

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sacide SEYRANİ**

**BAZI BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) ÇEŞİTLERİNDE MERİSTEMATİK  
DOKU PARÇALARI KULLANARAK ETKİN BİTKİ REGENERASYON  
SİSTEMİNİN KURULMASI**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2006**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) ÇEŞİTLERİNDE MERİSTEMATİK  
DOKU PARÇALARI KULLANARAK ETKİN BİTKİ REGENERASYON  
SİSTEMİNİN KURULMASI**

**Sacide SEYRANİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**Bu tez 29/08/2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği /  
Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.**

|                      |                      |                          |
|----------------------|----------------------|--------------------------|
| İmza.....            | İmza.....            | İmza.....                |
| Prof.Dr. N.Kemal KOÇ | Prof.Dr. Ali ERKILIÇ | Yrd.Doç.Dr. Sema DÜZENLİ |
| Danışman             | Üye                  | Üye                      |

**Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.  
Kod No**

**Prof. Dr.Aziz ERTUNÇ  
Enstitü Müdürü**

- **Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

|   |           |
|---|-----------|
| Öz.....   | I         |
| Abstract.....   | II        |
| Teşekkür.....   | III       |
| Çizelgeler Dizini.....  | IV        |
| Şekiller Dizini.....  | V         |
| <b>1.GİRİŞ.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1. Buğday ( <i>Triticum aestivum</i> L.)’da Bitki Regenerasyonu ile İlgili Yapılan<br>Çalışmalar..... | 3         |
| 2.2. Arpa ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)’da Bitki Regenerasyonu ile İlgili Yapılan<br>Çalışmalar.....     | 14        |
| 2.3. Buğday ve Arpa Üzerine Yapılan Bitki Regenerasyonu ile İlgili<br>Çalışmalar.....                   | 18        |
| 2.4. Yulaf ( <i>Avena sativa</i> L.)’da Bitki Regenerasyonu ile İlgili Yapılan<br>Çalışmalar.....       | 19        |
| <b>3. MATREYAL VE METOD.....</b>  | <b>20</b> |
| 3.1. Materyal.....  | 20        |
| 3.2. Metod.....   | 20        |
| 3.2.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması.....  | 20        |
| 3.2.2. Olgunlaşmış Buğday Embriyolarının Kültüre Alınması.....  | 21        |
| 3.2.3. Mezokotil Doku Parçalarının Kültüre Alınması.....  | 21        |
| 3.2.4. Olgunlaşmış Buğday Embryolarından Kallus Elde<br>Edilmesi.....                                   | 22        |
| 3.2.5. Kalluslardan Bitki Regenerasyonu.....  | 22        |
| 3.2.6. Sürgünlerin Geliştirilmesi ve Köklendirilmesi.....   | 22        |

**4. BULGULAR VE TARTIŞMA**

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1. Olgunlaşmış Buğday Embriyolarının Kültüre Alınması ve Mezokotil Doku Parçalarının Değişik Ortamlara Karşı Tepkileri.....                         | 24        |
| 4.2. Olgunlaşmış Buğday Embriyolarının Kültüre Alınması ve Buğday Çeşitlerinin Farklı Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonlarına Karşı Tepkileri ..... | 28        |
| 4.3. Kalluslardan Bitki Regenerasyonu.....  | 33        |
| 4.4. Regenere Olan Bitkilerin Köklendirilmesi ve Toprağa Aktarılması .....  | 36        |
| <b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>   | <b>39</b> |
| <b>Kaynaklar.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>Özgeçmiş.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>Ekler.....</b>   | <b>48</b> |

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) ÇEŞİTLERİNDE  
MERİSTEMATİK DOKU PARÇALARI KULLANARAK ETKİN  
BİTKİ REGENERASYON SİSTEMİNİN KURULMASI**

**Sacide SEYRANİ**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. N.Kemal KOÇ  
Yıl : 2006, Sayfa: 50  
Üye : Prof. Dr. N.Kemal KOÇ  
: Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ  
: Yrd. Doç. Dr. Sema DÜZENLİ

Üç değişik buğday genotipine ait (*Triticum aestivum* L.) olgun buğday embriyolarının *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ile elde edilen bitkilerden alınan meristematik doku parçaları (mezokotil) direk regenerasyonla bitkiler elde etmek için farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonları içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmış ve en uygun ortamın 2,4-D, NAA ve Dicamba'nın 2.0 mg/l konsantrasyonu BAP'm ise 1.0 mg/l'deki konsantrasyonunu içeren MS ortamı olduğu belirlenmiştir. Olgun embriyodan embriyogenik kalluslar elde edip embriyogenesisi teşvik ederek bitkiler elde etmek için ise iki farklı ortam denenmiştir. Bunlardan birincisinde sadece 2,4-D'nin değişik konsantrasyonlarını içeren MS ortamı, ikincisinde ise 2,4-D + Dicamba içeren MS ortamı kullanılmıştır. Her ikisinde de kallus oluşumu için en uygun ortamın 2.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı olduğu saptanmıştır. Kalluslardan bitki regenerasyonunun sağlanmasında ise Glycine (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l), BAP (1.0 mg/l), Kinetin (1.0 mg/l) ve IAA (0.1, 1.0 mg/l) içeren ortamlar denenmiş ve bunlardan en uygun regenerasyon ortamının 0.1 mg/l IAA ve 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamının olduğu belirlenmiştir. Regenerasyonda kullanılan Glycine'nin 1.0, 2.0, 3.0 mg/l konsantrasyonlarından en iyi sonuç 1.0 mg/l Glycine konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Regenere olan bitkiler hormonsuz MS ortamı üzerinde kök oluşumu açısından en iyi sonucu vermiştir. Bu bitkiler daha sonra sera koşullarında toprağa aktarılmış ve alınan sonuçlarla etkin bitki regenerasyon sisteminin kurulması için uygun bir protokol oluşturulmuştur.

**Anahtar Kelimeler :** *Triticum aestivum*, Mezokotil, Olgun Embriyo, Kallus, Bitki Regenerasyonu.

## ABSTRACT

### MSc THESIS

|   |
|---|
| <p><b>ESTABLISHMENT OF EFFECTIVE PLANT REGENERATION<br/>PROTOCOLS IN SOME WHEAT (<i>Triticum aestivum</i> L.)<br/>VARIETIES USING MERISTEMATIC TISSUE PARTS</b></p> |
|---|

**Sacide SEYRANI**

**DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION  
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisor : Prof.Dr.N. Kemal KOÇ  
Year : 2006, Page: 50  
Jury : Prof.Dr.N. Kemal KOÇ  
: Prof.Dr.Ali ERKILIÇ  
: Yrd.Doç.Dr. Sema DÜZENLİ

In this study, mature embryos of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars germinated under in vitro conditions and meristematic tissue parts of these germinated plants (mesocotyl) were cultured on MS medium containing different concentration and combination of different growth regulators. The best results were obtained from 2,4-D, NAA and Dicamba (2.0 mg/l) and BAP (1 mg/l). Embryogenic calli were obtained from mature embryo and two various media (various concentrations of 2,4-D with MS and 2,4-D + Dicamba with MS) were applied for inducing embryogenesis. The best results were obtained from 2.0 mg/l 2,4-D concentration and MS media to obtain embryogenic calli. As for the calli regeneration, various medias such as Glycine (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l), BAP (1.0 mg/l), Kinetin (1.0 mg/l) and IAA (0.1, 1.0 mg/l) were applied and the best results were obtained from including 0.1 mg/l IAA and 1.0 mg/l BAP plus MS media. Among the various Glycine concentrations (1.0, 2.0, 3.0 mg/l) the best results were obtained from 1.0 mg/l Glycine concentration. The regenerated plants were found to be the highest rooting from hormone free MS media. The rooted plants were transferred into the soil and grown under greenhouse condition and the results show that suitable and effective protocol were established for plant regeneration.

**Key Words :** *Triticum aestivum* ,Mesocotyl, Mature Embryo, Calli, Plant Regeneration.

## **TEŞEKKÜR**

Bana bu araştırma konusunu veren, alışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren ve her türlü maddi ve manevi yardımlarımı esirgemeyen biricik hocam, Prof. Dr. N.Kemal KOÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin yürütülmesi ve yazım aŐamasında bana yardımcı olan Dr. Nesibe Ebru KAFKAS ve arkadaşlarım Ela KSE, Hanife GARİP, Alev EKER, Pınar ŐENGEZER'e teşekkür ederim.

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

|  |    |
|--|----|
| Çizelge 4.1. Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarını İçeren MS ortamı<br>Üzerinde Kültüre Alınan Üç Değişik Buğday Çeşidine Ait Mezokotil<br>Dokularının Tepkileri..... | 26 |
| Çizelge 4.2. Olgunlaşmış Buğday Embriyolarının 2,4-D ve 2,4-D+Dicamba<br>Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarını İçeren MS Ortamı<br>Üzerindeki Tepkileri.....                 | 29 |
| Çizelge 4.3. Bitki Regenerasyonu İçin Kullanılan Çeşitli Hormon Kombinasyon ve<br>Konsantrasyonlarını İçeren MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan<br>Eksplantların Tepkileri.....   | 34 |
| Çizelge 4.4. MS Ortamı İçerisine İlave Edilen Farklı Glycine Konsantrasyonlarının<br>Bitki Regenerasyonu Üzerine Olan Etkileri.....  | 35 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

|   |    |
|---|----|
| Şekil 4.1. MS Ortamı Üzerinde Karanlıkta Çimlendirilmiş Buğday Embriolarından Bir Görünüm.....  | 24 |
| Şekil 4.2. MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Mezokotil Doku Parçalarından Bir Görünüm.....  | 25 |
| Şekil 4.3. MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Mezokotil Doku Parçalarından Oluşan Embriolardan Bir Görünüm.....                        | 27 |
| Şekil 4.4. MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Olgun Embriolardan Oluşan Embriyogenik Kalluslardan Bir Görünüm.....                     | 30 |
| Şekil 4.5. 2,4-D ve Dicamba İçeren MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Olgun Buğday Embriolarından Oluşan Kalluslardan Bir Görünüm..... | 32 |
| Şekil 4.6. Olgun Buğday Embriolarından Oluşan Embriyogenik Kalluslardan Bitki Regenerasyonu.....                                      | 33 |
| Şekil 4.7. Embriyogenik Buğday Kalluslarından Regenere Edilen <i>İn vitro</i> Buğday Bitkilerinden Bir Görünüm.....                   | 36 |
| Şekil 4.8. Hormon İçermeyen MS Ortamı Üzerinde Köklenen Buğday Bitkilerinden Bir Görünüm.....   | 37 |

## 1. GİRİŞ

Buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitli hastalık ve zararlılardan etkilenen en önemli kültür bitkilerinden birisidir.

Buğday ekim alanlarının genişletilmesi, yüksek verimli hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşitler elde etmek için klasik ıslah yöntemlerinin uygulanması ve bazı kültürel önlemlerle buğday verimi arttırılabilmektedir. Üretimde etkili bu faktörler yardımı ile dünya üretimindeki artış limitine ulaşmış bulunmaktadır. Dünya nüfusunun hızla artmasına karşılık, buğday üretiminin buna paralel olarak artmaması açlık sorununu gündeme getirmektedir. Bu nedenle buğday üretimini arttırıcı veya potansiyel verimi ortaya çıkaracak yöntemlerin uygulanmasına gereksinim vardır. Bu yöntemlerden biri de Biyoteknolojinin en önemli konuları arasında yer alan bitkilerin genetik yapısını değişik gen transferi yöntemleri ile değiştirmektir. Hastalık ve zararlılara dayanıklı, yüksek verimli yeni kültür bitkileri geliştirmek amacıyla son 20-30 yıl içerisinde bitki doku kültürü tekniklerinde çok önemli aşamalar kaydedilmiştir. Dikotiledon kültür bitkileri ile karşılaştırıldığında monokotiledon kültür bitkilerinde bitki doku kültürü tekniklerinin uygulanmasında bazı güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bir başka ifade ile dikotiledon bitkilerde bitki doku kültürü tekniklerinin uygulanması monokotiledon bitkilere göre daha kolay olmaktadır (Reinert and Bajaj, 1976). Yeni kültür bitkileri geliştirilmesinde bitki doku, anter ve hücre kültürlerinin kullanılması çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Green, 1977; Vasil, 1987).

Genel olarak bitkilerde moleküler düzeyde genetik manipulasyonlar yapabilmek için her bitki türü için bu tür çalışmalarda kullanılacak uygun, uzun süre morfogenetik özelliğini muhafaza eden hücre ve bitki dokularının elde edilmesi gerekmektedir. Tahıllarda uzun süre bitki regenerasyon özelliğini muhafaza eden etkin hücre ve doku kültürü sistemi henüz oluşturulamamıştır. Morfogenetik özelliği yüksek *in vitro* doku kültürü manipulasyonlarına uygun model bir kaç tahıl genotipi bilinmekte ise de bunlar tarımsal açıdan önemli genotipler değildir (Vasil, 1994; Jähne ve ark., 1995).

Buna rağmen tahıllarda olgun embriyo, mezokotil, apikal meristem, bitki doku parçaları ve olgunlaşmamış çiçek gibi eksplantlar kullanılarak transformasyonla ilgili araştırmalar yapılmıştır (Jähne-Gärtner ve Lörz, 1996; Akula ve ark., 1999; Havrlentová ve ark., 2001). Ancak, kullanılan bu bitki doku parçalarından somatik embriyogenesis ile bitki regenerasyonunda güçlüklerle karşılaşmaktadır (Jähne ve ark., 1991; Li ve Devaux, 2001; Dahleen ve Bregitzer, 2002;).

Genelde tahıllarda her türlü biyoteknolojik yöntemin uygulandığı embriyogenik kalluslar olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyoların kültüre alınması suretiyle elde edilmektedir ve bu kallusları kullanarak yapılan transformasyon sonucunda fertil transgenik bitkiler elde edilebilmiştir (Jähne ve ark., 1994; Wan ve Lemaux, 1994; Tingay ve ark., 1997).

Olgunlaşmamış embriyoların bu amaç doğrultusunda kullanılabilmesi için kontrollü koşullarda sürekli yetiştirilen donör bitkilere gereksinim vardır. Bu ise ekstra yatırım, işgücü, yer ve ekstra laboratuvar çalışması gerektirmektedir. Bunlara ek olarak bu şekilde elde edilen embriyogenik kalluslara yapılan gen aktarımı, transformasyon sıklığı, bitki regenerasyonu ve seleksiyon istenilen seviyede olmamaktadır (Koprek ve ark., 1996; Manoharan ve Dahleen, 2002; Murray ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalar uzun süreli kalluslardan regenerere edilen bitkilerde somaklonal varyasyonun yüksek olabileceğini göstermektedir (Choi ve ark., 2000; Bregitzer ve Tonks, 2003). Bu nedenle transformasyon için etkin ve verimli çok az kallus içeren bir regenerasyon sisteminin kurulması zorunlu olmaktadır.

Bu tür bir sistemin buğdayda oluşturulması amacı ile ele alınan bu çalışmada üç değişik ekmeklik buğday (Adana 99, Balattila, Sagitoria) çeşidinin olgun embriyolarından elde edilen bitkilerden alınan mezokotil parçaları kullanılarak transformasyon için uygun bitki doku parçaları elde edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Buğday (*Triticum aestivum* L.)’da Bitki Regenerasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Sun ve ark.(1990), yapmış oldukları bir çalışmada buğdayın olgun tohumlarından kallus oluşumunu başlatmışlar ve bunlardan süspansiyon kültürleri kurmuşlardır. Hücre süspansiyon kültürlerinden izole ettikleri protoplastları %0.8 agarose içeren MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Protoplastların bölünmesi ile oluşan kalluslardan bitkiler regenere olmuştur. Düşük osmotik basınçlı sıvı ortam 2 hafta sonra kültür ortamına eklendiğinde koloni oluşumu artmıştır. Regenere olan bitkilerin sıklığı ortama ilave edilen düşük konsantrasyonlu sakkaroz ile artmıştır. Sitokininlerin yüksek konsantrasyonları sürgün oluşumunu etkin bir şekilde arttırmıştır. Regenere olan bitki sayısı farklı zamanlarda farklılaşan ortamlara aktarılmasıyla artmıştır.

Trigo ve ark.(1991), yapmış oldukları bir çalışmada 3 buğday melezinden (Maringá x Nobre, Maringá x Palmeira, Nobre x Palmeira ) elde edilen F1 ve F2 generasyonları ve ebeveyn genotiplerinin karşılıklı etkileri kallus kültüründeki bitki regenerasyonu için değerlendirildiğinde genotipler arasında değişkenlik gözlenmiştir. Karakter eklemenin dominant gen hareketlerinin ortaya çıkmasında önemli olduğu vurgulanmıştır. Ebeveyn genotiplerindeki karşılıklı etkinin regenerasyon için önemli olmadığı saptanmıştır.

Trigo ve ark. (1991), yapmış oldukları bir çalışmada 16 buğday genotipini *in vitro* bitki regenerasyonu için değerlendirmişlerdir. Olgunlaşmamış buğday embriyoları kallus oluşumu için 5.0 mg/l ve 2.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde bir kısmı ise 0.5 mg/L, 0.2 mg/l 2,4-D içermeyen MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Farklı Brezilya buğday genotiplerinden regenere olan bitkiler için bu metodun kullanılması uygun olmuştur. Bitki regenerasyonunda genotipler arasında çeşitlilik gözlenmiştir.

Regenerasyon kapasitesi 2,4-D'nin farklı seviyeleriyle değişiklik göstermiştir. *In vitro* da regenere olan bitkilerden Nobre ve Maringa'nın dölleri tarladaki bitki boyu, başak sayısı, başak başına düşen tohum sayısı bakımından değerlendirilmiştir. Her iki genotipin incelenen karakterlerinde somaklonal varyasyonlar gözlenmiştir.

Ahmed ve Sagi (1993), çalışmalarında kışlık buğdayın (*Triticum aestivum* L. , cv. GK Sagvari) olgunlaşmamış embriyolarından elde ettikleri embriyogenik kalluslardan kapasitesi yüksek embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlardır. Elde edilen hücre süspansiyon kültürleri haftada bir 2.0 mg/l 2,4-D içeren sıvı MS ortamında alt kültüre alınmıştır. Bir ml hücre kültürünün IAA ve zeatin içeren katı MS ortamı üzerinde karanlık ve ışık koşullarında kültüre alınması sonucunda ortalama 22 organize kallus elde edilmiştir. Kalluslardan 9 tanesi karanlık koşullarda meydana gelmiştir. Çeşitlerin kallus oluşturma yeteneği alt kültüre alındıktan sonra geçen zamanla bağlantılıdır. Hücreler alt kültüre alındıktan 9 gün sonra en iyi sonucu vermiştir ve %59 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Bunların embriyogenik kapasitede olanları 6 aydan fazla bekletilmiş ve regenerasyon gerçekleşmiştir. IAA ve BAP eklenerek farklılaştırılmış ortamda birkaç yüz tane yeşil sürgün ve bitki regenerasyonu oluşmuştur. Bunlardan 300 tanesi seraya transfer edilmiştir. Bitkilerin büyük bir çoğunluğunda anormal kromozom sayısı belirlenmiştir ve bunların yaşayabilirlik oranı düşüktür.

Pauk ve ark.(1994), yapmış oldukları bir çalışmada Aura buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarında embriyogenik kalluslar elde etmişlerdir. Bu kalluslardan kurdukları hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izole etmişler ve bu protoplastlardan da yeşil, fertil bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca genotipin regenerasyon oranına olan etkisini belirleyebilmek için protoplast kültürü ortamı ve şartları da dikkate alınmıştır. Kültür ortamının etkisinin yanında, hücre ağırlığı artışı ve farklı genotiplerden elde edilen kallusların regenerasyon yetenekleri de gözlenmiştir. Protoplast izolasyonu amacıyla kurulan embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinde, ortama ilave edilen organik maddelerin yanında ortamdaki hücre miktarı ile sıvı kültür ortamının hacmi arasında olumlu bir ilişki olduğu saptanmıştır. Hücre bölünmesine kültür ortamının içeriğinin yanında genotipin de etkili olduğu belirlenmiştir. Aura buğday çeşidi için uygun olan

protoplast kültür ortamında yaklaşık %9 oranında hücre bölünmesi gözlenmiştir. Protoplastlardan elde edilen mikrokoloniler regenerasyon ortamına transfer edildiklerinde somatik embriyo ve fertil yeşil bitkilerin regene olduğu belirlenmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen sonuçlar Aura çeşidinin protoplast kültürlerinden bitki regenerasyonunun sağlandığını ve hücre süspansiyon kültürlerinin 9 ay boyunca regenerasyon yeteneklerini koruduklarını gözlemlemişlerdir.

Dornolles ve ark.(1997b), yapmış oldukları bir araştırmada 5 farklı hexaploid buğday çeşidini ve bunların F1 hibridlerinden elde etmiş oldukları kallusları 3 kez altkültüre aldıktan sonra doku kültüründe bitki regenerasyon kapasitesini değerlendirmişlerdir. Kalluslardan regene edilen bitki sayılarını değerlendirmeleri sonucunda esas olarak genin etkisini yüksek potansiyel ile arttırdığını belirlemişlerdir. Buğdayda kallus elde etme periyodunun uzun olmasının bitki regenerasyon kapasitesini düşürebileceğini rapor etmişlerdir.

Dornolles ve ark. (1997a), yaptıkları araştırmada Brezilyaya özgü triticales genotipini *in vitro* davranışlarını belirlemek için 16 triticales genotipi ile 3 buğday genotipi kullanmışlardır. Bu genotiplere ait olgunlaşmamış embriyolar eksplant olarak kullanılmış ve kallus gelişimi için 2.0 mg/l 2,4-D ve 4.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı kullanılmıştır. Bitki regenerasyonundaki farklılıklar triticales ve buğday genotiplerinin her ikisinde de gözlenmiştir. Triticales genellikle buğdaydan daha iyi regenerasyon göstermiştir. Ortamların kallus gelişimi üzerine etkisi bakımından farklılık gözlenmiştir.

Özgen ve ark. (1998), kışlık buğday çeşitlerinden 12 tanesinde olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarını *in vitro*'da kültüre almışlardır. Olgun embriyo kültüründen kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu için etkili metodlar geliştirmişler ve her iki embriyo kültürünün sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Çiçeklenmeden 15 gün sonra steril koşullarda tohumdan ayrılan embriyolar 2.0 mg/l 2,4-D ilave edilmiş katı MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Tohumlar embriyolarıyla birlikte kallus oluşumu için 8.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı üzerine tohum çizgisi alta gelecek şekilde konmuştur. Kallus gelişimi ve bitki regenerasyonu 2,4-D içermeyen MS ortamı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her iki embriyo kültüründen regene olan

bitkiler vernalize edilerek toprağa aktarılmış ve gelişmiş bitkiler elde edilmiştir. Regeneren olan bitkilerin çoğunda hexaploid kromozom sayısı korunmuştur. Her iki bitki kültürü için kültür sonuçlarında güçlü bir genotipik etki bulunmuştur. Kallusların oluşum oranı, regenerasyon kapasitesi ve regeneren olan bitkilerin sayısı birbirinden farklı olmuştur. Olgunlaşmış embriyolardan kallus oluşum oranı yüksek ve bitki regenerasyonu çok sık olmuştur. Bu özellik yıl boyunca devam etmiştir. Bu şekilde elde edilen kallusların buğday doku kültürü ile ilgili çalışmalarda efektif bir şekilde kullanılabileceği saptanmıştır.

Karaca ve Bürün (1999), yapmış oldukları bir çalışmada Doğu 88 buğday çeşidinin olgun ve olgunlaşmamış embriyoları farklı 4 madde katılmış MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Gözlemler 42 gün sürmüştür ve sonunda kallus, sürgün ve kök oluşum oranları belirlenmiştir. Çalışmada olgunlaşmamış embriyoların kültüründe en yüksek kallus oluşumu ( ortalama % 94) 2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l kinetin eklenmiş MS ortamında elde edilmiştir. Ayrıca olgun embriyoların kültüründe ise en yüksek kallus oluşumu (ortalama %95) 2.0 mg/l 2,4-D ilave edilmiş MS ortamında gözlenmiştir. Denemede kallus ağırlıkları bakımından olgun embriyoların daha iyi sonuç verdiğini belirlemişlerdir. En yüksek kallus ağırlığını ise ortalama 395.3 mg olarak 2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l kinetin içeren MS ortamında saptamışlardır.

Bahieldin ve ark.(2000), yapmış oldukları bir araştırmada 3 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde ettikleri kallusları sürgün oluşturma ve regenerasyon özelliklerini araştırmışlar ve regenerasyon ortamındaki Dicamba'nın farklı konsantrasyonlarının ( 0.5, 0.1 ve 0.02 mg/l ) buğday regenerasyonuna olan etkilerini gözlemlenmişlerdir. Regenerasyon oranının çeşitlere bağlı olmakla birlikte, Dicamba 0.02 ve 0.1 mg/l konsantrasyonlarının önceden belirtilmiş olan konsantrasyonlarına oranla 3 buğday çeşidi için her bir kallustan elde edilen sürgün oranını belirgin bir şekilde arttırdığını rapor etmişlerdir. Dicamba'nın 0.02 mg/l konsantrasyonunun buğdayda bitki regenerasyonu üzerinde oldukça etkili olduğunu sonuç olarak belirtmişlerdir.

Delporte ve ark. (2001), olgun buğday embriyoları kullanarak bitki regenerasyon sistemini geliştirmişlerdir. Olgun embriyolar yüzeysel sterilizasyon

uygulanmış tohumlardan alınmış ve 10 µM 2,4-D içeren katı MS ortamı üzerinde kallus oluşumu için kültüre alınmıştır. Kallus oluşumu 40 günlük bir kültür periyodu sonucunda gerçekleşmiştir. Kültüre alındıktan 24 saat sonra aktif hücresel bölünmeler meydana gelmiştir. Kültüre alma işleminden 3 gün sonra 100 embriyo parçasından birkaç yüz tane kallus gelişimi gözlenmiştir. Kallus oluşum oranı %90 olarak belirlenmiş ve kültürün 8. gününde proembriyolar ortaya çıkmıştır. En fazla embriyogenik kallus oluşum oranı % 47 ile 3-4 haftalık bir oluşum periyodundan sonra 2,4-D eklendiği zaman gözlenmiştir. İki regenerasyon metodu sonuçları karşılaştırılmıştır. Toplam olarak 513 bitkicik oluşmuştur. Ortalama 100 embriyodan optimal bitki üretimi 25-30 kadar olmuştur. Bu regenerasyon metodunun transformasyon uygulamaları için elverişli olabileceği gözlenmiştir.

Kereša ve ark. (2001), bitki regenerasyonunun bitki transformasyonunun en önemli aşamalarından biri olduğunu rapor etmişler ve bu amaçla 8 kışlık buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından kallus teşviki ve bitki regenerasyonu üzerine araştırmalar yapmışlardır. Bu çeşitlerin olgunlaşmış embriyolarından elde edilen regenerasyon verileri karşılaştırıldığında en iyi regenerasyon kapasitesi Edita ve Žitarka genotiplerinde bulunmuştur. Çalışmada Kuna, Lipa, Banica, Magdalen, Žitarka, Edita, Hana ve Barbara gibi kışlık buğday çeşitleri kullanılmıştır. Edita ve Žitarka çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyo kültüründe bitki parçalarından yüksek sayıda bitki regenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Olgunlaşmış embriyolardan bitki regenerasyonu aynı genotipteki olgunlaşmamış embriyoların regenerasyonundan zayıf ve bağımsız olmuştur. En iyi regene olan çeşitler bitki transformasyonunda *Agrobacterium sp.* aracılığı ile gen transferinde kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Anwaar ve ark.(2002), dört farklı buğday çeşidinde *in vitro* regenerasyon sisteminde uygulanabilir sürgün oluşumu ve tüm bitki eldesi ile ilgili araştırmalar yapmışlardır. Yapılan çalışmada 7 günlük buğday bitkiciklerinin sürgün ucu meristemleri, yan sürgünleri ve somatik embriyolarına 6-benzyladenin (BA) ve 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Dört buğday çeşidinin pozitif olarak sürgün gelişimine tepki verdiklerini, fakat bunun ortam kompozisyonuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Yapmış oldukları scanning elektron mikroskop araştırması sonucunda yan sürgünlerin ve somatik embriyoların çoğaldığını gözlemlemişlerdir.



Sürgün ucu meristeminin %80-90 oranında geliştiğini rapor etmişler ve bütün genotiplerde ortalama meristem sayısının 40 ila 50 olduğunu belirlemişlerdir. Farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonları 2.0 ve 4.0 mg/l BA'nın 2.0 ve 4.0 mg/l ve 2,4-D'nin 0.5 mg/l kombinasyonunun en iyi sonucu verdiğini gözlemlemişlerdir. Bu sürgün toplulukları normal olarak regenere olduğunu ve fertil tohum içeren bitkiler ürettiğini rapor etmişlerdir.

Haliloğlu (2002), buğdayda olgunlaşmamış embriyo kültüründen optimum morfogenezisi belirlemek için 3 embriyo gelişim evresiyle birlikte 2,4-D'nin 4 ayrı konsantrasyonu testlemiştir. 2.0 mg/l 2,4-D konsantrasyonu morfogenezis için optimum seviye olarak bulunduğunu ve embriyogenesis için iyi bir belirleyici olduğunu rapor etmişlerdir. 2,4-D'nin 2.0 mg/l konsantrasyonunda 1. ve 2. gelişim evrelerinde yoğun ve nodüler kalluslar gözlemiştir. Ayrıca buğday somatik embriyogenesisinin ortam bileşenlerinin sonuçlarını belirlemek için 5 kallus teşvik ortamı saptamışlardır. En yüksek embriyogenik kallus oluşumunu MS+B5 ortamında (% 98.3) gözlemiştir. Buna ilaveten 1. ve 2. gelişim evrelerinde MS+B5 ortamı ile birlikte 2.0 mg/l 2,4-D konsantrasyonu kullanıldığında buğdayda embriyogenik kallus eldesi gözlenmiştir.

Rashid ve ark. (2002), iki buğday (Chakwal 86, Rawal 87) çeşidinde kallus oluşumu, kallusların devamı ve regenerasyonuna ortam, büyüme düzenleyiciler ve genotiplerin etkileri araştırmışlardır. Rawal 87 buğday genotipinde kallus oluşum oranı MS ortamı üzerinde %49.58-75.62, 3 farklı BAP konsantrasyonu içeren ortam üzerinde ise % 58.31-91.58 olarak belirlemişlerdir. Chakwal 86 buğday genotipi için kallus oluşumunun sıklık oranı MS ortamı üzerinde % 52.08-81.04 ve tek başına 2.0 mg/l 2,4-D ve 6-Benzylaminopurine'nin (BAP) 3 konsantrasyonunun (0.1, 0.5 ve 1.0 mg/l) eklendiği ortam üzerinde %53.12-81.02 olarak saptanmıştır. BAP'ın kallus oluşumunda rol oynamadığı kanıtlanmıştır. Sorbitol'ün 2.0 mg/l 2,4-D eklenmiş ortam üzerinde kallus verimini arttırdığı saptanmıştır. Kalluslardan bitki regenerasyonu için 0.1 mg/l IAA ve BAP'ın 4 konsantrasyonu (0.5,1.0, 2.5 ve 5.0 mg/l) MS ortamı üzerinde denenmiştir. Rawal 87'nin 0.5 mg/l BAP ilave edilmiş ortamdaki regenerasyon sıklığı (%31.9) önemli bulunmuştur. Chakwal 86 için

(%15.27) ise 2.5 mg/l BAP eklenmiş ortamın regenerasyon için uygun olduğu saptanmıştır.

Manoharan ve Dahleen (2003), makarnalık buğdayın (*Triticum turgidum*) makarna ve irmik yapımında kullanılan önemli bir hububat olduğunu ve gen transferi yöntemi ile hastalıklara dayanıklılık ile ilgili ve özellikle de *Fusarium* başak yanıklığına karşı dayanıklılığın geliştirilmesinin oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir. Makarnalık buğdayda etkili, tekrarlanabilir ve güvenilir bir metodun olmadığını rapor etmişlerdir. Yapmış olduğu çalışmada Monreo buğday çeşidi ile etkili ve tekrarlanabilir regenerasyon sistemi kurmuşlardır. İçerisinde farklı konsantrasyonlarda (1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 mg/l) picloram (4-amino- 3,5,6-trichloropicnic acid) veya 2.0 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) hormonlarını içeren MS ortamı üzerinde olgunlaşmamış embriyoları kültüre almışlardır. Embriyogenik kallusların 2.0 mg/l picloram içeren ortam üzerinde çoğaldığını, fakat 2,4-D içeren ortam üzerinde çok nadiren sonuç alındığını rapor etmişlerdir. 2.0 mg/l Picloram içeren ortam ayrıca hem 2,4-D içeren ortamdaki hem de Picloram'ın diğer konsantrasyonlarını içeren ortamlardan daha fazla bitki regenerasyonu teşvik ettiğini gözlemlemişlerdir. Genetik transformasyon için kalluslar bazı genler ile bombardıman edilmişlerdir. PCR ve southern analizleri regene olan bitkilerin transgenik olduğunu göstermiş ve western analizleri ile bu sonucu doğrulamışlardır.

Shah ve ark. (2003), buğday tohumunun *in vitro* kallus oluşumu, bunların çoğalması ve regenerasyonu için büyüme düzenleyicilerden 2,4-D , IAA, BAP ve Kinetin'in uygun konsantrasyon değerlerini kullanmışlardır. En iyi kallus oluşumu 3.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde elde edilmiştir. BAP'ın 0.5 mg/l konsantrasyonunu içeren kültür ortamı, 2.0 mg/l 2,4-D ve 4.0 mg/l BAP kombinasyonuna göre daha iyi yanıt vermiş ve daha iyi kallus oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir. En iyi bitki regenerasyonu 4.0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l BAP , 1.0 mg/l IAA kombinasyonunda gözlenmiştir.

Tiwari (2003), kültür ortamı ve genotiplerin anter kültürüne olan tepkilerini araştırmış ve 16 durum buğdayı genotipi anterlerini BA ve NAA içeren bir ortam ile 2,4-D ve kinetin ilave edilmiş başka bir ortam üzerinde kültüre almıştır. Kallus ve

bitki oluşumu iki farklı ortamda karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Testlenen 16 genotipten 9 tanesinin androgenesis için yanıt verdiğini belirlemiştir. H18381 genotipi en fazla bitki elde edilen genotip olarak belirlenmiştir. Bunu 2,4-D ve kinetin içeren ortam üzerinde 2.25 bitki üreten A9-30-1 genotipi takip etmiştir. Androgenik kallus ve yeşil bitki regenerasyonunun oluşumu sakkaroz ve agar kombinasyonlu ortama göre maltose ve agarose'lu ortamda önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu kallusların uzun vadeli devamı için ise kalluslar MS ortamının 3 farklı kombinasyonunda alt kültüre alınmıştır. Androgenik kalluslarda embriyogenik olanların gelişimi için 2,4-D ve gümüş nitratlı ortamın yalnız 2,4-D içeren diğer iki ortamdan daha etkili olduğu saptanmıştır.

Alizadeh ve ark. (2004), buğdayda sürgün regenerasyonu için yeni , basit ve verimli bir metod geliştirmişlerdir. Farklı bitki parçaları bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşitli kombinasyonlarının buğdayın doğrudan sürgün regenerasyonuna olan etkilerini araştırmışlardır. Bu metod ile kısa zaman içerisinde çok sayıda sürgün elde edilmiştir. Sürgün gelişimi ve çoğaltılması alt kültüre almaksızın sürgün regenerasyon ortamından elde edilmiştir. Direk bitki regenerasyonu için farklı bitki doku parçaları 2,4-D, IAA, NAA, BAP'ın farklı kombinasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Embriyo dokuları kültüre alındığında MS ortamına 1.0 mg/l BAP, 0.2 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l'ye IAA eklenmiştir. MS ortamına 0.2 mg/l 2,4-D ve 2.0 mg/l BAP eklendiğinde ise doğrudan sürgün regenerasyonu daha verimli olmuş ve doku başına maksimum 7 sürgün olduğu gözlenmiştir. Sürgün regenerasyonunda 4 hafta süre ile karanlığa takiben 4 hafta ışığa maruz bırakmanın etkin sonuçlar verdiği saptanmıştır. Bitkilerin kök oluşum ortamına başarılı bir şekilde transfer edildiğini bildirmişlerdir.

Birsin ve Özgen (2004), altı buğday çeşidinin ( BDMT- 98-85, Melez 2001, Mikham-2002, Presto, Tacettin Bey ve Tatlıcak-97) olgunlaşmamış, olgun ve endosperm ağırlıklı olgun embriyolarını kallus oluşum ve bitki regenerasyonu açısından karşılaştırılması için *in vitro*'da kültüre almışlardır. Olgunlaşmamış embriyolar çiçeklenmeden 15-18 gün sonra 2.0 mg/l 2,4-D eklenmiş MS'den oluşan kallus kültür ortamında skutellum aşağı gelecek şekilde kültüre alınmıştır. Olgun embriyolar steril edilmiş bir şekilde 2.0 mg/l 2,4-D eklenmiş MS ortamı üzerinde

tohumların skutellumları ortama gelecek şekilde kültüre alınmıştır. Embriyo taşıyan tohumlar kallus oluşumu için 8.0 mg/l 2,4-D içeren kültür ortamları üzerine tohum çizgileri aşağıda olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kallustan gelişen ve regenere olan bitkiler hormonsuz MS ortamı üzerinde muhafaza edilmiştir. Embriyo kültüründe çeşitlerin çoğunda genotipler arası çeşitlilik gözlenmiştir. Olgunlaşmamış embriyolardan Presto ve olgunlaşmış embriyolardan Mikham 2002'nin regenerasyon kapasitesi (%92 ve %97.3) fazla olmuş ve toprağa aktarılan regenere bitkilerin sayısı yüksek olmuştur. *Triticale*'den bitki regenerasyonunda en başarılı sonuç olgun embriyolardan elde edilmiştir.

Farooq ve ark. (2004), çalışmalarında 3 buğday genotipini (Bakhtawar-92, Punjab-96 ve İnqılab-91) kallus oluşum sıklığı ve regenerasyona verdikleri yanıt için ortam kombinasyonu üzerinde testlemişlerdir. Kallus oluşumuna en iyi yanıtı veren genotipin Bakhtawar-92 olduğu ve bunu İnqılab-91 ile Punjab-96'nın izlediğini saptamışlardır. Diğer genotiplerle karşılaştırıldığında Bakhtawar-92 genotipi kallus üretim miktarının oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Buğday genotiplerinin kallus oluşumu açısından incelenmesinde en uygun ortamın 2.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı olduğu bulunmuştur. Bakhtawar-92'nin regenerasyon sıklığı 0.1 mg/l IAA ve 2.5 mg/l BAP ortam içeriğinde %40 bulunmuştur. 0.1 mg/l IAA ve 0.5 mg/l BAP kombinasyonunun eklendiği ortam üzerinde Punjab-96 ve İnqılab-91 % 25 ve %33 regenerasyon göstermiştir. Regenere olan bitkiler bitki boyu, olgunluk ve tohum sayısı açısından değerlendirilmiştir.

Fazelienasab ve ark. (2004), İran'ın ekmeklik buğday çeşitlerinden 5 tanesinde olgun embriyo kültürü için ABA'nın farklı konsantrasyonlarını denemişlerdir. Buğday çeşitlerinden 5 tanesinin (Tabasi, Bolani, Shiraz, Shoaleh ve Azar) olgun embriyosu 10 mg/l 2,4-D, 30 gr/l sakkaroz ve ABA'nın (0.2, 4.0, 6.0 ve 8.0 mg/l) farklı konsantrasyonlarının eklendiği MS ortamında kültüre alınmıştır. Kallus gelişimi kullanılan bir skala ile değerlendirilmiş ve değerlendirme sonucunda çeşitler arasında kallus büyüme oranları bakımından önemli farklılıklar bulunmuştur. Ayrıca ABA seviyelerinin kallus oluşumunda önemli etkileri olduğu saptanmıştır. Hormon konsantrasyonu arttıkça kallus oluşumunun azaldığı gözlenmiştir. ABA seviyeleri ve çeşitler arasındaki etkileşimin çok önemli olmadığı belirlenmiştir.

Kontrolde parlak renkli olan kalluslar ABA konsantrasyonunun artırılmasıyla koyulaşmış ve 8.0 mg/l ABA uygulanan kalluslar koyu kahverengi renge dönüşmüştür. Bu şekilde ABA konsantrasyonunun artırıldığı ortamda kompakt kallus olduğu kontrol ortamında daha kırılğan kallusların olduğu gözlenmiştir. Regenerasyon oranları karşılaştırıldığında ABA seviyeleri ve çeşitler arasında önemli farklar ortaya çıkmıştır. En fazla ve en az regenerasyon oranı kontrolde ve 8.0 mg/l ABA seviyesinde gözlenmiştir. Sıraya göre maksimum regenerasyon oranını Tabasi göstermiştir. Kallus oluşumuna karşılık, çeşitler ve ABA seviyeleri arasındaki etkileşimin önemli olduğu ve farklı ABA seviyelerinin önerildiği farklı çeşitlerde farklı sonuçlar alındığı bildirilmiştir.

Kereša ve ark. (2004), 8 adet kışlık buğday genotipi üzerinde yaptıkları çalışmalarında olgun ve olgun olmayan embriyo ve olgun olmayan çiçekte kallus regenerasyon kapasitesi ve bitki oluşumunu araştırmışlardır. Yüksek miktarda regenerasyonun olgunlaşmamış embriyolar kullanıldığı zaman Zitarka'da %57 ve Edita'da %54 buğday çeşitlerinde olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte bazı olgunlaşmamış çiçekler kullanıldığı zaman da eşit oranda veya daha iyi regenerasyon olduğunu rapor etmişlerdir. 2,4-D içeren ortam üzerinde kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolardan kallus teşvik etmek için ortamın daha uygun olduğunu ve bitki regenerasyonun picloram içeren bir ortamdan belirgin olarak daha etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Bunun tersine olgun olmayan çiçekler için en iyi ortamın picloram içeren MS ortamı olduğunu belirlemişlerdir.

Satyavathi ve ark. (2004), yapmış oldukları bir çalışmada büyüme düzenleyicilerden 2,4-D, Picloram ve Dicamba'nın 4 ticari durum buğdayı çeşitlerinden, Ben, Maier, Münich ve Lebsock'un skutellum kültürlerinden elde edilen kallus oluşumu ve bitki regenerasyonuna olan etkilerini araştırmışlardır. Modifiye edilmiş MS bazal ortamı üzerinde kültüre alınan skutellum bitki doku parçasından kallus oluşumu elde edilmiştir. Kallus oluşumundan 4 hafta sonra bütün kalluslar regenerasyon için MS bazal ortamında kültüre alınmıştır. Regenerasyon olan bitkiler fertil, normal kromozom sayısını ( $2n=4x=28$ ) korumuş ve somaklonal varyasyon göstermemiştir. Genotip ve kallus oluşum ortamı bitki regenerasyonunda baskın bir rol oynamıştır. Yoğun kallus teşvikinde en iyi bitki büyüme

düzenleyicinin Dicamba olduğu kanıtlanmıştır. Bitki regenerasyonunda en yüksek oranı Maier vermiştir. Dicamba'nın 2.0 mg/l konsantrasyonu ilk kez kallus oluşumu için kullanılmıştır. Bu sonuçlar durum buğdayının genetik transformasyonu ile ilgili çalışmalarını kolaylaştırmıştır.

Turhan ve Başer (2004), yapmış oldukları bir çalışmada buğdaydan en iyi kallus oluşumunu elde etmek için iki farklı olgun embriyo kaynağı NAA ve 2,4-D büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının eklendiği 5 ortam üzerinde denemişlerdir. Olgun embriyo kaynaklarından biri tohum embriyosuyla birlikte diğeri tohumdan embriyo çıkarılarak kültüre alınmıştır. En yüksek kallus oluşum oranı 4.0 mg/l 2,4-D ve 1.0 mg/l NAA eklenmiş MS ortamında kültüre alınmış tohumuz embriyoda gözlenmiştir. Bazal MS ortamında kallus oluşumu gözlenmemiştir. Embriyosuz prosedürde embriyogenik kallus oluşumunun toplam yüzde oranı endosperm destekli embriyo prosedüründen daha yüksek olmuştur. Buğdaydan embriyogenik kallus oluşumu bu konuda etkili büyüme düzenleyicilerden 2,4-D de gözlenmiştir. 2,4-D eklenmiş ortamdaki kallus oluşumu sadece NAA eklenmiş ortamdaki daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Shimada (2005), yapmış olduğu bir çalışmada buğday kültürlerinden regenerasyon alan bitkilerin genetik çalışmalar ve buğdayın kalitesinin geliştirilmesi için yararlı olacağını rapor etmiştir. Bununla birlikte buğday kültürlerinin çeşitli organlarından sadece çok az oranda bitkiler geliştiği gözlenmiştir. Son günlerde buğdayın genç embriyolarından elde edilen regenerasyonda uygun kültürler geliştiği gözlenmiştir. Buğdayın çeşitli genotiplerini gövde dokularından elde edilen regenerasyonunda, uygun kültürler elde edilmiştir. *Triticum dicoccoides*' in uzun vadeli altkültüre alınarak elde edilen kalluslarından birçok yeni bitkilerin oluştuğu saptanmıştır.

## 2.2. Arpa (*Hordeum vulgare L.*)’da Bitki Regenerasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Bayliss ve Dunn (1979) , farklı oksin ve sitokininlerin farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarının, arpa’nın olgun embriyolarından kallus oluşumu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Kallus oluşumunu teşvik etmek amacıyla oksin olarak 2,4-D kullanılmıştır. Farklı çeşitlerin farklı 2,4-D konsantrasyonlarındaki kallus oluşturma yetenekleri farklılık göstermiştir. Embriyolardan bitki gelişimi üzerine 2,4-D’nin etkisi araştırılmıştır. Bazı çeşitlerde sitokininler kallus gelişimini arttırmış, ya da inhibe etmiştir. Oksin yokluğu ve sitokinin varlığının kallus büyümesine olan etkilerine ya da kültürlerde oluşan farklılıklar incelenmiştir.

Wan ve ark.(1994), yapmış oldukları bir araştırmada hızlı, etkili ve yeniden uygulanabilecek bir çalışma sonucu elde edilebilecek çok sayıda bağımsız transgenik, kendine döllen, transgenik arpa bitkisi için araştırmalar yapmışlardır. Olgunlaşmamış zigotik embriyolar, genç kalluslar ve embriyodan elde edilmiş mikrosporlar uidA ve bar genlerinin hem kombinasyonlarını hem de yalnız olarak taşıyan plazmidler ve ayrıca başka plazmid olan arpa sarı cüceleşme virüsünün örtü protein (BYDV cp.) genlerini taşıyan plazmid ile bombardıman etmişlerdir. Toplam 91 adet bağımsız kallus grubu bar tarafından phosphinothricin acetyl transferase enzimi üretildiğini gözlemlemişlerdir. 67 hat da bar geninin bağlandığını DNA hibridizasyon tekniği ile kanıtlamışlardır. 500’den fazla yeşil, fertil, transgenik bitkinin 36 adet transgenik kallustan regenere olduğunu, bunun yanında 41 hattan da albino bitkilerin regenere olduğunu gözlemlemişlerdir. 25 hattan T0 bitkilerini DNA hibridizasyon tekniği ile bar genlerini taşıyanların tamamını analiz etmişlerdir. T1 döllerini DNA hibridizasyonu ile testlemişlerdir. T1 embriyoları biolophos içeren ortam üzerinde gelişmesi bar geninin var olup olmaması için iyi bir indikatör olmamasına rağmen, bar geninin aktarılıp aktarılmadığını ilk etapta seçmek için kullanılabilir bir metod olduğunu belirlemişlerdir. Bar geninin bazı bitkilere aktarıldığını, Basta herbisitine dayanıklılık ile de ispat etmişlerdir. Olgunlaşmamış embriyolardan elde ettikleri bitkicikleri bombardımandan yaklaşık 7 ay sonra toprağa aktardıklarını rapor etmişlerdir.

Oka ve ark. (1995), yapmış oldukları bir çalışmada sırasıyla 2.0 mg/l 2,4-D ve 5.0 mg/l Picloram içeren MS ortamında arpa'nın olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriolarından kallus teşvik etmişlerdir. Olgunlaşmamış embrioların skutellar epidermisinden elde edilen nodular compact kalluslardan meristemler regene olmuştur. Oysa olgunlaşmış embriolarda ise yaprağın epidermal hücrelerinden ya da coleoptil'in kök kısmından elde edilen nodular compact kalluslar regene olmuştur. Bitki kaynağına bakmaksızın elde edilen regenerasyon organogenesis bakımından üstün olmasına rağmen somatik embriyogenesis sebebiyle regenerasyon daha seyrek olmuştur. Böylece arpanın olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriolarından kallus teşviki nodular compact olmasından daha çok embriyogenik olmasına bağlı olduğu sonucuna varmışlardır.

Akula ve ark. (1999) , yapmış oldukları bir çalışmada 9 arpa çeşidinin olgun embriolarından kallus elde etmenin bitki regenerasyonu için güvenli bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Oksinlerden; 2,4-D, Picloram ve Dicamba'nın birçok arpa çeşidinin olgun embriolarından kallus teşvikini etkilediği kanıtlanmıştır. Oluşan kalluslar dağınık, kırılğan ve şeffaf olarak belirlenmiştir. Aynı bileşimdeki yeni ortam üzerine 2-3 kez aktarıldıktan sonra kaymak beyazı yoğun kalluslar oluştuğu gözlenmiştir. Kallus teşviki ve regenerasyon kapasitesi çeşide göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Picloram'ın yüksek konsantrasyonu kullanılması sonucu 3 çeşidin (Tallon, Grimmet, Sloop) regenerasyon kapasitesinin arttığı gözlenmiştir. Arapiles, Absisik asit ve Betain gibi kimyasallar olgun embriolardan morfogjenik kallus teşvikinde önemli bulunmuştur. Bu kalluslardan regene olan bitkilerin dayanıklı olduğu ve hormon içermeyen ortama aktarıldığı zaman köklerin gelişmeye hazır olduğunu belirtmişlerdir.

Dahleen (1999), arpa'da etkin bir transformasyonun gerçekleştirilebilmesi için kallustan çok sayıda bitki regenerasyon sisteminin kurulması gerektiğini ifade etmiştir. Olgunlaşmamış embrioların kültürü ile embriyogenik kallusların elde edilmesi, değişik ortam ve genotiplerin embriyogenik kallus elde edilmesi üzerine etkileri yoğun bir şekilde araştırılmış olmasına karşın, embriyogenik kalluslardan azami ölçüde bitki regenerasyonu üzerinde çok fazla bir araştırmanın olmadığını bildirmişlerdir. Farklı zamanlarda olgunlaşmamış embrioların kültüre alınmasının



kalluslardan azami ölçüde bitki regenerasyonunun olup olmayacağını araştırmak için kontrollü koşullarda Golden Promise ve Morex arpa çeşitleri 4 değişik tarihte ekimi yapılmıştır. Ekim ayında ekimi yapılan arpa çeşitlerinden elde edilen kalluslardan diğer tarihlerde ekimi yapılanlara göre daha fazla bitki regenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Regenerasyonda sıcaklıktan çok radyasyonun etkili olduğu ortaya konulmuştur. Sera koşullarındaki donör bitkilerin regenerasyonunda doğal ışığın sıcaklıktan daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Savaşkan ve ark. (1999), yapmış oldukları bir çalışmada ülkemizde tarımı yapılan dört arpa çeşidinde (Anadolu, Cumhuriyet-50, Obruk-86 ve Tokak -157137) anter kültürü tekniğinin uygunluğunu araştırmışlardır. Araştırmada iki farklı kültür ortamı denenmiştir. Ayrıca 21 gün soğuklama işleminin arpa çeşitleri üzerine olan etkileri araştırılmış ve tüm çeşitlerin androgeneze uygunluğu istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca önişlem uygulamalarında anter tepkisinin oranı ve üretilen kallus frekansı arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. Çalışmada Cumhuriyet-50 çeşidine soğuk önişlem uygulanmadığı durumda en yüksek transfer edilebilir kallus (%70.1) ve kök oluşturabilmiş bitki (%50,1) üretmiş olduğu saptanmıştır. Çalışmada kök formasyonunu oluşturmayan bitkilerde kök oluşumunu teşvik etmek için yüksek düzeyde oksin ( NAA veya IAA) kullanılmıştır.

Li ve Devaux (2001), yapmış oldukları çalışmada ıslah edilmemiş 7 arpa çeşidi mikrosporlarının vermiş oldukları tepkileri araştırmışlardır. Üç ön uygulama ortamını karşılaştırarak B ortamının değerlerine göre mikrospor embriyogenesisini daha fazla teşvik ettiğini rapor etmişlerdir. Kontrol ile bütün kültürler karşılaştırıldığı zaman ovarı alt kültürlerinin kullanılması ile embriyo oluşumunda 2.1 kat, yeşil bitkilerin regenerasyonun da 2.4 kat artış olduğunu belirtmişlerdir. Optimum co-kültür koşulunun 5 ovaryumunun 20 gün teşvik ortamında tutulması olarak belirlenmiştir. Mikrosporların kültüre alınmasında en etkili metodun B ortamı uygulamasının ovaryum alt kültürünün kombinasyonları sonucunda elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Bu yöntemi uygulayarak mikrospor embriyogenesisindeki genotip farklılıklarının azaltılacağını rapor etmişlerdir. Bu ortamın esasen mikrosporların canlılık oranını yükselttiği ve ovaryum alt kültürünün ise hücre bölünmesini ve embriyogenik gelişimi arttırdığını gözlemlemişlerdir. Burada bahsedilen metodun

arpa üretimi ve biyoteknoloji için mikrospor kültür tekniklerinin uygulanmasında önemli olduğunu kaydetmişlerdir.

Chang ve ark. (2003), yapmış oldukları bir çalışmada önemli biralık arpa çeşitlerinden olan 'Morex' için etkin bir bitki regenerasyon sistemi kurmuşlardır. Olgunlaşmamış embriyoların büyüklüğü ve bir seri kültür ortamını bu araştırma kapsamında denemeye almışlardır. Embriyogenik kallus oluşumu için embriyo büyüklüğünün çok önemli olduğu bulunmuştur. Küçük embriyolar (0,5-1,5 mm) büyük embriyolara göre daha fazla embriyogenik kalluslar oluşturmuşlardır. 3.0 mg/l 2,4-D yada Dicamba ile modifiye edilmiş MS ortamının embriyogenik kallus oluşumu için uygun olduğu saptanmıştır. Embriyogenik kalluslar kallus oluşum ortamında altı kez alt kültüre alındığında regenerasyon özelliğini muhafaza etmiştir. Verimli sürgün regenerasyonu 0.5-1.0 mg/l BAP eklenerek modifiye edilmiş MS ortamında gözlenmiştir. Regenere olan sürgünler 0.2 mg/l IBA eklenerek modifiye edilmiş yarı konsantrasyonlu MS ortamında köklendirilmiştir. Bitkiler başarılı bir şekilde toprağa aktarılmış ve serada yetiştirilerek olgunlaştırılmıştır. Verimli bitki ve regenerasyon sistemi kurularak önemli arpa çeşitlerinden transgenik bitkilerin üretiminin sağlanacağı gözlenmiştir.

Halámková ve ark. (2004), yapmış oldukları bir çalışmada tarımsal açıdan önemli 23 önemli arpa çeşidinin kallus oluşumu, somatik embriyogenesis ve regenerasyon kapasitesi, 2,4-D ya da 3-6-dichloro-o-anisic acid (Dicamba)'li oluşum ortamında ve modifiye edilmiş regenerasyon ortamı üzerinde denenmiştir. Kallus oluşturan zigotik embriyoların sıklığı genotipe göre %88-100 oranında değişmiştir. Somatik embriyogenesis ve regenerasyonun yüksek sıklık göstermesi için Dicamba'nın 2,4-D'den daha uygun olduğu gözlenmiştir. Bütün çeşitlerde yeşil embriyolar elde edilmiş ve bunların içinde albino bitkilere rastlanmamıştır. Denemede Victor çeşidi hariç kullanılan bütün çeşitler düşük regenerasyon kapasitesi göstermiş ve örnek olarak Golden Promise çeşidi ile karşılaştırılmıştır.

Sharma ve ark.(2005), araştırmalarında Avrupa arpa çeşitlerinin bir serisinin kuru tohumlardan olgun embriyoları kültüre alınması sonucunda embriyogenik kalluslar elde edildiğini bu kallusların kullanılabilir bir sistem olduğunu saptamışlardır. Çimlenme gücü düşürülmüş embriyolardan yüksek oranda

embriyogenik kalluslar, bu kalluslardan da yüksek oranda yeşil gelişmiş bitkiler elde edildiğini belirlemişlerdir. Çimlenmeyi azaltmak ya da engellemek için farklı yaklaşımlar denenmiş ve olgun embriyoların uzunlamasına iki eşit parçaya bölünüp kültüre alınması durumunda embriyo en az çimlenmeyi göstermiş ve en iyi kallus oluşumu gözlenmiştir. Embriyogenesis ve uzun vadeli olarak morfogenez kapasitesinin muhafaza edilmesi için ortamdaki BAP bileşeninin düşük seviyeleri çok etkili bulunmuştur. Bu çalışmaya göre; toprağa aktarılmaya hazır hale gelen bitkilerin gelişimine kadar olan bütün adımlarda olgun embriyoların ilk izolasyonundan 16-20 hafta sonra bitki regenerasyonu tamamlanmıştır. Deneme Golden Promise ve diğer ticari çeşitlerde de başarılı bir şekilde sonuçlanmıştır. Bütün çeşitler embriyogenik kallus oluşumu yönünden denenmiştir. 1.5-7.5 sayısındaki yeşil bitkiden elde edilen embriyogenik kallusun ortalama oranı % 22-25 arasında olmuştur.

### 2.3. Buğday ve Arpa Üzerine Yapılan Bitki Regenerasyonu ile İlgili Çalışmalar

Shan ve ark. (2000) , yapmış oldukları bir çalışmada Thidiazuron' un birçok dikotiledon bitki türlerinin *in vitro* morfogenezinde etkili düzenleyicilerin yerine kullanıldığını gözlemlemişlerdir. Ancak monokotiledon bitki türlerinin *in vitro* regenerasyonunda TDZ' nin etkisinin sınırlı olduğu hakkında bilgiler vardır. Buğday ve arpanın *in vitro* regenerasyonunda TDZ' nin etkisi araştırılmış ve TDZ' nin iki önemli tahıl türünün kalluslarından sürgün regenerasyonu artırdığını bulmuşlardır. Buğday ve arpanın olgunlaşmamış embriyo kültüründen elde edilen kalluslarından bitki regenerasyonu TDZ konsantrasyonlarının eklendiği regenerasyon ortamında gözlenmiştir. Arpa kalluslarından elde edilen sürgün regenerasyonu en yüksek (%38.3 Golden Promise) 1.0 mg/l TDZ konsantrasyonunda gözlenmiştir. Buğday regenerasyonu için en uygun TDZ seviyesinin 0.2 mg/l olduğu saptanmıştır (%87 Bob White ve % 49.4 Hi-line). TDZ içeren ortam üzerinde gelişen buğday ve arpa sürgünlerinden regenere olan bitkiler köklenme ortamına aktarılmıştır. Genellikle kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerle karşılaştırıldığında buğday ve arpa

regenerasyon ortamına TDZ önerilmekte ve TDZ buğday ve arpanın *in vitro* regenerasyonu için en uygun olduğu saptanmıştır.

#### **2.4. Yulaf (*Avena sativa* L.)’da Bitki Regenerasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar**

Birsin ve ark. (2001), yulafta kallus oluşumu ve regenerasyon yeteneğini belirlemek için bir araştırma yürütmüşleridir. Araştırmada on yulaf çeşidi ya da hattı kullanarak kallus oluşturmak için olgun embriyolardan yararlanılmıştır. Elde edilen veriler istatistiki analize tabi tutulduğunda; kallus oluşumu ve regenerasyon kapasitesinin çeşit ve hatlara göre değiştiği belirlenmiş olup kallus oluşumu ve regenerasyon kapasitesi arasında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır. Regenerasyon olan bitki sayısının ise doğrudan kallus oluşumuna bağlı olduğu belirlenmiştir.

### 3. MATERYAL VE METOD

Araştırma 2003-2006 yılları arasında Ç.Ü. Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarında yürütülmüştür.

#### 3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan kimyasallar bu kimyasallar kullanılarak hazırlanan kültür ortamları ve içerikleri ekler kısmında verilmiştir.

Ayrıca üç değişik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidinin (Adana 99, Balattila, Sagitoria) olgun tohumlarının *in vitro* da çimlendirilmesi ile elde edilen bitkilerin köke yakın kısmından alınan bitki doku parçaları (Mezokotil) ile olgun embriyolar bitki materyali olarak kullanılmıştır.

#### 3.2. Metod

##### 3.2.1. Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Araştırmada kültür ortamı olarak değişik hormon konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı kullanılmıştır. Hazırlanan ortamların pH'sı 0.5-1 M KOH ve 0.5-1 M HCl kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır. Hazırlanmış olan kültür ortamlarını katılaştırmak için %0.3 phytogel kullanılmış ve ortamlar otoklavda 121°C'de 1.1 atm basınç altında 20 dakika süre ile sterilizasyona tabi tutulduktan sonra 9 cm'lik petri kutularına dökülmüş ve katılaşıncaya kadar steril kabin içerisinde bekletilmiştir.

### 3.2.2. Olgunlaşmış Buğday Embriyolarının Kültüre Alınması

Adana 99, Balattıla, Sagitoria buğday çeşitlerine ait olgun buğday tohumları önce %70'lik etil alkol içerisinde 2 dakika bekletilmiş daha sonra birkaç damla Tween-20 ilave edilmiş %20'lik ticari sodyum hipoklorid (NaOCl) çözeltisi içerisinde 30 dakika yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuş ve 3-4 kez steril saf su ile yıkanmış ve ardından steril damıtık su içerisinde iki gün süre ile + 4<sup>0</sup>C'de tutulmuştur. Tohumlar bu işlemin ardından üç kez steril damıtık su ile yıkanmış ve olgun embriyolar pens, bistüri yardımıyla tohumdan ayrılmıştır. İzole edilen olgun embriyolar her bir petri kutusuna yaklaşık 12 adet olacak şekilde sürgün oluşturma ortamı olarak hazırlanan MS üzerinde kültüre alınmıştır. Her genotip için 60 olgun embriyo kültüre alınmış ve kültürler 25±1 <sup>0</sup>C'de karanlık koşullarda iklim odasında tutulmuştur.

### 3.2.3. Mezokotil Doku Parçalarının Kültüre Alınması

Olgun embriyoların MS ortamında kültüre alınmasından 5-7 gün sonra 3-6cm uzunluğa ulaşan sürgünlerin kök kısmına yakın kısmından 3-4 mm uzunluğundaki doku parçası (mezokotil) kesilip çıkarılmış ve 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid ) ve NAA (1-Naphthalene acetic acid)'nın 2.0 mg/l, Dicamba (3-6-dichloro-o-anisic acid)'nın 1.0, 2.0 mg/l, BAP (6-Benzyl amino purine)'in ise 1.0, 2.0, 3.0 mg/l konsantrasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde her bir petriye 12 adet olacak şekilde konularak 25±1<sup>0</sup>C'de karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Her genotip için yaklaşık 60 eksplant kullanılmıştır. Kültüre alma işleminden 3-4 hafta sonra eksplantların gösterdiği reaksiyonlara göre her bir petride bulunan mezokotil doku parçalarında oluşan embriyolar sayılmış ve bunların ortalamaları alınarak değerlendirme yapılmıştır.

### 3.2.4. Olgunlaşmış Buğday Embriolarından Kallus Elde Edilmesi

Tohumlardan izole edilen olgun embriyolar 2,4-D (2.0 mg/l ve 4.0 mg/) ve 2,4-D+Dicamba (2.0 mg/l + 2.0 mg/l) konsantrasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Embriyoların kültüre alınmasından 25-30 gün sonra her bir petride embriyo başına oluşan kalluslar sayılmış ve bunların yüzde oranları alınmıştır. Üç çeşit için 5'er petri kullanılarak her bir petride 12 adet embriyo kültüre alınmış ve değerlendirmeler buna göre yapılmıştır. Bütün çeşitler için toplam 60 tane olgun embriyo kullanılmıştır. Daha sonra embriyodan oluşan bitkiler kesilerek uzaklaştırılmış geriye kalan kalluslar yine her bir çeşit için 60 tane olacak şekilde aynı ortamlar üzerinde altkültüre alınmıştır. Elde edilen kalluslardan parlak renkli ve kırılabilir olanları seçilmiş ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık koşullarda iklim odasında kültüre alınmıştır.

### 3.2.5. Kalluslardan Bitki Regenerasyonu

Olgun buğday embriolarından elde edilen embriyogenik kalluslardan bitki regenerasyonunu gerçekleştirmek amacıyla kalluslar farklı konsantrasyonlarda Glycine (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l), IAA (3-Indol acetic acid) (0.1, 1.0 mg/l), BAP (1.0 mg/l) ve Kinetin (1.0 mg/l) içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınmıştır. Regenerasyon ortamlarına aktarılan kalluslar 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullardaki  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki klima odalarında muhafaza edilmiştir. Kallusların kültüre alınmasından yaklaşık 4-6 hafta sonra kallus başına oluşan bitkicikler sayılarak yüzde oranları alınmıştır. Üç buğday çeşiti için 3'er petride her bir çeşit için toplam 27 kallus parçası kültüre alınmış ve değerlendirmeler buna göre yapılmıştır.

### 3.2.6. Sürgünlerin Geliştirilmesi ve Köklendirilmesi

Olgun buğday embriolarından elde edilen embriyogenik kalluslardan oluşan küçük bitkicikler 3-4 hafta aralıklarla birkaç kez aynı ortam üzerinde alt kültüre alınmış ve sürgün gelişimi gerçekleşmiştir.

Sürgünler köklendirilmeleri için 0.1 mg/l IBA (Indole-3- butyric acid) içeren MS ortamı ve hormon içermeyen MS ortamı üzerinde cam deney tüpleri içerisinde kültüre alınmıştır. Hormon içermeyen MS ortamı üzerinde köklenen bitkiler sera koşullarında toprağa aktarılmıştır.



#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

##### 4.1. Olgunlaşmış Buğday Embriyolarının Kültüre Alınması ve Mezokotil Doku Parçalarının Değişik Ortamlara Karşı Tepkileri

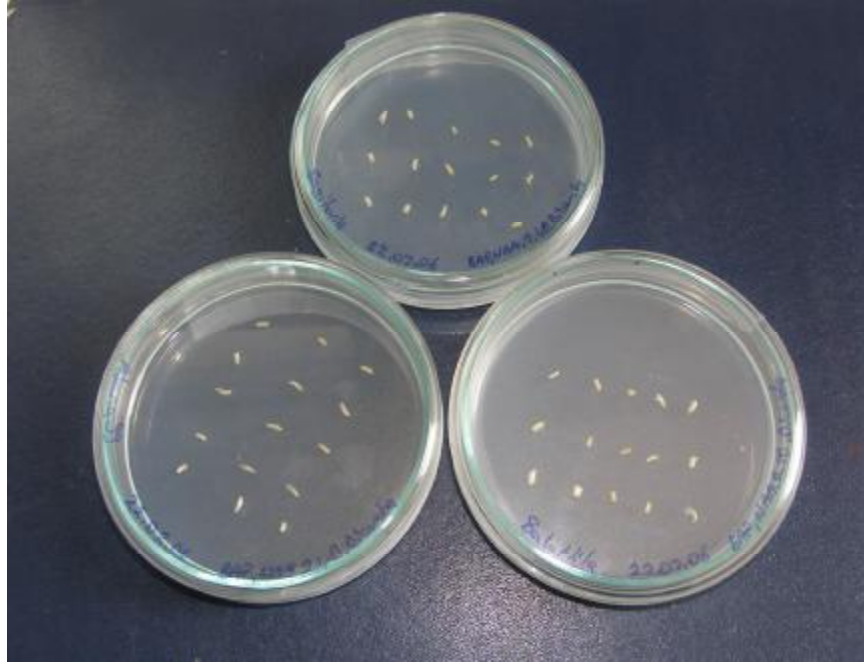
Üç farklı buğday çeşidinin (Adana 99, Balattıla, Sagitoria) olgun embriyolarının MS ortamı üzerinde çimlendirilmesiyle (Şekil 4.1) elde edilen bitkilere ait mezokotil doku parçalarının bitki regenerasyonu için farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınması ve bununla ilgili alınan sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** MS Ortamı Üzerinde Karanlıkta Çimlendirilmiş Buğday Embriyolarından Bir Görünüm

Embriyoların kültüre alınma işleminden 6-7 gün sonra yapılan sayımlar sonucunda buğday çeşitlerine ait çimlenme oranları sırasıyla %95 ile Balattıla, %91.6 ile Sagitoria ve %90 ile Adana 99 olarak belirlenmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda bazı ölü dokular ve kalluslar olduğu gözlenmiştir. Bu ölü dokular ve kalluslar bitki dokularından uzaklaştırılmıştır. Embriyoların çimlenmesi sonucunda 3-6 cm uzunluğa ulaşan bitkilerin kök kısmına yakın kısmından 3-4 mm uzunluğundaki doku parçaları (mezokotil) keskin bir bistüri yardımıyla kesilip

çıkarılmış ve 2,4-D, Dicamba, NAA ve BAP'ın değişik kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren katı MS ortamı üzerinde iklim odalarında kültüre alınmışlardır (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Mezokotil Doku Parçalarından Bir Görünüm

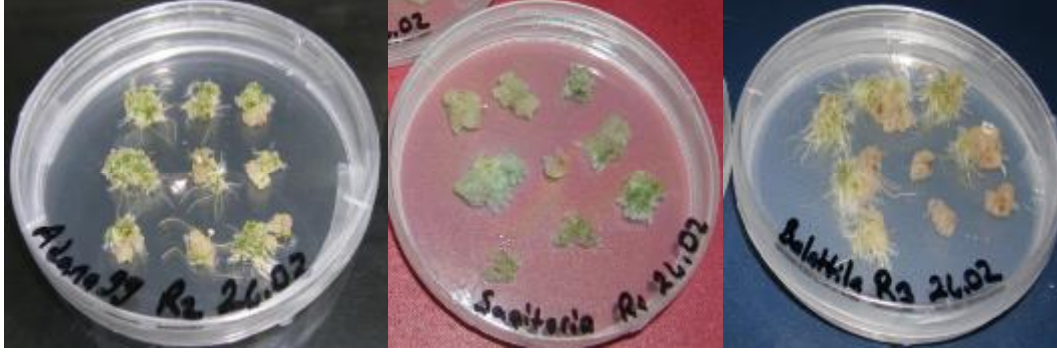
Mezokotil doku parçalarının kültüre alınmasından 4-6 hafta sonra bitki dokusu üzerinde yeşil renkli embriyolar ve kısmen de kallus oluşumu gözlenmiştir. Bitkiciklerin kök kısmına uzak olan gövde kısmından alınan doku parçalarının aynı ortamlar üzerinde kültüre alınması sonucunda herhangi bir oluşum gözlenmemiş ve bu bitki dokularının zamanla kahverengileşerek öldükleri saptanmıştır.

**Çizelge 4.1.** Farklı Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarını İçeren MS ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Üç Değişik Buğday Çeşidine Ait Mezokotil Dokularının Tepkileri

| Buğday Çeşidi | Hormon Kombinasyonları (BAP, Dicamba, 2,4-D, NAA) (mg/l) | Embriyo Oluşumu % |
|---------------|--|-------------------|
| Sagitoria     | 1, 2, 2, 2   | 73.3              |
|               | 2, 2, 2, 2   | 63.6              |
|               | 3, 2, 2, 2   | 61.3              |
|               | 2, 1, 2, 2   | 43.3              |
| Balattila     | 1, 2, 2, 2   | 66.3              |
|               | 2, 2, 2, 2   | 63.0              |
|               | 3, 2, 2, 2   | 60.6              |
|               | 2, 1, 2, 2   | 46.6              |
| Adana 99      | 1, 2, 2, 2   | 63.3              |
|               | 2, 2, 2, 2   | 55.0              |
|               | 3, 2, 2, 2   | 48.3              |
|               | 2, 1, 2, 2   | 40.0              |

I.no'lu hormon kombinasyonunu ( BAP, Dicamba, 2,4-D, NAA: 1.0, 2.0, 2.0, 2.0) içeren katı MS ortamı üzerinde kültüre alınan 3 değişik buğday çeşidine ait mezokotil dokularından en yüksek embriyo oluşumu eksplant başına ortalama 73.3 ile Sagitoria buğday çeşidine ait mezokotil doku parçalarından elde edildiği belirlenmiştir. Bunu ortalama 66.3 ile Balattila ve 63.3 ile Adana 99 izlemiştir. II. no'lu hormon kombinasyonunda ise ( BAP, Dicamba, 2,4-D, NAA: 2.0, 2.0, 2.0, 2.0) en yüksek embriyo oluşumu eksplant başına ortalama 63.6 ile Sagitoria, 63.0 ile Balattila ve 55.0 ile Adana 99 buğday çeşidinde gözlenmiştir. III. no'lu hormon kombinasyonunda ( BAP, Dicamba, 2,4-D, NAA: 3.0, 2.0, 2.0, 2.0) gerçekleşen en yüksek embriyo oluşumu eksplant başına ortalama 61.3 ile Sagitoria'da saptanmış ve bunu sırası 60.6 ile Balattila ve 48.3 ile Adana 99 çeşitleri takip etmiştir. IV. no'lu hormon kombinasyonundaki ( BAP, Dicamba, 2,4-D, NAA: 2.0, 1.0, 2.0, 2.0) MS

ortamı üzerinde kültüre alınan mezokotil dokularından elde edilen en yüksek embriyo oluşumu eksplant başına ortalama 46.6 ile Balattila, 43.3 ile Sagitoria ve 40.0 ile Adana 99 çeşidinde gerçekleşmiştir (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Mezokotil Doku Parçalarından Oluşan Embriyolardan Bir Görünüm

Araştırmada bitki materyali olarak kullanılan buğday genotiplerinin mezokotil doku parçalarından embriyo oluşumuna BAP konsantrasyonundaki değişiklikler genotiplere göre farklılık göstermiştir. Sharma ve ark. (2005) arpa üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada olgun arpa embriyolarının çimlendirilmesi sonucunda oluşan bitkiciklerin meristematik sürgün doku parçalarını 2,4-D, BAP ve TDZ'nin farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren katı MS ortamı üzerinde kültüre alarak kallus oluşumunu minimumda tutarak bitkicikler elde etmeyi başarmışlardır. Bir başka araştırmacı grubu ise yulafın meristem dokusunu kültüre alarak çok sayıda yulaf bitkiciği elde etmişlerdir (Zhang ve ark., 1996). Mısır ve arpa üzerinde yapılan benzer bir çalışmada ise meristemden alınan doku parçalarının kültüre alınması sonucunda çok sayıda yan sürgün oluşumu gözlemlendiğini rapor etmişlerdir (Zhang ve ark., 1998). Yukarıda belirtilen araştırmalarda da belirtildiği üzere kültüre alınan doku parçalarının ortama karşı gösterdikleri tepkilerin ortam içeriklerine bağlı olduğu gibi genotip özelliklerine de bağlı olabilmektedir. Yapılan bu çalışmada genotipler kültür ortamına karşı farklı tepkiler vermiş olması alınan sonuçların literatürde verilen sonuçlarla uyum içerisinde olduğunun bir göstergesidir. Yapılan araştırma ve alınan sonuçlar buğdayın genetik transformasyonunda kullanılacak bitki

materyalinin elde edilmesi açısından önem arz etmektedir.

#### **4.2. Olgunlaşmış Buğday Embriyolarının Kültüre Alınması ve Buğday Çeşitlerinin Farklı Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonlarına Karşı Tepkileri**

Adana 99, Balattila, Sagitoria buğday çeşitlerinin olgun embriyolarından doğrudan kallus gelişimini teşvik etmek amacıyla 2,4-D ve 2,4-D + Dicamba'nın farklı konsantrasyonlarını içeren MS ortamları kullanılmış ve kallus oluşum oranları gözlenmiştir. Olgun embriyoların kültüre alınmalarından yaklaşık 4-6 hafta sonra embriyolar üzerinde kallus oluşumunun başladığı gözlenmiştir. Kallus oluşturmamış olgun embriyoların bir çoğu ise sürgün oluşturmuştur. Bu şekilde oluşan kalluslar seçilerek yaklaşık 4 haftada bir alt kültüre alınmış ve bunlardan çabuk dağılan embriyogenik özellikte kallusların olduğu gözlenmiştir. Üç farklı buğday çeşidinin olgun embriyoları, ortama ilave edilen 2,4-D ve 2,4-D + Dicamba'nın konsantrasyonlarına göre farklı oranda kallus oluşturmuşlardır. Bu çalışmadan alınan sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Olgunlaşmış Buğday Embriyolarının 2,4-D ve 2,4-D+Dicamba Hormon Konsantrasyon ve Kombinasyonlarını İçeren MS Ortamı Üzerindeki Tepkileri

| <b>Buğday Çeşidi</b> | <b>Kullanılan Hormonlar ve Kombinasyonları Miktar (mg/l)</b> | <b>Kallus Oluşum %'si</b> |
|----------------------|--|---------------------------|
| Sagitoria            | 2 mg/l 2,4-D   | 76.6                      |
|                      | 4 mg/l 2,4-D   | 41.6                      |
|                      | 2 mg/l+2 mg/l 2,4-D+Dicamba                                  | 46.6                      |
| Balattila            | 2 mg/l 2,4-D   | 75.0                      |
|                      | 4 mg/l 2,4-D   | 48.3                      |
|                      | 2 mg/l+2 mg/l 2,4-D+Dicamba                                  | 60.0                      |
| Adana 99             | 2 mg/l 2,4-D   | 70.0                      |
|                      | 4 mg/l 2,4-D   | 45.0                      |
|                      | 2 mg/l+2 mg/l 2,4-D+Dicamba                                  | 53.3                      |

Tohumlardan izole edilen olgun embriyoları kültüre alınan bütün genotiplerin 2.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamındaki en yüksek kallus oluşum oranları sırası ile %76.6 ile Sagitoria, %75 ile Balattila ve %70 ile Adana 99 şeklinde meydana gelmiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.4.** MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Olgun Embriyolardan Oluşan Embriyogenik Kalluslardan Bir Görünüm

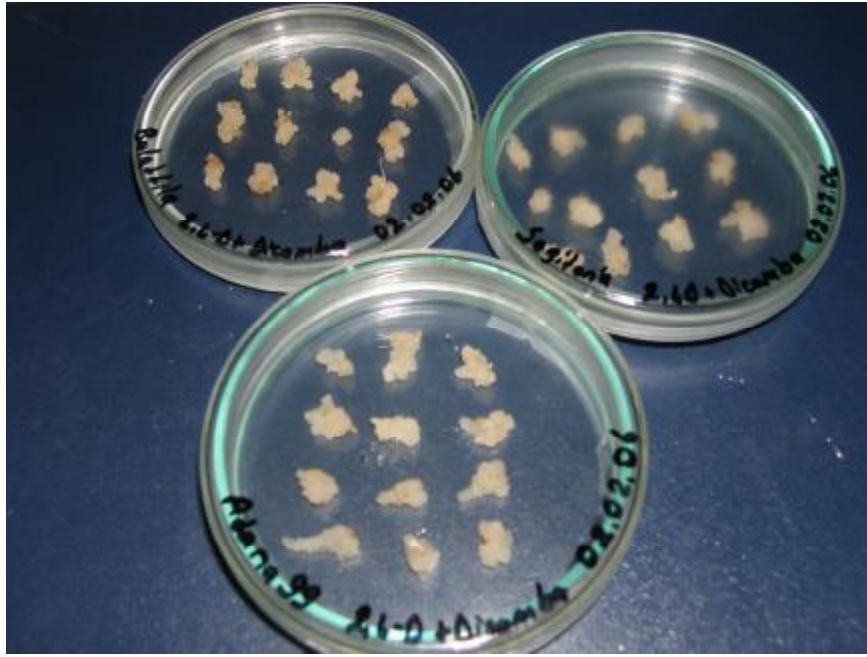
Ortamda kullanılan 2.0 mg/l 2,4-D konsantrasyonunun 4.0 mg/l'ye artırılması ile çeşitlerin kallus oluşum oranlarındaki değişiklikler şu şekilde tespit edilmiştir; %48.3 ile Balattıla, %45 ile Adana 99, %41.6 ile Sagitoria'da gözlenmiştir. Buna göre kallus teşvikinde kullanılan 2,4-D oranındaki artışın çeşitlerdeki kallus oluşum oranını düşürdüğü saptanmıştır. Dornolles ve ark. (1997a), yaptıkları bir araştırmada Brezilya triticalesinin *in vitro* davranışlarını belirlemek için 16 triticales genotipi ve 3 buğday genotipinin olgunlaşmamış embriyolarını eksplant olarak kullanmışlardır. Araştırmada kallus gelişimi için 2.0 mg/l ve 4.0 mg/l 2,4-D içeren 2 tip MS ortamını denemişler ve elde edilen kalluslardan bitki regenerasyonunda ki farklılıklar triticales ve buğday genotiplerinin her ikisinde de gözlenmiştir. Triticales genellikle buğdaydan daha iyi regenerasyon oranı göstermiştir. Olgunlaşmamış embriyoların kallus gelişim oranları arasında farklılık gözlenmemiştir. Eskalen (1996)'in yapmış olduğu bir çalışmada ise yine bizim çalışmamızın aksi bir sonuç alınmıştır. Yapılan çalışmada beş hexaploid buğday çeşidinin olgun embriyolarının, ortama ilave edilen 2,4-D konsantrasyonlarına göre farklı oranda kallus oluşturduğunu saptamıştır. Buna göre olgun embriyoları kültüre alınan bütün çeşitler en yüksek 5.0 ve 8.0 mg/l 2,4-D

içeren MS ortamlarında kallus oluşturmuşlardır. Çeşitler arasında en düşük kallus oluşumu ise MS + 3.0 mg/l 2,4-D içeren MS1 ortamlarında meydana gelmiştir. Her iki araştırma ile yapılan bu çalışma arasındaki farklılıklar kullanılan genotiplerin farklı olmasından kaynaklanabileceği varsayılmaktadır. Karaca ve Bürün (1999)'nün yapmış oldukları bir çalışmada Doğu 88 buğday çeşidinin olgun ve olgunlaşmamış embriyoları farklı 4 madde katılmış MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Gözlemler sonunda, kallus, sürgün ve kök oluşturan bitki sayıları belirlenmiştir. Çalışmada olgunlaşmamış embriyoların kültüründe en yüksek kallus oluşumu (ortalama % 94) 2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l Kinetin eklenmiş MS ortamında elde edilirken, olgun embriyoların kültüründe ise en yüksek kallus oluşumu (ortalama %95) 2.0 mg/l 2,4-D ilave edilmiş MS ortamında gözlenmiştir. Denemede kallus ağırlıkları bakımından olgun embriyoların daha iyi sonuç verdiğini belirlemişlerdir. En yüksek kallus ağırlığını ise ortalama 395.3 mg olarak 2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l kinetin içeren MS ortamında saptamışlardır. Bu çalışmada da bizim çalışmamıza benzer sonuçlar alınmış olup, olgun embriyoların kültüründe en yüksek kallus oluşumunun 2.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l Kinetin ilave edilmiş MS ortamından elde edildiği rapor edilmiştir. Sonuç olarak en fazla kallus oluşum oranı %76.6 ile 2.0 mg/l 2,4-D ilave edilmiş MS ortamında kültüre alınan çeşitlerden Sagitoria'da meydana geldiği saptanmıştır.

MS ortamına 2.0 mg/l 2,4-D + 2.0 mg/l Dicamba'nın ilave edilmesiyle kültüre alınan olgun embriyoların kallus gelişim oranları %60 ile Balattila, %53.3 ile Adana 99, %46.6 ile Sagitoria çeşitlerinde gözlenmiştir. Akula ve ark. (1999)'nın yapmış oldukları bir çalışmada benzer sonuçlar alınmış olup, Dicamba'nın hem buğday hem de arpa'nın olgun embriyolarından kallus teşvikini artırdığı tespit edilmiştir. Akula ve ark. (1999), çalışmalarında 9 arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşidinin olgun embriyolarından kallus elde etmenin bitki regenerasyonu için güvenli bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Oksinlerden; 2,4-D, Picloram ve Dicamba'nın birçok arpa çeşidinin olgun embriyolarından kallus teşvikini etkilediğini kanıtlamışlardır. İlk kallus teşvikinin dağınık, kırılğan ve şeffaf olduğunu belirtmişlerdir. Aynı bileşimdeki yeni ortam üzerine 2-3 kez aktarıldıktan sonra



kaymak beyazı yoğun kallusların meydana geldiğini saptamışlardır. Kallus teşviki ve regenerasyon kapasitesi çeşide göre değişkenlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Picloram'ın yüksek konsantrasyonunun kullanılması sonucu 3 çeşidin de (Tallon, Grimmet, Sloop) regenerasyon kapasitesinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bu kalluslardan regenere olan bitkilerin dayanıklı ve hormon içermeyen ortama aktarıldıklarında kök oluşturduklarını saptamışlardır.



**Şekil 4.5.** 2,4-D ve Dicamba İçeren MS Ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Olgun Buğday Embriyolarından Oluşan Kalluslardan Bir Görünüm

MS ortamına 2,4-D'den farklı olarak Dicamba'nın ilave edilmesiyle kallus oluşum oranlarında artış olmuş, ancak bu artış çeşide göre değişiklik göstermiştir. Ortama sadece 2,4-D eklendiğinde en yüksek kallus oluşum oranı Sagitoria'da gözlenirken, 2,4-D + Dicamba birlikte kullanıldığında ise en yüksek kallus oluşum oranı Balattila çeşidinde meydana gelmiştir.

### 4.3. Kalluslardan Bitki Regenerasyonu

Olgun embriyolardan elde edilen kalluslar, bitki regenerasyonunu sağlamak amacıyla farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda Glycine (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l), BAP (1.0 mg/l), Kinetin (1.0 mg/l) ve IAA (0.1, 1.0 mg/l) içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır.



**Şekil 4.6.** Olgun Buğday Embriolarından Oluşan Embriyogenik Kalluslardan Bitki Regenerasyonu

Her bir petri kutusuna 9 kallus parçası konulmuş ve 4-6 hafta sonra bu kallus parçaları üzerinde oluşan bitkicikler sayılarak bitki regenerasyonu oranı tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Buradan alınan sonuçlar Çizelge 4.3’de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Bitki Regenerasyonu İçin Kullanılan Çeşitli Hormon Kombinasyon ve Konsantrasyonlarını İçeren MS ortamı Üzerinde Kültüre Alınan Eksplantların Tepkileri

| <b>Buğday Çeşidi</b> | <b>Bitki Regenerasyonunda Kullanılan Ortamlar ve Konsantrasyonları (mg/l)</b> | <b>Regenerasyon Oranı %'si</b> |
|----------------------|---|--------------------------------|
| Adana99              | <b>R2:</b> MS + 1 mg/l IAA +1 mg/l BAP  | 96.3                           |
|                      | <b>R1:</b> MS + 4 mg/l Glycine  | 81.5                           |
|                      | <b>R3:</b> MS + 1 mg/l IAA + 1 mg/l Kinetin                                   | 66.7                           |
| Balattıla            | <b>R2:</b> MS + 1 mg/l IAA + 1 mg/l BAP                                       | 95.6                           |
|                      | <b>R1:</b> MS + 4 mg/l Glycine  | 77.7                           |
|                      | <b>R3:</b> MS + 1 mg/l IAA + 1 mg/l Kinetin                                   | 44.4                           |
| Sagitoria            | <b>R2:</b> MS + 1 mg/l IAA + 1mg/l BAP  | 88.9                           |
|                      | <b>R1:</b> MS + 4 mg/l Glycine  | 85.2                           |
|                      | <b>R3:</b> MS + 1 mg/l IAA + 1 mg/l Kinetin                                   | 55.6                           |

Regenerasyon için ilk önce üç farklı ortam denemiştir. Bu ortamlar R1 , R2, R3 olarak isimlendirilmiştir. R1'de %3 sakkaroz içeren MS ortamına 4mg/l Glycine eklenmiştir. R2 ortamı 0.1 mg/l IAA ve 1.0 mg/l BAP içermektedir. R3 ortamında ise yine MS ortamına 1.0 mg/l IAA ve 1.0 mg/l Kinetin ilave edilmiştir. Daha sonra üç ayrı ortamda regenerasyon oranı gözlenmiştir. Buna göre R1 ortamındaki Adana 99 çeşidindeki regenerasyon oranı %81.5, Balattıla'da %77.8, Sagitoria'da ise %85.2'dir. R2 ortamındaki regenerasyon oranları ise Adana 99 çeşidinde %96.3, Balattıla'da %95.6, Sagitoria'da ise %88.9 olarak meydana gelmiştir. R3 ortamındaki oranlar ise Adana 99 çeşidinde %66.7, Balattıla'da %44.4, Sagitoria'da %55.6 şeklinde gerçekleşmiştir. Regenerasyon oranlarındaki farklılığın çeşide ve kullanılan ortama göre değiştiği tespit edilmiştir. Fakat en az regenerasyon oranının R3 ortamında ve %44.4 ile Balattıla çeşidinde gerçekleştiği saptanmıştır. En fazla regenerasyon oranı ise R2 ortamında ve %96.3 ile Adana 99 çeşidinde gözlenmiştir. Ahmed ve Sagi (1993)'nin yapmış oldukları bir çalışmada kışlık buğdayın olgunlaşmamış embriyolarından elde ettikleri embriyogenik kalluslardan çok sayıda

embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlardır (*Triticum aestivum* L. , cv. GK Sagvari). Kallusların embriyogenik kapasitede olanlarını 6 aydan fazla bekletmişler ve regenerasyon gerçekleştirmişlerdir. IAA ve BAP eklenerek farklılaştırılmış MS ortamında birkaç yüz tane yeşil sürgün ve bitki regenerasyonu tespit etmişler ve bizim olgun embriyolardan elde ettiğimiz sonucu olgunlaşmamış embriyolarda tespit etmişlerdir.

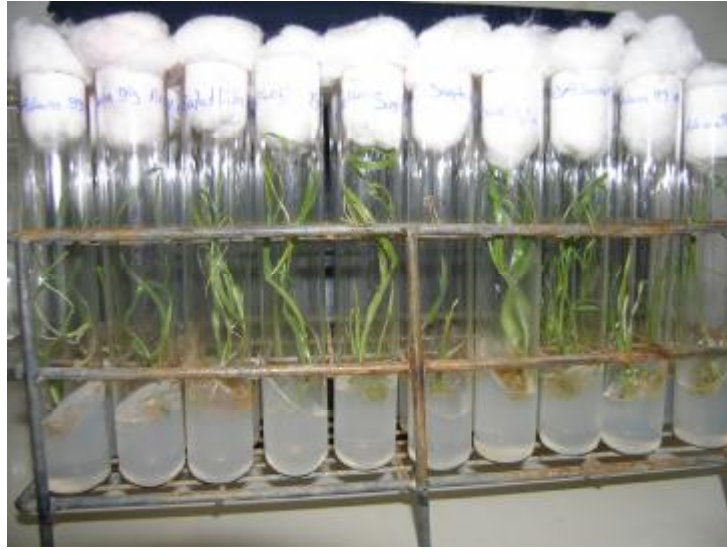
Başka bir regenerasyon denemesinde ise Glycine'in 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l konsantrasyonları kullanılmış ve sonuçları değerlendirilmiştir. Burada da her bir petri kutusuna 6 kallus parçası konmuş ve yine 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullardaki klim odasında muhafaza edilmiştir. Kültüre alınmalarından yaklaşık 4-6 hafta sonra kalluslardan regenere olan küçük bitkicikler sayılmış ve regenerasyon oranları rapor edilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4' de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** MS Ortamı İçerisine İlave Edilen Farklı Glycine Konsantrasyonlarının Bitki Regenerasyonu Üzerine Olan Etkileri

| Buğday Çeşidi | Glycine Konsantrasyonları<br>(mg/l) | Regenerasyon<br>%’si |
|---------------|-------------------------------------|----------------------|
| Adana 99      | 1 mg/l                              | 75.0                 |
|               | 2 mg/l                              | 33.3                 |
|               | 3 mg/l                              | 33.3                 |
| Balattıla     | 1 mg/l                              | 33.3                 |
|               | 2 mg/l                              | 41.6                 |
|               | 3 mg/l                              | 8.3                  |
| Sagitoria     | 1 mg/l                              | 16.6                 |
|               | 2 mg/l                              | 16.6                 |
|               | 3 mg/l                              | 50.0                 |

Buradan elde edilen sonuçlara göre en fazla regenerasyon oranı %75 ile Adana 99 çeşidinde ve 1.0 mg/l Glycine içeren MS ortamında gerçekleşmiştir. Özgen ve ark. (1998), yapmış oldukları bir çalışmada kışlık buğday genotiplerinin olgun ve olgun

olmayan embriyolarını kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu için kültüre almışlardır. Her iki embriyo kültürü için etkili metodlar geliştirerek alınan sonuçları karşılaştırmışları neticesinde kallusların oluşum oranı, regenerasyon kapasitesi ve regene olan bitkilerin sayısının genotipe bağlı olarak değişiklik gösterdiğini saptamışlardır. Çalışmalarında 2.0 mg/l Glycine içeren MS ortamının regenerasyon için etkili olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada alınan sonuçlarla yukarıda sözü edilen çalışmada alınan sonuçlar karşılaştırıldığında benzer sonuçlar alındığı ancak Glycine kullanılarak yapılmış olan regenerasyon denemesinde genotipe bağlı değişikliklerin olduğu gözlenmiştir. Kültürler  $25\pm 1$  °C'de 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullardaki iklim odasında muhafaza edilmiştir. Daha sonra kalluslardan regene olan bitkiler cam deney tüplerine aktarılmış gelişimleri gözlenmiştir (Şekil 4.5).

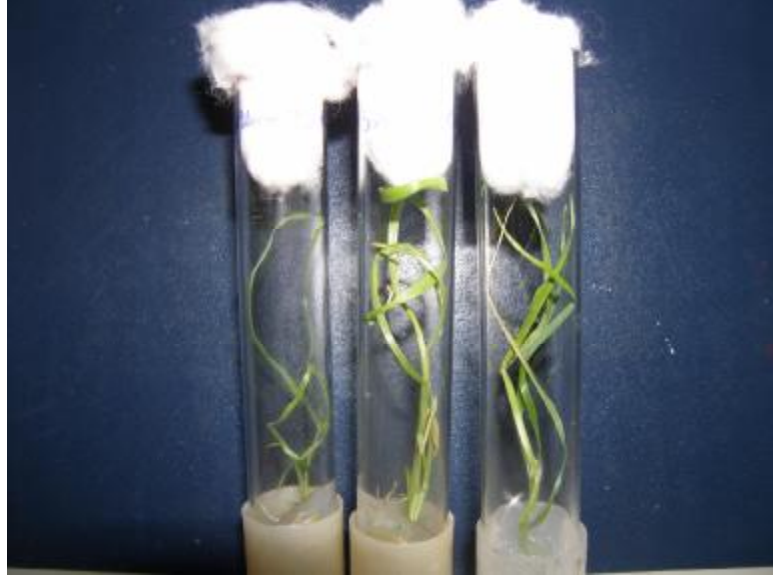


**Şekil 4.7.** Embriyogenik Buğday Kalluslarından Regene Edilen *İn vitro* Buğday Bitkilerinden Bir Görünüm

#### **4.4. Regene Olan Bitkilerin Köklendirilmesi ve Toprağa Aktarılması**

Embriyogenik buğday kalluslarından regene olan buğday bitkileri cam deney tüplerine aktarılmış ve sürgün gelişimini tamamlaması sağlanmıştır. Daha sonra kök gelişimi için hormon içermeyen MS ortamı üzerinde kültüre alınan bitkilerdeki kök oluşumunun 0.1 mg/l IBA içeren MS ortamındaki kök oluşumuna

göre daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Hormon içermeyen MS ortamı üzerinde 1 ay sonra 8-10 cm uzunluğuna ulaşan ve köklenen bitkiler daha sonra sera koşullarında toprağa aktarılmış olup normal büyüme ve gelişme gösteren bitkiler elde edilmiştir (Şekil 4.7).



**Şekil 4.8.** Hormon İçermeyen MS Ortamı Üzerinde Köklenen Buğday Bitkilerinden Bir Görünüm

Savaşkan ve ark. (1999) bir çalışmasında bizim çalışmamızın aksine bir sonuç alınmış olup, bizim yapmış olduğumuz çalışmada kök oluşumu için hormonsuz MS ortamı yeterli olurken, Savaşkan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise kök oluşumu için yüksek düzeyde oksine ihtiyaç duyulmuştur. Araştırmalarında ülkemizde tarımı yapılan dört arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşidinde (Anadolu, Cumhuriyet-50, Obruk-86 ve Tokak -157137) anter kültürü tekniği ile kallus elde etmişler bunlardan elde ettikleri bitkilerde kök oluşumunu teşvik etmek için 10 mg/l NAA yada IAA ve 0.5 mg/l Kinetin kullanarak başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Bu farklılığın arpa ile buğdayın kök oluşturmasında farklı istekleri olabileceğinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Akula ve ark. (1999)'nın yapmış oldukları bir çalışmada ise 9 arpa çeşidinin olgun embriolarından kallus elde ederek bunlardan bitki regenerasyonunu sağlamışlar ve bitkilerin köklendirilmesi için

hormonsuz MS ortamını kullanmışlardır. Yapılan çalışma yukarıda sözü edilen araştırma ile karşılaştırıldığında alınan sonuçların uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, bazı buğday çeşitlerinde meristematik doku parçaları kullanılarak etkin bitki regenerasyon sisteminin kurulması hedeflenmiştir. Bunun içinde bitki hücrelerinin totipotensi özelliğinden yararlanarak mezokotil dokulardan direk bitki ve olgun embriyolardan elde edilecek kalluslardan ise bitki regenerasyonu amaçlanmış ve değişik hormon konsantrasyon ve kombinasyonları kullanılarak yüksek oranda bitki regenerasyonunu teşvik eden uygun ortamların belirlenmesi öngörülmüştür.

1) Mezokotil doku parçalarından direk bitki regenere etmek için tohumların çimlenmesinden 7 gün sonra mezokotiller kesilmiş ve uygun ortamı belirlemek amacıyla yapılan ön çalışmalar sonucunda eksplant başına ortalama 73.3 embriyo oluşumu başarısı ile 1.0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l Dicamba, 2,4-D, NAA içeren MS ortamı olduğu belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan bitki doku parçalarından en fazla embriyo oluşumu bitkinin köke yakın olan kalın kısmından alınan mezokotil bitki doku parçasından elde edildiği saptanmıştır. Bunun dışında mezokotilden uzak olan kısımlardan alınan bitki doku parçalarında herhangi bir oluşum gözlenmemiş olup bu dokuların zamanla kahverengileşerek öldüğü tespit edilmiştir. Buna göre embriyo oluşumunun daha verimli olması için kullanılacak olan bitki doku parçasının mezokotil olması gerektiği mezokotilden uzak olan kısımların ise kullanılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır.

2) Buğday olgun embriyosundan kallus elde etmek amacıyla yapılan denemelerde MS ortamına sadece 2.0 mg/l 2,4-D ilave edilmesiyle en yüksek kallus oluşum oranı %76.6 ile Sagitoria çeşidinde gerçekleşmiştir. Buna göre araştırmalarda farklı çeşitlerin kallus oluşumu ve regenerasyon için farklı sonuçlar vereceği görüşüne varılmıştır.

3) Yine olgun embriyodan kallus oluşumunu gerçekleştirmek amacıyla yapılan başka bir çalışmada %60'lık bir başarı ile 2.0 mg/l 2,4-D ve 2.0 mg/l Dicamba içeren MS ortamında ve Balattıla çeşidinde gözlenmiştir. Kallus oluşumunda 2,4-D haricinde farklı büyüme düzenleyiciler kullanmanın kallus teşvikini olumlu yönde etkileyeceği düşünülmektedir.



4) Kalluslardan bitki regenerasyonunun sağlanması için farklı hormon konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren değişik ortamlarının denenmesi sonucunda en fazla başarı 0.1 mg/l IAA ve 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamında gerçekleşmiş olup %96.3 oran ile Adana 99 çeşidinde meydana gelmiştir. Buna göre regenerasyon çalışmalarında BAP ve IAA'nın birlikte kullanılmasının çeşitlere göre değişmekle birlikte regenerasyon oranını arttırdığı düşünülmektedir.

5) Başka bir regenerasyon denemesinde farklı Glycine konsantrasyonlarının regenerasyona olan etkisi araştırılmış ve sonuç olarak 1.0 mg/l Glycine eklenen MS ortamının en fazla başarı oranını %75 ile Adana 99 çeşidinde gösterdiği saptanmıştır. Buna göre farklı çeşitlerde farklı Glycine konsantrasyonlarının denenmesi yararlı olacaktır.

6) Araştırmada kullanılan ortamlardan hem kallus oluşum ortamları hem de regenerasyon ortamlarından alınan sonuçlar genotipe bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

7) Regenere olan bitkiler 0.1 mg/l IBA içeren MS ortamına aktarıldığında kök oluşumunun zayıf olduğu gözlenmiştir. Bitkilerin hormonsuz MS ortamı üzerinde kültüre alınmalarının ise kök oluşumu için uygun olduğu ve sera koşullarında toprağa aktarıldıkları zaman ise normal büyüme ve gelişme gösteren bitkiler elde edildiği saptanmıştır. Buna göre buğday bitkilerinin köklendirilmesi için IBA yerine hormonsuz MS ortamının kullanılmasının uygun olabileceği görüşüne varılmıştır.

Yapılan bu çalışma ile monokotiledon bitkilerin en önemlisi olan buğdayda günümüzün biyoteknolojik yöntemlerinden biri olan regenerasyon sisteminin kurulabilmesi için mezokotil dokularından bitki ve olgun embriyodan kısa zamanda embriyogenik kallus elde edilmiş ve bunlardan yüksek oranda bitki regenerasyonunun gerçekleştirilmesi için uygun bir protokol hazırlanmıştır. Bu çalışma daha sonraki yapılacak olan çalışmalara bir ön hazırlık olup transformasyonda kullanılacak uygun bitki doku parçalarının elde edilmesi konusunda yardımcı olacaktır.

## KAYNAKLAR

- AHMED, K.Z., and SAGI, F., 1993. High-efficiency plant regeneration from an embryogenic cell suspension culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Acta Biol. Hung., 44(4):421-32.
- AKULA, C., AKULA, A., and HENRY, R., 1999. Improved regeneration efficiency from mature embryos of barley cultivars. Biol. Plant., 42:505-513.
- ALIZADEH, H., NAGHAVI, M.R., OMIDI, M., and SAATIN, B., 2004. Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of wheat (*Triticum aestivum*). 4th International Crop Science Congress.
- ANWAAR, A., ZHONG, H., and WANG, W., 2002. Shoot apical meristem: *In vitro* Regeneration and Morphogenesis in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *In vitro* cellular & developmental biology. Plant, 38(2).
- BAHIELDIN, A., DYER, W.E., and QU, R., 2000. Concentration effects of Dicamba on shoot regeneration in wheat. Plant Breeding, Vol:119, Issue: 5, Page: 437.
- BAYLISS, M.W., and DUNN, S.D.M., 1979. Factors affecting callus formation from embryos of barley (*Hordeum vulgare*). Plant Science Letters, Volume 14, Issue 4, Pages 311-316.
- BİRSİN, M.A., ÖNDE, S., and ÖZGEN, M., 2001. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of oat (*Avena sativa* L.). Turk J. Biol. 25, 427-434.
- \_\_\_\_\_, and ÖZGEN, M., 2004. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale ( x *Triticosecale wittmack*). Cellular & Molecular Biology Letters, Volume 9, pp353-361.
- BREGITZER, P., and TONKS, D., 2003. Inheritance and expression of transgenes in barley. Crop Sci., 43:4-12.
- CHANG, Y., ZITZEWITZ, J.V., HAYES, P.M., and CHEN, T.H.H., 2003. High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L.cv. Morex). Plant Cell Reports, 21(8):733-8.

- CHOI, H.W., LEMAUX, P.G., and CHO, M-J., 2000. Increased chromosomal variation in transgenic versus nontransgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Crop Sci.*, 40:524-533.
- DAHLEEN, L.S., 1999. Donor-plant environment effects on regeneration from barley embryo-derived callus. *Crop Sci.*, Vol 39, Issue 3, Pages: 682-685.
- \_\_\_\_\_, and BREGITZER, P., 2002. An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus cultures of commercial cultivars. *Crop Sci.*, 42:934-938.
- DELPORTE, F., MOSTADE, O., and JACQUEMIN, J.M., 2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Volume 67, Number 1, Pages:73-80.
- DORNOLLES, A.L.C., CARVALHO, F.I.F., FEDERIZZI, L.C., HANDEL, C.L., BERED, F., SORDI, M.E.B., and SCHNEIDER, F., 1997a. Callus induction and plant regeneration by Brazilian triticale and wheat genotypes. *Brazilian Journal of Genetics.*, Vol:20, Issue:1.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, LANGE, C.E., and HANDEL, C.L., 1997b. Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Brazilian Journal of Genetics*, vol. 20, no. 2, 293-297.
- ESKALEN, A., 1996. Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Protoplast izolasyonu, Kültürü ve Bitki Regenerasyonu. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilimdalı Doktora Tezi., 143.
- FAROOQ, M., RASHID, H., IHSANULLAH., CHAUDHRY, Z., and MARWAT, K.B., 2004. Comparative Tissue Culture Response of Wheat Cultivars and Evaluation of Regenerated Plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(3): 406-408.
- FAZELIENASAB, B., OMIDI, M., and AMIRITOKALDANI, M., 2004. Effects of abscisic acid on callus induction and regeneration of different wheat cultivars to mature embryo culture. *Proceedings of the 4th International Congress*.
- GREEN, C.E. 1977. Prospects for crop improvement in the field of cell culture. *Hort Science*, 12: 131-134.

- HALÁMKOVÁ, E., VAGER, J., and OHNOUTKOVÁ, L., 2004. Regeneration capacity of calli derived from immature embryos in spring barley cultivars. *Biologia Plantarum*, Vol. 48, no.2, pp. 313-316(4).
- HALÍLOĞLU, K., 2002. Wheat immature embryo culture for embryogenic callus induction. *Journal of Biological Sciences* 2(8): 520-521.
- HAVRELETOVA, M., FARAGO, J., and NESTAKOVA, M., 2001. Regeneration of immature inflorescences of barley in vitro. *Biol Plant.*, 44:157-159.
- JÄHNE, A., LAZERI, P.A., JAGER-GUSSEN, M., and LÖRZ, H., 1991. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet.*, 82:74-80.
- \_\_\_\_\_, BECKER, D., BRETTSCHEIDER, R., and LÖRZ, H., 1994. Regeneration of transgenic, microspore derived, fertile barley. *Theor Appl Genet.*, 89:525-533.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and LÖRZ, H., 1995. Genetic engineering of cereal crop plants: a review. *Euphytica*, 85:35-44.
- JÄHNE-GARTNER, A., and LÖRZ, H., 1996. *In vitro* regeneration systems of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Tissue Cult Biotechnol.*, 2:11-23.
- KARACA, Ö., ve BÜRÜN, B., 1999. Buğdayda embryo kültüründen kallus oluşumu. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2:269-274.
- KEREŠA, S., BARIĆ, M., ŠARČEVIĆ, H., MARCHETTI, S., and DRESNER, G., 2001. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. The XVIth EUCARPIA Congress.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and \_\_\_\_\_, 2004. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos and immature inflorescences of eight Croatia winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Die Bodenkultur, Austrian Journal of Agricultural Research*. Band 54, Heft 3.
- KOPREK, T., HANSCH, R., NERLICH, A., MENDEL, R.R., and SCHULZE, J., 1996. Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. *Plant Sci.*, 119:79-91.

- LI, H., and DEVAUX, P., 2001. Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Rep.*, 20:475-481.
- MANOHARAN, M., and DAHLEEN, L.S., 2002. Genetic transformation of the commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Conlon by particle bombardment of callus. *Plant Cell Rep.*, 21:76-80.
- \_\_\_\_\_, and \_\_\_\_\_, 2003. Regeneration and genetic transformation of durum wheat. Congress On *In Vitro* Biology. *In Vitro*.V. 39. Abstract P. 2001.
- MURASHIGE, T., and SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15:473-497.
- MURRAY, F., BRETTELL, R., MATTHEWS, P., BIHOP, D., and JACOBSEN, J., 2004. Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Rep.*, 22:397-402.
- OKA, S., SAITO, N., and KAWAGUCHI, H., 1995. Histological observations on initiation and morphogenesis in immature and mature embryo derived callus of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Annals of Botany*, 76:487-492.
- 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*, Vol:18, Numbers:3-4, Pages:331-335.
- PAUK, J., KERTESZ, Z., JENES, B., PURNHAUSER, L., MANNIEN, O., PULLI, S., BARABAS, Z., DUDITS, D., 1994. Fertile wheat (*Triticum aestivum* L.) regenerants from protoplasts of embryogenic suspension culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 38:1-10.
- RASHID, H., GHANI, R.A., CHAUDHRY., Z., NAGVI, S.M.S., and QURAIISHI, A., 2002. Effect of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). *Biotechnology*, Vol:1, Number:1, 49-54.
- REINERT, J. and Y.P.S. BAJAJ., 1976. Applied and Fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture, pp: 144-147.

- SATYAVATHI, V.V., JAUHAR, P.P., ELIAS, E.M., and RAO, M.B., 2004. Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. *Crop Science*, 44:1839-1846.
- SAVAŞKAN, Ç., SZAREJKO, I., and TOKER, M.C., 1999. Callus production and plant regeneration from anther culture of some Turkish barley cultivars. *Turkish Journal of Botany*, 23:359-365.
- SHAH, M.I., JABEEN, M., and ILAHI, I., 2003. *In vitro* callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) var.lu –26S. *Pak.J.Bot.*, 35(2):209-217.
- SHAN, X., LI, D., and QU, R., 2000. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, vol. 36, no. 3, pp. 207-210.
- SHARMA, V.K., HÄNSCH, R., MENDEL, R.R., and SCHULZE, J., 2005. Mature embryo axis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*, 56(417):1913-1922.
- SHIMADA, T., 2005. Plant regeneration from stem-derived calluses of wheat. *Wheat Information Service*. No.50, P.59.
- SUN, B.L., SUN, Y.R., ZHU, Z., and LI, X.H., 1990. High frequency plant regeneration from protoplasts of wheat. *Chin J Biotechnol.* 6(2):125-9.
- TINGAY, S., McELROY, D., KALA, R., FIEG, S., WANG, M., THORNTON, S., and BRETTELL, R., 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.*, 11:1369-1376.
- TIWARI, S., 2003. Anther culture and long-term culture ability of androgenic calli in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Wheat Information Service*, Number 96:15-19.
- TRIGO, B., MILACH, S.C.K., FEDERIZZI, L.C., CARVALHO, F.I.F., DORNOLLES, A.L.C., and LANGE, C., 1991. Plant regeneration in callus culture of Brazilian wheat genotypes. *Revista PAB*, Volume:26.

- TRIGO, C., MILACH, S.C.K., FEDERIZZI, L.C., CARVALHO, F.I.F., and NETO, J.F.B., 1991. Genetic variability for plant regeneration on callus culture of wheat. *Revista PAB*, Volume:26.
- TURHAN, H., and BAŞER, İ., 2004. Callus induction from mature embryo of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian Journal of Plant Sciences* 3(1):17-19.
- VASIL, I.K., 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *J. Plant Physiology*, 128: 193-218.
- \_\_\_\_\_, 1994. Molecular improvement of cereals. *Plant Mol Biol.*, 25:925-937.
- WAN, Y., and LEMAUX, P.G., 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.*, 104:37-48.
- ZHANG, S., ZHONG, H., and STICKLEN, M.B., 1996. Production of multiple shoots from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.). *J Plant Physiol* 148:667-671.
- \_\_\_\_\_, WILLIAMS-CARRIER, R., JACKSON, D., and LEMAUX, P.G., 1998. Expression of CDC2Zm and KNOTTED1 during in vitro axillary shoot meristem proliferation and adventitious shoot meristem formation in maize (*Zea mays* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 204:542-549.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1979 yılında Adana'nın İmamoğlu İlçesi'nde doğdum. İlkokulu Adana'nın İmamoğlu İlçesi'nde, ortaokul ve lise öğrenimimi Manisa'nın Salihli İlçesi'nde tamamladım.1998 yılında kazandığım Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden 2002 yılında mezun oldum. 2002 yılında Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.



## EKLER

**Ek 1.** Buğday Bitki Doku Parçalarının Kültüre Alındığı MS (Murashige ve Skoog, 1962) Ortam İçeriği

| <b>Kimyasallar</b>                                  | <b>Miktarları (mg/l)</b> |
|---|--------------------------|
| <b>İnorganik Maddeler</b>                           |                          |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1650                     |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1900                     |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 440                      |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 370                      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170                      |
| KI  | 0.83                     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6.2                      |
| MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 22.3                     |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 8.6                      |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25                     |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0.025                    |
| CoCl.6H <sub>2</sub> O                              | 0.025                    |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 27.8                     |
| Na <sub>2</sub> .EDTA.2H <sub>2</sub> O             | 37.3                     |
| <b>Organik Maddeler</b>                             |                          |
| Myoinositol   | 100                      |
| Nikotinik asit                                      | 0.5                      |
| Piridoksin HCL                                      | 0.5                      |
| Thiamin HCL   | 0.1                      |
| Glycine   | 2.0                      |
| Sakkaroz  | % 3                      |
| Phytogel  | % 0.3                    |

**Ek 2. Buğday Bitki Doku Parçalarından (Mezokotil) Embriyo Elde Etmek İçin Kullanılan Ortam İçeriği**

| <b>Kimyasallar</b>                   | <b>Kullanılan Miktarlar</b> |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| MS                                   | 4.3 g/l                     |
| Sakkaroz                             | % 3                         |
| Casein Hydrolysate                   | 1.0 g/l                     |
| Proline                              | 0.5 g/l                     |
| Myo-inositol                         | 0.2 g/l                     |
| Thiamine Hydrochloride               | 1.0 mg/l                    |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O | 1.25 mg/l                   |
| BAP                                  | .....mg/l                   |
| NAA                                  | .....mg/l                   |
| 2,4-D                                | .....mg/l                   |
| Dicamba                              | .....mg/l                   |
| Phytogel                             | % 0.3                       |

**Ek 3. Olgun Buğday Embriolarından Kallus Elde Etmek İçin Kullanılan Ortamlar**

| <b>Kimyasallar</b> | <b>Kullanılan Miktarlar</b> |
|--------------------|-----------------------------|
| MS                 | 4.3 g/l                     |
| Sakkaroz           | % 3                         |
| Dicamba            | .....mg/l                   |
| 2,4-D              | .....mg/l                   |
| Phytogel           | % 0.3                       |

**Ek 4. Bitki Regenerasyonu İçin Kullanılan Ortam İçeriği**

| <b>Kimyasallar</b> | <b>Kullanılan Miktarlar</b> |
|--------------------|-----------------------------|
| MS                 | 4.3 g/l                     |
| Sakkaroz           | % 3                         |
| Glycine            | ..... mg/l                  |
| IAA                | ..... mg/l                  |
| BAP                | ..... mg/l                  |
| Kinetin            | ..... mg/l                  |
| Phytogel           | % 0.3                       |

**Ek 5. Buğday Bitkilerinin Köklendirilmesi İçin Kullanılan Ortam İçeriği**

| <b>Kimyasallar</b> | <b>Kullanılan Miktarlar</b> |
|--------------------|-----------------------------|
| MS                 | 4.3 g/l                     |
| Sakkaroz           | % 3                         |
| IBA                | ....mg/l                    |
| Phytogel           | % 0.3                       |