

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI YEREL KAVUZLU BUĞDAY TÜRLERİNDE FARKLI 2,4-D ve PİCLORAM
DOZLARININ KALLUS OLUŞUMUNA ve KROMOZOM YAPISINA ETKİSİ

Duygu Ege Tuna

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. A. Murat Özgen

Ocak

2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Duygu Ege Tuna

ONAY

Prof. Dr. A. Murat Özgen danışmanlığında Duygu Ege Tuna tarafından hazırlanan bu çalışma 20.01.2015 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. (Prof.) A. Murat ÖZGEN

İmza:

Üye: Doç. Dr. (Assoc. Prof.) Melahat AVCI BİRSİN

İmza:

Üye: Doç. Dr. (Assoc. Prof.) Sertaç ÖNDE

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Bazı Yerel Kavuzlu Buğday Türlerinde Farklı 2,4-D ve Picloram Dozlarının Kallus Oluşumuna ve Kromozom Yapısına Etkisi

Duygu Ege Tuna

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. A. Murat Özgen

Bu araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Bitki materyali olarak; Türkiye'de doğal olarak yetişen ve önemli birer gen kaynağı olan *Triticum monoccocum* L. ve *Triticum dicocum* Schulb. yerel kavuzlu buğday türlerinin olgunlaşmış embriyoları kullanılmıştır. Doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan sentetik oksinlerden 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve picloramın farklı dozlarında (0, 3, 6, 9 ve 12 mg/l) olgun embriyoların doku kültürü parametrelerine olan tepkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Kök uçlarından alınan örnekler feulgen boya kullanılarak boyanıp sitolojik çalışma yapılmıştır. Uygulanan bu oksinlerin kromozom yapısı ve sayısında herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığı araştırılmıştır.

Elde edilen verilere göre, *T. monoccocum*'da en iyi kallus gelişimi 6 mg/l picloram ve 3 mg/l 2,4-D içeren ortamlardan, *T. dicocum*'da ise en iyi kallus gelişimi 3 mg/l picloram ve 3 mg/l 2,4-D içeren ortamlardan elde edilmiştir. Yapılan sitolojik çalışmalar sonucunda herhangi bir kromozomal anormalliğe rastlanmamıştır.

2015, 84 sayfa

Anahtar kelimeler: *Triticum monoccocum*, *Triticum dicocum*, yerel kavuzlu buğday, kallus oluşumu, 2,4-D, picloram.

ABSTRACT

MSc Thesis

The Effect of Different 2,4-D and Picloram Doses on Callus Induction and Chromosome Structure in Some Local Hulled Wheat Varieties

Duygu Ege Tuna

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. A. Murat Özgen

This study was carried out in Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, Biotechnology Laboratory. As plant material, mature embryos of local hulled wheat varieties *Triticum monoccocum* L. and *Triticum dicoccum* Schulb. that are naturally grown in Turkey which possess an important genetic resource were used. Responses of mature embryos to tissue culture parameters in different doses of synthetic auxins 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and picloram (0, 3, 6, 9 ve 12 mg/l) which are widely used in tissue culture studies were investigated comparatively. The samples from root tips were stained with feulgen for the cytological studies. The applications of 2,4-D and picloram were searched whether they caused any chromosomal abnormalities.

According to the data, best callus induction was obtained for *T. monoccocum* when the media was supplemented with 6 mg/l picloram and 3 mg/l 2,4-D, whereas best callus induction for *T. dicoccum* was achieved when the media was supplemented with 3 mg/l picloram and 3 mg/l 2,4-D. The result of cytological studies demonstrated that no chromosomal abnormalities were observed.

2015, 84 pages

Keywords: *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum*, hulled local wheat, callus induction, 2,4-D, picloram.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, çalışmalarım için araştırma olanağı sağlayan, disiplinli çalışmayı öğreten değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca hem bilgisiyle, hem de değerli görüşleriyle bana destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Melahat AVCI BİRSİN'e ;

“Yurtiçi Yüksek Lisans Burs”u vererek tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK'a,

Laboratuvar çalışmalarım esnasında bana çok yardımcı olan, değerli arkadaşım Araş. Gör. Berk BENLİOĞLU'na ;

Hayatımın her aşamasında beni sonsuz destekleyen annem Yurdagül TUNA, babam M. Ergün TUNA ve ağabeyim Ozan Doğu TUNA'ya çok teşekkür ederim. Beni her zaman sabırla dinleyen, hep yanımda olan dostlarım Sertaç DÖNMEZ ve Nil KRİSTAL'e çok teşekkür ederim.

Duygu Ege Tuna

ANKARA, Ocak 2015

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ii
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
SİMGELER DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. BUĞDAY BİTKİSİ VE ÖNEMİ	3
2.1.1. BUĞDAY YETİŞTİRİCİLİĞİ	5
2.1.2. BUĞDAYIN TAKSONOMİSİ VE EVRİMİ	5
2.1.3. KAVUZLU BUĞDAY TÜRLERİNDEN TRITICUM MONOCOCCUM VE TRITICUM DICOCCUM'UN ÖZELLİKLERİ	8
2.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	12
2.3. BİTKİ SİTOGENETİĞİ ÇALIŞMALARI	24
3. GEREKÇE VE AMAÇ	29
4. MATERYAL VE YÖNTEM	33
4.1. MATERYAL	33
4.2. YÖNTEM	34
4.2.1. IN VITRO YÖNTEMLER.....	34
4.2.1.1 KULLANILAN EKİPMANLARIN STERİLİZASYONU.....	35
4.2.1.2. STERİL DİSTİLE SU HAZIRLANMASI.....	35
4.2.1.3. STOK 2,4-D VE PICLORAM ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI	35
4.2.1.4. BESİN ORTAMLARININ HAZIRLANMASI	36
4.2.1.5. EKSPANTLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU	37
4.2.1.6. KALLUS OLUŞUMU AŞAMASI	38
4.2.1.7. KALLUS GELİŞİMİ AŞAMASI	38
4.2.1.8. REJENERASYON AŞAMASI	38
4.2.2. SİTOLOJİK YÖNTEM	39
4.2.2.1. PREFİKSASYON AŞAMASI	40
4.2.2.2. FİKSASYON AŞAMASI	40
4.2.2.3. HİDROLİZ AŞAMASI	40
4.2.2.4. BOYAMA AŞAMASI	41
4.2.2.4.1. FEULGEN BOYASININ HAZIRLANMASI.....	41
4.2.2.5. PREPARATLARIN HAZIRLANMASI VE MİKROSKOPTA İNCELENMESİ	41
4.2.3. VERİLERİN ELDE EDİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ.....	42

5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	43
5.1. TRİTİCUM MONOCOCCUM ÇEŞİDİNİN FARKLI 2,4-D VE PICLORAM DOZLARINDA IN VITRO PARAMETRELERE OLAN TEPKİSİ	43
5.1.1. FARKLI DOZLARDA 2,4-D VE PICLORAM UYGULANAN TRİTİCUM MONOCOCCUM'DA KALLUS OLUŞTURMA ORANI	43
5.1.2. FARKLI DOZLARDA 2,4-D VE PICLORAM UYGULANAN TRİTİCUM MONOCOCCUM'DA KALLUS AĞIRLIĞI.....	45
5.1.3. FARKLI DOZLARDA 2,4-D VE PICLORAM UYGULANAN TRİTİCUM MONOCOCCUM'DA REJENERASYON KAPASİTESİ	46
5.1.4. FARKLI DOZLARDA 2,4-D VE PICLORAM UYGULANAN TRİTİCUM MONOCOCCUM'DA KÜLTÜR ETKİNLİĞİ....	48
5.2. TRİTİCUM DICOCCUM ÇEŞİDİNİN FARKLI 2,4-D VE PICLORAM DOZLARINDA IN VITRO PARAMETRELERE OLAN TEPKİSİ.....	49
5.2.1. FARKLI DOZLARDA 2,4-D VE PICLORAM UYGULANAN TRİTİCUM DICOCCUM'DA KALLUS OLUŞTURMA ORANI	50
5.2.2. FARKLI DOZLARDA 2,4-D VE PICLORAM UYGULANAN TRİTİCUM DICOCCUM'DA KALLUS AĞIRLIĞI	51
5.2.3. FARKLI DOZLARDA 2,4-D VE PICLORAM UYGULANAN TRİTİCUM DICOCCUM'DA REJENERASYON KAPASİTESİ	53
5.2.4. FARKLI DOZLARDA 2,4-D VE PICLORAM UYGULANAN TRİTİCUM DICOCCUM'DA KÜLTÜR ETKİNLİĞİ	55
5.3. FARKLI DOZLARDA 2,4-D VE PICLORAM UYGULANAN TRİTİCUM MONOCOCCUM VE TRİTİCUM DICOCCUM ÇEŞİTLERİNE İLİŞKİN SİTOLOJİK ÇALIŞMALAR	66
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	72
6.1. TARTIŞMA	72
6.2. SONUÇ.....	73
KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Buğday tanesinin yapısı	4
Şekil 2.2. Buğdayın evrimi	7
Şekil 2.3. <i>Triticum boeoticum</i> 'un gen merkezleri	10
Şekil 2.4. <i>Triticum dicoccoides</i> 'in gen merkezleri	11
Şekil 2.5. Sentromerin yerleşim bölgesine bağlı farklı kromozom tipleri	25
Şekil 5.1. <i>Triticum monococcum</i> 'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarında kallus oluşturma oranı	45
Şekil 5.2. <i>Triticum monococcum</i> 'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarında elde edilen kallus ağırlıkları	46
Şekil 5.3. <i>Triticum monococcum</i> 'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarına bağlı rejenerasyon kapasitesi	48
Şekil 5.4. <i>Triticum monococcum</i> 'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarına bağlı kültür etkinliği	49
Şekil 5.5. <i>Triticum dicoccum</i> 'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarında kallus oluşturma oranı	51
Şekil 5.6. <i>Triticum dicoccum</i> 'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarında elde edilen kallus ağırlıkları	53
Şekil 5.7. <i>Triticum dicoccum</i> 'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarına bağlı rejenerasyon kapasitesi	55
Şekil 5.8. <i>Triticum dicoccum</i> 'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarına bağlı kültür etkinliği	57
Şekil 5.9. <i>Triticum monococcum</i> 'un 14 gün sonunda farklı 2,4-D dozları içeren ortamlarda kallus gelişimi	58
Şekil 5.10. <i>Triticum monococcum</i> 'un 14 gün sonunda farklı picloram dozları içeren ortamlarda kallus gelişimi	59
Şekil 5.11. <i>Triticum dicoccum</i> 'un 14 gün sonunda farklı 2,4-D dozları içeren ortamlarda kallus gelişimi	60
Şekil 5.12. <i>Triticum dicoccum</i> 'un 14 gün sonunda farklı picloram dozları içeren ortamlarda kallus gelişimi	61
Şekil 5.13. <i>Triticum monococcum</i> 'un 30 gün sonunda farklı 2,4-D dozları içeren ortamlarda rejenerasyonu	62
Şekil 5.14. <i>Triticum dicoccum</i> 'un 30 gün sonunda farklı 2,4-D dozları içeren ortamlarda rejenerasyonu	63
Şekil 5.15. <i>Triticum monococcum</i> 'un 30 gün sonunda farklı picloram dozları içeren ortamlarda rejenerasyonu	64
Şekil 5.16. <i>Triticum dicoccum</i> 'un 30 gün sonunda farklı picloram dozları içeren ortamlarda rejenerasyonu	65
Şekil 5.17. Kontrol dozunda (0 mg/l)kültüre alınan <i>Triticum monococcum</i>	67
Şekil 5.18. Kontrol dozunda (0 mg/l) kültüre alınan <i>Triticum dicoccum</i>	67
Şekil 5.19. 3 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan <i>Triticum monococcum</i>	67
Şekil 5.20. 3 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan <i>Triticum dicoccum</i>	68
Şekil 5.21. 6 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan <i>Triticum monococcum</i>	68
Şekil 5.22. 6 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan <i>Triticum dicoccum</i>	68
Şekil 5.23. 9 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan <i>Triticum monococcum</i>	69
Şekil 5.24. 9 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan <i>Triticum dicoccum</i>	69
Şekil 5.25. 3 mg/l picloram dozunda kültüre alınan <i>Triticum monococcum</i>	69
Şekil 5.26. 3 mg/l picloram dozunda kültüre alınan <i>Triticum dicoccum</i>	70
Şekil 5.27. 6 mg/l picloram dozunda kültüre alınan <i>Triticum monococcum</i>	70
Şekil 5.28. 6 mg/l picloram dozunda kültüre alınan <i>Triticum dicoccum</i>	70
Şekil 5.29. 9 mg/l picloram dozunda kültüre alınan <i>Triticum monococcum</i>	71
Şekil 5.30. 9 mg/l picloram dozunda kültüre alınan <i>Triticum dicoccum</i>	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. 2012 Yılı Kıtalar Bakımından Buğdayın Ekiliş Üretim ve Verim Değerleri	3
Çizelge 2.2. Kromozom sayılarına göre buğday türleri ve genomları	6
Çizelge 5.1. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın <i>Triticum monococcum</i> 'un olgun embriyolarının kallus oluşumuna olan etkisine ait varyans analiz sonuçları	44
Çizelge 5.2. <i>Triticum monococcum</i> 'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kallus oluşumuna olan etkisine ilişkin AÖF testi	44
Çizelge 5.3. Farklı dozlardaki 2,4 ve picloramın <i>Triticum monococcum</i> 'un olgun embriyolarının kallus ağırlığına olan etkisine ait varyans analiz sonuçları	45
Çizelge 5.4. <i>Triticum monococcum</i> 'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kallus ağırlığına olan etkisine ilişkin AÖF testi	46
Çizelge 5.5. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın <i>Triticum monococcum</i> 'un olgun embriyolarının rejenerasyon kapasitesine olan etkisine ait varyans analiz sonuçları	47
Çizelge 5.6. <i>Triticum monococcum</i> 'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın rejenerasyon kapasitesine olan etkisine ilişkin AÖF testi	47
Çizelge 5.7. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın <i>Triticum monococcum</i> 'un olgun embriyolarının kültür etkisine olan etkisine ait varyans analizi sonuçları	48
Çizelge 5.8. <i>Triticum monococcum</i> 'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kültür etkisine olan etkisine ilişkin AÖF testi	49
Çizelge 5.9. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın <i>Triticum dicoccum</i> 'un olgun embriyolarının kallus oluşumuna olan etkisine ait varyans analizi sonuçları	50
Çizelge 5.10. <i>Triticum dicoccum</i> 'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kallus oluşumuna olan etkisine ilişkin AÖF testi	51
Çizelge 5.11. Farklı dozlardaki 2,4 ve picloramın <i>Triticum dicoccum</i> 'un olgun embriyolarının kallus ağırlığına olan etkisine ait varyans analiz sonuçları	52
Çizelge 5.12. <i>Triticum dicoccum</i> 'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kallus ağırlığına olan etkisine ilişkin AÖF testi	52
Çizelge 5.13. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın <i>Triticum dicoccum</i> 'un olgun embriyolarının rejenerasyon kapasitesine olan etkisine ait varyans analiz sonuçları	54
Çizelge 5.14. <i>Triticum dicoccum</i> 'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın rejenerasyon kapasitesine olan etkisine ilişkin AÖF testi	54
Çizelge 5.15. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın <i>Triticum dicoccum</i> 'un olgun embriyolarının kültür etkisine olan etkisine ait varyans analizi sonuçları	56
Çizelge 5.16. <i>Triticum dicoccum</i> 'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kültür etkisine olan etkisine ilişkin AÖF testi	56

SİMGELER DİZİNİ

ABA	Absisik asit
ABD	Amerika Birleşik Devleti
AgNO ₃	Gümüş nitrat
AFLP	Amplifiye edilmiş parça uzunluk polimorfizmi
AÖF	Asgari önem farkı
BAP	6-benzil amino pürin
B ₅	Gamborg B ₅ besiyeri
CH ₃ -COOH	Glasiyel asetik asit
cm	Santimetre
da	Dekar
dicamba	3,-6-dikloro-o-anisik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAO	Dünya Tarım Örgütü
g	Gram
ha	Hektar
HCl	Hidroklorik asit
Hg	Civa
IAA	İndolasetik asit
IBA	İndolbütirik asit
K ₂ S ₂ O ₅	Potasyum metabisülfid
KDD	Kardeş kromatit değişimleri
kg	Kilogram
l	Litre
LS	Laktoz sülfid besiyeri
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M.Ö.	Milattan önce
MS	Murashige ve Skoog besiyeri
MS-0	Hormonsuz Murashige ve Skoog besiyeri
N	Normal
N ₆	Hekzazin

NAA	Naftelenasetik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
pg	Pikogram
PAA	Fenilasetikasit
Picloram	4-amino-3,5,6-trikloro-2-piridinkarboksilik asit
ppm	Parts per million
psi	Pounds per inch square
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
TDZ	Tidiazuron
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
v	Hacim
2-MCPP	2-(2Metil-4klorofenoksi) propiyonik asit
2,4-D	2,4-diklorofenoksiasetik asit
2,4,5-T	2,4,5-triklorofenoksiasetik asit
2,4,5-TP	2-2,4,5-triklorofenoksi propiyonik asit
4-CPA	4-klorofenoksipropionamid
°C	Santigrat derece
µm	Mikrometre
µM	Mikromol
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ

2030 yılı itibariyle 9 milyarı geçmesi beklenen Dünya nüfusu hızla artmakta olup, mevcut beslenme sorununun da artması beklenmektedir.

Günümüzde ekim yapılan tarım alanları son sınırlarına ulaşmıştır. Sınırlı üretim kaynaklarından, tüketim gereksinimlerinin artan nüfusa karşı yararlanma olanakları gittikçe azalmaktadır. Buna karşın birim alandan elde edilen verim ve kalite öğelerinin artırılması amaçlanmaktadır. Aynı zamanda biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı çeşitlerin ıslahı ve uygun yetiştirme tekniklerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Buğday; insan ve hayvanlar için temel besin kaynağı olan, dünyada en çok ekilen serin iklim tahılı olma özelliğine sahip olan önemli bir bitkidir. Buğday ekonomik, stratejik ve besin değeri özellikleri ile üzerinde çok sayıda araştırma yapılmakta olan bitkilerden biridir. (1)

Buğday bitkisinin evriminde rol alan çeşitli kavuzlu yabancı türler, çeşitli stres faktörlerine dayanıklılık gibi üstün özellikleri sebebiyle iyi bir genetik kaynak oluşturmaktadır. Son yıllarda buğday bitkisinin yabancı türlerinden yararlanma olanakları araştırılmaktadır.

Tarımsal üretimi olumsuz etkileyen en önemli faktörlerden olan hastalık ve zararlılar nedeniyle ortaya çıkan ürün kayıpları yüksek maliyetli kimyasal ilaçlarla önlenmeye çalışılmış, ancak kullanılan kimyasal maddelerin kalıntıları gerek üründe, gerekse toprakta uzun süre ayrışmadan kalabildiğinden; insan, hayvan ve çevre sağlığını önemli ölçüde tehdit etmeye başlamıştır. (2)

Tarımda yüksek verim ve kalite artışında, dayanıklılık ıslahında klasik ıslah yöntemlerinin yanı sıra artık modern biyoteknolojik tekniklerden de yararlanılmaktadır. Günümüzde verim artışı sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen yeni moleküler ve biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla; kısırılık, uyumsuzluk, bağlılık nedeniyle istenmeyen genlerin geçişi, fazla zaman alması gibi sorunlar ortadan kalkmaktadır. (3)

Biyoteknolojik yöntemlerin, geleneksel yetiştirme yöntemleriyle birlikte kullanılması ile birçok bitkide, daha verimli ve kaliteli çeşitler geliştirilmiştir. (4) Bitkilere biyoteknolojik yöntemlerle yeni özellikler kazandırılmasında, çoğaltılmasında kullanılan laboratuvar çalışmalarının ilk aşaması bitki doku kültürü uygulamalarıdır. Doku kültürü teknikleri öncelikli olarak araştırma amacıyla yapılmakla birlikte; sonraki adımlarda başarılı çoğaltma metotları geliştirildikten sonra ticari üretimde kullanılmaktadır. (5)

Biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklılık genellikle birden fazla gen tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle klasik yöntemler bu genlerin belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Ancak bu alanda gerek ulusal gerekse ıslah kuruluşlarında, önemli miktarda bitki gen bankaları oluşturulmuş ve klasik ıslah konusunda önemli deneyimler kazanılmıştır. Biyoteknolojik yöntemlerle klasik ıslah yöntemleri birleştirilerek, stres faktörlerine dayanıklı bitki ıslahına yeni bir boyut kazandırılmıştır.

Hızla artan dünya nüfusunun yeterli ve dengeli beslenme ihtiyacını karşılamak amacıyla, biyoteknoloji ve genetik mühendisliği gibi modern teknolojiler tarımsal üretimi artırma şansı sağlamaktadır. Türkiye zengin gen kaynaklarına sahip bir ülkedir ve ülkemizin mevcut gen kaynaklarının biyoteknoloji ile birlikte doğru kullanımı tarımsal üretimi artırma konusunda başarı sağlayacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Buğday Bitkisi ve Önemi

Dünyanın hemen hemen her yerinde yetiştirilen buğday; hem dünyada hem de ülkemizde en fazla üretilen tarım ürünüdür. Bu nedenle, dünyadaki birçok ülkenin temel besin kaynağını oluşturur.

FAO ("Food and Agriculture Organization"- Gıda ve Tarım Örgütü) (2012) verilerine göre buğdayın; dünyada yaklaşık 216.6 milyon ha alanda ekimi, 674.8 milyon ton üretimi ve 311.5 kg/da ortalama verimi bulunmaktadır. Ülkemizde ise yaklaşık 7.5 milyon ha ekimi, 20.1 milyon ton üretimi ve 266.9 kg/da verimi bulunmaktadır. Asya yaklaşık 314.5 milyon ton üretimi ile buğday üretiminde en üst sırada yer alırken, Avrupa 195.3 milyon ton ile Asya'yı takip etmektedir. Amerika yaklaşık 110.4 milyon ton buğday üretimi ile 3. sırada yer almaktadır .(6)

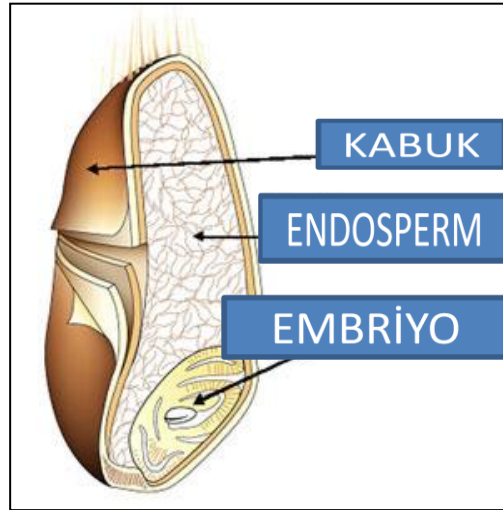
Çizelge 2.1. 2012 Yılı Kıtalar Bakımından Buğdayın Ekiliş Üretim ve Verim Değerleri (7)

Kıtalar	Ekiliş (1000 ha)	Üretim (1000 ton)	Verim (kg/da)
Afrika	10,127,6	24,073,5	237,7
Amerika	36,676,7	110,470,2	301,2
Asya	101,861,3	314,565,1	308,8
Avrupa	54,016,1	195,381,8	361,7
Okyanusya	13,956,9	30,393,6	217,7
Dünya	216,638,7	674,884,3	311,5

Buğday; un ve yem sanayisinde kullanılmakta olup, insan ve hayvan için çok önemli bir besin kaynağıdır. Makarna, ekmek, bulgur, irmik, bisküvi gibi gıdaların ana maddesini oluşturmaktadır. Buğdayın hasatından sonra geriye kalan sapları ve kepeği hayvanlar için de yararlı bir yem kaynağı oluşturmaktadır. Ancak yetiştirildiği toprak ve iklim koşullarına göre besin değeri ve kalitesi farklılık göstermektedir. Dolayısıyla yetiştirilme koşulları buğdayın kullanım alanlarını etkilemektedir.

Buğdayın tüketimi gelişmiş ülkelerde az olmasına karşın, Türkiye gibi kişi başına gelir düzeyi yüksek olmayan ülkelerde ekmeğe dolayısı ile buğdaya dayalı beslenme oldukça fazladır. Ülkelerin insan beslenmesinde buğdaya olan bağlılığı, buldukları coğrafi konuma göre değişmektedir. Bazı ülkelerde, günlük kalorisinin %30'dan fazlasını buğday karşılar; bazı ülkelerde bu oran %20'nin altına inebilmektedir. Bu değer Türkiye'de %60 oranına ulaşmaktadır. (8)

Buğday tanesi esas olarak; kabuk, embriyo ve endosperm olmak üzere 3 kısma ayrılmaktadır. Kabuk tanenin %12'sini oluştururken, embriyo %3'ünü, endosperm ise yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır. Tahıl danesinde kabuk; meyve kabuğu (pericarp), tohum kabuğu (testa) ve hialin (nucellar) katlarından oluşur. Tahıllarda tohum (testa) ile meyve kabuğunun (perikarp) yapışık olmasına karyopsis denir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Buğday tanesinin yapısı (9)

Bir buğday tanesi içeriğinde ortalama; %70 karbonhidrat, %12 protein, %2 yağ, %2.2 selüloz, %1.8 kül (madensel maddeler) ve %12 su bulundurmaktadır. Bu oranlar buğdayın yetiştirildiği yerlere göre değişkenlik göstermektedir. Bunlara ek olarak, buğdayın içerdiği protein miktarı da kullanım alanlarını etkilemektedir. Örneğin; protein miktarı %14-17 (çok yüksek) olan buğdaylar temel gluten kaynaklarında kullanılırken, %11-14 protein içeren buğdaylar mayalı ekmek yapımında, %10-12 (orta seviye) proteine sahip olanlar yufka ekmek yapımında ve düşük oranda proteine sahip olanlar bisküvi, kraker, kek ve pasta yapımında kullanılmaktadır. (10) Buğday proteininin % 80'ini gliadin ve glutenin oluşturmaktadır. Bunların yanında buğday tanesi; tiyamin (0.52 mg/100 g), riboflavin (0.12

mg/100 g), niyasin (4.3 mg/100 g) ve diğler aminoasitleri bulundurmasının yanında 330 kalori/100 g içermektedir.

İnsan gıdası olarak kullanılan un, buğdayın endosperminden elde edilmektedir. Kabuk ve embriyo kısmı kepekte kalmaktadır. Ancak embriyo kısmı bazen kepekten ayrılmaktadır. Kepek başta yem sektöründe olmak üzere çeşitli amaçlarla, embriyo ise gıda olarak veya buğday yağı elde edilmesinde kullanılmaktadır.

2.1.1. Buğday Yetiştiriciliği

Buğday bitkisi serin iklim tahılı olup, kışa oldukça dayanıklıdır. Yetiştirme döneminin ilk evrelerinde bol nemli hava ve düşük sıcaklığa gereksinim duymaktadır. Çimlenme ve kardeşlenme sırasında sıcaklığın 5–10°C, nisbi nemin ise %60 civarında olması gerekmektedir. Yıllık yağış isteği 350-1150 mm arasındadır. Ancak kaliteli ve bol ürün, yıllık yağışın 500-600 mm olduğu yerlerden ya da bu nemi sağlayabilecek sulamanın yapıldığı yerlerden alınabilmektedir. (11)

Buğday bitkisinin toprak çeşitliliği konusunda geniş bir adaptasyon yeteneği mevcuttur. Toprak konusunda çok seçici değildir. Genellikle yüksek verimlerin, killi, tınlı-killi, yeterli miktarda fosfor ve kireç bulduran, humusça zengin topraklardan alınmaktadır. Besin maddesi yönünden fakir topraklarda kaplıca çeşitleri, orta şartlarda ekmeklik çeşitleri, en iyi şartlarda da makarnalık çeşitleri ekme daha uygun görülmektedir. (12)

2.1.2. Buğdayın Taksonomisi ve Evrimi

Alem: *Plantae*

Şube: *Magnoliophyta*

Sınıf: *Liliopsida*

Takım: *Poales*

Familya: *Poaceae*

Alt familya: *Poacideae*

Oymak: *Triticeae*

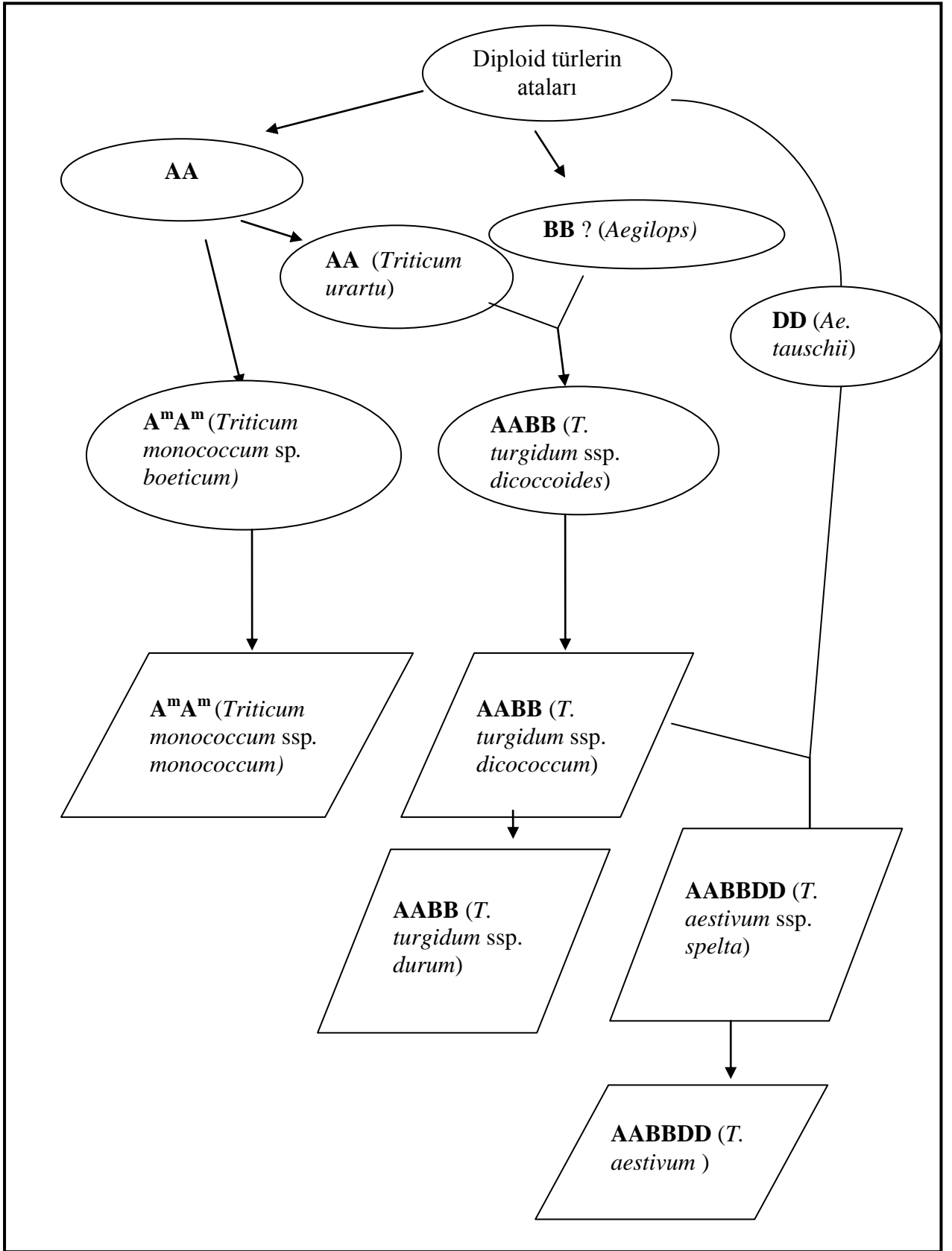
Cins: *Triticum*

Buğdaylar kromozom sayılarına göre 3 farklı sınıfa ayrılmaktadır:

1. Diploid buğdaylar (2n=14)
2. Tetraploid buğdaylar (2n=28)
3. Hekzaploid buğdaylar (2n=42)

Çizelge 2.2. Kromozom sayılarına göre buğday türleri ve genomları (13)

Ploidi seviyesi	Tür	Genom
Diploid	<i>Triticum monococcum</i> L. subsp. <i>aegilopoides</i>	A ^m
Diploid	<i>Triticum urartu</i>	A ^u
Diploid	<i>Triticum monococcum</i> L. subsp. <i>monococcum</i>	A ^m
Tetraploid	<i>Triticum turgidum</i> L. subsp. <i>dicoccoides</i>	BA ^u
Tetraploid	<i>Triticum turgidum</i> L. subsp. <i>dicoccum</i>	BA ^u
Tetraploid	<i>Triticum ispahanicum</i>	BA ^u
Tetraploid	<i>Triticum turgidum</i> L. subsp. <i>paleocolchicum</i>	BA ^u
Tetraploid	<i>Triticum turgidum</i> L. subsp. <i>durum</i>	BA ^u
Tetraploid	<i>Triticum turgidum</i> L. subsp. <i>turgidum</i>	BA ^u
Tetraploid	<i>Triticum turgidum</i> L. subsp. <i>polonicum</i>	BA ^u
Tetraploid	<i>Triticum turgidum</i> L. subsp. <i>turanicum</i>	BA ^u
Tetraploid	<i>Triticum turgidum</i> L. subsp. <i>carthlicum</i>	BA ^u
Tetraploid	<i>Triticum timopheevii</i> Zhuk. subsp. <i>armeniicum</i>	GA ^m
Tetraploid	<i>Triticum timopheevii</i> Zhuk. subsp. <i>timopheevii</i>	GA ^m
Hekzaploid	<i>Triticum aestivum</i> L. subsp. <i>spelta</i>	BA ^u D
Hekzaploid	<i>Triticum aestivum</i> L. subsp. <i>macha</i>	BA ^u D
Hekzaploid	<i>Triticum vavilovii</i>	BA ^u D
Hekzaploid	<i>Triticum aestivum</i> L. subsp. <i>aestivum</i>	BA ^u D
Hekzaploid	<i>Triticum aestivum</i> L. subsp. <i>compactum</i>	BA ^u D
Hekzaploid	<i>Triticum aestivum</i> L. subsp. <i>sphaerococcum</i>	BA ^u D



Şekil 2.2. Buğdayın evrimi (14)

Triticum cinsinde, çeşitli poliploidlerin oluşumu yaklaşık olarak 10.000 yıl önce başlamıştır. Buğday türlerinin temel kromozom sayısının $n=1x=7$ olduğu 1900'lerin başlarından beri bilinmektedir. Kültürü yapılan buğdayların diploid ($2n=2x=14$, AA), tetraploid ($2n=4x=28$, AABB ya da AAGG) ve hekzaploid ($2n=6x=42$, AABBDD) formları mevcuttur. (15) Diploid genomlar (A, B ve D) birbirleriyle evrimsel olarak ilişkilidir ve doğada homolog olarak bulunmaktadır.

A genomunun kökeniyle ilgili yapılmış olan sitogenetik çalışmalar sonucunda iki farklı görüş ortaya konulmuştur. İlk başlarda yapılan çalışmalarda A genomunun, *Triticum monococcum*'dan köken aldığı savunulmuştur. Ancak son olarak A genomunun donörünün *Triticum urartu* olduğu anlaşılmıştır. (16) Pathak (1939) yaptığı çalışmaya göre D genomunun donörünün *Aegilops squarrosa* olduğunu öne sürmüştür, daha sonra doğruluğu (17) Kihara (1944) tarafından desteklenmiştir.

Tetraploid buğdaylarda bulunan B ve D genomları çok fazla sapmaya ve poliploidleşmeye uğramıştır. İkisinin de atası S genomu olup, ikisi de bu genomdan modifiye olmuştur. S genomu *Aegilops speltoides*'ten köken almaktadır. (18) Sitoplazmik analizler; *Aegilops speltoides*'in sadece tetraploidlerin ana donörü olmadığını, aynı zamanda hekzaploid buğdayların da donörü olduğunu göstermiştir. (19)

2.1.3. Kavuzlu Buğday Türlerinden *Triticum monococcum* ve *Triticum dicococcum*'un Özellikleri

Günümüzde kültüre alınan buğday çeşitleri; harman şekline bağlı olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Kaplıca, gernik ve spelt gibi daha ilkel buğday formları kavuzlu tanelere sahiptir. Bu türlerin taneleri serttir ve başakçıkları kavuzla kaplıdır. Buna karşın ekmeçlik, makarnalık ve topbaş gibi buğday formları çıplak tanelidir. Harman sonucunda çıplak taneler elde edilmektedir.

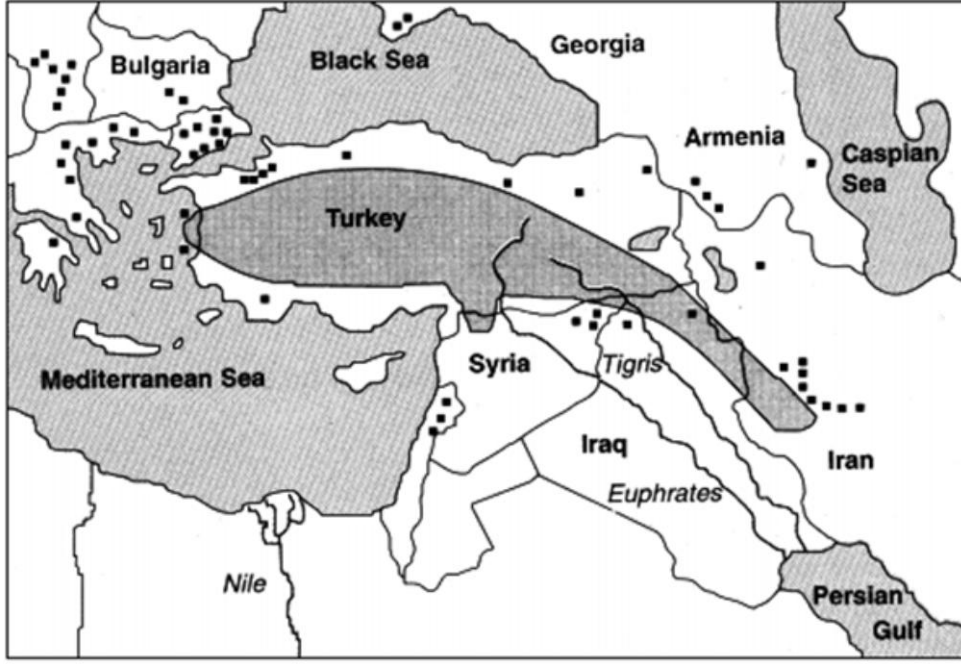
İlk kültüre alınan buğdaylardan biri olan kaplıca buğdayı (*Triticum monococcum* L.) Neolitik Çağ'da Türkiye'nin güneydoğusunda ortaya çıkmıştır. (20) Bu bölgeden Orta Doğu, Balkanlar, Kafkasya Bölgesi, Türkmenistan, Orta Avrupa, Akdeniz ve Kuzey Afrika'ya yayılmıştır ve bu bölgelerde tarımın gelişmesinde büyük bir rol oynamıştır. Ancak günümüzde, kaplıca buğdayı Türkiye, Fas, Kafkasya ve Avrupa'da dağlık

bölgelerde yöresel olarak yetiştirilmektedir. Besleyici değerinin yüksek olması, hastalık ve zararlılara karşı dirençli olması, organik tarıma uygun olması nedeniyle son yıllarda bu türe ilgi artmıştır. Gernik buğdayı (*Triticum dicoccum* Schubl.) da ıslah çalışmaları için değerli bir gen kaynağıdır. Kavuzlu olması, düşük verime sahip olması, az biliniyor olması ve melezlenebilirliğinin düşük olması bu türün kullanımını kısıtlamaktadır.

Kaplıca buğdayı (*Triticum monococcum* L.) ve gernik buğdayı (*Triticum dicoccum* Schubl.) gibi yabancı buğdaylarda, yerel adı kavıl olan kavuzlar mevcuttur. Bu kavuzlar sayesinde tohumlar ekimden sonra böcek zararına karşı korunmaktadır. Kavuzlar harman sırasında tohumlardan ayrılmamaktadır. Bu türler zayıf ve kurak topraklarda ürün verme yeteneğine sahiptir. Ayrıca fakir topraklarda rekabet gücü yüksektir. Hastalıklara karşı diğer kültür buğdaylarına göre çok daha dirençli olup, gübre istekleri azdır.

Bunların yanısıra, yapılan araştırmalarda *Triticum monococcum* L. ve *Triticum dicoccum* Schubl. gibi yabancı buğday türlerinin tane içeriklerinin de zengin olduğu ortaya konulmuştur. Örneğin; kaplıca buğdayının, yapılan çalışmalarda yüksek yağ içeriğine ve ekmeklik buğdaya göre daha fazla sarı lutein oranına sahip olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca tam tahıl tüketimiyle ilişkili sağlık yararları ve düşük glisemik indekse sahip olmasının yanında, fonksiyonel gıda olarak da protein, fenolikler, tokoferoller ve karotenoidler açısından diğer buğday türlerine göre daha zengin bir yapıda olduğu tespit edilmiştir.

Kaplıca buğdayı (*Triticum monococcum* L.) en eski buğday türü olarak bilinmektedir. Sadece 2 takım kromozom içermesi nedeniyle “diploid” olarak sınıflandırılmaktadır. Modern buğday türleri uzun yıllar içerisinde gerçekleşen hibritleşme olayları sebebiyle, 6 set kromozom içerdikleri için “hekzaploid” olarak adlandırılmaktadır. Kaplıca buğdayının çıkış yeri Fırat ve Dicle nehirlerini içine alan bereketli hilal bölgesinin üst kısmında kalan bölgedir. Bu bölgeden Yakın Doğu, Transkafkasya, Akdeniz, Güneybatı Avrupa ve Balkanlara kadar yayılmıştır. Dünyada kültürü yapılan ilk tahıllardan birisidir. *Triticum monococcum* L.'un (kaplıca buğdayı) kökeni Türkiye'nin dağlık bölgelerinde olup, yabancı progenitorü olan *Triticum boeoticum* Boiss. hala bu bölgelerde kendiliğinden yetişmektedir. (21)



Şekil 2 3. *Triticum boeoticum*'un gen merkezleri (22)

Triticum monococcum L.'un antosiyanin içeren koleoptilleri mevcuttur. Kardeşlenme fazladır. Kardeşlenmede yarı dik pozisyon gösterir ve başaklanmayla birlikte dik bir pozisyon alıp, olgunlaşmaya kadar bu durumunu korur. 60-30 cm arasında boylanabilme özelliğine sahiptir. Esnek bir gövdeye sahiptir ve yatmaya dayanıklıdır. Yapraklar ortalama 18 cm uzunluğunda olup, dar ve kısa dişlidir. Kulakçılar açık yeşil renktedir. Başak uzunluğu 6-12 cm arasındadır. Başaklar yanlardan basık, dar ve sıktır. Her başak ortalama 20-30 başakçık bulundurur. Başaklarda 1 adet çiçek bulunur. Kılçıklar sert ve uzundur. Anterler 5-6 mm uzunluğundadır. Tohumlar düz, ince, camsı ve küçüktür (15-35 mg). (23)

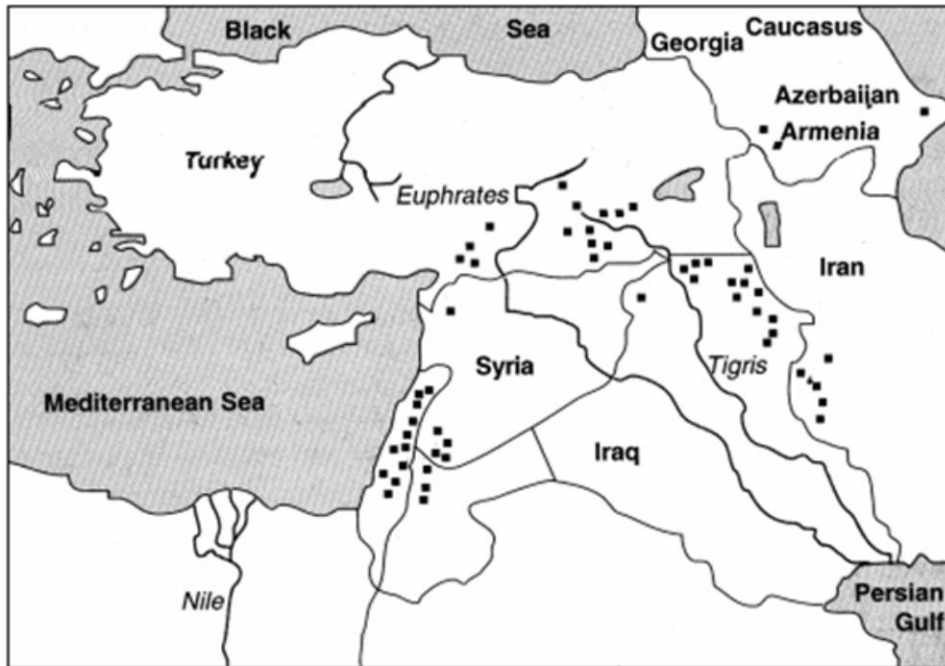
Tarımı çok eski çağlara dayanan kaplıca buğdayı besleyicilik açısından oldukça değerlidir. Lif açısından zengin değildir. Ancak güçlü bir antioksidandır ve beta karoten lutein açısından zengindir. Hatta kaplıca buğdayı lutein açısından en değerli buğday türü olma özelliğini taşımaktadır. Kültür çeşitleriyle kıyaslandığında; protein, ham yağ, fosfor ve potasyum açısından oldukça üstündür. E vitamini kaynağıdır.

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan morfolojik analizlerde kaplıca buğdayının biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanıklı olduğu ve bunların buğday ıslahında kullanılabileceği ifade edilmiştir. (24–26) *Triticum monococcum* L. hem makarnalık hem de ekmeklik

buğdayın yapısında bulunan A genomunu taşımaktadır. Bundan dolayı makarnalık ve ekmeçlik buğday ıslahında genetik çeşitliliği artıracak yeni bir gen kaynağı olarak görülmektedir. (27)

Gernik buğdayı (*T. dicocum* Schubl.); yabancı buğday türü olan *Triticum dicoccoides*'den türemiş olan ve kültüre alınan ilk buğday türlerinden biridir. 4 set kromozom içerir yani “tetraploid” buğday grubuna girmektedir. Yazlık ve kışlık olarak yetiştirilebilen kaplıca buğdayına göre daha geniş bir iklim aralığına, özellikle de ılıman iklimlere adaptedir. M.Ö. 4000-1000 yılları arasında Yakın ve Uzak Doğu Bölgeleri, Avrupa ve Kuzey Afrika Bölgesi'nde en çok yetiştirilen buğday çeşidi olmakla beraber, günümüzde Hindistan, Etiyopya ve İtalya'da yetiştirilen önemli bir tarla bitkisidir. (28)

Organik tarıma uygunluğuyla dikkat çekmekte olan *T. dicocum* Schubl.; yetiştiricilik maliyetinin az olması, yabancı otlarla olan rekabet gücü, marjinal alanlara uyum yeteneği ve insan beslenmesi açısından potansiyeli sayesinde araştırmacıların dikkatini çekmeyi başarmıştır. Aynı zamanda nişasta, lif ve antioksidanlar açısından da zengindir. En önemli özelliklerinden bir tanesi de içerdiği düşük gluten miktarıdır. Bu özelliğiyle çölyak hastaları açısından önemli bir besin kaynağıdır.



Şekil 2.4. *Triticum dicoccoides*'in gen merkezleri (29)

Triticum dicoccum soğuga dayanım özelliği yüksektir ve günümüzde Kuzey Anadolu'da özellikle Kars ve çevresinde tarımı yapılmaktadır. *Triticum monococcum*'un ise Kastamonu ili ve çevresinde yetiştiriciliği devam etmektedir.

(30) Peng vd (2000) *Triticum dicoccum*'un yabani progenitörü olan *Triticum dicoccoides*'in moleküler haritalaması çalışmasını AFLP yöntemini kullanarak yapmışlardır.

Triticum monococcum ve *Triticum dicoccum*'dan kültür buğdaylarına; sarı pasa,yaprak pasına, tahıl kist nematoduna, külemeye dayanıklılık geni aktarma gibi birçok çalışma yapılmıştır.(31–33)

Günümüzde verim artışı sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen yeni moleküler ve biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla izole edilmiş bir genin doğrudan aktarılması söz konusu olduğundan, öncelikle farklı türler ve cinsler arası gen aktarımında melezleme zorunluluğu ortadan kaldırılmakta; klasik ıslahta yabani gen kaynaklarından yararlanmada en önemli engel olan doğal izolasyon, bir başka deyişle, kısırılık ve uyumsuzluk sorunu da çözülmektedir. (3)

2.2. Bitki Doku Kültürü

Bitki ıslahçılarının amacı yüksek verimli, kaliteli ve çeşitli stres faktörlerine dayanıklı yeni çeşitler geliştirmektir. Klasik bitki ıslahı programları artık tek başına yeterli olmamakta, ve bu programları destekleyen ve hızlandıran biyoteknolojik yöntemlerden yararlanma yoluna gitmektedirler. Biyoteknolojinin sınırları çok geniş olup değişik uygulama alanlarını içine almaktadır. Bu uygulama alanlarından bir tanesi de doku kültürü uygulamalarıdır.

Bitki doku kültürü; aseptik koşullarda, yapay bir besin ortamında bütün bir bitki, hücre, doku ya da organ gibi bitki kısımlarından (eksplant), kontrollü çevre koşullarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir.

Bitki doku kültürü; yeni çeşit geliştirmeyi veya mevcut çeşitlerde genetik değişiklik meydana getirmeyi, bitkileri klonal olarak hızlı çoğaltmayı, patojenlerden arınmış bitki eldesini, haploid bitki üretimini, bitkisel gen kaynaklarının muhafazasını, sekonder metabolitlerin üretimini amaçlamaktadır. Bitkilere yeni özellik kazandırılmasında, çoğaltılmasında kullanılan laboratuvar çalışmalarının ilk aşaması bitki doku kültürü uygulamalarıdır.

Doku kültürü çalışmaları hücresel teorilerin ortaya atılmasıyla başlamıştır. Bu teorilere göre; bitki hücreleri kendi kendine çoğalabilme ve totipotent özelliğe sahiptir. (34)

(35) Haberlandt (1902) tarafından ilk aseptik kültür denemesi gerçekleştirilmiştir. İlk kök kültürü White (1934) tarafından domates bitkisinde denenmiştir. (36) Bu gelişmeleri takip eden çalışmalarda bu yöntemler geliştirilmiş ve günümüze kadar gelmiştir.

1970'li yılların sonlarından itibaren, bitki doku kültürü teknolojisi tarıma ve endüstriye önemli katkılarda bulunmaya başlamıştır. (37)

Hücrelerin manipülasyonu için birçok teknik vardır. Bunlar kallus, protoplast, süspansiyon kültürü, anter ve ovum kültürü, somatik embriyo ve meristem kültürleridir.

Bir bitkinin hücre, doku, organ, meristem veya embriyo gibi çeşitli parçalarından yani eksplantlarından yeni bitki veya bitkiler elde edilmesine bitki rejenerasyonu denilmektedir. Tahıllardaki genetik mühendisliği çalışmaları bitki rejenerasyon sisteminden geçmektedir. Başarılı bitki rejenerasyonu, başarılı bir doku kültürü çalışmasına bağlıdır.

Ekonomik öneme sahip olan bitkilerde etkili bir rejenerasyon sistemi; genetik mühendisliği, ıslah ve genomik çalışmaların temelini oluşturmaktadır. (38) Lührs ve Lörz (1989), *in vitro* koşullar altında yürütülen bitki rejenerasyonu çalışmalarında, tahılların çok hücreli eksplantlarıyla başarıya ulaşıldığı ve bu sayede tahıllara alternatif gen aktarım yöntemlerinin uygulanabileceğini ifade etmiştir.

Buğday bitkisinde rejenerasyon organogenez ve embriyogenez yoluyla çok çeşitli eksplant kaynaklarında elde edilebilmektedir. Bu eksplant kaynakları olgunlaşmamış embriyo, (39–

44) olgun embriyo, (45–48) olgunlaşmamış yaprak, (49,50) olgunlaşmamış çiçek, (51) kök ucu (52) ve anterlerdir (53–55).

Günümüzde en çok kullanılan besiyeri MS besiyeridir. (56) Murashige ve Skoog (1962) tarafından geliştirilen, bitkilerin ihtiyaç duyduğu tüm besin maddelerini uygun dozda içeren bir besiyeridir. Araştırmacılar bu besiyerini kendilerine göre modifiye ederek yaklaşık 50 yıldır kullanmaktadırlar.

Bitki doku kültürünün başarısı genellikle besin ortamına eklenen hormonlara ya da bitki büyüme düzenleyicilerine ve diğer aktif maddelere bağlıdır. (57)

Buğdayda, genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılarak gen aktarmada önemli bir adım olan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında başarının büyük ölçüde genotipe bağlı olduğu bilinmektedir. (3)

Sinnott (1960) yara dokularında yaptığı gözlemlerde kallus oluşumu gözlendiğini ifade etmiştir. (58)

Tahıllarda genellikle embriyo kültürü ve kallus kültürü kullanılmaktadır. Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınması embriyo kültürü olarak tanımlanmaktadır. Olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyo kültürü olmak üzere 2 tip embriyo kültürü vardır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, bitki rejenerasyonu için olgunlaşmamış embriyodan oluşturulmuş kallusların, diğer eksplant dokularından oluşan kalluslardan daha yüksek verime sahip olduğu anlaşılmıştır. (59) Olgunlaşmamış embriyoların eksplant kaynağı olarak kullanabilmeleri için donör bitkinin belli dönemlerde eksplant kaynağı temin etmesi ve kışlık çeşitlerde vernalizasyon ihtiyacının karşılanması için seralara ve kontrollü koşullara gereksinim duyulmaktadır. Olgunlaşmış embriyolar yılın belirli zamanlarına bağlı kalınmadan sağlanabildiğinden, kültüre alınması daha kolay olduğundan ve bol miktarda sağlanabildiğinden dolayı olgunlaşmamış embriyolara göre daha avantajlıdır. (48)

Embriyo kültür tekniği ilk defa 1904 yılında Hanning tarafından kullanılmış olup, bu çalışmada *Raphanus* ve *Cochlearia*'nın tohumundan izole edilen olgun embriyolar mineral tuz ve şeker içeren besi ortamda kültüre almış ve bunlardan bitkicikler elde edilmiştir. (60)

Embriyo kültürü bitkilerde farklı amaçlarla kullanılan bir tekniktir. Tohum dışında embriyonun gelişiminin incelenmesi, yaşama yeteneğine sahip olmayan embriyoları kurtarma ve haploid bitki geliştirme gibi amaçlar için kullanılabilir. Bu teknik, özellikle genetik tabanı daralmış, tür içindeki varyasyonun azalmış olduğu durumlarda mevcut gen havuzunu genişletmek ve arzu edilen çeşitlere istenen özellikleri aktarmada etkin olarak kullanılabilir. Embriyo kültürü sayesinde ıslah çalışmalarında klasik metotlarla başarı sağlanamadığı durumlarda başarı sağlanabilmekte, daha kısa sürede daha etkin sonuçlar alınabilmektedir. (61)

(59) Özgen vd (1996), 7 kışlık buğday genotipinde (Çakmak-79, Kırmızı 5132, Bursa 7113, Kunduru 414/44, Berkmen 469, T-104, T-105) olgun ve olgunlaşmamış embriyo kültürlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunu incelemiştir. Bu çalışmada, olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşumu sağlanmasında, kendi geliştirdikleri embriyo gevşetme (endosperm destekli embriyo kültürü) yöntemiyle başarılı bir sonuca ulaşmışlardır. Kallus oluşumu ile rejenerasyon kapasitesi arasında bir korelasyon gözlenmemiştir. Olgunlaşmış embriyoların düşük kallus oluşumuna, yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip oldukları bildirilmiştir. Hızlı, güvenilir ve yılın her zamanı bulunabilmeleri özelliğiyle olgun embriyo kültürünün, olgunlaşmamış embriyo kültürü için alternatif bir yöntem olduğu ifade edilmiştir.

(62) Tuberosa vd (1998), 8 ekmeçlik buğday çeşidini olgunlaşmamış embriyo kültürüne almıştır. Embriyoların besin ortamına kalkancıkları yukarı gelecek şekilde yerleştirilmesi gerektiğini, kalkancıkların besin ortamına teması halinde kallus oluşturabildiklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar kallus oluşumunun 10-14. günde başladığını rapor etmişlerdir.

Kallus kültürü ise; hücrelerin yara aldığı zaman oluşturdukları hücre yığınının yani kallusların kültüre alınmasıdır. Besiyerinde bulunan oksin ve sitokinler yardımıyla kalluslar gelişmekte, organogeneze öncülük etmektedirler.

Kallus kültüründe karşılaşılan sorunlardan en önemlisi hücre popülasyonunda meydana gelen genetik düzeydeki değişimlerdir. Kültür sırasında ortaya çıkan fenotipik varyasyonlar gelişimsel ya da genetik bir temele sahip olabilir. Eğer genetik bir temele

sahip olan değişim mevcut ise, poliploidiye neden olan kromozomal anomalileri söz konusu olabilmektedir. (63)

Embriyo kültürü yöntemleriyle, etkili ve tekrarlanabilen kallus kültürleri ile bitki rejenerasyon sistemleri oluşturulabilmektedir. Böylece kültüre alınan bitki hücrelerine ya da dokularına bakteriler (*Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*,...vb.) aracılığıyla ya da partikül bombardımanı ile gen aktarımı yapılabilmekte, daha sonra gen aktarılmış bitki kısımları uygun besin ortamında olgun bitki haline getirilerek, aktarılan geni taşıyan transgenik bitkiler elde edilebilmektedir. Yine, doku kültürü sırasında oluşan kalluslardan farklılaşan bitkiler arasında görülen somaklonal varyasyondan ıslah programlarında yararlanılabilmektedir. Ayrıca, *in vitro* ortamda kimyasal ve fiziksel mutagen uygulamaları ile hastalıklara, antibiyotiklere, herbisitlere, tuza, düşük sıcaklığa ve kuraklığa toleranslı veya dayanıklı mutant hücre seçimleri yapılabilmektedir. (64)

Doku kültürü uygulamalarında, bir besiyeri; inorganik tuzlar, bitki büyüme düzenleyicileri (oksin, sitokinin, giberellinler), vitaminler (tiyamin, niyasin, piridoksin), amino asit ve amidler (L-aspartik asit, L-asparjin, L-glutamik asit, L-glutamin, L-arginin), kompleks organik tamamlayıcılar (pepton, maya özütü, malt özütü, hindistan cevizi sütü), karbon kaynakları (D-glikoz, D-fruktoz), ozmotik kaynaklar (mannitol, sorbitol), su ve katılaştırıcı ajanlardan (agar) oluşmaktadır.

Kültüre alınan bitki dokularının gelişmesinde bazı bitki büyüme düzenleyicileri ya da hormonlara gereksinim duyulmaktadır. En önemli bitki büyüme düzenleyicileri oksinler, sitokininler ve giberellinlerdir. Kültür ortamına belli oranlarda eklenen sitokinin ve oksin organ oluşumunu hızlandırmaktadır.

Oksinler, hücre gelişimini ve büyümesini teşvik ederek, hücresel düzeyde büyümeyi sağlamaktadırlar. Aynı zamanda köklendirme ve yan sürgünlerin gelişmesinde de rol oynamaktadırlar. Bitki doku kültürü uygulamalarında, kallus uyarımını, somatik embriyo oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu desteklemektedir. Bunlara ek olarak sürgün köklendirmede de kullanılmaktadır. Bazı sentetik oksinler yabancı bitkilere karşı herbisit olarak kullanılmaktadırlar.

Bitkilerde doğal olarak bulunan oksinler; fenilasetik asit (PAA), indolasetik asit (IAA), 4-kloro-indolasetik asit (4-CPA) ve indol-3-bütirik asittir (IBA). Sentetik oksinler yani bitki büyüme düzenleyicileri ise 1-naftalinasetik asit (NAA) ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit (picloram), 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit (2,4,5-T) ve 2-2,4,5-triklorofenoksi propiyonik asit (2,4,5-TP)'den oluşmaktadır. (65)

Sitokininler, hücre ve sürgün bölünmesini teşvik etmektedirler. Kinetin, zeatin ve BAP (benzilaminopürin) en yaygın kullanılan sitokininlerdir. Ayrıca thidiazuron (TDZ) ve bakteri kökenli 6- γ,γ -dimetilalilamino pürin (2İP) de sitokininler grubunda yer almaktadır. Sitokininler, kök ucu meristeminde ve genç yapraklarda üretilmekte olup, antioksidan etkiye yani yaşlanmayı geciktirici etkiye sahiptir.

Doku kültürü çalışmalarında sentetik oksinler 2,4-D (kallus oluşumu ve süspansiyon kültürleri için) ve NAA'den (organogenesis için) yararlanılmaktadır. Bunların dışında dicamba (3,6-dikloro-o-anisik asit) ve picloram (4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit) genellikle embriyogenik dokuların oluşumunda ve süspansiyon kültürlerinin sürdürülmesinde etkilidir. (66,67)

2,4-D beyaz sarı kristal toz halinde bulunan, geniş yapraklı yabancı bitkilerle mücadelede kullanılan, genellikle ticari olarak sıvı formülasyonda satılan bir herbisittir (ot öldürücü). 2,4-D, Amerika Kimyasal Kozmetik Anonim Şirketi tarafından 1940'ların ortalarında geliştirilmiş organik bir kimyasal olup, ana bileşimi asittir. (68) 1500'ün üzerinde ticari herbisit ürününün ana malzemesidir. Doku kültürü çalışmalarında hücre gelişimi, hücre bölünmesi ve köklendirme amacıyla kullanılmaktadır.(69) Açık formülü $C_8H_6Cl_2O_3$, moleküler ağırlığı $221,04 \text{ gr Mol}^{-1}$, erime noktası $140,5^\circ\text{C}$, kaynama noktası 160°C (0,4 mm Hg), su içerisindeki çözünürlüğü 25°C 'de 900 mg/T 'dir.

Zirai mücadele yöntemleri içinde yabancı otlarla mücadelede çok yaygın olarak kullanılan 2,4-D herbisitinin yüksek dozlarda kullanımının, rejeneratif bitkilerin kromozom yapılarında ya da sayınlarda önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. (70,71)

Doku kültürü uygulamalarında 2,4-D'nin hücre çoğalmasını ve kallus oluşumunu hızlandırdığı, ancak kallustan bitki oluşumu için 2,4-D'nin ortamdaki uzaklaştırılması

gerektiği birçok araştırıcı tarafından kaydedilmiştir. (72–74) 2,4-D'nin kullanımı dūřuk konsantrasyonlarda olmaktadır. 5 mg/l 2,4-D konsantrasyonundan daha yūksək konsantrasyonların bitkiye uygulanması sonucunda, kromozomal mutasyonlar ve kromozomal sapmaların oluşabildiği belirtilmiştir. (75)

(76) O'Hara ve Street (1978); buđdayda olgun embriyo kūltūre çalıřmasında bitki būyūme dūzenleyicisi olarak 1 mg/l 2,4-D kullanmıřtır. Kallus veriminin kullanılan çeřitlere bađlı olduđunu ve kallus oluřumu için oksinlerin gerekli olduđunu bildirmiřlerdir.

(77) Ozias-Akins ve Vasil (1982) ekmeklik buđdayda yaptıkları olgunlařmamıř embriyo kūltūründe, 1-8 mg/l arasındaki 2,4-D konsantrasyonlarını karřılařtırmıřlardır. En iyi kallus oluřumu ve çimlenme oranları 2 mg/l 2,4-D konsantrasyonunda gōrūlmūřtir.

(78) Sears ve Deckard (1982), 39 farklı kıřlık buđday çeřidinin olgunlařmamıř embriyo kūltūrüne alarak, kallus oluřumunu, rejenerasyon kabiliyetlerini ve doku kūltūrū çalıřmalarındaki potansiyellerini arařtırmıřlardır. Olgunlařmamıř embriyolar 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kallus oluřumu için kūltūre alındıktan sonra, oluřan kalluslar hormonsuz MS ortamına aktarılmıřtır. 18 buđday genotipi rejenerasyon kabiliyeti gōsterirken, 5 genotipin 240 gūn sonra totipotensi yeteneđinin kaybolduđu gōzlenmiřtir. Arařtırma sonucunda, kallus oluřumunun ve geliřiminin, totipotensinin ve rejenerasyon kabiliyetinin genotipe bađlı olarak deđiřtiđi belirlenmiřtir.

(79) Ozias-Akins ve Vasil (1983), farklı dozlardaki 2,4-D'nin(0, 0.4, 1.0, 4.0, 8.0 mg/l) Gamborg B5 ortamındaki kallus geliřimi üzerindeki etkilerini arařtırmıřlardır. Doz arttıka kallus ađırlıđının ve hūcre bōlūnmesinin arttıđını, ancak 2 mg/l ve daha yūksək dozlarda dūzensiz būyūme gōzlemlediklerini, 2 mg/l 2,4-D'nin kallus oluřumu için optimum doz olduđunu belirtmiřlerdir. Bunlara ek olarak aceto-carmin boyama yōntemi kullanılmıř ve preparatlardaki kromozom sayılarında herhangi bir deđiřiklik meydana gelmediđini ($2n=6x=42$) bildirmiřlerdir.

(45) Zhou ve Lee (1983), 2,4-D ve 12 farklı oksinin "Frederick" ve "Chinese Spring" buğday çeşitlerinde kallus oluşumuna olan etkisini karşılaştırmışlardır. Genotipler arasında kallus oluşturma bakımından değişiklikler gōzlenmiřtir. "Chinese Spring" eşidinde 2,4-D

ve dicambanın picloramdan daha üstün olduğunu, ancak "Frederick" çeşidinde dicamba ve picloramın kallus gelişiminde 2,4-D ile aynı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

(80) Redway vd (1990), 8 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını, anterlerini ve yapraklarını embriyogenik kallus elde etmek amacıyla 12 farklı ortamda kültüre almışlardır. Anterler ve yapraklardan elde edilen kallus oranı oldukça düşük gözlenirken, olgunlaşmamış embriyolardan çok yüksek oranda kallus elde etmişlerdir. En fazla embriyogenik kallus oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında görülmüştür. Rejenerasyon için MS+ 1 mg/l IAA+ 1 mg/l zeatin içeren ortam kullanılmıştır. En az bitki rejenerasyonu anterlerden elde edilen kalluslarda gözlenmiştir. Kallusların yaklaşık beş ayın sonunda rejenerasyon kapasitesini kaybettikleri kaydedilmiştir.

(80) Vasil vd (1990), buğdayın olgunlaşmamış embriyolarını öncelikle 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almış olup, daha sonra rejenerasyon için farklı bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, IAA, 2,4-D, zeatin ve kinetin) denemişlerdir. En iyi rejenerasyon kapasitesi 1 mg/l zeatin+ 1mg/l IAA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

(81) Ziauddin ve Kasha (1990), 2 mg/l 2,4-D ve daha yüksek konsantrasyonlarının meydana getirdiği kromozom anormalliklerini; poliploid mitoz yüzdesinin artması şeklinde görmüştür. Ayrıca ortamda NAA varlığında kromozomların yapısal değişikliğe uğradığına rastlanmıştır. En yüksek kallus oluşumu en az genetik varyasyonun olduğu 0.1 ve 1.0 mg/l 2,4-D konsantrasyonunda görülmüştür.

(82) Felföldi ve Purnhauser (1992), 44 buğday ve 3 tritikale çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Kallus oluşumunda genotiplere bağlı olarak bir değişiklik gözlenmemiştir. Rejenerasyon için hormonsuz MS ortamına alınan kallusların rejenerasyon kapasitesi buğdayda %1-90 oranında değişirken, tritikalede bu oran %5-84 arasında değişmiştir. Ayrıca buğdayda embriyogenik kallus benzeri kallusların %0-39, tritikalede %0-81 oranında olduğu gözlenmiştir.

(83) Bommineni ve Jauhar (1996), yaptıkları çalışmada makarnalık buğday çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyo kültüründe 3 farklı jelleştirici madde (%0.8 agar, %0.8 agaroz ve %4 phytigel) ile %2 ve %3 sukroz kullanmıştır. 2 mg/l 2,4-D, %3 sukroz ve %0.8 agar içeren MS ortamlarındaki bütün genotiplerde 2-3 içinde somatik embriyo oluşumu

gözlenmiştir. Somatik embriyoların 3-4 hafta içerisinde küçük ve yoğun somatik topluluklar halinde geliştikleri ve bu toplulukların rejenerasyon ortamına transfer edildiklerinde bitki oluşumu gözlemlendiği bildirilmiştir.

(84) Ivanov vd (1989), 5 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını 2 mg/l 2,4-D, 20 g/l sakkaroz, 8 g/l agar içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Oluşan embriyogenik kalluslar 0.1 mg/l IAA, 0.5 mg/l BAP, 20 g/l sakkaroz, 8 g/l agar içeren MS ortamında rejenerasyona alınmıştır. Bitki boyu 5-6 cm'ye ulaştığında 4 mg/l IAA, 0.1 mg/l kinetin, 146 mg/l L-glutamin, 20 g/l sakkaroz, 8 g/l agar içeren MS ortamında köklendirilmeye alınmıştır. Köklenen bitkiler vernazlasyon amacıyla 2-4°C'de tüpler içerisinde, 4-5 hafta muhafaza edilmiştir. R₀ rejenerantları elde edilerek, sera koşullarında fizyolojik gelişimlerinin tamamlanması sağlanmıştır. Daha sonra R₃ ve R₄ rejenerantları elde edilmiştir.

(85) Machii vd (1998), yaptıkları çalışmada 107 buğday genotipinde (78 yerel, 29 yabancı) olgunlaşmamış embriyo kültürü yöntemini kullanarak embriyogenik kallus oluşumunu ve rejenerasyon kapasitesini araştırmışlardır. Tozlanmadan 14 gün sonra alınan olgunlaşmamış embriyolar; 2 mg/l 2,4-D+ 0.25 mg/l ABA+ 500 mg/l L-glutamin+ 100 mg/l prolin+ 100 mg/l kazein hidrolizat+ 60 mg/l maltoz+ 2 g/l fitojel içeren MS ortamında kallus teşviki için kültüre alınmıştır. Oluşan embriyogenik kalluslar rejenerasyon için; 0.5 mg/l BAP+ 30 g/l sakkaroz+ 2 g/l fitojel içeren MS ortamına transfer edilmiştir. Araştırma sonucunda 107 buğday çeşidinin 83'ünde embriyogenik kallus gelişimi gözlenmiş olup, bunların 45 tanesinde rejenerasyon elde edilmiştir. Embriyogenik kallus eldesinin; buğday embriyolarının kalitesine ve canlılığına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

(86) Zheng ve Konzak (1999) ekmeklik buğday çeşidi olan Pavoy 76 üzerinde yaptıkları anter kültürü çalışmasında, 4 farklı 2,4-D konsantrasyonu (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l) denemiş olup, optimum kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunu 2.0 mg/l 2,4-D konsantrasyonundan elde etmişlerdir.

(87) Benkirane vd (2000), 10 buğday çeşidinin yapraklarını ve koleoptillerini farklı 2,4-D konsantrasyonları (2.3-11.3 µM) içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Eksplantlar kültüre alındıktan 4-6 hafta sonra embriyogenik kalluslar oluşturmaya başlamışlardır. En fazla embriyogenik kallus; 6.8 µM 2,4-D içeren ortamda bulunan 0.5-1 cm uzunluğundaki

bitki yapraklarından elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar rejenerasyon için; 0.9 µM 2,4-D+ 0.5 µM 2İP içeren MS ortamına transfer edilmiştir. Koleoptil segmentlerinden, yaprak segmentlerine göre daha fazla kallus elde edilmiştir. Rejenerasyonm kapasitesi bakımından koleoptil büyüklüğünün önemli olduğu tespit edilmiştir. Kallus oluşumu aşamasında farklı 2,4-D konsantrasyonlarında bir değişiklik gözlenmezken, rejenerasyon aşamasında 9 µM 2,4-D içeren ortamın en iyi sonuç verdiği gözlenmiştir.

(88) Delporte vd (2001), Odean ve Minaret buğday çeşitlerinin olgun embriyolarında rejenerasyon çalışması yapmışlardır. Eksplantlar steril edilerek 10 µM 2,4-D içeren ortamda kallus teşviki amacıyla kültüre alınmıştır. Kallus oluşum oranı %90 olarak tespit edilmiştir. Bitki rejenerasyonu için; 0.45 µM 2,4-D+ 46 µM zeatin içeren ½ MS ortamı kullanılmıştır. Sonuç olarak her 100 embriyodan 25-30 adet bitki elde edilmiştir.

(89) Gonzales vd (2001), 12 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını eksplant olarak kullanmış olup, 4 farklı MS ortamında kültüre almışlardır. Elde edilen kallusların bazıları hem kompakt yapıda, hem de embriyogenik olduğu gözlenirken, bazılarının yumuşak ve sulu olduğu gözlenmiştir. Oluşan kallus oranları %54-100 arasında, genotiplere bağlı olarak değişmiştir. En iyi kallus gelişimi 30 g/l maltoz ve 30 g/l sakkaroz içeren ortamlardan elde edilmiştir. Rejenerasyon ortamı olarak 2.22 µM BAP+ 2.68 µM NAA+ 20 g/l sakkaroz içeren MS ortamı kullanılmıştır. Kompakt yapıya sahip olan kalluslardan daha fazla bitki rejenerasyonu elde edilmiştir.

(90) Özgen vd (2001), 4 farklı kışlık buğday çeşidinde olgun embriyo kültürü uygulamıştır. Olgunlaşmış buğday embriyolar kallus gelişimi için 8 mg/l 2,4-D içeren sıvı ortama alınmıştır. 11 gün sonunda kalluslar bitki rejenerasyonu için 2 mg/l glisin+ 20 g sakaroz+ 7 g/l agar içeren katı MS ortamına transfer edilmiştir. Kallus oluşum kapasitesi %75-100 oranında değişirken, her 100 embriyodan 14.1 bitki rejenerasyonu elde edilmiştir.

(91) Shah vd (2003), 2,4-D, IAA, BAP ve kinetin gibi büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumu ve rejenerasyona olan etkisini ekmeçlik buğday çeşidi olan Lu-26S üzerinde karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. 2 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BAP kombinasyonunu içeren ortamda en iyi kallus oluşum oranı elde edilmiştir. En iyi rejenerasyon oranı ise tek başına 4.0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l BAP+ 1.0 mg/l IAA kombinasyonlarında gözlenmiştir.

(92) Ahmet ve Adak (2007), yaptıkları araştırmada Irak'ta yetiştirciliği yapılan 5 farklı ekmeklik buğday çeşidinde olgun embriyo kültürü uygulamasıyla, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunu incelemiştir. Kallus teşviki amacıyla 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı kullanılmıştır. Bitki rejenerasyonu için, 20 g/l sakkaroz+ 7 g/l agar+ 4.43 g/l MS içeren katı ortam kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kallus oluşturma kapasitesi %88.75-98.75 arasında, bitki rejenerasyonu ise %86.75-98.75 arasında değişmiştir. Kallus ağırlığının artmasının, rejenerasyon yeteneğini arttırdığı belirlenmiştir.

(93) Dağüstü (2007), 24 ekmeklik buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Olgunlaşmamış embriyolar 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Rejenerasyon kapasitesi genotipe bağlı olarak değişmiştir. Kallus oluşum oranı %2.4-100 arasında değişmiştir. Buğday bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarında bitki rejenerasyonunun uygun genotip kullanımına bağlı olarak etkili bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır.

(94) Yu vd (2008), in'de oldukça yaygın olarak yetiştirilen 8 elit ekmeklik buğday çeşidinin olgun embriyolarını kültüre almışlardır. Olgun embriyolar 5 farklı (MS, LS, N₆, B₅, P) besiyerine yerleştirilmiştir. En iyi kültür etkisi sonucu 2 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BA+ 0.1mg/l NAA içeren MS ortamından alınmıştır. En iyi rejenerasyon kapasitesi ise 10 mg/l AgNO₃ içeren rejenerasyon ortamında kültüre alınan kalluslardan elde edilmiştir.

(95) Ren vd (2010), 2 farklı elit ekmeklik buğday çeşidini L₃ ortamında olgun embriyo kültürüne almışlardır. Bu çalışmada farklı karbon kaynaklarının etkisi ve dicambanın 2,4-D yerine kullanım olanağı araştırılmıştır. 4 mg/l dicamba ve 30 mg/l sukroz içeren ortamda maksimum kallus oluşumu gözlenmiştir.

Picloram sistemik bir herbisit olup, genellikle derin köklü, geniş yapraklı ve odunsu bitkilerle mücadelede kullanılmaktadır. Picloram ilk kez 1964 yılında ABD'de tescil edilmiştir. Pikolinik asitin klorlu bir türevidir. Piridin türü bir herbisittir. Tordon ve Grazon ticari isimler altında satılmaktadır. Picloram da kullanımı kısıtlı olan herbisitler sınıfına girmektedir.

(96) Barro vd (1999), 8 buğday ve 7 arpa genotipinde, olgunlaşmamış embriyo ve yapraklarını kullanarak somatik embriyogenesi ve bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır.

Olgunlaşmamış embriyoları ve yaprakları 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l picloram içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Araştırma sonuçlarına göre, picloram içeren ortamda yapraklardan elde edilen somatik embriyo sayısı, içermeyen ortama oranla 2 kat fazla olmuştur. Buğday yapraklarından elde edilen somatik embriyogenesis (%92), olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen somatik embriyogenesis (%85) daha fazla olmuştur. Ancak olgunlaşmamış embriyoların rejenerasyon kapasitesi (%62), yapraklardan elde edilen rejenerasyon kapasitesinden (%18) daha fazla olmuştur.

(97) He ve Lazzeri (2001), 4 farklı makarnalık buğday genotipinin olgunlaşmamış embriyolarını ve yeşil bitki parçalarını kullanarak, embriyogenesis ve rejenerasyon kapasitesini araştırmışlardır. Embriyogenesis teşviki amacıyla büyüme düzenleyicisi olarak farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D ve picloram denemiştir. En iyi embriyogenesis oluşumu 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l picloram içeren ortamlardan elde edilmiştir. Ayrıca olgunlaşmamış embriyolarında, yeşil bitki aksamalarına göre daha fazla kallus gelişimi gözlenmiştir. 2 mg/l picloram içeren ortamda olgunlaşmamış embriyolarda %97-100 oranında bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Yeşil aksamalardaki bitki rejenerasyon oranı %45-85 arasında kaldığı belirtilmiştir.

(98) Mendoza ve Kaepler (2002), ekmeklik buğdayın "Bobwhite" çeşidini MS ortamında kültüre almış olup, 4 farklı oksin (2-MCPP, 2,4-D, dicamba ve picloram) denemiştir. 2-MCPP içeren ortamda kallus oluşumu gözlenmemiştir. En çok kallus oluşumu picloramdan elde edilmiş olup, bu sonucu dicamba ve 2,4-D takip etmiştir.

(99) Keres vd (2004), 8 farklı Hırvatistan kışlık buğday çeşidinin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarını kültüre alarak, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu kapasitesini incelemişlerdir. Olgunlaşmamış embriyolarda en yüksek oranda rejenerasyon Zitaraka (%57) ve Edita (%54) çeşitlerinden elde edilmiştir. Olgunlaşmış embriyolarda en yüksek rejenerasyon Magdalen (%26) çeşidinden elde edilmiştir. Kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için en iyi sonuçların picloram içeren ortamlardan sağlandığı belirtilmiştir.

(100) Sağsöz ve Aydın (2006), 4 farklı buğday genotiplerinin (Kırık, Gerek-79, Sivas 111/33 ve Haymana-79) olgun embriyolarının kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesini araştırmışlardır. Büyüme düzenleyicisi olarak 3 farklı oksin (2,4-D, dicamba, picloram), farklı konsantrasyonlarda (2,5; 3,0; 4,0 mg/l) ve farklı jel yapıcı maddelerle (fitajel ve

agar) kullanılmıştır. En yüksek kallus oluşumu Kırık çeşidinden (%92), en yüksek bitki rejenerasyonu ise Sivas 111/33 çeşidinden (%78.7) elde edilmiştir. Tüm genotiplerde bitki rejenerasyonu ve kallus oluşumu fitajel içeren ortamlarda, agar içeren ortamlara göre yüksek olduğu belirenmiştir. Dicamba'nın, picloram ve 2,4-D'den daha etkili olduğu ifade edilmiştir.

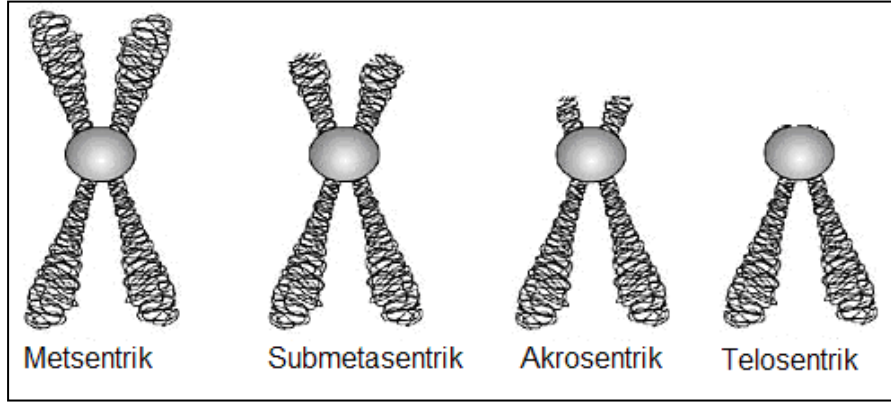
2.3. Bitki Sitogenetiği Çalışmaları

Sitogenetik; genetik materyali taşıyan kromozomları inceleyen, hücrenin yapısını ve fonksiyonunu araştıran, sitoloji ve genetiğin yöntem ve bulgularını bir araya getiren bilim dalıdır.

Her hücrede kromozomlar paketlenmiş halde yani kromatin şeklinde bulunmaktadır. Kromatide bulunan bazı proteinler yapısal rol oynar, bazıları ise gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Kromatinler hücre bölünmesi dışında, hücrede dağılmış halde bulunmaktadır. Ancak hücre bölünmesi esnasında kromozomlar belirlemektedir.

Her tür kendine özgü sayı ve morfolojiye sahip karakteristik bir kromozom yapısına (karyotip) sahiptir. Kromozom sayısı ile canlının organizasyon derecesi arasında bir ilişki bulunmamaktadır.

Kromozomlar sentromerlerinden bağlanmış kardeş kromatidlerden oluşur. Kromozomların çoğu sadece boyları ile değil, aynı zamanda sentromerlerin kromozom üzerindeki yerleşimi ile de birbirlerinden ayrılırlar. Bir kromozom, sentromerinin pozisyonuna göre submetasentrik, metasentrik, akrosentrik ve telosentrik olarak ayırt edilebilir. Sentromer submetasentrik bir kromozomu kısa kol (p) ve uzun kol (q) olarak böler (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Sentromerin yerleşim bölgesine bağlı farklı kromozom tipleri (9)

Mitotik metafazda kromozomların görünüşüne karyotip adı verilmektedir. Bir karyotip, beş farklı karakterin karşılaştırılmasıyla ortaya çıkmaktadır. Bu karakterler, kromozom takımındaki kromozomlarının büyüklüklerinde, sentromerin pozisyonunda, kromozomların nisbi büyüklüklerinde, temel kromozom sayısında ve satellitlerin pozisyonu ve sayısındaki farklılıklardır. (101) Kromozomların grafik olarak gösterilmesine idiogram denilmektedir. İdiogramlar hücre içindeki ölçümlere ve gözlemlere dayanmaktadır.

Kromozom morfolojisinde üzerinde durulan kriterlerden birisi de boğumların sayısıdır. Birincil boğum, kromozom kollarını ve sentromerin pozisyonunu belirlemektedir. İkincil boğum rRNA genlerinin yerlerini belirleyen satellitlerdir. Üçüncül boğum ise sadece bazı türlerde bulunur ve genellikle soğuğa hassas heterokromatin bölgelere benzerlik göstermektedir. Kromozomlar ilk olarak bitki hücrelerinde 1842’de Karl Wilhelm von Nageli tarafından gözlenmiştir. 1888 yılında Waldeyer tarafından kromozom ismi verilmiştir.

1920’li yıllarda, *Triticum* genusuna ait kültüre alınan buğdayların kromozom sayılarının $2n=14$, 28 ve 42 olduğu bilinmekteydi. (102)

(103) Unrau ve Larter (1952) arpa, ekmeklik ve makarnalık buğdaylar üzerinde 2,4-D herbisitini denemişlerdir. Bütün örneklerde mayotik düzensizlikler, kromozom anomalileri, erkencilik ve bitki boyunda kalıtsal değişiklikler gözlemlemişlerdir.

(104) Liang vd (1969) süpürge darısı bitkisinde yaptıkları çalışmada, 2,4-D herbisitinin mayotik evrede kromozom artışına, aynı hücrede iki çekirdek oluşumuna ve hücre büyümesine yol açtığını bildirmişlerdir.

1930'lu yıllarda, Sears (1954) aneuploid buğdaylarda sitogenetik analizlere başlamış ve özgün kromozomların gen haritalaması üzerine çalışmalar yapmıştır. 1970'lerde, tahılların kromozom yapıları analizi için modern boyama teknikleri kullanılmaya başlanmış ve buğdayın sitogenetik karyotipi geliştirilmiştir. (105)

Kromozomların yapısal özelliklerini bütün incelikleri ile görebilmek için somatik kromozomlarda gözlemler yapmak gereklidir. Somatik kromozomların morfolojik yapılarını mitoz bölünmenin metafaz evresinde incelemek en doğru yoldur. (106)

1993 yılından itibaren buğdayda sitogenetik haritalama çalışmaları başlamıştır. (107–113) Bu sitogenetik haritalar; poliploid buğdaylarda agronomik açıdan önemli olan genlerin klonlanmasının önünü açmıştır. (114) Röder vd (1998) tarafından geliştirilen buğdayın mikrosatellit haritası, buğday ıslah çalışmalarındaki moleküler markör kullanımı açısından önemli bir dönüm noktası olmuştur.

(115) Murata (1989), sentetik oksinlerin (NAA, 2,4-D ve 2,4,5-T) ve sitokininin (kinetin) mutasyon etkisini araştırmak için bir ekmeklik buğdayın ıslah edilmiş hücrelerinde denemiştir. Kardeş kromatit değişimleri (KKD) analiz edilmiştir. 2.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında KKD'lerin sayısı hücre başına 15.2 ve DNA pg'si başına 0.42 olarak bulunmuştur. 0.5 mg/l NAA ve 2,4-D ile yapılan uygulamalarda belirgin bir etki gözlenmemiştir. 2.0 mg/l 2,4,5-T konsantrasyonunda ise çok yüksek derecede KKD artışı gözlenmiştir. Kinetinin KKD indüksiyonu üzerinde hiçbir etkisi olmadığı fakat 2,4,5-T'nin neden olduğu KKD'lerin kinetin tarafından bastırılma eğilimi olduğu saptanmıştır.

(116) Chen et al. (1990), *Triticum aestivum* ile *Agropyron* sp. arasında yapılan türler arası melezleme çalışmalarında, elde edilen F₁'lerin somatik kromozom sayısını tespit etmek için kök ucu meristemlerinden yararlanmışlardır. İçerisinde α -monobromonaftalin bulunan buzlu suda, 2°C'de 24 saat ilk işlem yapmışlardır. Fiksasyon için 1 ölçek asetik asit ve 3 ölçek alkol ve boyama için de Feulgen kullanmışlardır. Ezme preparat yapılırken %1 'lik

asetokarminden yararlanmışlardır.

(117) Bannikova ve Barabanova (1990), kışlık buğdayların olgun embriyolarını kültüre almış ve histolojik karakterlerini analiz etmişlerdir. Kültüre alınan embriyolarda bazı değişiklikler gözlemlemişlerdir. Materyalin kültürdeki 2. gününden sonra kalkancıkta mitotik bölünmelerin meydana geldiğini, somatik embriyoların oluşmadığını, koleoptil ve ikincil kök oluşumunun meydana geldiğini görmüşlerdir. Ayrıca olgun embriyoların rejenerasyon kapasitelerinin düşük olduğunu ifade etmişlerdir.

(118) Pijnacker ve Ferwerda (1994), *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum dicoccum* ve *Triticum monococcum*'un olgunlaşmamış embriyolarını farklı 2,4-D konsantrasyonlarında (1.0, 2.0 mg/l) ve farklı sakkaroz dozlarında (20, 30 mg/l) MS ortamında kültüre almışlardır ve KKD incelemesi yapmışlardır. KKD frekanslarının genotipe bağlı olduğu ancak plooidinin derecesiyle ilişkisi olmadığı bildirilmiştir. *Triticum aestivum*'un bir çeşidi hariç diğer hepsinde 2,4-D ve/veya sakkaroz konsantrasyonu arttıkça KKD'lerin arttığı ifade edilmiştir.

(119) Okumuş (1997), asetokarmin boyama yöntemiyle Atilla-1 ve Katae-1 ekmeklik buğday çeşitlerinde polen ana hücreleri mayoz bölünmenin metafaz-1 devresinde incelemiştir. Kromozom konfigürasyonları kiazma frekanslarıyla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Kiazma frekansı, Atilla-1 hattında 41.54 olarak, Katae-1 hattında ise 39.85 olarak bulunmuş ve kiazma frekansının kromozom eşlenmesiyle ilgili literatüre bağlı olarak homolog kromozomların aralarındaki homoloji kaybından kaynaklandığı tartışılmıştır.

(48) Özgen vd (1998), çalışmalarında 12 kışlık ekmeklik buğday genotipi kullanmışlardır. Kallus ortamı olarak 8 mg/l 2,4-D, 20 g/l sakkaroz, 4 g/l agar içeren MS besiyeri kullanılmıştır. İnkübatörde 11 gün bekletildikten sonra oluşan kalluslar MS-0 rejenerasyon ortamına transfer edilmiştir. 3 hafta sonunda 1-1,5 cm boyundaki kök uçları kesilerek, α -monobromonaftalin (6 ml/l) eriyiğinde 4 saat süreyle bekletilmiştir. Tespit için glasiyal asetik asitte, yarım saat boyunca oda sıcaklığında tutulup, 1 N HCl içerisinde 60°C'de 10 dakika süre ile hidroliz edilmiştir. Feulgen boya içerisinde bekletilen köklerin uç kısımları lam üzerinde kesilerek, %45'lik asetik asit damlatılarak preparat hazırlanmıştır. Buğday kromozom sayıları mikroskop altında incelenmiştir. İncelemeler sonucunda T-115

çeşidinin en yüksek kallus oluşum frekansına (%98.3) ve en yüksek rejenerasyon kapasitesine (%96.6) sahip olduğu gözlenmiştir. Sitogenetik araştırmalar sonucunda bütün buğday genotiplerinin $2n=6x=42$ somatik kromozoma sahip olduğu bildirilmiştir.

(120) Doğan (2010), 2 farklı makarnalık buğday çeşidinde (Kundurulu 149 ve Çakmak 79) uyguladığı olgun embriyo kültüründe, farklı 2,4-D ve picloram dozlarının (0, 3, 6, 9 ve 12 mg/l) kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve kromozom yapısına olan etkisini araştırmıştır. Her iki genotipte de en yüksek kallus oluşum yüzdesi ve bitki rejenerasyonu kapasitesi 3 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l picloram dozlarından elde edilmiştir. Ayrıca bu dozları içeren ortamlarda gelişen rejeneratif sürgünlerden alınan kök uçlarında yapılan sitolojik çalışma sonucunda, herhangi bir kromozomal değişiklik gözlenmediği ifade edilmiştir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Dünyanın hemen her yerinde yetişebilen ve birçok çeşidi bulunan buğday, gerek dünyada ve gerekse ülkemizde en fazla üretilen tarım ürünüdür. İnsan beslenmesinde ilk sırada yer alan buğdayın tüketimi gelişmiş ülkelerde daha az olmasına karşın, ülkemizde ve kişi başına gelir düzeyi düşük olan ülkelerde daha fazladır. Ayrıca, ülkemizde ekmeğin yanı sıra besin değeri yüksek, saklanması, taşınması, hazırlanması kolay ve hammaddesi makarnalık buğday olan bulgur ve makarnanın tüketimi de gün geçtikçe önemli ölçüde artmaktadır.

Bilindiği gibi, yabani bitki türlerinin en yaygın kullanım alanı, bitki ıslahında genitör olarak kullanılmalarıdır. Yabani ve ilkel populasyonlardan modern kültür çeşitlerinin fakir olan gen havuzlarının genişletilmesi konusunda da yararlanılmaktadır. Günümüzde, üstün verimli ve fakat dar genetik tabanlı olan modern çeşitler başta çevresel baskılara (hastalık, zararlı, soğuk ve kurak v.b.) dayanıklılık yönünden yetersiz olduklarından, ıslahçılar sürekli olarak kalıtsal materyalin yeni kaynaklarını aramaktadırlar. Bu yönden uzun süreli programlarda kantitatif karakterleri; kısa ya da orta süreli programlarda kalitatif karakterleri (hastalıklara dayanıklılık v.b.), aktarmada bitki genetik kaynakları doğrudan ya da köprü türler olarak kullanılırlar. (121)

Önemli bir gen kaynağı olan yabani bitki türleri, kültür türlerinin geliştirilmesinde gen verici (genitör) olarak kullanılmalarının yanında, doğrudan toplanılarak da tüketilmektedir. Bu yöntemin binlerce yıllık geçmişi vardır. Bu yabani türler önemli mineraller, vitaminler ve diğer çok sayıdaki gıdayı tamamlayan önemli kaynaklardır. Bunlar arasında ilaç, kokulu bitkiler, reçine, yağ, tutkal, boya, tanin, balmumu ve böcek ilacı elde edilen endüstriyel bitkiler yanında süs bitkileri de bulunmaktadır. Yabani türlerin yetiştirilmesinde karşılaşılan güçlükler nedeniyle doğadan toplanarak doğrudan kullanımı günümüzde de yaygın olarak devam etmektedir. Ancak, bu türlerin üretilerek kullanılması, bitki genetik kaynaklarının devamlılığını sağlama yönünden üzerinde durulması gereken önemli bir konudur. Bunun en güzel örneğini *Triticum monococcum* (kaplıca ya da siyez) ve *Triticum dicoccum* (gernik) gibi buğdayın yabani türlerinin yıllar boyu üretilmesi oluşturmaktadır. (122) Ülkemizde, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2012 yılı verilerine göre; kaplıca buğdayının (*Triticum monococcum* L.) üretim miktarı 6565 ton, ekim alanı 39.789 da verimi ise 166 kg/da'dır. (6) Türkiye'de kaplıca buğdayı üretimi sadece Kastamonu

Yöresi'nde Seydiler, İhsangazi ve Devrekani İlçeleri'nde yapılmaktadır. Biyotik (hastalık ve zararlılar) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, soğuk) çevresel baskılara dayanıklılıkları nedeniyle tercih edilen bu türlerin yabancı karakterlerinin giderilmesi ve verimlerinin artırılmaları gibi bazı yeni özelliklerin kazandırılması ile daha etkili bir şekilde üretilmeleri sağlanabilir.

Son 50 yıldaki ürün artışında bitki ıslahı çalışmalarının önemli payı olmuştur. Klasik bitki ıslahı yöntemleri sayesinde, özellikle melez çeşitlerden yararlanarak elde edilen ürünlerin miktar ve kalitesinde önemli artışlar sağlanmıştır. Bununla birlikte, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık başta olmak üzere bitkinin diğer birçok tarımsal özelliklerini iyileştirmede önemli engellerle karşılaşmaktadır.

Günümüzde bitki ıslahı çalışmalarında klasik yöntemlerde karşılaşılan sorunların aşılmasında biyoteknolojik yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Kısırlık, uyumsuzluk, bağlı genler gibi sorunları aşmak amacıyla başarıyla kullanılabilen biyoteknolojik yöntemler, bitki cins ve türleri arasında da gen geçişlerine olanak sağlamaktadır. Laboratuvar koşullarında yürütülen çalışmalarda, biyoteknolojik yöntemler klasik ıslah yöntemlerine tamamlayıcı olarak kullanılmakta ve istenen özelliklerdeki yeni bitkiler elde edilebilmektedir. Kısacası, biyoteknolojik yöntemlerinin kullanılmasıyla, başta türler ve cinslerarası melezlemeler olmak üzere, klasik ıslah çalışmalarının bir çok sorunu aşılabilmektedir. Böylece doğal florada bulunan, hastalık, zararlı, tuzluluk ve kuraklık gibi biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı olan bitkilerin bu özelliklerinden yararlanılmasında yeni olanaklar sağlanmaktadır. Öte yandan, istenilen özellikleri taşıyan yeni bir çeşit geliştirebilmek için klasik ıslah yöntemleri kullanılarak 10-15 yıl gibi uzun bir zamana gereksinim duyulmasına karşılık, biyoteknolojik yöntemlerden embriyo kültürü tekniği ile çok daha kısa zamanda, aynı sonuçları elde etmek mümkündür. (123)

Genellikle doku kültürü çalışmalarında olgunlaşmamış embriyolar, diğer eksplantlara oranla bitki rejenerasyonu bakımından daha yüksek verime sahip olduklarından, yaygın olarak kullanılmaktadır. (124) Ancak, olgunlaşmamış embriyoların elde edilmelerindeki sınırlamalar bu eksplantın kullanımını güçleştirmektedir. Bu nedenle, yılın her döneminde elde edilmesi mümkün olan olgunlaşmış embriyoların kullanılmasına ilişkin araştırmalara ağırlık verilmiş ve son yıllarda geliştirilen endosperm-destekli kallus oluşturma tekniklerinin kullanılmasına da başlanılmıştır. (48,59,125)

Tüm doku kültürü çalışmalarında, rejeneratif bitkilerin elde edilmesi için gerekli olan kallusların oluşturulması için genellikle 2,4-D yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde, diğer oksinlerin kullanımı ve etki mekanizmalarının araştırılması çalışmaları da giderek artmaktadır. (126) 2,4-D'nin *in vitro* ortamda kromozomlar üzerindeki olumsuz etkisi sitolojik çalışmalar ile belirlenmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda 2,4-D'nin kullanıldığı çalışmalar sonucunda, kromatit ve kromozomlarda kırıkların arttığı, yapısal ve sayısal değişikliklerin olduğu bilinmektedir. (127) Bu nedenle, yüksek oranda kallus oluşumunu sağlayan ve kromozom yapısına zarar vermeyen yeni oksinlerin araştırılması çalışmaları günümüzde yoğun olarak sürdürülmektedir. Bu maddelerden biri olan picloram (4-amino-3,5,6- trichloropicolinic acid) bitki biyoteknolojisi çalışmalarında genellikle 0.001-10 mg/l konsantrasyonlarında kullanılan, somatik embriyogenesi arttıran ve düzenleyen önemli bir sentetik oksindir.

Gen merkezleri ülkemizde olan tahıl türlerinin yerel kavuzlu türleri ile ilgili çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. (128) Serpen vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada 12 gernik (*Triticum dicoccum* Schulb.), 6 siyez (*Triticum monococcum* L.) ve 2 de ekmeklik buğday çeşidi kullanılmış ve sonuçta insan sağlığı açısından yararlı olan bitki kökenli kimyasallar ve antioksidanlar bakımından gernik ve siyez örneklerinin önemli ölçüde yüksek değerler verdiği saptanmıştır. (129) Köksel ve vd. (2008) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise aralarında kültürü yapılan siyez ve gernik de dahil olmak üzere buğdaya A ve B genomunu veren yabancı akrabaların nişasta özelliklerine bakılmıştır. Araştırmada kullanılan tüm örneklerin nişasta özellikleri yaygın olarak yetiştirilmekte olan buğday çeşitlerinden farklı bulunarak sonuçta ortaya çıkan bu farklılıkların ileride gıda endüstrisinde kullanılabileceği belirtilmiştir. (130) Akıncı ve Yıldırım (2009) güneydoğu Anadolu'dan topladıkları 29 arpa yerel çeşidine ait 800 adet örnek üzerinde yaptıkları 3 yıllık bir seleksiyon çalışması sonucunda morfolojik karakterler yanında hastalıklara dayanıklılık ve protein içeriği gibi karakterler bakımından büyük bir çeşitliliği olduğunu belirlemişlerdir.

Bu tezde, biyoteknolojik ıslah tekniklerinin uygulanması halinde, gerekli olacak doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan sentetik oksinlerden 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid)'nin ve günümüzde kullanılmaya başlanılan picloramın (4-amino-3,5,6- trichloropicolinic acid) yerel kavuzlu buğday türlerinde kallus gelişimi üzerine olan etkisi karşılaştırmalı olarak incelenecek ve kromozom yapısına zarar vermeyen en yüksek kallus oluşumunu sağlayan dozların belirlenmesine çalışılacaktır.

Bu tezin amacı, sentetik oksinlerden olan ve biyoteknolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan 2,4-D'nin ve buna alternatif olabilecek picloramın, bitki ıslahında önemli yeri olan yabani buğdaylarda kallus oluşturma amacıyla kullanılma olanaklarının ve kromozomal yapıya olan fiziksel etkilerinin belirlenmesidir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

Araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Materyal olarak, ülkemizde yetiştirilen 2 adet yerel kavuzlu buğday türü kullanılmıştır.

Materyal olarak kullanılan yerel kavuzlu buğday çeşitleri T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Türkiye Tohum Gen Bankası'ndan ve yetiştirildikleri illerden temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan yerel kavuzlu buğday türlerine ait özellikler aşağıda verilmiştir.

***Triticum monococcum* L. (Kaplıca ya da siyez buğdayı):** Kaplıca buğdayı diploid formda olup $2n=14$ kromozom yapısındadır. Başakçıkları sivri, ince, kılçıklı, dar ve basıktır. Kırılgan bir yapısı vardır. Başakçıklarda sadece bir adet fertil çiçek bulunur ve böylece tek bir tohum verir. Tohumlar açık kırmızı renktedir. Kavuzları harmandan sonra da kalır. Genetik yapısı değişmemiş, saf buğday olma özellikleri ve geçmişinin çok gerilere dayanması ile antik buğday grubu içinde yer alır. Tek başakçıklı olması ve sıkı kavuz yapısı itibarı ile hastalık ve zararlılara dayanıklı, kurak şartlarda ve fakir topraklarda rekabet gücü yüksek bir tür olarak bilinen kaplıca buğdayının, yapılan çalışmalarda yüksek yağ içeriğine ve ekmeçlik buğdaya göre daha fazla sarı lutein oranına sahip olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca tam tahıl tüketimiyle ilişkili sağlık yararları ve düşük glisemik indekse sahip olmasının yanında, fonksiyonel gıda olarak da protein, fenolikler, tokoferoller ve karotenoidler açısından diğer buğday türlerine göre daha zengin bir yapıda olduğu tespit edilmiştir. Karbonhidrat değeri düşüktür, B kompleks vitaminleri ,E, K2 vitamini, çinko, magnezyum, demir, krom gibi mineraller de içerir.

***Triticum dicoccum* Schubl. (Gernik buğdayı):** Gernik buğdayı tetraploid formda olup $2n=28$ kromozom yapısındadır. Gernik buğdayında başakçıklar iki tanelidir. Başakları sık ve yassıdır. Başakçıklar 2 çiçek içerir ve kılçıklıdır. Taneler kavuz içinde kapalı kalırlar. Başak eksenini zayıf ve gevrekçektir. Kavuzları taneye yapışık değildir. Kavuzlar incedir ve kavuzların her iki ucu da sivridir. Gernik buğdayının yaprakları tüylüdür.

Çalışmada kullanılan deney ekipmanları;

- Hassas Terazi: Hava akımlarını engelleyen özel cam paravanlı hassas terazi kullanılmıştır.
- İnkübatör: Sıcaklığı 100°C'ye kadar ayarlanabilen inkübatör kullanılmıştır.
- Karıştırıcı (Vortex): Hızı elle ayarlanabilen masa tipi karıştırıcı kullanılmıştır.
- Mikroskop: Olympus marka BX51/BX52 modelinde binoküler ışık mikroskobu kullanılmıştır.
- Mikropipet: 20, 200 ve 1000 µl arası ayarlanabilen mikropipet ve bunlara uygun pipet uçları kullanılmıştır.
- pH Metre: Hassas ölçümler yapabilen laboratuvar tipi pH metre kullanılmıştır.
- Steril Kabin: Sürgülü cam kapaklı, UV lambalı ve hava filtreli kabin kullanılmıştır.

4.2. Yöntem

4.2.1. *In vitro* yöntemler

Araştırmada bitki büyüme düzenleyicisi olarak sentetik oksin olan farklı 2,4-D ve picloram dozları kullanılmıştır. Kontrol dozu olarak 0 dozu kullanılmış olup, her iki bitki büyüme düzenleyicisi için 3, 6, 9, 12 mg/l olmak üzere, 4 farklı 2,4-D ve 4 farklı picloram dozlarından oluşan toplam 10 dozda incelemeler yapılmıştır.

Çalışmalarda kullanılan buğday türlerinde, doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan sentetik oksinler 2,4-D'nin (dichlorophenoxyacetic acid) ve günümüzde kullanılmaya başlanılan picloramin (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) kallus gelişimi ve rejenerasyon üzerine olan etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve en yüksek kallus oluşum değerlerini veren 2,4-D ve picloram dozlarına ait bitki örneklerinin kallus ağırlığı, kallus oluşturma yüzdesi, rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkisi değerleri hesaplanarak belirlenmiştir.

4.2.1.1. Kullanılan ekipmanların sterilizasyonu

In vitro çalışmalarda, çalışmanın yürütüldüğü laboratuvarın ve kullanılan tüm ekipmanların steril olması bakteriyel bulaşma olmadan başarılı sonuçlar elde edilmesinde büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle her çalışma öncesinde kullanılacak ekipmanların özelliklerine göre sterilizasyonu sağlanmıştır.

Tohumların yüzey sterilizasyonunda kullanılan kavanozların ağızları kalın alüminyum kapaklarla kapatılarak, içine ortam dökülen ve diğer amaçlarla kullanılan petri kapları ise gruplar halinde yüksek ısı derecelerine dayanıklı yanmaz kağıtlara sarılarak etüvde 200°C'de 2 saat süreyle bekletilmiştir. Kaplar, alüminyum ve kağıt koruyucular steril kabin içerisinde açıldıktan sonra kullanılmıştır.

Steril kabin içerisinde kullanılan pens ve bistüri gibi metal ekipmanların sterilizasyonunda ise %70'lik (v/v) etil alkol ve doğal gaz alevi kullanılmıştır. Embriyoların endospermden ayrılmasında kullanılan bistüri ucu gerekli görüldükçe yeni steril uç (Surgeon, no:11) ile değiştirilmiştir.

4.2.1.2. Steril distile su hazırlanması

Musluk suyunda erimiş halde bulunan mineraller, çalışmalarda kullanılan ortam formüllerindeki besin maddelerinin hassas dengesini bozucu yönde etki ederken, sudaki klor da toksik etkide bulunarak kültürün gelişmesini engellemektedir. Bu nedenle laboratuvar çalışmalarında suyun kaynatılıp buharının soğutulması ilkesiyle çalışan distilasyon cihazı ile elde edilen distile su kullanılmaktadır. Çalışmanın ortam hazırlama ve tohumların yüzey sterilizasyonu aşamalarında kullanılan distile su, otoklavda 121°C'de 15 psi basınç altında 25 dakika tutularak steril edilmiştir. (131)

4.2.1.3. Stok 2,4-D çözeltisinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan sentetik oksin olan 2,4-D ve picloram için 50 ml'lik 1 mg/ml (1:1) oranında stok çözelti hazırlanmıştır. (131)

1 mg/ml'lik 2,4-D stok çözeltisi için 0.025 g 2,4-D tartım kağıdı üzerinde hassas terazide tartılarak falcon tüpüne alınmıştır ve birkaç damla alkol ve birkaç damla NaOH içerisinde vorteks yardımıyla çözüldürülmüştür. Daha sonra 50 ml'ye kadar saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

1 mg/ml'lik picloram stok çözeltisi için 0.025 g picloram tartım kağıdı üzerinde hassas terazide tartılarak falcon tüpüne alınmıştır ve 50 ml NaOH içerisinde vorteks yardımıyla çözüldürülmüştür. Hazırlanan stok çözelti +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

4.2.1.4. Besin ortamlarının hazırlanması

Olgunlaşmış embriyolardan kallus gelişiminin sağlanması için hazır MS (56), sukroz ve agar ile katı besin ortamları hazırlanmıştır. Besin ortamı, formülünde belirtilen organik, inorganik ve diğer maddelerden oluşan, bitkilere topraktan karşıladıkları her türlü besin maddesi ve su gereksinimlerini in vitro koşullarda sağlayan karışımdır.

Hazırlanan ortamlara her doz için gerekli miktarda bitki büyüme düzenleyicisi eklenmiştir.

Buna göre 500 ml'lik besin ortamı hazırlamak için;

- 1000 ml'lik behere 450 ml distile su konulmuş ve içine uygun büyüklükte bir balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir.
- 2.21 g MS (Sigma),
- 10 g sukroz (Sigma) tartılarak su içerisine ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı ile tamamen erimeleri sağlanmıştır.
- Farklı 2,4-D ve picloram dozları olarak 0, 3, 6, 9, 12 mg/l'lik yaygın olarak kullanılan yoğunluklar uygulanmıştır.
- 0 mg/l'lik dozlar için bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmamıştır.
- Her biri 3 mg/l 2,4-D ve picloram içeren besin ortamı hazırlamak için, 1 mg/l'lik hazır stoklardan mikropipet yardımıyla 1500 µl çekilerek ortama eklenmiştir.
- Her biri 6 mg/l 2,4-D ve picloram içeren besin ortamı hazırlamak için, 1 mg/l'lik hazır stoklardan mikropipet yardımıyla 3000 µl çekilerek ortama eklenmiştir.
- Her biri 9 mg/l 2,4-D ve picloram içeren besin ortamı hazırlamak için, 1 mg/l'lik hazır stoklardan mikropipet yardımıyla 4500 µl çekilerek ortama eklenmiştir.

- Her biri 12 mg/l 2,4-D ve picloram içeren besin ortamı hazırlamak için, 1 mg/l'lik hazır stoklardan mikropipet yardımıyla 6000 µl çekilerek ortama eklenmiştir.
- Hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.
- 1 N NaOH ve 1N HCl kullanılarak pH, kallus gelişimi için en uygun değer olan 5.8' e ayarlanmıştır.
- Ortamı katılaştırmak için 1.75 g agar tartılarak Duran şişesine konulmuş ve hazırlanan ortamlar 250 ml ölçülerek üzerine eklenmiştir.
- Şişe kapağı tam olarak sıkılmadan ortam, otoklavda (121°C, 1.2 psi basınç, 25 dakika) steril edilmiştir.
- Daha sonra biraz soğutularak steril kabindeki önceden steril edilmiş olan 10 cm'lik petri kaplarına, her birine yaklaşık 30 ml gelecek şekilde dökülmüştür.
- Steril kabin içerisindeki ortamların yaklaşık yarım saat süre ile soğutularak katılaşması sağlanmış ve petrilerin kapakları kapatılarak hava almasını önlemek amacıyla kenarları streç film ile kaplanmıştır.

4.2.1.5. Eksplantların yüzey sterilizasyonu

Eksplant olarak olgun embriyoların kullanıldığı çalışmada öncelikle yerel kavuzlu buğday türlerinin kavuzları elle mekanik olarak ayrılmıştır ve ardından yüzey sterilizasyonu steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.(131)

- Tohumlar kavanozlara konularak (85 tohum/kavanoz) manyetik karıştırıcı yardımıyla (200 devir/dakika) %70'lik (v/v) alkolde 5 dakika süresince çalkalanmıştır.
- Tohumlar üç kez steril distile su ile yıkanmış, yıkama süreleri 30 saniye olarak uygulanmıştır.
- Daha sonra tohumlar %5'lik (v/v) ticari sodyum hipoklorit (Ace, Colgate Palmolive Co.) solüsyonunda manyetik karıştırıcı yardımıyla (200 devir/dakika) 25 dakika süresince çalkalanmıştır.
- Tohumlar yedi kez steril distile su ile yıkanarak sodyum hipokloritin ortamdan uzaklaşması sağlanmış, yıkama süreleri 30 saniye olarak uygulanmıştır.
- Tohumların bulunduğu kavanozlar yarıya kadar steril distile su ile doldurularak su banyosunda (33°C), 2 saat süre ile şişirilerek embriyo çıkarma aşamasına hazır hale getirilmiştir.

4.2.1.6. Kallus oluşumu aşaması

Sterilizasyonu tamamlanmış embriyoların, canlılıkları bozulmadan tohumlarından ayrılması ve daha önceden hazırlanmış ortamlarına aktarılması büyük önem taşımaktadır. (131)

- Steril ve yumuşamış tohumların embriyoları steril kabin içerisinde bistüri ve pens yardımıyla endospermilerinden ayrılmıştır.
- Embriyolar kalkancıkları ortama değmeyecek şekilde kallus ortamı içeren petri kaplarına 10'ar adet yerleştirilmiştir. Çalışma her bitki büyüme düzenleyicisi dozu için 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür.
- Petriler, hava almayacak şekilde kenarlarından streçlenerek 14 gün süre ile 26°C'deki inkübatörde karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre içinde embriyodan gelişen sürgünler ve kökler steril kabin içerisinde kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır.

4.2.1.7. Kallus gelişim aşaması

- 14 günün sonunda oluşan kalluslar, içinde buldukları petri kaplarıyla birlikte tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir.
- Steril kabinde, kallus oluşturmuş olan embriyolardan bistüri yardımıyla oluşan sürgünler ayrılarak bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen (MS-0) besin ortamlarına aktarılmıştır.
- Sürgünleri, kallus gelişim ortamını ve tartılırken kenarına sarılan streçi içeren petriler tekrar tartılmış ve aradaki fark “kallus ağırlığı” (g) olarak değerlendirilmiştir.
- Kallus oluşturan embriyo sayısı belirlenerek “kallus oluşumu “ (%) değerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

4.2.1.8. Rejenerasyon aşaması

Olgunlaşmış embriyolardan elde edilen kalluslardan kök oluşumu ve gelişimi sağlamak için rejenerasyon ortamı hazırlanmıştır. (131)

- 2,4-D uygulanarak elde edilen kalluslardan kök uçlarının oluşturulması hormonsuz MS (MS-0) ortamında yapılmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımıyla hazırlanan ortama 20 g/l sukroz, 7g/l agar ve 4.43 g/l MS ilave edilerek, pH'sı 5.8'e ayarlanmış ve 45 dakika boyunca 121°C, 1.1 kg/cm² basınçta otoklavlanarak steril edilmiştir.
- Kültür odasına yerleştirilerek 4 hafta süreyle 16 saatlik fotoperiyotta (1500 Lux) ve 25°C sıcaklıkta bekletilerek rejenere olması sağlanmıştır.
- 4 hafta sonunda genotiplerin “rejenerasyon kapasitesini” belirlemek için petri kutularındaki rejenere olmuş kallusların sayımı yapılmıştır.
- Rejenerasyon süresi boyunca geçen 4 hafta boyunca kalluslarda rejenerasyon gözlenmiştir fakat sitolojik çalışmalarda kullanılacak kökler elde edilememiştir.
- 4 hafta sonunda rejenere olan kallusların köklendirilmesi amacıyla MS-0 besin ortamı içeren jarlar hazırlanmış ve kalluslar jarlara aktarılmıştır. 16 saatlik fotoperiyotta (1500 Lux) 25°C sıcaklıktaki kültür odasında köklenmeye teşvik edilmiştir.

Kalluslardan gelişen kök uçları sitolojik çalışmada kullanılmak üzere gerekli işlemlere tabi tutulmuştur.

4.2.2. Sitolojik yöntem

Araştırma materyali olarak kullanılan *Triticum monococcum* ve *Triticum dicoccum* yerel kavuzlu buğday türlerinde, kallus gelişiminin görüldüğü farklı 2,4-D ve picloram dozları içeren besin ortamlarından alınan örneklerin rejenere olması sağlanmış ve oluşan kök uçlarından örnekler alınmıştır. Rejenere olmuş kalluslardan alınan kök uçları örneklerinde sitolojik çalışmalarla analiz edilmiş, yerel kavuzlu buğday hatlarının kromozom sayıları ve yapılarında oluşabilecek değişiklikler belirlenmeye çalışılmıştır.

4.2.2.1. Prefiksasyon aşaması

Elde edilen köklerden bistüri yardımıyla kök uçları kesilmiştir. Kök uçlarına uygulanan ilk işlem prefiksasyondur. Bu işlemin amacı kromozomları incelenebilecek düzeyde tutmaktır. α -monobromonaftalin uygulaması sonucu bu işlem ile iğ ipliklerinin oluşumu durdurulur, kromozomların kısalması ve düzelmesi sağlanır. Ayrıca bu işlem kromozomların güvenilir bir şekilde sayılmasına ve büyüklüklerinin karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır. (106)

Bu amaçla 1 ml α -monobromonaftalinin 100 ml etanol içerisinde çözündürülmesi ile hazırlanan stok çözeltiden, 1 ml alınarak 250 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. Kök uçları bu çözelti içerisinde +4°C'de buzdolabında 4 saat süre ile bekletilmiştir.

4.2.2.2. Fiksasyon aşaması

Tespit çözetisinin hazırlanması aşamasıdır. Özellikle kromozomların canlılığının hayattaki durumuna mümkün olduğu kadar yakın bir durumda tespiti önemlidir. Öldürücü tespit edici bir sıvının etkisi öncelikle, öldürme işlemini hızlı bir şekilde yapmasına bağlıdır. Böylece, ani bir şekilde, hücreler mümkün olduğu kadar hayattaki durumu bozulmadan tespit edilebilir. Tespit sıvısının, hücreler üzerinde hızlı bir sertleştirme etkisinin olması ve bunun yanı sıra sıvının dokulara mümkün olduğunca hızlı girmesi gerekmektedir.

Bu amaçla, buzdolabında α -monobromonaftalin çözeltisinde 4 saat boyunca bekletilen kök örnekleri öncelikle musluk suyu altında 5 dakika süreyle yıkanmış, daha sonra 2 defa saf su ile yıkandıktan sonra %99'luk glasiyel asetik asitte ($\text{CH}_3\text{-COOH}$) 30 dakika bekletilmiştir. (106)

4.2.2.3. Hidroliz aşaması

Köklerin 1N HCl içerisinde su banyosunda bekletilmesi aşamasıdır. Hidroliz, dokuların birbirinden ayrılıp, daha iyi gözlenebilmesi için önemlidir. Özellikle bitki dokularının feulgen ile boyanmadan önce hidroliz edilmesi gerekmektedir. Hidroliz aşamasında zaman, sıcaklık derecesi, kullanılan HCl konsantrasyonu önemlidir.

Bu aşamada, glasiyel asetik asit örneklerden mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır ve 2 kez 5'er dakika saf su ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra kök uçları 1 N HCl'de 60°C'lik sıcak su banyosunda 12 dakika süreyle bekletilmiştir. Bu işlemin ardından örnekler saf su il 5 dakika yıkanmıştır. (106)

4.2.2.4. Boyama aşaması

Bu aşamada, hidrolizden çıkan örnekler boya içinde bekletilerek, kök uçlarının boyanması sağlanmaktadır. Kök uçları oda sıcaklığında 2 saat süreyle feulgen boyada bekletilip, daha sonra +4°C'de buzdolabında tüm gece boyunca bekletilmiştir. Feulgen, örnekler Hcl ile hidroliz edildikten sonra kullanılmaktadır. Feulgenin yapılışında kullanılan fuksin bazik çözeltilisi kromatini seçici olarak boyamaktadır. Feulgenin boyamadaki etkisi aldehit reaksiyonuna bağlıdır. (106)

Boyanmış kök ucu örneklerinden preparatlar hazırlanarak feulgen boya ile mitotik metafaz döneminde mikroskopta inceleme yapılmıştır.

4.2.2.4.1. Feulgen boyasının hazırlanması

Feulgen boyasının hazırlanması için 1 g kristal halindeki bazik fuksin tartılmış ve küçük bir havanda ezilmiştir. 500 ml'lik erlenmayerin içine ezilmiş olan bazik fuksin dikkatli bir şekilde etrafına bulaştırılmadan konulmuştur. Bir başka erlenmayerde 200 ml'lik damıtık su kaynatılarak, kaynayan suya toz halindeki bazik fuksin ilave edilmiştir. 50°C'ye soğuyuncaya kadar karıştırılmıştır. 20 ml'lik 1 N HCl ilave edildikten sonra filtre kağıdı (Whatmann No:1) ile süzölmüştür. Karışıma 2 g potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) ilave edilmiştir. Boya, şişeye konulup ağzı sıkıca kapatılarak karanlıkta bir gece boyunca bekletilmiştir. Başlangıçta vişne çürüğü renginde olan boya açık çay rengini almıştır. Hazırlanan boya şişesinin etrafı alüminyum folyo ile sarılarak, +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. (106)

4.2.2.5. Preparatların hazırlanması ve mikroskopta incelenmesi

Buzdolabında muhafaza edilen feulgen boya içerisindeki kök ucu örnekleri pens yardımıyla alınmıştır ve içinde saf su bulunan petriye konulmuştur. Kök uçları saf su

içerisinde 10 dakika bekletilip, üzerindeki suyunu uzaklaştırmak için filtre kağıdı üzerine alınmıştır. Daha sonra lamın üzerine alınıp, kökün uç kısmında kalan ve daha koyu boyanmış olan kısa bölge bistüri yardımıyla kesilmiştir. Uzun bölge uzaklaştırılmıştır. Lamın üzerinde bulunan kök ucunun üzerine bir damla asetik asit damlatılmış ve bistüri yardımıyla çok küçük parçalara ayrılması sağlanmıştır. Lamel 45°C'lik açı ile lamın üzerine içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde özenle kapatılmıştır. Lamelin sabit kalmasına dikkat edilerek, üzerine filtre kağıdı bastırılıp fazla su alınmıştır. Kurşun kalemin arkası yardımıyla örneklerin üzerine hafif şekilde vurularak ezilmeleri sağlanmıştır. Bu işlem hücrelerin parçalanıp, kromozomların birbirinden ayrılması amacıyla uygulanmıştır.

Hazırlanan preparat öncelikle sırasıyla 5x, 10x, 20x ve 40x'lik objektiflerle incelenmiştir. İstenilen görüntü sağlandıktan sonra immersiyon yağı damlatılmış ve 100x'lik objektifte bulunan görüntünün fotoğrafı kaydedilmiştir.

4.2.3. Verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesi

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, her uygulama, içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü olarak 10 cm'lik petri kutularından oluşmuştur.

In vitro çalışmalarda kallus oluşumu (%), kallus ağırlığı (g), rejenerasyon kapasitesi (%) ve kültür etkisi (%) parametreleri incelenmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi MSTAT-C paket programı ile yapılmıştır.

Kallus oluşumu(%); kültürün 14. gününde kallusların sayılması ve kallus oluşturan embriyo sayısının, petride kültüre alınmış toplam embriyo sayısına oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Kallus ağırlığı (g); kültürün 14. gününde oluşan kallusların hassas terazide tartılmasıyla hesaplanmıştır. Rejenerasyon kapasitesi (%); kallusların rejenerasyon ortamına alınmasından 4 hafta sonra rejeneren olan kallusların, oluşan kallus sayısına oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Kültür etkisi (%); rejeneren olan kallus sayısının, kültüre alınan embriyo sayısına oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

In vivo çalışmalarda kök uçlarından elde edilen kromozom sayıları değerlendirilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Gen merkezleri ülkemizde bulunan, genetik materyal olarak üstün özellikler taşıyan önemli gen kaynaklarından *Triticum monococcum* ve *Triticum dicoccum* yerel kavuzlu buğday çeşitlerinin olgun embriyoları; farklı dozlarda 2,4-D ve picloram (0, 3, 6, 9, 12 mg/l) içeren kültür ortamlarında kallus oluşumu için teşvik edilmiştir. Elde edilen kalluslar rejenerasyon ortamına transfer edilerek, rejenere olmaları sağlanmıştır. Rejenere olan bitkilerin kök uçlarından alınan örneklerde sitolojik çalışmalar yapılmış ve her iki türde mitoz bölünmenin metafaz evresinde kromozom yapısında ve sayısında değişiklik oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen tüm bulguların sonuçları ve değerlendirmeleri bu bölümde sunulmuştur.

5.1. *Triticum monococcum* Çeşidinin Farklı 2,4-D ve Picloram Dozlarında *In vitro* Parametrelere Olan Tepkisi

Triticum monococcum yerel kavuzlu buğday çeşidinin olgun embriyolarına uygulanan 4 farklı dozda 2,4-D ve picloramın; “Kallus Oluşturma Yüzdesi”, “Kallus Ağırlığı”, “Rejenerasyon Kapasitesi”, “Kültür Etkinliği” parametreleri incelenmiştir. Elde edilen veriler ile varyans analizi yapılmış olup, Asgari Önem Farkı (AÖF) testi ile değerlendirilmiştir.

5.1.1. Farklı Dozlarda 2,4-D ve Picloram Uygulanan *Triticum monococcum*'da Kallus Oluşturma Oranı

Triticum monococcum yerel kavuzlu buğday çeşidinin olgun embriyoları, 4 farklı dozda 2,4-D ve picloram içeren kültür ortamlarına yerleştirilmiş, 26°C'de karanlık ortamda 14 gün boyunca kallus teşviki amacıyla kültüre alınmıştır. 14 gün sonunda elde edilen kalluslar sayılmıştır. Oluşan kallus sayısı, kültüre alınan toplam embriyo sayısına oranlanarak, kallus oluşturma oranı hesaplanmıştır (Çizelge 5.2). Elde edilen veriler ile varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.1). Çizelge 5.1'de görüldüğü gibi kallus oluşturma oranı bakımından *Triticum monococcum*'da 2,4-D ve picloram dozları arasındaki farkın %5 ve %1 düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur. Dozlar arasındaki farklılığı belirlemek

amacıyla yapılan AÖF testi sonuçları Çizelge 5.2’te verilmiştir. AÖF testine göre 3 farklı grup oluşmuştur.

Çizelge 5.1. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın *Triticum monococcum*’un olgun embriyolarının kallus oluşumuna olan etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F
Hormon(A)	1	83.333	83.333	2.5000
Dozlar (B)	4	44713.333	11178.333	335.3500**
AxB	4	366.667	91.667	2.7500*
Hata	20	666.667	33.333	
Toplam	29	45830.000		

**P< 0.01 düzeyinde önemli

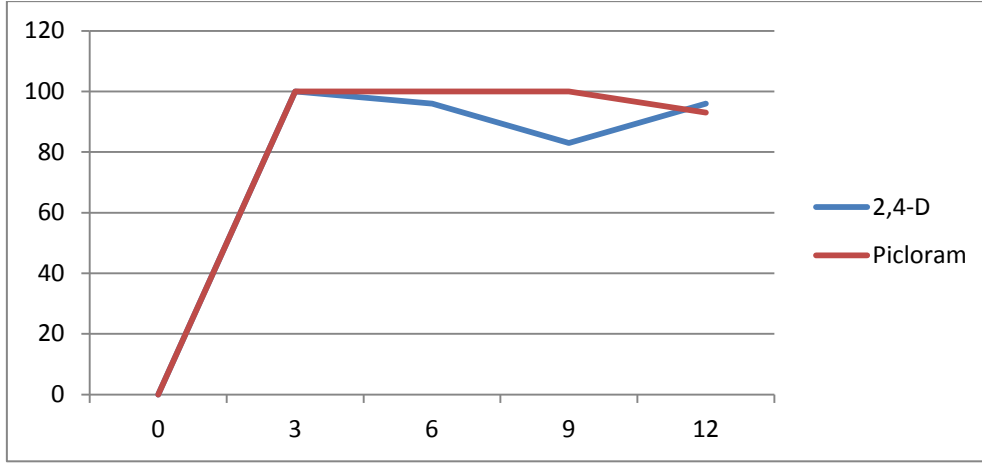
*P< 0.05 düzeyinde önemli

Varyasyon katsayısı: %7.50

Çizelge 5.2. *Triticum monococcum*’un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kallus oluşumuna olan etkisine ilişkin AÖF testi

DOZ (mg/l)	2,4-D	Picloram
0	0 C	0 C
3	100.000 A	100 A
6	96.667 A	100 A
9	83.333 B	100 A
12	96.667 A	93.333 A

AÖF:9.833



Şekil 5.1. *Triticum monococcum*'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarında kallus oluşturma oranı

5.1.2. Farklı Dozlarda 2,4-D ve Picloram Uygulanan *Triticum monococcum*'da Kallus Ağırlığı

Farklı 2,4-D ve picloram dozlarında kallus teşviki amacıyla inkübasyona alınan *Triticum monococcum* çeşidine ait olgun embriyolardan elde edilen kalluslar, 14 gün sonunda tartılarak ağırlıkları hesaplanmıştır. Kallus ağırlıklarına ilişkin varyans analizi Çizelge 5.3'te verilmiştir. Farklı dozların kallus ağırlığına olan etkisinin %1 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür. Dozlar arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla yapılan AÖF testi sonuçları Çizelge 5.4'te yer almaktadır. AÖF testine göre 6 farklı grup oluşmuştur.

Çizelge 5.3. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın *Triticum monococcum*'un olgun embriyolarının kallus ağırlığına olan etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F
Hormon(A)	1	1.300	1.300	61.6059**
Dozlar (B)	4	4.852	1.213	57.4788**
AxB	4	0.460	0.115	5.4546**
Hata	20	0.422	0.021	
Toplam	29	7.034		

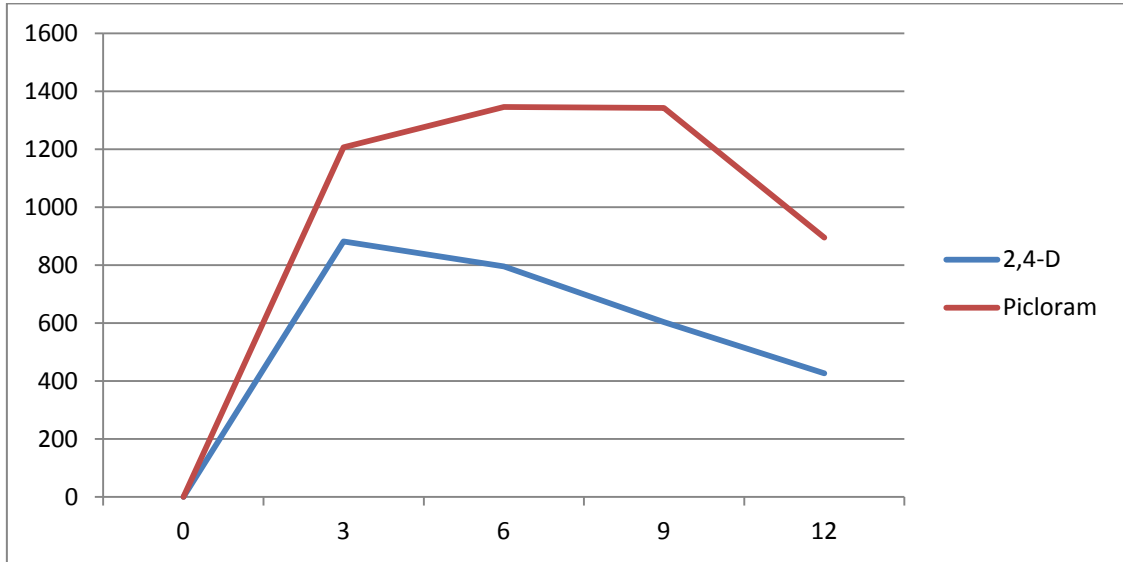
**P< 0.01 düzeyinde önemli

Varyasyon katsayısı: %19.39

Çizelge 5.4. *Triticum monococcum*'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kallus ağırlığına olan etkisine ilişkin AÖF testi

DOZ (mg/l)	2,4-D	Picloram
0	0.000 E	0.000 E
3	0.882 B	1.206 A
6	0.795 BC	1.345 A
9	0.603 CD	1.342 A
12	0.427D	0.895 B

AÖF: 0.2468



Şekil 5.2. *Triticum monococcum*'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarında elde edilen kallus ağırlıkları

5.1.3. Farklı Dozlarda 2,4-D ve Picloram Uygulanan *Triticum monococcum*'da Rejenerasyon Kapasitesi

14 gün sonunda elde edilen kalluslar hormonsuz MS ortamında transfer edilerek, 26°C'de 16 saat karanlık, 8 saat aydınlık fotoperiyod koşulları altında rejenerasyona teşvik

edilmiştir. Işıklı ortama geçen kalluslardan hızla sürgün gelişimi gözlenmeye başlamıştır. 4 hafta sonunda rejenere olan kallus sayısı, ortama konulan toplam kallus sayısına oranlanarak rejenerasyon kapasitesi hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ile varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.5). Farklı dozların rejenerasyon kapasitesine olan etkisinin %1 düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Dozlar arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla yapılan AÖF testi sonuçları Çizelge 5.6'da yer almaktadır. AÖF testi sonuçlarına göre 7 farklı grup oluşmuştur.

Çizelge 5.5. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın *Triticum monococcum*'un olgun embriyolarının rejenerasyon kapasitesine olan etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F
Hormon(A)	1	10868.033	10868.033	179.2419**
Dozlar (B)	4	22436.800	5609.200	92.5102**
AxB	4	3619.467	904.867	14.9236**
Hata	20	1212.667	60.633	
Toplam	29	38136.967		

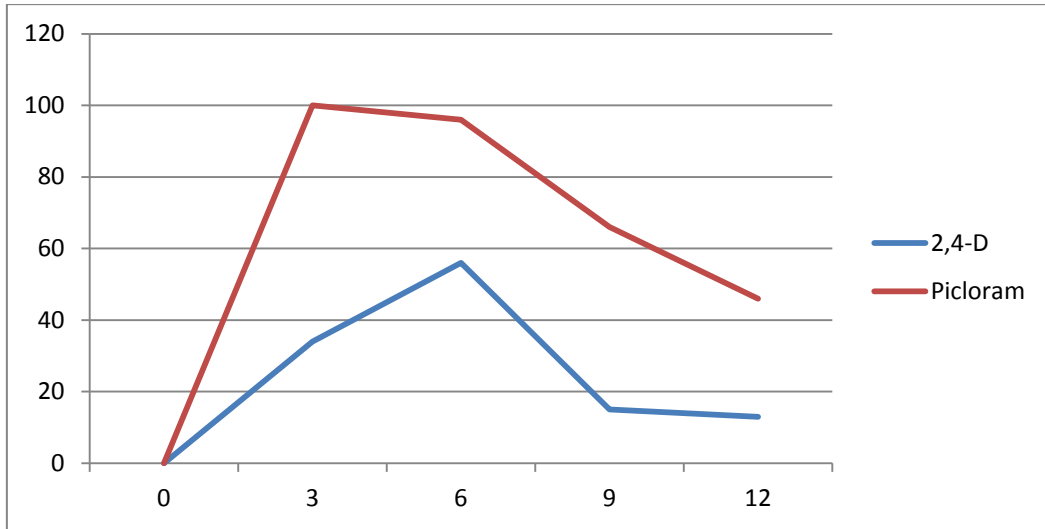
**P< 0.001 e göre önemli

Varyasyon katsayısı: %18.12

Çizelge 5.6. *Triticum monococcum*'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın rejenerasyon kapasitesine olan etkisine ilişkin AÖF testi

DOZ	2,4-D	Picloram
0	0.00 F	0.00 F
3	34.333 D	100 A
6	56.667 BC	96.667 A
9	15.333 E	66.667 B
12	13.333 E	46.667 CD

AÖF:13.26



Şekil 5.3. *Triticum monococcum*'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarına bağlı rejenerasyon kapasitesi

5.1.4. Farklı Dozlarda 2,4-D ve Picloram Uygulanan *Triticum monococcum*'da Kültür Etkinliği

Kültür etkinliği; rejenere olan kallus sayısının, kültüre alınan toplam embriyo sayısına oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ile varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.7). Farklı dozların kültür etkinliğine olan etkisinin %1 düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Dozlar arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla yapılan AÖF testi sonuçları Çizelge 5.8'de yer almaktadır. AÖF testi sonuçlarına göre 4 farklı grup oluşmuştur.

Çizelge 5.7. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın *Triticum monococcum*'un olgun embriyolarının kültür etkisine olan etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F
Hormon(A)	1	10453.333	10453.333	149.333**
Dozlar (B)	4	22880.000	5720.0	81.7143**
AxB	4	3946.667	986.667	14.0952**
Hata	20	1400.00	70	
Toplam	29	38680		

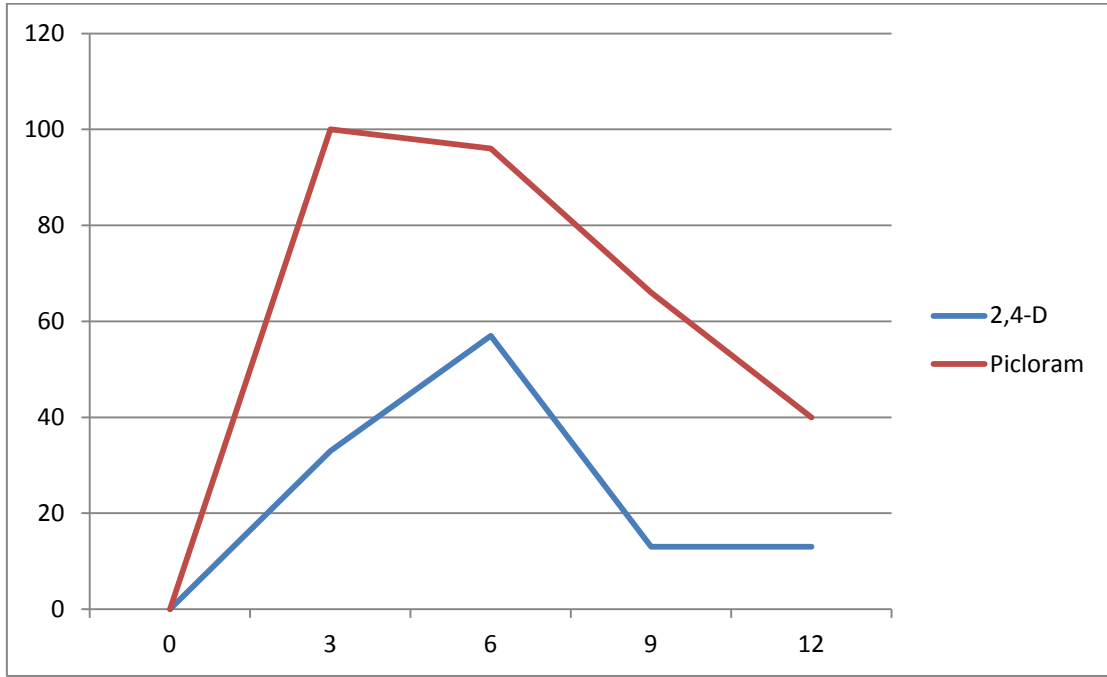
**P< 0.01 e göre önemli

Varyasyon katsayısı: %19.92

Çizelge 5.8. *Triticum monococcum*'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kültür etkisine olan etkisine ilişkin AÖF testi

DOZ	2,4-D	Picloram
0	0 D	0 D
3	33.333 C	100 A
6	56.667 B	96.667 A
9	13.333 D	66.667 B
12	13.333 D	40 C

AÖF: 14.25



Şekil 5.4. *Triticum monococcum*'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarına bağlı kültür etkinliği

5.2. *Triticum dicoccum* Çeşidinin Farklı 2,4-D ve Picloram Dozlarında *In vitro* Parametrelere Olan Tepkisi

Triticum dicoccum yerel kavuzlu buğday çeşidinin olgun embriyolarına uygulanan 4 farklı dozda 2,4-D ve picloramın; “Kallus Oluşturma Yüzdesi”, “Kallus Ağırlığı”, “Rejenerasyon

Kapasitesi”, “Kültür Etkinliği” parametreleri incelenmiştir. Elde edilen veriler ile varyans analizi yapılmış olup, Asgari Önem Farkı (AÖF) testi ile değerlendirilmiştir.

5.2.1. Farklı Dozlarda 2,4-D ve Picloram Uygulanan *Triticum dicoccum*'da Kallus Oluşturma Oranı

Triticum dicoccum yerel kavuzlu buğday çeşidinin olgun embriyoları, 4 farklı dozda 2,4-D ve picloram içeren kültür ortamlarına yerleştirilmiş, 26°C'de karanlık ortamda 14 gün boyunca kallus teşviki amacıyla kültüre alınmıştır. 14 gün sonunda elde edilen kalluslar sayılmıştır. Oluşan kallus sayısı, kültüre alınan toplam embriyo sayısına oranlanarak, kallus oluşturma oranı hesaplanmıştır (Çizelge 5.10). Elde edilen veriler ile varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.9). Çizelge 5.9'da görüldüğü gibi kallus oluşturma oranı bakımından *Triticum dicoccum*'da 2,4-D ve picloram dozları arasındaki farkın %1 düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur. Dozlar arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla yapılan AÖF testi sonuçları Çizelge 5.10'te verilmiştir. AÖF testine göre 4 farklı grup oluşmuştur.

Çizelge 5.9. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın *Triticum dicoccum*'un olgun embriyolarının kallus oluşumuna olan etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F
Hormon(A)	1	3.333	3.333	0.0357
Dozlar (B)	4	41653.333	10413.333	111.5714**
AxB	4	813.333	203.333	2.1786
Hata	20	1866.667	93.333	
Toplam	29	44336.667		

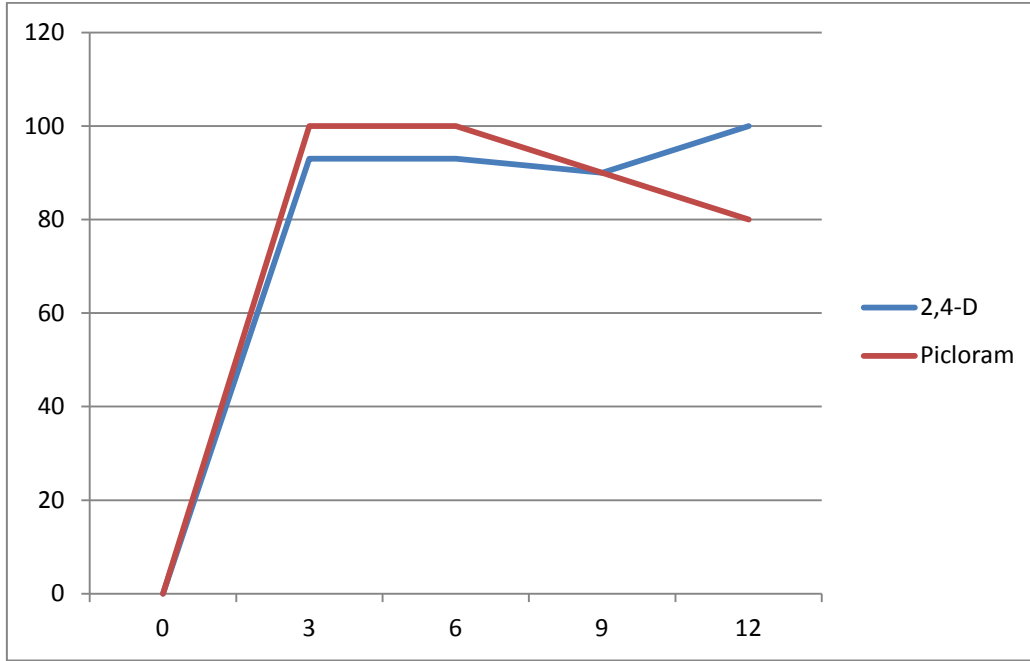
**P< 0.01 e göre önemli

Varyasyon katsayısı: %13.00

Çizelge 5.10. *Triticum dicoccum*'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kallus oluşumuna olan etkisine ilişkin AÖF testi

DOZ	2,4-D	Picloram
0	0 C	0 C
3	93.333 AB	100.000 A
6	93.333 AB	100.000 A
9	90.000 AB	90.000 AB
12	100.000 A	80.000 B

AÖF=16,45



Şekil 5.5. *Triticum dicoccum*'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarına bağlı kallus oluşturma oranı

5.2.2. Farklı Dozlarda 2,4-D ve Picloram Uygulanan *Triticum dicoccum*'da Kallus Ağırlığı

Farklı 2,4-D ve picloram dozlarında kallus teşviki amacıyla inkübasyona alınan *Triticum dicoccum* çeşidine ait olgun embriyolardan elde edilen kalluslar, 14 gün sonunda tartılarak ağırlıkları hesaplanmıştır. Kallus ağırlıklarına ilişkin varyans analizi Çizelge 5.11'de

verilmiştir. Farklı dozların kallus ağırlığına olan etkisinin %1 ve %5 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür. Dozlar arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla yapılan AÖF testi sonuçları Çizelge 5.12’de yer almaktadır. AÖF testine göre 5 farklı grup oluşmuştur.

Çizelge 5.11. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın *Triticum dicoccum*’un olgun embriyolarının kallus ağırlığına olan etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F
Hormon(A)	1	0.056	0.056	5.0124*
Dozlar (B)	4	2.859	0.715	64.2934**
AxB	4	0.073	0.018	1.6318
Hata	20	0.222	0.011	
Toplam	29	3.210		

**P< 0.01 e göre önemli

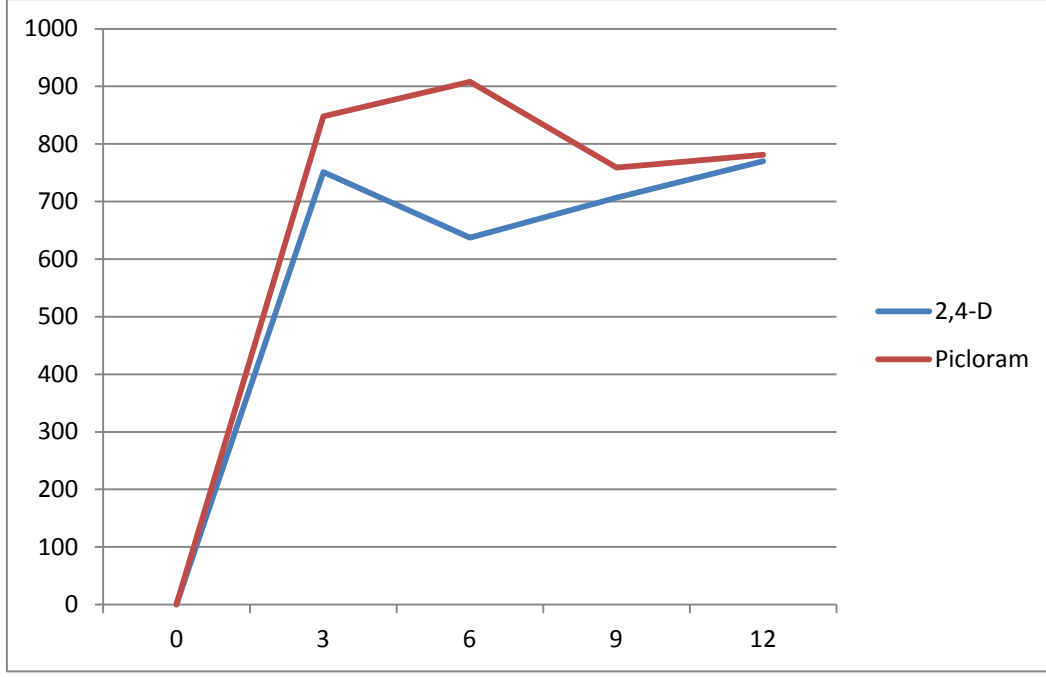
*P< 0.05 e göre önemli

Varyasyon katsayısı: %17.12

Çizelge 5.12. *Triticum dicoccum* ’un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kallus ağırlığına olan etkisine ilişkin AÖF testi

DOZ	2,4-D	Picloram
0	0 D	0 D
3	0.751 ABC	0.848 AB
6	0.637 C	0.908 A
9	0.707 BC	0.759 ABC
12	0.770 ABC	0.781 ABC

AÖF: 0,1786



Şekil 5.6. *Triticum dicoccum*'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarında elde edilen kallus ağırlıkları

5.2.3. Farklı Dozlarda 2,4-D ve Picloram Uygulanan *Triticum dicoccum*'da Rejenerasyon Kapasitesi

14 gün sonunda elde edilen kalluslar hormonsuz MS ortamında transfer edilerek, 26°C'de 16 saat karanlık, 8 saat aydınlık fotoperiyod koşulları altında rejenerasyona teşvik edilmiştir. Işıklı ortama geçen kalluslardan hızla sürgün gelişimi gözlenmeye başlamıştır. 4 hafta sonunda rejenere olan kallus sayısı, ortama konulan toplam kallus sayısına oranlanarak rejenerasyon kapasitesi hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ile varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.13). Farklı dozların rejenerasyon kapasitesine olan etkisinin %1 düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Dozlar arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla yapılan AÖF testi sonuçları Çizelge 5.14'te yer almaktadır. AÖF testi sonuçlarına göre 5 farklı grup oluşmuştur.

Çizelge 5.13. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın *Triticum dicoccum*'un olgun embriyolarının rejenerasyon kapasitesine olan etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F
Hormon(A)	1	3808.133	3808.133	68.5738**
Dozlar (B)	4	30783.533	7695.883	138.5813**
AxB	4	3078.867	769.717	13.8604**
Hata	20	1110.667	55.533	
Toplam	29	38781.200		

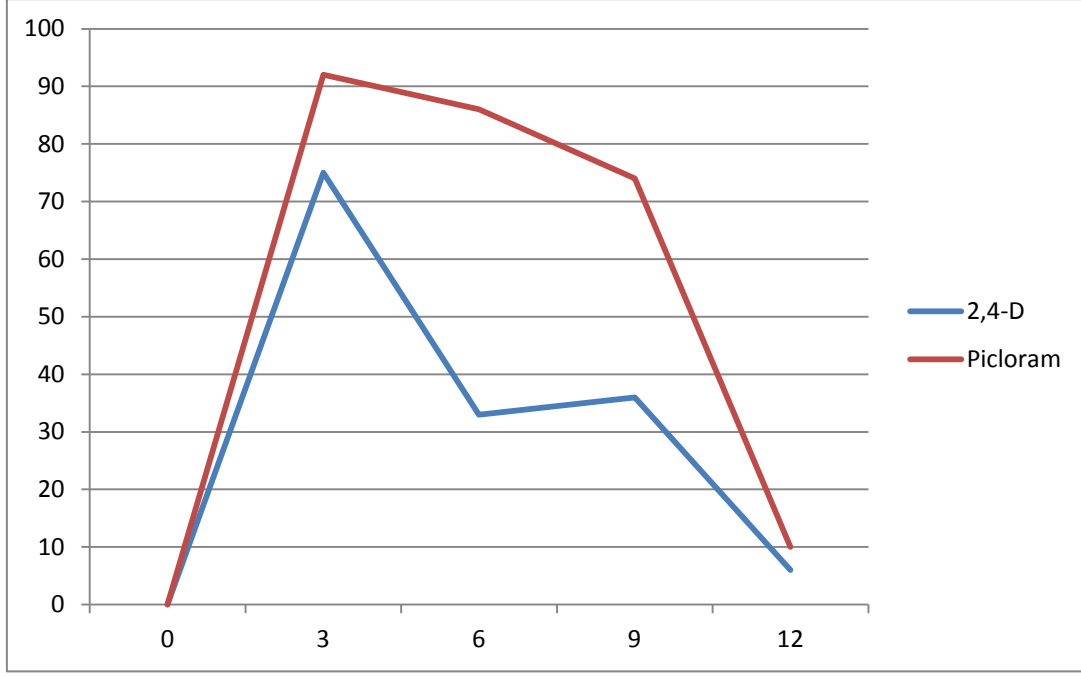
**P< 0.01 e göre önemli

Varyasyon katsayısı: %17.91

Çizelge 5.14. *Triticum dicoccum*'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın rejenerasyon kapasitesine olan etkisine ilişkin AÖF testi

DOZ	2,4-D	Picloram
0	0 D	0 D
3	75.000 B	92.667 A
6	33.333 C	86.667 AB
9	36.667 C	74.333 B
12	6.667 D	10.667 D

AÖF: 12.69



Şekil 5.7. *Triticum dicoccum*'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarına bağlı rejenerasyon kapasitesi

5.2.4. Farklı Dozlarda 2,4-D ve Picloram Uygulanan *Triticum dicoccum*'da Kültür Etkinliği

Kültür etkinliği; rejenere olan kallus sayısının, kültüre alınan toplam embriyo sayısına oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ile varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 5.15). Farklı dozların kültür etkinliğine olan etkisinin %1 düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir. Dozlar arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla yapılan AÖF testi sonuçları Çizelge 5.16'da yer almaktadır. AÖF testi sonuçlarına göre 4 farklı grup oluşmuştur.

Çizelge 5.15. Farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın *Triticum dicoccum*'un olgun embriyolarının kültür etkisine olan etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F
Hormon(A)	1	4320.000	4320.000	92.5714**
Dozlar (B)	4	29500.000	7375.000	158.0357**
AxB	4	3246.667	811.667	17.3929**
Hata	20	933.333	46.667	
Toplam	29			

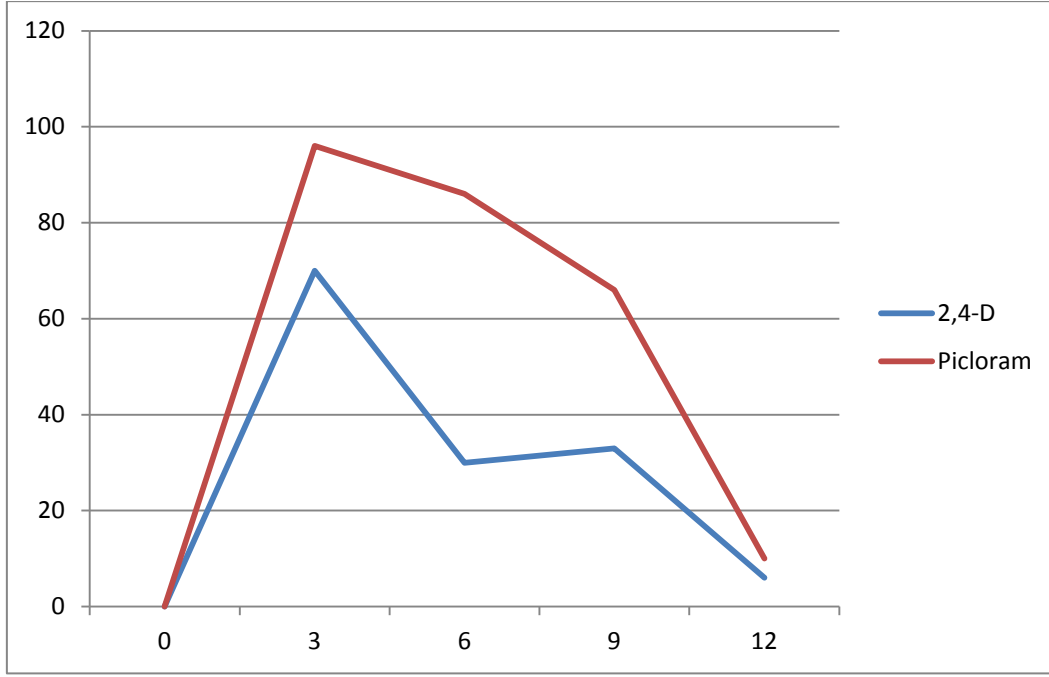
**P< 0.01 e göre önemli

Varyasyon katsayısı: %17.08

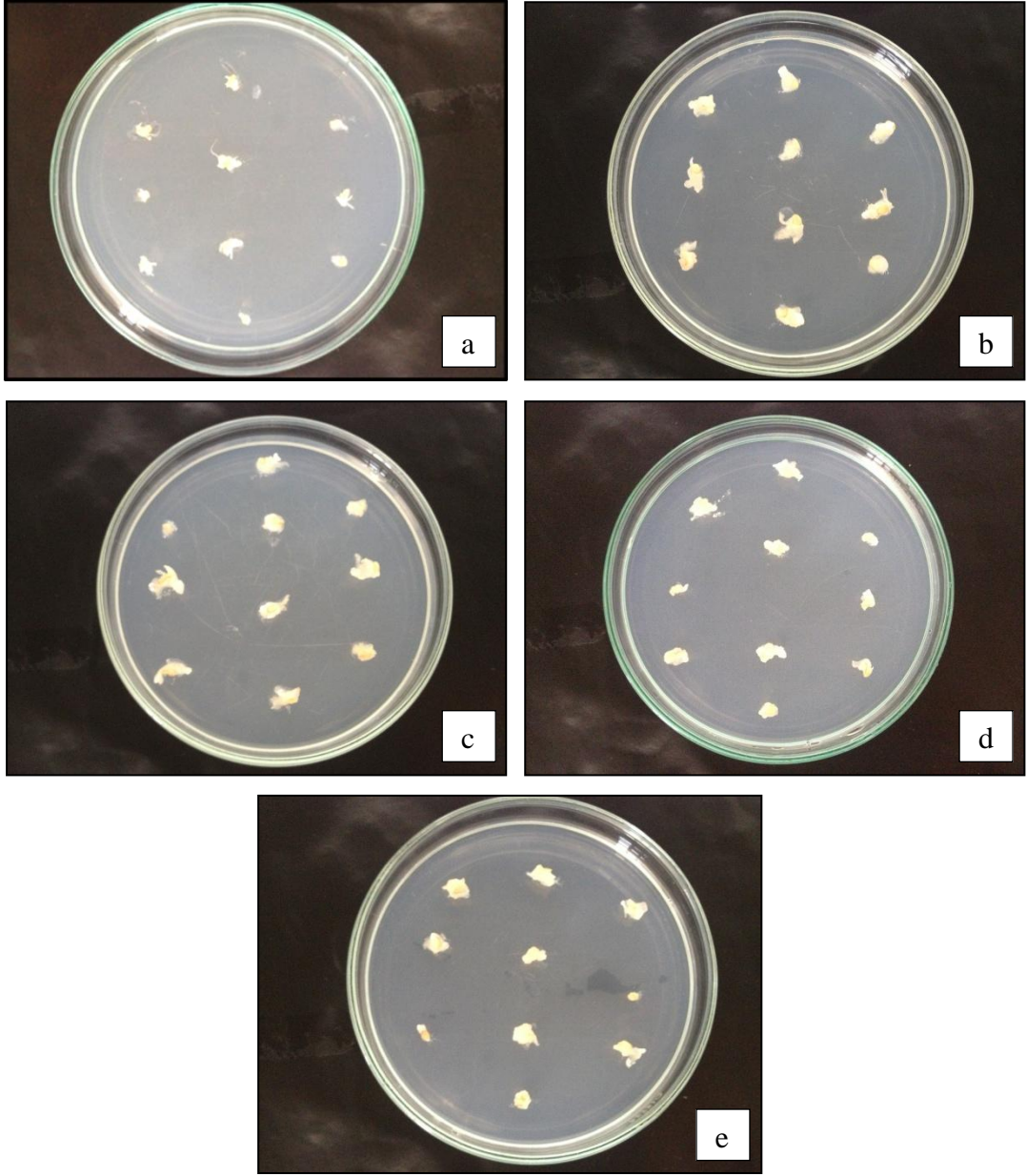
Çizelge 5.16. *Triticum dicoccum*'un olgun embriyolarında kullanılan farklı dozlardaki 2,4-D ve picloramın kültür etkisine olan etkisine ilişkin AÖF testi

DOZ	2,4-D	Picloram
0	0 D	0 D
3	70.000 B	96.667 A
6	30.000 C	86.667 A
9	33.333 C	66.667 B
12	6.667 D	10.000 D

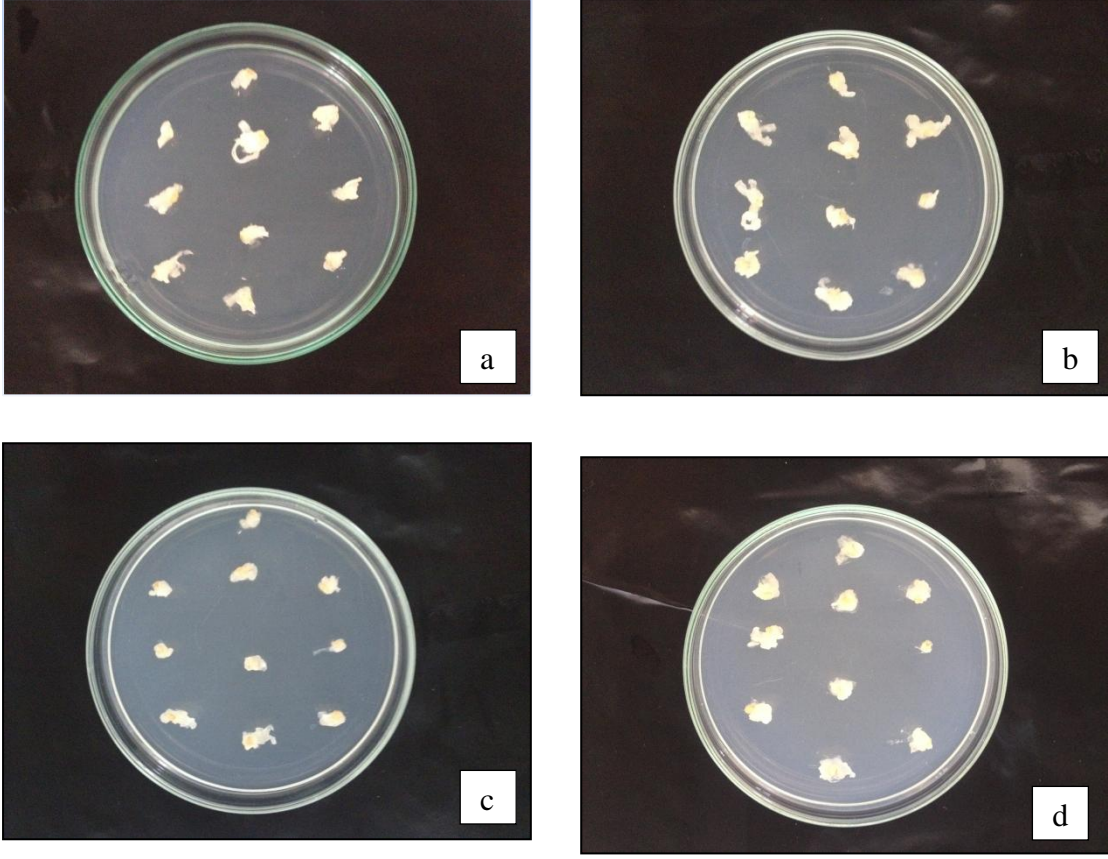
AÖF: 11.63



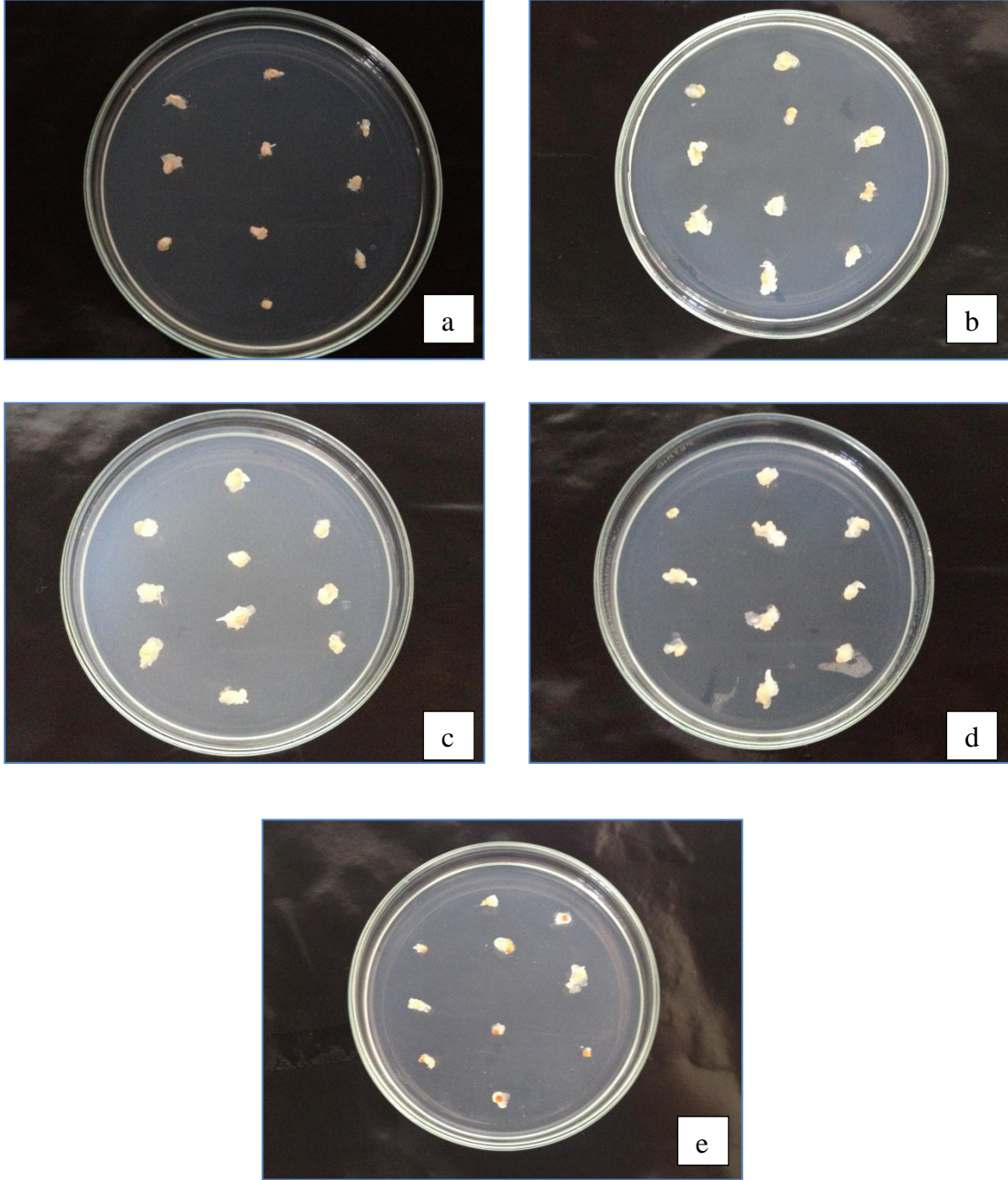
Şekil 5.8. *Triticum dicoccum*'un farklı 2,4-D ve picloram dozlarına bağlı kültür etkinliği



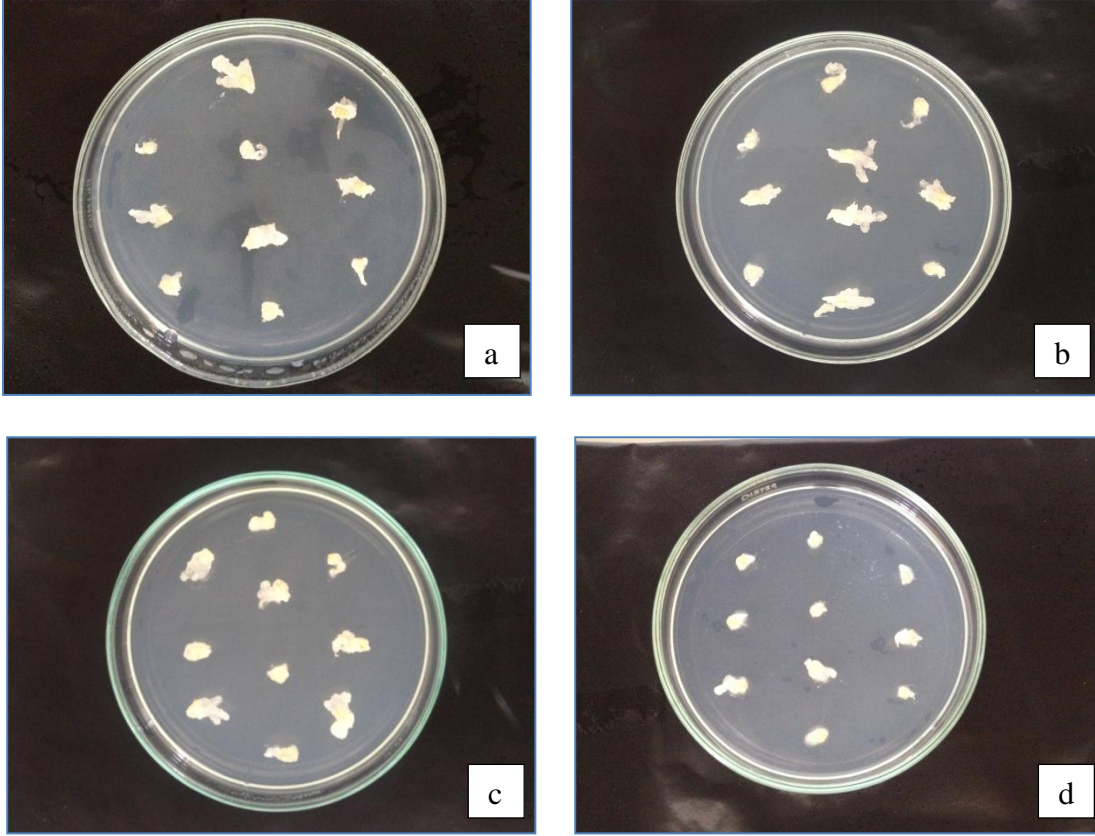
Şekil 5.9. *Triticum monococcum*'un 14 gün sonunda farklı 2,4-D dozları içeren ortamlarda kallus gelişimi (a: 0 mg/l 2,4-D, b: 3 mg/l 2,4-D, c: 6 mg/l 2,4-D, d: 9 mg/l 2,4-D, e: 12 mg/l 2,4-D)



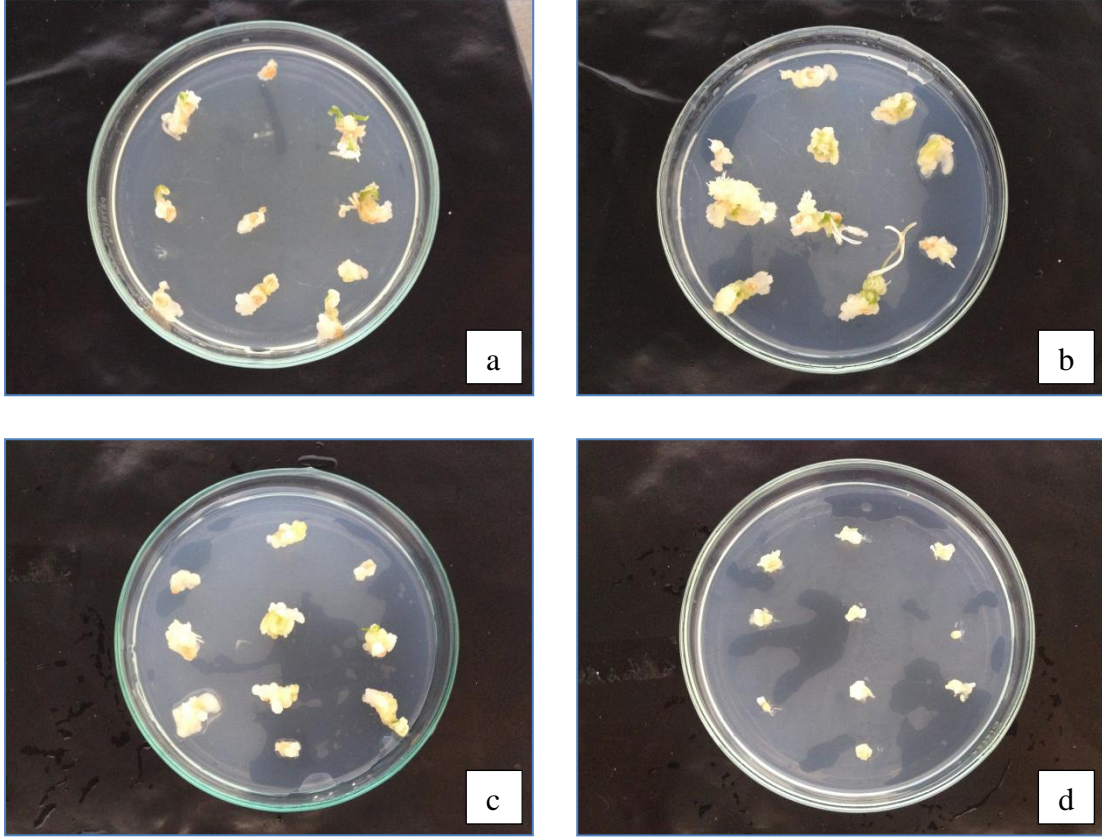
Şekil 5.10. *Triticum monococcum*'un 14 gün sonunda farklı picloram dozları içeren ortamlarda kallus gelişimi (a: 3 mg/l picloram, b: 6 mg/l picloram, c: 9 mg/l picloram, d: 12 mg/l picloram)



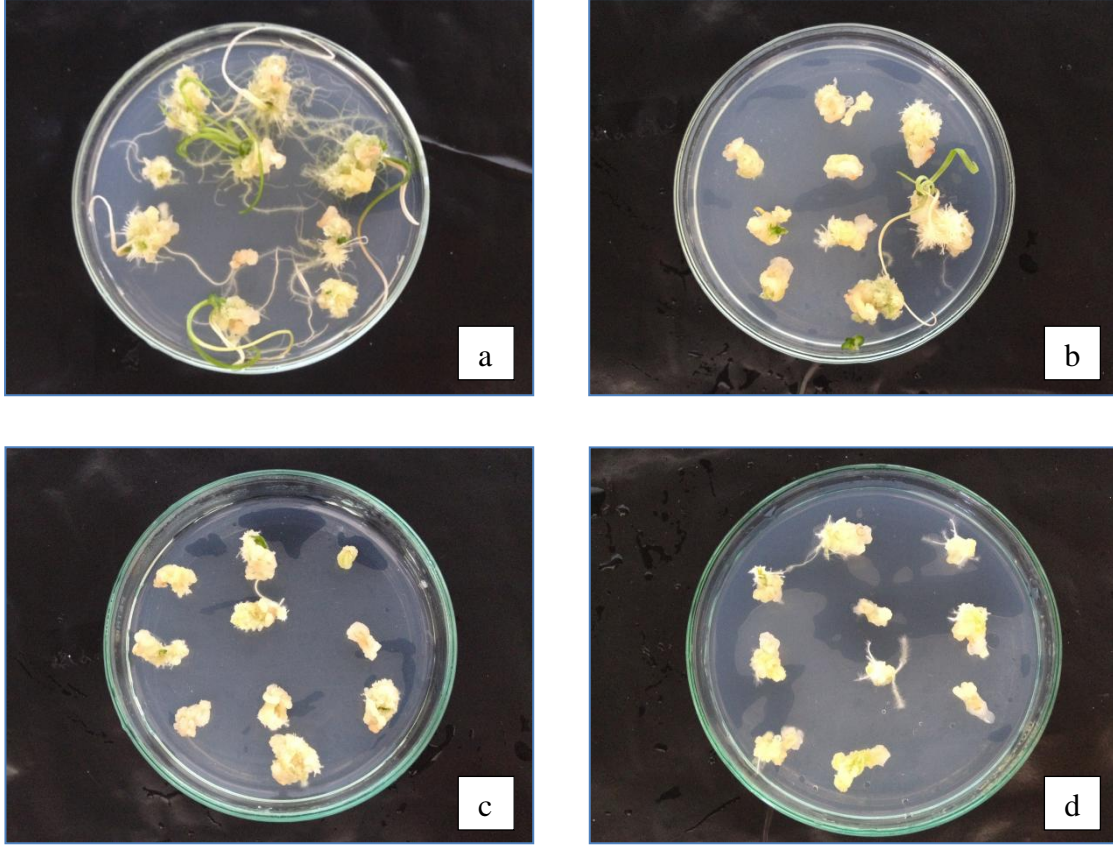
Şekil 5.11. *Triticum dicoccum*'un 14 gün sonunda farklı 2,4-D dozları içeren ortamlarda kallus gelişimi (a: 0 mg/l 2,4-D, b: 3 mg/l 2,4-D, c: 6 mg/l 2,4-D, d: 9 mg/l 2,4-D, e: 12 mg/l 2,4-D)



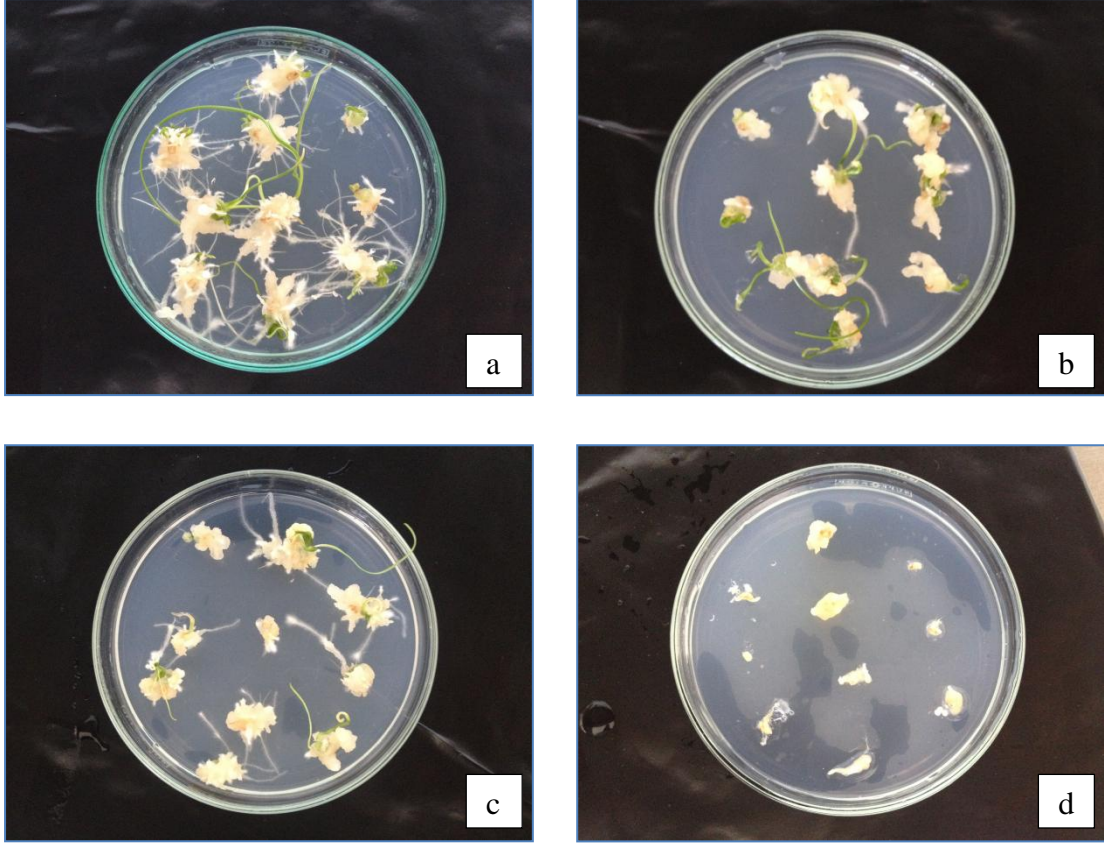
Şekil 5.12. *Triticum dicoccum*'un 14 gün sonunda farklı picloram dozları içeren ortamlarda kallus gelişimi (a: 3 mg/l picloram, b: 6 mg/l picloram, c: 9 mg/l picloram, d: 12 mg/l picloram)



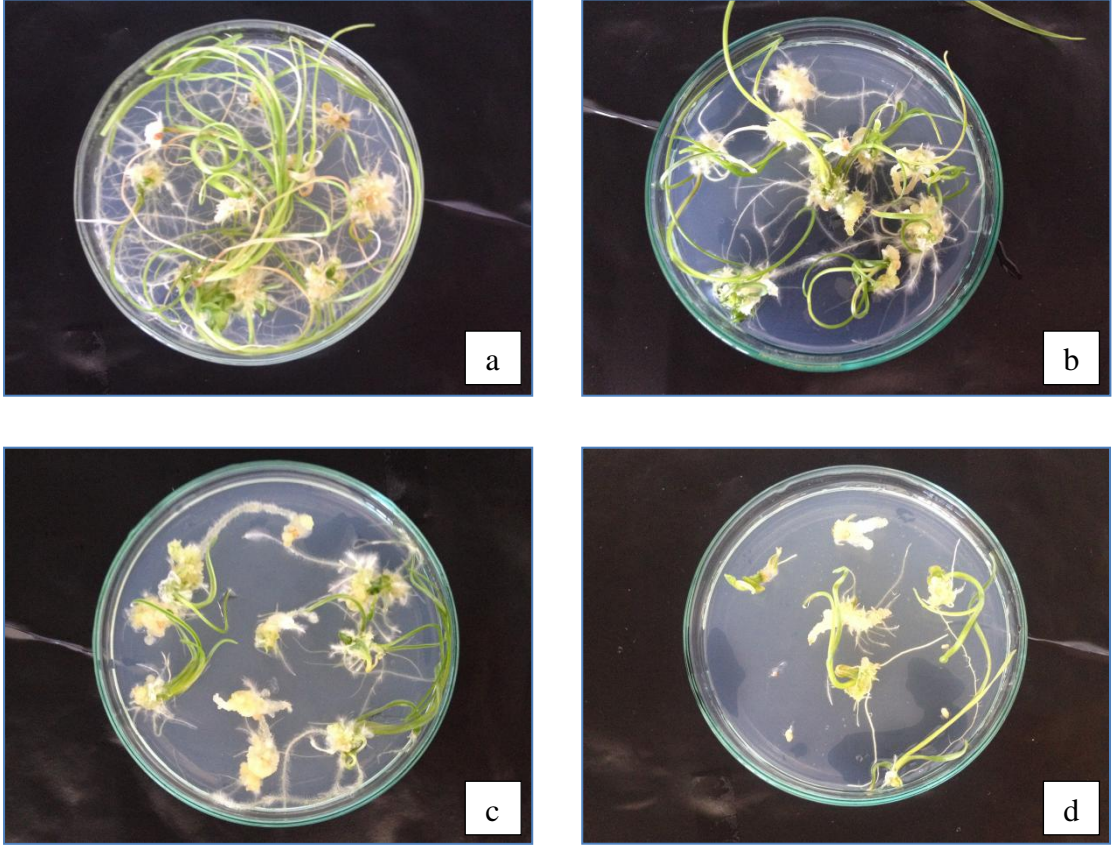
Şekil 5.13. *Triticum monococcum*'un 30 gün sonunda farklı 2,4-D dozları içeren ortamlarda rejenerasyonu (a: 3 mg/l 2,4-D, b: 6 mg/l 2,4-D, c: 9 mg/l 2,4-D, d: 12 mg/l 2,4-D)



Şekil 5.14. *Triticum dicoccum*'un 30 gün sonunda farklı 2,4-D dozları içeren ortamlarda rejenerasyonu (a: 3 mg/l 2,4-D, b: 6 mg/l 2,4-D, c: 9 mg/l 2,4-D, d: 12 mg/l 2,4-D)



Şekil 5.15. *Triticum monococcum*'un 30 gün sonunda farklı picloram dozları içeren ortamlarda rejenerasyonu (a: 3 mg/l 2,4-D, b: 6 mg/l 2,4-D, c: 9 mg/l 2,4-D, d: 12 mg/l 2,4-D)



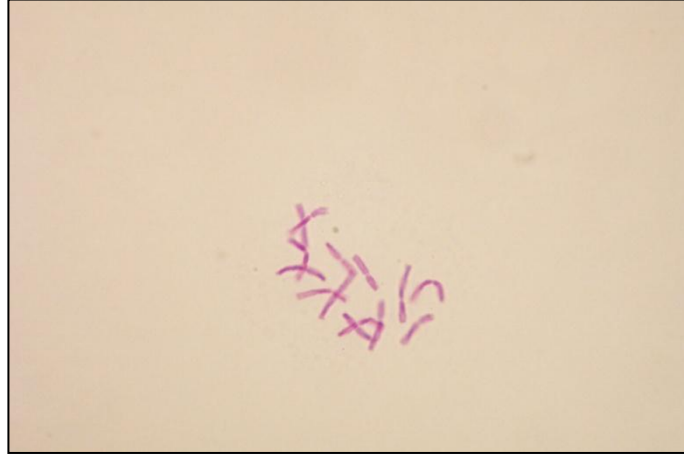
Şekil 5.16. *Triticum dicoccum*'un 30 gün sonunda farklı picloram dozları içeren ortamlarda rejenerasyonu (a: 3 mg/l 2,4-D, b: 6 mg/l 2,4-D, c: 9 mg/l 2,4-D, d: 12 mg/l 2,4-D)

5.3. Farklı Dozlarda 2,4-D ve Picloram Uygulanan *Triticum monococcum* ve *Triticum dicoccum* Çeşitlerine İlişkin Sitolojik Çalışmalar

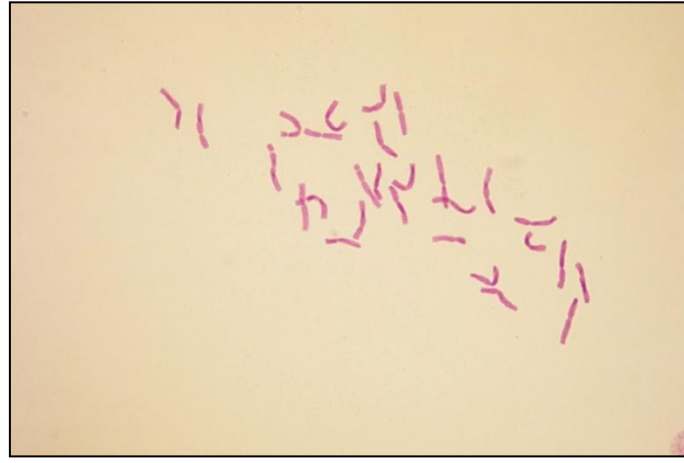
Araştırma materyali olarak kullanılan *Triticum monococcum* ve *Triticum dicoccum* çeşitlerinin olgun embriyoları; farklı dozlardaki (0, 3, 6, 9 ve 12 mg/l) 2,4-D ve picloram içeren besin ortamlarında kültüre alınıp kallus oluşumu sağlandıktan sonra, rejenerasyon amacıyla 14 gün sonunda hormonsuz MS ortamına transfer edilmiştir. Rejenerasyon esnasında kalluslardan gelişen rejeneratif sürgünlerin kök uçlarından örnekler alınarak sitolojik analize tabi tutulmuştur. Sitolojik analizin amacı; kullanılan buğday hatlarının kromozom sayıları ve yapılarında meydana gelmiş olabilecek değişiklikleri saptamaktır. Bu çalışmada kök ve sürgün gelişimini desteklemek amacıyla herhangi bir büyüme düzenleyicisi kullanılmamıştır. *Triticum monococcum* ve *Triticum dicoccum* çeşitlerinde 12 mg/l 2,4-D ve picloram dozlarında yeterli kök gelişimi sağlanamaması nedeniyle bu dozlarda analiz yapılamamıştır.

Buğday kök uçlarından preparat hazırlama ve kromozom incelemesinde Özgen vd (1996, 1998) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. Preparatlar hazırlandıktan sonra, ilk başta 10x'lik objektifle incelenmiş, bunu 20x, 40x ve 100x'lik objektifler takip etmiştir. 100x'lik objektifte yapılan incelemede immersiyon yağı kullanılmıştır. En düzgün görüntü yakalandığında, mikroskoba bağlı fotoğraf makinesiyle görüntünün kaydı alınmış, bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

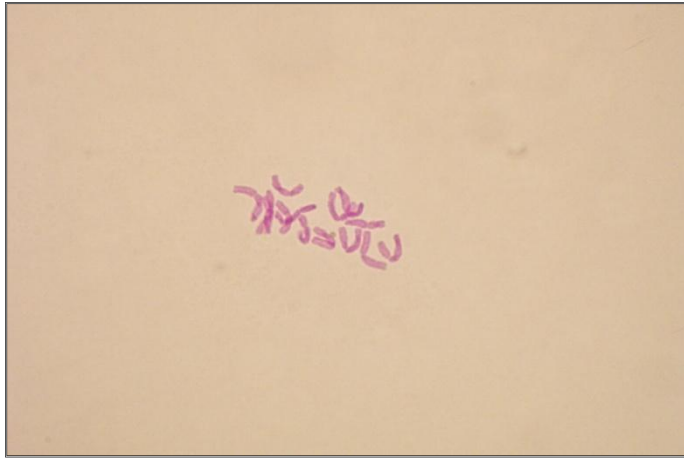
Görüntülerde her iki çeşitte, analizi yapılabilen bütün dozlarda, kromozom yapısında ve sayısında herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır.



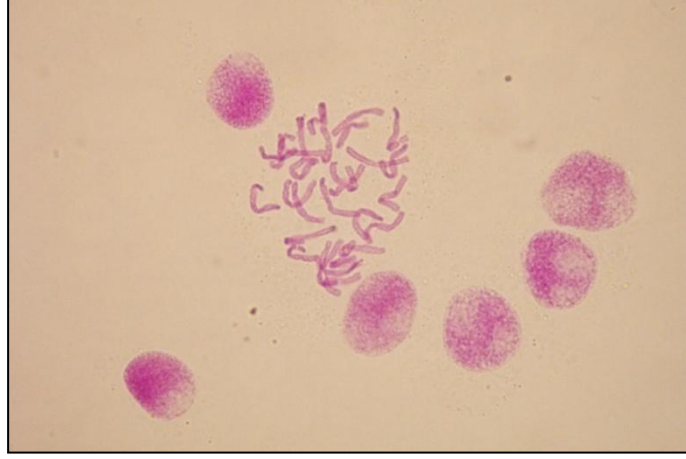
Şekil 5.17. Kontrol dozunda (0 mg/l) kültüre alınan *Triticum monococcum* (2n=14)



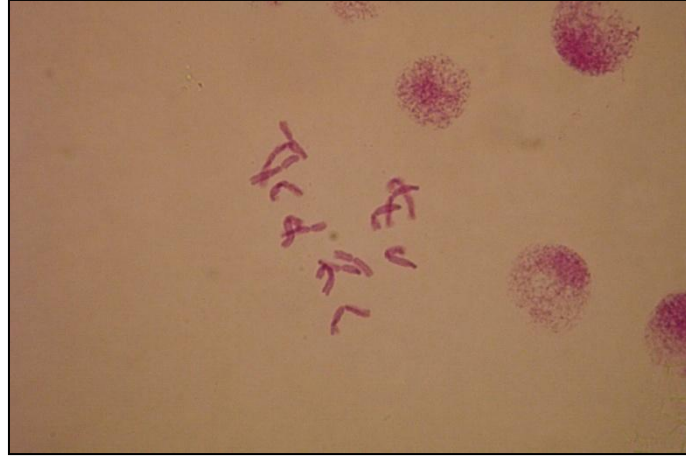
Şekil 5.18. Kontrol dozunda (0 mg/l) kültüre alınan *Triticum dicoccum* (2n=28)



Şekil 5.19. 3 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan *Triticum monococcum* (2n=14)



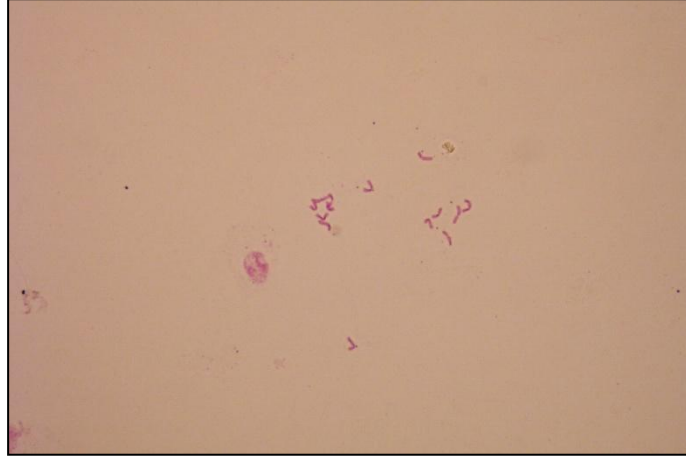
Şekil 5.20. 3 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan *Triticum dicoccum* ($2n=28$)



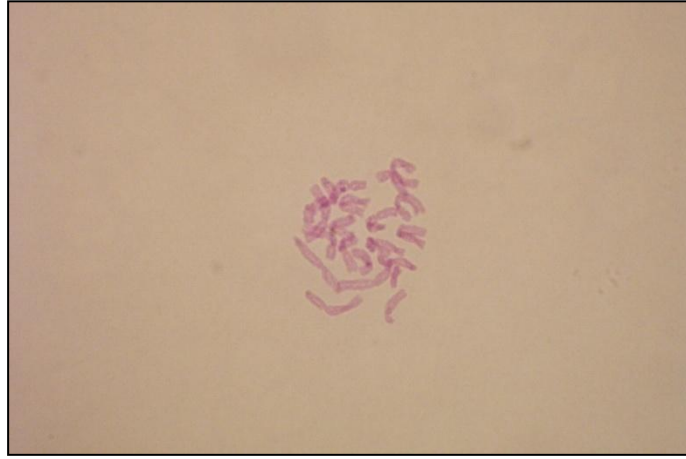
Şekil 5.21. 6 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan *Triticum monococcum* ($2n=14$)



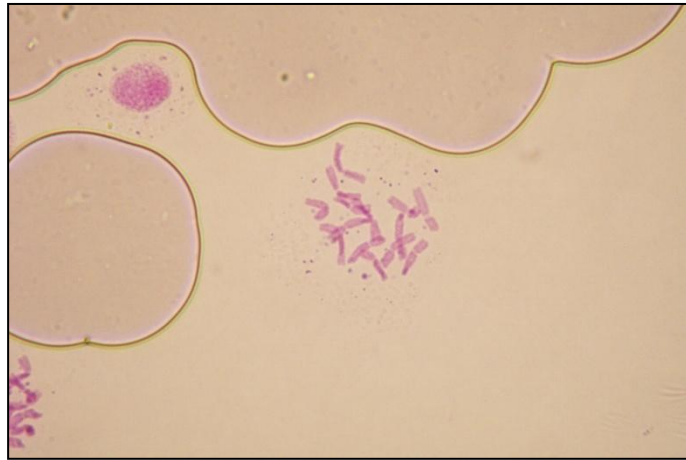
Şekil 5.22. 6 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan *Triticum dicoccum* ($2n=28$)



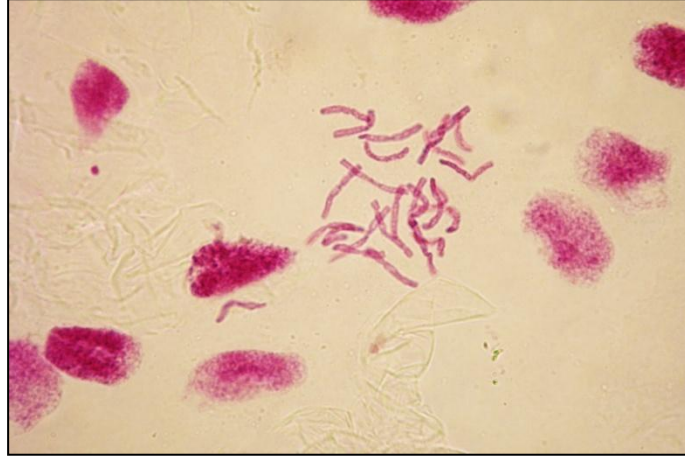
Şekil 5.23. 9 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan *Triticum monococcum* ($2n=14$)



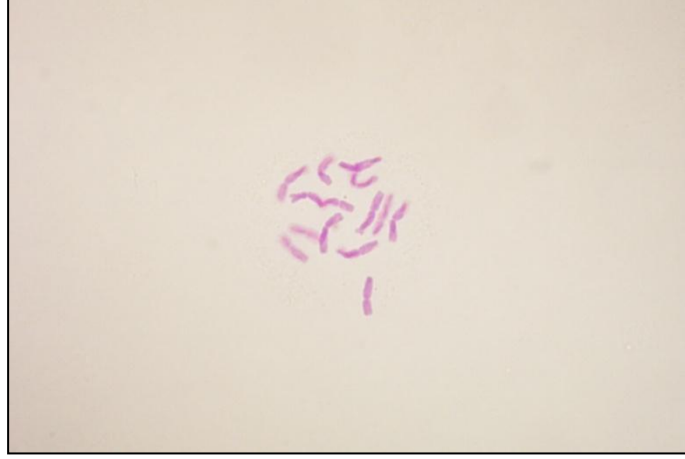
Şekil 5.24. 9 mg/l 2,4-D dozunda kültüre alınan *Triticum dicoccum* ($2n=28$)



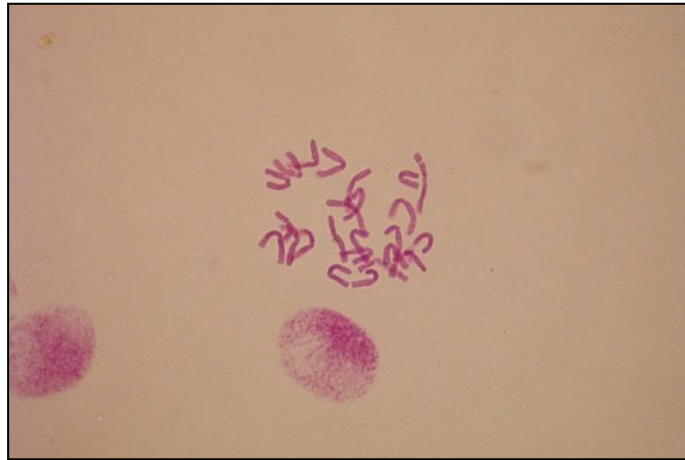
Şekil 5.25. 3 mg/l picloram dozunda kültüre alınan *Triticum monococcum* ($2n=14$)



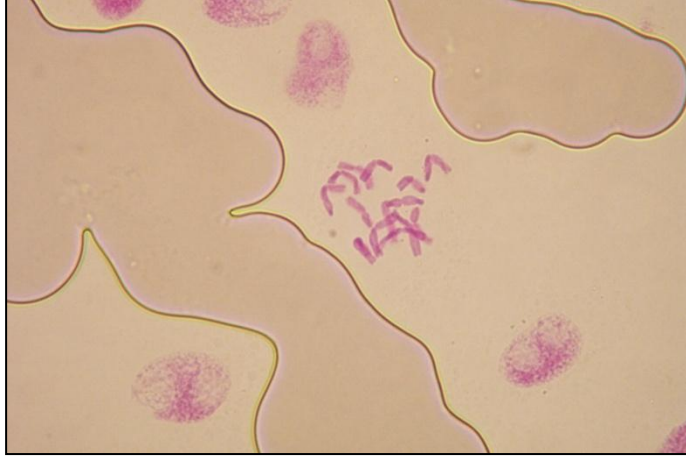
Şekil 5.26. 3 mg/l picloram dozunda kültüre alınan *Triticum dicoccum* (2n=28)



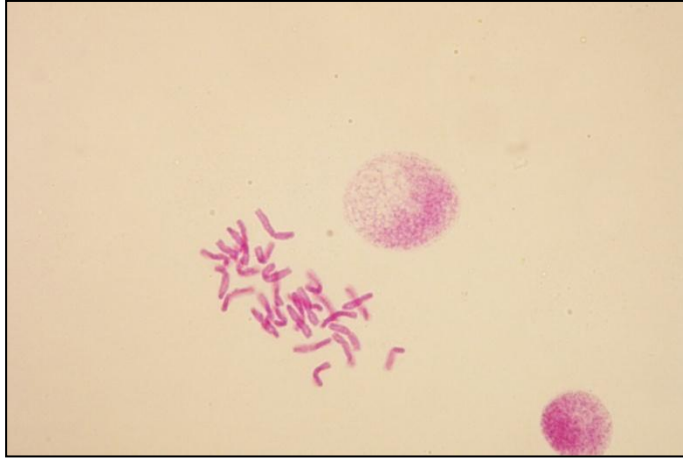
Şekil 5.27. 6 mg/l picloram dozunda kültüre alınan *Triticum monococcum* (2n=14)



Şekil 5.28. 6 mg/l picloram dozunda kültüre alınan *Triticum dicoccum* (2n=28)



Şekil 5.29. 9 mg/l picloram dozunda kültüre alınan *Triticum monococcum* ($2n=14$)



Şekil 5.30. 9 mg/l picloram dozunda kültüre alınan *Triticum dicoccum* ($2n=28$)

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1 Tartışma

Farklı 2,4-D ve picloram dozlarında kültüre alınan *Triticum monococcum* ve *Triticum dicoccum* yerel kavuzlu buğday çeşitlerinden elde edilen sonuçlara göre;

- *Triticum monococcum* çeşidinde en yüksek kallus oluşum oranı (%100) 2,4-D'nin 3 mg/l konsantrasyonundan elde edilmiştir. Picloramın ise 3, 6, 9 mg/l dozlarından aynı oranda kallus oluşumu (%100) göstermiştir.
- *Triticum dicoccum* çeşidinde en yüksek kallus oluşum oranı 2,4-D'nin 12 mg/l konsantrasyonundan (%100) elde edilmiştir. Picloramın ise 3, 6 mg/l dozlarından aynı oranda kallus oluşumu (%100) göstermiştir.
- *Triticum monococcum* çeşidinde en yüksek kallus ağırlığı 3 mg/l 2,4-D (0,822 g) ve 6 mg/l picloram(1,345g) dozlarından elde edilmiştir.
- *Triticum dicoccum* çeşidinde en yüksek kallus ağırlığı 12 mg/l 2,4-D (0,770 g) ve 6 mg/l picloram (0,908 g) dozlarından elde edilmiştir.
- *Triticum monococcum* çeşidinde en yüksek rejenerasyon kapasitesi 6 mg/l 2,4-D (%56,6) ve 3 mg/l picloram (%100) dozlarından elde edilmiştir.
- *Triticum dicoccum* çeşidinde en yüksek rejenerasyon kapasitesi 3 mg/l 2,4-D (%75) ve 3 mg/l picloram (%92,6) dozlarından elde edilmiştir.
- *Triticum monococcum* çeşidinde en yüksek kültür etkinliği 6 mg/l 2,4-D (%56,6) ve 3 mg/l picloram (%100) dozlarından elde edilmiştir.
- *Triticum dicoccum* çeşidinde en yüksek kültür etkinliği 3 mg/l 2,4-D (%75) ve 3 mg/l picloram (%92,6) dozlarından elde edilmiştir.

Çalışmadan elde edilen bu sonuçlara göre; *Triticum monococcum* için optimum *in vitro* koşulların 2,4-D oksini için 6 mg/l dozu, picloram oksini için ise 3 mg/l dozu olduğu belirlenmiştir. *Triticum dicoccum* için optimum *in vitro* koşulların 2,4-D ve picloram oksini için 3 mg/l dozu olduğu belirlenmiştir.

Picloram ve 2,4-D oksinlerinin başarısı kıyaslanacak olursa; her iki yerel kavuzlu buğday çeşidinde 3 mg/l picloram dozlarının daha yüksek sonuçlar verdiği söylenebilir. Yani bu iki çeşit için picloram kullanımı başarıyı arttırmaktadır.

(79) Ozias-Akins ve Vasil (1983) farklı dozlardaki 2,4-D'nin(0, 0.4, 1.0, 4.0, 8.0 mg/l) kallus gelişimi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada, 2 mg/l 2,4-D'nin kallus oluşumu için optimum doz olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca yaptıkları sitogenetik çalışmalar sonucunda Aceto-carmin boyama yöntemini kullanılmış ve preparatlardaki kromozom sayılarında herhangi bir değişiklik meydana gelmediğini ($2n=6x=42$) bildirmişlerdir. (96) Barro vd (1999), 8 buğday ve 7 arpa genotipinde, olgunlaşmamış embriyo ve yapraklarını 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l picloram içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Araştırma sonuçlarına göre, picloram içeren ortamda yapraklardan elde edilen somatik embriyo sayısı, içermeyen ortama oranla 2 kat fazla olmuştur. (97) He ve Lazzeri (2001), 4 farklı makarnalık buğday genotipinin olgunlaşmamış embriyolarını ve yeşil bitki parçalarını kullanarak yaptıkları çalışmada en iyi embriyogenesis oluşumunu 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l picloram içeren ortamlardan elde etmişlerdir. Ayrıca 2 mg/l picloram içeren ortamda olgunlaşmamış embriyolarda %97-100 oranında bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. (98) Mendoza ve Kaepler (2002), "Bobwhite" çeşidini MS ortamında kültüre almış olup, 4 farklı oksin (2-MCPP, 2,4-D, dicamba ve picloram) denemiştir. En çok kallus oluşumu picloramdan elde edilmiş olup, bu sonucu dicamba ve 2,4-D takip etmiştir.

Araştırma sonucu elde edilen bulgular bu çalışmalarla benzer sonuçlar göstermektedir.

6.2 Sonuç

Buğday Dünya'da en çok kültürü yapılan bitki olması nedeniyle, bitki ıslah çalışmalarında özel bir yere sahiptir. Buğdayda dayanıklılık ıslahı çalışmalarında genetik kaynak olarak kavuzlu buğday türlerinin kullanılması önemlidir. Melezleme yöntemiyle aktarımı kolay, dominant dayanıklılık genlerini taşımaktadırlar. Son yıllarda ıslah çalışmalarında kavuzlu

buğday türlerinden özellikle *Triticum monococcum* ve *Triticum dicoccum* türlerinden yararlanılmaktadır.

Biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklılık genellikle birden fazla gen tarafından kontrol edilmektedir. Yeni çeşitler geliştirmek amacıyla kullanılan kalsik ıslah yöntemleri bu genlerin belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Biyoteknolojik yöntemlerle klasik ıslah yöntemleri birleştirildiğinde, stres faktörlerine dayanıklı bitki ıslahına yeni bir boyut kazandırılmıştır.

Biyoteknoloji uygulamalarının ilk basamağı doku kültürü uygulamalarıdır. Hızlı, güvenilir ve yılın her zamanı bulunabilmeleri özelliğiyle olgun embriyoların kullanılmasına ilişkin araştırmalar yaygınlaşmıştır.

Tahıllarda genellikle embriyo kültürü ve kallus kültürü kullanılmaktadır. Kallus kültüründe kallus oluşturmak için genellikle 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid), dicamba (3,6-dikloro-o-anisik asit) ve picloram (4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit) gibi sentetik oksinlerden yararlanılmaktadır.

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülen bu araştırmada, gen merkezi Türkiye olan yerel kavuzlu buğday türlerinden *Triticum monococcum* ve *Triticum dicoccum* eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Olgun embriyo yöntemi kullanılmış olup, sentetik oksin olarak 2,4-D ve picloramın farklı dozları uygulanmıştır. Kromozomal yapı açısından en zararsız kallus oluşturma protokolü belirlenmiştir.

Bu çalışmada; *Triticum monococcum* ve *Triticum dicoccum*'un olgunlaşmış embriyoları yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş, 2 saat süreyle 33°C'de su banyosunda bekletilmiş ve steril kabin içerisinde embriyoları endospermilerinden ayrılmıştır. Embriyolar kalkancıkları yukarı bakacak şekilde 0, 3, 6, 9, 12 mg/l 2,4-D ve picloram içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. 14 gün sonunda "kallus oluşumu" ve "kallus ağırlığı" parametreleri belirlenmiştir. Oluşan kalluslar hormonsuz MS-0 ortamına transfer edilerek iklim odasında rejenerasyon için teşvik edilmiştir. 4 hafta sonunda "rejenerasyon kapasitesi" ve "kültür etkinliği" parametreleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarla istatistik analizler yapılmıştır.

AÖF testleri sonucunda dozlar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır.

Farklı 2,4-D dozlarında kültüre alınan *Triticum monococcum* ve *Triticum dicoccum* olgun embriyoları en yüksek sonuçları 3 mg/l dozunda vermiştir.

Farklı picloram dozlarında kültüre alınan *Triticum monococcum* olgun embriyoları en yüksek sonuçları 6 mg/l dozunda vermiştir. *Triticum dicoccum* olgun embriyoları ise en yüksek sonuçları 3 mg/l dozunda vermiştir.

Elde edilen kallusların bitki sürgünlerindeki kök uçlarından örnekler alınmıştır. Kök uçları 4 saat süreyle %1'lik α -monobromonaftalin çözeltisinde bekletilmiş, daha sonra 30 dk süreyle glasiyel asetik asitte bekeletilmiştir. 1 N HCl ile 10 dk hidroliz edilerek, feulgen boyayla boyanmıştır. Bu işlemlerden sonra preparat hazırlanarak, bu örneklerle sitolojik analizler yapılarak, kromozom yapılarında ve sayılarında oluşabilecek değişiklikler belirlenmeye çalışılmıştır.

Farklı dozlarda 2,4-D ve picloram içeren ortamlardan elde edilen kök uçlarında yapılan sitogenetik analizler sonucunda kromozom sayısı ve yapısında herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. 12 mg/l picloram ve 2,4-D dozlarında kök oluşumu gözlenemediği için bu dozlarda sitogenetik çalışma yapılamamıştır.

Sonuç olarak bu tezde yerel kavuzlu buğday türlerinin olgun embriyoda kallus oluşturma ve rejenerasyonda kullanılan en uygun 2,4-D ve picloram dozu belirlenmiştir. Yapılan sitolojik araştırmalar sonucunda bu dozlarda herhangi bir kromozomal değişikliğe rastlanmadığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Vasil IK. Molecular genetic improvement of cereals: Transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports. 2007. p. 1133–54.
2. Özgen M, Ertunç F, Kınacı G, Yıldız M, Birsin M, Ulukan H, Emiroğlu H, Koyuncu N, Sancak C. Tarım Teknolojilerinde Yeni Yaklaşımlar ve Uygulamalar. Bitki Biyoteknolojisi.
3. Şehirli S, Özgen M. Bitki Islahı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları; 1527.;2010.
4. Demir A, Seyi F, Kurt O. Genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar. Ordu Ziraat Fakültesi Dergisi. 2006;21(2):249–60.
5. Onay, A., Yıldırım, H., Piriç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y. Ö., Akdemir, H., Akdemir FM. Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum. J Life Sci. 2012;1(2).
6. Anonim [Internet]. Tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin alan ve üretim miktarları. 2012 [cited 2013 Nov 10]. Available from: <http://www.tuik.gov.tr>
7. Anonymous. FAO. 2012.
8. Kün E. Serin İklim Tahılları. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1032.; 1988.
9. Anonim 2014a [Internet]. Florida Herb House. Available from: http://floridaherbhouse.com/kitchen_spice_blog/?page_id=2
10. Williams P, Haremein FJ, Nakkaul H, Rihawi S. Crop Quality Evaluation Methods and Quidelines. Technical Mansal. 1986. p. 14.
11. Süzer S. Buğday Tarımı [Internet]. 2014. Available from: <http://arastirma.tarim.gov.tr/ttae/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=69>
12. Eripek S. Tarla Bitkileri. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi; 1995.
13. Reynolds M, Pask A, Mullan D. Physiological breeding I: interdisciplinary approaches to improve crop adaptation. Mexico: CIMMYT; 2012.
14. Anonim 2014b [Internet]. Available from: <http://www-urgv.versailles.inra.fr/analysis-genomeOrg-oepg.htm>
15. Gale MD, Devos KM. Comparative genetics in the grasses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:1971–4.
16. Pathak GN. Studies in the cytology of cereals. J Genet. 1940;39(3):437–67.
17. Kihara H. Die Entdeckung des DD-analysators beim Weizen. Agr Hort. 1944;19:889–90.
18. Sarkar P, Stebbins GL. Morphological Evidence Concerning the Origin of the B Genome in Wheat. Am J Bot. 1956;43(4):297.
19. Wang GZ, Miyashita NT, Tsunewaki K. Plasmon analyses of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*: PCR-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analyses of organellar DNAs. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:14570–7.
20. Kilian B, Özkan H, Walther A, Kohl J, Dagan KT, Salamini F, et al. Molecular Diversity at 18 Loci in 321 Wild and 92 Domesticated Lines Reveal No Reduction of

- Nucleotide Diversity during *Triticum monococcum* (Einkorn) Domestication: Implications for the Origin of Agriculture. *Mol Biol Evol.* 2007;24(12):57–68.
21. Harlan JR, Zohary D. Distribution of wild wheats and barley. *Science.* 1966;153:1074–80.
 22. Anonim 2014c [Internet]. Available from: http://www.einkorn.com/Hulled_Wheats_1995.pdf
 23. Terrell EE, Peterson PM. Caryopsis morphology and classification in the *Triticeae* (*Pooideae: Poaceae*). Washington DC: Smithsonian Contributions to Botany, Number 83, Smithsonian Institution Press,; 1993.
 24. Vallage V, Hari S. Domestication of plants in the old World - The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley. *Genet Resour Crop Evol.* 1979;123(2):256–75.
 25. Vallage V, D'egidio MG, Nardi S. Grain, flour, and dough characteristics of selected strains of diploid wheat, *Triticum monococcum* L. *Cereal Chem.* 1991;70:298–303.
 26. Waines JG, Barnhart D. Isolation and Characterization of Five Novel High Molecular Weight Subunit of Glutenin Genes From *Triticum timopheevi* and *Aegilops cylindrica*. *Bot J Linn Soc.* 1983;153(1):67–72.
 27. Vallage V, Antoni K. A new interspecific hybrid: *Triticum aestivum ssp. vulgare x Aegilops ventricosa*. *Wheat Info Serv.* 1978;35:22–4.
 28. Stallknecht GF, Gilbertson KM, Ranney JE. Alternative Wheat Cereals as Food Grains: Einkorn, Emmer, Spelt, Kamut, and Triticale. *Prog new Crop.* 1996;156–70.
 29. Anonim 2014d [Internet]. Available from: http://www.einkorn.com/Hulled_Wheats_1995.pdf
 30. Peng J, Korol AB, Fahima T, Röder MS, Ronin YI, Li YC, et al. Molecular genetic maps in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*: genome-wide coverage, massive negative interference, and putative quasi-linkage. *Genome Res.* 2000;10:1509–31.
 31. Schmolke M, Mohler V, Hartl L, Zeller FJ, Hsam SLK. A new powdery mildew resistance allele at the Pm4 wheat locus transferred from einkorn (*Triticum monococcum*). *Mol Breed* [Internet]. 2011 Mar 18 [cited 2014 Apr 9];29(2):449–56. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11032-011-9561-2>
 32. Piarulli L, Gadaleta A, Mangini G, Signorile MA, Pasquini M, Blanco A, et al. Molecular identification of a new powdery mildew resistance gene on chromosome 2BS from *Triticum turgidum ssp. dicoccum*. *Plant Sci* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Nov [cited 2014 Apr 9];196:101–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23017904>
 33. Liu XM, Brown-Guedira GL, Hatchett JH, Owuoche JO, Chen M-S. Genetic characterization and molecular mapping of a Hessian fly-resistance gene transferred from *T. turgidum ssp. dicoccum* to common wheat. *Theor Appl Genet* [Internet]. 2005 Nov [cited 2014 Apr 9];111(7):1308–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16136351>
 34. Schwann T. Mikroskopische untersuchungen über die übereinstimmung in der struktur und dem wachstum der thiere und pflanzen. Sander'schen Buchhandlung. Berlin; 1839.

35. Haberlandt G. Haberlandt G. 1900 Ueber die Perception des geotropischen Reizes. Ber.dt.bot Ges. 1902;18:261–72.
36. Kakhki V. Plant Cell and Tissue Culture [Internet]. 2012. Available from: http://profs.hsu.ac.ir/vaezi/files/2012/01/Plant-Cell-and-Tissue-Culture_-_Introduction-to-Plant-Biotechnology_-_For-Print.pdf
37. Murashige T. The impact of plant tissue culture on agriculture. Calgary: International Association for Plant Tissue Culture. 1978. p. 15–26.
38. Lührs R, Lörz H. Plant regeneration in vitro from embryogenic cultures of spring- and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. Theor Appl Genet. 1987;75(1):16–25.
39. Mathias RJ, Simpson ES. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) callus. Plant Cell Tiss Organ Cult. 1986;7:31–7.
40. Ahmed KZ, Sagi F. Culture and fertile plant regeneration from regenerable, embryogenic suspension cell derived protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Rep. 1993;12:175–9.
41. Maes OC, Chibbar RN, Caswell K, Leung N, Kartha KK. Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. Plant Sci. 1996;121:75–84.
42. Varshney A, Kant T, Sharma K V., Rao A, Kothari SL. High frequency plant regeneration from immature embryo cultures of *Triticum aestivum* and *T. durum*. Cereal Res Commun. 1996;24:409–413.
43. Ben Amer IM, Borner A. The relationship between green spot initiation and plantlet regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) callus grown under short-term conditions. Plant Cell Tiss Organ Cult. 1997;50:67–9.
44. Hess JR, Carman JG. Embryogenic competence of immature embryos: genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels. Crop Sci. 1988;38:249–53.
45. Zhou MD, Lee TT. Selectivity of auxin for induction and growth of callus from embryos of spring and winter wheat. Can J Bot. 1983;62:1393–7.
46. MacKinnon C, Gunderson G, Nabors MW. High efficiency plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature embryo explants of bread wheat (*Triticum aestivum*) and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). Vitro Cell Dev Biol Plant. 1989;23:443–7.
47. Mohmand AS, Nabors MW. Comparison of two methods for callus culture and plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult. 1991;26:185–7.
48. Ozgen M, Türet M, Altınok S, Sancak C. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Plant Cell Rep [Internet]. 1998;18:331–5. Available from: <http://www.springerlink.com/content/4hxd4qxvrbb0jvm9/>
49. Zamora AB, Scott KJ. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. Plant Sci. 1983;29:183–9.
50. Rajyalaksmi, A. G. Maheshwari, A. K. Maheshwari SC. High frequency regeneration of plantlets from the leaf-bases via somatic embryogenesis

- and comparison of polypeptide profiles from morphogenenic calli in wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plant*. 1991;82:617–23.
51. Sharma VK, Rhao A, Varshney A, Kothari SL. Comparison of developmental stage of inflorescence for high frequency plant regeneration in *Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf. *Plant Cell Rep*. 1995;15:227–31.
 52. Viertel K, Hess D. Shoot tips as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 1996;44:183–8.
 53. Ouyang J, Zhou SM, Jia SE. The response of anther culture to culture temperature in wheat *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet*. 1983;66:101–9.
 54. Chu CC, Gill RD. An improved anther culture method to obtain higher frequencies of pollen embryos in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci*. 1988;55:175–181:175–81.
 55. Simmons J. Improved androgenesis of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars in response to low temperature treatments of donor plants. *Plant Sci*. 1989;66:225–31.
 56. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15:473–97.
 57. Gamborg OL, Shyluk JP. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiol*. 1970;45:598–600.
 58. Dodds JH. Experiments in plant tissue culture. *Int Potato Cent*. 1985;
 59. Özgen M, Türet M, Özcan S, Sancak C. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breed*. 1996;115:455–8.
 60. Kurt O. Bitki Islahı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ders Kitabı Yayın No: 43.; 2001.
 61. Uysal H, Seyis F, Kurt O. Tarla Bitkilerinde Melezleme Bariyerlerinin Aşılmasında Alternatif Bir Yöntem: Embriyo Kültürü. *Ondokuz Mayıs Univ Anadolu J Agric Sci*. 2012;22(1):116–22.
 62. Tuberosa R, Rauaglia S, Lucchese C. Callus induction and plant regeneration in Italian cultivars of bread wheat. *Agric Mediterian*. 1998;18:361–5.
 63. D'Amato F. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary: International Association for Plant Tissue Culture. 1978. p. 287–95.
 64. Karaca Ö, Bürün B. Buğdayda embriyo kültüründen kallus oluşumu. *Tr J Agric For*. 1999;23(2):269–74.
 65. George EF. Plant growth regulators I. Introduction; Auxins, Their Analogues and Inhibitors. *Plant Propag by Tissue Cult* 3rd Ed. 2008;175–204.
 66. Gray DJ, Conger B V. Influence of dicamba and casein hydrolysate on somatic embryo number and culture quality in cell suspensions of *Dactylis glomerata* (Gramineae). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 4123- 133; 1985. 1985;4:123– 133.
 67. Hagen SR, Muneta P, Augustin J. Stability and utilization of picloram, vitamins and sucrose in a tissue culture medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1991;25:45–8.
 68. Keller T, Skopp G, Wu M, Aderjan R. Fatal overdose of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Forensic science international*. 1994. p. 13–8.

69. Holt JS, Powles SB, Holtum JAM. Aspects of Herbicide Resistance. *Annu Rev Plant Physiol.* 1993;44:203–29.
70. Ahloowalia BS. Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Sci.* 1982;22:405–10.
71. Bai D, D.R. K. The effects of level of 2,4-D and time in culture on regeneration rate and chromosome numbers of regenerants from calli of the hybrid *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring ph1b x *Thinopyrum ponticum* (2n = 10x = 70). *Genome.* 1993;36:166–72.
72. Ball ST, Zhou H, Konzak CF. Influence of 2,4-D, IAA, and duration of callus induction in anther culture of spring wheat. *Plant Sci.* 1993;90:195–200.
73. K.J. K, A. Z, U.H. C. Haploids in cereal improvement: anther and microspore culture. *Crop Sci Dept, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.* 1989.
74. Liang GH, Xu A, Tang H. Direct generation of wheat haploids via anther culture. *Crop Sci.* 1987;27:336–9.
75. Bayliss MW. Chromosomal variation in plant tissue culture. *Int Rev Cytol, Suppl.* 1980;11A.
76. J.F. O, Street HE. Wheat callus culture: the initiation, growth and organogenesis of callus derived from various explant sources. *Ann Bot.* 1978;42:1029–38.
77. Ozias-Akins P, Vasil IK. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L.(wheat): evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma.* 1982;110(2):95–105.
78. Sears RG, Deckard EL. Tissue Culture Variability in Wheat: Callus Induction and Plant Regeneration. *Crop Sci.* 1982;22:546–50.
79. P. O-A, Vasil IK. Callus induction and growth from the mature embryo of wheat. *Protoplasma.* 1983;115:104–13.
80. Redway FA, Vasil V, Lu D, Vasil IK. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet.* 1990;79:609–17.
81. Ziauddin A, Kasha KJ. Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*). II. Effect of auxins on chromosomal status of cultures and regeneration of plants. *Euphytica.* 1990;48:279–86.
82. Felföldi K, Purnhauser L. Induction of Regenerating Callus Cultures from Immature Embryos of 44 Wheat and 3 Triticale Cultivars. *Cereal Res Commun.* 1992;20(3-4):273–7.
83. Bommineni VR, Jauhar PP. Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. *Plant Sci.* 1996;116:197–203.
84. Ivanov P, Anatanssov Z, Mikova V, Nikolava L. Culture Selected Somaclonal Variation in Five *Triticum aestivum* L. Genotypes. *Euphytica.* 1998;104:167–72.
85. Machii H, Mizuno H, Hirabayashi T, Li H, Hagio T. Screening Wheat Genotypes for High Callus Induction and Regeneration Capability from Anther and Immature Embryo Cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1998;53:67–74.
86. Zheng MY, Konzak CF, Zheng MY. K onzak CF. Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.* 1999;19:69–73.

87. Benkirane H, Karima S, Chlyah A, Chlyah H. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Fragments of Immature Inflorescences and Coleoptiles of Durum Wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2000;61:107–13.
88. Delporte F, Mostade O, Jacquemin JM. Plant Regeneration through Callus Initiation from Thin Mature Embryo Fragments of Wheat. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2001;67:73–80.
89. Gonzales JM, Friero E, Jouve N. Influence of Genotype and Culture Medium on Callus Formation and Plant Regeneration from Immature Embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars. *Plant Breeding.* 2001;120:513–7.
90. Özgen M, Türet M, Avcı M. Cytoplasmic Effect on The Tissue Culture Response of Callus from Winter Wheat Mature Embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2001;64:81–4.
91. Shah MI, Jabeen M, Ilahi I. In vitro callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) var. LU-26S. *Pakistan J Bot.* 35(2):209–17.
92. Ahmet H, Adak MS. Irak'ta yetiştirilen bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. *Tarım Bilim Derg.* 2007;13:285–92.
93. Dağüstü N. Olgunlaşmamış Embriyo Kültüründen Yüksek Oranda Bitkicik Oluşumu. Türkiye 7 Tarla Bitkileri Kongresi. Erzurum; 2007. p. 346–51.
94. Yu Y, Wang J, Zhu ML, Wei ZM. Optimization of mature embryo-based high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China. *Plant Breed.* 2008;127(3):249–55.
95. Ren JP, Wang XG, Yin J. Dicamba and sugar effects on callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of wheat. *Agric Sci China.* 2010;9(1):31–7.
96. Barro F, Martin A, Lazzeri PA, Barceló P. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica.* 1999;108:161–7.
97. He GY, Lazzeri PA. Improvement of Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Durum Wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.) Scutellum and Inflorescence Cultures. *Euphytica.* 2001;119:369–376.
98. Mendoza MG, Kaeppler HF. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.* 2002. p. 39–45.
99. Keresa S, Baric M, Sarcevic H, Marchetti S. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos and immature inflorescences of eight Croatian winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Austria J Agric Res.* 2004;
100. Sağsöz S, Aydın M. Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Olgun Embriyo Kaynaklı Kallus Oluşumu ve Rejenerasyon Kapasitesini Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2006.
101. Stebbins GL. *Chromosomal Evolution in Higher Plants.* London: Edward Arnold Ltd.; 1971.
102. Sakamura T. Kurze Mitteilung über die Chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhältnisse der *Triticum*-Arten. *Bot Mag.* 1918;32:151–4.

103. Unrau J, Larter EN. Cytogenetical responses of cereals to 2, 4-D: I. A study of meiosis of plants treated at various stages of growth. *Can J Bot.* 1952;30(.1):22–7.
104. Liang GH, Feltner KC, Russ OG. Meiotic and morphological response of grain sorghum to atrazine, 2, 4-D, oil, and their combinations. *Weed Sci.* 1969;8–12.
105. Gill BS, Kimber G. Giemsa C-banding and the evolution of wheat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71:4086–90.
106. Elçi Ş. Sitogenetikte gözlemler ve araştırma yöntemleri. Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları; 1982.
107. Gill KS, Gill BS, Endo TR. A chromosome region-specific mapping strategy reveals gene-rich telomeric ends in wheat. *Chromosoma.* 1993;102:374–81.
108. Gill KS, Gill BS, Endo TR, Taylor T. Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. *Genetics.* 1996;144:1883–91.
109. Delaney DE, Nasuda S, Endo TR, Gill BS, Hulbert SH. Cytologically based physical maps of the group 3 chromosomes of wheat. *Theor Appl Genet.* 91:780–2.
110. Delaney DE, Nasuda S, Endo TR, Gill BS, Hulbert SH. Cytologically based physical maps of the group 2 chromosomes of wheat. *Theor Appl Genet.* 91:568–73.
111. Mickelson-Young L, Endo TR, Gill BS. A cytogenetic ladder-map of the wheat homoeologous group-4 chromosomes. *Theor Appl Genet.* 1995;90:1007–11.
112. Werner JE, Endo TR, Gill BS. Toward a cytogenetically based physical map of the wheat genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:11307–11.
113. Hohmann U, Endo TR, Gill KS, Gill BS. Comparison of genetic and physical maps of group 7 chromosomes from *Triticum aestivum* L. *MGG Mol Gen Genet.* 1994;245:644–53.
114. Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, et al. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998;149:2007–23.
115. Murata M. Effects of auxin and cytokinin on induction of sister chromatid exchanges in cultured cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet.* 1989;78:521–524.
116. Chen Q, Jahier J, Cauderon Y. Intergenic hybrids between *Triticum aestivum* and three crested wheatgrass: *Agropyron mongolicum*, *A. michnoi* and *A. desertorum*. *Genome.* 1990;33:663–7.
117. Bannikova VP, Barabanova EA. Induction and Histological Features of Somatic Embriyogenesis in the Tissue Culture of Gramineae. *Sitologiya Genet.* 1990;24(2):61–8.
118. Pijnacker LP, Ferwerda MA. Sister chromatid exchanges in cultured immature embryos of wheat species and regenerants. *Theor Appl Genet.* 1994;89(2-3):287–92.
119. Okumuş A. Buğdayda Mayoz Bölünme: Metafaz-1 Gözlemleri. 2 Tarla Bitkileri Kongresi. Samsun; 1997. p. 547–9.
120. Doğan E. Makarnalık buğdayda (*Triticum durum* Desf.) farklı 2,4-d ve picloram dozlarının kallus oluşumuna ve kromozom yapısına etkisi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü; 2010.
121. Şehirli S, Özgen M. Bitki Genetik Kaynakları. Ankara: Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları No: 1020. Ders Kitabı: 294; 1987.

122. Karagöz A, Zencirci N, Tan A, Taşkın T, Köksel H, Sürek M, et al. Bitki Genetik Kaynaklarının Korunması ve Kullanımı. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII Teknik Kongresi Kitabı. 2010. p. 155–77.
123. Özgen, M. TM. Bitki Islahı ve Gen Aktarma Teknolojisi. Workshop “Biyoteknoloji ve Bitki Islahı.” Gebze / Kocaeli; 1995. p. 227–36.
124. Huang XQ, Wei ZM. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). Plant Cell Rep. 2004;22:793–800.
125. Bartok T, Sagi F. A New Endosperm Supported Callus Induction Method for Wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 1990;22:37–41.
126. Przetakiewicz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2003;73:245–56.
127. Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. Toxicology. 2004;200:39–47.
128. Serpen A, Gökmen V, Karagöz A, Köksel H. Phytochemical quantification and total antioxidant capacities of Emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) and Einkorn (*Triticum monococcum* L.) wheat landraces. J Agric Food Chem. 2008;56:7285–92.
129. Köksel H, Celik S, Karagoz A, Ng PKW. Partial characterization of starch in flours of ancient wheat and wild progenitor accessions. Ital J Food Sci [Internet]. 2008;20:101–10. Available from: <Go to ISI>://000259316600008
130. Akıncı C, Yıldırım M. Screening of barley landraces by direct selection for crop improvement. Acta Agric Scand Sect B – Soil Plant Sci. 2009;59:33–41.
131. Özgen M, Türet M, Altınok S, Sancak C. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Plant Cell Rep [Internet]. 1998;18:331–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s002990050581>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Duygu Ege Tuna

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 12.05.1989

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: TED Ankara Koleji Vakfı Özel Lisesi

Lisans: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi

İş Tecrübesi

Kurumu: MARO Tarım A.Ş. **Görevi:** Ziraat Mühendisi

Yılları: 2014-...

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Benlioğlu, B., Tuna, D.E., Birsin, M., Özgen, M. Effect of Growth Regulators on Tissue Culture Parameters in Rice (*Oryza sativa* L.). International Plant Breeding Congress. Antalya, Turkey, 10-14 November.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Benlioğlu, B., Tuna, D.E., Birsin, M., Özgen, M. Yulafta (*Avena sativa* L.) Tohum İriliğinin Doku Kültürü Parametrelerine Etkisi. 10. Tarla Bitkileri Kongresi. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Konya, Turkey, 10-13 Eylül.

Benlioğlu, B., Tuna, D.E., Birsin, M., Özgen, M. Arpada (*Horduem vulgare* L.)Kallus Oluşumu ve Bitki Rejeneasyonuna Farklı Kültürlerin Etkisi. 10. Tarla Bitkileri Kongresi. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Konya, Turkey, 10-13 Eylül.