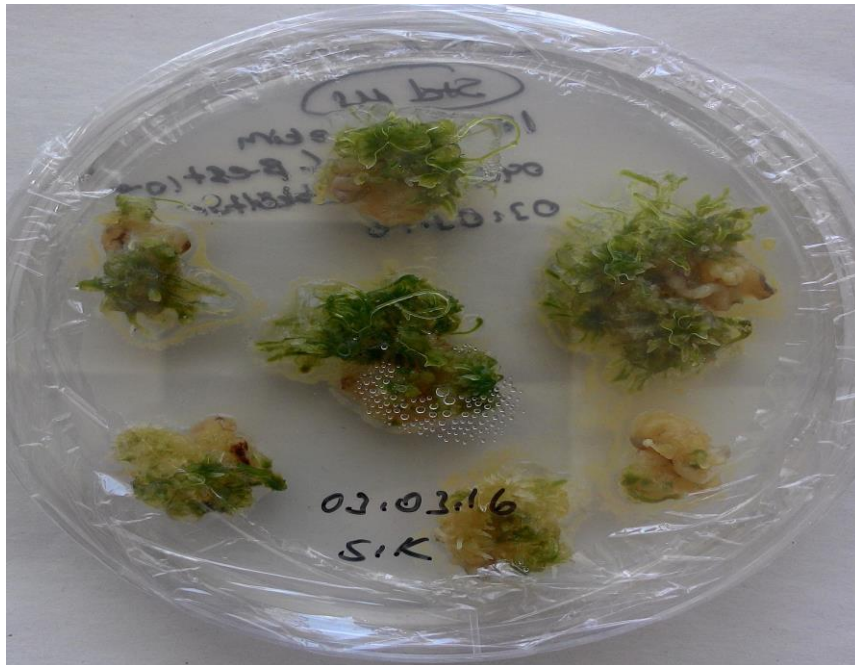
Şekil 4.2. 2,4-D'nin farklı dozlarında oluşan kallus oluşum oranı grafiği

4.2. Embriyogenik Kallus Oluşum Oranı

Eksplantlar kallus oluşum ortamına alındıktan sonra 1 ay süre ile aydınlıkta bekletilmiş ve daha sonra kallus oluşturanlar ve embriyogenik özellik taşıyanlar sayılmıştır (Şekil 4.3.a ve 4.3.b). Kallus oluşumu kültüre alınan tüm eksplantlarda %85 üzerinde gözlenmiştir. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranına ait veriler sunulmuştur.



Şekil 4.3.a Kallus oluşum ortamına alındıktan aydınlık ortamda 1 hafta sonra alınan embriyogenik özellik gösteren kalluslar.

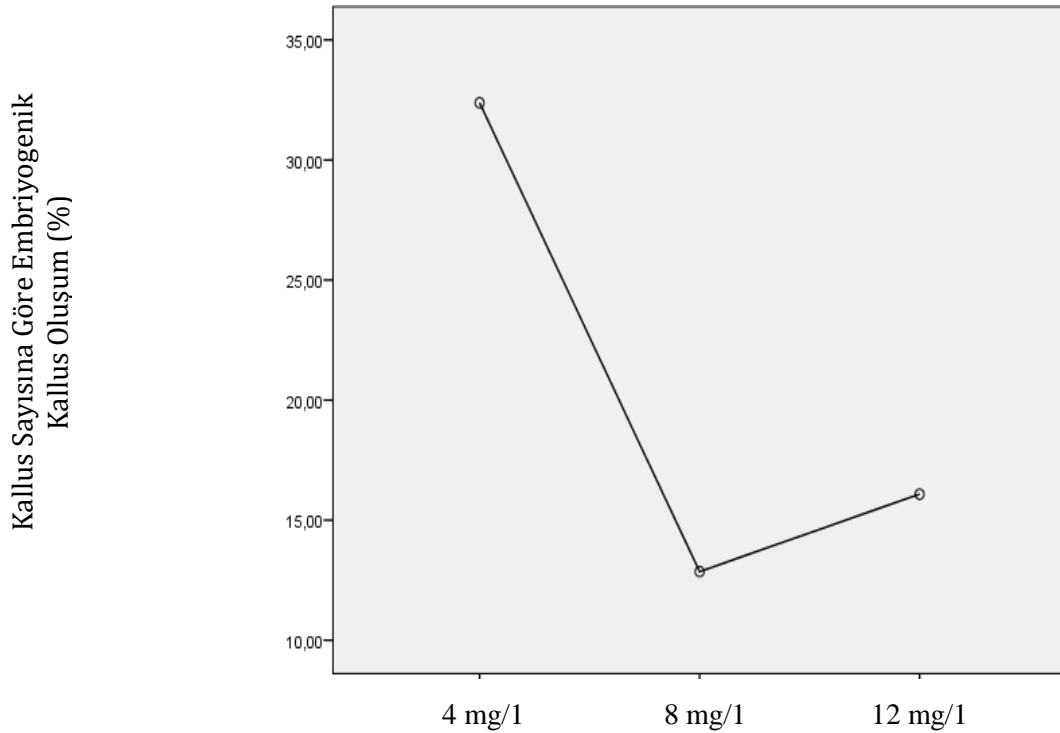


Şekil 4.3.b Kallus oluşum ortamına alındıktan bir ay aydınlıkta bırakılarak oluşan embriyogenik özellik gösteren kalluslar.

2,4-Dichlorophenoxyacetic asit'in 3 farklı dozunda oluşan embriyogenik kallus verilerine bakıldığında kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı (KSEKO) 4 mg/l dozunda %32,38 olarak belirlenmiştir. 8 mg/l dozunda %12,86 oranında ve 12mg/l dozunda ise %16,08 olarak görülmüş olup ortalama olarak %20,44 oranı bulunmuştur (Çizelge 4.2, Şekil 4.4).

| Konsantrasyon | Kallus Sayısına Göre Oluşan Embriyogenik Kallus Oluşum Oranı (KSEKO) (%) |
|-----------------|--|
| 4 mg/l | 32,38 |
| 8 mg/l | 12,86 |
| 12 mg/l | 16,08 |
| Ortalama | 20,44 |

Çizelge 4.2. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı (KSEKO)(%)



Şekil 4.4. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı (KSEKO) (%)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan popülasyonunun artması ile birlikte gelişen dünya üzerinde bitkisel üretimi kısıtlayan düşük verim ve abiyotik stress dikkate alınması gereken faktörlerdendir. Sürdürülebilir tarımsal üretim için stres faktörlerinden kaynaklanan verim kaybını minimize etmek önemlidir. Bu minimizasyonu sağlamak için doku kültürü ya da moleküler teknikler kullanılarak stres faktörlerine dayanıklı çeşit geliştirmek mümkündür. Hücre ve doku kültürü teknikleri moleküler ve hücre tabanlı özel teknolojiler kullanan bitki ve bitkisel ürünlerin verimliliğini, kalitesini arttırmak ya da abiyotik ve biyotik streslere neden olan faktörleri ortadan kaldıran dolayısıyla bitki verim kayıplarını önleyen çok etkili bir yöntemdir.

Günümüzde birçok bitki türüne ait doku kültürü ve genetik mühendisliği teknikleri kullanarak birçok çalışma yapılmış ve bilimin hizmetine sunulmuştur. Türkiye’de tritikale ıslahı üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında, klasik ıslah metotlarının kullanıldığı görülmektedir. Ülkemizde ekimi yapılan tritikale ticari çeşitleri ile *in vitro* rejenerasyon üzerine ait herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Tritikale, besin değeri yüksek, hem insan hemde hayvan beslenmesinde kullanılan bir bitkidir. Tahıllar içerisinde yem kalitesinin yüksek olması, çevre şartlarına daha dayanıklı olması nedeniyle en çok tercih edilen bir bitki türüdür (Jin at al 2010). Ayrıca tahıllar içerisinde *in vitro* rejenerasyon kabiliyeti nedeniyle doku kültürü ve genetik mühendisliği çalışmalarında en az çalışılmış bir bitki ve şu an ekimi yapılan genotipler arasında *in vitro* şartlar için uygulanan herhangi bir protokol bulunmamaktadır.

Tahılları da içeren birçok bitki türünde kallus oluşumu ve embriyogenik kallus oluşumu çalışmalarında başarı büyük ölçüde genotip, eksplant tipine ve ortam bileşenlerine bağlıdır. Olgunlaşmış embriyolardan tahılların somatik embriyogenesis etkileyen en önemli faktör genotiptir (He ve Lazzeri 2001).

Bezirganoğlu (2006), olgun embriyodan etkili bir kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu sistemini geliştirmek ve çavdar genotiplerinin doku kültürüne tepkilerini

belirlemek amacıyla yaptığı çalışmasında çavdarın diploid ve tetraploid formlarının olgun embriyoları kullanmıştır. Bu çalışmada iki oksin tipinin (2,4-D dikamba) ve bunlara ait 3 farklı dozun (2,5mg/l;3mg/l;3,5mg/l) kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon kapasitesine olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre embriyogenik kallus oluşumu diploid genotipte tetraploidden daha yüksek olmuştur. Embriyogenik kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda dikambanın, 2,4-D'den daha etkili olduğu saptanmıştır. Doz uygulamalarında 2,5 ve 3,0 mg/l'nin hem embriyogenik kallus oluşumu hemde bitki rejenerasyonu kapasitesi açısından optimum olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, embriyogenik kallus oluşum oranı ile embriyogenik kallus sayısına göre rejenerasyon kapasitesi arasında önemli ve negatif, kallus sayısına göre rejenerasyon kapasitesi ile embriyogenik kallus sayısına göre rejenerasyon kapasitesi arasında ise pozitif bir ilişki tespit edilmiştir.

Çabuk (2010), İn vivo ve in vitro şartlarda yapılan araştırmanın in vitro kısmında, 6 değişik 2,4-D konsantrasyonunun (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/l) mısır çeşitlerinde bitki rejenerasyonuna ve kallus oluşumuna etkileri incelenmiştir. İn vivo kısmında ise, tüm mısır çeşitlerinin kalluslarından meydana gelen kök ucu kısımlarından numuneler alınarak, mısır hatlarının kromozom sayılarında meydana gelen farklılıkları araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, değişik konsantrasyonlarda, farklı mısır çeşitlerine 2,4-D büyüme düzenleyicisinin muamele edilmesi ile elde edilen kök uçlarının mikroskopik gözlemleri sonucunda, 10 mg 2,4-D uygulanan Pioneer 34N24 (2n=19), Pioneer 31N27 (2n=18) ve Pioneer 34N24 (2n=19) mısır çeşitlerinin kromozom sayılarının değiştiği görülmüştür. 2,4-D uygulanmasıyla gözlenen mitotik anormalliğin aneuploidi (genomdaki kromozomların sayısının değişmesi) olduğu ve kromozom sayısının azalması (hipoploidi) şeklinde meydana geldiği belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, Türkiye'de yapılabilecek olan transgenik mısır elde etme çalışmalarında da kullanılabilir en yüksek kallus oluşturma oranını sağlayan ancak kromozomal sapmalar oluşturmeyen 2,4-D dozunun, 2 mg/l olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada Ümran Hanım genotipinin olgulaşmış embriyolarından 3 farklı dozda 2,4-D büyüme düzenleyicisi denenmiş ve büyük ölçüde başarı sağlanmıştır. Ozias-Akins ve Vasil (1983), buğdayda 2,4-D'nin farklı miktarlarının (0, 0.4, 1.0, 4.0

ve 8,0 mg/l) kallus oluşumu ve gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. En uygun dozun 2mg/l 2,4-D olduğunu söylemişlerdir. Çalışmamızda Ümran Hanım tritikale çeşidinin kallus oluşumu ve embriyogenik kallus oluşumu çalışılmış ve kallus oluşum oranı ve embriyonik kallus oluşumu 4 mg/l dozda 2,4-D oksininin sağladığı görülmüştür. Yaptığımız çalışmaya benzer yapılan çalışmalarda kallus sayısına göre embriyonik kallus oranı üzerine çalışılan genotipin etkisi önemli olduğu vurgulanmıştır (Fennel *et al.*1996; Vikrant and Rashid 2001; Rakoczy-Trajanonowska and Malepszy 1995). Bu çalışmada Ümran Hanım çeşidi kullanılmış olup oluşan kallus sayısı oranı ve kallus sayısına göre embriyogenik kallus sayısı oranı belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Eksplant kaynağına bakılmaksızın 2,4-D tritikalede kallus oluşumu ve devamlılığı için en yaygın olarak kullanılan bitki büyüme düzenleyicisidir. Bu araştırmada elde ettiğimiz bulgulara farklı olarak Vikrant and Rashid (2001), bitki büyüme düzenleyicilerin düşük konsantrasyonunun somatik embriyo oluşturmada daha etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Zapata *et al.* (2004) arpanın embriyogenik kalluslarından bitki rejenerasyonunda yüksek olmayan dozların daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular, Huang ve Wei (2004) tarafından yapılan çalışma tarafından desteklenmektedir. Huang ve Wei (2004)'ün 7 mısır çeşidinde kallus oluşumundaki değişiklikleri görebilmek amacıyla yaptıkları araştırmada, kallus oluşumu için en uygun 2,4-D dozu 4 mg/l olarak belirlenmiştir.

Tritikalenin Ümran Hanım çeşidinin olgunlaşmış embriyoları kallus ve embriyogenik kallus oluşumunu belirlemek amacı ile MS ortamında 2,4-D 'nin farklı dozlarında denemeye alınmıştır. Araştırmadan elde edilen bulgulara göre tritikalenin olgun embriyo kültürü ile ilgili çalışmalarda genotip olarak Ümran Hanım çeşidinin 2,4-D'nin üç farklı dozlarına eklenmiştir. 4 mg/l en yüksek oranın olduğu dozdur ve en düşük olduğu doz ise 8 mg/l olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışma esnasında Ümran Hanım çeşidi ve 2,4-D' nin 3 farklı dozu kullanarak somatik embryogenesis aracılığıyla embriyogenik kallus oluşumu için etkili ve tekrarlanabilir protokol optimize edilmiştir. Çalışma sonucunda geliştirilen protokol ülkemizde diğer tritikale genotipleri içinde referans olarak kullanılabilir ve gelecekte somatik melezleme ve gen aktarım uygulamaları için kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Ahloowalia, B.S. 1982. Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Science*. 22, 405-410.
- Ahmadabadi, M., Ruf, S. and Bock, R. 2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Research*. 16, 437-448.
- Ahmed, K. Z., Bartok, T. and Sagi, F. 1992. A modified method for rapid callus induction by utilization of endosperm metabolites in mature and immature seeds of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum durum* L.). *Cereal Res Commun*, 20, 81-86.
- Ali, M., P. R. Rajput. 1977. Relative performance of triticales in comparison to wheat on different dates of sowing. *Indian J. of Agron*, 22 (1): 44-45.
- Ammirato, P.V. 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures. *Suspension Culture Techniques and Hormone Requirements*. 14(1), 68-74.
- Aydın M, Sağsöz S, Haliloğlu K, Tosun M (2011) Buğdayda olgun embriyo kültürünü etkileyen faktörler. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak Dergisi*, 42 (1): 1-10
- Bahieldin, A., Dyer, W. E., Qu, R., 2000. Concentration effects of dikamba on shoot regeneration in wheat. *Plant Breeding*, 119, 437-439.
- Barriaga, P. A., Seeman, F.P., Fuentes, P. R. 1979. Comparative performance of triticale (*x triticosecale wittmack*) and wheat (*triticum aestivum* L.) genotypes in valdivia. chile. *Agro. Sur*. 7 (2): 66-74.
- Bartok, T. and Sagi, F. 1990. A new endosperm supported callus induction method for wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cul.*, 22, 37-41.
- Bezirganoğlu, İ., 2006. Çavdarda (secale cereale l.) olgun embriyodan kallus oluşumunu ve bitki rejenerasyonunu etkileyen faktörlerin incelenmesi, yayınlanmamış yüksek lisans tezi , Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bishnoi, U. R., Hughes, J.L. 1979. Agronomic Performance and Protein Content of Fall Planted Triticale, Wheat and Rye. *Agron.j.*, 71:359-360
- Bohorova, N.E., Luna, B., Brito, R.M., Kuerta, L.D. and Hoisington, D.A. 1995. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude and highland maize inbred. *Maydica*. 40, 275-281.

- Can, E., Çeliktas, N., Hatipoğlu, R. 2000. Sarı Sakalotu (*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng) bitkisinin genç salkımlarının *in vitro* kültüründe salkım uzunluğunun kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisi. Turk. J. Agric For., 24, 399- 404.
- Conger, B.V., Novak, F.J., Afza, R. and Erdelsky, K. 1987. Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. Plant Cell Reports. 6, 345-347.
- Çabuk, B.,2010. Mısırdada (*zea mays* l.) farklı 2,4-d dozlarının kallus oluşumu ve kromozomal yapıya etkisi. Yayınlanmamış Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Doğan, E.,2010. Makarnalık buğdayda (*triticum durum* desf.) farklı 2,4-d ve picloram dozlarının kallus oluşumuna ve kromozom yapısına etkisi, Yayınlanmamış Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Fazelienasab, B., Omidi, M., Amiritokaldani, M. 2004. Effects of abscisic acid on callus induction and regeneration of different wheat cultivars to mature embryo culture. www.bcpc.org/Seminars.
- Felföldi, K. and Purnhauser, L. 1992. Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. Cereal Research Communication. 20 (3-4), 273-277.
- George, E.F. 2008. Plant growth regulators I. Introduction; Auxins, Their Analogues and Inhibitors. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, 175-204.
- Gürcan, K. 2003. Bazı meyve türlerinin dişi organ dokularından somatik embriyo oluşumu. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hayes, W.J. and Laws, E.R. 1991. Handbook of Pesticide Toxicology, Volume 3 classes of pesticides, 1318-1321.
- He, G.Y. and Lazzeri, P.A. 2001. Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from Durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.) scutellum and inflorescence cultures. Euphytica. 119, 369-376.
- Huang, X.Q and Wei Z.M. 2004. High- frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). Plant Cell Reports. 22, 793-800.
- Keller, T., Skopp, G. And Wu, M. 1994. Fatal overdose of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Forensic Sci. Int. 65, 13-18.
- Kün, 1996. Tahıllar II (Sıcak İklim Tahılları). A.Ü.Ziraat Fak. Yayınları No:1452. Ders Kitabı; 432, A.Ü. Basımevi, 317s. Ankara.

- Lukaszewski, A.J., and Gustafson, J.P.D. 1987. Cytogenetics of triticale. *Plant Breed. Rev.* 5; 41-93.
- Mergoum, M. J. P. Shroyer, M. A. Monem, 1992. Potential for adapting triticale in Morocco. *Journal of Plant Breeding*. Verlag paul parey. Berlin und Hamburg. 105.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annu. Rev. Plant Physiology*. 25, 135-166.
- Müntzing, A. 1989. Triticale results and problems. *Advances in plant breeding*. Supplement to *Journal of Plant Breeding*. Verlag Paul Parey. Berlin und Hamburg. p103.
- Naqvi, S.M.S., Yasmin, T., Rashid, H., Chaudary, Z. and Quraishi, A. 2002. Callus induction from seeds of *Zea mays* var. EV-2097. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 5(9), 956-958.
- Ozias-Akins, P. and Vasil, I.K. 1983. Proliferation of plant regeneration from the epiblast of *Triticum aestivum* L. (wheat). *Amer. J. Bot.* 70, 1092-1097.
- Özgen, M., Türet, M., Özcan, S. and Sancak, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breeding*. 115, 455-458.
- Özgen, M., Türet, M., Altinok, S. and Sancak, C. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes. *Plant Cell Reports*. 18, 331-335.
- Özgen, A. M., 2006. Partikül bombardımanı (biyolistik) yöntemi ile tritikaleye (x triticosecale wittmack) markör gen aktarımı.
- Pareddy, D.R. and Petolino, J.F. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. *Plant Sci.* 67, 211-219.
- Popelka, J.C. and Altpeter, F. 2001. Interactions between genotypes and culture media components for improved in vitro response of rye (*Secale Cereale* L.) inbren lines. *Plant Cell Reports*. 20, 575-582.
- Przetakiewicz A, Orczyk W. and Nadolska-Orczyk A., 2003. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell, Tissue and Organ*

Culture 73, 245–256.

- Qualset, C.O., Rupert, E.A., Prato, J.D. 1976. Triticales in California: Review of Current Research and Appraisal as a New Cereal Crop. From 1973 International Triticale Symposium (Ed. by S. P. Yang) Int. Center of Arid and Semi-Arid Land Studies, Icasals Publ. 76-1. 47-72.
- Ray, D.S. and Ghosh, P.D. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultered leaf explants of *Zea mays*. Ann Bot. 66, 497-500.
- Rhodes, C.A., Green, C.E. and Phillips, R.L. 1986. Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels. Plant Science. 46, 225-232.
- Sachs, E., Bivour, W. and Krumbiegel, D. 1999. Damage to winter barley (*Hordeum vulgare* L.), winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and winter triticales (*Triticosecale* Wittm.) caused by winter kill in Güterfelde/ Branderburg. 1999/97. Field Crops Abstaracts 1999. Vol.52, No.9, page 890.
- Sairam, R.V., Parani, M., Franklin, G., Lifeng, Z., Smith, B., MacDougali, J., Wilber, C., Sheikhi, H., Kashikar, N., Meeker, K., Al-Abed, D., Berry, K., Vierling, R. And Goldman, S.L. 2003. Shoot meristem: An ideal explant for *Zea mays* L. transformation. Genome. 46, 323-329.
- Santos, M.A., Torne, J.M. and Blanco, J.L. 1984. Methods of obtaining maize totipotent tissues. I. seedling segments culture. Plant Sci. Lett. 33, 309-315.
- Songstad, D.D., Petersen, W.L. and Armstrong, C.L. 1992. Establishment of friable embryogenic (Type II) Callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae). American Journal of Botany. 79 (7), 761-764.
- Ting, Y.C., Yu, M. and Zheng, W-Z. 1981. Improved anther culture of maize. Plant Science Letters. 23, 139-145.
- Ülger, A.C., Yağbasanlar, T. ve Genç, İ., 1989. Çukurova koşullarında seçilen yüksek verimli tritikale hatlarının önemli tarımsal karakterleri üzerinde bir araştırma. Doğa Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi, 13(3b), 1342-1362.
- Vikrant, A. and Rashid, A. 2001. Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf base of triticales. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 64, 33-38.
- Vikrant, A. and Rashid, A. 2002. Somatic embryogenesis from immature and mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69, 71-77.

- Westwood, M.N. 1993. Hormones and growth regulators. Temperate Zone Pomology: Physiology and Culture. Timber Press, Inc. 9999 S.W. Wilshire, Suite 124, Portland, Oregon 97225.
- Yağbasanlar, T., 1987. Çukurova'nın Taban ve Kıraç Koşullarında Farklı Ekim Tarihlerinde Yetiştirilen Değişik kökenli Yedi Tritikale Çeşidinin Başlıca Tarımsal ve Kalite Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yağbasanlar ve Ülger, 1989., Tritikale (X Triticosecale Wittmack)'nin besin değeri ve önemi, Çukurova Üniversitesi Ziraat. Fakültesi Dergisi, 4 (4): 120-128.
- Zale, J.M., Wier, H.B., Kidwell, K.K. and Steber, C.M. 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 76, 277-281.
- Zapata, J.M., Sabater, B. and Martin, M. 2004. Callus induction and *in vitro* regeneration from barley mature embryos. Biologia Plantarum. 48(3), 473-476.
- Zhang, S., Williams-Carrier, R. and Lemaux, P. 2002. Transformation of recalcitrant maize elite inbreds using *in vitro* shoot meristematic cultures induced from germinated seedlings. Plant Cell Reports. 21, 263-270.

ÖZGEÇMİŞ

03.09.1984 tarihinde Gaziantep’te doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep’de tamamladı. 2001 yılında Gaziantep Ondokuz Mayıs Lisesi’nden mezun olduktan sonra 2003 yılında Elâzığ Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde öğrenim görmeye hak kazandı. 2007 yılında bu bölümden mezun olduktan sonra 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Öğrenimine başladı. Beraberinde özel eğitim kurumlarında Biyoloji öğretmeni olarak çalışmaya başladı. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi’ndeki öğrenimini yarıda bırakarak devam eden dönemde Türk Kızılayı Erzurum Doğu Anadolu Bölge Kan Merkezinde Kan Bağışçısı Kazanım Uzmanı olarak çalışmaya başladı. Halen bu görevine devam etmektedir. Aynı yıl Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans öğrenimine başladı.

