

17722

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

X ve GAMMA IŞINLARININ ARPA DOKU KÜLTÜRLERİNE ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

(Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji - Genetik Programı)

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

Şule ARI

Danışman: Doç. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

ARALIK - 1991

TEŞEKKÜR

Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji konularında güncel yöntemlerin öğrenilmesi ve uygulanması yolunda bizlere her türlü olanağı sağlayan çok değerli hocalarımız Sayın Prof. Dr. Gönül BARA ve Sayın Prof. Dr. Metin BARA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Anabilim Dalı'mızda Bitki Doku Kültürü alanındaki araştırmaların başlatılıp, sürdürülmesi için yoğun çabalar harcayan, tez çalışmam boyunca deneyimlerinden ve yönlendirici fikirlerinden yararlandığım tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya çok teşekkür etmek isterim.

Çalışmanın gerçekleşmesi için maddi desteklerini gördüğüm Rektör Yardımcısı Sayın Prof. Dr. Sevim BÜYÜKDEVİRİM'e, İstanbul Üniversitesi, Araştırma Fonu'na ve TÜBİTAK MAM Biyoloji Bölümü Başkanı, NATO-TU-Biotechnology projesi direktörü Sayın Prof. Dr. Engin BERMEK'e çok teşekkür ederim.

Işınlamaların gerçekleştirilmesini sağlayan İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Seyfettin KUTER'e, kültürde yetişen bitkilerin toprağı aktarımı sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Bölümümüz Öğretim Üyelerinden Sayın Yard. Doç. Dr. Sabahat BAYKAL'a teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında her zaman desteklerini gördüğüm Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Avni KURU'ya, Sayın Prof.Dr. Güler ORALER ve Sayın Yard. Doç. Dr. Atok OLGUN'a, yardımlarından dolayı Anabilim Dalımızdaki değerli çalışma arkadaşlarıma, ayrıca fotoğraf ve çizim işlerinin gerçekleştirilmesini sağlayan Alaaddin ŞENTÜRK, Ahmet VATANSEVER ve Celal DAR'a çok teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ ve YÖNTEM	9
2.1 KALLUS KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI	9
2.2 İŞINLARIN UYGULANMASI	12
2.2.1 X Işınlarının Uygulanması	12
2.2.2 Gamma Işınlarının Uygulanması	14
2.3 İŞINLANAN KÜLTÜRLERİN İZLENMESİ	16
2.3.1 Regenerasyon Besiyerinde İzleme	16
2.3.2 Seleksiyon Besiyerinde İzleme	17
2.4 KÜLTÜRDE GELİŞEN BİTKİCİKLERİN SU KÜLTÜRÜNE ALINMASI VE TOPRAĞA AKTARIM	17
2.5 SİTOLOJİK İNCELEMELER	18
2.5.1 Kallus Kültürlerinde Mitoz İncelemeleri	19
2.5.2 Kültürde Regenerasyon Olan Bitkilerde Sitolojik İncelemeler	19
2.5.2.1 R ₀ Bitkilerinde Mayoz İncelemeleri	19
2.5.2.2 R ₁ Bitkilerinde Kök Ucu Mitoz İncelemeleri	20
3. BULGULAR	21
3.1 KÜLTÜR GÖZLEMLERİ	21
3.1.1 Kallus Oluşumu	21
3.1.2 Regenerasyon	22
3.1.2.1 X Işınlarının Regenerasyon Üzerine Etkileri	23

3.1.2.2 Gamma Işınlarının Regenerasyon Üzerine Etkileri.....	24
3.1.2.3 Seleksiyon Besiyerinde Regenerasyon	25
3.1.3 Işınların Kallus Görünümü Üzerine Etkileri	26
3.1.4 Kültürde Regenere Olan Bitkilerin Su Kültürüne Alınması ve Toprağa Aktarımı	27
3.2 SİTOLOJİK İNCELEMELER.....	28
3.2.1 Kallus Kültürlerinde Mitoz İncelemeleri.....	28
3.2.2 Kültürde Regenere Olan Bitkilerde Sitolojik İncelemeler	31
3.2.2.1 R ₀ Bitkilerinde Mayoz İncelemeleri.....	31
3.2.2.2 R ₁ Bitkilerinde Kök Ucu Mitoz İncelemeleri	34
4. TARTIŞMA	38
5. ÖZET.....	57
6. SUMMARY.....	58
7. KAYNAKLAR.....	59

1. GİRİŞ

In vitro yöntemler uygulanarak çeşitli bitki türlerinde; hücre, doku ve organ kültürlerinin kurulması, bu kültürlerde farklılaşma, organogenez ve regenerasyon evrelerinin oluşabilmesi, bitkilerin genetik potansiyellerinin amaca uygun biçimde yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Doku kültürü ve moleküler biyoloji tekniklerinin bitki biyoteknolojisinde (1) istenilen özellikteki bitki materyalinin fazla miktarda ve hızlı üretimi (vegetatif çoğalma), (2) somaklonal varyasyon teknolojisinin kullanımı ile yeni ve zirai özellikleri geliştirilmiş türlerin eldesi, (3) protoplast füzyonu ile tür içi veya türler arasında istenilen karakterlerin hibridlerde (somatik ve sitoplazmik hibridizasyon) oluşturulması, (4) mutagen uygulaması ve çeşitli biyokimyasal mutantların elde edilmesi, (5) rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı ile istenilen özellikteki genetik materyalin bitki hücrelerine aktarımı gibi geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır (Ammirato P.V. ve ark., 1984; Vasil I. K., 1988).

Arpa (*Hordeum vulgare* L.); buğday, pirinç ve mısırdan sonra zirai önemlilik bakımından dördüncü sırada yer alan bir tahıl bitkisidir. Genelde arpa, tane ve samanlarının hayvancılıkta kullanımı yönünden bir yem bitkisi olmakla beraber, dünyadaki arpa

retiminin çok büyük bir bölümü, bira yapımı için hammadde olarak kullanılmaktadır (Koblitz H., 1986). Diğer tahıl bitkilerinde olduğu gibi arpada da ıslah çalışmaları, uzun yıllar istenilen özellikleri taşıyan türler arasında çaprazlama yapmak yoluyla yürütülmüştür. Günümüzde de çaprazlama ıslahı, mutasyon ıslahı ve haploid eldesi için Bulbosum tekniği'nin kullanım alanı vardır. Ancak, 1980'li yıllardan itibaren özellikle ekonomik değeri olan tahıl bitkilerinin ıslah çalışmalarında kaydedilen gelişmelerde, bitki hücre ve doku kültürü gibi modern tekniklerin uygulanması büyük önem taşımaktadır (Wolski T. ve ark., 1991).

Hücre ve doku kültürlerinin kullanıldığı çalışmalarla arpada; mantar ve viral patojenlere, diğer zararlılara, sıcaklık gibi diş koşullara dirençli, standard özellikte, protein (yüksek lizin içerikli) ve karbonhidrat (nişasta) içeriği bakımından zengin ürün elde edilmesi amaçlanmaktadır (Kleinhofs A. ve Warner R.L., 1974; Koblitz H., 1986; Vasil I.K., 1988; Sigurbjornsson B., 1991).

Ekonomik bakımdan önemli olan bu özelliklerin kazandırılmasıyla yeni ve geliştirilmiş varyetelerin elde edilmesi çalışmalarında, mutagen kullanımı önemli bir potansiyel oluşturmaktadır (Sigurbjornsson B., 1991). Bu nedenle; mutasyon ve seleksiyon çalışmaları, bitki doku kültürlerinin bilimsel ve uygulamalı alanlardaki kullanımında büyük bir yer tutmakta ve gittikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Doku kültürü yöntemlerinin, tarla koşullarında uzun srelerde seleksiyonu yapılabilecek tiplerin elde edilmesine göre kolaylık ve zaman açısından üstünlüğü nedeni ile tahıl bitkilerinde mutasyon ve seleksiyon çalışmaları hız kazanmıştır. Mutagen uygulaması ile bitki doku kültürlerinde

genetik varyasyon artırılarak istenilen özellikteki tiplerin seleksiyonu; kallus, süspansiyon, protoplast ve anter kültürlerinde yapılabilmektedir (Negrutiu I. ve ark., 1984; Al-Safadi B. ve Simon P.W., 1990; Gao M. ve ark., 1991; Kinoshita T. ve Mori K., 1991).

Fiziksel mutagenlerden olan ışınların canlı organizmalar üzerinde olumlu ve olumsuz etkileri bilinmektedir. Işınlar kalıtsal ya da kalıtsal olmayan (epigenetik) değişiklikler oluştururlar. Işınlarla yapılan çalışmalarda kullanılan ışının cinsi, dozu, uygulama tipi ve süresi farklı bitkiler üzerinde farklı etkilerin ortaya çıkmasına yol açar. Yüksek bitkiler üzerinde ışınların etkileri, 20. yüzyılın başından beri çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmektedir. Gamma ışınları, X ışınları, UV ışığı gibi fiziksel mutagenlerin, mutant tiplerin oluşturulmasında %94 oranında etkili olduğu bilinmektedir (Al-Safadi B. ve Simon P.W., 1990).

Arpa ve diğer tahıl bitkilerinde X ve gamma ışınlarıyla, tohum (Moh C. C. ve Withrow R. B., 1959; Long T. J. ve Haber A. H., 1965; Wangenheim K.-H.V., 1975; Bilge E. ve ark., 1981; Olgun A., 1985; Novak F. J. ve ark., 1988; Ukai Y., 1988; Aldemita R.R. ve Zapata F.J., 1991; Sawicka E.J. ve ark., 1991) ve doku kültürü düzeyinde (Novak F.J. ve ark., 1988; Ukai Y., 1988; Al-Safadi B. ve Simon P.W., 1990; Gao M. ve ark., 1991; Kinoshita T. ve Mori K., 1991; Min S. ve ark., 1991; Sawicka E.J. ve ark., 1991) mutasyon çalışmaları yapılmıştır.

Doku kültürlerinde, ışınların değişik etkileri olabilmektedir. Çeşitli bitkilerde iyonize edici radyasyonun belli dozlarının; regenerasyon potansiyelini artırma (Shama Rao H.K. ve Narayanaswamy S., 1976), kallus büyümesini hızlandırma (King G. S., 1949; Bajaj Y. P.S. ve ark., 1970), protoplastlara DNA transformasyon oranını artırma (Benediktsson I. ve ark., 1990), polenden bitki regenerasyonunu geliştirme (Aldemita R.R. ve Zapata F.J., 1991), anter kültüründe yeşil bitki üretimini başlatma (Zapata F.J. ve ark., 1986) ve mutant tiplerin eldesi (Chaleff R. S., 1983) gibi etkileri vardır.

Doku kültürlerinde mutasyonla indüklenen çeşitliliğin yanısıra, kültürde kendiliğinden meydana gelen varyasyon (somaklonal varyasyon) özellikle ekonomik değeri olan ürün bitkilerinden yeni tiplerin elde edilmesinde önemli rol oynamaktadır (Larkin P. J. ve Scowcroft W. R., 1981; Phillips R. L. ve ark., 1990). Kültüre alınan bitki hücrelerindeki çeşitliliğin genetik temelini anlaşılması ve hücre seleksiyon metodlarının gelişmesi ile birçok araştırmacı, *in vitro* hücre kültürlerinin, kültürlenmiş bitkilerdeki çeşitliliğin artırılması için yeni ve önemli bir araç olduğu fikrini kabul etmişlerdir (Larkin P.J. ve Scowcroft W. R., 1981; Phillips R. L., ve ark., 1990; Gao M. ve ark., 1991; Kinoshita T. ve Mori K., 1991). Somaklonal varyasyonun nedenleri arasında; bitki türünün, genotipin, kullanılan eksplantın, besiyerinin ve hormonların etkili olabileceği düşünülmektedir (Vasil I.K. ve Vasil V., 1986; Phillips R.L. ve ark., 1990). Gramineae'lerin çeşitli türlerinin doku kültürleri yapılarak elde edilen bitki populasyonunda, somaklonal varyantlar *in vitro* seleksiyon yöntemleriyle seçilerek elde edil-

miştir (Orton T.J., 1980; Larkin P.J. ve ark., 1984; Kinoshita T. ve Mori K., 1991; Ullrich S. E. ve ark., 1991). Somaklonal varyasyonla ilişkili olan kromozomal varyasyon (Ruiz M.L. ve Vazquez A.M., 1982; Singh R. J., 1986; Gözükırmızı N. ve ark., 1990) ve somaklonal varyantların tarımsal, morfolojik ve biyokimyasal özellikleriyle ilişkili fenotipik ekspresyonları araştırılmıştır (Gao M. ve ark., 1991).

Doku kültürlerinde kendiliğinden meydana gelen varyasyon, genetik çeşitlilik için önemli bir potansiyel olmasına karşın, olası çeşitlilik spektrumunun tamamını içermek durumunda değildir (Ukai Y., 1988). Bu nedenle, somaklonal varyasyon, radyasyon veya kimyasal mutagenler kullanılarak artırılabilir (Ullrich S. E. ve ark., 1991) ve mutasyonla indüklenen varyasyonun daima somaklonal varyasyonla ilişkili olduğu düşünülmelidir (Novak F. J. ve ark., 1988).

Bitki hücrelerinin; kültürü, regenerasyonu sağlanabildikten ve mikroorganizma genetiğinde geliştirilen seleksiyon yöntemlerinin, yüksek bitkilerin *in vitro* hücre kültürlerinde de başarılı bir şekilde uygulanabilmesinden sonra; çeşitli biyokimyasal mutantların seleksiyonu ve tanımlanması, araştırmacıların en önemli araçlarından biri haline gelmiştir (Sheridan WM. F., 1974; Chaleff R. S., 1983; Negrutiu I. ve ark., 1984; Jacobs M. ve ark., 1987). Bu gelişmeler sayesinde, yüksek bitkilerinin yaşam sikluslarının özellikleri ve genomlarının karmaşık oluşlarının sınırlayıcı etkisine rağmen, biyokimyasal yollara ait çeşitli mutantların elde edilmesi mümkündür. Mutantlar, biyokimyasal yolların anlaşılması, somatik hibridizasyon ve trans-

formasyon gibi somatik hücre genetiği tekniklerinin geliştirilmesi, önemli metabolik fonksiyonları idare eden genlerin izole edilmesi, gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılmaları, ürün bitkilerinin tarımsal özelliklerinin geliştirilmesi gibi çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadırlar (Redei G. P., 1974; Bright S.W.J. ve ark., 1979; Bourgin J.P. ve ark., 1982; Bourgin J.P., 1986; Jacobs M. ve ark., 1987).

Biyokimyasal mutantlar, tüm bitki düzeyinde ve *in vitro* seleksiyon teknikleri kullanılarak hücre kültürü düzeyinde seçilebilmektedir. Hücre kültürü düzeyinde yapılan seleksiyonla; karbon ve azot asimilasyonu yapan, antibiyotik, herbisit ve susuzluk gibi dış koşullara dirençli ve amino asit, purin ve pirimidin metabolizmasına ait mutantlar elde edilmiştir. (Jacobs M. ve ark., 1987). Biyokimyasal mutantların seleksiyonu; kallus, süspansiyon veya protoplast kültürlerinde yapılabilir (Chaleff R. S. ve Carlson P.S., 1974; Chaleff R. S., 1983; Maliga P., 1984; Negrutiu I. ve ark., 1984; Jacobs M. ve ark., 1987).

Bugüne kadar elde edilmiş mutantların çoğu, yabani tip hücrelerin ölümü ya da inhibisyonuna yol açan seleksiyon ajanlarının varlığında yaşayabilen dirençli tiplerin elde edilmesi esasına dayanan pozitif seleksiyon metodu ile seçilmiştir (Chaleff R.S. ve Carlson P.S., 1974; Bright S. W. J. ve ark., 1978-a; Bright S.W.J. ve ark., 1978-b; Matthews B.F. ve Widholm J.M., 1978; Bright S.W.J. ve ark., 1979; Hibberd K.A. ve ark., 1980; Matthews B.F. ve ark., 1980; Sung Z.R. ve Jacques S., 1980; Cattoir-Reynaerts A. ve ark., 1981; Green C.E., 1982; Harms C.T. ve ark., 1982; Bright S.W.J. ve ark., 1983; Rognes S.E. ve ark., 1983; Grandbastien

M.A. ve ark., 1985; Miao S. ve ark., 1988; Diedrick T. J. ve ark., 1990; Jansen C.E. ark., 1990). Bu yolla elde edilen hücreler; amino asit, amino asit analogları, antibiyotikler, nükleik asit baz analogları, herbisitler, ağır metaller, toksinler, patojenler, bitki hormonları, fiziksel ve kimyasal streslere direnç özelliği kazanmaktadırlar.

Protein, karbonhidrat ve lipidler, tahılların tohum kalitesini belirleyen temel bileşenlerdir ve bu bitkilerde protein konsantrasyonu, amino asit dengesi besin değerinin belirlenmesinde çok önemli bir faktördür (Maliga P., 1984). Tahıllar, genel olarak lizin, treonin veya triptofan amino asitlerinin eksikliğini gösterirler. Tohum kalitesini artırma yolunda doku kültürü çalışmaları, ilk kez tütün ve havuç doku kültürlerinin triptofan analoglarında yetiştirilip, serbest triptofanda artışın olduğunun gösterilmesiyle başlamıştır (Widholm J.M., 1972). Daha sonra lizin ve treonin sistemi, çeşitli bitkilerde denenmiştir (Bright S.W.J. ve ark., 1978-b; Matthews B.F. ve Widholm J.M., 1978; Green C.E. ve Donovan C.M., 1980; Hibberd K.A. ve ark., 1980; Matthews B.F. ve ark., 1980; Harms C.T. ve ark., 1982; Miao S. ve ark., 1988; Diedrick T.J. ve ark., 1990).

Arpada lizin ve treonin amino asitlerini fazla miktarda içeren tiplerin elde edilmesi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış (Bright S.W.J. ve ark., 1978-a; Bright S.W.J. ve ark., 1979; Cattoir-Reynaerts A. ve ark., 1981; Bright S.W.J. ve ark., 1983; Rognes S.E. ve ark., 1983) ve Bright S.W.J. ve ark., (1982) 12 kat fazla treonin içeren tipleri elde etmişlerdir.

Bu çalışmada; yurdumuzun tescilli yerli arpa varyetelerinden biri olan ve İstanbul Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Biyoloji Bölümü'nde yirmi yılı aşkın süredir mutasyon ıslahı çalışmalarında kullanılan *H.vulgare* L.cv. Zafer-160 arpa varyetesinin, doku kólürü koşullarının saptanması, kallus kólürlerinde X ve gamma ışınlarının regenerasyon potansiyeli üzerine ve sitogenetik yönde etkilerinin araştırılması ayrıca lizin bakımından zengin mutantların seleksiyonunun yapılması amaçlanmıştır.



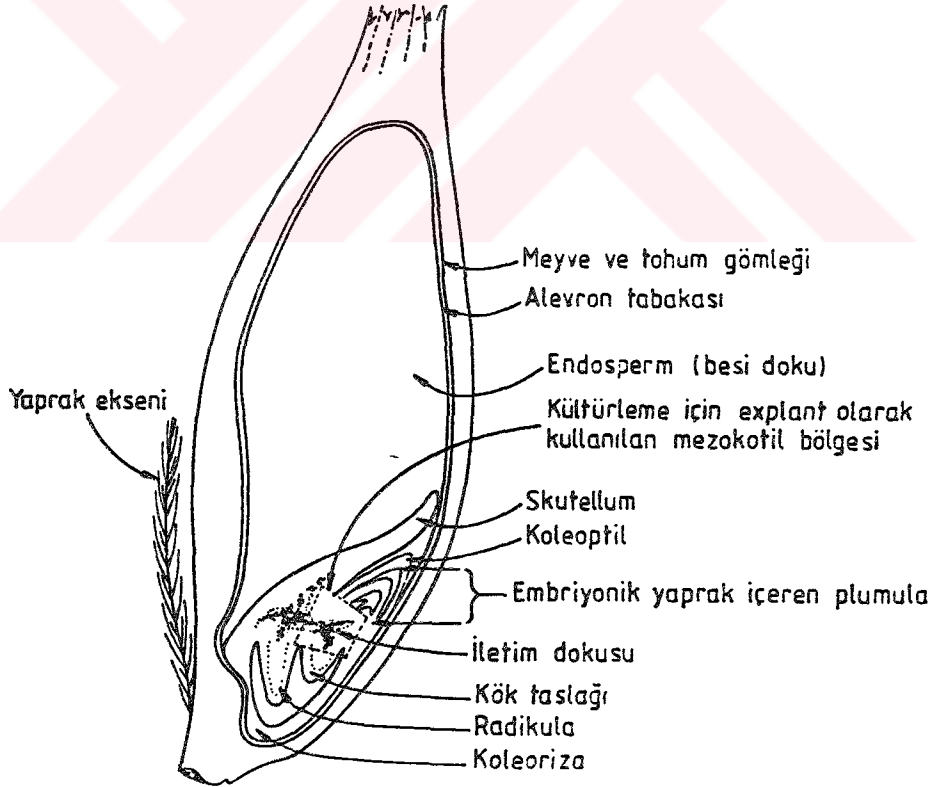
2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada yerli bir arpa varyetesi olan *Hordeum vulgare* L. cv. Zafer-160 ($2n=2x=14$), kallus kültürlerinin kurulması ile X ve gamma ışınlarının çeşitli dozlarının regenerasyon üzerine ve sitogenetik yöndeki etkilerinin araştırılmasında ve mutant seçilmesinde kullanılmıştır. Altı sıralı kışlık bir arpa varyetesi olan *H. vulgare* L. cv. Zafer-160 tohumları, Halkalı Ziraî Araştırma Enstitüsü'nden sağlanmıştır.

2.1 KALLUS KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI

Kallus kültürlerinin elde edilmesi amacıyla, olgun arpa tohumlarına öncelikle yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Yüzey sterilizasyonu için tohumlar; %95 etil alkol'e batırılmışlar, sonra %20 sodyum hipoklorit'te 15 dakika bırakılmışlardır. Sodyum hipoklorit'in uzaklaştırılması için ise 20 dakika steril distile su ile yıkanmışlardır. Bu şekilde steril edilen tohumlardan olgun embriyolar, laminar akım (Gelaire Flow Laboratories TC 48) altında ince uçlu pens ve bisturi yardımıyla steril olarak çıkarılmıştır. Embriyonun kök ve gövdeyi verecek olan parçaları uzaklaştırıldıktan sonra mezokotil kısmı (Şekil 1) %99 etil alkol'e batırılıp, üç kez steril distile su ile yıkanmıştır. Steril olarak hazırlanan mezokotil parçaları, %0.8 agar ile katılaştırılmış Murashige ve Skoog (MS; Murashige T. ve Skoog F., 1962) besiyerine (Tablo 1) ekilmiştir.

MS besiyerinde kullanılan inorganik maddeler için Sigma'nın (M 5524) toz halindeki preparatı kullanılmıştır. Preparat içeriği 900 ml distile su içinde çözüldürülüp, tamamen eritildikten sonra sukroz ve 2,4-D (2,4- dichlorophenoxyacetic acid) 0.5 mgL^{-1} , 1 mgL^{-1} , 2 mgL^{-1} olacak şekilde stok çözültiden ilave edilmiştir. Agar ilavesi yapılmadan önce çözültinin pH'sı 0.1N NaOH veya 0.1N HCl ile 5.7'ye ayarlanmıştır. Agar ilave edilip, erimesi için çözülti, 90°C 'lik su banyosunda tutulmuş ve daha sonra da 121°C 'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Vitaminler, otoklavlanmış besiyeri çözültisi $50\text{-}60^\circ\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra $0.22 \mu\text{m}$ por açıklığına sahip Millipore (Millex-GS) filtre ile steril edilmiş mg/ml'lik stok vitamin çözültisi (Sigma M 3900)'nden 1 mgL^{-1} olacak şekilde steril koşullarda eklenmiştir.



Şekil 1: Arpa Embriyosu

Tablo 1. Çalışmada kullanılan besiyeri (MS) içerikleri

- 1) Kallus kültür besiyeri
- 2) Regenerasyon besiyeri
- 3) Seleksiyon besiyeri

	1	2	3
	mgL ⁻¹	mgL ⁻¹	mgL ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2
CaCl ₂	332	332	332
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
MgSO ₄	180.7	180.7	180.7
MnSO ₄	16.9	16.9	16.9
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
KI	0.83	0.83	0.83
KNO ₃	1900	1900	1900
KH ₂ PO ₄	170	170	170
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	8.6
Glisin	2.0	2.0	2.0
Myo-Inositol	100	100	100
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5	0.5	0.5
Thiamine-HCl	0.1	0.1	0.1
2,4-D (Sigma)	0.5-2	0.01	0.01
Sucrose (Sigma)	30000	30000	30000
Agar (Sigma)	8	8	8
SAEC* (Sigma)	-	-	100-200

* SAEC; [S(2-aminoethyl-L-cysteine)]

Olgun tohumların embriyolarından steril koşullar altında çıkarılan mezokotil parçaları MS besiyeri içeren Petri kutularına (Anumbra, ϕ 9 cm) onaltışar adet ekilmişlerdir. Petri kutularının etrafı, besiyerinden su kaybını engellemek amacıyla Parafilm (Parafilm PM 992) ile kuşatılmış ve karanlıkta, 25°C'deki etüvde (Nüve EN 500) inkübe edilerek kallus oluşumu sağlanmıştır.

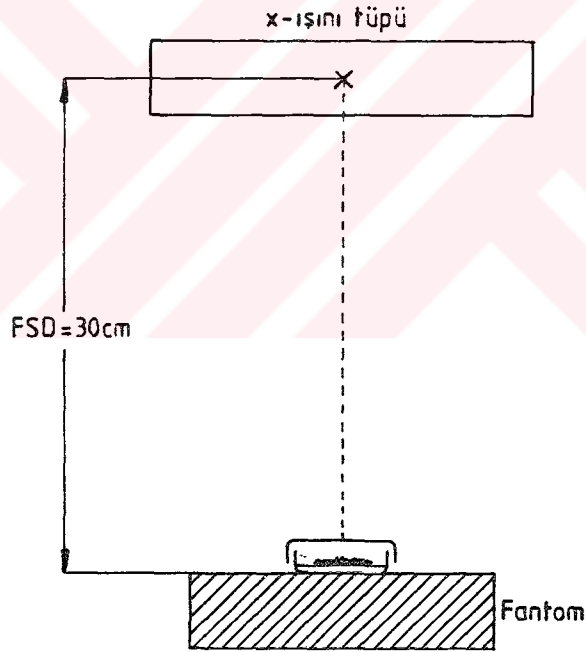
2.2 IŞINLARIN UYGULANMASI

Aktif olarak bölünen 10 günlük kallus kültürlerine, X ve gamma ışınları uygulanmıştır. Işınlamalar; İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Değişik tarihlerde yapılan ışınlamalarda aynı fizik faktörler ve dozlar kullanılmıştır. Dozlar, aynı günde tek doz (single dose) olarak bir defada verilmiştir.

2.2.1 X Işınlarının Uygulanması

X ışınlarının uygulanması için, Siemens 250 KV, 15 mA'lik konvansiyonel seviyede X ışınları veren Stabilipan tedavi cihazı kullanılmıştır. Kallus kültürlerinin ışınlanması; 200 KV, 10 mA, 0.5 mm Cu filtre, HVL'si 1.2 mm Cu olan X ışınlarıyla yapılmıştır. Röntgen cihazının doz verimini artırmak için yakın FSD uzaklığı (FSD=30 cm) tercih edilmiştir. Işınlama alanı, 10x8 cm'dir. Röntgen cihazının X ışını doz kalibrasyonu insan vücuduna eşdeğer materyalde (fantom ile) yapıldığından aynı saçılmayı sağlamak için, petri kutuları ışınlama sırasında saçıcı materyal üzerine konulmuştur, Cihazın kalibrasyonu cGy/dakika

(rad/dakika) cinsinden yapıldığından bütün ışınlamalarda bu doz birimi kullanılmıştır. Kallus kültürleri; 500 cGy, 1000 cGy, 2000 cGy ve 3000 cGy dozlarında X ışınlarının etkisinde bırakılmışlardır. Ön denemelerde 1000 cGy'nin üzerindeki dozlar tümüyle letal olduğundan sonraki aşamalarda 500 cGy ve 1000 cGy dozları kullanılmıştır. Işınlama düzeneği, Şekil 2'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2: X ışınlaması düzeneği

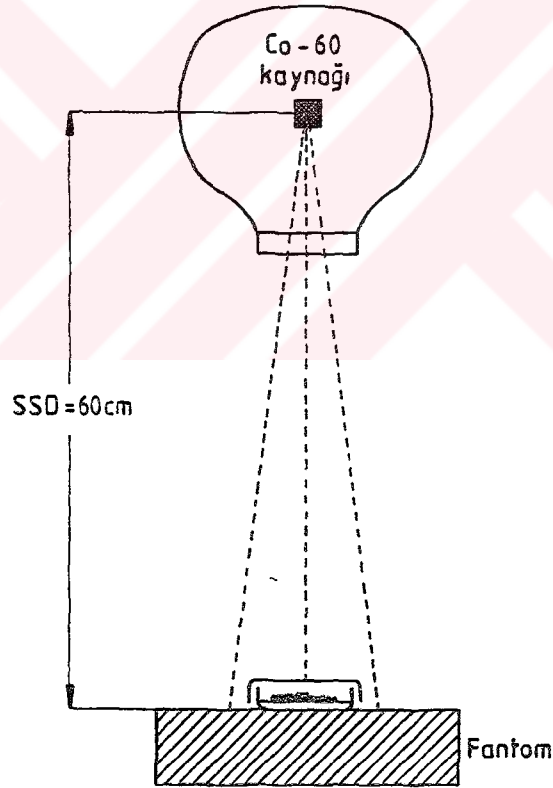
X ışınlamalarında şu program uygulanmıştır:

Işınlama sırası	Işınlama tarihi	Doz (cGy)	Işınlama süresi
I	15.09.1988	1000	8' 56"
		2000	17' 52"
		3000	26' 48"
II	17.12.1988	500	4' 28"
		1000	8' 56"
III	04.03.1989	500	4' 28"
		1000	8' 56"
IV	22.04.1989	500	4' 28"
		500	4' 28"
V	14.04.1990	500	5' 00"
		500	5' 00"

2.2.2 Gamma Işınlamalarının Uygulanması

Gamma ışınlarının uygulanması için Cobalt-60 radyoizotopunun gamma ışınları veren (1.25 Mev) GE-CGR Alcyon II teleterapi cihazı kullanılmıştır. Alcyon II Cobalt-60 cihazının kurşun veya wolfram madeninden yapılmış küre şeklindeki kafası içinde Co-60 radyoizotopu bulunmaktadır. Bu radyoaktif izotop, 1.25 Mev'lik gamma ışınları verir. Bu çalışmada kullanılan gamma ışınının radyoaktivitesi, çalışmanın ilk yapıldığı tarihte 5400 RHM olup (Co-60 yarılanma süresi=5.3 yıl), aktivite her ay takriben %1 azalmaktadır. Gamma ışınları huzmesi, wolframdan yapılmış kollimatör ve diyafraamlar ile ayarlanmıştır. Kaynağın açık ve kapalı durumları uzaktan kumanda ile yapılmıştır. Bu cihazla hasta tedavileri normal olarak SSD=80 cm'den yapılırken, bu çalışmada ışınlamalar, kısa zamanda daha fazla doz şiddeti elde

etmek için $SSD=60$ cm'den yapılmıştır. Kallus kültürleri, 500 cGy, 1000 cGy, 3000 cGy ve 6000 cGy dozlarında gamma ışınlarının etkisinde bırakılmışlardır. Yapılan ön denemelerde 1000 cGy'nin üzerindeki dozların tümüyle letal olduğu saptandığından sonraki aşamalarda 500 cGy ve 1000 cGy dozları kullanılmıştır. Işınlama düzeneği Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3: Gamma ışınlaması düzeneği

Işınlama sırası	Işınlama tarihi	Doz (cGy)	Işınlama süresi
I	15.09.1988	1000	5'.16
		3000	15'.82
		6000	31'.64
II	17.12.1989	500	2'.17
		1000	4'.34
III	04.03.1989	500	2'.23
		1000	4'.46
IV	22.04.1989	500	2'.25
V	14.04.1990	500	2'.58
		500	2'.58

2.3 IŞINLANAN KÜLTÜRLERİN İZLENMESİ

Işınlanan kültürler, kültür ortamı değiştirilmeksizin 25°C'de, karanlıkta 10 gün boyunca tutulduktan sonra regenerasyon ve seleksiyon besiyerlerine (Tablo 1) aktarılmışlar ve kültürlemenin bundan sonraki kısmı büyüme kabininde (Heraeus Vötsch (No:440/0026/86) 25°C, 16 saat/gün ışık periyodu, % 70 rölatif nem) sürdürülmüştür. Işınlanan kalluslarla aynı koşullar altında yetiştirilen bir diğer grup kallus kültürü, kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu kallus kültürleri de eş zamanlı olarak regenerasyon ve seleksiyon besiyerlerine aktarılmışlardır.

2.3.1 Regenerasyon Besiyerinde İzleme

Regenerasyon besiyeri olarak 0.01mgL⁻¹ 2,4-D içeren MS besiyeri kullanılmıştır. Kültürler bu besiyerinde düzenli olarak incelenmiş ve regenerasyon gösteren kalluslar, 250 ml'lik şişeler içinde

50 ml, hormon içermeyen MS besiyerine aktarılmışlardır. Somatik embriyogenez ve/veya organogenez şeklinde görülebilen regenerasyon, ışınlanmış ve kontrol kallus kültürlerinde karşılaştırılarak, regenerasyon yüzdesi her iki grup için belirlenmiştir.

2.3.2 Seleksiyon Besiyerinde İzleme

Lisin ve treonin amino asitlerini fazla miktarda içeren (üreten) tiplerin seleksiyonunu yapmak amacıyla, seleksiyon besiyeri olarak; MS besiyerine lisin analogu bir madde olan SAEC [S(2-aminoethyl-L-cysteine)], büyümeyi inhibe edici konsantrasyonda (1mM) ilave edilmiştir. Besiyerine SAEC ilavesi, otoklavlamadan sonra filtre sterilizasyonu ile yapılmıştır. Regenerasyon besiyerinde olduğu gibi bu besiyerinde de somatik embriyogenez ve/veya organogenez tipindeki regenerasyonun yüzdesi kontrol ve ışınlanmış kallus kültürlerinde karşılaştırılarak izlenmiştir. Seleksiyon besiyerinde regenerasyonu indüklemek için 0.01mgL^{-1} konsantrasyonda 2,4-D kullanılmıştır.

2.4 KÜLTÜRDE GELİŞEN BİTKİCİKLERİN SU KÜLTÜRÜNE ALINMASI VE TOPRAĞA AKTARIM

Kültürde yaprak organogenezi şeklinde regenerasyon gösteren kallusların kök sistemlerinin gelişmesini sağlamak amacıyla regenerantlar, sera koşullarında su kültürüne alınmışlardır. Su kültüründe kök gelişimi için Buchholz Çözeltisi (Buchholz C., 1962) kullanılmıştır (Tablo 2). Tablo 2'de verilen bileşenlere ilave olarak, Fe kaynağı için %5 demir içeren bir bileşik, Fertilon 30mg Fe L^{-1} olacak şekilde, kültürlemenin yapıldığı 250 ml'lik tüplere ilave edilmiştir. Buchholz Çözeltisi haftalık aralıklarla değiştiril-

miştir. Temperatür ve rölatif nem, termograf ve higrograf ile ölçülmüş; ortalama temperatür gündüz 29 °C, gece 16 °C, ortalama rölatif nem gündüz %60, gece %70 olacak şekilde sağlanmıştır.

Tablo 2: Buchholz Çözeltisi (Buchholz C., 1962)

Bileşen	mgL ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1181
KNO ₃	506
MgSO ₄ .7H ₂ O	246
KH ₂ PO ₄	136
CuSO ₄	0.1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1
MnSO ₄ .H ₂ O	2.0
H ₃ BO ₃	2.0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.1

Su kültüründe kök sistemleri geliştirilen bitkiler, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Bahçesi'nde toprağa ekilmişlerdir. Bu bitkilerden tohum elde edilerek döleri devam ettirilmektedir.

2.5 SİTOLOJİK İNCELEMELER

Işınlanmış ve ışınlanmamış (kontrol) kallus kültürleri ve bunlardan regenere olan bitkiler, kromozom sayı ve yapı incelemeleri için kullanılmış, mitoz ve mayoz preparasyonları yapılmıştır.

2.5.1 Kallus Kùltùrlerinde Mitoz İncelemeleri

Mitoz preparasyonları için ışınlanmış ve kontrol (ışınlanmamış) kalluslar 10. ve 45. günlerinde 24 saat 1:3 v/v absolü asetik asit:etil alkol'de fikse edilmiş, süre sonunda distile su ile yıkandıktan sonra %85 etil alkole alınmışlardır. Fikse edilmiş materyel distile su ile yıkandıktan sonra 60°C'deki 1N HCl'de 25 dakika tutularak hidroliz edilmiş, sonra Feulgen içinde 1 saat tutularak boyanmıştır. Boyanan materyalin kolay ezilebilmesi için kalluslar % 2'lik pektinaz (Sigma EC 3.2.1.15, Crude powder) çözeltisinde 1 saat bırakılmışlardır. Süre sonunda materyal lam üzerindeki %45 asetik asit içinde, üzerine gliserin-albumin sürülmüş lameller kapatılarak ezilmiş, sonra lam ve lamel %10 asetik asit içinde saat camında birbirinden ayrılmıştır. Lamel üzerinde kalan materyal %60, %80, %90, absolü etil alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek kanada balsamı ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda incelenmiş ve her grup kallusa ait preparatlardan 10 tanesi analizlenmiştir.

2.5.2 Kùltürde Regenere Olan Bitkilerde Sitolojik İncelemeler

2.5.2.1 R₀ Bitkilerinde Mayoz İncelemeleri

Kùltürde regenere olan ışınlanmış ve kontrol materyalin toprağa aktarımından sonra gelişen bitkiler (R₀)'da gelişmenin erken evresindeki başakçıklar 3:1 v/v absolü asetik asit:etil alkol'le 24 saat boyunca fikse edilmiş, süre sonunda distile su ile yıkandıktan sonra %85 etil alkole alınmışlar ve Feulgen metoduyla

boyanan anterlerden yapılan preparatlar ışık mikroskopunda incelenmişlerdir. 60°C'de 1N HCl'deki hidroliz süresi 9 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Her bitki materyaline ait 10 adet preparat ışık mikroskopunda incelenerek 55-65 hücre analizlenmiştir. Bulgular kontrolleri ile birlikte değerlendirilmiştir.

2.5.2.2 R₁ Bitkilerinde Kök Ucu Mitoz İncelemeleri

Gerek ışınlanmış gerekse kontrol materyalden regenere olan bitkilerin R₁ dönlünde kök ucundan Feulgen Metodu ile hazırlanan preparasyonlarda mitoz bölünme incelenmiştir. Kök ucu preparasyonu için hidroliz, 1N HCl'de 60°C'de 18 dakika olarak uygulanmıştır.

3. BULGULAR

3.1 KÜLTÜR GÖZLEMLERİ

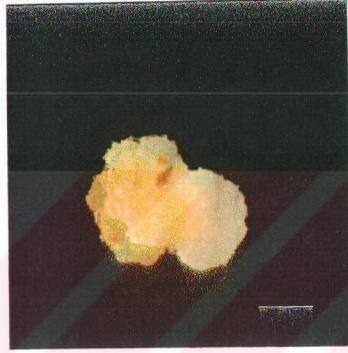
3.1.1 Kallus Oluşumu

Olgun tohumların mezokotil bölgelerinden başlatılan kültürlerde, kültürün başlatılmasından 10 gün sonra beyaz, yumuşak ve sulu kallus oluşumu gösteren eksplantların sayısı, başlangıçta ekilen eksplant sayısına oranlanarak kallus oluşum oranı yüzde cinsinden hesaplanmıştır (Tablo 3). En yüksek kallus oluşum oranı (% 54.2 ile) 1 mgL⁻¹ 2,4-D içeren besiyerinde gözlenmiştir. Bu besiyerindeki kallus oluşumu, Şekil 4'de gösterilmiştir.

Tablo 3: *H.vulgare* L. cv. Zafer-160'ın olgun embriyolarının mezokotil kısmından kallus oluşumu üzerine 2,4-D'nin etkisi

Besiyeri ve 2,4-D konsantrasyonları	Explant sayısı	Kallus sayısı	Kallus oluşum yüzdesi
1) MS+0.5 mgL ⁻¹ 2,4-D	144	52	36.1
2) MS+1mgL ⁻¹ 2,4-D	140	76	54.2*
3) MS+2mgL ⁻¹ 2,4-D	127	44	34.6

* Kallus oluşumu için 2 no.lu besiyerinin 1 ve 3 no.lu besiyerlerinden farkı anlamlıdır (P<0.01).



Şekil 4: MS+1 mgL⁻¹2,4-D besiyerinde kallus oluşumu

3.1.2 Regenerasyon

Kallustan bitki regenerasyonu; kültürlemenin 10. gününde ışın etkisinde bırakılmış kültürlerin, 20. günde kontrolleri ile birlikte 0.01 mgL⁻¹2,4-D içeren MS besiyerine aktarımı ve bu kültürlerin bitki büyüme kabiniinde tutulması ile sağlanmıştır. Her uygulama sonucu elde edilen regenere bitki sayısı ve regenerasyon yüzdesi Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4: Regenerasyon besiyerinde (MS+0.01 mgL⁻¹ 2,4-D) X ve gamma ışınlarının etkisinde bırakılmış kallusların regenerasyon durumları

Işın dozu (cGy)	Test edilen kallus sayısı	Yeşil bitki veren kallus sayısı	Regenerasyon yüzdesi
500 X	29	5	17.24*
1000 X	14	-	0
500 γ	39	5	12.82**
1000 γ	18	1	5.5
Kontrol	19	10	52.63

* 500 cGy X ışını etkisinde bırakılmış kalluslardan yeşil bitki regenerasyonundaki azalma kontrole göre anlamlıdır (P<0.05).

** 500 cGy γ ışını etkisinde bırakılmış kalluslardan yeşil bitki regenerasyonundaki azalma kontrole göre anlamlıdır (P<0.01).

3.1.2.1 X Işınlarının Regenerasyon Üzerine Etkileri

1000 cGy ve üzerindeki dozlarda X ışınları etkisinde bırakılan materyalde regenerasyon görülmemiştir. 500 cGy dozunda X ışını uygulanan kallusların regenerasyonunda kontrole göre % 35.39' luk bir azalma saptanmıştır (Tablo 4). 500 ve 1000 cGy dozunda X ışını etkisinde bırakılan kallusların regenerasyon durumları Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5: Regenerasyon üzerine X ışınlarının etkisi

A: 500 cGy dozunda X ışınlaması sonucu regene olan kallus

B: 1000 cGy dozunda X ışını uygulaması sonucu regenerasyon göstermeyen kallus

3.1.2.2 Gamma Işınlarının Regenerasyon Üzerine Etkileri

Gamma ışınlarının 1000 cGy'lik dozu, kallusların regenerasyonunu olumsuz yönde etkilemiştir. 500 cGy dozunda gamma ışınlaması ise, kontroldeki 52.63 olan regenerasyon yüzdesini 12.82'ye kadar düşürmüştür (Tablo 4). Gamma ışınlarının etkisinde bırakılmış kallusların regenerasyon durumları ile ilgili örnekler Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6: Regenerasyon üzerine gamma ışınlarının etkisi

- A: 500 cGy dozunda gamma ışını uygulaması sonucu regene olan kallus.
- B: 1000 cGy dozunda gamma ışını uygulaması sonucu regenerasyon göstermeyen kallus.

3.1.2.3 Seleksiyon Besiyerinde Regenerasyon

Kültürlemenin 10. gününde ışınlanan kallusların 20. günde, kontrol kalluslarla birlikte 0.01 mgL^{-1} 2,4-D + 1 mM SAEC içeren MS besiyerine aktarımı ve bu kültürlerin bitki büyüme kabinde tutulması ile, seleksiyon besiyerinde 500 cGy dozunda gamma ışını uygulaması yapılmış kalluslardan regenerasyon elde edilmiştir. 500 ve 1000 cGy dozunda X ile 1000 cGy dozunda gamma ışınlanması yapılan kallus kültürlerinden, bu besiyerinde regenerasyon elde edilememiştir (Tablo 5).

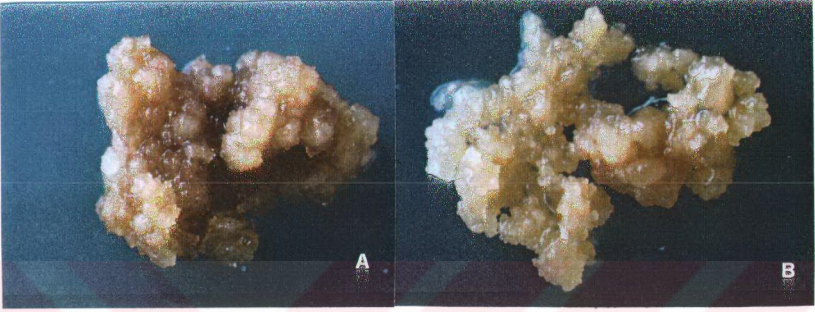
Tablo 5: Seleksiyon besiyerinde, ($MS+0.01 \text{ mgL}^{-1} 2,4\text{-D}+1\text{mM SAEC}$) X ve gamma ışınlarının etkisinde bırakılmış kallusların regenerasyonu

İşin dozu (cGy)	Test edilen kallus sayısı	Yeşil bitki veren kallus sayısı	Regenerasyon yüzdesi
500 X	32	-	0
1000 X	30	-	0
500 γ	34	4	11.76
1000 γ	31	-	0
Kontrol (-SAEC)	19	10	52.63
Kontrol (+SAEC)	22	1	4.54*

* Regenerasyon ($MS+0.01 \text{ mgL}^{-1} 2,4\text{-D}$) ve seleksiyon ($MS+0.01 \text{ mgL}^{-1} + 1 \text{ mM SAEC}$) besiyerlerindeki kontrol kalluslar arasındaki regenerasyon farkı anlamlıdır ($P < 0.05$).

3.1.3 Işınların Kallus Görünümü Üzerine Etkileri

1000 cGy ile 1000 cGy'den daha yüksek dozlardaki X ve gamma ışınlarının etkisinde bırakılmış regenerasyon göstermeyen kalluslarda 1.5 ay sonra renk değişimi en belirgin özellik olarak saptanmıştır. Kontrolde beyaz olan kallus rengi, ışın etkisindeki materyelde sarı-kahverengi tonlarına dönüşmüş, kalluslar nekrotik hale gelmiş ve ayrıca gamma ışını alan kalluslarda bütünlük bozulup, kolayca dağılan bir kitle görünümü kazanmıştır (Şekil 7).



Şekil 7: Işınlara kallos görünümü ve rengi üzerine etkileri

A: 1000 cGy dozunda X ışını uygulamalı kallos

B: 1000 cGy dozunda gamma ışını uygulamalı kallos

3.1.4 Kültürde Regenere Olan Bitkilerin Su Kültürüne Alınması ve Toprağa Aktarımı

Doku kültüründe regenere olan toplam 25 adet bitki, 2.4 bölümünde belirtildiği şekilde toprağa aktarılmış ve 23 adedinden tohum elde edilmiştir. Toprağa aktarılıp tohumları alınan bitkiler; kontrol ve ışınlama yapılmış (500cGy x ve 500 cGy γ) kallos kültürlerinin, regenerasyon (MS+0.01mgL⁻¹ 2,4-D) ve seleksiyon (MS+0.01mgL⁻¹ 2,4-D+1mM SAEC) besiyerlerinde yetiştirilmeleriyle elde edilmiştir (Tablo 6). 1000 cGy X ve gamma dozlarında ışınlama yapılmış kültürlerden toprağa aktarım yapılmak üzere bitki gelişimi izlenememiştir. Ayrıca 500 cGy

dozunda X ışını almış olan kallus kültürlerinden de seleksiyon besiyerinde regenerasyon gerçekleşmediğinden bu koşullarda bitki ve tohum elde edilememiştir.

Tablo 6: Toprağa aktarılan bitkilerin ışınlama durumları ve regene-
nere oldukları besiyerleri (Regenerasyon besiyeri:
MS+0.01mgL⁻¹ 2,4-D, Seleksiyon besiyeri:
MS+0.01mgL⁻¹ 2,4-D+1mM SAEC).

Işın dozu (cGy)	Toprağa aktarılan bitki sayısı	Tohum elde edilen bitki sayısı	Bitkilerin regene- re oldukları besiyerleri
500 X	5	5	Regenerasyon besiyeri
	-	-	Seleksiyon besiyeri
500 γ	5	5	Regenerasyon besiyeri
	4	2	Seleksiyon besiyeri
Kontrol	10	10	Regenerasyon besiyeri
	1	1	Seleksiyon besiyeri

3.2 SİTOLOJİK İNCELEMELER

3.2.1 Kallus Kültürlerinde Mitoz İncelemeleri

Kültürde kendiliğinden meydana gelen kromozomal varyasyonla, ışınların etkisi ile oluşan varyasyon durumunu karşılaştırmak amacı ile kontrol ve ışınlanmış kallus materyallerinde, kültürün başlangıcından itibaren 45. günde mitotik kromozomlar incelenmiştir. Ayrıca kontrol kültürlerde, 10. gündeki başlangıç materyalinde eksplant etkisi araştırılmıştır.

Mitoz preparasyonlarında ışık mikroskobu ile yapılan inceleme sonucunda rastlanan anomaliler Tablo 7 ve Şekil 8'de gösterilmiştir. Kontrol materyalde, kültürlemenin 10. gününde bütün metafazlar diploid olarak, kültürlemenin 45. gününde ise metafazların % 11.4'ü tetraploid olarak bulunmuştur. Işınlanmış olan kallus kültürlerinde kromozom sayı anomalisine rastlanmamış, yalnızca 500 cGy dozunda X ışınlaması yapılmış olan kalluslarda kromozom köprüsü saptanmıştır.

Tablo 7: Işınlanmış ve kontrol materyale ait kallusların mitoz preparasyonlarında kromozom analizi (X ve gamma ışınlarının 500 cGy'lik dozlarının etkisinde bırakılmış kallus kültürlerindeki kromozomal analizler, kültürlemenin 45. gününde yapılmıştır).

Uygulanan ışın dozu (cGy)	Metafaz ve Anafaz sayısı	Kromozom sayı anomalisi	Kromozom yapı anomalisi	Total anomali yüzdesi
		4n	Anafaz köprüsü	
500 X	18	-	1	5.5
500 γ	26	-	-	0
Kontrol (Kültürlemenin 10. günü)	25	-	-	0
Kontrol (Kültürlemenin 45. günü)	35	4	-	11.4



Şekil 8: *H. vulgare* L. Zafer-160'in olgun embriyolarının mezokotil kısmından elde edilen kalluslarda mitoz preparasyonlarına ait fotoğraflar.
A: Kontrol (Diploid) B: Kontrol (Tetraploid) C: 500 cGy dozunda X ışını uygulaması (Diploid) D: 500 cGy dozunda gamma ışını uygulaması (Diploid). Büyütme: x1250.

3.2.2 Kültürde Regenere Olan Bitkilerde Sitolojik İncelemeler

Kültürde regenere olan bitkilerde, ışınlanmaların kromozomlar üzerine etkilerini araştırmak amacı ile sitolojik çalışmalar yapılmıştır.

3.2.2.1 R₀ Bitkilerinde Mayoz İncelemeleri

Işınlanmış ve kontrol gruba ait kalluslardan, kültürde regenere olanlarının toprağa aktarımı sonucu elde edilen R₀ bitkilerinin, gelişmelerinin uygun evrelerinde mayoz preparasyonları yapılmış ve sonuçlar Tablo 8 ile Şekil 9'da gösterilmiştir.

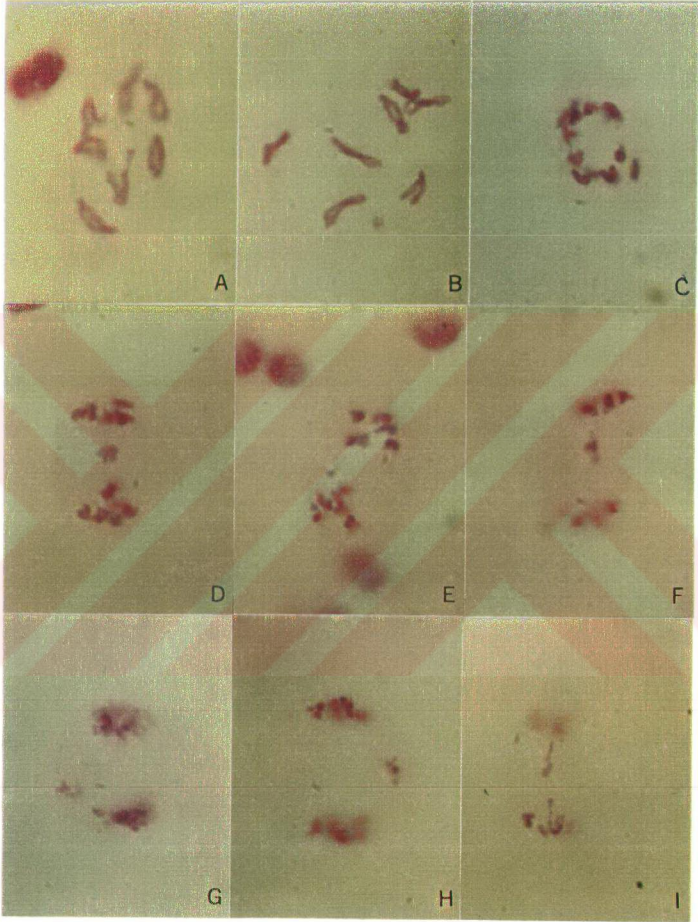
Işınlama deneylerine ait; 500 cGy dozunda gamma ışınlaması yapılmış kalluslardan seleksiyon besiyerinde regenerasyon gösteren 2 bitkiden birinde (Bitki 17) mayoz bölünmenin çeşitli evrelerine ait kromozomlarda kopma, parça eklenmesi, geri kalmış kromozomlar, geri kalmış kromozomlarda yapışıklık ve yapışıklık köprüsü gibi anomalilere rastlanmıştır. Bu anomalilerin yüzdesi 20.6 olarak bulunmuştur (Tablo 9). 500 cGy dozunda gamma ışınlarının etkisinde bırakılıp regenerasyon besiyerinde elde edilen 5 bitkiden 1 tanesinde (Bitki 19) %3.6 oranında geri kalmış kromozomlarda yapışıklık köprüsü şeklinde anomali saptanmıştır. X ışınlaması ve kontrol kültürlerden elde edilen bitkilerin mayoz bölünmeleri normal olarak gözlenmiştir.

Tablo 8: R₀ bitkilerinin mayoz preparasyonlarına ait kromozom analizi

Uygulanan ışın dozu (cGy)	İncelenen hücre sayısı	Anomali çeşidi					Total anomali yüzdesi
		Kromozomlarda kopma	Kromozomlara parça eklenmesi	Geri kalmış kromozomlar	Geri kalmış kromozomlarda yapışıklık köprüsü	Kromozom yapışıklığı	
500 X	60	-	-	-	-	-	0
	58	1	1	4	3	3	20.6*
500 γ	55	-	-	-	2	-	3.6* *
Kontrol	65	-	-	-	-	-	0

* Anomali yüzdesi seleksiyon besiyerinde regenere olan 2 bitkiden Bitki 17'ye aittir.

** Anomali yüzdesi regenerasyon besiyerinde regenere olan 5 bitkiden Bitki 19'a aittir.



Şekil 9: 500 cGy dozunda gamma ışını uygulamalı kalluslardan regenere olan bitkilerin (R₀) mayoz preparasyonlarına ait fotoğraflar. Büyütme: x1250

- A:** Diplotende bir bivalentte kromozomlardan birine parça yapışması (Bitki 17)
B: Diplotende kopmuş kromozom parçası (Bitki 17)
C: Anafaz l'de yapışıklık köprüsü (Bitki 17)
D: Anafaz l'de geri kalmış kromozom (Bitki 17)
E: Anafaz l'de geri kalmış kromozom ve yapışıklık köprüsü (Bitki 17)
F: Anafaz l'de geri kalmış kromozom ve köprü (Bitki 17)
G: Telofaz l'de mikronukleus oluşumu (Bitki 17)
H: Telofaz l'de mikronukleus oluşumu (Bitki 17)
I: Anafaz l'de geri kalmış kromozom ve yapışıklık köprüsü (Bitki 19)

3.2.2.2 R₁ Bitkilerinde Kök Ucu Mitoz İncelemeleri

Işınlanmış ve kontrol materyalden regenere olan R₀ bitkilerinin toprağa aktarımından sonra gelişen ve tohumları elde edilen R₁ bitkilerinin kök uçlarından mitoz preparasyonları yapılmıştır. İncelenen preparatlardaki kromozom sayı ve yapı anomalileri Tablo 9 ve Şekil 10'da gösterilmiştir.

500 cGy dozunda X ışınlamasından sonra regenere olan (regenerasyon besiyerinde) 5 adet bitkinin R₁ döllerinin kök ucundan yapılan mitoz preparasyonlarında 1 adet bitkide (Bitki 1₁), kromozom köprüsü şeklinde yapısal anomali görülmüştür. Bu şekildeki kromozom anomalisinin yüzdesi 7.4 olmuştur. 500 cGy dozunda gamma ışınlaması sonucunda regenerasyon besiyerinde elde edilen 5 adet bitkinin kök ucu preparasyonlarında herhangi bir anomali saptanamamıştır. Buna karşın, aynı dozda gamma ışını alıp seleksiyon besiyerinde regenere olan 2 bitkinin birinde (Bitki 16₁) % 12 oranında poliploidi bulunmuştur. Kontrol kültürlerinde seleksiyon besiyerinde yetiştirilmesinden elde edilen yalnızca bir bitkide (Bitki 18) %3.8 oranında kromozom köprüsü izlenmiştir.

Ancak, kontrol grup kalluslarının regenerasyon besiyerinde, oluşturdukları 10 adet bitkinin kök ucu mitoz preparasyonlarında anomali oranı % 0 olmuştur (Tablo 9).

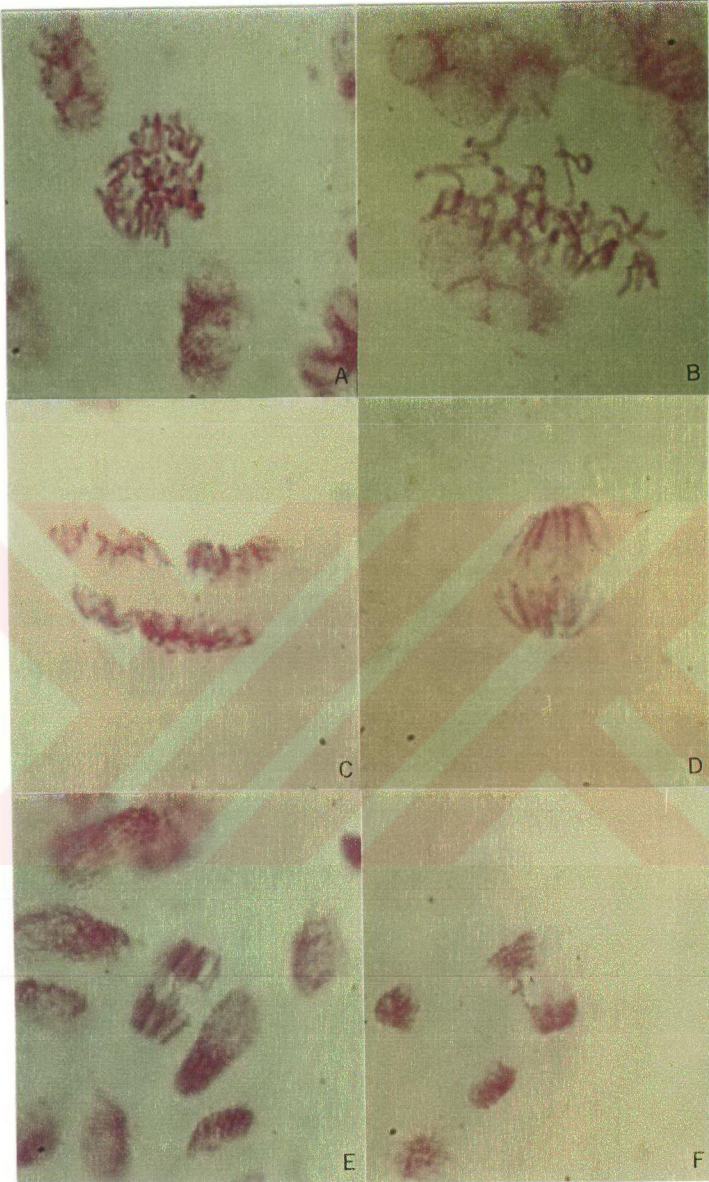
Tablo 9: Regenerasyon ve Seleksiyon besiyerinde işinlanmış ve kontrol materyelden regene olan R₁ bitkilerinin kök ucu mitoz preparasyonlarında kromozom analizi

Uygulanan işin dozu (cGy)	Besiyeri	Metafaz Anafaz ve Telofaz sayısı	Kromozom	Kromozom	Total anomali yüzdesi
			sayı anomalisi	yapı anomalisi	
			Poliploidi	Anafaz ve Telofaz köprüsü	
500 X	Regenerasyon	27	-	2	7.4*
500 γ	Regenerasyon	25	-	-	0
	Seleksiyon	25	3	-	12**
Kontrol	Regenerasyon	28	-	-	0
	Seleksiyon	26	-	1	3.8***

*Anomali yüzdesi, tohumu elde edilen 5 bitkiden birine (Bitki 1₁) aittir.

**Anomali yüzdesi, tohumu elde edilen 2 bitkiden birine (Bitki 16₁) aittir.

***Anomali yüzdesi, tohumu elde edilen 1 bitkiye (Bitki 18) aittir.



Şekil 10: Kontrol ve ışınlama uygulaması yapılmış kallus kültürlerinden regene olup, toprağa aktarımı yapılmış bitkilerin (R₁) kök ucundan yapılan mitoz preparasyonlarına ait fotoğraflar. Büyütme: x1250.

- A,B:** 500 cGy dozunda gamma ışını uygulamalı kallustan seleksiyon besiyerinde (MS+0.01 mgL⁻¹ 2,4-D+1mM SAEC) regenerere olan bitkiye ait (Bitki 16₁) poliploid metafazlar.
- C:** 500 cGy dozunda gamma ışını uygulamalı kallustan seleksiyon besiyerinde (MS+0.01 mgL⁻¹ 2,4-D+1mM SAEC) regenerere olan bitkiye (Bitki 16₁) ait poliploid anafaz.
- D:** Işın uygulaması yapılmamış (Kontrol) kallustan seleksiyon besiyerinde (MS+0.01 mgL⁻¹ 2,4-D+1mM SAEC) regenerere olan bitkiye ait (Bitki 18) anafaz köprüsü.
- E:** 500 cGy dozunda X ışını uygulaması yapılmış kallustan regenerasyon besiyerinde (MS+0.01 mgL⁻¹ 2,4-D) regenerere olan bitkiye ait (Bitki 1₁) anafaz köprüsü.
- F:** 500 cGy dozunda X ışını uygulaması yapılmış kallustan regenerasyon besiyerinde (MS+1mgL⁻¹ 2,4-D) regenerere olan bitkiye ait (Bitki 1₁) telofaz köprüsü.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, aktif bölünen ve regenerere olabilen kallus kültürlerinin kurulması için, olgun tohum embriyolarının mezokotil kısımları eksplant olarak kullanılmıştır. Arpa bitkisinde regenerere olabilen kallus kültürlerinin eldesinde farklı bitki kısımlarının kullanımı bilinmektedir. Arpanın olgun embriyosu (Lupotto E., 1984; Ukai Y. ve Nishimura S., 1987; Gapanenko A.K. ve ark., 1988), olgunlaşmamış embriyosu (Hanzel J.J. ve ark., 1985; Lührs R. ve Lörz H., 1987), fideciği (Rengel Z. ve Jeleska S., 1986), genç fideciğin apikal meristemi (Cheng T.Y. ve Smith H., 1975), tohumları (Ukai Y. ve Nishimura S., 1987; Kothari S.L. ve Chandra N., 1988), polenleri (Wei Z.M. ve ark., 1986), anterleri (Olsen F.L., 1987; Arı Ş., 1990-a) kallus oluşumu için eksplant olarak kullanılabilir. Gramineae'ler için kallus oluşumunda, en uygun eksplantlar olarak, olgunlaşmamış tohum embriyosu, genç çiçek ve genç yapraklar önerilmektedir (Vasil V. ve Vasil I.K., 1986). Bu eksplantlardan olgunlaşmamış tohum embriyosunun kullanımı, uygun varyete ile çalışıldığında yüksek oranda gövde regenerasyonu eldesi nedeniyle yaygındır. Bununla beraber, olgunlaşmamış embriyo kullanımının bitkinin büyüme koşullarına bağlı olarak uygun gelişme evresinin saptanması, eksplantın hazırlanmasındaki zaman gereksinimi gibi bazı zorlukları vardır

(Ukai Y. ve Nishimura S., 1987). Olgun tohum embriyosu kullanımının, diğer eksplantların kullanımına göre materyal sağlamada mevsime bağımsızlık, kolay çalışabilme ve rölatif olarak steril bir doku olması gibi bazı olumlu yönleri vardır (Gözükırmızı N. ve ark., 1990).

H.vulgare L.cv.Zafer-160 arpasının doku kültürlerinin kurulabilmesi için; olgun embriyoların gövde ucu, mezokotil ve kök taslağı ile fideciklerin yaprak ve kök parçalarının eksplant olarak kullanımı sonucu en iyi yanıt olgun tohum embriyosunun mezokotil bölgesinden elde edildiği için (Gözükırmızı N. ve Arı Ş., 1988) çalışma, bu eksplantla yapılmıştır.

Olgun tohum embriyosunun mezokotil parçasından kallus oluşturma yüzdesi, MS besiyerinde (Murashige T. ve Skoog F., 1962) sentetik bir oksin olan 2,4-D'nin değişik konsantrasyonları ile etkilenmiş, 1mgL^{-1} 2,4-D konsantrasyonu ile en yüksek değere (%54.2) ulaşmıştır. Birçok Gramineae türünün doku kültüründe besin gereksinimi için MS besiyerinin uygun olduğu ifade edilmektedir (Vasil I.K., 1987). Arpanın değişik varyetelerinde kallus eldesi için MS ve diğer besiyerlerinin kullanımı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Kothari S.L. ve Chandra N. (1988), RD 387 arpa tohumlarının embriyonal kök parçalarından, Ahloowalia B.S., (1987) "Emma", "Gerbel", "İgri", "Panda", "Triumph", "Viola" arpa kültür varyetelerinde tohumdan, Thomas M.R. ve Scoot K.J., (1985) "Prior", "Corvette" ve "Manchuria" varyetelerinde olgun olmayan embriyo ve fidecikten kallus oluşumu için MS besiyerini kullanmışlardır. Bununla beraber, Lupotto E., (1984) *H.vulgare* "Maxima"nın olgun

tohumlarının kallus oluşturması için Cheng ve Smith besiyerini (Cheng T.Y. ve Smith H., 1975) kullanmıştır. Pickering R. A., (1989)'nin *H. vulgare* L. ile *H. bulbosum* L. varyetelerinin çaprazlanmasından elde edilen ve ayrı ayrı bu iki varyetenin olgun olmayan tohumlarının regenerasyonu için ve Kott L.S. ve ark., (1986)'nin "Bruce", "Perth", "Klages" kltivarlarının haploid embriyolarından kallus oluşumu çalışmalarında B5 besiyerini kullanmışlardır. Ukai Y. ve Nishimura S., (1987) "Chikurin Ibaraki I" kltivarının olgun embriyolarından kallus oluşumunu yine B5 besiyerinde izlemişlerdir. Ayrıca Goldstein C.S. ve Kronstad W.E., (1986) adlı araştırıcılar da arpada Gamborg B5 besiyerini kullanarak kallus oluşumunu elde etmişlerdir. Jorgensen R.B. ve ark.'nin (1986), arpanın interspesifik hibridleri ile yaptıkları çalışmada, genç başaklardan kallus oluşumu J 25-8 besiyerinde elde etmişlerdir. *H. distichum* L'nin olgun embriyolarından, kallus oluşumu White besiyerinde (Kato Y. ve ark., 1986) elde edilmiştir. Çalışmamız sırasında MS besiyerinde olumlu sonuçlar elde ettiğimiz için diğer besiyerleri kullanılmamıştır. Farklı varyete ve eksplant yanıtları değişik besiyeri bileşkenlerine karşı farklılıklar gösterebilmektedir.

Kallus eldesi için, çeşitli arpa varyetelerinde 2,4-D'nin kullanıldığı birçok alışma (Koot L.S. ve Kasha K.J., 1984; Lupotto E., 1984; Hanzel J.J. ve ark., 1985; Thomas M.R. ve Scoot K.J., 1985; Weigel R.C. ve Hughes K.W., 1985; Goldstein C.S. ve Kronstad W.E., 1986; Jorgensen R.B. ve ark., 1986; Kato Y. ve ark., 1986; Koot L.S. ve ark., 1986; Ahloowalia B.S., 1987; Lührs R. ve Lrz H.,

1987; Rengel Z., 1987; Ukai Y. ve Nishimura S., 1987; Kothari S.L. ve Chandra N., 1988; Pickering R.A., 1989) bilinmektedir. 2,4-D'nin yanısıra sentetik oksinlerden 2,4,5-T (Goldstein C.S. ve Kronstad W.E., 1986; Rengel Z. ve Jeleska S., 1986; Lührs R. ve Lörz H., 1987); dicamba, picloram (Lührs R. ve Lörz H., 1987), doğal oksin olan IAA (Weigel R.C. ve Hughes K.W., 1985; Ahloowalia B.S., 1987), sentetik sitokininlerden kinetin (Wei Z.M. ve ark., 1986) ve benzil adenin (Rengel Z. ve Jeleska S., 1986), doğal sitokinin olan izopentil adenin (2ip) (Weigel R.C. ve Hughes K.W., 1985) ve bir anti oksin olan TIBA'nın (Rengel Z. ve Jeleska S., 1986) kallus eldesi üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir. Bununla beraber, 2,4-D'nin tahıl bitkilerinde embriyogenik kallus oluşumu ve kültürlenmenin devamı için gerekli olan en önemli oksin olduğu ve Gramineae'ler için 0.5 - 2.5 mgL⁻¹ konsantrasyonlarının uygun olduğu bildirilmektedir (Vasil V. ve Vasil I.K., 1986). Bu çalışmada da 2,4-D'nin 1 mgL⁻¹'lik konsantrasyonun, kullanılan materyalden aktif bölünen kallus eldesi için optimum konsantrasyon olduğu saptanmış ve diğer hormonlar denenmemiştir. Literatürde arpada kallus eldesi için, farklı konsantrasyonda 2,4-D kullanımına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan Kothari S.L. ve Chandra N., (1988)'nin çalışmasında RD 387 arpası ve Lupotto E., (1984)'nin araştırmasında ise *H. vulgare* "Maxima" kùltivarı için 5 mgL⁻¹ 2,4-D kullanılmıştır. Ahloowalia B.S., (1987) "Emma", "Gerbel", "Igri", "Panda", "Triumph", "Viola" kùltivarları için 1.5 mgL⁻¹ konsantrasyonunu önermektedir.

Pickering R.A., (1989)'nin *H. vulgare* L. ve *H. bulbosum* L. varyetelerini çaprazladığı ve ayrı ayrı kullandığı çalışmada olduğu gibi; "Bruce", "Perth", "Klages" kùltivarlarıyla Koot L.S. ve arkadaşları (1986) tarafından yapılan araştırmada da 2 mgL^{-1} 2,4-D, kallus oluşumunda iyi sonuç vermiştir. Ayrıca Jorgensen R.B. ve ark., (1986) arpanın interspesifik hibridleriyle yaptıkları araştırmada ve *H. distichum* L.'de 2 mgL^{-1} 2,4-D yine uygun konsantrasyon olarak bulunmuştur. Thomas M.R. ve Scoot K.J., (1985) aynı amaçla *H. vulgare*'de 2.2 mgL^{-1} 2,4-D'yi önerirken, Ukai Y. ve Nishimura S., (1987) "Chikurin Ibaraki I" varyetesi için 1.76 mgL^{-1} 'lik 2,4-D konsantrasyonunu kullanmışlardır. Bizim bulgularımıza benzer olarak Goldstein C.S. ve Kronstad W.E., (1986) *H. vulgare* "Klages" varyetesi için 1 mgL^{-1} 2,4-D'yi uygun konsantrasyon olarak saptamışlardır. Arpa bitkisiyle yapılan çalışmalarda 2,4-D konsantrasyonuna ilişkin farklılıklar; birçok çalışmada kullanılan eksplant, varyete ve besiyeri gibi faktörlerle yakından ilişkili olmaktadır.

Çalışmamızda *H. vulgare* L. cv. Zafer - 160 arpasının aktif bölünen embriyogenik kallus kùltürlerinin kurulmasını takiben; kùltürlemenin 20. gününde kallusların, 0.01 mgL^{-1} 2,4-D içeren MS besiyerine aktarılmasıyla bitki regenerasyonu elde edilmiştir. Zafer - 160 arpasıyla Gözükırmızı N. ve ark., (1990)'nin regenerasyonu için düşük konsantrasyonlarda 2,4-D kullandıkları ($0.5, 0.1, 0.01 \text{ mgL}^{-1}$) çalışmada, en yüksek orandaki regenerasyonu %44.1 ile 0.01 mgL^{-1} 2,4-D konsantrasyonunda

elde ettiklerinden, bu çalışmada da regenerasyon koşulu olarak aynı konsantrasyon kullanılmıştır.

Genel olarak monokotil bitkilerden Gramineae'lerin *in vitro*'da uzun süreli kallus kültürleri ve bitki regenerasyonu 70'li yıllarda başarılammıştı. 80'li yıllara kadar ise, üretken bitki regenerasyonuna ait sadece birkaç çalışma bildirilmekteydi. Daha sonraki yıllarda ise besiyerinde 2,4-D'nin kullanımıyla kallus oluşumu ve azalan konsantrasyonlarında ise bitki regenerasyonu elde edilmiştir (Vasil I.K., 1987; Vasil I.K., 1988). 2,4-D'nin kullanımı ile meristematik ve farklılaşmamış hücreleri içeren doku/organlara ait eksplantların kültürlenmesi ve geri dönüşümsüz olarak belli bir gelişme yoluna katılmamış hücrelerin varlığı, birçok Gramineae türünde embriyogenik doku kültürlerinin oluşumu ve devamlılığına yol açmıştır. Bu tip kültürlerden; tek hücreden gelişen, morfolojik ve fizyolojik olarak zigotik embriyoya benzeyen somatik embriyolar gelişmektedir (Vasil I.K., 1987). 2,4-D varlığında eksplantın çıkarılmasını takiben, hücrelerin bir kısmı embriyogenik hale geçer ve uygun seviyedeki konsantrasyonuyla bu hücrelerin bölünmeleri devam ederek, gelişen dokuda embriyogenik zonlar oluşur. 2,4-D'nin düşük konsantrasyonları somatik embriyoların organizasyonuna yol açmaktadır (Vasil I.K., 1987).

Arpa doku kültürlerinde regenerasyon elde etmek amacıyla birçok araştırmacı farklı hormonları ve besiyerlerini denemişlerdir. Bu amaçla arpada MS besiyerinin kullanımı yaygın olup, çok sayıdaki çalışmada da bu besiyerinde organogenez ya da somatik

embriyogenez şeklinde bitki regenerasyonu elde edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS besiyerinde bitki regenerasyonu elde ettiğimiz çalışmamıza benzer olarak, Hanzel J.J. ve ark., (1985) 91 farklı arpa varyetesiyle yaptıkları araştırmada, düşük 2,4-D konsantrasyonunda (0 ve 1 mgL⁻¹) kök ve gövde farklılaşmasını ve bunu takiben 8/91 varyetede bitki regenerasyonu elde etmişlerdir. Ahloowalia B.S., (1987) ise 7 farklı arpa varyetesinde organogenez için MS tuzlarını yarım kuvvette içeren 0.5 mgL⁻¹ 2,4-D'li ve 1mgL⁻¹ zeatin'li besiyerini, bitki regenerasyonu için ise hormon içermeyen yarım kuvvette MS besiyerini önermektedir. Kothari S.L. ve Chandra N., (1988) regenerasyon için 0.5 mgL⁻¹ 2,4-D'ye ilaveten 0.2 mgL⁻¹ kinetin içeren MS besiyerini kullanmışlardır. Wei Z.M. ve arkadaşlarının, (1986) *H. vulgare* "Sabarlis" polenleriyle yaptıkları araştırmada MS+2 mgL⁻¹ BA ve 0.5 mgL⁻¹ indol-3-asetik asit'in regenerasyon için uygun olduğunu bulmuşlardır. Rengel Z. ve Jeleska S., (1986) Rengel Z., (1987) arpada regenerasyon için; MS+3 µM TIBA, Thomas M.R. ve Scoot K.J., (1985) hormonsuz MS ya da 0.4 µM ABA içeren MS besiyerini önermektedirler.

MS tuzlarından başka, arpada regenerasyon için doku kültüründe kullanım alanı olan diğer besiyerlerinden de olumlu sonuçların alındığı birçok çalışma yapılmıştır. Lupotto E., (1984) bitki regenerasyonu için "Maxima" varyetesinde hormonsuz Cheng ve Smith besiyerini ve ardışık olarak bu besiyerini yarım kuvvette kullanmıştır. Pickering R.A. (1989), 3 farklı varyetenin tek tek ve çaprazlanmasından elde edilen kalluslarından hormonsuz B5 besiyerinde regenerasyonu bildirmişlerdir. Goldstein C.S. ve

Kronstad W.E., (1986) aynı besiyerinde 1 mgL^{-1} 2,4-D veya 5 mgL^{-1} 2,4,5-T'yi önermektedirler. Ayrıca, hormonsuz J 25-8 besiyeri (Jorgensen R.B. ve ark., 1986), 41 farklı arpa varyetesi için, 1 mgL^{-1} IAA ve 0.05 mgL^{-1} zeatin içeren CC besiyeri (Lührs R. ve Lörz H., 1987), *H. distichum*'da 2 mgL^{-1} 2,4-D içeren White besiyeri (Katoh Y. ve ark., 1986), "Chikurin Ibaraki I" varyetesi içinde 2.2 mgL^{-1} ve 6.6 mgL^{-1} 2,4-D içeren B5 gibi besiyerleri (Ukai Y. ve Nishimura S., 1987) çeşitli arpa varyetelerinin regenerasyonu çalışmalarında başarıyla kullanılmıştır.

Yukarıda sözü edilen tüm bu araştırmalardan, optimal regenerasyon koşulu olarak, besiyeri ve kullanılan hormonların çeşitleriyle konsantrasyonlarının farklılık göstermeleri, birinci derecede kullanılan arpa varyetelerinin farklı olması nedeniyledir diye düşünülmektedir. Bunun yanısıra, kullanılan eksplant tipi ve kültürlenme koşulları da regenerasyon için önemlidir.

Önceki bölümlerde tartışılan şekilde çalışmamızda; *H. vulgare* L. cv. Zafer - 160 arpasının aktif bölünen, embriyogenik kallus kültürleri ve bu kalluslardan da bitki regenerasyonu koşulları optimize edildikten sonra, regene olma potansiyeline sahip kallus kültürleri X ve gamma ışınlarının etkisinde bırakılmışlardır. Işınlanmış olan bu kallusların hem regenerasyonları hem de lizin analogu bir madde olan SAEC'ye dirençli olma durumları, analog varlığında regenerasyonunun gerçekleşip, gerçekleşmesi kriterine göre araştırılmıştır.

Bu çalışmada uygulanan ışınlamalar, *H. vulgare* L. Zafer-160'ın kallus kültürlerinin regenerasyon yeteneğini olumsuz yönde

etkilemiştir. 1000 cGy'nin üzerindeki X ve gamma ışınları regenerasyon yeteneğini tamamen ortadan kaldırmıştır. Bu sonuç, 1000 cGy dozunda X ışını almış olan kalluslar için de aynı olup, 1000 cGy dozunda gamma ile ışınlananlarda kısmen de olsa regenerasyon izlenebilmiştir. Bu dozdaki regenerasyon oranı %5.5 olarak bulunmuştur. Bir diğer yaklaşımla ışınlamalar, kontrolde 52.63 olan regenerasyon yüzdesini; 1000 cGy dozunda gamma ışını uygulamasıyla %47.13, 500 cGy dozunda gamma ışını uygulaması ile %39.81, 500 cGy dozunda X ışını uygulaması ile de %35.39 azaltmışlardır. Işınların bu şekildeki olumsuz etkileri, genel olarak bölünen hücrelerin aktivitelerine ket vurulması ile ilişkilidir (Ukai Y., 1968). Zafer-160 arpa varyetesinde yapılan bir çalışmada, X ve gamma ışınlarının 500 ve 1000 cGy'lik dozlarında, doz artışına paralel olarak somatik embriyogenez yüzdesinin azaldığı da saptanmıştır (Arı Ş., 1990-b). Zafer-160 arpa tohumlarında 16.000 - 40.000 cGy X ve 12.000 - 18.000 cGy gamma ışınlamalarının çimlenme yeteneğini, doz artışına paralel olarak azalttığı Bilge E. ve ark., (1982) tarafından bildirilmiştir. Bu bulgular bizim bulgularımızla birlikte düşünüldüğünde, kallus dokusunun tohuma göre ışınlara çok daha hassas olduğu sonucunu ortaya çıkartmaktadır. Bu bulguya paralel olarak, Ukai Y., (1988)'nin çeşitli arpa varyetelerinin tohum ve kalluslarının yaş ağırlık cinsinden radyasyon duyarlılığını araştırdığı çalışmada; kavuzlu ve çıplak varyetelerin radyasyon hassasiyetinin; tohum ışınlaması için kavuzlu varyetelerde 44.000 cGy, çıplak varyetelerde 7000 cGy olduğunu, kallus ışınlamasında bu değerlerin sırasıyla 5000 cGy ve 3000 cGy'ye düştüğünü izlemiştir. Araştırmacı bu sonuçla, radyasyon hassasiyetinin varyete ile ilişkili olduğunu vurgulamıştır.

Arpanın dışındaki diğer tahıl bitkileri ile de gamma ve X ışınlanması çalışmaları yapılmış ve kullanılan bitki türü, varyete ve ışınlanan materyal (tohum ya da doku kültürü materyali) farkına bağlı olarak; ışınlanmış materyaller arasındaki radyasyon duyarlılığı ile ışınların çimlenme yeteneği, kallus oluşumu, süspansiyon kültürlerde koloni oluşturma yeteneği, yeşil bitki regenerasyonunu değiştirme gibi etkileri ortaya konulmuştur. Novak F.J. ve ark.'nın (1988), mısırın 17 farklı varyetesiyle yaptıkları ışınlama çalışmasında, yüksek somatik embriyogenez kapasiteli "CHI 31" varyetesinde olgunlaşmamış embriyo taşıyan tohumları *in situ* olarak gamma ışınlarının (500 - 1000 cGy) etkisinde bırakmışlar ve *in vitro* regenerasyonda ışınların etkisiyle oluşan bitki sayısındaki azalmanın 1000 cGy dozunda 500 cGy dozuna göre daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Çavdarın 14 günlük olgunlaşmamış embriyoları Sawicka E.J. ve ark., (1991)'nin yaptıkları araştırmada 500 - 8000 cGy gamma ışınlarının etkisinde bırakılmış ve olgunlaşmamış embriyonun çimlenmesiyle uygulanan ışın dozu arasında önemli bir ilişki saptanmıştır. 500 ve 1000 cGy gamma radyasyonunda kontroldeki 100 olan germinasyon yüzdesinin 44'e düştüğünü, doz artışı ile çimlenme yüzdesinin (2000 cGy'de %6) daha da azaldığını ve yok olduğunu izlemişlerdir. Ayrıca doz artışına bağlı olarak embriyogenik kallus oluşumu da azalmıştır. Bir başka çalışmada Aldemita R.R. ve Zapata F.J., (1991), farklı pirinç kültürlerinin tohumlarını; 10.000, 20.000, 30.000, 40.000 cGy gamma ışınlarının etkisinde bırakmışlar ve bu tohumlardan daha sonra anter kültürü yapmışlardır. Tohum çimlenmesinin radyasyon dozunun artışına bağlı olarak azaldığını ve tohum materyalinden kurdukları anter kültüründe cevap vermeyen (radio - resistant) varyetelerin kallus oluşumu ve bitki regenerasyonunda

radyasyonla artış olduğunu, ayrıca fertilizasyon yüzdesinin radyasyon dozunun artışı ile azaldığını saptamışlardır. Yine pirinç bitkisinin "Kitaake" varyetesinin anter ve kallus kültürlerine gamma radyasyonunun uygulandığı çalışmada, anterlerden kallus ve yeşil bitki oluşumunun gamma ışın dozunun artışına bağlı olarak azaldığı, albino bitki sayısının arttığı bulunmuştur. 1000 cGy ile 500 cGy/dak. ve 300 cGy ile 200 cGy/saat dozları kallus oluşumunu %16.7 ve %18.7 oranında düşürmüştür (Kinoshita T. ve Mori K., 1991). Min S. ve ark., (1991) tarafından pirinçle yapılan başka bir çalışmada ise "Basmati 370" varyetesinin çimlenmekte olan embriyoları, kallusları, yeşil noktalı ve gelişen gövde yapısı gösteren kalluslarına 0 - 10.000 cGy gamma ışınları verilmiştir. Çimlenmekte olan embriyoların kallus oluşturma yetenekleri doz artışıyla azalmış, yeşil noktalı kalluslarda radyasyon önemli etki göstermiş ama bu etki kallus ışınlamasına göre daha az olmuştur. Dozun 10.000 cGy olduğu durumda ise yeşil bitki yüzdesinde önemli ölçüde azalma izlenmiştir. Bu çalışma sonuçlarından da anlaşılabilir gibi; ışınlamanın kallus, yeşil noktalı kallus, organogenez gösteren kallus, bitki ve tohuma kadar çeşitli doku kültürü materyallerindeki olumsuz etkisi, kallustan itibaren organizasyon artışına bağlı olarak azalmaktadır. Diğer bir deyişle, radyasyon duyarlılığı, kallustan tohuma doğru gidildikçe azalmaktadır.

Havuç süspansiyon kültürleriyle yapılan bir çalışmada da (Al - Safadi B. ve Simon P.W., 1990), 500 - 40.000 cGy dozlarındaki gamma ışınları kullanılmıştır. Radyasyon etkileri olarak; hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinde azalma, anormal bitki sayısındaki artış, düşük dozlarda regenere bitki sayısını

artırma (5000 - 10.000 cGy) ama yüksek dozlarda regenerasyonda supresyon şeklinde izlenmiştir. Radyasyonla regeneratif potansiyeldeki artış bulgusu, Shama Rao H.K. ve Narayanaswamy S., (1976) tarafından pigeon pea (*Cajanus cajan*)'nin 0 - 10.000 cGy gamma ışınları etkisinde bırakılmış hipokotil segmentleri ile yaptığı çalışmada da yer almaktadır. Aynı şekilde; buğdayın olgunlaşmamış embriyoları ve 2 aylık kallus kültürlerinin gamma ışınlarının etkisinde bırakıldığı çalışmada, genç embriyolardan 500 cGy dozunda regenere bitkiler M₁ R₁ generasyonunda elde edilmişlerdir. 1000 cGy dozu ile ışınlanan kalluslardan 10 adet regenerant elde edilmiş ve ışınlamanın varyant soyların frekansını artırmada yararlı olabileceği vurgulanmıştır. Aynı çalışmada kromozomal bozukluklar nedeni ile sterilite ve düşük regenerasyon yüzdesinin ışınların etkisiyle ortaya çıktığı görülmüş, bu durumun 500 cGy ışınlama limitiyle kontrol edilebileceği ileri sürülmüştür (Gao M. ve ark., 1991). Bizim çalışmamızda gamma ışınlarının regenerasyonu indükleyici bir etkisi saptanmamıştır.

X ışınları ile ilgili olarak literatürde regenerasyon çalışmasına rastlanamamıştır. Ancak bizim çalışmamızda 1000 cGy ve üzerindeki dozlarda regenerasyon izlenmemiştir. 500 cGy dozundaki X ışınları ise, kontroldeki 52.63 olan regenerasyon yüzdesini 17.24'e indirgemekle birlikte regenerasyona izin vermiştir.

Işınlama çalışmalarında, 1000 cGy ve 1000 cGy'nin üzerindeki X ve gamma ışınlarının, kallus kültürlerinde 1.5 ay sonra renk değişimine yol açtığı saptanmıştır. Kontrol kültürlerdeki kallusların; beyaz, opak ve sert görünümleri sözü edilen dozlarda ışın almış kalluslarda; non-embriyogenik, sarı-kahverengi, yumuşak, sulu ve doku bütünlüğü bozulmuş hale dönüşmüştür. Bu tip kalluslarda bitki regenerasyonu izlenememiştir. Regenerasyon çalışmalarında, bu bulguya paralel olarak Jorgensen R.B. ve Andersen B. (1989), *H. procerum* ile *H. vulgare*'nin çaprazlanmasından elde edilen kallusları 10.000 ve 15.000 cGy dozlarında gamma ışınlarının etkisinde bıraktıkları çalışmalarında, kallusların renginin ışınlamadan birkaç hafta sonra kahverengiye dönüştüğü ve bu kallusların regene bitki vermediklerini saptamışlardır. Bu çalışmada renk değişimine neden olan gamma ışını dozlarının, bizim çalışmamızdakinden yüksek oluşunun, kullanılan varyetelerin farkından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Diğer bir deyişle, *H. procerum* x *H. vulgare* çaprazlanmasından oluşan kalluslar, *H. vulgare* Zafer-160 kalluslarına göre renk değişimi yönünden gamma ışınlarının daha yüksek dozlarına dirençlidirler. Ukai Y., (1988)'nin çeşitli arpa varyetelerinin tohumlarını gamma ışınlarının etkisinde bıraktığı çalışmada da, bu tohumların embriyolarından gelişen kallusların rengi kontrol kültürlerde beyaz iken, ışınlanmış olanlarda kahverengiye dönüşmüştür. Işınlama koşulu olmaksızın da embriyogenik ve non-embriyogenik olarak sınıflandırılan (Vasil I.K., 1987) ve regenerasyon yetenekleri farklı olan bu iki kallus tipine arpada, kültürleme sırasında rastlanması birçok araştırmacının yapmış olduğu çalışmalarda yer almaktadır (Koot L.S.

ve Kasha K.S., 1984; Thomas M.R. ve Scoot K.J., 1985; Weigel R.C. ve Hughes K.W., 1985; Goldstein C.S. ve Kronstad W.E., 1986; Rengel Z., 1987). Somatik embriyogenezin kallus tipiyle ilgili olduğu (Vasil V. ve Vasil I.K., 1981) ve *H. vulgare* "Maxima" varyetesiyle yapılan bir çalışmada, non - embriyogenik kalluslardan bitki regenerasyonunun elde edilmediği saptanmıştır (Lupotto E., 1984).

Gerek fiziksel gerekse kimyasal mutagenез yoluyla diğer tahıl bitkileri için olduğu gibi, arpa bitkisinde de tarımsal ve biyoteknolojik özellikleri geliştirmek amacı ile çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların önemli bir kısmı da tohum kalitesinin geliştirilmesi için, tohum proteinlerinde eksikliği görülen amino asitlerin (özellikle lizin ve treonin) artırılması yolunda olmuştur.

Bizim de bu çalışmada amaçlarımızdan biri olan, lizin amino asidini fazla miktarda içeren mutantların seleksiyonu için, X ve gamma ışınlaması yapılmış kallus kültürleri ile kontrol kültürler bir lizin analogu olan SAEC'nin 1 mM'lük konsantrasyonunda yetiştirilmiş, bu selektif ajanın varlığında regenerere olabilen bitkiler elde edilebilmiştir. Tohumları da alınan toplam 23 adet bitkiden 11 tanesi kontrol materyalden sağlanmış olup, bunların 1 adedi SAEC'nin 1 mM'lük konsantrasyonuna dirençlidir. Geri kalan 12 bitkinin 2 tanesi yine 1 mM SAEC'ye dirençli olup 500 cGy dozunda gamma ışınlaması deneylerinden regenerere olmuştur. 10 adet bitkinin ise 5 tanesi 500 cGy X ışınlaması ile regenerasyon besiyerinde gelişmiştir.

Lisin ve treonin amino asitlerini fazla miktarda içeren tiplerin elde edilmesi amacıyla bitki doku kültürü çalışmalarında selektif sistem olarak SAEC'nin kullanıldığı çalışmalar bilinmektedir. Bunlardan 1979'da Bright S.W.J. ve ark., *H. vulgare* L."Bomi"de 0.25 mM SAEC varlığında büyüeyebilen R906 mutanını elde etmişler ve yabancı tipe göre serbest lisin miktarında artış saptamışlardır. Yüksek lisin içerikli tiplerin elde edilmesi amacıyla diğer bitkilerde de SEAC'nin kullanımı bildirilmektedir. Bunlardan Chaleff R.S. ve Carlson P.S. (1974), *Oryza sativa* (C.I.8960-5)'da 2 mM SAEC'ye dirençli üç hücre soyu elde etmişlerdir. Bu çalışmada hücre süspansiyon kültürleri seleksiyondan önce %1 etil metan sülfonat etkisinde bırakılmışlar ve SAEC ile inkübasyondan sonra dirençli soylarda 30 nmol/mg kuru ağırlık cinsinden serbest lisinde artış saptamışlardır. Harms C.T. ve ark., (1982) *Daucus carota* L.'nin interspesifik hibrid hücre soylarının 5-metil-triptofan ve/veya SAEC'nin her ikisine de yüksek seviyede dirençli olduğunu bulmuşlardır. Matthews B.F. ve ark., (1980) ise yine havucun "Donvers" varyetesinin, hücre kültüründe SAEC'nin 0.3 mM konsantrasyonuna dirençli tipleri selekte etmişlerdir. Bu kültürleri seleksiyondan sonra 2 kez 1mM SAEC ortamına aktarmışlar, daha sonra da 0.25 mM SAEC içeren agarlı besiyerinde dirençli kolonilerin oluştuğunu izlemişlerdir. Boyes C.J. ve Vasil I.K., (1987) 0.5 - 4 μ M SAEC içeren besiyerinde *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. cv. Gahi 3'e ait embriyogenik kalluslardan, SAEC'ye tolerant tipleri direkt olarak seçmişlerdir. SAEC'ye tolerant olan kallusların, kontrole göre 7 kat fazla serbest lisin biriktirmiş oldukları saptanmıştır.

Bizim çalışmamız sırasında 1mM SAEC içeren seçici besiyerinde gelişen ve tohum elde edilerek dölleri devam ettirilen materyelde, direkt lisin tanımlayıcı bir kalitatif veya kantitatif yöntem uygulanamamıştır. Eldeki materyelin bu yönden incelenmesi yolundaki çalışmalara devam edilecektir.

Mitoz bölünme incelemeleri, kallus kültürlerinin X ve gamma ışınlarının 500 cGy dozu ile ışınlanmış ve kontrol grubunda yapılmıştır. 500 cGy dozunda X ışını almış olan kalluslarda %5.5 oranında kromozom köprüsü gözlenirken, aynı dozda gamma ışını almış olanlarda sayı ya da yapı anomalisi izlenmemiştir. Aynı şekilde kontrol kültürlerde, kültürlemenin 10. gününde herhangi bir anomali görülmezken 45. günde %11.4 oranında tetraploidlere rastlanmıştır. Kontrol materyel için elde ettiğimiz bulguya benzer olarak Ruiz M.L. Vazquez A.M., (1982) *H. vulgare* L.'nin gövde kökenli kallus kültürlerinde bölünen hücre populasyonunu başlangıçta diploid olarak bulmuşlar, ancak 5. ayda kalluslarda tetraploidlere rastlamışlardır. Bununla beraber, aynı araştırmacılar (1981)'de bir başka çalışmalarında kallusların 3 yıl boyunca diploidliklerini koruduklarını, ancak başlangıçta bazı poliploid veya aneuploid hücrelerin bulduklarını ifade etmektedirler. Singh R.J. (1986), *H.vulgare* L. "Himalaya"nın olgun olmayan embriyosundan gelişen morfogenetik ve non-morfogenetik kallus kültürlerinden non-morfogenetik olanlarında rastlanan kromozom sayı ve yapı anomalisi sıklığının, morfogenetik olanlarınkine göre çok daha fazla olduğunu göstermiştir. Ayrıca kallus regenerasyonunda azalmanın aneuploid ve poliploidlerin birikimi ile ilişkili olduğunu vurgulamıştır. Gapanenko A.K. ve ark.,

(1988)da *H.vulgare* "Moskovsky 121" kltivarının kallus kültürlerinde morfogjenik olanların diploid olduğunu bulmuşlardır. Poliploid ve aneuploid metafaz yüzdesinin kallus yaşıyla arttığını gözlemişlerdir. Kott L.S. ve ark., (1986) eşitli arpa varyetelerinin haploid embriyolarından oluşan kalluslarda, poliploidinin kallus yaşıyla arttığını saptamışlardır. Lupotto E., (1984)'nin *H.vulgare* "Maxima" varyetesinin kallus kültürlerinde 3 ay sonra poliploidlerin sayısının önemli derecede arttığını ve bitki regenerasyonundan kallusların diploid komponentlerinin sorumlu olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacıların ifade ettikleri gibi, doku kültüründe çok çeşitli tiplerine rastlanan sayısal ve yapısal kromozomal varyasyonların, kallus yaşının artışına paralel olarak arttığı ve bu tip kalluslarda regenerasyon cevabının zayıfladığı izlenmektedir (Vasil I.K., 1987; Lee M., 1988). Bizim bulgularımız da yaşlanmayla poliploidlerin artışı yönünde olmuş, kültürlemenin 10. gününde poliploidlerin yüzdesi 0 iken, 45. gününde 11.4 oranında bulunmuştur. Zafer-160 arpası ile yapılan bir başka çalışmada da Gzkirmızı N. ve ark. (1990), kallus yaşıyla regenerasyon yeteneğinin azalması arasındaki pozitif ilişkiyi 1.5 yıl boyunca sürdürdükleri kültürlerde saptamışlardır. Ayrıca sözü edilen çalışmada, poliploidiyi yaşlanan kalluslarda artan oranla izlemişlerdir.

Bu çalışmada kullanılan işinlerden yalnızca 500 cGy dozundaki X işini uşgulamasında, bir adet kromozom köprüsüne rastlanmıştır. Bunun dışında 500 cGy dozunda gamma işinlemedisinin herhangi bir kromozom anomalisine neden olmadığı saptanmıştır.

Ancak Al-Safadi B. ve Simon P.W., (1990)'nin havuç süspansiyon kültürlerinde gamma ışınlanması yaptıkları çalışmada, poliploid ve aneuploidlerin arttığı ifade edilmektedir. Bu çalışmadaki gamma ışını etkisinin, bizim çalışmamızdakinden farklı olmasının nedeni, kullanılan türlerin ve kültürlemenin farkı ile açıklanabilir. Kallus kültürlerinde mitoz bölünme analizlerinden elde ettiğimiz bulgular göstermektedir ki; radyasyona bağlı varyasyon, spontan olarak meydana gelen kromozomal varyasyondan daha düşüktür. Çünkü, ışınlanan materyalde tetraploidlere rastlanmamıştır. Novak F.J. ve ark., (1988) tarafından mısırın doku kültürlerinde yapılan çalışmada somaklonal ve gamma ışınlarıyla indüklenen varyasyon karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar, somaklonlardaki varyasyonun, mutagenize populasyondan önemli derecede yüksek olduğunu işaret etmişler ve bu iki çeşit varyasyon kaynağının, varyant frekansını arttırdığını ileri sürmüşlerdir.

Mayoz bölünme ile ilgili kromozom analizinde kontrol ve X ışınlanması yapılmış kalluslara ait bitkilerde herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır. Ancak, 500 cGy dozunda gamma ışınlanması yapılmış olan kalluslardan seleksiyon besiyerinde regenerere olabilen 2 bitkiden birinde total %20.6 normal olmayan kromozom davranışı izlenmiştir. Aynı dozdaki gamma ışını etkisinde kalan kalluslardan regenerasyon besiyerinde regenerere olan 5 bitkiden birinde ise, total % 3.6 oranında geri kalmış kromozomlarda yapışıklık köprüsü gözlenmiştir. Arpada tohum ışınlamaları etkisiyle oluşan mayoz bölünme anormallikleri Bilge E. ve ark., 1982 tarafından incelenmiş ve bizim bulgularımıza benzer tipte çeşitli yapı ve bölünme anormallikleri gözlenmiştir.

R₁ bitkilerinin mitoz incelemeleri sırasında en önemli bulgu, 500 cGy gamma ışını uygulamasına ait 1 mM SAEC konsantrasyonunda regenere olan 2 bitkiden birinin R₁ kök ucu mitozunda poliploidlerin görülmüş olmasıdır. Jorgensen R.B. ve Andersen B., (1989)'nin arpanın interspesifik hibridleriyle yaptıkları çalışmada, gamma radyasyonunun karyotipik varyantların oluşumunu artırdığını ve regenere olan birçok bitkiden ışınli olanlarda çaprazlanan türlere ait kromozom kayıpları şeklinde sayısal anomaliler gözlemişlerdir. Olgun A., (1985) de Zafer-160 arpasıyla yaptığı kök ucu mitoz çalışmasında gamma radyasyonu ile tohum ışınlamasının mitoz anomalilerine yol açtığını bulmuştur. Ancak literatürde kalluslarda gamma ışınlarıyla, lisince zengin tiplerin seleksiyonu için SAEC'nin birlikte kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle gamma ışını uygulaması ile birlikte SAEC varlığında büyüeyebilen 1 bitkide, %12 oranında poliploidlere rastlanmasının, bu bitkinin poliploidi nedeni ile SAEC'ye dirençli olabileceğini düşündürmektedir.

Günümüzde bitki yetiştiriciliğinde, zirai yönden önemli bitkilerin doku kültürlerinin kurulması ve bu kültürlerde mutasyon, somaklonal varyasyon, gen transferi gibi yöntemlerin uygulanması ile yeni ve üstün nitelikli tiplerin eldesi çok önem kazanan konulardan biri haline gelmiştir. Bir model sistem olarak, yerli arpa varyetesi olan *H.vulgare* L.cv. Zafer-160 ile elde ettiğimiz bulguların bu yöndeki çalışmalar için yararlı olabileceği düşünülmektedir.

5. ÖZET

X ve GAMMA IŞINLARININ ARPA DOKU KÜLTÜRLERİNE ETKİLERİ

Bu çalışmada X ve gamma ışınlarının kallusların regenerasyon potansiyeli ve kromozom varyasyonu üzerine etkileri araştırıldı. 1 mM S-(2- aminoetil) - L- sistein içeren seleksiyon ortamında büyüyen kontrol ve ışınlanmış kalluslarda lisince zengin mutantların seçimi için de deneyler yapıldı. Bu kalluslardan regenere olan bitkiler hem mitoz hem de mayozda kromozom davranışları yönünden incelendi.

Kallusların regenerasyon potansiyeli artan radyasyon dozu ile olumsuz yönde etkilendi. 500 cGy gamma ve X ışınları regenerasyonu sırasıyla %39.81 ve %35.39 azaltırken, 1000'in üzerindeki X ve gamma ışınları regenerasyonu tümüyle engelledi.

Işınlanmamış kalluslarda gözlenen kendiliğinden oluşan kromozom varyasyonları, X ve gamma ışınlanması yapılan örneklerde ileri derecede azaldı. 500 cGy gamma ışınları et kisinde bırakılmış kallustan regenere olan bir bitkide mayozda ortalama %20.6 oranında anormal kromozom davranışı görüldü.

Lisince zengin mutantların seleksiyonu için seçici besiyerinde büyütülen ışınlanmış ve kontrol kallus kültürlerinden bitkiler elde edildi. Kontrol kültürlerden 1 bitki ve 500 cGy gamma ışını ile işlem görmüş kültürlerden 2 bitki olgunluğa kadar yetiştirilerek tohum elde edildi. Bu tohumların kök ucu mitoz preparasyonları incelendiğinde sadece gamma ışını ile işlem görmüş örneklerde yüksek oranda poliploid hücrelere rastlandı.

6. SUMMARY

EFFECTS of X and GAMMA RAYS on BARLEY TISSUE CULTURES

In this study, the effects of X and gamma rays on the regeneration potential and chromosomal variation of calli were investigated. Experiments were also carried on the selection of lysine - rich mutants in irradiated, and control calli grown in selective media containing 1 mM S- (2 - aminoethyl) - L- cysteine (SAEC). Plants regenerated from these calli were examined in terms of both mitotic and meiotic chromosomal behaviour.

Regeneration potential of calli was negatively effected by the increasing dose of radiation. X and gamma rays over 1000 cGy completely inhibited regeneration while 500 cGy gamma and X rays diminished regeneration to 39.81% and 35.39%, respectively. Spontaneous chromosomal variations observed in non - irradiated calli were highly diminished in X and gamma irradiated ones. About 20.6% abnormal meiotic chromosomal behaviour was seen in one plant regenerated from the callus treated with 500 cGy gamma rays.

For the selection of lysine - rich mutants, plants were regenerated from control, X and gamma rays treated cultures grown in selective media. Two plants from 500 cGy gamma rays treated cultures and one from control ones were obtained. These plants were grown to maturity and seeds were obtained. When the root - tip mitotic preparations of these seeds were examined, a high level polyploid cells were observed only in gamma rays treated ones.

7. KAYNAKLAR

AHLOOWALIA B.S. (1987). Plant regeneration from embryo-callus culture in barley. *Euphytica*. 36: 659-665.

ALDEMITA R.R. ve ZAPATA F.J. (1991). Anther culture of rice: effects of radiation and media components on callus induction and plant regeneration. *Cereal Research Communications*. 19 (1-2): 9-32.

AL - SAFADI B. ve SIMON P.W. (1990). The effects of gamma irradiation on the growth and cytology of carrot (*Daucus carota* L.) tissue culture. *Environmental and Experimental Botany*. 30 (3): 361-371.

AMMIRATO P.V., EVANS D.A., FLICK C.E., WHITAKER R.J. ve SHARP W.R. (1984). Biotechnology and agricultural improvement. *Trends in Biotechnology*. 2 (3): 53-58.

ARI Ş. (1990-a). Anther culture of different barley cultivars. Report from Department of Molecular Plant Biotechnology of the Institute for Biotechnology and Chemistry of TNO in Leiden, The Netherlands.

ARI Ş. (1990-b). Effects of X and gamma rays on the regeneration capacity of calli derived from mature embryos in barley. Abstracts VII th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, June 24-29, s. 147.

BAJAJ Y.P.S., SAETTLER A.W. ve ADAMS M.W. (1970). Gamma irradiation studies on seeds, seedlings and callus tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L. Rad. Bot. 10: 119-124.

BENEDIKTSSON I., KÖHLER F. ve SCHIEDER O. (1990). X - irradiation and co-transformation of *Petunia* 'Mitchell' protoplasts with two antibiotic resistance genes. Proceedings of the VII th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, The Netherlands, June, 24-29 s. 67-72.

BİLGE E., ORALER G., GÖZÜKIRMIZI N., OLGUN A. ve TOPAKTAŞ M. (1981). Experimental mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.). İstanbul Üniv. Fen Fak. Mec. Seri B. 46: 29-35.

BİLGE E., ORALER G., KOCAOĞLU M., OLGUN A. ve KUTER S. (1982). Üstün vasıflı arpa varyetelerinin elde edilmesi yolunda temel genetik çalışmalar (TÜBİTAK, Grant No. TOAG 162), TÜBİTAK Yayınları. No.510.

BOURGIN J.P. (1986). Isolation and characterization of mutant cell lines and plants: auxotrophs and other conditional lethal mutants. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 3 Plant Regeneration and Genetic Variability. s. 475-498. Ed: I.K. Vasil Academic Press, New York.

BOURGIN J.P., CHUPEAU M.C. ve MISSONIER C. (1982). Amino acid-resistant plants from tobacco cells selected *in vitro*. Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture. s. 163-174. Ed: E.D.Earle ve Y.Demarly Preager Publishers, New York.

BOYES C.J. ve VASIL I.K. (1987). *In vitro* selection for tolerance to S-(2-aminoethyl)-L- cysteine and overproduction of lysine by embryogenic calli and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. Plant Science. 50:195-203.

BRIGHT S.W.J., WOOD E.A. ve MIFLIN B.J. (1978-a). The effect of aspartate-derived amino acids (lysine, threonine, methionine) on the growth of excised embryos of wheat and barley. *Planta*. 139: 113-117.

BRIGHT S.W.J., SHEWRY P.R. ve MIFLIN B.J. (1978-b). Aspartate kinase and the synthesis of aspartate-derived amino acids in wheat. *Planta*. 139:119-125.

BRIGHT S.W.J., FEATHERSTONE L.C. ve MIFLIN B.J. (1979). Lysine metabolism in a barley mutant resistant to S(2-aminoethyl) cysteine. *Planta*. 146: 629-633.

BRIGHT S.W.J., KUEH J.S.H., FRANKLIN J., ROGNES S.E. ve MIFLIN B.J. (1982). Two genes for threonine accumulation in barley seeds. *Nature*. 299:278-279.

BRIGHT S.W.J., KUEH J.S.H. ve ROGNES S.E. (1983). Lysine transport in two barley mutants with altered uptake of basic amino acids in the root. *Plant Physiol.* 72:821-824.

BUCHHOLZ C. (1962). Zellen, Gewebe und Organe von Pflanzen bei Phosphormangel. Dissertation. Berlin, 1962.

CATTOIR - REYNAERTS A., DEGRYSE E., NEGRUTIU I., AERTS M. ve JACOBS M. (1981). Effects of aspartate-derived amino acids on growth of barley and *Arabidopsis* plants and callus. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 101: 67-74.

CHALEFF R.S. (1983). Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. *Science.* 219:676-682.

CHALEFF R.S. ve CARLSON P.S. (1974). *In vitro* selection for mutants of higher plants. Genetic Manipulation with Plant Material. s. 351-363. Ed: L.Ledoux Plenum Press, New York.

CHENG T.Y. ve SMITH H. (1975). Organogenesis from callus of *Hordeum vulgare*. *Planta.* 123:307-310.

DIEDRICK T.J., FRISCH D.A. ve GENGENBACH B.G. (1990). Tissue culture isolation of a second mutant locus for increased threonine accumulation in maize. *Theor. Appl. Genet.* 79:209-215.

GAO M., CHENG Z. ve LIANG Z. (1991). Effect of *in vitro* mutagenesis on the frequency of somaclonal variation in wheat. *Cereal Research Communications.* 19 (1-2): 77-89.

GAPANENKO A.K., PETROVA T.F., ISKAKOV A.R. ve SOZINOV A.A. (1988). Cytogenetics of *in vitro* cultured somatic cells and regenerated plants of barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet. 75: 905-911.

GOLDSTEIN C.S. ve KRONSTAD W.E. (1986). Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare*. Theor. Appl. Genet. 71:631-636.

GÖZÜKIRMIZI N. ve ARI Ş. (1988). NATO-TU- Biotechnology Progress Report. August 1987 -October 1988. s.22-29.

GÖZÜKIRMIZI N., ARI Ş., ORALER G., OKATAN Y. ve ÜNSAL N. (1990). Callus induction, plant regeneration and chromosomal variations in barley. Acta Bot. Neerl. 39 (4):379-387.

GRANDBASTIEN M.A., BOURGIN J.P., CABOCHE M. (1985). Valine-resistance, a potential marker in plant cell genetics. II. Optimization of UV mutagenesis and selection of valine-resistant colonies derived from tobacco mesophyll protoplasts. Genetics. 109:409-425.

GREEN C.E. (1982). Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture. Variability in Plants Regenerated from Tissue Culture. s. 188-201. Ed: E.D. Earle ve Y. Demarly Preager Publishers, New York.

GREEN C.E. ve DONOVAN C.M. (1980). Effect of aspartate-derived amino acids and aminoethyl cysteine on growth of excised mature embryos of maize. Crop Science. 20:258-362.

HANZEL J.J., MILLER J.P., BRINKMAN M.A. ve FENDOS E. (1985). Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Science*. 25:27-31.

HARMS C.T., OERTLI J.J. ve WIDHOLM J.M. (1982). Characterization of amino acid analogue resistant somatic hybrid cell lines of *Daucus carota* L.Z. *Pflanzenphysiol. Bd.* 106:239-249.

HIBBERD K.A., WALTER T., GREEN C.E. ve GENGENBACH B.G. (1980). Selection and characterization of a feedback-insensitive tissue culture of maize. *Planta*.148:183-187.

JACOBS M., NEGRUTIU I., DIRKS R. ve CAMMAERTS D. (1987). Selection programmes for isolation and analysis of mutants in plant cell cultures. Proceedings of the VI th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. August 3-8, 1986, Minnesota, s. 243-264.

JANSEN C.E., SNEL E.A.M., AKERBOOM M.J.E., NIJKAMP H.J.J. ve HILLE J. (1990). Induction of streptomycin resistance in the wild tomato *Lycopersicon peruvianum*. *Mol. Gen. Genet.* 220: 261-268.

JORGENSEN R.B. ve ANDERSEN B. (1989). Karyotype analysis of regenerated plants from callus cultures of interspecific hybrids of cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 77:343-351.

JORGENSEN R.B., JENSEN C.J., ANDERSEN B. ve VON BOTHMER R. (1986). High capacity of plant regeneration from callus of interspecific hybrids with cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 6: 199-207.

KATOH Y., HASEGAWA T., SUZUKI T. ve FUJII T. (1986). Plant regeneration from the callus derived from mature embryos of hiproly barley, *Hordeum distichum* L. Agric. Biol. Chem. 50 (3): 761-762.

KING G.S. (1949). Direct and trasmitted X-ray effect on growth of tobacco callus *in vitro*. Am. J. Bot. 36: 265-270.

KINOSHITA T. ve MORI K. (1991). Somaclonal selection of physiological mutants through rice cell culture. Cereal Research Communications. 19 (1-2): 131-146.

KLEINHOF S. ve WARNER R.L. (1974). Temperature-sensitive mutants in *Hordeum vulgare* L. Crop Science. 14: 268-271.

KOBLITZ H. (1986). Barley (*Hordeum vulgare* L.): establishment of cultures and the regeneration of plants. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 2 Crops I. s.181-203. Ed: Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

KOTHARI S.L. ve CHANDRA N. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration from seed callus of barley (*Hordeum vulgare* L.). Current Science. 57 (24): 1351-1352.

KOTT L.S. ve KASHA K.J. (1984). Initiation and morphological development of somatic embryoids from barley cell cultures. Can. J. Bot. 62: 1245-1249.

KOTT L.S., FLACK S. ve KASHA K.J. (1986). A comparative study of initiation and development of embryogenic callus from haploid embryos of several barley cultivars. II. Cytophotometry of embryos and callus. Can. J. Bot. 64: 2107-2112.

LARKIN P.J. ve SCOWCROFT W.R. (1981). Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.

LARKIN P.J., RYAN S.A., BRETTELL R.I.S. ve SCOWCROFT W.R. (1984). Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 67: 443-455.

LEE M. (1988). The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 413-437.

LONG T.J. ve HABER A.H. (1965). Growth of embryos on synthetic media after excision from gamma-irradiated (525 kr) and unirradiated wheat grains. *Radiation Botany.* 5: 223-231.

LUPOTTO E. (1984). Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos. *Annals of Botany.* 54: 523-529.

LÜHRS R. ve LÖRZ H. (1987). Plant regeneration *in vitro* from embryogenic cultures of spring - and winter - type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 75: 16-25.

MALIGA P. (1984). Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 519-542.

MATTHEWS B.F. ve WIDHOLM J.M. (1978). Regulation of lysine and threonine synthesis in carrot cell suspension cultures and whole carrot roots. *Planta.* 141: 315-321.

MATTHEWS B.F., SHYE S.C.H. ve WIDHOLM J.M. (1980). Mechanism of resistance of a selected carrot cell suspension culture to S (2-aminoethyl)- L- cysteine. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 96: 453-463.

MIAO S., DUNCAN D.R. ve WIDHOLM J. (1988). Selection of regenerable maize callus cultures resistant to 5 - methyl - DL - tryptophan, S-2-aminoethyl-L-cysteine and high levels of L-lysine plus L-threonine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 14: 3-14.

MIN S., XIONG Z., QI X. ve ZHAO Ch. (1991). Effects of gamma-ray radiation treatment on somatic cell culture in rice, *Oryza sativa* L. *Cereal Research Communications*. 19 (1-2): 201-208.

MOH C.C. ve WITHROW R.B. (1959). Nonionizing radiant energy as an agent in altering the incidence of X-ray-induced chromatid aberrations. *Radiation Research*. 10: 13-19.

MURASHIGE T. ve SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.

NEGRUTIU I., JACOBS M. ve CABOCHE M. (1984). Advances in somatic cell genetics of higher plants-the protoplast approach in basic studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. *Theor. Appl. Genet*. 67: 289-304.

NOVAK F.J., DASKALOV S., BRUNNER H., NESTICKY M., AFZA R., DOLEZELOVA M., LUCRETTI S., HERICHOVA A. ve HERMELIN T. (1988). Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture techniques. *Plant Breeding*. 101: 66-79.

OLGUN A. (1985). Effects of X and gamma rays on the mitotic cell division and the protein content at the root tips of *Hordeum vulgare* L. *İstanbul Üniv. Fen Fak. Mec. Seri B*.50: 45-59.

OLSEN F.L. (1987). Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Res. Commun.* 52: 393-404.

ORTON T.J. (1980). Chromosomal variability in tissue cultures and regenerated plants of *Hordeum*. *Theor. Appl. Genet.* 56: 101-112.

PHILLIPS R.L., KAEPLER S.M. ve PESCHKE V.M. (1990). Do we understand somaclonal variation? *Proceedings of the VII th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture.* Amsterdam, The Netherland, June 24-29, s. 131-141.

PICKERING R.A. (1989). Plant regeneration and variants from calli derived from immature embryos of diploid barley (*Hordeum vulgare* L.) and *H. vulgare* L. x *H. bulbosum* L. crosses. *Theor. Appl. Genet.* 78:105-112.

REDEI, G.P. (1974). Induction of auxotrophic mutations in plants. *Genetic Manipulation with Plant Material.* s. 329-349 Ed: L. Ledaux. Plenum Press, New York.

RENGEL Z. (1987). Embryogenic callus induction and plant regeneration from cultured *Hordeum vulgare* mature embryos. *Plant Physiol. Biochem.* 25(1):43-48.

RENGEL Z. ve JELASKA S. (1986). Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling tissues of *Hordeum vulgare* L. *J. Plant Physiol.* 124:385-392.

ROGNES S.E., BRIGHT S.W.J. ve MIFLIN B.J. (1983). Feedback-insensitive aspartate kinase isoenzymes in barley mutants resistant to lysine plus threonine. *Planta*. 157:32-38.

RUIZ M.L. ve VAZQUEZ A.M. (1981). Cell population evolution in tissue cultures from embryo barley (*Hordeum vulgare* L.) after caffeine treatment. *Protoplasma*. 107:13-20.

RUIZ M.L. ve VAZQUEZ A.M. (1982). Chromosome number evolution in stem derived calluses of *Hordeum vulgare* L. cultured *in vitro*. *Protoplasma*. 111: 83-86.

SAWICKA E.J., RYBCZYNSKI J.J. ve MOLSKI B. (1991). Mutation induction in rye (*Secale cereale* L.). *Cereal Research Communications*. 19 (1-2): 209-218.

SHAMA RAO H.K. ve NARAYANASWAMY S. (1976). Anatomical anomalies in tissue culture-induced roots of *Cajanus cajan* L. Mills. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad. Part. B. Biol. Sci.* 93 (5): 207-209.

SHERIDAN WM.F. (1974). Plant regeneration and chromosome stability in tissue cultures. Genetic Manipulation with Plant Material. s. 263-295. Ed: L. Ledoux. Plenum Press, New York.

SIGURBJORNSSON B. (1991). Proceedings of the Second FAO/IAEA Research Coordination Meeting on Use of Induced Mutations in Connection with Haploids and Heterosis in Cereals. Foreword. *Cereal Research Communications*. 19 (1-2): 7-8.

SINGH R.J. (1986). Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor Appl. Genet. 72: 710-716.

SUNG Z.R. ve JACQUES S. (1980). 5-Fluorouracil resistance in carrot cell cultures. Planta. 148: 389-396.

THOMAS M.R. ve SCOTT K.J. (1985). Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature embryos and immature inflorescences of *Hordeum vulgare*. J. Plant Physiol. 121: 159-169.

UKAI Y. (1968). Studies on varietal differences in radiosensitivity in rice. III. Radiosensitivities with respect to the reduction in the number of dividing cells and the occurrence of chromosome bridges. Japan J. Breed. 18: 221-228.

UKAI Y. (1988). Effect of gamma-ray irradiation on growth of calli derived from mature embryos or seeds in barley. Japan J. Breed. 38: 292-300.

UKAI Y. ve NISHIMURA S. (1987). Regeneration of plants from calli derived from seeds and mature embryos in barley. Japan J. Breed. 37: 405-411.

ULLRICH S.E., EDMISTON J.M., KLEINHOF S. A., KUDRNA D.A. ve MAATOUGUI M.E.H. (1991). Evaluation of somaclonal variation in barley. Cereal Research Communications. 19 (1-2): 245-260.

VASIL I.K., (1987). Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *J.Plant Physiol.* 128: 193-218.

VASIL I.K. (1988). Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/technology.* 6: 397-402.

VASIL I.K. and VASIL V. (1986). Regeneration in cereal and other grass species. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.3 Plant Regeneration and Genetic Variability. s. 121-150. Ed: I.K .Vasil. Academic Press, New York.

VASIL V. ve VASIL I.K. (1981). Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum*, and *P.americanum* x *P.purpureum* hybrid. *Amer.J.Bot.* 68(6):864-872.

VASIL V. ve VASIL I.K. (1986). Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of Gramineae. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.1 Laboratory Procedures and Their Applications. s. 36-42. Ed: I.K. Vasil. Academic Press, New York.

WANGENHEIM K.-H.V. (1975). A major component of the radiation effect: interference with endocellular control of cell proliferation and differentiation. *Int.J. Radiat. Biol.* 27 (1): 7-30.

WEI Z.M., KYO M. ve HARADA H. (1986). Callus formation and plant regeneration through direct culture of isolated pollen of *Hordeum vulgare* cv. "Sabarlis". *Theor. Appl. Genet.* 72: 252-255.

WEIGEL R.C. ve HUGHES K.W. (1985). Long term regeneration by somatic embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) tissue cultures derived from apical meristem explants. *Plant Cell, Tissue, Organ Culture*. 5: 151-162.

WIDHOLM J.M. (1972). Anthranilate synthetase from 5-methyltryptophan-susceptible and-resistant cultured *Daucus carota* cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 279:48-57.

WOLSKI T., POMAJ M.S. ve SAWICKA E.J. (1991). Evaluation of short *Triticale* mutants for hybrid breeding. *Cereal Research Communications*. 19 (1-2): 261-266.

ZAPATA F.J., ALDEMITA R.R., TORRIZO L.B., NOVERO A.U., RAINA S.K. ve ROLA R.R. (1986). Anther culture of Basmati 370 at IRRI.A. Gamma-ray induced green plant regeneration. *IRRN* 2(4): 22-23.

KISALTMALAR

MS : Murashige ve Skoog besiyeri

2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

SAEC : S(2 - aminoethyl - L- cysteine)

cGy : santigrey

2,4,5 - T: 2,4,5 - trichlorophenoxyacetic acid

IAA : 1H - indole - 3 - acetic acid

TIBA : 2,3,5 - triiodobenzoate

BA : 6 - benzylaminopurine

ABA : abscisic acid

ANAHTAR KELİMELER

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), Doku kültürü, X ışınları, Gamma ışınları

ÖZGEÇMİŞ

1962 İstanbul doğumluyum. 1979 yılında Lisans eğitimine başladığım İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden Haziran - 1983 tarihinde mezun oldum. Aynı yıl başlamış olduğum İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü'nün Biyoloji Anabilim Dalı'na bağlı 'Biyoteknoloji' Yüksek Lisans Programını, "pH'nin *Schizosaccharomyces pombe*'nin Purin Salgılayan ade 2 Mutantında Üreme ve Salgılama Üzerindeki Etkileri" konulu tezle Eylül-1985 tarihinde tamamladım. Ekim-1985 tarihinde İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü'nün açtığı Moleküler Biyoloji-Genetik Doktora Programına kaydoldum. "Temel ve Uygulamalı Enzimoloji" konulu Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu'na (Çeşme, 1986), "International Course on Plant Biotechnology" konulu ICRO kursu'na (Madrid, 1989) burslu öğrenci olarak, ve "VII th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture" Kongre'sine (Amsterdam, 1990) poster sunusu ile katıldım. Haziran-Eylül, 1990 tarihleri arasında üç ay boyunca TNO-CIVO Enstitüsü'nün Moleküler Bitki Biyoteknolojisi Bölümü'nde "Anter Kültürü" konusunda çalıştım. Doktora eğitimim sırasında NATO-TU-Biotechnology Programına bağlı 1.2.2 No.lu subprojede ve İ.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenen 181-212/31086 No.lu projede yardımcı araştırmacı olarak çalıştım. Yine İ.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenen 389/230289 No.lu "Doktora Projemi" Ekim-1991 tarihinde tamamladım. Aralık-1985 tarihinden itibaren İ.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.