

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**GAMMA RADYASYONUNUN BUĞDAYDA (*Triticum sp.*) PARTİKÜL
BOMBARDIMANI TEKNİĞİ İLE GEN AKTARIMINA VE BİTKİ
REJENERASYONUNA ETKİSİ**

ÇİĞDEM YILDIZ

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN

ANKARA
2009

Prof.Dr. A. Murat ÖZGEN danışmanlığında, Çiğdem YILDIZ tarafından hazırlanan bu çalışma 19/01/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

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

İmza :

Üye : Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU (TİK Üyesi)

İmza :

Üye : Prof. Dr. Sertaç ÖNDE (TİK Üyesi)

İmza :

Üye : Prof. Dr. İbrahim DEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Sümer ARAS

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA
Enstitü Müdürü

Gamma Radyasyonunun Buğdayda (*Triticum* sp.) Partikül Bombardımanı Tekniği ile Gen Aktarımına ve Bitki Rejenerasyonuna Etkisi

ÖZET

Bu çalışmada, gamma radyasyonundan yararlanılarak hücre ve dokularda fiziksel ve biyolojik değişikliklerin oluşturulması ve bu şekilde partikül bombardımanı yöntemi kullanılarak yapılan gen geçişlerinin ve bitki rejenerasyonunun artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, öncelikle farklı gamma kaynaklarının (Co-60 ve Cs-137) ve bunlara ilişkin dozların bitki rejenerasyonuna olan etkisi belirlenmiş; uygun kaynak ve dozlar belirlendikten sonra bu kaynaktan yararlanılarak partikül bombardımanı ve bitki rejenerasyonu çalışmalarına başlanmıştır. Literatüre göre, partikül bombardımanı ile gen aktarımında gamma radyasyonunun etkileri üzerine çalışmaların yapılmadığı görülmüştür.

Olgun embriyolardan kallus kültürü aracılığıyla bitki rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan her iki buğday çeşidinde (Bezostaja-1 ve Çakmak 79) de incelenen tüm karakterlerde en yüksek sonuçlar kontrol (0 Gy) uygulamasından alınmış, bunu 15 Gy'lik gamma dozu uygulaması izlemiştir. Gamma radyasyon dozlarındaki artışa paralel olarak elde edilen sonuçlarda önemli düşüşler gözlenmiştir. 15 Gy'in üzerindeki gamma dozlarında sürgün rejenerasyonu görülse de herhangi bir bitkicik gelişimi olmamıştır. Araştırmada kullanılan her iki çeşitte de en yüksek sonuçların Kobalt 60 gamma kaynağının kullanıldığı uygulamalardan elde edilmiştir. Sezyum 137 kaynağı kullanıldığında, incelenen tüm karakterlerden elde edilen sonuçlarda önemli düşüşler gözlenmiştir. 15 Gy'lik gamma radyasyonu uygulamasında kallus ve embriyo eksplantları karşılaştırıldığında, tüm karakterlerde en yüksek sonuçların kallustan alındığı belirlenmiştir.

Farklı kaynaklı gamma radyasyonunun kallustan gelişen bitkiciklerin yaprak hücreleri ve bu yapraklardaki fotosentetik aktivite üzerine olan etkileri incelendiğinde, Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu ile kontrol uygulaması (0 Gy) arasındaki farkın incelenen tüm karakterlerde ve her iki çeşitte de önemli olmadığı, ancak Sezyum 137 kaynaklı 15 Gy'lik gamma uygulamasından elde edilen sonuçların önemli derecede düşüşler gösterdiği tespit edilmiştir.

Bitki rejenerasyonunun aksine, yapılan gen aktarım çalışmalarında, kullanılan her iki çeşitte (Bezostaja-1, Çakmak 79) ve eksplantta (embriyo, kallus) Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu ile yapılan ışınlamalarda, kontrol (0 Gy) uygulamasına göre incelenen bütün karakterlerde daha yüksek sonuçlar alınmıştır. Araştırmada kullanılan her iki çeşitte de petri başına gelişen en yüksek mavi nokta sayısının 15 Gy'lik gamma dozu ve embriyo eksplantından elde edilmiştir.

Sonuç olarak, buğdaya partikül bombardımanı yöntemi ile yapılan gen aktarım çalışmalarında embriyo eksplantına uygulanan Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu gen aktarım frekansını önemli derecede artırmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gamma radyasyonu, gen aktarımı, *in vitro* mutagenesis, partikül bombardımanı, *Triticum*

The Effect of Gamma Radiation on Gene Transfer and Plant Regeneration via Particle Bombardment Technique in Wheat (*Triticum* sp.)

ABSTRACT

In this research, forming physical and biological changes in cells and tissues via gamma radiation and by this way increasing plant regeneration and gene transition by particle bombardment method were aimed. For this purpose, primarily the effect of different gamma sources (C0-60 and Cs-137) and their relevant doses on plant regeneration were determined; after assigned suitable source and doses, particle bombardment and plant regeneration studies were started by using that source. According to literature, no studies were conducted about the effect of gamma radiation on gene transformation via particle bombardment technique.

The highest results in all characters examined were obtained from control (0 Gy) application which was followed by 15 Gy gamma dose application, in both wheat cultivars (Bezostaja-1 and Çakmak 79) used in studies on plant regeneration via callus culture from mature embryos. Important decrease was observed in results obtained parallel to increase in gamma radiation doses. Although shoot regeneration was seen, no plantlet was grown in gamma doses over 15 Gy. The highest results were recorded from applications where Cobalt 60 gamma source was used in both cultivars. When Cesium 137 source was used, dramatic decreases were observed in results from all characters. It was determined that the highest results from all characters were obtained from callus when callus and embryo explants were compared in application of 15 Gy gamma radiation.

When the effects of gamma radiation from different sources on leaf cells and photosynthetic activity of the leaf from plantlet developed from callus, it was determined that the difference between Cobalt 60 originated 15 Gy gamma dose and control (0 Gy) application was not statistically important, however, considerable decreases were observed in the results from Cesium 137 originated 15 Gy gamma application.

On the contrary of plant regeneration, in gene transfer studies, higher results were obtained from irradiations with Cobalt 60 originated 15 Gy gamma dose than control (0 Gy) application in all characters examined in both cultivars (Bezostaja-1, Çakmak 79) and explants (embryo, callus). In both cultivars used in the study, the highest number of blue spots per Petri dish was obtained from 15 Gy gamma dose and embryo explant.

Finally, Cobalt 60 originated 15 Gy gamma dose which was treated to embryo explant, increased the gene transfer frequency significantly in gene transfer studies to wheat via particle bombardment technique.

Key Words: Gamma radiation, gene transformation, *in vitro* mutagenesis, particle bombardment, *Triticum*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana yeni bir ufuk açarak araştırma olanağı sağlayan ve çalışmalarım süresince her türlü yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN'e sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım. Araştırmalarım sırasında büyük yardımlarını gördüğüm Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi ve Tez İzleme Komitesi üyesi Sayın Doç. Dr. Sertaç ÖNDE'ye, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi ve Tez İzleme Komitesi üyesi Sayın Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU'na, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Melahat AVCI BİRSİN'e ve çalışmalarımın her aşamasında bana destek veren eşim Sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Bana her türlü manevi destek veren anneme, babama ve sevgili oğlum Emrehan'a da sonsuz teşekkür ederim.

Çiğdem YILDIZ

Ankara, 2009

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	16
2.1. Doku Kültürü	16
2.1.1. Kallus kültürü	16
2.1.2. Meristem kültürü	17
2.1.3. Embriyo kültürü	18
2.1.4. Anter kültürü	18
2.1.5. Hücre kültürü	19
2.1.6. Protoplast kültürü ve somatik hibridizasyon	20
2.2. Bitkilere Gen Aktarımı	21
2.2.1. Doğrudan gen aktarımı	21
2.2.1.1. Protoplastlara DNA aktarımı	23
2.2.1.2. Mikroenjeksiyonla gen aktarımı	24
2.2.1.3. Hızlandırılmış partiküllerle gen aktarımı	25
2.2.1.3.1. Partikül bombardımanı cihazının tasarımındaki gelişmeler	25
2.2.1.3.2. Partikül bombardıman cihazının yapısı	27
2.2.1.3.3. Partikül bombardıman sisteminin fiziksel parametreleri	34
2.2.1.3.4. Partikül bombardıman sisteminin kimyasal parametreleri	38
2.2.1.3.5. Partikül bombardıman sisteminin biyolojik parametreleri	39
2.3. Radyasyon	41
2.3.1. Radyasyonun sınıflandırılması	42
2.3.2. Radyasyon çeşitleri	42
2.3.2.1. Alfa parçacıkları	43
2.3.2.2. Beta parçacıkları	44

	Sayfa No
2.3.2.3. X ışınları	44
2.3.2.4. Gamma ışınları	45
2.3.2.5. Nötronlar	46
2.3.3. Radyasyon dozu	46
2.3.4. Radyasyonun hücre ile etkileşmesi	47
2.3.4.1. Radyasyonun özelliklerine bağlı faktörler	49
2.3.4.2. Hedefin özelliklerine bağlı faktörler	49
3. MATERYAL VE YÖNTEM	51
3.1. Materyal	51
3.1.1. Bitki materyali	51
3.1.2. Plazmid vektörü	51
3.1.3. Işınlama materyali	51
3.2. Yöntem	51
3.2.1. Ekipmanların sterilizasyonu	51
3.2.2. Tohum yüzey sterilizasyonu, embriyo izolasyonu ve kallus oluşumu	53
3.2.3. Büyüme ortamı ve kültür koşulları	53
3.2.4. Gamma radyasyonunun uygulanması	54
3.2.5. Partikül bombardımanı yöntemi ile gen aktarımı	54
3.2.5.1. Mikrotaşıyıcıların hazırlanması	55
3.2.5.2. Mikrotaşıyıcıların DNA ile kaplanması	56
3.2.5.3. Bombardıman işleminin yapılması	56
3.2.6. Gen geçişlerinin belirlenmesi	59
3.2.7. Fotosentetik aktivitenin belirlenmesi	61
3.2.8. Mikroskop gözlemleri	61
3.3. Verilerin değerlendirilmesi	61
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	62
4.1. Kallusa Uygulanan Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Buğdayda Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi	63
4.1.1. Kallusa uygulanan Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	63
4.1.2. Kallusa uygulanan Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	63

4.1.3. Kallusa uygulanan Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	68
4.1.4. Kallusa uygulanan Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	68
4.1.5. Buğdayda kallustan sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma kaynaklarının karşılaştırılması	73
4.2. Embriyoya Uygulanan Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Buğdayda Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi	75
4.2.1. Embriyoya uygulanan Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	75
4.2.2. Embriyoya uygulanan Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	75
4.2.3. Embriyoya uygulanan Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	80
4.2.4. Embriyoya uygulanan Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	80
4.2.5. Buğdayda sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından embriyoya uygulanan Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma kaynaklarının karşılaştırılması	80
4.2.6. Buğdayda sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy gamma dozunda embriyo ve kallusun karşılaştırılması	85
4.3. Kültür Süresinin Uzatılmasının Gamma Radyasyonu Uygulanmış Kalluslardan Sürgün Rejenerasyonu ve Köklenmiş Bitkicik Gelişimi Üzerine Etkisi	85
4.4. Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Kallustan Gelişen Bitkiciklerin Yapraklarında Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi	87
4.5. Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Kallustan Gelişen Bitkiciklerin Yapraklarında Fotosentetik Aktivite Üzerine Etkisi	91
4.6. Partikül Bombardımanı Tekniği ile Gen Aktarımı Üzerine Gamma Radyasyonunun Etkisi	94
5. TARTIŞMA	103
5.1. Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Olgun Buğday Embriolarından Kallus Kültürü Aracılığıyla Bitki Rejenerasyonu Üzerine Etkisi	103

	Sayfa No
5.2. Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Kallustan Gelişen Bitkiciklerin Yapraklarında Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi	105
5.3. Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Kallustan Gelişen Bitkiciklerin Yapraklarında Fotosentetik Aktivite Üzerine Etkisi	105
5.4. Partikül Bombardımanı Tekniği ile Gen Aktarımı Üzerine Gamma Radyasyonunun Etkisi	106
6. SONUÇ	108
7. KAYNAKLAR	110
ÖZGEÇMİŞ	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. <i>In vitro</i> bitki rejenerasyonu	22
Şekil 2.2. Hızlandırılmış partiküllerle gen aktarımı	26
Şekil 2.3. Partikül bombardımanı cihazını oluşturan parçalar	27
Şekil 2.4. Partikül bombardımanı cihazının dış parçaları	28
Şekil 2.5. Solenoid vana	29
Şekil 2.6. Bombardıman cihazına ait aletler	30
Şekil 2.7. Partikül bombardımanı cihazının iç parçaları	30
Şekil 2.8. Partikül bombardımanı cihazının arka bağlantıları	32
Şekil 2.9. Helyum gazı bağlantısı için 6 ft ve 2.5 ft PEEK boru	32
Şekil 2.10. Helyum basıncı göstergesi	34
Şekil 2.11. Hedef hücrenin yerleştirilebileceği dört farklı raf konumu	37
Şekil 2.12. Radyasyonun sınıflandırılması	43
Şekil 2.13. Alfa parçacığı	44
Şekil 2.14. Beta parçacığı	44
Şekil 2.15. X ışınlarının oluşumu	45
Şekil 2.16. Gamma ışınları	46
Şekil 2.17. Nötron parçacıkları	47
Şekil 3.1. Bombardımanda kullanılan pBI221.23 plazmidinin şematik görünümü	51
Şekil 3.2. Kobalt 60 gamma kaynağı	52
Şekil 3.3. Sezyum 137 gamma kaynağı	52
Şekil 3.4. Kırılıcı diskin başlık içine yerleştirilmesi	57
Şekil 3.5. Kırılıcı diskin yerleştirildiği başlığın takılması/çıkarılması	57
Şekil 3.6. Partikül fırlatma düzeneğine makrotaşıyıcı ve durdurma levhasının yerleştirilmesi	58
Şekil 3.7. Bombardıman işlemi	58
Şekil 3.8. Bombardıman işleminden sonra makrotaşıyıcı ve durdurma levhasının durumu	59
Şekil 3.9. Kırılıcı diskin patladıktan sonraki durumu	59
Şekil 4.1. Kallusa uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	66
Şekil 4.2. Kallusa uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde bitkicik gelişimi üzerine etkisi	67

Şekil 4.3.	Kallusa uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	71
Şekil 4.4.	Kallusa uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde bitkicik gelişimi üzerine etkisi	72
Şekil 4.5.	Embriyoya uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	78
Şekil 4.6.	Embriyoya uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde bitkicik gelişimi üzerine etkisi	79
Şekil 4.7.	Embriyoya uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	84
Şekil 4.8.	Kültür süresinin uzatılmasının kallustan sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi	89
Şekil 4.9.	Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde kallusa uygulanan 15 Gy'lik gamma radyasyonunun gelişen bitkiciklerin yaprak hücreleri üzerine etkisi	92
Şekil 4.10.	Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde kallusa uygulanan 15 Gy'lik gamma radyasyonunun gelişen bitkiciklerin yaprak hücreleri üzerine etkisi	93
Şekil 4.11.	1100 psi basınç ve 9 cm yükseklikten Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde embriyoya gen aktarımı	97
Şekil 4.12.	1100 psi basınç ve 9 cm yükseklikten Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde embriyoya gen aktarımı	98
Şekil 4.13.	900 psi basınç ve 6 cm yükseklikten Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde kallusa gen aktarımı	100
Şekil 4.14.	900 psi basınç ve 6 cm yükseklikten Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde kallusa gen aktarımı	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1.	Gen aktarımının başarılı olduğu bazı önemli kültür bitkileri ve gen aktarma yöntemleri	23
Çizelge 3.1.	Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma radyasyon kaynaklarının özellikleri	53
Çizelge 3.2.	MS (Murashige ve Skoog) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları	54
Çizelge 4.1.	Kallusa uygulanan Kobalt 60 gamma kaynağının Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi	64
Çizelge 4.2.	Kallusa uygulanan Sezyum 137 gamma kaynağının Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi	65
Çizelge 4.3.	Kallusa uygulanan Kobalt 60 gamma kaynağının Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi	69
Çizelge 4.4.	Kallusa uygulanan Sezyum 137 gamma kaynağının Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi	70
Çizelge 4.5.	Buğdayda kallustan sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından kallusa uygulanan 15 Gy dozda Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma kaynaklarının karşılaştırılması	74
Çizelge 4.6.	Embriyoya uygulanan Kobalt 60 gamma kaynağının Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi	76
Çizelge 4.7.	Embriyoya uygulanan Sezyum 137 gamma kaynağının Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi	77
Çizelge 4.8.	Embriyoya uygulanan Kobalt 60 gamma kaynağının Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi	81
Çizelge 4.9.	Embriyoya uygulanan Sezyum 137 gamma kaynağının Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi	82
Çizelge 4.10.	Buğdayda sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından embriyoya uygulanan 15 Gy dozda Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma kaynaklarının karşılaştırılması	83
Çizelge 4.11.	Buğdayda sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy gamma dozunda embriyo ve kallusun karşılaştırılması	86
Çizelge 4.12.	Kültür süresinin uzatılmasının kallustan sürgün rejenerasyonu ve köklenmiş bitkicik gelişimi üzerine etkisi	88
Çizelge 4.13.	Farklı kaynaklı 15 Gy'lik gamma radyasyonu uygulamasının kallustan gelişen bitkiciklerin yaprak hücreleri üzerine etkisi	91
Çizelge 4.14.	Farklı kaynaklı 15 Gy'lik gamma radyasyonu uygulamasının kallustan gelişen bitkiciklerin yapraklarında fotosentetik aktivite üzerine etkisi	94

Çizelge 4.15. Buğdayda partikül bombardımanı yöntemi ile gen geçişine etkisi bakımından embriyoya uygulanan 0 Gy ve 15 Gy gamma dozlarının karşılaştırılması	99
Çizelge 4.16. Buğdayda partikül bombardımanı yöntemi ile gen geçişine etkisi bakımından kallusa uygulanan 0 Gy ve 15 Gy gamma dozlarının karşılaştırılması	102
Çizelge 5.1. Bezostaja-1 ve Çakmak 79 çeşitlerinde Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma kaynakları kullanılarak kallus ve embriyoya uygulanan 15 Gy'lik doz ile kontrol (0 Gy) uygulamasından elde edilen sonuçların karşılaştırılması	104
Çizelge 5.2. İki buğday çeşidinde kallus ve embriyo eksplantlarına uygulanan 0 ve 15 Gy gamma dozlarının partikül bombardımanı yöntemi ile gen geçişi üzerine etkisi	107

SİMGELER DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik asit
GUS	β -glucuronidase
<i>gfp</i>	Yeşil flöresans protein
Gy	Gray
<i>npt-II</i>	Neomycin-phosphotransferase-II geni
<i>bar</i>	Fosfinotrisin asetiltransferaz geni
AZCA	Azetidine-2-carboxylic acid
PEG	Polyethileneglucol
X-GLUC	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide
<i>cat</i>	Kloramfenikol asetiltransferaz geni
Km	Kanamycin
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
OD	Optik Yoğunluk (Optical Density)
α	Alfa parçacığı
β	Beta parçacığı
β^-	Negatif yüklü elektron
β^+	Pozitif yüklü elektron
Co	Kobalt
Cs	Sezyum
U	Uranyum
mSv	milisievert
Ci	Curie
BAP	6-benzylaminopurine
IBA	Indole-3-butyric acid

1. GİRİŞ

Bitkiler, yeryüzündeki yaşamın kaynağını oluştururlar. İnsanlar tarafından tüketilen enerjinin %90'ı, proteinin ise %80'i bitkisel kaynaklıdır. Geriye kalan enerji ve protein gereksinimi ise hayvansal ürünlerden karşılanmaktadır. Dünyanın birçok bölgesinde her yıl açlık ve yetersiz beslenme nedeniyle binlerce insan ölmektedir. İnsanoğlunun yeterli ve dengeli bir şekilde beslenerek yeryüzündeki varlığını devam ettirebilmesi için; nüfus artış hızının kontrol edilmesi ve besin maddeleri üretiminin artırılması gerekmektedir. Besin maddeleri içerisinde özellikle bitkisel besin maddeleri üretiminin artırılması büyük önem taşımaktadır. Bitkisel üretimin artırılması, üretim alanlarının artırılması veya birim alandan elde edilen verimin artırılmasıyla mümkündür.

Yeryüzünde karaların kapladığı alanlar 14 milyar hektardır. Halen bu karasal alanın %10'luk kısmında bitkisel üretim yapılmaktadır. Dünya karalarının %20'sini meralar, %20'sini dağlar, %20'sini buzullar, %20'sini ise çöller kaplamaktadır. Geriye kalan %10'luk alan ise çok yüzeysel bir toprak örtüsüne sahiptir. Dağlar ve buzullarla kaplı alanlarda tarımsal faaliyetlerin olanaksız olduğu göz önüne alındığında, geriye potansiyel tarım alanı olarak meralar, çöller veya yetersiz toprak örtüsüne sahip alanlar kalmaktadır. Genellikle engebeli ve çok eğimli alanları kaplayan meraların tarla arazisi olarak kullanılması büyük ölçüde olanaksızdır. Çöllerin ve yetersiz toprak örtüsüne sahip alanların tarıma uygun duruma getirilmesi ise büyük yatırım gerektirir. Ayrıca, her yıl artan nüfusa paralel olarak tarım alanlarının amaç dışı kullanıldığı (yerleşim, yol, fabrika vb.) dikkate alındığında, bitkisel üretimin artırılması için tarıma daha fazla alan ayrılamayacağı ortadadır.

Birim alandan alınan verimin artırılması için bir yandan bitkilerin genetik yapılarının iyileştirilmesi, bir yandan da yetiştirmede kullanılan tarım tekniklerinin (gübreleme, sulama, hastalık ve zararlılarla mücadele gibi) iyi bir şekilde uygulanması gerekir. Son yüzyılda bitkisel üretimde uygulanan gübreleme, sulama, hastalık ve zararlılarla mücadele için kullanılan kimyasallar verimde büyük artışlar sağlamış, ancak bu uygulamaların bilinçsiz bir şekilde yapılmasının uzun dönemde yeryüzündeki ekolojik dengeyi olumsuz yönde etkilediği ortaya çıkmıştır. Örneğin, uygulanan aşırı dozdaki azotlu gübrelerin toprakta yıkanarak içme sularını ve denizleri kirlettiği, gaz halinde topraktan uzaklaşan azot bileşenlerinin yeryüzünü zararlı ışınlardan koruyan ozon tabakasını olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır. Diğer taraftan, yabancıot ve zararlılarla mücadele amacıyla

uygulanan otöldürücü (herbisit) ve böceköldürücülerin (insektisit) tarım alanlarında doğal dengeyi bozarak, yeni hastalık ve zararlı ırklarının ortaya çıkmasına neden olduğu görülmüştür. Ayrıca, kalıcı etkisi olan bazı kimyasalların bitki bünyesinde biriktiği ve bu durumun bitkilerle beslenen insanlar ve hayvanların sağlığını olumsuz yönde etkilendiği anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, gelecekte daha fazla gübre ve ilaç kullanarak verimin artırılması söz konusu değildir. Bu durumda bitkisel üretimde verim artışlarının daha çok bitkilerin genetik yapılarının ıslahı ve kullanılan girdilerin daha bilinçli bir şekilde uygulanması ile sağlanabileceği ortaya çıkmaktadır.

Bugün bitki ıslahının tarımsal üretimin artırılmasındaki payı ve önemi tartışılmaz bir gerçektir. Klasik ıslah yöntemleri bitkisel üretimin artırılmasında oldukça başarılı olmasına karşın, doğası gereği yavaş ve zaman alıcıdır. Yapılan melezlemelerde bağlantı (linkage) nedeniyle istenilen özelliklerle birlikte istenmeyen birçok özellik de yeni bireye geçebilmektedir. Ayrıca, bu yöntemlerde doğadaki dar sınırlar içerisinde bulunan çeşitlilikten faydalanmak esastır. Günümüzde özellikle insan beslenmesinde önemli yeri olan ürünlerde genetik çeşitliliğin sınırlarına yaklaşmıştır. Oysa ki, klâsik bitki ıslahı yöntemlerinden beklenen başarı, üzerinde çalışılan populasyondaki genetik çeşitlilik ile doğru orantılıdır. Dolayısıyla, populasyonda var olan genetik çeşitliliğin artırılması gerekmektedir. Populasyon boyutlarındaki artış ise yer, zaman ve maliyet açısından önemli artışlara yol açmaktadır (Özgen ve Türet 1995). Populasyondaki genetik çeşitliliğin artırılması, türler arasındaki uyumsuzluğun kaldırılması, bağlantı engelinin aşılması yalnız istenilen genin aktarılması, mutasyonlar, protoplast füzyonu, haploid hücre ve bitkilerle mümkündür. İşte, bitkilerin tarımsal özelliklerinin iyileştirilmesinde yukarıda açıklamaya çalıştığımız klâsik bitki ıslahının doğasında var olan zorluklar, bitki doku kültürleri ve bitki genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak kolayca aşılabilmektedir.

Geliştirilen yeni biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması ile izole edilmiş bir genin doğrudan aktarılması söz konusu olduğundan, öncelikle farklı türler ve cinsler arası gen aktarımında melezleme zorunluluğu ortadan kaldırılacağından, klâsik ıslahta yabancı gen kaynaklarından yararlanmada en önemli engel olan doğal izolasyon, bir başka deyişle, kısırılık ve uyumsuzluk sorunu çözümlenmiş olmaktadır. Klâsik bitki ıslahının temelini oluşturan varyasyon ve seleksiyon, yeni teknolojide karşımıza transformasyon ve *in vitro* seleksiyon olarak çıkmaktadır. *In vitro* seleksiyonlar, tüm bitki yerine hücre seçimine

olanak sağlamakta; bu ise tarlada binlerce bitki yerine, petri kutularında milyonlarca hücre üzerinde çalışmak anlamına gelmektedir. *In vitro* koşullarda seleksiyonun herhangi bir zamanda yapılabilmesi nedeniyle, bitkinin gelişme dönemlerine bağlı kalınmaması da önemli bir avantaj sağlamaktadır (Özgen vd. 2000).

Bu yeni tekniklerde gen aktarım sistemlerinin esasını; tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının kalıcı olarak yerleştirilmesi oluşturur. Günümüzde, bitkilere gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan araç *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri, yapısında yer alan Ti plazmid üzerinde bulunan T-DNA ve virülens (*vir*) bölgeleri ile gen aktarımını gerçekleştirmektedir. T-DNA bölgesi, bakteriden bitki hücresine aktarılarak bitkinin genomuyla birleşen küçük bir DNA parçasıdır (Chilton vd. 1980). Ti vektör sisteminde bitkilere aktarılacak gen ya da genler önceden T-DNA'ya yerleştirilmiş olan seçici markör genlerin yanına, promotör ve terminatör baz dizileri arasına yerleştirilerek bitkilerde fonksiyonel duruma getirildikten sonra seçici markör genlerin yardımıyla istenen genleri taşıyan hücre ve dokular belirlenir. Bu bakteri yardımı ile tütün, patates, kolza ve domates gibi birçok kültür bitkisine başarıyla ve sürekli olarak gen aktarımının yapıldığı bilinmektedir. Bu özelliğinden dolayı *Agrobacterium tumefaciens* bakterisine *Bitkilerin Doğal Genetik Mühendisi* adı verilmiştir. Ancak, *Agrobacterium* tek çenekli bitkilere gen aktarımında yeterince başarılı olamamaktadır (Potrykus 1990, Raineri vd. 1990). Karşılaşılan bu engelleri aşabilmek için *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımı dışında birçok doğrudan gen aktarım yöntemi geliştirilmiştir.

Doğrudan gen aktarım tekniklerinde, genellikle çok yönlü klonlama bölgelerine ve fazla kopya sayısına sahip plazmidler kullanılmaktadır. Bu vektörler, plazmidin bakteri içerisinde seleksiyonunu sağlayan antibiyotige dayanıklılık geni yanında raportör ve bitkisel seçici genleri de taşırlar. Kullanım amacına uygun olarak yapılandırılan bir vektör kolayca *E. coli*'ye aktarıldıktan sonra, çoğaltılarak büyük miktarlarda izole edilebilmektedir (Draper vd. 1988). Transgenik bitkilerin üretimi için birçok doğrudan gen aktarım tekniği geliştirilmiş olup bunlar; doku, hücre, tohum veya embriyoların serbest DNA solüsyonu içerisinde inkübasyonu (Töpfer vd. 1989), normal tozlanmadan önce olgun ya da çimlenmekte olan çiçek tozlarının serbest DNA ile karıştırılması (Ohta 1986), DNA taşıyan liposomların protoplastlarla füzyonu (Deshayes vd. 1985), bakteri ve bitki protoplastları arasındaki füzyon (Hain vd. 1984), kimyasal maddeler yardımıyla protoplastlara plazmid aktarımı (Lindsey vd. 1988), DNA'nın bitki hücrelerine

mikroenjeksiyonu (Crossway vd. 1986), elektroporasyon yöntemiyle bitki dokularına DNA'nın aktarımı (Dekeyser vd. 1990), hızlandırılmış partiküller aracılığı ile hücre ve dokulara DNA aktarımı (Sanford 1988) ve gen aktarımında silikon karbit liflerinin kullanılması (Kaepler 1990) şeklinde sıralanabilir.

Çalışmalarda raportör ve seleksiyon özelliği olan markör genler kullanılarak eksplantın gen aktarımından sonra göstereceği gelişim aşamaları izlenebilmektedir. Bakteriyel kökenli olup, bitki hücre ve dokularına antibiyotik ve herbisitlere karşı dayanıklılık kazandıran bu genlerin aktarıldığı bitki materyali normalde öldürücü etkisi olan belirli antibiyotik ya da herbisit dozlarında canlı kalıp büyümesini sürdürebildiği için kolaylıkla seçilebilmektedir. Seçici markör genlerin yanında bitkilere aktarılan, yabancı genlerin belirtilerinin kontrol edilebilmesinde kullanılan raportör markör genlerin en sık kullanılanı ise " β -glucuronidase (*gus*)" genidir. Son yıllarda kullanılmaya başlanan diğer bir raportör markör gen olan "*gfp*" ise kimyasal bir reaksiyona gerek duyulmaksızın mikroskopta mavi ışık altında incelenen bitki kısımlarında yeşil floresan ışığı vererek gözlenebilen bir özelliğe sahip olması ve aynı bitki kısımlarının çalışmanın rejenerasyon aşamalarında da kullanılabilmesi nedeniyle çalışmalarda *gus* geninin yerini almaktadır (Mankin vd. 2001, Carlson vd. 2001).

Günümüzde doğrudan gen aktarma tekniklerinden en yaygın olarak kullanılanı, partikül bombardımanı (biyolistik) yöntemidir. Partikül bombardımanı yönteminde, yabancı DNA ile kaplanan 1-2 μm çapındaki altın ya da tungsten partiküllerinin yüksek hız kazandırılarak doğrudan bitki hücrelerine gönderilmesi ile gen aktarımı gerçekleştirilmektedir. Partikül bombardımanı yöntemi tek çenekli bitkilerde en çok kullanılan yöntemlerden biri olmasının yanında oldukça yeni bir yöntemdir. Yaklaşık 14 yıl önce Klein ve arkadaşları yüksek hız kazandırılmış mikropartiküllerin, üzerlerinde taşıdıkları nükleik asiti yaşayan hücrelere aktarmada kullanılmasını amaçlayan bir yöntem geliştirmişlerdir. İlk deneylerde soğan epidermal hücrelerine dışardan DNA veya RNA aktarımı yapıldıktan sonra tahıl hücrelerinde de biyolistik yöntem başarıyla uygulanmıştır.

Temel besin kaynağını oluşturan buğday ve çeltiğin tek çenekli bitkiler grubunda olması, partikül bombardımanı yöntemi ile yeni çeşit geliştirmenin önemini daha da artırmaktadır. Bu iki bitkinin verimlerinde sağlanacak en küçük artış, dünyadaki açlık sorununun çözümüne önemli bir katkı sağlayacaktır. Tek çenekli bitkilerde yeni çeşit geliştirilmesinde önemli avantajlar sağlayan doğrudan gen aktarma sistemi olan partikül bombardımanı yönteminin beraberinde önemli zorluklar getirdiği de bilinmektedir. Sistem; fiziksel,

kimyasal ve biyolojik parametreleri içeren bir yapıya sahiptir. Bir başka deyişle, bu sistemle başarılı sonuçlar alabilmek için bu üç parametrenin çalışılan bitkiye göre optimize edilmesi gerekir. Bu ise oldukça karmaşık bir iştir. Nitekim, her bir parametre onlarca değişkeni içerir. Bu nedenle, gen aktarımı yapılacak olan doku tipine bağlı olarak bu parametrelerin ayrı ayrı belirlenmesi ve gen aktarımı için optimum koşulların elde edilmesi zorunludur.

İyonlaştırıcı radyasyon, popülasyondaki varyasyonu artırması nedeniyle, istenilen genotiplerin elde edilmesinde gerek klâsik ve gerekse modern ıslahta kullanılan bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. İyonlaştırıcı radyasyon, geçtiği ortamlarda iyonlar oluşturan radyasyon olarak tanımlanır. İyonlaştırıcı radyasyon biyolojik materyaller ile etkileştiğinde, hücredeki kritik noktaları etkilemektedir. Radyasyon, hücredeki diğer atom ve moleküllerle ve özellikle de su ile karşılıklı etkileşime girerek önemli elemanlara ulaşır zarar verecek olan serbest radikalleri oluşturur. Radyasyon, pektinlerin önemli derecede bozulmasına neden olmaktadır. Dokulardaki yumuşama ve hücreler arasındaki bağın kırılması, suda çözünebilen pektinlerin artışına dayanmaktadır. Membran bozulması, radyasyon etkisiyle oluşan serbest radikaller tarafından fosfolipidlerin esterleşmemesi sonucu ortaya çıkmaktadır (Voisine vd. 1993). Kalsiyum, hücre duvarında bulunan pektik asitlerle kalsiyum pektat oluşturmak amacıyla etkileşerek hücre duvarı yapısının korunmasında özel bir rol oynar. Kalsiyum iyonları, hücreler arası bağın korunarak hücre duvarı yapısındaki değişikliklerin önlenmesinde etkilidir (Kovacs ve Keresztes 2002).

Sitoplazmada radyasyona duyarlılığı en yüksek olan organel mitokondridir. Bir organizmanın farklı dokuları, radyasyona farklı derecede duyarlılık gösterir (Yıldırım 1985). Yüksek dozdaki radyasyonun hücre düzeyindeki en belirgin etkilerinden biri hücre büyümesini baskılamasıdır. Özellikle hücre bölünmesi sırasında radyasyona maruz kalan hücrelerde büyüme kesintiye uğrar. Hücreyi oluşturan yapılardan çekirdek ve özellikle de bölünme halindeki kromozomlar, radyasyona oldukça fazla duyarlıdır. Radyasyon kromozomların kırılmasına, birbirine yapışmasına, kenetlenmesine ve kıvrılmasına yol açabilir. Kromozom kırıkları yeniden organize olabilir, aynı kalabilir veya bir başka kromozomla birleşebilir. Tüm bu nedenlerden dolayı mutasyon ortaya çıkabilir veya hücre ölümü gerçekleşebilir (Görpe ve Cantez 1992).

İyonlaştırıcı radyasyonun yüksek dozları bitkilerde solunumda artış, etilen üretiminde yükselme, enzim aktivitesinin başlatılması ve bazı protein türlerinin birikimi gibi fizyolojik

değişikliklere neden olmaktadır. Hücre duvarları, membranlar ve DNA gibi hücresel makromoleküller iyonlaştırıcı radyasyondan fiziksel ve biyokimyasal olarak önemli derecede etkilenmektedir (Nagata vd. 1999). Yüksek dozdaki radyasyon, bitki hormonlarını ve bunların sentezini olumsuz yönde etkilemekte, ışınlanan hücrelerin büyümeyi uyarıcı maddelere olan duyarlılığı azaltmaktadır (Lage vd. 2002).

Yüksek dozların aksine, düşük dozdaki gamma radyasyonun *in vivo* ve *in vitro* bitki gelişimini teşvik ettiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Düşük dozdaki radyasyonun teşvik edici etkileri arasında, meyvelerde erken olgunlaşma, meyve ağırlığında ve tohum çimlenmesinde artış sayılabilir. Düşük dozdaki gamma radyasyonunun teşvik edici etkisi doku kültüründe de gözlenmektedir. Düşük dozlu gamma radyasyonunun fasulyede doku kültürü gelişimini artırdığı, tütün doku kültüründe hücre farklılaşmasını teşvik ettiği, havuçta bitki rejenerasyonunu hızlandırdığı ve patatesteki mikroyumru oluşumu artırdığı bildirilmektedir (Al-Safadi vd. 2000).

Bilindiği gibi, mutasyona uğrayan birçok gen, hücre bölünmesi ve gelişmesini etkilemektedir. Yüksek dozda gamma radyasyonu kullanılarak tahıllardaki hücre bölünmesi durdurulduğunda, morfolojik olarak normal yaprakların oluşması artan hücre genişlemesi ile sağlanabilmektedir. Bu yapraklar az sayıda ancak büyük hücreleri içermektedir. Hücre bölünmesi ve genişlemesindeki olumsuzluklar, dokudaki diğer değişikliklerle giderilebilmektedir (Doonan 2000).

Gamma radyasyonu, bitki doku kültürlerinin gelişimini engelleyebilmektedir. Buna karşın, büyüme düzenleyicilerle yapılan radyasyon sonrası uygulamalar ile tüm bitki oluşumunun sağlandığı bilinmektedir. Ancak, izole edilmiş dokuların *in vitro* gelişimi ile ilgili çok az sayıda çalışma vardır. Işınlanan dokular, kontrollere oranla daha az yaş ağırlık artışı göstermektedir. Radyasyona duyarlılık eksplantların kültüre alındığı ortamın büyüme düzenleyicileri konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (Kerbaui ve Hell 1979).

Yapılan literatür taramasında, bu tezin temel amacı olan partikül bombardımanı ile gen aktarımında gamma radyasyonunun etkileri konusunda herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Bununla birlikte, bitki doku kültürlerinde radyasyon uygulamalarını ve ışınların bitkisel yapıya etkilerini içeren çalışmalar tarih sırasına göre aşağıda özetlenmiştir.

Schwartz ve Bay (1956), yüksek dozda iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılan mısır tohumlarında çimlenme oranının normal olup, fidelerin çevrelerine olumlu tepki verdiğini; ancak bitkilerin sayıca az ve ışınlanmamış bitkilere göre daha büyük hücreler içeren sınırlı sayıda yaprak oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Foard ve Haber (1961), tohumların gamma radyasyonuna uğratılmasından sonra buğday fidelerinin DNA sentezi, mitoz ve hücre bölünmesi olmaksızın geliştiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, gamma ışınlamasına tabi tutulan fidelerdeki gelişimin ışınlanmamış buğdaylardaki normal gelişime benzediğini, ancak hücre bölünmesinin olmayışı nedeniyle fidelerde yeni organların oluşmadığını, meristem bölgelerinde anormal yapılar görüldüğünü ve hücre boylarının aşırı arttığını bildirmişlerdir.

Kerbaui ve Hell (1979), gamma radyasyonunun bitki doku kültürlerinin gelişimini engelleyebildiğini, buna karşın, büyüme düzenleyicilerle yapılan radyasyon sonrası uygulamalar ile tüm bitki oluşumunun sağlandığını bildirmişlerdir. İzole edilmiş dokuların *in vitro* gelişimi ile ilgili çok az sayıda çalışma olduğunu vurgulayan araştırmacılar; ışınlanan dokuların, kontrollere oranla daha az yaş ağırlık artışı gösterdiklerini ve radyasyona duyarlılığın eksplantların kültüre alındığı ortamın büyüme düzenleyicileri yoğunluğuna bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir.

Sheppard ve Evenden (1986), düşük radyasyon dozunun uyarıcı etkisini araştırdıkları çalışmalarında 0.5-50 Gy arasında gamma radyasyonu uygulaması sonrasında arpa ve buğdayda bitkileri incelemişlerdir. Uygulama sonrasında her iki türde de gelişmenin hızlandığı gözlenmiş, düşük dozlardaki radyasyonun canlı dokularındaki suyu iyonlaştırması sonucu ortaya çıkan peroksitler ve serbest radikallerin genlere baskı yaparak protein sentezini artırıcı etki yaptığı, enzim üretimindeki artışın biyokimyasal reaksiyonları hızlandırdığı belirlenmiştir.

Atila ve Peşkirioğlu (1990), gamma radyasyonunun Çukurova 1518 pamuk çeşidi üzerine etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmalarında tohumları 100-700 Gy arasındaki dozlarla ışınlamışlar, çıkışın dozlardaki artıştan etkilenmediğini, ancak hipokotil uzunluğu, fide boyu, fide yaş ve kuru ağırlıklarının artan doza paralel olarak önemli derecede azaldığını bildirmişlerdir.

Daniell vd. (1991), üç ekmeklik buğday çeşidinde anter ve olgunlaşmamış embriyo kültüründen elde edilen kalluslara ve yapraklara, 0.7 µm çapındaki tungsten partiküllerine

bağlanan pBI121 plazmidi aracılığı ile "*gus*" raportör ve "*nptII*" kanamisine dayanıklılık genlerini aktarmışlardır. Gen aktarımı barutla çalışan bombardıman cihazı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bombardımandan üç gün sonra dokular "Histokimyasal GUS Analizi"ne tabi tutulmuş, tüm eksplantlarda en yoğun boyanmanın kloroplastlarda ortaya çıktığı bildirilmiştir.

Tutluer (1993), gamma radyasyonunun çok yıllık çavdarda morfolojik ve sitolojik etkilerini araştırdığı çalışmasında, 20-150 Gy dozları arasında 9 farklı dozda ışınlama yapmış ve doz artışı ile birlikte fide boyu, kök uzunluğu, fide kuru ağırlığı, başakta başakçık sayısı, tane sayısı ve fertilitenin olumsuz olarak etkilendiğini ve kromozom anormalliklerinin saptandığını bildirmiştir.

Voisine vd. (1993), iyonlaştırıcı radyasyonun, dokularda yumuşama ve kararmaya neden olduğunu; özellikle gamma radyasyonunun karnıbahar çiçek taslaklarında membran fosfolipidlerinin bozulmasını hızlandırdığını; membran bozulmasının, radyasyon süresince oluşan serbest radikaller tarafından fosfolipidlerin esterleşmemesi sonucu ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Weeks vd. (1993), ekmeklik buğdayda olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kallus kültürlerine pAHC25 plazmidi aracılığı ile "*gus*" raportör ve "*bar*" seleksiyon genlerini aktararak geniş etkili herbisitlere dayanıklı gen aktarılmış bitkiler elde etmişlerdir. Çalışmada 1 µm çapındaki altın partiküllerine bağlanan DNA, hedef hücrelere 1100 psi basınç ve 13 cm mesafeden helyum ile çalışan bombardıman cihazı kullanarak aktarılmıştır. GUS aktivitesinin belirlenmesinde "Histokimyasal GUS Analizi", herbisitlere dayanıklılığın belirlenmesinde kalluslar artan dozlarda Basta herbisiti içeren ortamlara aktarılmış, canlılığını sürdürenlere "PAT Aktivitesi" uygulanmıştır. Araştırmacılar, patojenlere dayanıklı ekmeklik kalitesi yüksek buğday elde etmede biyolistik yöntemin başarıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Vasil vd. (1993), üç ekmeklik buğday çeşidinde olgunlaşmamış embriyolara pBARGUS, pAHC25 ve pMON19526 plazmidleri aracılığıyla "*gus*" raportör ve "*bar*" seleksiyon genlerini aktardıkları çalışmalarında, barut ve helyum ile çalışan partikül bombardıman cihazlarını kullanarak spermidinin gen aktarım oranına etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonunda partikül bombardıman cihazının barutla ya da helyum gazıyla çalışan modelleri arasında etkinlik bakımından büyük fark olmadığı, ancak helyum modelinin

daha temiz ve güvenli çalıştığı, sonuçlar bakımından da süreklilik gösterdiği belirtilmiş ve ayrıca spermidin olmadan yapılan bombardımanlarda gen aktarımının başarısız olduğu vurgulanmıştır. Araştırmacılar, kullandıkları iki yeni plazmidin (pAHC25, pMON19526) buğdaya gen aktarımında başarılı sonuçlar verdiğini, "*bar*" genini kullanarak geniş etkili herbisitlere dayanıklı bitkiler elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Becker vd. (1994), olgunlaşmamış kışlık buğday embriyolarına pDB1 plazmidi aracılığıyla "*gus*" raportör ve "*bar*" seleksiyon genlerini PDS-1000/He cihazını kullanarak aktarmışlardır. 0.4-1.2 µm çapındaki altın partiküllerine bağlanan DNA, 900-1550 psi basınç ve 6 cm mesafeden dokulara aktarılmıştır. Araştırmacılar, 116.6 µg ve 29.2 µg altın kullanarak yaptıkları atışlarda, partikül yoğunluğu ile hücrelerde zarar oranı arasındaki ilişkiyi belirlemeye çalışmışlardır. Bombardımandan iki gün sonra petriyelerdeki embriyoların yarısı GUS aktivitesi için kullanılmış, diğer yarısı ise 14 gün kallus ortamında bırakılarak bitki gelişimi bombardıman edilmemiş diğer embriyolarla karşılaştırılmıştır. Yüksek yoğunlukta partikül ile bombardıman edilen embriyolarda kallus oluşumunun azaldığı, düşük partikül yoğunluğu uygulananlarda ise kontrol bitkileriyle aynı gelişimi gösterdikleri belirlenmiştir. Araştırma sonucunda düşük partikül yoğunluğu kullanılan atışların daha başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir.

Altpeter vd. (1996), ekmeklik buğdayda olgunlaşmamış embriyolara pAHC25 plazmidi ile "*gus*" raportör ve "*bar*" seleksiyon genlerini PDS-1000/He cihazı aracılığı ile aktardıkları çalışmalarında kullanılan altın miktarının mavi nokta ve dolayısı ile transgenik bitki sayısına etkisini araştırmışlardır. Bombardımanda kullanılan altın partiküllerinin miktarı azaltıldığında, doku zedelenmesi en aza inmiş ve mavi nokta sayısında %50 oranında artış belirlenmiştir.

Özgen vd. (1998), 12 ekmeklik buğday çeşidinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna eksplant türünün etkisini (olgunlaşmamış embriyo ve endosperm-destekli olgun embriyo) araştırmışlar; her iki embriyo kültüründe de rejenere bitki elde edildiğini ve kültür tepkilerinin genotiplere bağlı olduğunu, kallus oluşumu, rejenerasyon kapasitesi ve rejenere bitki sayısının birbirinden bağımsız olduğunu, olgun embriyolarda kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunun yüksek olduğunu ve yılın her döneminde kolay bulunabileceği için buğday doku kültürü çalışmalarında başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Akıncı (1999), "Sorgül" makarnalık buğday çeşidinin tohumlarına 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 Gy'lik gamma radyasyonu uygulamış, gözlemlerini M₁ bitkileri için sera ve tarlada, M₂ bitkileri için tarlada yürütmüştür. M₂ bitkilerinin başaktaki başakçık sayısı, başaktaki tane sayısı ve başaktaki tane ağırlığı gibi özellikleri üzerinde gamma radyasyonu dozlarının istatistiki olarak önemli etkiler oluşturduğunu, artan gamma radyasyonu dozlarına paralel olarak M₁ bitkilerinde başaklanma süresi uzarken, incelenen diğer karakterlere ait değerlerde azalmalar olduğunu, doz artışı ile M₂ bitkilerinde klorofil mutasyonlarının önemli ölçüde arttığını bildirmiştir.

Charbaji ve Nabulsi (1999), asmaya ait iki çeşit (Helwani ve Cabernet) ve iki anaçın (R.99 ve 3309) sürgün ucu ve tek boğum eksplantlarını 0, 2, 5 ve 7 Gy dozlarında ışınlayarak DSD1 ortamında 60 gün süre ile kültüre almışlardır. Araştırmacılar, 7 Gy'lik dozun her iki çeşidin sürgün uzunluklarını ve 5 Gy'lik dozun ise "Helwani" çeşidi ile iki anaçın bitkilerindeki kök sayısını artırdığını bildirmişlerdir. Her iki çeşitte de 2 ve 7 Gy'lik dozlarla yapılan ışınlamalarda kök uzunlukları, ışınlanmayan kontrole göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. 5 Gy'lik gamma dozu R.99 anaçın kuru ağırlığını artırırken, "Helwani" ve "Cabernet" çeşitlerinde benzer etkiler 2 ve 7 Gy'lik dozlarda gözlenmiştir. 5 ve 7 Gy'lik dozlarda bitkilerin yaprak sayıları ışınlanmayan kontrolle kıyaslandığında artış göstermiştir.

Nagata vd. (1999), iyonlaştırıcı radyasyonun yüksek dozlarının bitkilerde solunumda artış, etilen üretiminde yükselme, enzim aktivitesinin başlatılması ve bazı protein türlerinin birikimi gibi fizyolojik değişikliklere neden olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, hücre duvarları, membranlar ve DNA gibi hücrel makromoleküllerin iyonlaştırıcı radyasyondan fiziksel ve biyokimyasal olarak önemli derecede etkilendiklerini bildirmişlerdir.

Öktem vd. (1999), "Atay" ekmeklik ve "Çakmak" makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyolarına partikül bombardımanı ile gen aktarımı yaptıkları çalışmalarında pBSGUSINT plazmidini kalsiyum nitrat metodunu kullanarak tungsten partiküllerine bağlamışlardır. Araştırmacılar olgun embriyolara farklı basınç ve hazne vakumlarında bombardıman yapmışlar, eksplantlar bombardımandan 24 saat sonra ya da embriyoların çimlenmesinden 7 gün sonra "Histokimyasal GUS Analizi"ne tabi tutmuşlardır. Bombardıman yapılan embriyoların %80'inde ve bu embriyolardan gelişen 7 günlük fidelerde GUS geni nedeniyle oluşan mavi renklenmeler görülmüştür.

Sayar vd. (1999), diploid, tetraploid ve heksaploid buğday çeşitlerinde endosperm destekli olgun embriyo tekniğini kullanarak, tane iriliğinin kallus oluşumuna etkisini araştırdıkları çalışmalarında; buğday çeşitlerine ait tohumları küçük ve büyük olarak ikiye ayırmışlar, yüzey sterilizasyonu uygulanan bu tohumların embriyoları steril kabin içerisinde endospermden hafifçe ayrılıp 8 mg/l 2,4-D içeren sıvı ortamda kallus oluşturmaları sağlanmış, içinde oksin bulunmayan MS ortamına rejenerasyon için aktarılmıştır. Araştırmacılar, tüm genotiplerde büyük tanelerin, küçük tanelere göre kallus oluşturma frekansı, kallus net ağırlığı, rejenerasyon kapasitesi ve kültür oluşturabilme yeteneğinin önemli derecede yüksek değerler gösterdiğini; tohum ağırlığı ile kallus ağırlığı ($r = 0,86$) ve kallus ağırlığı ile rejenerasyon kapasitesi ($r = 0,85$) arasında önemli ilişki olduğunu, büyük taneli buğdaylarda endosperm destekli embriyo tekniği kullanılarak yüksek düzeyde rejeneratif kallus oluşumu elde edildiğini, bu nedenle bu tekniğin olgunlaşmamış embriyolara alternatif olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Al-Safadi vd. (2000), üç farklı patates çeşidine uygulanan 4 farklı gamma radyasyon dozunun (2.5, 5, 10, 15 Gy) *in vitro* şartlarda mikroyumru oluşumu üzerine etkilerini incelemişler, gamma radyasyonunun düşük dozlarının *in vivo* ve *in vitro* bitki gelişimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Düşük dozdaki radyasyonun teşvik edici etkileri arasında, meyvelerde erken olgunlaşma, meyve ağırlığında artış ve yüksek tohum çimlenmesi gibi özelliklerin olduğunu belirten araştırmacılar; düşük dozdaki gamma radyasyonunun teşvik edici etkisinin doku kültüründe de gözlemlendiğini, fasulyede doku kültürü gelişimini artırdığını, tütün doku kültüründe hücre farklılaşmasını teşvik ettiğini, havuçta bitki rejenerasyonunu hızlandırdığını ve patateste mikroyumru oluşumunu artırdığını vurgulamışlardır.

Doonnan (2000), mutasyona uğrayan birçok genin hücre bölünmesi ve gelişmesini etkilediğini rapor etmiştir. Buna göre, yüksek dozda gamma radyasyonu kullanılarak tahıllardaki hücre bölünmesi durdurulduğunda, morfolojik olarak normal yaprakların oluşması artan hücre genişlemesi ile sağlanabilmektedir. Bu yapraklar az sayıda ancak büyük hücreleri içermektedir. Hücre bölünmesi ve genişlemesindeki olumsuzluklar, dokudaki diğer değişikliklerle giderilebilmektedir.

Önde vd. (2001), partikül bombardımanı yöntemi ile korunga kotiledonlarına pBI221.23 plazmidini aktardıkları çalışmalarında, geçici GUS gen ifadesi gözlemişlerdir. 1100 ve 1350 psi basınç, 6 ve 9 cm atış mesafesi, 1 μm ve 1.6 μm çapa sahip altın partikülleri

kullanmışlar, bombardımandan 48 ve 120 saat sonra "Histokimyasal GUS Analizi" yapmışlardır. Sonuçta, 1350 psi basınç ve 6 cm atış mesafesi başarılı bulunmuş, 1 µm çaplı altın partikülleri kullanılıp, 48 saat sonra yapılan GUS analizinden en iyi sonuçlar alınmıştır. Yapılan mikroskop gözlemleri sonucunda, altın partiküllerinin çoğunun epidermal hücre katmanında bulunduğu, ancak %1'den daha az bir kısmının sub-epidermal tabakaya geçebildiği görülmüştür.

Budak ve Yıldırım (2002), "Ege 88" ve "Kundur" makarnalık buğday çeşidi tohumlarına 50, 100, 150, 200 ve 250 Gy dozlarında gamma radyasyonu uygulamışlardır. Her generasyonda bitki boyu (cm), başaklanma tarihi (gün), bin tane ağırlığı (g), parsel verimi (g) ve tane protein içeriği (%) belirlenmiştir. Araştırmacılar, Ege 88 çeşidi mutantlarının tane veriminin Kunderu çeşidi mutantlarına göre daha yüksek, fakat protein içeriğinin düşük olduğunu bildirmişlerdir. Kunderu makarnalık çeşidine ait tane veriminin 250 Gy gamma radyasyonu uygulamasında kontrolden yüksek olduğu belirlenmiştir.

Kovacs ve Keresztes (2002), iyonlaştırıcı radyasyonun biyolojik materyaller tarafından soğurulduğunda, klorofil sentezini engellediğini, hücredeki kritik noktaları etkilediğini bildirmektedirler. Araştırmacılar, radyasyonun hücredeki diğer atom ve moleküllerle ve özellikle de su ile karşılıklı etkileşime girerek önemli elemanlara ulaşarak zarar verecek olan serbest radikalleri oluşturduklarını; radyasyonun bu dolaylı etkisinin vejetatif hücrelerde ve %80'nini suyun oluşturduğu sitoplazmada da önemli olduğunu vurgulamışlardır. Morfolojik değişimlerin, farklı doku ve hücrelerin biyolojik ve kimyasal değişimlerinden kaynaklandığını belirten araştırmacılar, radyasyonun pektinlerin önemli derecede bozulmasına neden olduğunu; dokulardaki yumuşama ve hücreler arasındaki bağın kırılmasının ise suda çözünebilen pektinlerin artışından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Lage vd. (2002), radyasyonun bitki hormonlarını ve bunların sentezini olumsuz yönde etkilediğini; ışınlanan hücrelerin büyümeyi uyarıcı maddelere olan duyarlılığını azalttığını; isoperoksidazların, dayanıklılık ve yaralanmaya tepki göstergesi olarak bitki fizyolojisinde önemli role sahip olan enzimlerden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, radyasyonun tatlı patatesten boğum segmentleri, kök ve sürgün oluşturmada doza bağlı olarak düşüşler gösterebildiğini belirtmişlerdir.

Hyun vd. (2003), çeltikte azetidine-2-carboxylic acid (AZCA) dayanımını artırmak için *in vitro* mutagenesisten yararlanmışlardır. Kalluslar 30, 50, 70, 90 ve 120 Gy dozlarında ışınlanmış, 50 ve 70 Gy'lik dozlarla ışınlanan kalluslarda önemli derecede AZCA dayanımı gözlenmiştir. AZCA'dan seçilen ışınlanmış kallusların ışınlanmayanlara göre tuza daha toleranslı oldukları saptanmıştır. Mutasyon uygulaması yüksek ozmotik basınca dayanıklılık sağlamıştır. Serbest prolin düzeyi, AZCA'ya dayanıklı hücre hattında kontrole göre 3.5 kat artmıştır. *In vitro* mutagenesis yoluyla yüksek prolin içeren hücre hatlarının seçimi başarılı olmuştur. Araştırmacılar, çeltikte bu yöntemin kullanılmasıyla strese toleranslı çeşitlerin geliştirilmesinin mümkün olabileceğini belirtmişlerdir.

Lee vd. (2003), *in vitro* koşullarda tuza toleranslı çeltik geliştirmek için gamma radyasyonu kullanarak yaptıkları çalışmada; tuza toleranslı hatları yüksek bitki boyu, kök uzunluğu ve kök sayısı gibi karakterleri dikkate alarak seçmişlerdir. Orijinalleri ile kıyaslandığında, mutant hatlarda α -amilaz ve alkol dehidrogenaz aktivitelerinde önemli derecede artışlar gözlenmiştir. Mutantlar canlı kalma bakımından yüksek değerler göstermiş ve tuz stresine daha dayanıklı olmuştur. Çalışmada, tuz stresi koşullarında, bitki hücreleri için gerekli olan, serbest prolin düzeyinde önemli artışlar olduğu, bunun ise enzimlerin ve zar yapılarının korunmasında etkili olduğu belirtilmiştir.

Adu-Dapaah ve Sangwan (2004), gamma radyasyonunun yerfistiğinde yüksek genetik varyasyona neden olduğunu ve verimi artırmak için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Nagata vd. (1999), gamma radyasyonuna tabi tutulan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin kök hücrelerinin radyal gelişmesi ve kılcal köklerin uzamasını incelemişlerdir. Araştırmacılar, gamma radyasyonu nedeniyle kökte oluşan morfolojik değişikliklere, suyun hidrolizi ile ortaya çıkan aktif oksijen türleri sonucu artan etilen üretiminin neden olduğunu bildirmişlerdir.

Zaka vd. (2004), 5 günlük fideleri 0 ile 60 Gy arasında değişen dozlarda kısa süreli gamma radyasyonuna tabi tutmuşlar, 2 generasyon boyunca bitki büyüme ve gelişimini incelemişlerdir. 6 Gy'in üstündeki dozlar G_1 bitkilerinin gelişimini ve verimliliğini önemli derecede engellemiş, 40 Gy ve üzerindeki dozlarla yapılan ışınlamalarda fide gelişmemiştir. Bu etkiler G_2 generasyonuna daha şiddetli olarak yansımıştır. Işınlanan G_1 ve G_2 bitkileri kontrolden önemli derecede daha kısa olmuştur. Her iki generasyonda da (G_1 ve G_2) bitkilerindeki ortalama bakla sayısı uygulanan tüm dozlarda en az %20

oranında azalma göstermiştir. Benzer şekilde, ortalama yumurtalık ve bakladaki normal gelişmiş tohum sayıları G_1 'de 10 Gy ve G_2 'de ise 0.4 Gy'lik dozlardan sonra önemli derecede azalmıştır. G_1 ve G_2 bitkilerinde 0'dan 10 Gy'e kadar olan dozlarla yapılan ışınlamalar sonucunda mayozda görülen anormalliklere paralel olarak erkek kısırlıkta artışlar ortaya çıkmıştır. Bitki gelişimindeki izlenen uzun süreli değişiklikler radyasyon nedeniyle oluşan genomik dengesizlikleri işaret etmektedir. Ancak, 0 ile 10 Gy dozları arasında yapılan ışınlamalarda G_1 tohumlarının depo proteinlerinde ne miktar, ne de kalite yönünden herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

Akıncı ve Baysal (2005), farklı dozlardaki gamma ışınlarının (0, 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 Gy) Sorgül makarnalık buğday çeşidine olan etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, M_1 ve M_2 generasyonlarında başaklanma süresi, bitki boyu, başak uzunluğu, başaktaki başakçık sayısı, başaktaki tane sayısı, başaktaki tane ağırlığı ve 1000 tane ağırlığı; M_2 generasyonunda fertil bitki oranı, bitkide başak sayısı ve bitki verimini incelemişlerdir. Artan gamma dozlarının M_1 bitkilerinin incelenen bütün karakterlerinde ve M_2 bitkilerinin başaktaki başakçık sayısı, başaktaki tane sayısı ve başaktaki tane ağırlığını önemli derecede etkilediği belirlenmiştir.

Li vd. (2005), iki patates çeşidinin *in vitro* çoğaltılan bitkiciklerinden alınan eksplantları farklı dozlarda (0, 2, 4, 6 ve 8 Gy) gamma radyasyonuna maruz bırakarak, *in vitro* mikroyumru üretimi ve kalitesi üzerine radyasyonun teşvik edici etkisini araştırmışlardır. Gamma radyasyonunun 4, 6 ve 8 Gy'lik dozları ile mikroyumru oluşum periyodu 10-15 gün arasında uzamıştır. Bitkiciklerin 4 Gy ile ışınlanması hem mikroyumru sayısında ve hem de taze ağırlıkta önemli artışlara neden olmuştur. Radyasyonun düşük dozları (2 ve 4 Gy) mikroyumruların nişasta kapsamını artırırken, yüksek dozlar (6 ve 8 Gy) askorbik asiti yükseltmiş ve şeker kapsamını düşürmüştür. 4 ve 6 Gy'lik dozlar da mikroyumruların protein içeriğini önemli derecede artırmıştır.

Yılmaz vd. (2005), Acalpi-952 pamuk çeşidinde Kobalt 60 kaynağını kullanarak yaptıkları çalışmalarında 100, 200, 300 ve 400 Gy gamma dozları ile tohum ışınlaması yapmışlardır. Her doza ait ışınlanan tohumlar M_1 generasyonunu oluşturmak üzere ekilmiş ve yaşayabilen bitkilerin tohumları alınmıştır. M_2 generasyonunda her bitkiye ait tohumlar birer sıra halinde yetiştirilerek bitki boyu, meyve dalı sayısı, koza sayısı, koza ağırlığı, koza kütlü ağırlığı ve 100 tohum ağırlığı gibi karakterler incelenmiştir. Her iki

generasyonda da incelenen karakterler bakımından ebeveyn çeşide göre olumlu ve olumsuz yönde varyasyonlar belirlenmiştir.

Chung vd. (2006), *Lithospermum erythrorhizon* S. bitkisinin hücre süspansiyon kültürlerine uygulanan 2, 16 ve 32 Gy'lik gamma radyasyonunun sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkilerini inceledikleri araştırmalarında, hücrelerin shikonin sentezinin 2 Gy'lik dozda %240, 16 Gy'lik dozda %400 ve 32 Gy'lik dozda %180 arttığını bildirmişlerdir. Çalışmada shikonin sentezi için gerekli olan "*p*-hydroxybenzoic acid (PHB) geranyltransferase" enziminin gamma radyasyonu ile aktive edildiği görülmüştür. Bu enzim aktivitesindeki artış, bitkinin gamma radyasyonu sonucu maruz kaldığı strese karşı savunma mekanizmasına katkı sağlayan shikonin gibi sekonder metabolitlerin birikimlerine neden olmaktadır.

Bu çalışmada, gamma radyasyonundan yararlanılarak hücre ve dokularda fiziksel ve biyolojik değişikliklerin oluşturulması ve bu şekilde partikül bombardımanı yöntemi kullanılarak yapılan gen aktarımı ile gen geçişlerinin ve bitki rejenerasyonunun artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, öncelikle farklı gamma radyasyon kaynaklarının (Kobalt 60 ve Sezyum 137) ve bunlara ilişkin dozların bitki rejenerasyonuna olan etkisi belirlenmiş; uygun kaynak ve dozlar belirlendikten sonra uygun kaynaktan yararlanılarak partikül bombardımanı ve bitki rejenerasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

Bu çalışma temelde üç farklı konuyu içermektedir. Bunlar; olgun embriyoların kültüre alınmasıyla elde edilen kalluslardan sürgün gelişiminin sağlanabilmesi için kullanılan *in vitro* doku kültürü, embriyo ve kallus eksplantlarına doğrudan gen aktarımı ve bu eksplantların ışınlanmasında kullanılan radyasyon konularıdır. Bu bölümde, ilgili konular ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.1. Doku Kültürü

Doku kültürü çalışmaları farklı teknikleri kapsamaktadır.

2.1.1. Kallus kültürü

Kallus; düzensiz bölünen, organize olmamış hücreler kümesidir (Gamborg ve Shyluk 1981). Gen aktarımı gibi ileri biyoteknolojik çalışmaların yapılabilmesi için önce kallus kültürlerinin oluşturulması gerekmektedir (Groose ve Bingham 1984). Kallus kültürü, aynı zamanda hücre ve protoplast kültürlerinin başlangıç materyalini de oluşturmaktadır. Kallus kültürlerinin oluşturulmasında bitkilerin çiçekleri, olgunlaşmamış endosperm ve embriyoları, yaprakları, gövde parankiması, hipokotilleri, petiol ve yaprak orta damarı gibi kısımları kullanılmaktadır. Bitki türlerine göre kallusun yapısı, rengi ve büyüme şekli farklılık gösterebilmektedir.

Kallus kültürü sonucu elde edilen bitkilerde görülen kromozom sayısı ve yapısındaki farklılık bitki ıslahı için son derece önemlidir. Çünkü, ıslah programlarından beklenen sonucun alınabilmesi için üzerinde çalışılan populasyonun genetik farklılık göstermesi gerekmektedir. Üzerinde çalışılan populasyonda genetik farklılık gösteren bireyler ne kadar fazla ise, ıslahtan beklenen başarı o denli yüksek olmaktadır. Günümüzde, kallus oluşumundan sonra yüksek oranda bitki rejenerasyonu bitkilere gen aktarımının temel şartı haline gelmiştir. Kallus dokusundan bitki rejenerasyonu iki şekilde gerçekleşir. Bunlar; organogenesis ve somatik embriyogenesis'tir.

Kallustan organogenesis yoluyla bitki rejenerasyonunda, kallus önce yüksek sitokinin içeren ortamlarda kültüre alınarak sürgün oluşturması sağlanır ki, buna indirek organogenesis adı verilmektedir. Daha sonra oluşan sürgünler köklendirilmek amacıyla oksin kapsamı yüksek ortamlara aktarılır.

Araştırmalar, organogenesis yoluyla rejenere olan bitkilerin genetik olarak farklılık gösterdiğini ve bu nedenle bu yöntemin vejetatif çoğaltma ya da genetik materyallerin muhafazası amacıyla kullanılamayacağını göstermiştir (Vasil 1987). Direk organogenesisiste sürgünler doğrudan eksplant üzerinden gelişirler.

Somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu; somatik hücre ya da dokulardan somatik embriyoların oluşumu ve bu embriyolardan sürgünlerin gelişimi yoluyla gerçekleşir. Somatik embriyogenesisin iki tipi vardır. Direk somatik embriyogenesisiste; embriyo kallus oluşumu gerçekleşmeden doğrudan somatik bir hücreden gelişir (Finer 1994, Merkle vd. 1990). İndirek somatik embriyogenesisiste ise; somatik embriyolar ara bir kallus safhasından sonra gelişir (Ammirato 1987, Rashid 1988). Her iki sistemde de embriyolardan gelişen sürgünler köklendirilerek bitkiler elde edilir.

2.1.2. Meristem kültürü

Meristemler tüm bitkilerde sürgünlerin ucunda bulunan ve bitkilerin büyümesini sağlayan dokulardır (Kartha 1981). Meristem kültüründe, bitkilerden alınan sürgün uçları steril edildikten sonra ışık mikroskobu altında meristem dokusu çıkarılarak kültüre alınır. Elde edilen sürgünler köklendirildikten sonra steril toprağa aktararak gelişmeleri sağlanır.

Meristem kültürü, özellikle patates gibi vejetatif çoğalan bitkilerde virüsten arı bitki elde etmek için uygulanır (Hartmann vd. 1990). Bitkilerde virüslerin neden olduğu enfeksiyonlarla mücadele oldukça zordur. Bitkilerin virüslerden temizlenmesinde başlıca üç yöntem kullanılır. Bunlar; kimyasal madde kullanımı, sıcaklık muamelesi (termoterapi) ve meristem kültürü yöntemleridir.

Kimyasal maddeler kullanılarak virüssüz sağlıklı bitki elde edilebilmesi oldukça zordur. Sıcaklık muamelesi ise; virüslerin yok edilmesinde kullanılan etkili bir yöntemdir. Ancak, bitkinin sığa karşı çok hassas olması ya da virüsün sıcaktan etkilenmemesi durumunda bu yöntem başarısız olabilmektedir.

Virüssüz bitki elde edilmesinde en sık kullanılan ve en yüksek başarı alınan yöntem; meristem kültürüdür. Limasset ve Corneut, mozaik virüsünün tütünün kökü boyunca farklı yoğunluktaki dağılımından yola çıkarak, aynı durumun sürgünde de gözlenebileceğini ve meristemin virüssüz olabileceği fikrini ortaya atmışlardır. Morel ve Martin (1952), dahlia

bitkisinin meristemlerini *in vitro* koşullarda kültüre alarak ilk virüssüz bitkileri elde etmişlerdir.

Bitkilerin farklı kısımlarında virüs yoğunluğunun farklı olmasının nedeni henüz tam olarak aıklanamış değildir. Bu konuda farklı görüşler mevcuttur. Bazı araştırcılara göre meristem bölgesindeki hücre çoğalması virüslerden daha hızlı olduğundan, buradaki virüs yoğunluğu daha az olmaktadır. Bir kısım araştırcılar meristemdeki virüs yoğunluğunun düşüklüğünü, meristemde virüslerin çoğalmasını teşvik eden enzimlerin bulunmayışına bağlamaktadırlar. Kimi araştırcılar ise, meristemde bulunan bazı maddelerin virüslerin çoğalmasını engellediğini savunmaktadırlar (Hatipoğlu 1995).

2.1.3. Embriyo kültürü

Bu teknik; olgunlaşmamış ya da olgun embriyoların steril koşullarda izolasyonu ve uygun ortamlarda kültüre alınmasını kapsamaktadır (Hu ve Wang 1986).

Embriyo kültürünün, embriyoların olgunlaşmış ya da olgunlaşmamış olmasına göre iki türü vardır. Olgunlaşmış embriyolar, tohum çimlenmesini önleyen dormansi durumunu ortadan kaldırmak için kültüre alınır. Olgunlaşmamış embriyolar ise, normal şartlarda gelişimini tamamlayamayan embriyolardan bitki elde etmek amacıyla kullanılır.

Embriyo kültürünün pratikte birçok kullanım alanı vardır. Bunlar;

- Normal şartlarda çimlenmesi mümkün olmayan bitki tohumlarının imlendirilmesinde,
- Dormansi gösteren bitkilerde, dormansinin kaldırılıp, bitki tohumlarının hızla imlendirilmesinde,
- Türler ve cinsler arası melezlemelerde ortaya çıkan uyuşmazlık nedeniyle embriyoların gelişemediği durumlarda embriyo gelişiminin sağlanması,
- Haploid bitkilerin elde edilmesinde.

2.1.4. Anter kültürü

Anter kültürünün esasını; belli bir gelişme safhasındaki mikrosporları içeren anterlerin steril şartlar altında iek tomurcuklarından çıkartılarak uygun ortamlarda kültüre alınması ve haploid bitkilerin elde edilmesi oluşturur. Daha sonra bitkiler saksılara aktararak kontrollü şartlar altında gelişmeleri sağlanır. En sonunda gelişen bitkilerin kromozomları katlanarak homozigot diploid fertil bitkiler elde edilir (Barnabas vd. 1991).

İlk defa 1964 yılında Guha ve Maheshwari, anter kültürü tekniğini kullanarak *Datura innoxia*'dan bitkiler elde etmişlerdir. Bugüne kadar 200'den fazla türde haploid bitki elde edildiği bildirilmektedir (Dunwell 1986).

Anter kültürünün pratikteki kullanım alanları aşağıda verilmiştir (Kasha vd. 1990);

- Klâsik ıslah yöntemleriyle yeni bir çeşidin geliştirilmesi yaklaşık 10 yıl alırken, anter kültürünün kullanılmasıyla bu süre 3-4 yıla kadar inebilmektedir.
- Homozigot diploid bitkiler bir generasyonda elde edilebilmektedir.

2.1.5. Hücre kültürü

Bitki hücreleri, tek bir hücreden bölünme ve farklılaşma yoluyla tüm bitki oluşturma yeteneğine sahiptir ki, buna totipotansi adı verilir (Liu 1981).

Hücre kültürünün esasını; steril şartlar altında tek bir bitki hücresinden tüm bitkinin elde edilmesi oluşturur. Bu kültürler, kallus parçalarının sıvı ortamlarda bireysel hücreler oluşuncaya kadar çalkalanması ile elde edilir. Daha sonra bu hücreler sıvı ya da agarlı besin ortamlarında kültüre alınarak hızlı hücre bölünmesi başlatılır. Bundan da kallus ve somatik embriyogenesis yoluyla rejenerasyon sağlanır (Rashid 1988).

Hücre kültürünün pratikte çeşitli kullanım alanları vardır. Bunlar;

- Hücre kültürleri mutasyon çalışmalarına materyal sağlarlar. Burada ya eksplant kültür öncesi mutasyona uğratılır (Carlson ve Polacco 1975) ya da hücre süspansiyonu elde edildikten sonra bunların kültürü sırasında çeşitli kimyasal mutagenler kültür ortamı bileşimine eklenerek mutasyon oluşturulur. Daha sonra hücreler seçici şartlarda kültüre alınarak aranan özelliğe sahip bitkilerin seçilmesine çalışılır. Örneğin, hastalıklara dayanıklılık için yapılacak seçmelerde kültür ortamına hastalık etmeninin toksini eklenerek dayanıklı bitkiler elde edilebilmektedir.
- Hücre kültürlerinde görülen kromozom sayı ve yapısındaki değişikliklerden yararlanılarak genlerin kromozomlar üzerindeki yerleri ve kromozom ilişkileri incelenmeye çalışılır.
- Hücre kültürleri protoplast kültürlerinin başlangıç materyalini oluşturur.
- Hücre kültürü tekniğinde bir test tüpü içerisinde milyonlarca hücreyi kültür etmek ve seleksiyon yapmak mümkündür. Ancak, klâsik bitki ıslahında aynı işi yapmak için binlerce hektar arazi, büyük bir işgücü ve paraya ihtiyaç vardır.

- Başta tıp olmak üzere, endüstrinin farklı kollarında kullanılan alkaloidler, glikozitler, eterik yağlar, steroidler, terpenoidler ve fenolikler gibi sekonder bitki metabolitleri üretilir.
- Hücre kültürünün en önemli uygulama alanlarından bir diğeri ise, gen aktarımında kullanılmasıdır.

2.1.6. Protoplast kültürü ve somatik hibridizasyon

Protoplast kültürü, normal eşeyssel yollarla elde edilemeyen türler ve cinsler arası melezlemelerin somatik olarak gerçekleştirilmesi tekniğidir (Evans ve Reed 1981).

Protoplast kültüründe yaygın olarak kullanılan eksplant; yaprakların mezofil dokusudur. Dokunun fizyolojik durumu başarıyı etkilediğinden bitkiler kontrollü iklim odaları ya da seralarda yetiştirilir (Vasil 1976). Yaprak yüzeyi steril edildikten sonra epidermisi uzaklaştırılarak mezofil dokusunun ayrılması sağlanır. Küçük parçalara ayrılan yapraklar sıvı ortamlar içerisinde çalkalayıcılar üzerinde sallanır. Tek hücreler elde edildikten sonra, bunlar hücre duvarlarının parçalanması amacıyla özel enzimler içeren ortamlara alınır. Bu ortamlar aynı zamanda protoplastların yapı ve canlılığını koruyacak, osmotik basıncı düzenleyen maddeleri de içerir. Bundan sonra ölü hücre ve diğerk artıkları protoplastlardan ayırmak için filtre edilir.

Protoplastlar, sıvı ya da agarlı ortamlarda kültüre alınabilir. Ancak, yine kültür ortamında osmotik basıncı düzenleyen maddelerin bulunması gerekir. Böylece, kültüre alınan ve füzyonu sağlanan protoplastlar, önce yeni bir hücre duvarı oluşturur ve bundan sonra da hücre bölünmesi başlar. 1-3 hafta içerisinde hücre yığınları oluşur. Oluşan bu hücre yığınlarından önce sürgünler, sürgünlerin köklendirilmesi ile yeni bitkiler elde edilir. Bu bitkilerin saksılara aktarılarak yetiştirilmesi son aşamayı oluşturur.

Negatif yüzey yüküne sahip protoplastların biraraya gelmesi mümkün değildir. Protoplastların biraraya gelebilmeleri için ortama pozitif yüklü bir iyonun ilâve edilmesi gereklidir. Bu amaçla en çok Ca^{+2} kullanılır. Ancak, biraraya gelen protoplastlarda füzyon olayının gerçekleşebilmesi için polyethileneglucol (PEG) kullanılır. Bu olay sırasında iki hücrenin muhtevaları birbiri içerisine karışır. Daha sonra çekirdekler arasında çekirdek füzyonları ortaya çıkar. Ancak, çekirdek füzyonları her zaman görülmeyebilir. Böylece birleşen hücreler, hücre duvarlarını oluşturarak birkaç gün içerisinde bölünmeye başlarlar.

Sonuçta, hücre yığınları oluşur ve bunların kültürüyle somatik melez bitkiler elde edilir. Bütün protoplast füzyonlarından somatik melez bitki elde edilmesi beklenmemelidir. Nitekim, burada cereyan eden olaylar normal eşeyssel melezlemeye göre çok daha karmaşıktır. Hücreler arasındaki uyumsuzluklar, kromozom eşleşmeleri ve bunların bölünme sırasında hücrelere dağılışındaki düzensizlikler gibi nedenlerle protoplast füzyonununun her zaman istenen başarı alınamamaktadır.

Bitkilere uygulanan tüm doku kültürü teknikleri Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

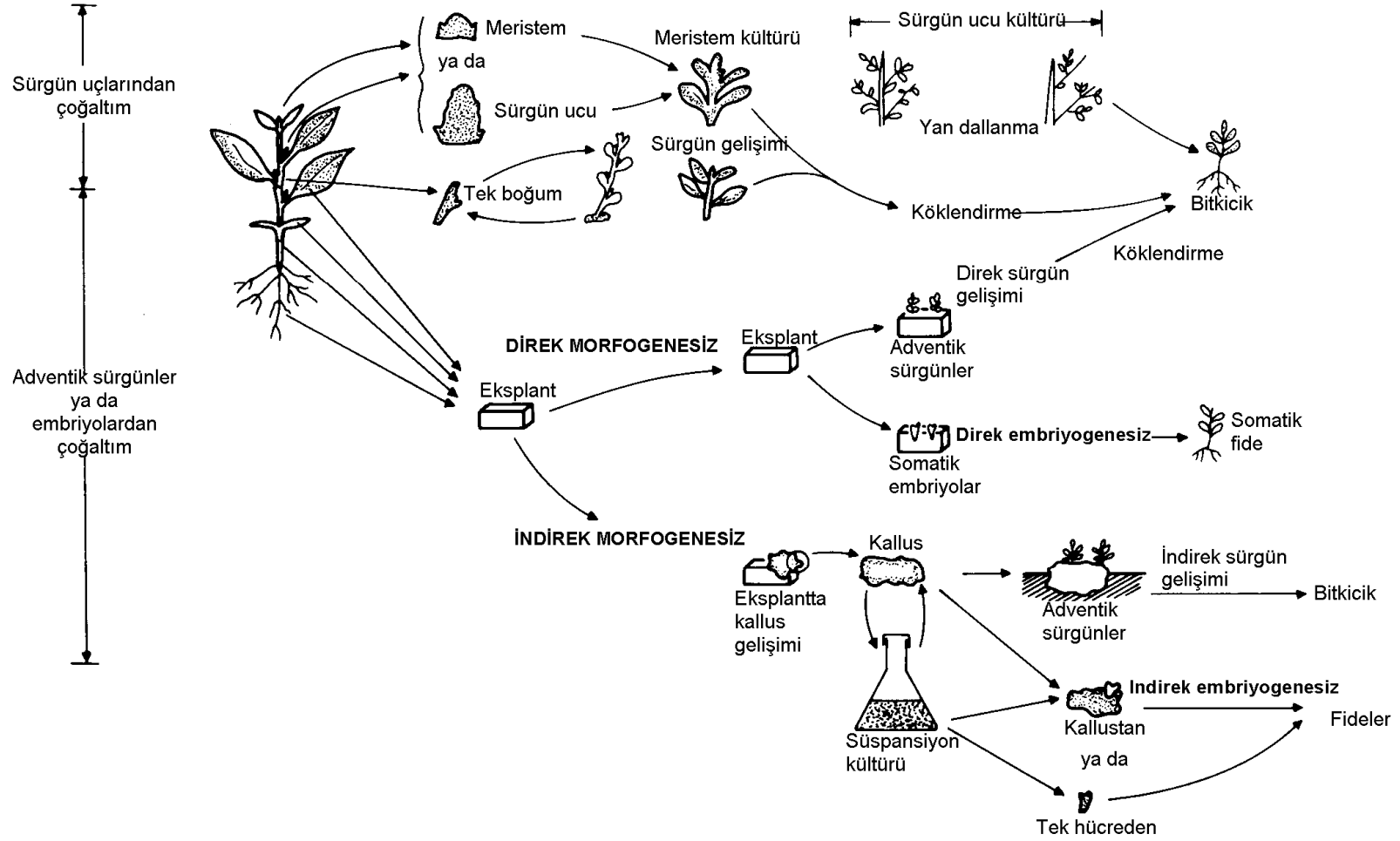
2.2. Bitkilere Gen Aktarımı

Bitkilere gen aktarımında kullanılan tekniklerin esasını; istenilen geni taşıyan bir DNA parçasının doku içerisindeki hücrelerin kromozomlarına yerleştirilmesi, daha sonra doku kültürü tekniklerinin kullanılarak bu hücrelerden gen aktarılmış (transgenik) bitkilerin elde edilmesi oluşturur. Genelde, doku içerisinde gen aktarılmış hücrelerin oranı oldukça düşüktür. Bu nedenle, gen aktarımı yapılacak bitki türlerinde yüksek adventif sürgün oluşumuna paralel olarak başarı da önemli derecede artmaktadır.

Bitkilere gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan iki yöntem; *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi ve partikül bombardıman tekniğidir (Çizelge 2.1). Günümüzde, *A.tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı yapılamayan tek çenekli bitkilere gen aktarabilmek için elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve partikül bombardımanı gibi doğrudan gen aktarma yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan çalışmamızda da yer alan partikül bombardımanı tekniği en yaygın kullanım alanına sahiptir.

2.2.1. Doğrudan gen aktarımı

Dünya besin ihtiyacının önemli bir kısmını karşılayan buğdaygillere ve bazı iki çenekli bitkilere gen aktarımında *Agrobacterium*’un başarısız olması ya da yeterli başarının alınamaması, doğrudan gen aktarma yöntemlerinin gelişmesine neden olmuştur. Birçok doğrudan gen aktarma yöntemi bulunmasına karşın, en çok kullanılanları; protoplastlara DNA aktarımı, mikroenjeksiyon ve hızlandırılmış partiküllerdir (Özcan ve Özgen 1996).



Şekil 2.1. *In vitro* bitki rejenerasyonu (Lindsey ve Jones 1989)

Çizelge 2.1. Gen aktarımının başarılı olduğu bazı önemli kültür bitkileri ve gen aktarma yöntemleri

Latincesi	Türkçesi	Yöntemi	Kaynak
<i>Beta vulgaris</i>	Şekerpancarı	●	Gasser ve Fraley 1989
<i>Brassica napus</i>	Kolza	●,○	Fry vd.. 1987
<i>Glycine max</i>	Soya	●,○	Hinchee vd.. 1988
<i>Gossypium hirsutum</i>	Pamuk	●	Firoozabady vd. 1987
<i>Helianthus annuus</i>	Ayçiçeği	●	Everett vd. 1987
<i>Linum usitatissimum</i>	Keten	●	Basiran vd. 1987
<i>Solanum tuberosum</i>	Patates	●	De Block 1988
<i>Nicotiana sp.</i>	Tütün	●,○	Horsch vd. 1985
<i>Lotus corniculatus</i>	Gazal boynuzu	●	Jensen vd. 1986
<i>Medicago sativa</i>	Yonca	●	Shahin vd. 1986
<i>Trifolium repens</i>	Ak üçgül	●	White ve Greenwood 1987
<i>Oryza sativa</i>	Çeltik	●,○	Chan vd. 1992
<i>Triticum sp., Hordeum vulgare</i>	Buğday, Arpa	●,○	Mooney vd. 1991
<i>Zea mays</i>	Mısır	●,○	Gould vd. 1991
<i>Apium graveolens</i>	Kereviz	●	Catlin vd. 1988
<i>Asparagus officinalis</i>	Kuşkonmaz	●	Conner vd. 1988
<i>Brassica oleracea</i>	Lahana	●	Shahin ve Yashar 1986
<i>Daucus carota</i>	Havuç	●,○	Scott ve Draper 1987
<i>Cucumis sativus</i>	Hıyar	●	Trulson vd. 1986
<i>Lactuca sativa</i>	Marul	●	Michelmore vd. 1987
<i>Solanum melongena</i>	Patlıcan	●	Guri ve Sink 1988
<i>Pisum sativum</i>	Bezelye	●	Puonti-Kaerlas vd. 1990
<i>Cucumis melo</i>	Kavun	●	Fang ve Grumet 1990
<i>Fragrea fragrans</i>	Çilek	●	Nehra vd. 1990
<i>Malus pumila</i>	Elma	●	James vd. 1989
<i>Juglans regia</i>	Ceviz	●	McGranahan vd. 1988
<i>Petunia hybrida</i>	Petunya	●	Horsch vd. 1985
<i>Geranium sp.</i>	İtir	●	Butcher vd. 1990

● *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımı ○ Doğrudan gen aktarımı

2.2.1.1. Protoplastlara DNA aktarımı

Protoplast zarlarının geçirgenliği, belli kimyasal maddeler ya da elektroporasyon yöntemiyle artırılabilir. Bu metotla çift çenekli ve mısır, çeltik, arpa ve domuz ayrığı gibi tek çenekli bitkilere başarıyla gen aktarımı yapılmıştır (Zhang vd. 1988, Horn vd. 1988).

Bugün için protoplastlara gen aktarımında en yaygın kullanılan kimyasal, polyethilenglycol (PEG)'dir (Lörz vd. 1985, Draper vd. 1988). Yüksek konsantrasyonlarda kullanılan PEG, solüsyondaki DNA'yı protoplast üzerine çöktürmekte ve hücre zarında oluşturduğu gözeneklerden DNA'nın protoplast içerisine girişini sağlamaktadır (Freeman 1988). DNA alımı gerçekleştikten sonra, protoplastlar normal büyüme ortamına alınarak hücre duvarlarının yenilenmesi ve bölünmenin başlaması sağlanır. Daha sonra gen aktarımı yapılan hücrelerin belirlenebilmesi için seçici ortamlara aktarılır.

Protoplastlara elektroporasyon yöntemiyle DNA aktarımında, yüksek gerilimli elektrik akımı yardımıyla hücre zarında 30 nm çapında ve birkaç dakika açık kalabilen gözenekler oluşturulur (Okada vd. 1986, Fromm vd. 1986). Bu yöntemde elektrik akımının verilme süresi ve gerilim değeri çok önemlidir (Draper vd. 1988). DNA aktarımında her bitki türüne özgü bir gerilim değeri olup, bunun üzerine çıkılması hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (Lindsey vd. 1988). Örneğin, optimal gerilimler soya için 450 V/cm, mısır için 250 V/cm ve tütün için 300-350 V/cm kadardır. Bu yöntemle şeker pancarı (Lindsey ve Jones 1987) ve mısırdaki çok düşük oranda başarı sağlanmıştır.

Protoplastlara gen aktarımında PEG ve elektroporasyon yöntemlerinin birlikte kullanılması başarıyı artırmaktadır (Shillito vd. 1985). Elektroporasyon yöntemiyle transgenik domates (Bellini vd. 1989), kolza (Guerche vd. 1987), marul (Chupeau vd. 1989) ve çilek (Shimamoto vd. 1989) bitkilerinin elde edildiği bildirilmiştir.

2.2.1.2. Mikroenjeksiyonla gen aktarımı

Mikroenjeksiyon yönteminde esas; DNA'yı 0.5-1 µm çapındaki kılcal iğnelerle doğrudan alıcı hücrenin sitoplazması ya da çekirdeği içerisine yerleştirmektir. Mikroenjeksiyonda önce protoplastlar, ya polylysine üzerine yapıştırılarak ya da agarose içerisine gömülerek sabit hale getirilmektedir (Neuhaus ve Spangenberg 1990). Bu yöntemde ilk başarı; yabancı Ti plazmidinin yonca (Reich vd. 1986) ve tütün (Crossway vd. 1986) protoplastlarına enjeksiyonuyla elde edilmiştir. Burada DNA doğrudan çekirdek içerisine enjekte edildiğinden, gen aktarım oranı diğer yöntemlerden daha yüksektir. İşlemin yavaş yürümesi (20-100 hücre/gün) ve pahalı olması bu yöntemin en büyük dezavantajlarıdır.

2.2.1.3. Hızlandırılmış partiküllerle gen aktarımı

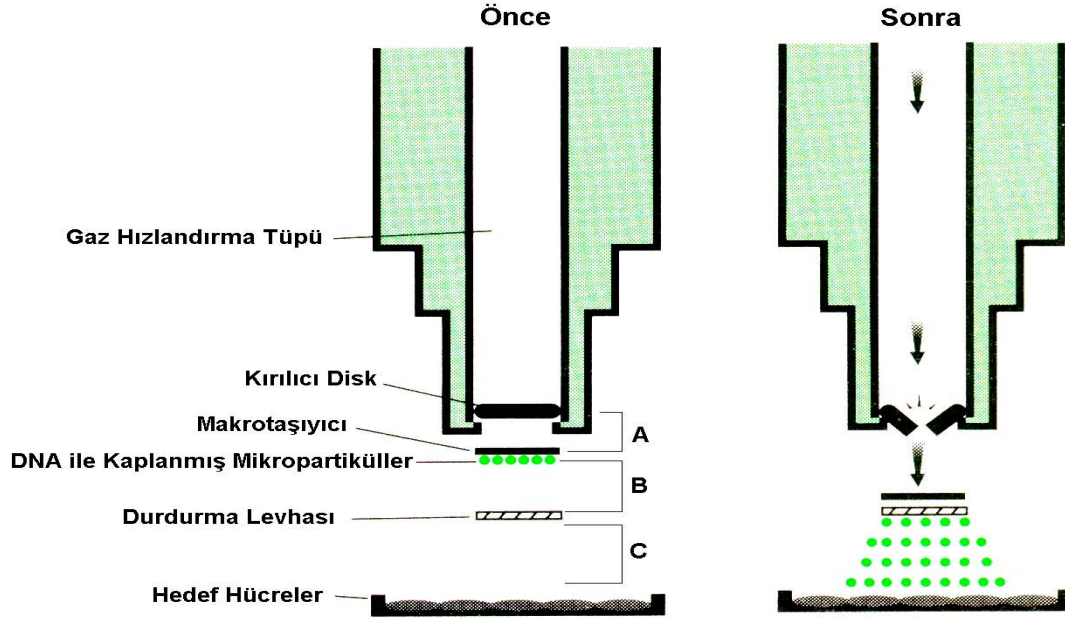
Partikül bombardıman tekniği bir fiziksel gen aktarım yöntemi olup, hemen tüm doku ve hücre tiplerinde uygulanabilmektedir. Bu teknik çalışmamızın temelini oluşturduğundan ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu yöntemin temel ilkesi; DNA taşıyan 1-2 µm çapındaki altın veya tungsten parçacıklarına çok yüksek hız kazandırıp, bitki hücrelerine girmelerinin sağlanmasıdır (Şekil 2.2). Parçacıklar hücre içerisine girdikten sonra DNA'lar bitki genomuyla birleşmektedir (McCabe vd. 1988, Klein vd. 1987).

Parçacıkların hızlandırılmasında önceleri yüksek elektrik akımı kullanılırken, son yıllarda sıkıştırılmış helyum gazından faydalanılmaktadır. Parçacık hızının sürtünme nedeniyle azalmasının önlenmesi için, işlem vakum altında yapılmaktadır. Bu yöntemde eksplant olarak yaprak, embriyo, sürgün ucu gibi organlar, kültüre alınmış hücreler, polen ve mikrosporlar kullanılmaktadır (Klein vd. 1990). Embriyogenik kallus kültürlerine (Stiff vd. 1995), meristemlere (Zhang vd. 1999), olgunlaşmamış embriyolara (Harwood vd. 2000), polenlere (Fernando vd. 2000) ve mikrospora (Yao vd. 1997) biyolistik yöntemle gen aktarımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Partikül bombardımanı yönteminin buğday, çeltik ve mısır gibi ekonomik önemi yüksek olan buğdaygillere uygulanması sonucunda transgenik bitkiler elde edilmiştir (Weeks vd. 1993).

Mikropartiküller gen aktarımı için DNA veya başka biyolojik materyallerle kaplanır. Makrotaşıyıcı, basınç etkisi ile hızlanarak kısa bir mesafe yol aldıktan sonra bir durdurma levhası ile durdurulur. Makrotaşıyıcı bu şekilde durdurulduğunda çarpma etkisi ile ortaya çıkan kuvvetle mikropartiküller hedef dokulara doğru hareket ederek doku içine nüfuz eder ve üzerlerindeki DNA'yı hücre içerisine bırakır. Bombardıman sonucunda mikropartiküllerin fırlama hızı, helyum basıncına (kırılıcı diskin seçimine), bombardıman odasının vakum miktarına, kırılıcı diskten makrotaşıyıcıya olan uzaklığa (A), makrotaşıyıcının durdurma levhasına kadar aldığı mesafeye (B) ve durdurma levhası ile hedef dokular arasındaki mesafeye (C) bağlıdır (Şekil 2.2).

2.2.1.3.1. Partikül bombardımanı cihazının tasarımındaki gelişmeler

Partikül bombardımanı yöntemi kullanılarak yapılan ilk çalışmada yaklaşık 4 µm çapındaki tungsten partikülleri hava akımı ile hızlandırarak soğan hücreleri üzerine gönderilmiştir. Bu çalışmada hedef hücrelerde partiküllerin çarptığı bölgelerde oldukça büyük çaplı hücre ölümleri gözlenmiştir.



Şekil 2.2. Hızlandırılmış partiküllerle gen aktarımı (William 1994)

Partiküllerin hava akımı kullanılarak hızlandırıldığı gen aktarım çalışmalarında partikül büyüklüğü küçültülse de başarı elde edilememiştir (Sanford 1988). Hava akımı kullanılarak yapılan çalışmalardan olumsuz sonuçlar elde edildiğinden araştırmacılar, 1987 yılında üzerinde DNA ile kaplanmış partikülleri taşıyan makrotaşıyıcıları bir durdurma levhasına çarptırıp, çarpma etkisiyle makrotaşıyıcı üzerindeki partiküllerin hızlanarak yollarına devam ederek hedef hücre içine girmesini sağlayan bir sistem geliştirmişlerdir (Sanford vd. 1987) (Şekil 2.3). "Biological ballistic" teriminin kısaltması olan "biolistik" cihazı olarak da adlandırılan partikül bombardımanı cihazı, ilk kez bitkilere gen aktarım yöntemi olarak kullanılmış olup, memelilere, mantarlara ve bakterilere gen aktarımı için de kullanılır (Klein vd. 1987). Bu cihaz, *Agrobacterium* ile gen aktarım çalışmalarından önce bitki dokularını yaralamak ve böylelikle transgenik sürgün frekansını artırmak amacıyla da kullanılmaktadır (Bidney vd. 1992).

İlk tasarımlanan partikül bombardımanı cihazlarında, DNA ile kaplanan mikropartiküllerin hedef hücrelere doğru hızlandırılması için barut kullanılmıştır. Ancak, barut kullanılan sistemlerde güç kullanımının kontrolsüz olması, makrotaşıyıcıdan kopan parçalarında hız kazanıp hücre ölümlerine sebep olması nedeniyle partiküllerin helyum gazı ile hızlandırıldığı sistem geliştirilmiştir. Günümüzdeki sistemlerde kullanılan helyum teknolojisi daha temiz, daha güvenli ve daha fazla tekrarlanabilir partikül hızlandırma imkanı sağladığı, bombardıman basıncının kontrolüne olanak sağladığı ve partikülleri

hedef hücreler üzerine daha homojen dağıttığı için daha fazla tercih edilmektedir. Barut kullanılan sistem ile helyum kullanılan sistem arasındaki en önemli fark, bombardıman odası malzemesinin metal yerine hafif ve sert plastikten yapılmış olmasıdır. Bu özellik, bombardıman performansında herhangi bir değişikliğe neden olmaksızın, cihazın daha kolay taşınmasına ve daha kolay temizlenmesine olanak verir.

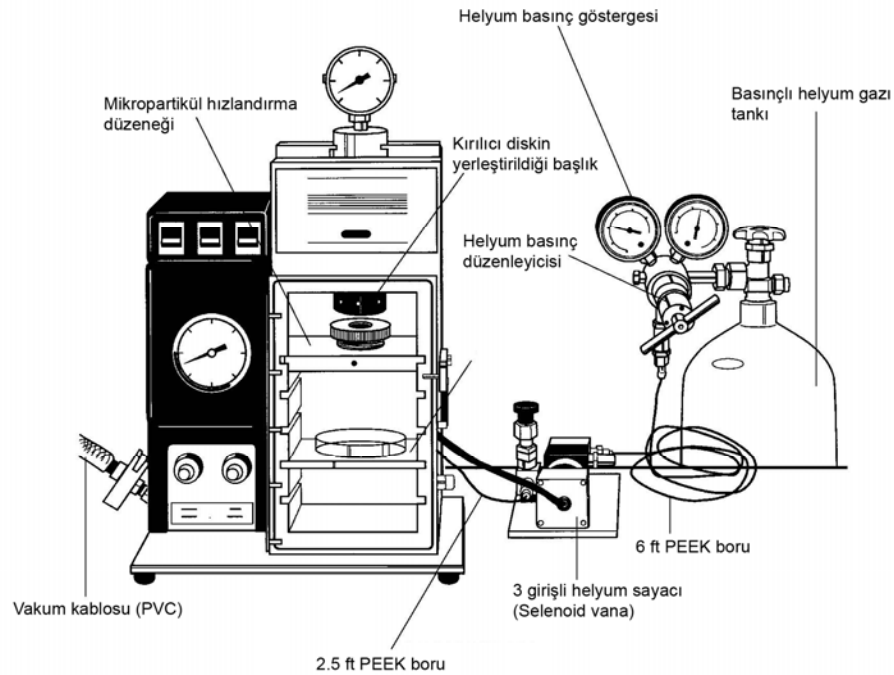
2.2.1.3.2. Partikül bombardıman cihazının yapısı

Partikül bombardımanı cihazına ait parçalar, bombardıman işleminin kontrol edilmesini sağlayan dış parçalar (Şekil 2.4), bombardıman işleminin gerçekleştirilmesini sağlayan iç parçalar (Şekil 2.7) ve bombardıman odası içine vakum yapılmasını ve partiküllerin hızlandırılması için helyum gazı verilmesini sağlayan arka bağlantılar (Şekil 2.8) olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir (Sanford vd. 1993).

Cihazın Dış Parçaları

Ateşleme Düğmesi

Solenoid vanayı harekete geçirerek helyum gazının gaz hızlandırma tüpü içine akışını kontrol eder. Ateşleme düğmesi, kırılıcı disk patlayıncaya kadar sürekli AÇIK konumunda tutulmalı, patlamadan sonra helyum gaz akışını kesmek için kapatılmalıdır.



Şekil 2.3. Partikül bombardımanı cihazını oluşturan parçalar (Bio-Rad 2000)

Vakum Düğmesi

Bombardıman odasına vakum uygulamak için kullanılan düğmedir. Bu düğme üzerinde üç ayrı konum bulunur. VAC konumu, kaynaktan vakum alınmasını kontrol eder. VENT konumu, filtrelenmiş hava kullanarak vakumun tahliye edilmesini sağlar. HOLD konumu, bombardıman odasını izole ederek vakumun sabit kalmasını sağlar. Bombardıman işlemi, mutlaka bu düğme HOLD konumunda iken yapılmalıdır.

Güç Düğmesi (AÇMA/KAPAMA Düğmesi)

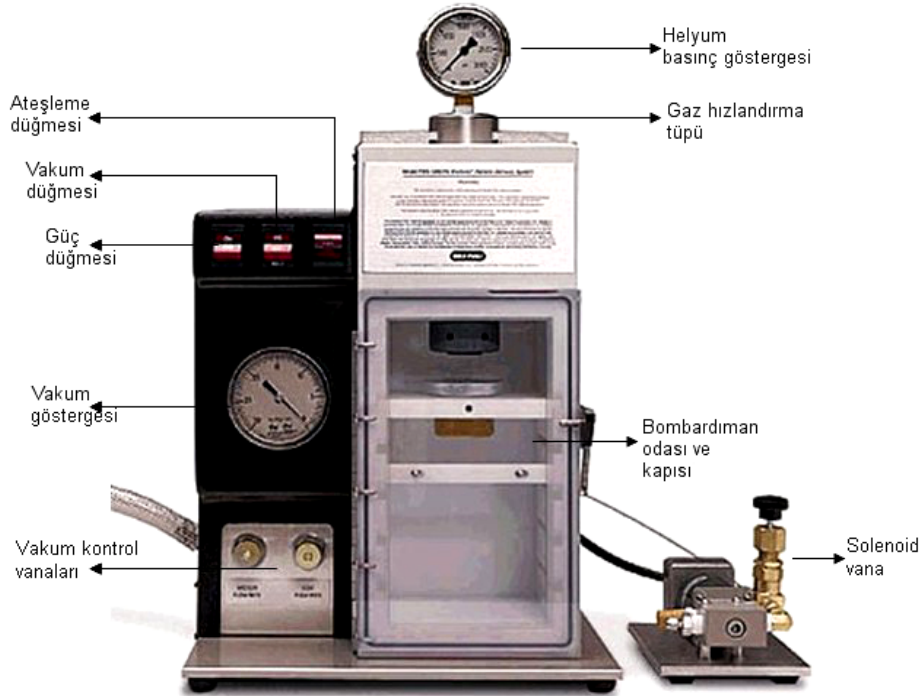
Cihaza verilen elektriksel besleme kaynağını kumanda eder.

Vakum Göstergesi

Bombardıman odası içindeki vakumu inçHg cinsinden gösterir. Bu göstergedeki sıfır değeri, ortam atmosfer basıncına eşittir.

Vakum Kontrol Vanaları

Bombardıman odasına vakum uygulanmasını ve vakumun odadan boşaltılmasını (odaya hava verilmesini) kontrol eder. Vanalar saat yönünde döndürülürse kapanır.



Şekil 2.4. Partikül bombardımanı cihazının dış parçaları

Helyum Basınç Göstergesi

Gaz hızlandırma tüpündeki helyum basıncını psi cinsinden gösterir. Solenoid vana, ateşleme anahtarı kullanılarak harekete geçirildiğinde yağ ile doldurulmuş göstergedeki ibre kırılıcı disk patlayıncaya kadar saat yönünde hareket eder.

Gaz Hızlandırma Tüpü

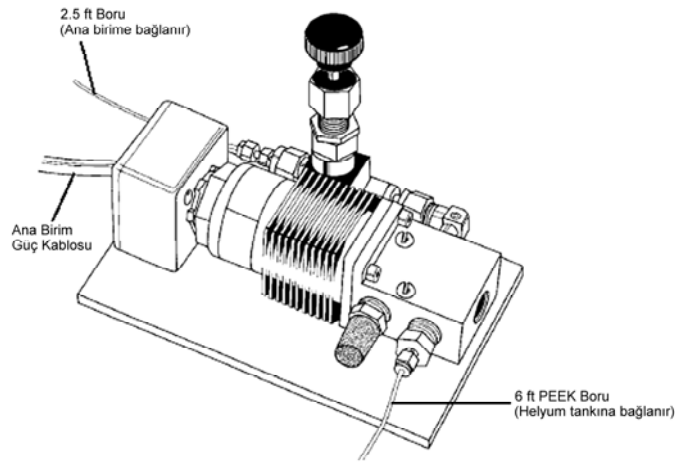
Bir ucundan helyum borusu ile gaz alınan, diğer ucunda ise kırılıcı disk bulunan ve kırılıcı diski patlatan gaz basıncına ulaşıncaya kadar içerisinde helyum gazının biriktirildiği ve sıkıştırıldığı silindir şekilli tüptür.

Bombardıman Odası Kapısı

Bombardıman odası, katı polikarbonat plastikle kaplanmıştır. Bombardıman odası içindeki vakum kaçağını engellemek için bombardıman odası kapısına tek parça halinde büyük bir o-ring geçirilmiştir.

Solenoid Vana

3 girişli solenoid vana, gaz hızlandırma tüpü içerisine gaz doldurma oranını kontrol eder. Bu vana, 1550 psi basınçta patlayan kırılıcı diski 12-15 saniye içinde patlacak şekilde ayarlanmıştır. Bu vana saat yönünde yavaş yavaş döndürülerek gaz doldurma oranı artırılabilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Solenoid vana (Bio-Rad 2000)

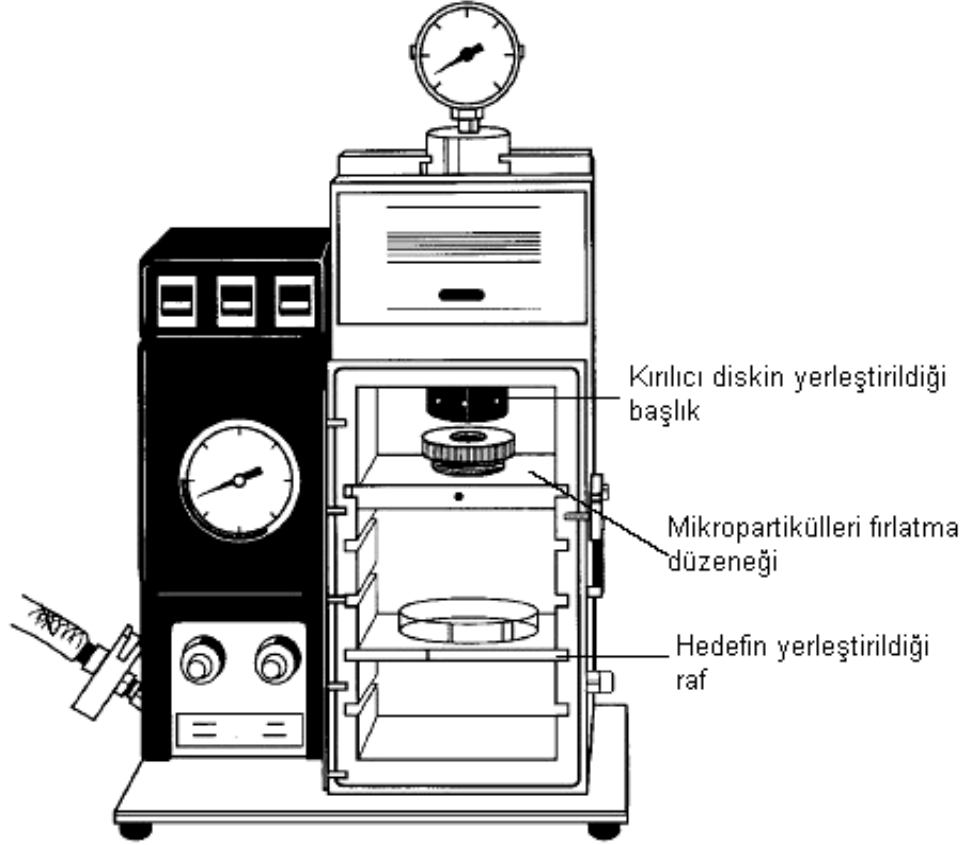
Diğer parçalar

Cihazın iç ve dış parçalarını takmak veya sökmek için kullanılan parçalardır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Bombardıman cihazına ait aletler (Bio-Rad 2000)

Cihazın İç Parçaları



Şekil 2.7. Partikül bombardımanı cihazının iç parçaları (Bio-Rad 2000)

Bombardıman Odası

Bombardıman esnasında vakum altındaki biyolojik hedefin, mikropartikül fırlatma düzeneği ve kırılıcı diskin bulunduğu bölümdür.

Kırılıcı Diskin Yerleştirildiği Başlık

Gaz hızlandırma tüpünün bombardıman odası girişinde, kırılıcı diskin yerleştirildiği bir başlıktır. Başlık delikler kullanılarak iyice sıkıştırılmış olmalıdır. Bu başlık içerisine yerleştirilen kırılıcı disk, gaz hızlandırma tüpü içinde bu kırılıcı diskin patlayacağı basınç elde edilinceye bir kapak olarak görev yapar.

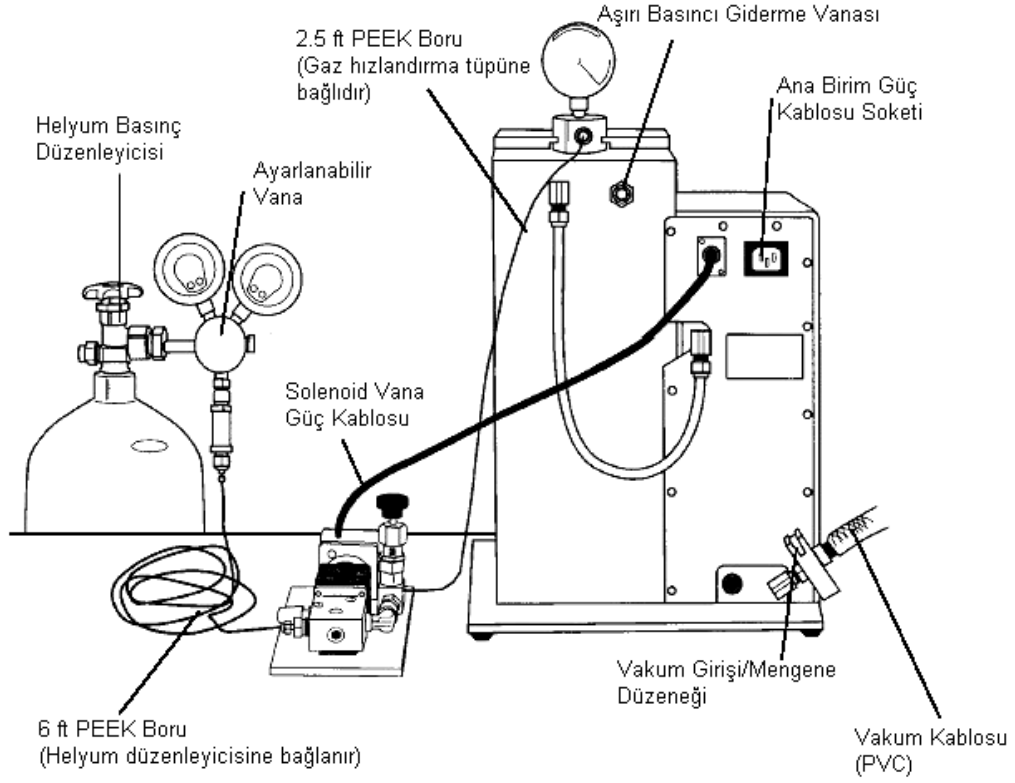
Mikropartikülleri Fırlatma Düzeneği

Mikropartikülleri fırlatma düzeneği, gaz hızlandırma tüpünde istenen basınç elde edildiği zaman kırılıcı diskin patlaması sonucunda açığa çıkan gaz şoku etkisiyle mikropartikülleri taşıyan makrotaşıyıcının durdurma levhasına çarparak durdurulması, ancak üzerinde DNA bulunan mikropartiküllerin çarpma etkisiyle hızlanarak hedef hücreye girmesini sağlayan düzenektir.

Hedefin Yerleştirildiği Raf

Petri kabı içinde gen aktarımı yapılacak olan biyolojik materyalin yerleştirildiği raftır. Bu raf, partiküllerin uçuş mesafesini değiştirmek amacıyla dört farklı konuma ayarlanabilir.

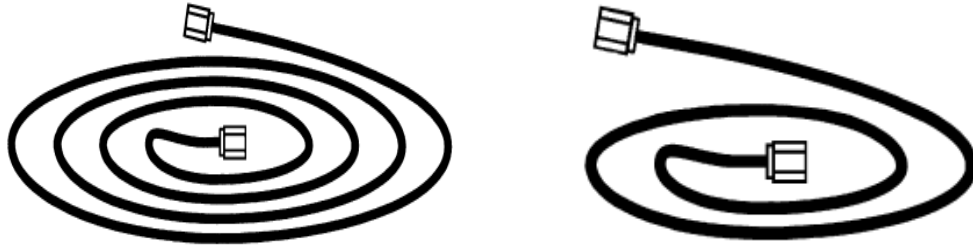
Cihazın Arka Bağlantıları



Şekil 2.8. Partikül bombardımanı cihazının arka bağlantıları (Bio-Rad 2000)

Cihazın Helyum Gazı Bağlantısı

Bu bağlantı, gaz tüpü girişini, plastik bir boru ile yüksek basınçlı helyum gazı sağlayan solenoid vanaya bağlar (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Helyum gazı bağlantısı için 6 ft ve 2.5 ft PEEK boru (Bio-Rad 2000)

Basınçlı gaz kullanılan cihazlarda laboratuvar güvenliğini sağlamak için genellikle PEEK (Polyetheretherketone) polimer borular kullanılır. PEEK, yüksek sıcaklığa (erime sıcaklığı

343°C) ve kimyasal maddelere karşı dayanıklı (sadece saf sülfürik asit içinde erir) malzemedir. Yanması durumunda zehirli gazlar açığa çıkmaz.

Aşırı Basıncı Giderme Vanası (Emniyet Vanası)

Bu vana, bombardıman odası basıncı 0.5 psi'ye ulaştığı zaman, gaz birikimini azaltmak amacıyla açılır. Güvenlik amaçlı bir vanadır.

Vakum Kablosu

Kontrol vanaları aracılığı ile bombardıman odasına vakum yapılmasını sağlayan kablodur.

Solenoid Vananın Elektrik Bağlantısı

Helyum gazı hattındaki 3 girişli solenoid vanaya elektrik sağlayan bağlantıdır.

Şebeke Elektrik Hattı Bağlantı Soketi

Şebeke hattından cihaza elektriksel güç sağlamak için kullanılan giriştir.

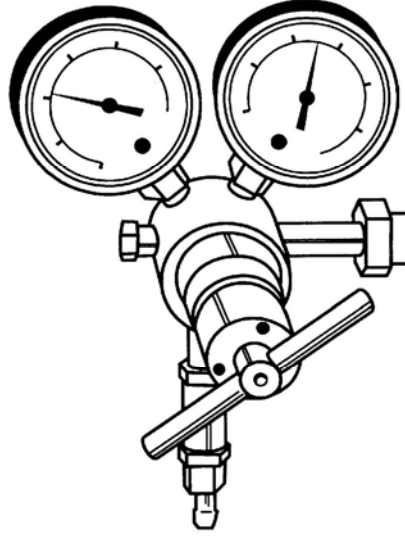
Helyum Tankı

Helyum gazı toksik ve yanıcı bir gaz değildir, ancak basınç altında tutulan her türlü gazın dikkatli kullanılmadığı zaman potansiyel bir tehlike kaynağı olduğu da unutulmamalıdır. Atom ağırlığı çok küçük olan helyum gazı, bombardıman odası içinde maksimum genleşme sağlar. Böylelikle, DNA ile kaplanmış partiküllerin hedef hücreye nüfuz etmesi için gereken hız elde edilmiş olur.

Biyolojik bir sistemde bombardıman şartlarını optimize etmek için yüksek saflıkta helyum içeren tank basıncının 2400 psi-2600 psi olması gerekir. Bombardıman işleminde kullanılan kırılıcı diskler dayanabildikleri basınç değerine göre sınıflandırılır. Tank basıncının bu şekilde yüksek olması, farklı basınçlar altında kırılan tüm kırılıcı disklerin kullanılabilmesine izin verir.

Helyum Basıncı Göstergesi ve Ayarlanabilir Vana

Helyum tankına bağlı iki adet basınç göstergesi bulunur. Bu göstergelerden biri tank içindeki gaz basıncını, diğeri ise tank içinden solenoid vanaya verilen gaz akış basıncını gösterir. Gaz akış basıncı ayarlanabilir vana ile kontrol edilir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Helyum basıncı göstergesi (Bio-Rad 2000)

Vakum Pompası

Partikül bombardımanı sisteminin ana birimi, bombardıman odasından en az 5 inç Hg basıncı tahliye etme özelliğine sahip bir vakum kaynağına bağlanmalıdır. Maksimum miktarda hava boşaltma kapasitesi için cihazın, dakikada 90-150 litre pompalama hızına sahip döner pervane tipi bir vakum pompasına bağlanması tavsiye edilmektedir. Bu şekildeki pompalama hızı, hedef hücrelerin vakuma maruz kalma süresini en aza indirir. Bombardıman odası için gerekli olan vakum seviyesi, gen aktarımı yapılacak biyolojik materyale bağlıdır. Vakum çok yüksek olduğunda, partiküllere etki eden sürüklenme kuvveti azalır. Bombardıman işlemi sırasında, bombardıman odası içerisinde 15-29 inç Hg arasında bir basınç seviyesi gerekir. Bazı hücreler ve dokular 28 inç Hg basıncı gibi yüksek basınç gerektirebilir.

2.2.1.3.3. Partikül bombardıman sisteminin fiziksel parametreleri

Partikül bombardımanı yöntemi uygulamalarında en iyi sonuçların elde edilebilmesi için dikkate alınması gereken parametreler şunlardır:

- Bombardıman odasının basıncı (vakum)
- Helyum basıncı/kırılıcı disk seçimi
- Kırılıcı disk ile makrotaşıyıcı arasındaki mesafe
- Makrotaşıyıcı ile durdurma levhası arasındaki mesafe

- Mikropartiküller ile doku arasındaki mesafe (Partiküllerin uçuş mesafesi)
- Mikropartikül tipi ve büyüklüğü

Partikül bombardımanı sisteminde gen aktarım oranını etkileyen bu parametreler hız belirleyici parametreler olarak da adlandırılabilir. Bu parametreler her çalışma öncesinde amaca yönelik planlar yapılarak belirlenmelidir.

Partikül bombardımanı sisteminde basınç artırıldığında, basınç kaynağı çıkışının makrotaşıyıcıya olan uzaklığı kısaltılıp, uçuş mesafesi artırılırsa, mikropartiküllerin hızı da artar. Mikropartiküllerin uçuş mesafesinin artırılması, yüksek hızın dokuya olan çarpma etkisini azaltır ve hücreye olan gaz şokunu en aza indirir. Daha küçük mikropartiküllerin kullanılması da çarpma hızının etkisini azaltacaktır.

Helyum gazı kullanılan sistemler 600-1200 psi basınç altında çalışır. Bazı biyolojik transformasyonlar için 600 psi yeterli olmakla birlikte, bazı uygulamalar için yeterli değildir. Pek çok uygulama için 1000 psi basınçta optimum sonuçlar elde edilir. Basınç 2400 psi'ya doğru artırılırsa, partikül hızı da artar, ancak bu kadar yüksek basınç değerinin gen aktarım oranını da artıracığı anlamına gelmez. Helyum gazı kullanılan sistemlerde basınç kaynağı çıkışının makrotaşıyıcıya olan uzaklığı 1 mm-20 mm arasında değiştirilirse, bu mesafe arttıkça partikül hızı azalmaktadır.

Bombardıman odasının basıncı (vakum)

Bombardıman odasına yapılan vakum işlemi, partiküllere etki eden hava sürtünmesini azaltır. Bombardıman odasının basıncını 30 s içinde 28-29 inç Hg basıncına düşürebilen bir vakum sistemi cihaza bağlanır. Bu vakum seviyesi pek çok bitki hücresi ve mikrobiyal hücre için yeterli bir seviyedir. Memeli hücreleri 15 inç Hg basıncında bombardıman edilmelidir. Bu işlemde, biyolojik numune içerisindeki su buharı basıncı da düşebileceği için daha yüksek vakum kullanılmamalıdır.

Belli biyolojik numunelerin dönüşüm etkinliğini artırmak için vakum yapılmadan önce deney odacığına helyum gazı verilebilir. Bu durumda fazlalık gaz hava yerine helyum gazıdır. Biyolojik numunelerdeki fazlalık gazın biolistik dönüşümü etkilemesinin iki sebebi vardır.

- Mikrotaşıyıcılar her türlü gaz içinde hareket edebildikleri için fazlalık gaz mikrotaşıyıcıların hızlı bir şekilde yavaşlamasına sebep olur. Bu gaz boşaltılarak bu

yavaşlama miktarı önemli ölçüde azaltılmış olur. Benzer şekilde helyum gibi hafif bir gaz kullanılarak mikrotaşyıcıların sürüklenmesi de azaltılmış olur. Mikrotaşyıcıların ebatları küçüldükçe, daha fazla yavaşlama problemi ortaya çıkar.

- Biyolojik numuneler içindeki fazlalık gaz, dokulara hasar verebilecek şok dalgalarını iletebilir. Bu fazlalık gazın yoğunluğu azaltılarak veya fazlalık gaz olarak helyum gibi düşük moleküler ağırlıklı gaz kullanılarak bu tür bir şok dalgasının etkisi azaltılabilir.

Helyum basıncı/kırılıcı disk seçimi

Helyum gazının kullanıldığı cihazlar, daha güvenli ve daha temiz güç kaynakları olduğu için diğer sistemlere göre daha avantajlıdır. Helyum gazı hafif bir gaz olduğu ve hızlı bir şekilde genişlediği için sıkıştırılmış hava veya azot gibi diğer gazlardan daha iyi özelliklere sahiptir. Helyum gazı kullanılan sistemler ile barut kullanılan sistemler karşılaştırıldığında, mikrotaşyıcıların dokulara nüfuz etmesi açısından temelde bir fark yoktur. Barut kullanılan sistemlerde hedef bölgenin merkezinde daha yüksek hızlar elde edilebilir, ancak yaklaşık 1 cm çapındaki bölgede dokulara zarar vererek hücre ölümüne sebep olur. Helyum gazı kullanılan sistemlerde ise hücre ölümü gerçekleşmez, partiküller daha geniş bir alana dağıtılabilir ve daha homojen bir dönüşüm sağlanır. Yapılan bütün araştırmalarda helyum gazı kullanılan sistemler, barut kullanılan sistemlere göre daha yüksek performans göstermiştir.

Bombardıman işleminde, farklı basınç değerleri altında patlayan 9 farklı kırılıcı disk vardır. Bu basınç değerleri 450 psi ile 2200 psi arasında değişir. Kırılıcı diskin patladığı basınç, bombardıman odasındaki helyum şokunun gücünü belirler. Helyum basıncının artırılması, partikül hızını artırır. Gaz şoku dalgası veya patlama etkisiyle oluşan akustik dalga hedef hücre veya dokularda hasara sebep olabildiği için, en yüksek performans elde edecek en düşük basınç değeri kullanılmalıdır.

Kırılıcı disk ile makrotaşyıcı arasındaki mesafe

Gaz şokunun partikül hızı üzerindeki etkisi, kırılıcı disk ile makrotaşyıcı arasındaki mesafe ile belirlenir. Bu mesafe azaltılırsa, partikül hızı da buna bağlı olarak artar.

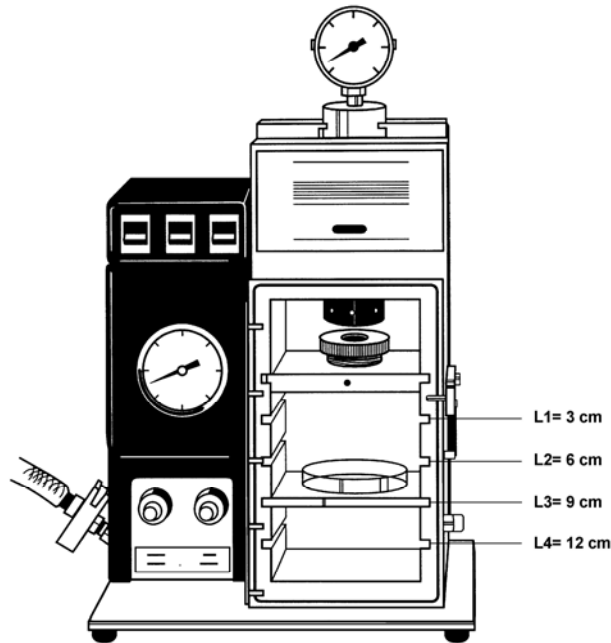
Bu mesafeyi ayarlamak için heksagonal şekilli 1/8", 1/4" ve 3/8" çapında üç farklı mesafe ayarlama aleti bulunur.

Makrotaşıyıcı ile durdurma levhası arasındaki mesafe

Makrotaşıyıcı ile durdurma levhası arasındaki mesafe kısa tutulduğunda helyum şok dalgası makrotaşıyıcıyı daha güçlü bir şekilde etkileyeceğinden bu yolla mikropartiküllerin yüksek hıza ulaşması sağlanabilir (Kikkert 1993). Bu mesafe arttırıldığı zaman, makrotaşıyıcının uçuşu kararsız olacağı için kısa mesafeler tavsiye edilir ve durdurma levhasının yerleştirildiği başlık içerisine rondela yerleştirilerek bu mesafe değiştirilebilir. Bu işlem, rondelaları 5 mm'lik adımlarla en fazla 16 mm'ye kadar değişik yerlere yerleştirerek yapılır. Genel olarak 6-12 mm mesafenin makrotaşıyıcıya etkin enerji aktarımında en uygun mesafeler olduğu görülmüştür (Sanford vd. 1993).

Durdurma levhası ile hedef hücre arasındaki mesafe

Partikül bombardımanı cihazının parametrelerini optimize etmek için belirlenmesi gereken en önemli parametre, partiküllerin uçuş mesafesidir. Bu amaçla bombardıman odası içinde hedef hücreleri yerleştirmek üzere dört farklı raf konumu mevcuttur (Şekil 2.11). Büyük mikropartiküller kullanıldığında hedef uzaklığı gen aktarım oranına önemli ölçüde etki yapmazken, küçük mikropartiküller kullanıldığında, özellikle bakteriyal gen aktarımlarında hedef uzaklığı önem kazanmaktadır. Bu nedenle, mikropartiküllerin etkili çarpma hızına ulaşması için bu mesafe kısa tutulmalıdır (Sanford vd. 1993).



Şekil 2.11. Hedef hücrenin yerleştirilebileceği dört farklı raf konumu (Bio-Rad 2000)

Partikül seçimi ve partikül büyüklüğü

Hedef hücrelere gen aktarmak amacıyla yapılan bombardıman işleminde iki farklı partikül kullanır. Bu partiküller tungsten ve altın partikülleridir.

Tungsten partikülleri

Tungsten partikülleri, şekil olarak düzensiz, ebatları heterojen partiküllerdir. Tungsten partiküllerinin ebatları ortalama 0.5 µm - 2.0 µm arasında değişmektedir. Partikül bombardımanı çalışmalarında tungsten partikül kullanılmasının en önemli sebebi ucuz olması, DNA ile kolaylıkla kaplanabilmesidir. Belli hücreler için toksik etkiye sahip olması ve DNA bağlanmasını etkileyen yüzey oksidasyonuna maruz kalması en önemli dezavantajlarıdır.

Beş farklı büyüklükte tungsten partikülü ticari olarak temin edilebilir. Büyüklüklerinin farklı olması belli bir partikül büyüklüğü kullanılarak bu parametreye göre optimizasyonu zorlaştırır.

Altın partikülleri

Ticari olarak mevcut üç farklı büyüklükte altın partikülü vardır. Altın partikülleri daha yuvarlak şekilli ve şekil olarak daha düzgündür. Dokular üzerinde toksik etkisi yoktur.

Büyük partiküller helyum gaz şoku etkisiyle daha fazla hız kazanır. Partikül hızındaki artma ise, bu partiküllerin hedef hücrelere nüfuz etmesini artırır ve böylelikle gen aktarım etkinliği de artmış olur.

2.2.1.3.4. Partikül bombardıman sisteminin kimyasal parametreleri

Mikrotaşıyıcıların DNA ile kaplanması

Partiküllerin DNA ile kaplanması için ilk olarak partiküllere %100 etanol (v/v) ve steril distile su ile yüzey sterilizasyonu uygulanır. Homojen bir reaksiyon karışımı elde etmek için DNA ve mikrotaşıyıcıların sürekli vorteks durumunda iken kalsiyum klorit ve spermidin eklemesi yapılmalıdır. DNA'nın partiküllere yapışmasını sağlayan spermidin ve Ca konsantrasyonları gen aktarım oranını etkileyen önemli faktörlerdir. DNA konsantrasyonunun artırılması ile doğru orantılı olarak gen aktarım oranının artması beklenir. Ancak çok sayıda DNA/mikrotaşıyıcı birleşip geniş yüzeyler oluşturarak doku

zedelenmelerine ve canlılık kayıplarına neden olduğundan DNA konsantrasyonunun partiküllerin kümeleşmesine izin vermeyecek şekilde az, fakat etkili gen aktarımı yapabilecek kadar yeterli olması gereklidir (Southgate vd. 1995).

Partiküllerin makrotaşıyıcıya yüklenmesi

DNA ile kaplanmış mikrotaşıyıcılar kısa süre içinde kullanılmalıdır. Eğer gün boyu sürececek bir çalışma planlanmışsa, partiküllerin DNA ile bağlanması işlemi gerekli miktarlarda ve birkaç kez yapılmalıdır. Makrotaşıyıcıya yüklenen partiküllerin homojen dağılmasına özen gösterilmelidir. Atış yapılmadan önce makrotaşıyıcının vakum altında kurutulması partiküllerin birbirine yapışmasını ve kümeleşmesini önler (Sanford vd. 1993).

2.2.1.3.5. Partikül bombardıman sisteminin biyolojik parametreleri

İşaret-raportör gen tasarımı

Kullanılacak vektör uygun işaret veya raportör gen tasarımına ve etkili promotöre sahip olmalıdır. Aktarılan genin kolaylıkla ve hızlı bir şekilde izlenebildiği X-Gluc ile hücreler maviye boyandığında gözlenen, *gus (uidA)* kodlu " β -glucuronidase" enzimi ile tanımlanan GUS raportör sistemi (Jefferson 1987) partikül bombardımanı yönteminin optimizasyon çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır (Southgate vd. 1995). Seçici gen tasarımı ile eksplantlara antibiyotiğe ya da herbisitlere dayanıklılık gibi özellikler aktarılmaktadır. Antibiyotiğe dayanıklılığı sağlayan bakteriyal kökenli genler, promotörün yönlendirmesi ile bitkinin belirli kısımlarında etkili olarak ortaya çıkarlar ve böyle bir genin seçimi yüksek dozda verilen antibiyotiğe karşın, canlılığını sürdüren hücrelerin izlenmesi ile olur. Kanamisin, genetisin ve higromisin en çok kullanılan antibiyotiklerdir. Herbisitlere dayanıklılık, bakterileri ve bitkileri içeren geniş bir organizma topluluğundan izole edilen genlerle sağlanan, sıkça kullanılan ve başarılı sonuç alınan bir seleksiyon yöntemidir. Bu amaçla kullanılan markör genlere *bar*, *cat* ve *nptII* örnek olarak verilebilir. Birçok bitki türünde herbisitlere dayanıklılığın test edilmesinde kullanılan L-fosfınotrisin, glifosat ve klorosülfüron ise geniş etkili herbisitlerdir (Wilmink ve Dons 1993). CaMV 35S çift çenekli bitkilerde etkili bir promotörken, *Adh1* ve *Ubi1* promotörleri buğday, arpa, mısır gibi tek çenekli bitkilerde başarılı sonuçlar vermektedir (Southgate vd. 1995).

Vektör yapısı

Yapılan çalışmalar ışığında vektör boyutu kısıtlayıcı bir faktör olarak değerlendirilmemektedir. 20-30 kb boyutlarındaki *E. coli* plazmid vektörleri işlevsel olarak kullanılabilir. Ancak uzun plazmidlerle yapılan gen aktarımlarında kısa plazmidlere oranla daha az etkili sonuçlar alınmıştır (Mendel vd. 1989). Tungsten partiküllerine bağlanmış λ faj vektörleri ile (50 kb) yüksek oranda gen aktarımı gerçekleştirilmiştir (Sanford vd. 1993). Biyolistik yöntemle aktarılan RNA ya da DNA, çember veya çubuk formda ve tek veya çift iplik şeklinde olabilmektedir.

Hücre yaşı/fizyolojisi

Biyolistik yöntemle gen aktarımına en uygun hedef hücreler, fizyolojik yapısı ile gen aktarımına uyum sağlayabilen, bombardıman basıncı stresine dayanabilen, sağlıklı ve hücre bölünmesi devam eden genç hücrelerdir. Ancak en ideal hücre yaşı türlere göre değiştiğinden, gen aktarımı için eksplantın en uygun dönemi ön çalışmalarla belirlenmelidir.

Hücre büyüklüğü

Farklı hücre büyüklüğüne sahip birçok organizma ve hücre organellerine biyolistik yöntemle başarılı gen aktarımları gerçekleştirilmiştir. Değişik biçimlerde ve büyüklüklerdeki (20-100 μm) bitki hücreleri de kullanılmıştır. Hedef hücre büyüklüğü partikül büyüklüğü seçiminde ve hedef uzaklığının belirlenmesinde önemli bir faktördür (Sanford vd.1993).

Hücre yoğunluğu

Hücre süspansiyon kültürü hazırlanmasında önemli bir parametredir. Bakteriyel sistemlerde sıvı ortamda yetiştirilen hücreler bombardıman için santrifüj edilip tekrar süspansiyon edilerek bombardıman için hazırlanan ortamın yüzeyine ince bir tabaka halinde dağıtılır. Aynı yapıdaki hücrelerin kullanılması çok sayıda hedef hücre oluşumunu sağlayarak, uygun özellikte olmayan hücrelerin tekrar elimine edilmesi gerekliliğini ortadan kaldırır (Sanford vd. 1993). Hücrelerarası boşluğun az olduğu eksplantlarda başarı oranı daha yüksektir.

Ozmotik basınç

Yüksek ozmotik basınç hücreyi su kaybından ve düşük turgor basıncından koruyarak partikül girişini olumlu etkiler. Bombardımandan önce ortama katılan ve ozmotik basıncı artırıcı etkide bulunan mannitol veya sorbitol gibi kimyasallarla bombardıman etkinliğinin 3-4 kat artırıldığı, bunun plazmoliz olan hücrelerde bombardıman sırasında protoplazma zedelenmesinin önlenerek şiddetli çarpmanın neden olduğu zararların azaltılması ile sağlandığı gözlenmiştir (Southgate vd. 1995).

Partikül toksisitesi

Tungsten toksisitesi, yüksek konsantrasyonlarda ve ileri dönemlerde görülür. Yüzey oksitlenmesi nedeniyle zamanla DNA bağlanmasını azaltıcı etkide bulunur. Altın ise biyolojik sistemlerde kimyasal etkileşime sebep olmaz, hücrelerde toksik etkisi yoktur. Partikül yüzeyinde DNA bağlanmasını etkileyecek reaksiyonlar oluşturmaz. Altın partiküllerinin yüksek kütleli yoğunlukları, tungsten partiküllerine oranla hedef hücrelere çok daha kolay nüfuz etmelerini sağlar. Nedeni açıkça bilinmemekle birlikte tungsten partiküllerinin daha geniş mavi nokta oluşumu sağladığı görülmüştür. Mısırdaki ve gülde yapılan deneylerde tungsten partikülleri kullanıldığında altın partiküllerine oranla daha az mavi nokta elde edilmiştir (Southgate vd. 1995).

2.3. Radyasyon

Radyasyon, iç dönüşüm geçiren atomlar tarafından yayımlanan, boşlukta ve madde içerisinde hareket edebilen enerji olarak tanımlanır. Herhangi bir maddenin atom çekirdeğindeki nötronların sayısı, proton sayısına göre oldukça fazla ise; bu tür maddeler kararsız bir yapı göstermekte ve kararlı yapıya geçmek için alfa, beta, gamma gibi çeşitli parçacık ve ışınlar yaymaktadır. Çevresine bu şekilde ışın saçarak parçalanarak maddelere "radyoaktif madde", çevreye yayılan alfa, beta ve gamma gibi ışınlara ise "radyasyon" adı verilmektedir. Yayımlayan kaynağın özelliğine bağlı olarak bu enerji, hızlı parçacıklar veya elektromanyetik dalgalar şeklinde taşınabilir. Radyasyonu tanımlanırken; radyasyonun enerjisi (düşük ve yüksek enerjili radyasyon), türü (parçacık tipi radyasyon ve dalga tipi radyasyon) ve kaynağı (doğal ve yapay radyasyon kaynakları) olmak üzere üç ana parametre kullanılır (Krane 1987).

2.3.1. Radyasyonun sınıflandırılması

Radyasyon "parçacık" ve "dalga" tipi olarak iki şekilde sınıflandırılır. Parçacık radyasyonu; belli bir kütle ve enerjiye sahip çok hızlı hareket eden küçük parçacıkları ifade eder. Bunlar, hızlı hareket eden mermilere benzetilebilir, ancak gözle görülemeyecek kadar küçüktürler. Önerine çıkan malzeme içerisinde durdurulup soğurulana kadar, o malzemeye enerji aktarırlar. Doğal olarak malzemede zamanla ısınma meydana gelir. Parçacık gücüne bağlı olarak; molekül bağları kırılabilir. Bu olay bazı plastik türlerini sertleştirme (radyasyonla polimerizasyon) amacı için kullanılabilir. Ancak bu olay bir canlı hücrelerinde meydana geliyor ise bu durum organizmada olumsuz etkiler meydana getirir. Canlı hücrelerde radyasyon ile kırılan molekül bağları, bazen gelişmiş güzel başka bağlanmalara sebep olabilir ve arızalı hücreler ortaya çıkabilir. Canlı organizmanın bu arızalı hücreleri belli oranda tamir etme kapasitesi olsa da, radyasyon hücre çekirdeğine ulaşır ve DNA yapısında değişikliklere yol açarsa, hücre ya ölür ya da başka formda hızlı üreme çabası içine girerek kanserleşir (Lombardi 2007).

Dalga tipi radyasyon; belli bir enerjiye sahip ancak kütsüz radyasyon çeşididir. Bunlar, titreşim yaparak ilerleyen elektrik ve manyetik enerji dalgaları gibidir. Görünür ışık dalga tipi radyasyonun bir çeşididir. Bütün dalga tipi radyasyonlar ışık hızıyla (3×10^8 m/saniye) hareket ederler. Dalga tipi radyasyon, enerjisine bağlı olarak canlı organizmada parçacık tipi radyasyona benzer etkiler yaparlar.

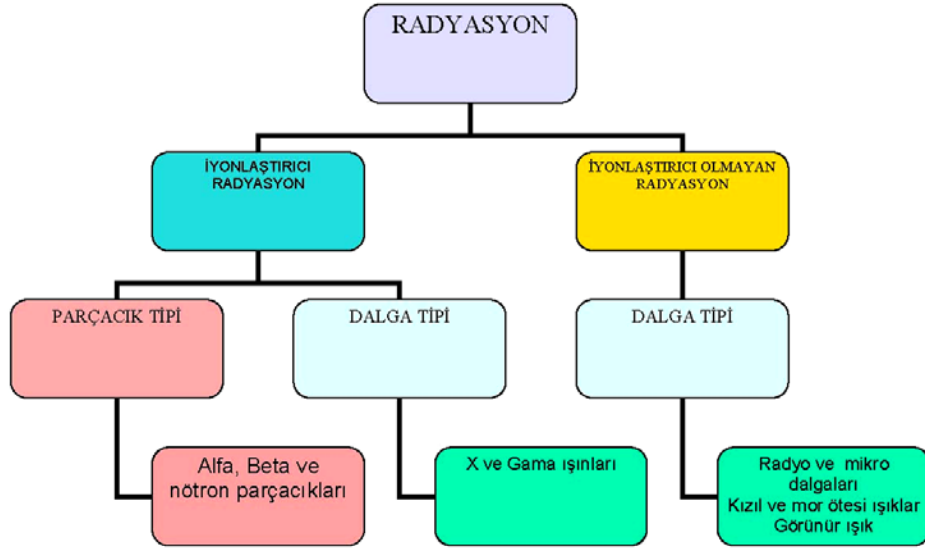
Parçacık ve dalga tipi radyasyon; "iyonlaştırıcı" ve "iyonlaştırıcı olmayan" radyasyon olmak üzere iki gruba ayrılır (Krane 1987).

2.3.2. Radyasyon çeşitleri

Düşük enerjili ya da iyonlaştırıcı olmayan radyasyon ise etkileştiği materyal içindeki atomları yeteri kadar enerjisi olmadığı için iyonlaştıramaz ve sadece uyarmakla yetinir. Mikrodalgalar, görünür ışık, radyo dalgaları, kızılötesi ve (çok kısa dalga boyluları hariç olmak üzere) morötesi ışık iyonlaştırıcı olmayan radyasyona örnektir.

İyonlaştırıcı radyasyon, yüksek enerjili radyasyon olarak da tanımlanır ve atomdan elektron koparabilen dolayısıyla atomu iyonize edebilen radyasyon türüdür. İyonlaşma olayı herhangi bir maddede meydana gelebileceği gibi insanlar dahil tüm canlılarda da oluşabilir. O halde iyonlaştırıcı radyasyon, önlem alınmadığı takdirde tüm canlılar için

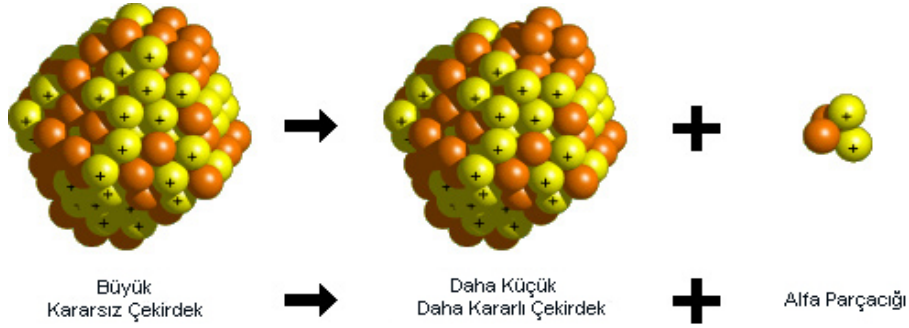
zararlı olabilecek radyasyon çeşididir. İyonlaştırıcı radyasyon beş çeşidi vardır. Bunlar, alfa parçacıkları, beta parçacıkları, X ışınları, gamma ışınları ve nötronlardır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Radyasyonun sınıflandırılması

2.3.2.1. Alfa parçacıkları

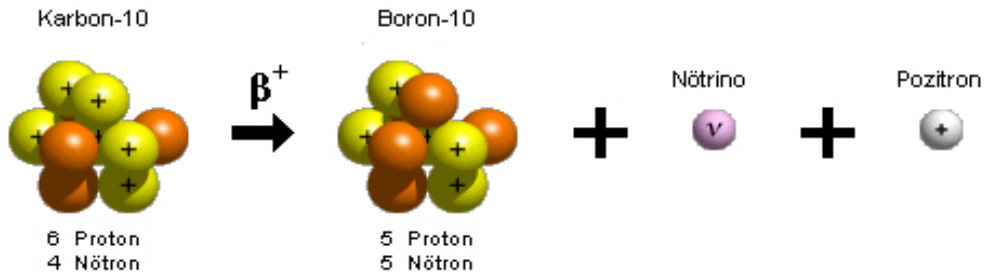
Alfa parçacığı iki proton ve iki nötrondan oluşmuş bir helyum (${}^4_2\text{He}$) çekirdeğidir ve pozitif yüklüdür. Çekirdeğin kararsızlığı hem proton hem de nötron fazlalığından ileri geliyorsa, çekirdek iki proton ve iki nötrondan oluşan bir alfa parçacığı yayımlayarak bozunur. α işaretiyle sembolize edilirler. Çekirdeğin, alfa parçacığı yayımlayarak parçalanması olayı atom numarası büyük izotoplarda görülür ve genellikle doğal radyoaktif atomlarda rastlanır. Alfa parçacıklarını çok küçük kalınlıklardaki maddelerle (örneğin, ince bir kağıt tabakası ile) durdurmak mümkündür. Bunun sebebi, diğer radyasyon çeşitlerine göre sahip oldukları nispeten büyük elektrik yükleridir. Sahip oldukları bu elektrik yükü, alfa parçacıklarının herhangi bir madde içerisinden geçerken yolları üzerinde yoğun bir iyonlaşma meydana getirmelerine ve bu yüzden de enerjilerini çabucak kaybetmelerine yol açar. Enerjilerini bu şekilde kaybeden alfa parçacıklarının erişme uzaklıkları da dolayısıyla çok kısadır (Krane 1987). Bu yüzden normalde dış radyasyon tehlikesi yaratmazlar. Ancak, mide, solunum ve yaralar vasıtasıyla vücuda girdiklerinde tehlikeli olabilirler (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Alfa parçacığı

2.3.2.2 Beta parçacıkları

Çekirdekteki enerji fazlalığı çekirdek civarında, $E = mc^2$ eşitliğiyle açıklanabilen, bir kütle oluşturur. Bu kütle çekirdekteki fazla yükü alır ve dışarıya bir beta parçacığı olarak çıkar. β işaretiyle sembolize edilirler. Beta parçacıkları, pozitif veya negatif yüklü elektronlardır. Pozitif yüklü elektronlar " β^+ ", negatif yüklü elektronlar ise " β^- " işaretiyle sembolize edilirler. Çekirdekteki enerji fazlalığı proton fazlalığından meydana geliyorsa " β^+ ", nötron fazlalığından meydana geliyorsa " β^- " parçacığı çıkar. Beta parçacıkları da alfa parçacıkları gibi belli bir yük ve kütleye sahip olduklarından madde içerisinde geçerken yolları üzerinde iyonlaşmaya sebep olurlar. Ancak bu iyonlaşma, alfa parçacıklarının oluşturduğu iyonlaşmadan daha azdır. Çünkü bu parçacıklar alfa parçacıklarına göre daha hafif ve yüz kere daha giricidirler (Krane 1987). Beta parçacıkları ince alüminyum bir levha ile durdurulabilir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Beta parçacığı

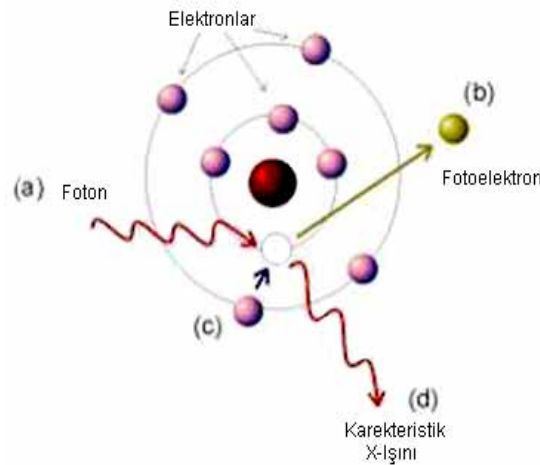
2.3.2.3. X ışınları

Röntgen ışınları da denilen X ışınları, görünür ışık dalgaları ve mor ötesi ışınları gibi dalga şeklindedir. Bir atoma dışarıdan gönderilen yüksek enerjili elektronlar o atomun ilk halkalarından elektronlar koparırlar. Atomdan kopan bu elektronun yerine daha yüksek

seviyelerden (üst halkalardan) elektronlar atlayarak kopan elektronun yerindeki boşluğu doldurur. Bu sırada ortaya çıkan enerji fazlalığı X ışını şeklinde dışarı salınır.

Çekirdek içerisinde bulunan protonlardan bir tanesi hareketi esnasında atomun ilk halkalarındaki elektronu yakalar ve nötrleşir. Yakalanan bu elektronun halkasındaki boşalan yere diğer bir halkadan bir elektron atlamasıyla da X ışını meydana gelebilir (Şekil 2.15). Bunların dışında da X ışını yapay olarak, röntgen tüplerinde de elde edilir. Tüp içerisinde ısıtılmış katottan yayılan elektronlar, yüksek gerilimle hızlandırılarak karşıdaki hedef anoda çarpıtılır. Bu çarpışma sonucu elektronlar durdurulurken elektronların kaybettiği enerji X ışınları olarak yayınlanır. Bu olaya Bremsstrahlung (Frenleme ışını) olayı, çıkan X ışınlarının oluşturduğu sürekli spektruma da Bremsstrahlung adı verilir.

Bu olay sırasında gelen fotonun enerjisinin bir kısmı elektronu bağlı olduğu atomdan koparabilmek için harcanır, geri kalan kısmı ise koparılan elektrona kinetik enerji olarak aktarılır (Krane 1987).

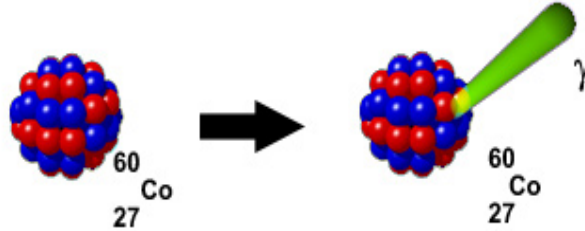


Şekil 2.15. X ışınlarının oluşumu

2.3.2.4. Gamma ışınları

Gamma ışınlarının kaynağı atomun çekirdeğidir. Bu ışınlar atom çekirdeğinin enerji seviyelerindeki farklılıklardan meydana gelir. Çekirdek, bir alfa veya bir beta parçacığı çıkardıktan sonra genellikle kararlı bir durumda olmaz. Fazla kalan çekirdek enerjisi bir elektromanyetik radyasyon halinde yayınlanır. Gamma ışınları, beta ışınlarından daha yüksek enerjili ve dolayısıyla daha girici ışınlardır. γ sembolize edilirler. Gamma ve X ışınlarının, alfa ve beta parçacıklarına göre madde içine nüfuz etme kabiliyetleri çok daha fazla, iyonlaşmaya sebep olma etkileri ise çok daha azdır. Ancak birkaç santimetre

kalınlığındaki kurşun levhalarla ve sadece belli bir kısmı durdurulabilir. Madde içerisinde geçerken üstel bir fonksiyon şeklinde bir şiddet azalmasına uğrarlar (Krane 1987). Yüksüz olduklarından elektrik ve manyetik alanda sapma göstermezler (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Gamma ışınları

2.3.2.5. Nötronlar

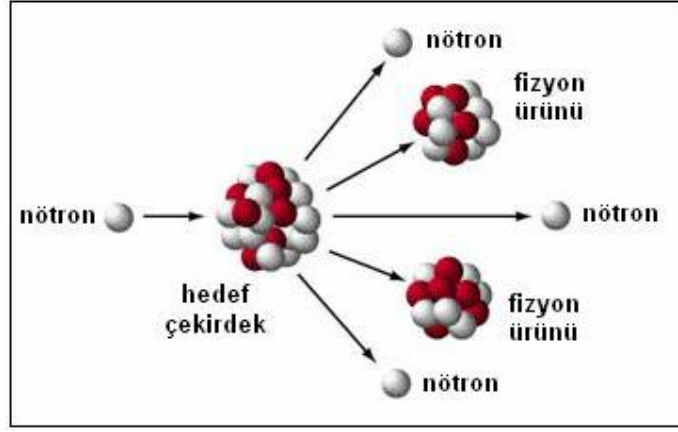
Nötronlar yüksüz parçacıklardır. Nötronun kütlesi protonun kütlesinden biraz daha büyüktür. Bu özelliklerinden dolayı herhangi bir madde içerisine kolaylıkla nüfuz edebilirler. Doğrudan bir iyonlaşmaya sebep olmazlar. Ancak atomlarla etkileşmeleri, iyonlaşmaya neden olan alfa, beta, gamma veya X ışınlarının ortaya çıkmasına neden olabilir. Nötronlar genel olarak kimyasal enerjilerine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılır ve sadece kalın beton, su veya parafin kütleleriyle durdurulabilirler (Krane 1987).

Hızlı ya da yavaş, yani az veya çok kinetik enerjiye sahip nötronların bombardımanı ile parçalanabilen atom çekirdeklerinin bölünebilir (fisol) olduğu söylenir. Uranyum, doğada bulunan yegane bölünebilir elementtir. Doğal hali sayıca; %99.274 oranında U-238, %0.7205 oranında U-235 ve çoğunlukla gözardı edilen %0.0055 oranındaki U-234 izotoplarından oluşur. Bunlardan bölünebilir olan U-235'in parçalanması sonucunda açığa; 'filyon ürünü' denilen orta ağırlıkta iki çekirdekle, yüksek kinetik enerjiye sahip, yani 'hızlı' iki veya üç nötron çıkar (Şekil 2.17).

2.3.3. Radyasyon dozu

Radyasyon dozu hedef kütle tarafından, belli bir sürede, soğurulan veya alınan radyasyon miktarıdır. Bütün zararlı maddeler gibi genellikle, canlılarda birtakım biyolojik hasarlara neden olurlar. Biyolojik etki radyasyonun tipine, enerjisine, iyonlaştırma yeteneğine,

radioaktif maddenin yarı ömrüne, biyolojik sistemin radyasyon kaynağına olan mesafesine ve radyasyona maruz kalma süresine bağlıdır.



Şekil 2.17. Nötron parçacıkları

Gerekli önlemler alınmadığı takdirde, belli bir sürede belli bir miktarın üzerinde radyasyon enerjisi soğuran yani radyasyon dozu alan canlılarda da bazı zararlı etkilerin meydana gelmesi kaçınılmazdır. Bu etkinin büyüklüğü ise radyasyonun çeşidi, soğurulma hızı ve soğurulan radyasyonun miktarı bilindiği zaman mümkündür. Bütün bu faktörler bilindiğinde canlı ve cansız varlıklar üzerinde bırakacağı etki kolayca belirlenebilir (Lombardi 2007).

2.3.4. Radyasyonun hücre ile etkileşmesi

Bilindiği gibi, tüm canlılar organlardan, organlar dokulardan ve dokularda biyolojik sistemin temel yapı taşı olan hücrelerden meydana gelir. Hücre, kabaca, bir çekirdek, bu çekirdeği çevreleyen jelse yapıdaki sitoplazma ve en dışta bunları saran bir zardan oluşur. Çekirdeğin içerisinde hücre davranışlarıyla ilgili şifre bilgileri içeren ve görevi bunları bir sonraki nesillere değiştirmeden taşımak olan kromozomlar bulunur. Kromozomlar ise protein zincirlerinden oluşur. Hücrenin yapı ve işlevleri DNA tarafından kontrol edilir.

İyonlaştırıcı radyasyonun bir canlıda biyolojik bir hasar yaratabilmesi için radyasyon enerjisinin hücre tarafından soğurulması gerekir. Bu soğurma sonucu hedef moleküllerde iyonlaşma ve uyarılmalar meydana gelir. Daha sonra ortaya çıkabilecek biyolojik hasarların başlatıcı olayları olan bu iyonlaşmalar, hücrenin genetik bilgilerini taşıyan DNA zincirlerinde kırılmalara ve hücre içerisinde kimyasal toksinlerin üremesine neden olabilir. Kırılmaların hemen ardından bir onarım faaliyeti başlar. Hasar çok büyük değilse DNA'da

meydana gelen kırılmalar onarılabilir. Ancak bu onarım esnasında da hatalar oluşabilir ve yanlış şifre bilgiler içeren kromozomlar meydana gelebilir.

Hasarlı DNA düzgün onarılmadığı takdirde hücre ya bozuk (kötü çalışan) bir metabolizma ile sağ kalacak ya da ölecektir. Canlılarda bir çok organ veya doku, önemli sayıda hücre kaybına rağmen faaliyetlerini normal bir şekilde sürdürebilir. Yine de hücre kaybı belli bir sayının üzerine çıktığında organ veya dokularda, dolayısıyla ışınlanan organizmada gözlenebilir hasarlar meydana gelecektir. Bu da ancak bu kadar çok sayıda hücrenin ölümüne sebep olacak büyüklükte bir radyasyon dozuna maruz kalınması sonucu gerçekleşir. Etki eşiğini aşan akut doz almış canlılarda ortaya çıkan bu tür hasarlara deterministik etkiler denir. Kısaca, deterministik etkilere hücre ölümü sebep olur, eşik doz yüksektir, belirtisiz safha genellikle kısadır, doz yüksek olduğu takdirde etki kesindir, etkinin şiddeti doz ile artar ve doz hızının etkiler üzerinde büyük bir tesiri vardır.

Radyasyonun verdiği hasar sonucu hücre ölmüyor ancak değişikliğe uğruyorsa bu hücredeki hasar genellikle onarılır. Onarım mükemmel olarak gerçekleşmediği takdirde değişim yavru hücrelere aktarılacak ve er geç ışınlanan canlının organ veya dokularında kanser oluşumuna yol açacaktır. Eğer hücreler ışınlanan ebeveyninden bir sonraki nesile genetik bilgilerin aktarılmasıyla ilgiliyse kalıtsal bozukluklar meydana gelebilir. Ebeveynin kendisinde veya yeni nesilde meydana gelen bu tür etkiler "Stokastik etkiler" olarak adlandırılır.

Stokastik etkilere (kalıtsal etkilere) tek bir hücrede meydana gelen hasarlar neden olur. Doku dozu arttıkça çok daha fazla sayıda hücrede hasar görülür ve stokastik etkilerin meydana gelme olasılığı artar. Kısaca, kalıtsal etkiler radyasyonun stokastik etkileridir, belli bir eşik doz yoktur, meydana gelme olasılığı doz ile artar, şiddet derecesi doz ile artmaz ve doz hızının risk üzerinde küçük bir etkisi olabilir. Stokastik etkilerin, kanser için birkaç yıllık ve kalıtsal etkiler için ise daha uzun sürebilecek belirtisiz geçen periyotları vardır (Lombardi 2007).

Kromozomda meydana gelen hasarın büyüklüğüne etki eden faktörleri özelliklerinden dolayı genel olarak iki grupta incelenir.

- Radyasyonun Özelliklerine Bağlı Faktörler,
- Hedefin Özelliklerine Bağlı Faktörler

2.3.4.1. Radyasyonun özelliklerine bağlı faktörler

Hasarın büyüklüğüne etki eden en önemli radyasyon özelliklerinden biri radyasyonun çeşidi ve sahip olduğu enerjidir. Hücreye alınan veya enerjisi soğurulan herhangi iki radyasyon çeşidinden enerjileri aynı ancak iyonlaştırma yeteneği daha fazla olanı veya iyonlaştırma yeteneği aynı ancak enerjisi daha büyük olanı DNA'da daha büyük bir hasar meydana getirir.

Bir diğer önemli radyasyon özelliği doz hızıdır. Eşit dozdaki radyasyonların yüksek doz hızlarında uygulanmasıyla oluşacak hasar, düşük doz hızlarında uygulanmasına oranla oluşacak hasardan daha büyük olacaktır. Örneğin, 1 Gy'lik bir dozun bir saatte alınması sonucu oluşacak hasar, aynı dozun bir hafta boyunca alınması sonucu oluşacak hasardan büyük olacaktır.

Radyasyon dozuna maruz kalış süresi de hasarın büyüklüğüne etki eden radyasyon özelliklerinden biridir. Radyasyon kaynağın yakınında ne kadar çok zaman geçirilirse o kadar çok doza maruz kalınır. Bir ölçüm cihazının 5 mSv/saat doz hızı okuduğu bir bölgede kalınması halinde maruz kalınacak doz 1 saatte 5 mSv, 2 saatte 10 mSv, 3 saatte 15 mSv, vs.'dir Böylece süre arttıkça maruz kalınan doz miktarı artar ve hasar da buna bağlı olarak büyür (Lombardi 2007).

2.3.4.2. Hedefin özelliklerine bağlı faktörler

Farklı doku hücreleri, radyasyona karşı farklı duyarlılık gösterir. Oksijen konsantrasyonu yüksek dokular ile sık sık bölünen, tam olarak farklılaşmamış, metabolik aktivitesi düşük ve bölünme safhasında olan hücrelerin radyasyona karşı duyarlılığı fazladır. Ayrıca, radyasyona maruz kalınan bölge ve bu bölgenin büyüklüğü de biyolojik hasarın büyüklüğünü etkiler. Bunların yanısıra, radyasyona karşı duyarlılık canlıdan canlıya, yaşa, cinsiyete ve organizmanın sağlığına göre de değişebilir (Lombardi 2007).

Radyasyonun hücre ile etkileşmesi sonucunda kromozomda meydana gelen hasarlar bir takım biyolojik etkilerin oluşmasına yol açar. Bu etkiler, bedensel ve kalımsal etkilerdir. Işınlanan canlının kendisinde meydana gelebilecek hasarlar bedensel etkiler, kendisinden sonraki nesillerde ortaya çıkabilecek hasarlar ise kalımsal etkiler olarak adlandırılır. Bedensel ve kalımsal etkiler de erken ve gecikmiş etkiler olarak iki farklı kategoride incelenir. Erken etkiler, kısa bir süre içinde ve bir defada yüksek dozlara maruz kalınması

sonucunda kısa bir zaman aralığı içerisinde ortaya çıkar. Gecikmiş etkiler ise uzunca bir süre aralıklı olarak düşük dozlara maruz kalınması sonucu ortaya çıkar. Erken etkiler akut ışınlanma etkileri, gecikmiş etkiler ise kronik ışınlanma etkileri olarak da adlandırılır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

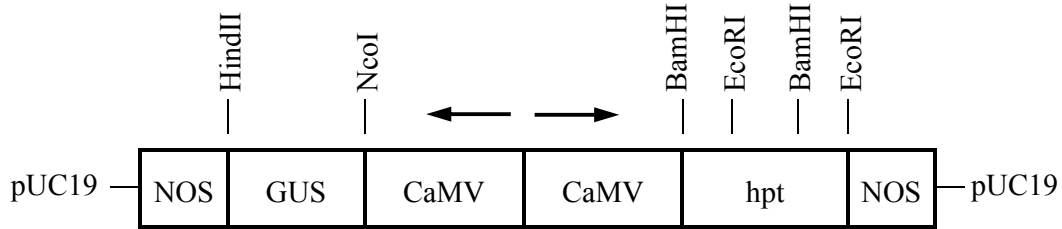
3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Çalışmada bitki materyali olarak Türkiye’de halen yetiştirilmekte olan ve daha önce *in vitro* çalışmalarda başarılı sonuçlar veren, tescilli 1 adet ekmeklik (*Triticum aestivum* L. – Bezostaja-1) ve 1 adet makarnalık (*Triticum durum* Desf. – Çakmak 79) buğday çeşidi kullanılmıştır.

3.1.2. Plazmid vektörü

Çalışmada kullanılan pBI221.23 plazmidi, çift CaMV35S promotörü (1000 bp) kontrolünde β -glukuronidaz (GUS) geni (2000 bp) ve hygromisin antibiyotikğine duyarlı *hpt* geninden (1300 bp) oluşmaktadır (Şekil 3.1). Bu gen ODTÜ Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Sertaç ÖNDE’den sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Bombardımda kullanılan pBI221.23 plazmidinin şematik görünümü

3.1.3. Işınlama materyali

Araştırmada radyasyon kaynağı olarak Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi’nde bulunan Kobalt 60 (Co-60) (Şekil 3.2) ve Sezyum 137 (Cs-137) (Şekil 3.3) gamma radyasyon kaynakları kullanılmıştır. Bu kaynaklara ilişkin özellikler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ekipmanların sterilizasyonu

In vitro çalışmalarda, çalışılan laboratuvarın ve kullanılan tüm ekipmanların steril olması kontaminasyon olmadan başarılı sonuçlar almak için büyük önem taşımaktadır.



Şekil 3.2. Kobalt 60 gamma kaynağı



Şekil 3.3. Sezyum 137 gamma kaynağı

Çizelge 3.1. Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma radyasyon kaynaklarının özellikleri

Radyasyon Kaynağı	Aktivitesi (Ci)	Yarı Ömrü (yıl)
Kobalt 60 (Co-60)	10000 (370 TBq) (1994)	5.27
Sezyum 137 (Cs-137)	10000 (370 TBq) (1982)	30.20

Bu nedenle her çalışma öncesinde ekipmanların özelliklerine göre steril edilmeleri sağlanmıştır. Tohumların yüzey sterilizasyonunda kullanılan kavanozlar, içine ortam dökülen ve diğer amaçlarla kullanılan Petri kapları gibi cam malzemeler, yüksek ısı derecelerine dayanıklı kalın kağıtlara sarılarak 200°C'de 2 saat bekletilerek sterilizasyonları sağlanmıştır.

Çalışmalarda kullanılan 200 µl'lik sarı uçlar, 1000 µl'lik mavi uçlar, büyük ependorf tüpler, 5 ve 10 ml'lik cam pipetler otoklavda steril edilmiş ve düşük sıcaklıktaki fırında kurumaları sağlanmıştır.

Steril kabin içerisinde kullanılan pens ve bistüri gibi metal ekipmanların steril edilmesinde ise %70'lik (v/v) etil alkol ve doğal gaz alevi kullanılmıştır. Eksplantların kesiminde kullanılan bistüri ucu gerekli görüldükçe özel koruması içindeki yeni steril uç takılarak değiştirilmiştir.

3.2.2. Tohum yüzey sterilizasyonu, embriyo izolasyonu ve kallus oluşumu

Yüzey sterilizasyonu yapılacak tohumlar manyetik karıştırıcıda etil alkolde (%70) 5 dakika bekletilerek 3 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra, 25 dakika ticari çamaşır suyunda (%5 sodyum hipoklorit içeren) çalkalanıp 6-7 kez steril saf su ile durulanmıştır. Steril tohumlar, 33°C'de yaklaşık 2 saat bekletilerek, embriyoların kolayca ayrılması sağlanmıştır (Özgen vd. 1998). Steril edilen tohumların embriyoları steril kabin içerisinde bistüri yardımıyla dikkatlice tohumdan ayrılarak skutellum kısmı yukarı gelecek şekilde besin ortamına yerleştirilmiştir. Her petride 20 adet embriyo kültüre alınmıştır. Kültürler kallus oluşumu için 26°C'de karanlık inkübatörde 14 gün bırakılmıştır.

3.2.3. Büyüme ortamı ve kültür koşulları

Besin ortamı, MS mineral ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962) (Çizelge 3.2) ile 2 mg/l 2,4-D ve 20 g/l sukrozdan oluşup, 7 g/l agar ile katılaştırılmıştır (Özgen vd. 1996). Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2

atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 25±1°C'de tutulmuşlardır. Her muamele, içerisinde 20 adet eksplantın bulunduğu 3 tekrarlamalı 100x10 mm'lik Petri kaplarından oluşmuştur.

3.2.4. Gamma radyasyonunun uygulanması

Gamma ışını kullanılarak yapılan çalışmalarda, embriyo ve kallus için 0 (kontrol), 15, 30, 60, 90, 120 ve 150 Gy gamma dozları kullanılmıştır. Kontrol olarak olgun embriyolar ve kalluslar herhangi bir ışınlama işlemine maruz bırakılmamıştır.

Çizelge 3.2. MS (Murashige ve Skoog 1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

Ortamda Bulunan Maddeler		Konsantrasyonu (mg/l)
Makro Elementler	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	KI	0.83
	H ₃ BO ₃	6.2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
Vitaminler	Inisitol	100
	Nicotinic Acid	0.5
	Pyridoxine-HCl	0.5
	Thiamine-HCl	0.1
	Glycine	2

3.2.5. Partikül bombardmanı yöntemi ile gen aktarımı

Bio-Rad PDS-1000 He[®] Partikül Bombardıman cihazı kullanılarak olgun buğday embriyolarına ve olgun embriyolardan gelişen kalluslara tungsten partikülleri aracılığı ile gen aktarımı gerçekleştirilmiştir. DNA'nın partiküllere bağlanmasında Lonsdale vd., (1990)'dan yararlanılmıştır. Buna göre, her atış başına, içerisinde "GUS" geni ve "CaMV

35S" promotörü bulunan, 0.6 µg "pBI221.23" DNA kullanılmış, her eksplant materyalinde olduğu gibi, cihazın optimal kullanılması için gereken parametrelerin belirlenmesinde daha önce yapılan çalışmalardan (Akby vd. 2000, Birsin vd. 2003, Koyuncu ve Özgen 2005, Özgen vd. 1999) ve ön denemelerden yararlanılmıştır.

Partikül bombardımanı yöntemi kullanılarak yapılan gen aktarımı çalışmalarında her petri bir tekrar olarak kabul edilmiş ve denemeler 3 tekrarlamalı olarak kurulmuştur.

Embiyoya gen aktarımında, petri başına 50 adet embriyo petrinin ortasına gelecek şekilde yerleştirilmiş, 15 Gy gamma dozuyla ışınlanan embriyolara ertesi gün 1100 psi basınç ve 9 cm yükseklikten gen aktarımı yapılmıştır. Kallusa gen aktarımında ise 14 gün süre ile inkübatörde karanlık şartlarda tutulan embriyoların kallus oluşturması sağlanmış, petrilerin ortasına konulan ve 15 Gy gamma dozuyla ışınlanan 15 adet kallusa ertesi gün 900 psi basınç ve 6 cm yükseklikten gen aktarımı gerçekleştirilmiştir.

Gen aktarımından 48 saat sonra "Histokimyasal GUS Analizi" uygulanmış, sonuçta ortaya çıkan mavi noktalar sayılarak gen aktarım frekansı tespit edilmiştir.

3.2.5.1. Mikrotarıyıcıların hazırlanması

Tungsten partikülleri Sanford vd. (1993) tarafından belirtilen aşağıdaki metot kullanılarak hazırlanmıştır.

- 1.5 ml'lik endorff tüp içine 30 mg partikül tartılmış,
- 1 ml %96'lık (v/v) etanol ilave edilerek
- 3-5 dakika boyunca vorteks ile karıştırılmıştır.
- Mikrosantrifüjde 10 000 devirde 1 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra
- Üst kısımda kalan sıvı boşaltılmıştır.
- Yukarıdaki işlemler 3 kez tekrar edilmiştir.
- Ortamdan etanolü uzaklaştırmak için 1 ml steril saf su ilave edilmiş,
- 1 dakika vorteksle karıştırıldıktan sonra
- 10 000 devirde 1 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.
- Üstte kalan sıvı boşaltılmış,
- Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.
- Partikül konsantrasyonunu 60 mg/ml'ye getirmek için 500 µl %50'lik (v/v) steril gliserol ilave edilmiştir.

3.2.5.2. Mikrotaşıyıcıların DNA ile kaplanması

- Mikrotaşıyıcı solüsyonundan 50 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüp içine konulmuş,
- Süspansiyon sürekli vorteksle çalkalanırken,
- 5 µl DNA (1 µg/µl), 50 µl 2.5 M CaCl₂ ve 20 µl 0.1 M spermidin eklenmiştir.
- 2-3 dakika vorteks ile karıştırılmış,
- Süspansiyon 10 000 devirde 10 saniye süreyle santrifüj edilmiştir.
- Üst kısımda kalan sıvı boşaltıldıktan sonra,
- 250 µl %96'luk (v/v) etanol eklenerek,
- 10 000 devirde 10 saniye süreyle santrifüj edilmiştir.
- Üst taraftaki sıvı boşaltılmış,
- DNA ile kaplanmış tungsten partiküllerinin üzerine 60 µl %96'luk (v/v) etanol eklenmiştir.

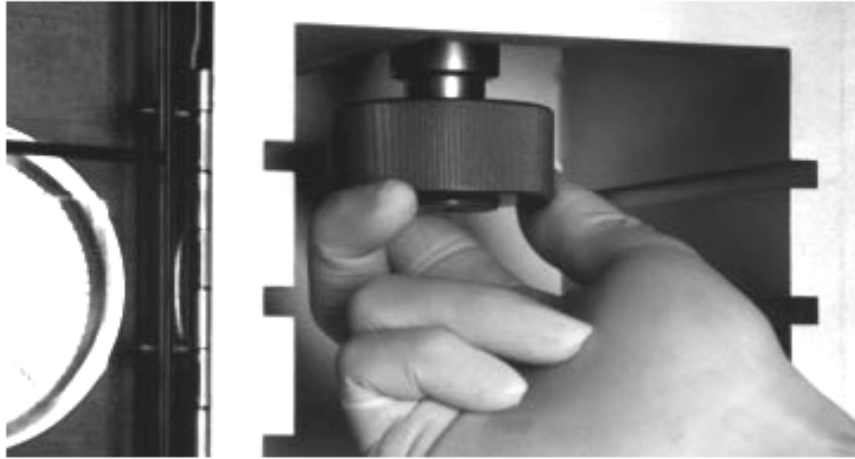
3.2.5.3. Bombardıman işleminin yapılması

- Kırılıcı diskin yerleştirildiği başlık (Şekil 3.4) ile partikül fırlatma düzeneği arasındaki mesafe ayarlanarak, partikül fırlatma düzeneğinin sabitleme başlığı içerisine durdurma levhası yerleştirilmiştir.
- Helyum kaynağı kontrol edilmiş,
- Makrotaşıyıcılar %50'lik (v/v) gliserol içinde yıkanmış,
- Güç kablosu şebeke gerilimine bağlanmıştır.
- Güç kontrol düğmesi "AÇIK" konuma getirildikten sonra,
- Bombardıman odasının iç çeperleri %70'lik (v/v) etanol ile temizlenmiştir.
- Sterilize edilmiş kırılıcı disk yine sterilize edilmiş olan kırılıcı disk başlığına yerleştirilmiştir (Şekil 3.4).



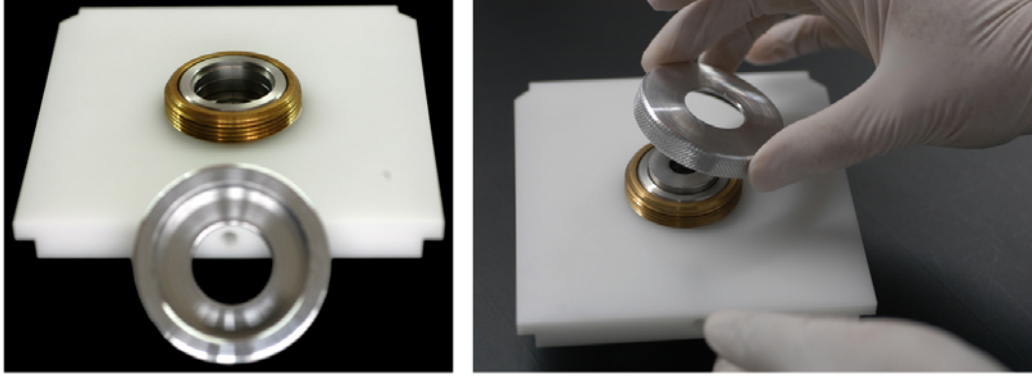
Şekil 3.4. Kırılıcı diskin başlık içine yerleştirilmesi (orijinal)

- Kırılıcı disk başlığı gaz hızlandırma tüpünün ucuna takılarak sıkıştırılmıştır (Şekil 3.5).



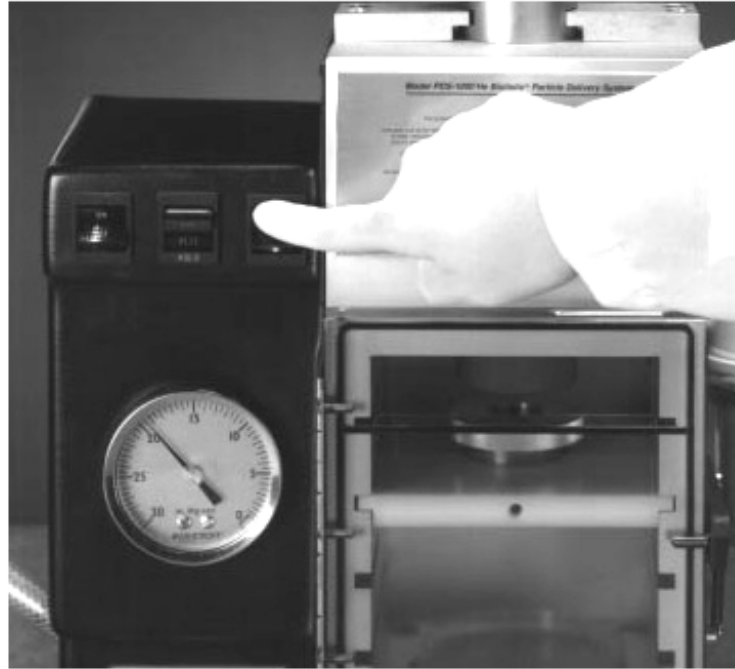
Şekil 3.5. Kırılıcı diskin yerleştirildiği başlığın takılması/çıkarılması (Bio-Rad 2000)

- Partikül fırlatma düzeneğine makrotaşıyıcı ve durdurma levhası yerleştirilmiş (Şekil 3.6).
- Partikül fırlatma düzeneği ve hedef hücreler bombardıman odasına konarak cihazın kapısı kapatılmıştır.
- Vakum düğmesi "vac" konumuna getirilerek bombardıman odasının havası boşaltılmış,
- Vakum düğmesi "vac" konumundan "hold" konumuna getirilerek bombardıman odasının vakumu korunmuştur.



Şekil 3.6. Partikül fırlatma düzeneğine makrotaşıyıcı ve durdurma levhasının yerleştirilmesi (orijinal)

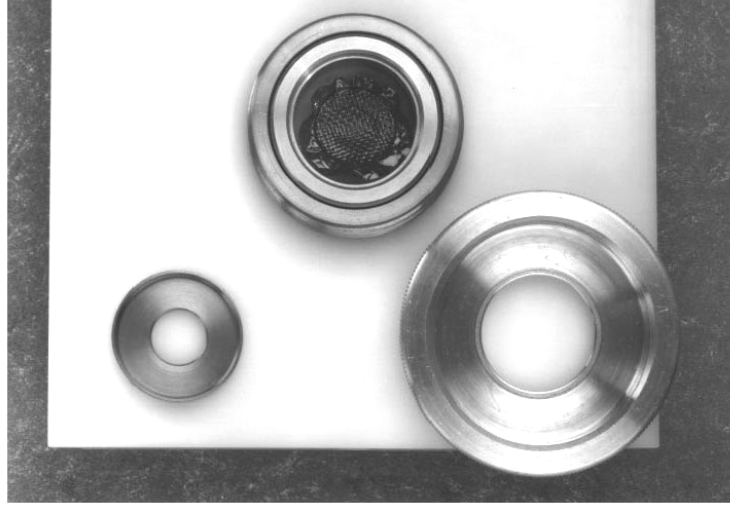
- Ateşleme düğmesi kırılıcı disk patlayıncaya kadar basılı tutulmuş, basınç istenen düzeye ulaştığında kırılıcı disk patlamış ve atış gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7).
- Ateşleme düğmesi bırakılmış,
- Atıştan hemen sonra helyum basınç göstergesi sıfıra düşmüştür.
- Vakum düğmesi "vent" konumuna getirilerek bombardıman odasına hava alınmış ve vakum ortadan kaldırılmıştır.



Şekil 3.7. Bombardıman işlemi (Bio-Rad 2000)

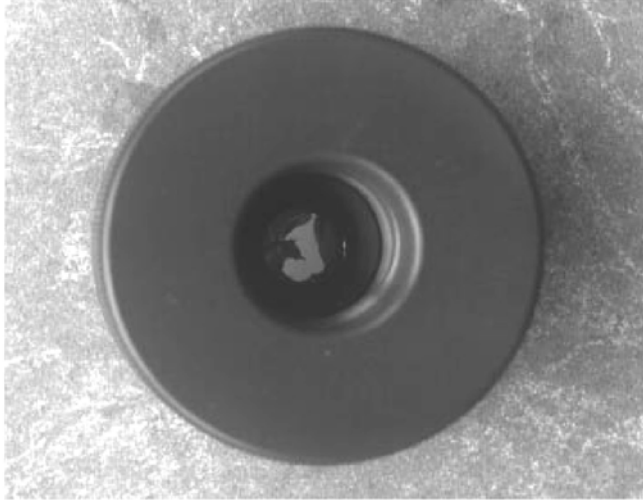
- Hedef doku bombardıman odasından çıkarılmış,

- Makrotaşıyıcı ve durdurma levhası partikül fırlatma düzeneğinden çıkarılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Bombardıman işleminden sonra makrotaşıyıcı ve durdurma levhasının durumu (Bio-Rad 2000)

- Kırılmış olan disk çıkarılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Kırılıcı diskin patladıktan sonraki durumu (Bio-Rad 2000)

3.2.6. Gen geçişlerinin belirlenmesi

Araştırmada markör gen olarak *E. coli* " β -Glucuronidase (GUS)" geni kullanılmış, gen geçişlerinin belirlenmesinde, Jefferson (1987) tarafından bildirilen "Histokimyasal GUS Analizi"nden yararlanılmıştır. Buna göre, bitki dokuları 100 mM sodyum fosfat (pH=7.0),

10 mM EDTA, %0.1 Triton X-100 ve 1 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucuronide (X-GLUC) içeren solüsyonda 37°C'de gece boyu inkübe edilmiş, daha sonra dokular %70'lik alkolde yıkanarak, gen geçişlerinin göstergesi olarak kabul edilen mavi noktalar sayılmıştır.

Bombardımandan 48 saat sonra gen geçişlerinin belirlenmesi amacıyla embriyo ve kalluslar Jefferson (1987) yönteminden yararlanılarak X-GLUC solüsyonuna alınmıştır.

50 ml "X-Gluc" solüsyonu hazırlamak için bir behere sırası ile,

- 5 ml EDTA,
- 5 ml potasyum ferrisiyanid,
- 5 ml potasyum ferrosiyaniid,
- 25 ml Buffer,
 - 0.2 M Na₂HPO₄ = 15.25 ml
 - 0.2 M NaH₂PO₄ = 9.75 ml
- 500 µl Triton X-100
- 25 mg "X-Gluc" (tartılarak 500 µl DMF içinde çözülmüştür.)
- 9 ml steril distile su eklenmiştir.
- Petri kutuları steril kabin içerisinde açılarak embriyo ve kalluslar 10 ml'lik falkon tüplere alınmış,
- Eksplantların yüzeyini örtecek şekilde her tüpe solüsyon eklenmiş ve
- Tüpler vakum cihazına yerleştirilerek 10 saniye süre ile hava kabarcıklarının dışarı alınması ve böylece eksplantların yüzeyi ile solüsyon temasının daha iyi olması sağlanmıştır.
- Tüpler, ağızları kapatılarak ışık almayacak şekilde bir kutuya yerleştirilerek 24 saat süre ile 37°C'de inkübatörde bekletilmiştir.
- Bu süre sonunda tüpler açılarak "X-Gluc" solüsyonu mikropipet yardımıyla dışarı alınmış ve bir defa steril distile su ile yıkama sonrası % 70 (v/v) etanol eklenmiştir.
- Embriyo ve kalluslar mikroskop altında birer birer incelenerek gözlenen mavi nokta sayıları kaydedilmiştir.

3.2.7. Fotosentetik aktivitenin belirlenmesi

Gamma radyasyonu uygulamasından sonra kallustan gelişen bitkiciklerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri Curtis ve Shetty (1996) tarafından bildirilen protokol kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için, 50 mg yeşil materyal, 3 ml metanol içine konularak 23°C'lik sıcaklıktaki karanlık ortamda 2 saat süreyle tutulmuş ve yeşil materyalde bulunan klorofilin metanol içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda sıvı kısımdan (klorofil içeren metanol) 1.5 ml alınarak 650 ve 665 nm'de spektrofotometre aracılığıyla optik yoğunluğu (OD) ölçülmüş ve aşağıda verilen formüller kullanılarak klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarları "µg klorofil/g taze doku" cinsinden belirlenmiştir.

$$\text{Klorofil a} = [16.5 \times A_{665} - 8.3 \times A_{650}] \times 3 / 0.05$$

$$\text{Klorofil b} = [33.8 \times A_{650} - 12.5 \times A_{665}] \times 3 / 0.05$$

$$\text{Toplam Klorofil} = [25.8 \times A_{650} - 4.0 \times A_{665}] \times 3 / 0.05$$

3.2.8. Mikroskop gözlemleri

Gamma uygulamasından sonra kallustan gelişen bitkiciklerin yaprak üst yüzeyinde yapılan gözlemlerde mikroskop görüş alanında ($303\ 000\ \mu\text{m}^2$) bulunan toplam tüy sayısı, toplam stoma sayısı ve 10 adet hücrenin boyu (μm) belirlenmiştir. Ölçümler, her bir muamele için (0 Gy (kontrol), Kobalt 60 ile 15 Gy ve Sezyum 137 ile 15 Gy) 3 tekrarlamalı olarak yapılmıştır.

3.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, her muamele içerisinde 20 adet eksplantın bulunduğu 3 tekrarlamalı 100x10 mm'lik petri kutularından oluşmuştur. Elde edilen veriler "SPSS for Windows" programı yardımıyla t-testi ve varyans analizine tabi tutulmuş, muamele ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerlere istatistik analizinden önce arcsin (\sqrt{X}) transformasyonu uygulanmıştır (Snedecor ve Cochran 1967).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yapılan bu araştırma ile gamma radyasyonunun partikül bombardımanı tekniği ile gen aktarımına olan etkisinin belirlenmesine çalışılmıştır. Gamma radyasyon kaynağı olarak Kobalt 60 (Co-60) ve Sezyum 137 (Cs-137) kullanılmıştır. Kültüre alınan olgun embriyolar ve 14 gün sonra bu embriyolardan gelişen kalluslar 0 (kontrol), 15, 30, 60, 90, 120 ve 150 Gy dozlarında ışınlanmıştır.

Öncelikle farklı kaynaklı gamma dozlarının olgun buğday embriyolarından kallus kültürü aracılığıyla bitki rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesine çalışılmış, en uygun gamma kaynağı ve dozu belirlendikten sonra gen aktarım çalışmalarına geçilmiştir. Olgun embriyolardan kallus kültürü aracılığıyla bitki rejenerasyonu çalışmalarında her iki buğday çeşidinde de (Bezostaja-1 ve Çakmak 79) en yüksek sonuçlar ışınlama yapılmayan kontrol uygulamasından alınmıştır. Uygulanan gamma kaynakları ve dozları içerisinde ise en yüksek değerler Kobalt 60 gamma kaynağının kullanıldığı 15 Gy'lik doz ile yapılan ışınlama uygulamalarından elde edilmiştir.

Kobalt 60 gamma kaynağı ve 15 Gy'lik dozla ışınlanan eksplantlara (embriyo ve kallus) daha sonra partikül bombardımanı yöntemi ile gen aktarımı yapılmış, 2 gün sonra uygulanan "Histokimyasal GUS Analizi" sonucunda eksplantlardaki mavi nokta sayıları belirlenerek, gamma radyasyonunun gen geçişine üzerine olan etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

Kallustan gelişen bitkiciklerin yapraklarındaki hücre gelişimi üzerine etkisi bakımından 15 Gy'lik dozda farklı gamma kaynakları karşılaştırıldığında, Kobalt 60 gamma kaynağından alınan sonuçların kontrol (0 Gy) uygulamasına yakın olduğu, buna karşın Sezyum 137 kaynağının kullanıldığı durumlarda yaprak hücrelerinin olumsuz yönde etkilendiği gözlenmiştir.

Kallustan gelişen bitkiciklerin yapraklarındaki fotosentetik aktivite üzerine etki bakımından 15 Gy'lik gamma dozunda Kobalt 60 ve Sezyum 137 kaynaklarının karşılaştırıldığı çalışmada, yine elde edilen sonuçların Sezyum 137 kaynağının kullanıldığı uygulamalarda büyük düşüşler gösterdiği tespit edilmiştir.

4.1. Kallusa Uygulanan Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Buğdayda Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi

İncelenen tüm karakterlerde en yüksek değerler her iki çeşit ve gamma kaynağında da 0 Gy'lik kontrol uygulamalarından elde edilmiştir.

4.1.1. Kallusa uygulanan Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

İncelenen karakterlerden kallusun rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkinliği bakımından 0 ve 15 Gy'lik dozlar arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Gamma kaynağı olarak Kobalt 60'ın kullanıldığı uygulamalarda en yüksek değerler 15 Gy'lik dozdan alınmıştır. Gamma radyasyon dozu arttıkça incelenen tüm karakterlerde (kallusun rejenerasyon kapasitesi, kültür etkinliği, rejenere olan sürgün sayısı, gelişen bitkicik sayısı, sürgün uzunluğu ve kök uzunluğu) önemli düşüşler gözlenmiştir (Şekil 4.1). 15 Gy'lik gamma dozu dışında diğer tüm dozlarda kallustan sürgün rejenerasyonu sağlansa bile, bu sürgünler köklendirilmek için kavanozlara aktarıldığında, sürgünlerde herhangi bir gelişme olmamış ve sonuçta köklenmiş bitkicikler gelişmemiştir. Kontrol uygulamasında (0 Gy) petri başına ortalama 11 adet bitkicik gelişirken, 15 Gy'lik gamma dozunda bu rakam 8.3'e gerilemiştir. Sürgün uzunlukları kontrolde 13.9 cm'den 15 Gy'lik gamma dozunda 11.9 cm'ye düşmüştür. Kök uzunluğu ise, kontrol uygulamasında 2.4 cm iken, 15 Gy'lik gamma dozunda 1.8 cm olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.2).

4.1.2. Kallusa uygulanan Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Sezyum 137 gamma kaynağı kullanıldığında, en yüksek değerler yine 15 Gy'lik dozdan alınmıştır. Gamma dozu arttıkça tüm karakterlerde önemli düşüşler gözlenmiştir (Şekil 4.1). 15 Gy'lik gamma dozu dışında diğer gamma dozlarından köklenmiş bitkicik elde edilememiştir. Gelişen bitkicik sayısı kontrolde (0 Gy) petri başına ortalama 11.0 adet iken, 15 Gy'lik dozda 5.0 adet olmuştur. Sürgün uzunlukları kontrolde 13.9 cm'den 15 Gy'lik gamma dozunda 2.5 cm'ye düşmüştür. Kök uzunluğu ise kontrol uygulamasında 2.4 cm'den 15 Gy'lik gamma dozunda 1.6 cm'ye gerilemiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. Kallusa uygulanan Kobalt 60 gamma kaynağının Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi

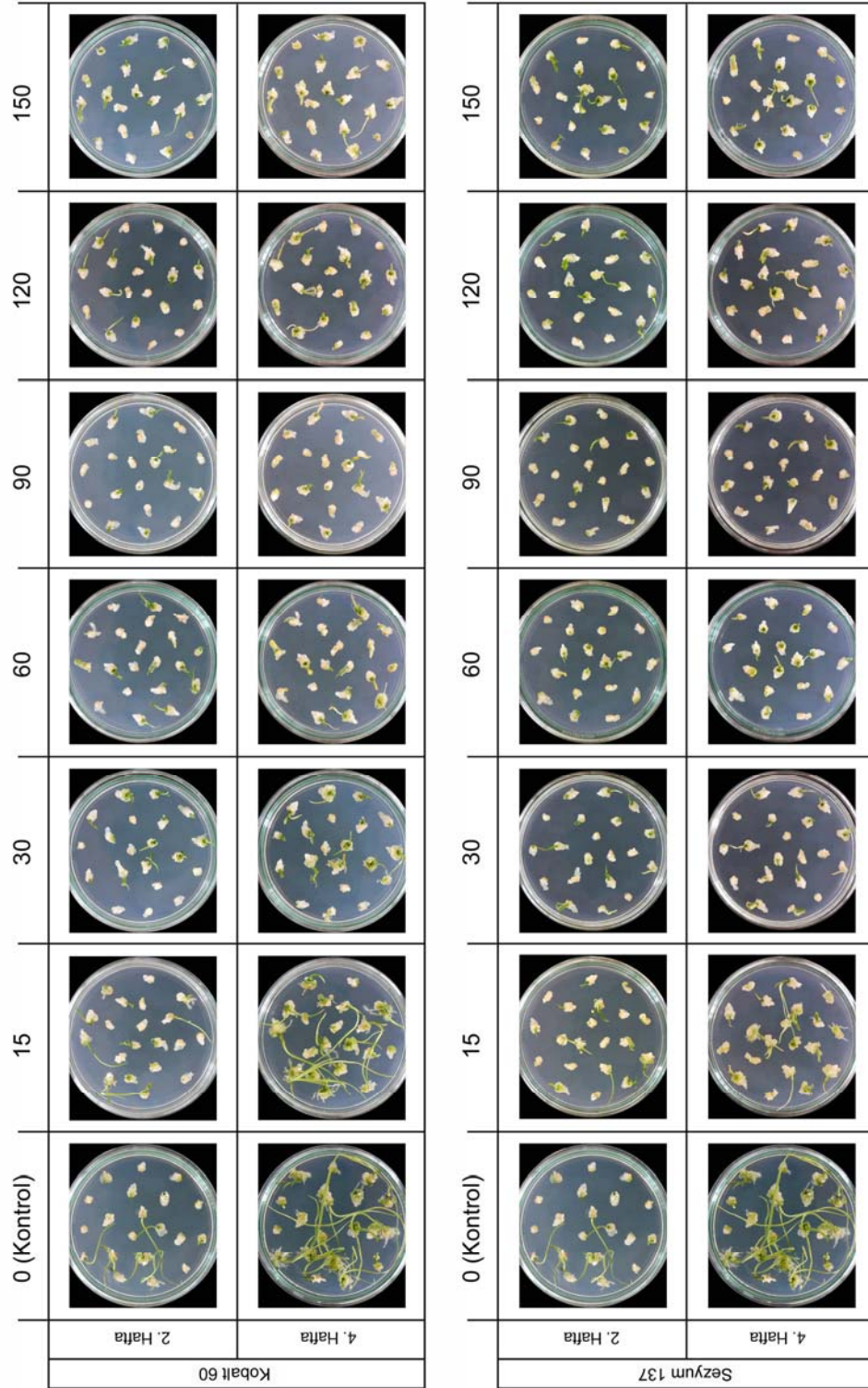
Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Gamma Dozu (Gy)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)	Kültür Etkinliği ² (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
100	1.229	0	98.3 a	98.3 a	18.0 a	11.0 a	13.9 a	2.4 a
100	1.135	15	96.7 a	96.7 a	15.0 b	8.3 b	11.9 b	1.8 b
100	1.301	30	90.0 b	90.0 b	13.7 b	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.261	60	88.3 bc	88.3 bc	11.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
98.3	1.297	90	78.3 bcd	78.3 bcd	10.3 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
98.3	1.244	120	76.7 cd	76.7 cd	9.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.302	150	73.3 d	73.3 d	8.3 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

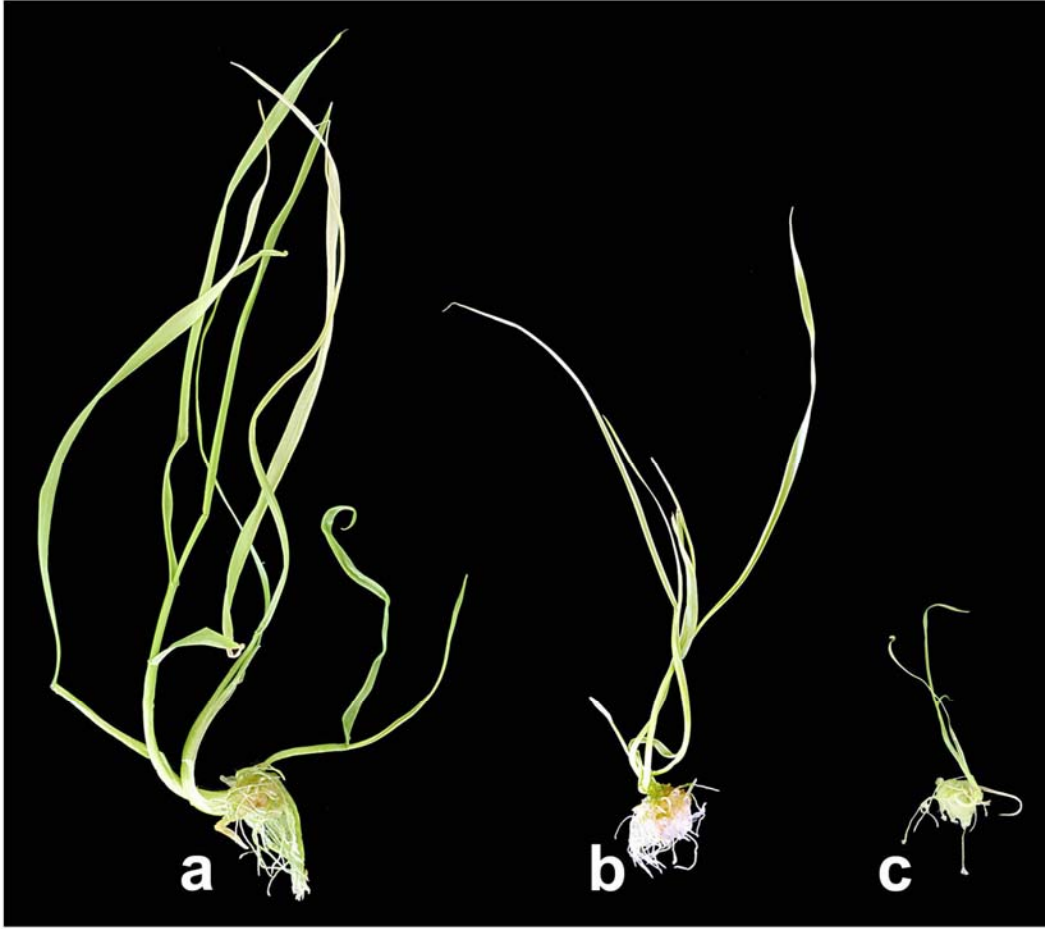
Çizelge 4.2. Kallusa uygulanan Sezyum 137 gamma kaynağının Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi

Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Gamma Dozu (Gy)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)	Kültür Etkinliği ² (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
100	1.229	0	98.3 a	98.3 a	18.0 a	11.0 a	13.9 a	2.4 a
100	1.230	15	83.3 b	83.3 b	13.3 b	5.0 b	2.5 b	1.6 b
100	1.247	30	81.7 bc	81.7 bc	11.7 bc	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.203	60	76.7 bcd	76.7 bcd	10.7 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.207	90	73.3 cd	73.3 cd	6.7 d	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.247	120	68.3 de	68.3 de	6.0 d	0.0 c	0.0 c	0.0 c
98.3	1.190	150	61.7 e	61.7 e	5.3 d	0.0 c	0.0 c	0.0 c

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.1. Kallusa uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi



Şekil 4.2. Kallusa uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde bitkicik gelişimi üzerine etkisi. (a) 0 Gy (kontrol) gamma dozu, (b) 15 Gy Kobalt 60 gamma dozu, (c) 15 Gy Sezyum 137 gamma dozu

4.1.3. Kallusa uygulanan Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

İncelenen tüm karakterlerde en yüksek değerler 0 Gy'lik kontrol uygulamalarından elde edilmiştir (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4). Gamma kaynağı olarak Kobalt 60'ın kullanıldığı uygulamalarda en yüksek değerler 15 Gy'lik dozdan alınmıştır. Artan gamma dozuna paralel olarak tüm karakterlerde (kallusun rejenerasyon kapasitesi, kültür etkinliği, rejenerasyon olan sürgün sayısı, gelişen bitkicik sayısı, sürgün uzunluğu ve kök uzunluğu) belirgin düşüşler tespit edilmiştir (Şekil 4.3). 15 Gy'lik gamma dozu dışında diğer tüm dozlarda kallustan sürgün rejenerasyonu sağlansa bile, bu sürgünler köklendirilmek için kavanozlara aktarıldığında, sürgünlerde herhangi bir gelişme olmamış ve sonuçta köklenmiş bitkicikler gelişmemiştir.

0 Gy'lik kontrol uygulamasında petri başına ortalama 15.3 adet bitkicik gelişirken, 15 Gy'lik gamma dozunda bu rakam 11.3'e gerilemiştir. Sürgün uzunlukları kontrolde 12.6 cm'den 15 Gy'lik gamma dozunda 10.9 cm'ye düşmüştür. Kök uzunluğu ise, kontrol uygulamasında 2.8 cm iken, 15 Gy'lik gamma dozunda 2.1 cm olmuştur (Çizelge 4.3, Şekil 4.4).

4.1.4. Kallusa uygulanan Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Gamma kaynağı olarak Sezyum 137 kullanıldığında, en yüksek değerler yine 15 Gy'lik dozdan alınmıştır. Gamma dozu arttıkça tüm karakterlerde önemli düşüşler gözlenmiştir (Şekil 4.3). 15 Gy'lik gamma dozu dışında diğer gamma dozlarından köklenmiş bitkicik elde edilememiştir. Gelişen bitkicik sayısı kontrol uygulamasında (0 Gy) petri başına ortalama 15.3 adet iken, 15 Gy'lik dozda 3.7 adet olmuştur. Sürgün uzunlukları kontrolde 12.6 cm'den 15 Gy'lik gamma dozunda 2.1 cm'ye düşmüştür. Kök uzunluğu ise kontrol uygulamasında 2.8 cm'den 15 Gy'lik gamma dozunda 1.7 cm'ye gerilemiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

Çizelge 4.3. Kallusa uygulanan Kobalt 60 gamma kaynağının Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi

Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Gamma Dozu (Gy)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)	Kültür Etkinliği ² (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
100	1.383	0	98.3 a	98.3 a	18.0 a	15.3 a	12.6 a	2.8 a
100	1.498	15	90.0 b	90.0 b	13.7 b	11.3 b	10.9 b	2.1 b
98.3	1.497	30	85.0 bc	85.0 bc	12.0 b	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.474	60	78.3 cd	78.3 cd	10.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.534	90	75.0 cd	75.0 cd	9.7 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.461	120	71.7 d	71.7 d	9.7 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.439	150	65.0 d	65.0 d	8.3 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.4. Kallusa uygulanan Sezyum 137 gamma kaynağının Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi

Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Gamma Dozu (Gy)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)	Kültür Etkinliği ² (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
100	1.383	0	98.3 a	98.3 a	18.0 a	15.3 a	12.6 a	2.8 a
100	1.415	15	75.0 b	75.0 b	12.0 b	3.7 b	2.1 b	1.7 b
96.7	1.279	30	71.7 b	71.7 b	11.3 b	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.451	60	66.7 b	66.7 b	10.0 b	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.457	90	61.7 bc	61.7 bc	7.7 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.469	120	61.7 bc	61.7 bc	6.7 cd	0.0 c	0.0 c	0.0 c
100	1.384	150	51.7 c	51.7 c	5.0 d	0.0 c	0.0 c	0.0 c

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.4. Kallusa uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde bitkicik gelişimi üzerine etkisi. (a) 0 Gy (kontrol) gamma dozu, (b) 15 Gy Kobalt 60 gamma dozu, (c) 15 Gy Sezyum 137 gamma dozu

4.1.5. Buğdayda kallustan sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma kaynaklarının karşılaştırılması

Sonuçlar incelendiğinde, gamma kaynağı olarak kullanılan Sezyum 137'nin her iki buğday çeşidinde de incelenen karakterler üzerindeki etkisinin Kobalt 60'dan daha şiddetli olduğu görülmektedir.

Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde 15 Gy'lik gamma dozunda kaynak olarak Kobalt 60 yerine Sezyum 137 kullanıldığında, rejenerasyon olan sürgün sayısı 15.0'dan 13.3'e, gelişen bitkicik sayısı 8.3'den 5.0'a, sürgün uzunluğu 11.9 cm'den 2.5 cm'ye ve kök uzunluğu da 1.8 cm'den 1.6 cm'ye düşmüştür (Çizelge 4.5).

Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde ise 15 Gy'lik gamma dozunda kaynak olarak Kobalt 60 yerine Sezyum 137 kullanıldığında, rejenerasyon olan sürgün sayısı 13.7'den 12.0'a, gelişen bitkicik sayısı 11.3'den 3.7'ye, sürgün uzunluğu 10.9 cm'den 2.1 cm'ye ve kök uzunluğu da 2.1 cm'den 1.7 cm'ye gerilemiştir (Çizelge 4.5).

Buna göre, gamma radyasyonunun buğday olgun embriyolarından kallus kültürü aracılığıyla bitki rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından en iyi sonuçlar 15 Gy'lik gamma dozu ve Kobalt 60 kaynağının kullanılmasıyla sağlanmıştır. Her ne kadar bu dozda elde edilen sonuçlar incelenen tüm karakterlerde kontrolün (0 Gy) gerisinde kalsa da, gamma radyasyonunun hücre ve dokular üzerinde oluşturduğu etki düşünüldüğünde, partikül bombardımanı tekniği ile gen aktarımında kontrole göre daha yüksek oranda gen aktarılmış hücre ve transgenik sürgün elde edilebilme şansı olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.5. Buğdayda kallustan sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından kallusa uygulanan 15 Gy dozda Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma kaynaklarının karşılaştırılması

Çeşitler	Kallus Oluşumu (%)		Kallus Ağırlığı (g)		Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)		Kültür Etkinliği ² (%)		Rejenere Olan Sürgün Sayısı		Gelişen Bitkicik Sayısı		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)	
	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137
Bezostaja-1	100	100	1.135	1.230	96.7	83.3	96.7	83.3	15.0	13.3	8.3	5.0	11.9	2.5	1.8	1.6
t değeri	ns		ns		2.854*		2.854*		ns		5.000**		18.692**		3.500*	
Çakmak 79	100	100	1.498	1.415	90.0	75.0	90.0	75.0	13.7	12.0	11.3	3.7	10.9	2.1	2.1	1.7
t değeri	ns		ns		3.453*		3.453*		ns		16.263**		16.965**		3.250*	

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100

*,** 0.05 ve 0.01 düzeyinde önemli

ns önemsiz

4.2. Embriyoya Uygulanan Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Buğdayda Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi

İncelenen tüm karakterlerde en yüksek değerler her iki çeşit ve gamma kaynağında da 0 Gy'lik kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

4.2.1. Embriyoya uygulanan Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Gamma kaynağı olarak Kobalt 60'ın kullanıldığı uygulamalarda en yüksek değerler 15 Gy'lik dozdan alınmıştır. Artan gamma dozunda incelenen tüm karakterlerde (kallusun rejenerasyon kapasitesi, kültür etkinliği, rejenere olan sürgün sayısı, gelişen bitkicik sayısı, sürgün uzunluğu ve kök uzunluğu) önemli düşüşler gözlenmiştir (Şekil 4.5). 15 Gy'lik gamma dozu dışında diğer tüm dozlarda kallustan sürgün rejenerasyonu sağlansa bile, bu sürgünler köklendirilmek için kavanozlara aktarıldığında, sürgünlerde herhangi bir gelişme olmamış ve sonuçta köklenmiş bitkicikler gelişmemiştir. Kontrol uygulamasında (0 Gy) petri başına ortalama 11 adet bitkicik gelişirken, 15 Gy'lik gamma dozunda bu rakam 3.0'a gerilemiştir. Sürgün uzunlukları kontrolde 13.9 cm'den 15 Gy'lik gamma dozunda 10.4 cm'ye düşmüştür. Kök uzunluğu ise, kontrol uygulamasında 2.4 cm iken, 15 Gy'lik gamma dozunda 1.8 cm olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.6).

4.2.2. Embriyoya uygulanan Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Sezyum 137 gamma kaynağı kullanıldığında, en yüksek değerler yine 15 Gy'lik dozdan alınmış, gamma dozu arttıkça tüm karakterlerde önemli düşüşler gözlenmiştir (Şekil 4.5). 15 Gy'lik gamma dozu dışında diğer gamma dozlarından köklenmiş bitkicik elde edilememiştir. Gelişen bitkicik sayısı kontrolde (0 Gy) petri başına ortalama 11.0 adet iken, 15 Gy'lik dozda 2.0 adet olmuştur. Sürgün uzunlukları kontrolde 13.9 cm'den 15 Gy'lik gamma dozunda 1.7 cm'e düşmüştür. Kök uzunluğu ise kontrol uygulamasında 2.4 cm'den 15 Gy'lik gamma dozunda 0.8 cm'ye gerilemiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.6).

Çizelge 4.6. Embriyoya uygulanan Kobalt 60 gamma kaynağının Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi

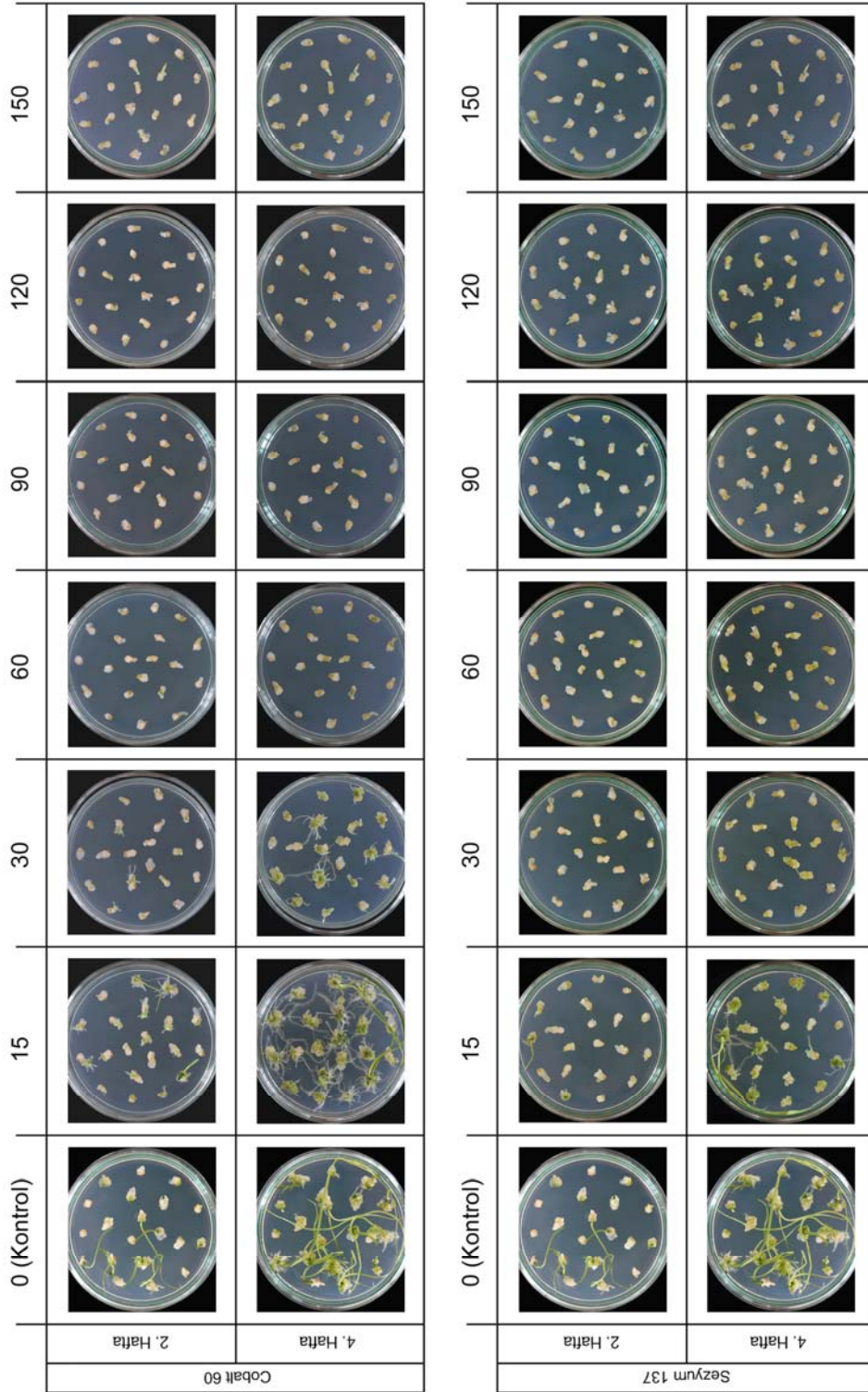
Gamma Dozu (Gy)	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)	Kültür Etkinliği ² (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
0	100	1.229 a	98.3 a	98.3 a	18.0 a	11.0 a	13.9 a	2.4 a
15	100	1.211 ab	95.0 ab	95.0 ab	3.0 b	3.0 b	10.4 b	1.8 b
30	100	1.178 ab	93.3 bc	93.3 bc	0.3 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
60	100	1.057 bc	90.0 cd	90.0 cd	0.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
90	100	1.041 bc	85.0 cd	85.0 cd	0.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
120	100	0.921 c	80.0 d	80.0 d	0.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
150	100	0.865 c	78.3 d	78.3 d	0.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.7. Embriyoya uygulanan Sezyum 137 gamma kaynağının Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi

Gamma Dozu (Gy)	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)	Kültür Etkinliği ² (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
0	100	1.229 a	98.3 a	98.3 a	18.0 a	11.0 a	13.9 a	2.4 a
15	100	1.126 b	80.0 b	80.0 b	3.0 b	2.0 b	1.7 b	0.8 c
30	100	1.044 bc	76.7 bc	76.7 bc	0.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
60	100	1.031 bc	71.7 bc	71.7 bc	0.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
90	100	1.014 c	70.0 c	70.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
120	100	0.992 c	67.7 c	67.7 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
150	100	0.950 c	60.0 c	60.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.5. Embriyoya uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi



Şekil 4.6. Embriyoya uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde bitkicik gelişimi üzerine etkisi. (a) 0 Gy (kontrol) gamma dozu, (b) 15 Gy Kobalt 60 gamma dozu, (c) 15 Gy Sezyum 137 gamma dozu

4.2.3. Embriyoya uygulanan Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Kobalt 60 gamma kaynağı kullanıldığında, 15 Gy'lik dozda rejenere olan sürgün sayısı 3.0 olmuştur. Artan gamma dozlarında kallusun rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkinliği değerlerinde belirgin düşüşler tespit edilmiştir. Tüm gamma dozlarında kallustan sürgün rejenerasyonu sağlansa bile, bu sürgünler köklendirilmek için kavanozlara aktarıldığında, sürgünlerde herhangi bir gelişme olmamış, köklenmiş bitkicikler gelişmemiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.7).

4.2.4. Embriyoya uygulanan Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Gamma kaynağı olarak Sezyum 137 kullanıldığında, yine 15 Gy'lik dozda yalnızca sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Diğer gamma dozları gibi 15 Gy'lik dozda da herhangi bir bitkicik gelişimi elde edilememiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.7).

4.2.5. Buğdayda sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından embriyoya uygulanan Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma kaynaklarının karşılaştırılması

Sonuçlar incelendiğinde, gamma kaynağı olarak kullanılan Sezyum 137'nin her iki buğday çeşidinde de incelenen karakterler üzerindeki etkisinin Kobalt 60'dan daha şiddetli olduğu görülmektedir.

Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde 15 Gy'lik gamma dozunda kaynak olarak Kobalt 60 yerine Sezyum 137 kullanıldığında, gelişen bitkicik sayısı 3.0'dan 2.0'a, sürgün uzunluğu 6.5 cm'den 1.7 cm'ye ve kök uzunluğu da 1.8 cm'den 0.8 cm'ye düşmüştür. Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde ise 15 Gy'lik gamma dozunda kaynak olarak Kobalt 60 yerine Sezyum 137 kullanıldığında, rejenere olan sürgün sayısı 3.0'den 2.0'ye düşmüş (Çizelge 4.10), incelenen diğer karakterlerde (gelişen bitkicik sayısı, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu) her iki gamma kaynağından da herhangi bir sonuç alınamamıştır.

Buna göre, gamma radyasyonunun buğday olgun embriyolarına uygulanması sonucu Bezostaja-1 çeşidinde en iyi sonuçlar 15 Gy'lik gamma dozu ve Kobalt 60 kaynağının kullanılmasıyla sağlanmıştır. Çakmak 79 çeşidinde ise, her iki gamma kaynağında da kallustan sürgün rejenerasyonu sağlanmasına karşın, bu sürgünlerden bitkicikler elde edilememiştir.

Çizelge 4.8. Embriyoya uygulanan Kobalt 60 gamma kaynağının Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi

Gamma Dozu (Gy)	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)	Kültür Etkinliği ² (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
0	100	1.383 a	98.3 a	98.3 a	18.0 a	15.3 a	12.6 a	2.8 a
15	100	1.178 b	82.0 b	82.0 b	3.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b
30	100	1.060 ab	66.7 c	66.7 c	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b
60	100	1.065 ab	50.3 d	50.3 d	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b
90	100	1.056 ab	38.3 de	38.3 de	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b
120	100	1.018 ab	29.0 ef	29.0 ef	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b
150	100	0.989 b	22.3 f	22.3 f	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.9. Embriyoya uygulanan Sezyum 137 gamma kaynağının Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde embriyo kültürü üzerine etkisi

Gamma Dozu (Gy)	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)	Kültür Etkinliği ² (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
0	100	1.383 a	98.3 a	98.3 a	18.0 a	15.3 a	12.6 a	2.8 a
15	100	1.265 b	83.0 b	83.0 b	2.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b
30	100	1.185 bc	60.0 c	60.0 c	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b
60	100	1.142 cd	45.0 d	45.0 d	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b
90	100	1.136 cd	33.3 de	33.3 de	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b
120	100	1.036 de	25.0 ef	25.0 ef	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b
150	100	0.980 e	17.0 f	17.0 f	0.0 c	0.0 b	0.0 b	0.0 b

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

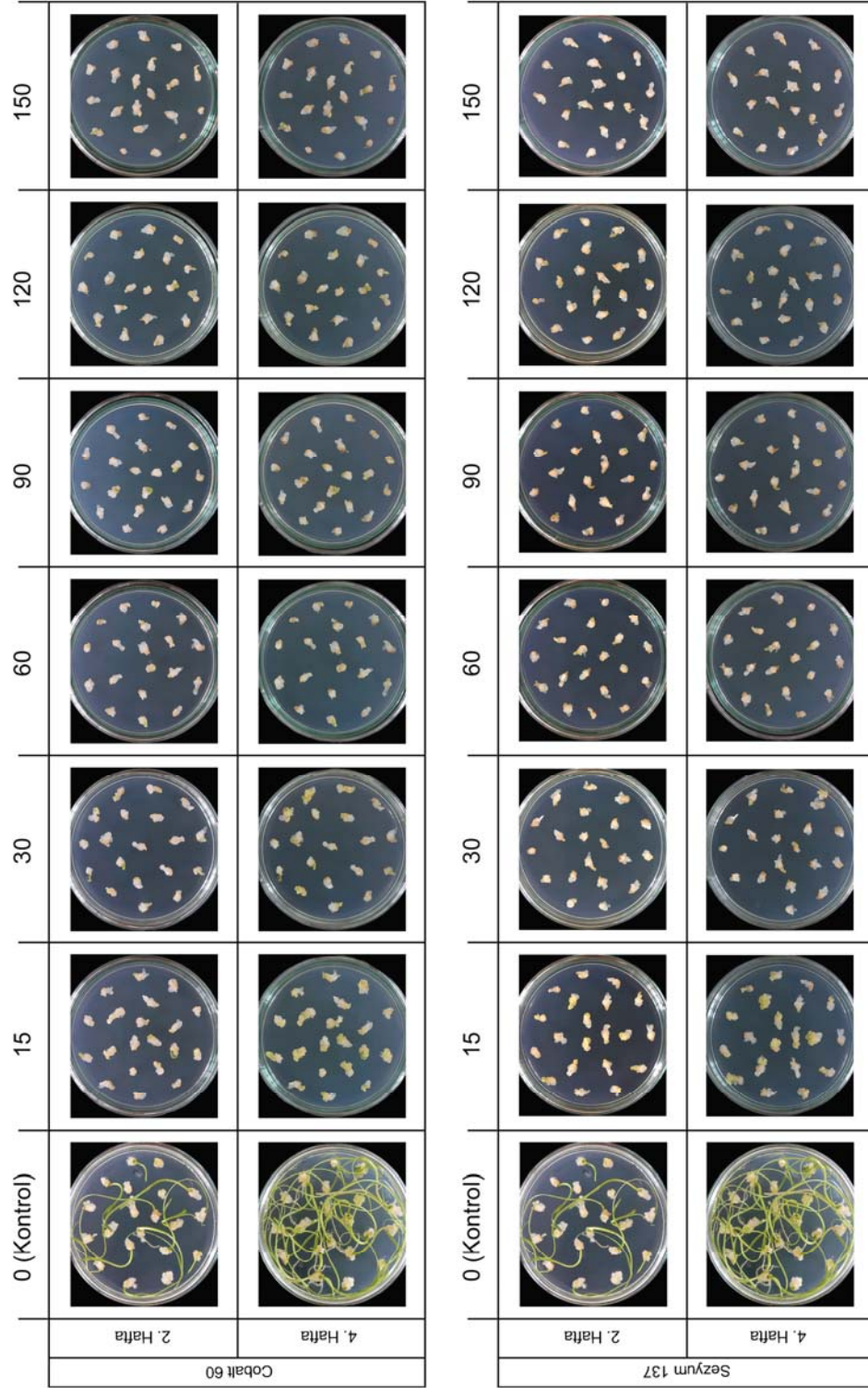
Çizelge 4.10. Buğdayda sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından embriyoya uygulanan 15 Gy dozda Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma kaynaklarının karşılaştırılması

Çeşitler	Kallus Oluşumu (%)		Kallus Ağırlığı (g)		Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)		Kültür Etkinliği ² (%)		Rejenere Olan Sürgün Sayısı		Gelişen Bitkicik Sayısı		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)	
	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137	Kobalt 60	Sezyum 137
Bezostaja-1	100	100	1.127	1.126	87.3	80.0	87.3	80.0	3.0	3.0	3.0	2.0	6.5	1.7	1.8	0.8
t değeri	ns		ns		ns		ns		ns		ns		8574**		4180*	
Çakmak 79	100	100	1.178	1.147	82.0	75.7	82.0	75.7	3.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
t değeri	ns		2743*		ns		ns		ns		ns		ns		ns	

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100

*,** 0.05 ve 0.01 düzeyinde önemli

ns önemsiz



Şekil 4.7. Embriyoya uygulanan farklı kaynaklı gamma radyasyonunun Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

4.2.6. Buğdayda sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy gamma dozunda embriyo ve kallusun karşılaştırılması

Yapılan çalışmalarda her iki çeşitte de radyasyon uygulamaları içerisinde en iyi sonuçlar Kobalt 60 gamma kaynağı ve 15 Gy'lik gamma dozundan elde edilmiştir. Çizelge 4.11 incelendiğinde, Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy gamma dozu uygulamasında her iki çeşitte de en yüksek değerleri veren eksplantın kallus olduğu görülmektedir. Özellikle rejenere olan sürgün sayısı, gelişen bitkicik sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından kallustan alınan sonuçlar embriyoya oranla çok yüksek çıkmış, aralarındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur. Çakmak 79 çeşidinde gelişen bitkicik sayısı, sürgün uzunluğu ve kök uzunluğu karakterlerinde embriyodan herhangi bir sonuç alınamamış, kallusta ise başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak, embriyoya uygulanan gamma radyasyonunun kültürü olumsuz etkilediği, tüm karakterlerde alınan sonuçların kallusa uygulanan gamma radyasyonundan elde edilen sonuçların altında kaldığı görülmektedir.

4.3. Kültür Süresinin Uzatılmasının Gamma Radyasyonu Uygulanmış Kalluslardan Sürgün Rejenerasyonu ve Köklenmiş Bitkicik Gelişimi Üzerine Etkisi

Daha önceki çalışmalarla buğday embriyo kültüründe en uygun gamma kaynağının Kobalt 60 (Co-60), gamma dozunun 15 Gy ve eksplantın da embriyolardan gelişen kalluslar olduğu belirlenmişti. Hem kontrol (0 Gy) ve hem de 15 Gy'lik dozlarda köklendirilmiş bitkicikler elde edilebilmiş olmasına karşın, daha yüksek dozlarda kalluslar üzerinde sürgün gelişimi gözlenirse de bu sürgünlerden köklenmiş bitkicikler elde edilememiştir.

Bu aşamada kallusa uygulanan 15 Gy'den yüksek gamma dozlarında sürgün ve köklendirilmiş bitkicik gelişiminin artırılması için kültür süresi uzatılmıştır. Çalışmada Kobalt 60 kaynaklı 30, 60, 90, 120, 150, 200, 300 ve 500 Gy'lik gamma dozları kallusa uygulanmış ve 4 hafta olan normal kültür süresi 12 haftaya çıkarılmıştır. Ölçümler 4. hafta sonunda alınmış, her hafta sonunda verilerde herhangi bir değişiklik olup olmadığı kontrol edilmiştir. Ancak, araştırmada kullanılan her iki çeşitte de (Bezostaja-1 ve Çakmak 79), kallusa uygulanan gamma dozlarında kültür süresinin uzatılmasının sürgün ve köklenmiş bitkicik gelişimi üzerine herhangi bir olumlu etkisi saptanmamıştır. En yüksek veriler 4. hafta sonunda tespit edilmiş, haftalar ilerledikçe kallusların ve gelişen sürgünler giderek solduğu ve sonuçta kuruyarak öldüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.8).

Çizelge 4.11. Buğdayda sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi bakımından Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy gamma dozunda embriyo ve kallusun karşılaştırılması

Çeşitler	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)		Kültür Etkinliği ² (%)		Rejenere Olan Sürgün Sayısı		Gelişen Bitkicik Sayısı		Sürgün Uzunluğu (cm)		Kök Uzunluğu (cm)	
	Embriyo	Kallus	Embriyo	Kallus	Embriyo	Kallus	Embriyo	Kallus	Embriyo	Kallus	Embriyo	Kallus
Bezostaja-1	87.3	96.7	87.3	96.7	3.0	15.0	3.0	8.3	6.5	11.9	1.8	1.8
t değeri	ns		ns		14.697**		8.000**		8.050**		ns	
Çakmak 79	82.0	90.0	82.0	90.0	3.0	13.7	0.0	11.3	0.0	10.9	0.0	2.1
t değeri	ns		ns		12.095**		34.000**		21.241**		17.750**	

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100

** 0.01 düzeyinde önemli

ns önemsiz

Bezostaja-1 çeşidinde uygulanan tüm radyasyon dozlarında kalluslar üzerinde sürgün gelişimi gözlenirken, Çakmak 79 çeşidinde 300 ve 500 Gy'lik dozlarda kalluslarda herhangi bir sürgün gelişimine rastlanmamıştır. Çeşitler genel olarak incelendiğinde, Çakmak 79 çeşidinin gamma radyasyonuna karşı hassas olduğu ve uygulamalarda Bezostaja-1 çeşidine göre daha olumsuz etkilendiği görülmüştür (Çizelge 4.12, Şekil 4.8). Bezostaja-1 çeşidinde gamma dozu 750 Gy'e çıkarıldığında, kalluslar üzerinde herhangi bir sürgün gelişimi olmamıştır.

4.4. Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Kallustan Gelişen Bitkiciklerin Yapraklarında Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi

Buğday embriyo kültüründe kallusa uygulanan farklı kaynaklı (Kobalt 60 ve Sezyum 137) 15 Gy'lik gamma radyasyonunun hücreler üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, kallustan gelişen bitkiciklerin yapraklarının üst yüzeyinde hücrelerin boyu, stoma sayısı ve tüy sayısı belirlenmiştir.

Her iki çeşitte de incelenen tüm karakterlerde kontrol (0 Gy) uygulaması ile 15 Gy'lik Kobalt 60 uygulaması arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Ancak, Sezyum 137 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozunda sonuçlar önemli derecede değişim göstermiştir. Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde, radyasyonun uygulanmadığı kontrolde birim görüş alanındaki ($303\ 000\ \mu\text{m}^2$) tüy sayısı 38.0, stoma sayısı 15.3 ve hücre boyu da $242.2\ \mu\text{m}$ olarak saptanmıştır. Tüm uygulamalarda yapraktaki tüy sayısında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Sezyum 137 kaynağının kullanıldığı 15 Gy'lik gamma dozunda birim alandaki stoma sayısı 8.7'ye düşmüştür. Aynı uygulamada hücre boyu $318.9\ \mu\text{m}$ 'ye yükselmiştir (Çizelge 4.13, Şekil 4.9).

Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde ise, kontrol uygulamasında aynı alandaki ($303\ 000\ \mu\text{m}^2$) tüy sayısı 44.0, stoma sayısı 10.7 ve hücre boyu $246.9\ \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. 15 Gy'lik gamma dozunda, Sezyum 137 kaynağının kullanıldığı uygulamada birim alandaki tüy sayısı 11.0'e, stoma sayısı 7.7'ye düşmüş ve hücre boyu da $356.4\ \mu\text{m}$ 'ye yükselmiştir (Çizelge 4.13, Şekil 4.10).

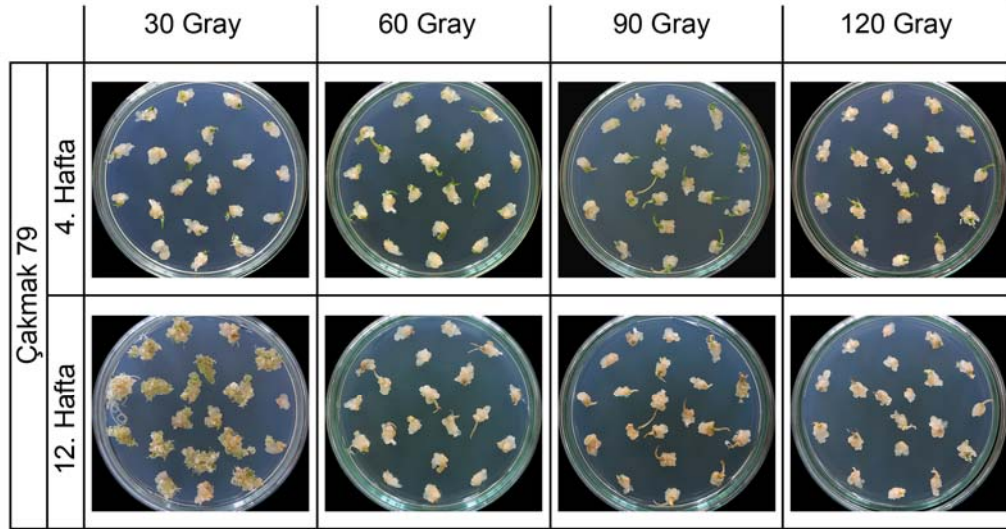
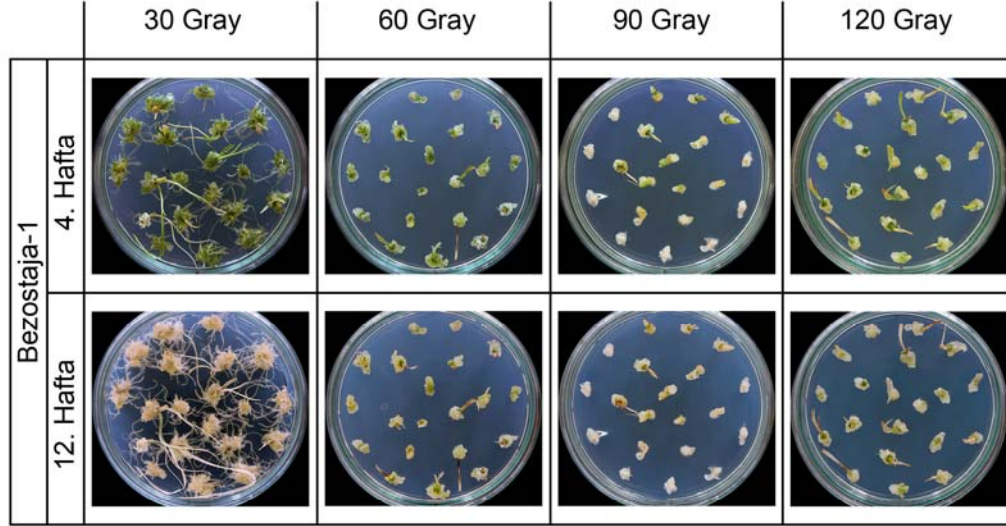
Çizelge 4.12. Kültür süresinin uzatılmasının kallustan sürgün rejenerasyonu ve köklenmiş bitkicik gelişimi üzerine etkisi

Çeşit	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Gamma Dozu (Gy)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)	Kültür Etkinliği ² (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı (adet)	Gelişen Bitkicik Sayısı	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
Bezostaja-1	100	1.039	30	98 a	98 a	11.7 a	0	0	0
	100	1.043	60	98 a	98 a	11.7 a	0	0	0
	100	1.048	90	97 ab	97 ab	11.3 ab	0	0	0
	100	1.066	120	97 ab	97 ab	10.3 bc	0	0	0
	100	1.102	150	95 abc	95 abc	10.3 bc	0	0	0
	100	1.065	200	93 abc	93 abc	10.3 bc	0	0	0
	100	1.090	300	92 bc	92 bc	9.3 cd	0	0	0
	100	1.060	500	88 c	88 c	9.0 d	0	0	0
Çakmak 79	100	1.407	30	90 a	90 a	10.3 a	0	0	0
	100	1.412	60	87 ab	87 ab	10.7 a	0	0	0
	100	1.424	90	83 b	83 b	10.0 a	0	0	0
	100	1.412	120	83 b	83 b	9.7 a	0	0	0
	100	1.402	150	83 b	83 b	9.3 a	0	0	0
	100	4.220	200	65 c	65 c	5.3 b	0	0	0
	100	1.404	300	0 d	0 d	0.0 c	0	0	0
	100	1.401	500	0 d	0 d	0.0 c	0	0	0

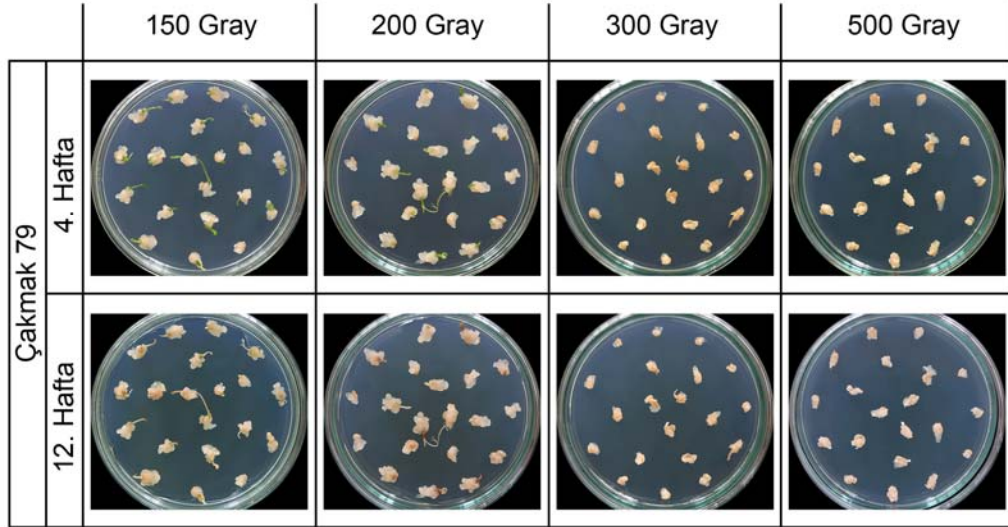
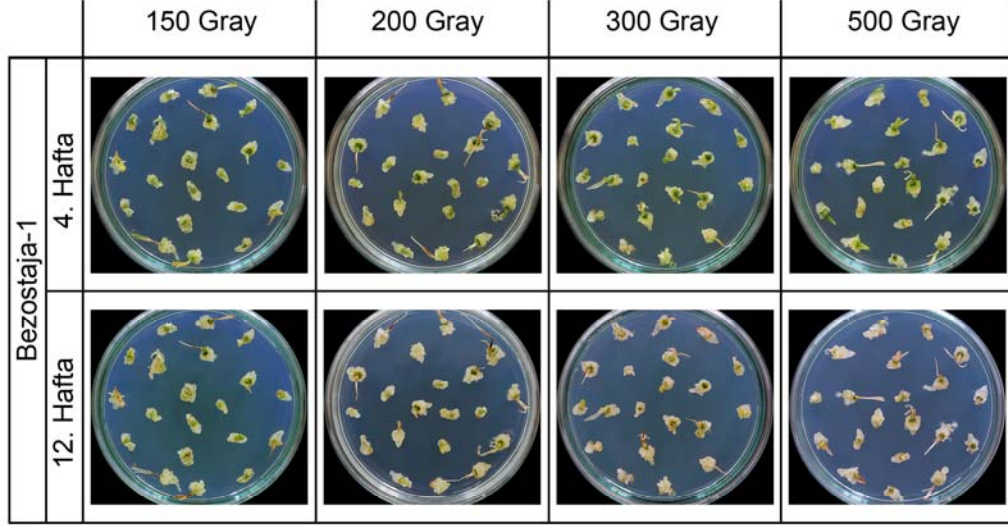
¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100

² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100

Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.8. Kültür süresinin uzatılmasının kallustan sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi



Şekil 4.8. devamı

Aslında hücresel boyutta tespit edilen bu değişimler, buğday embriyo kültüründen elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Bir başka deyişle, gamma kaynağı olarak Sezyum 137 kullanıldığında alınan sonuçlar, kontrol ve Kobalt 60 uygulamalarında elde edilen verilerden önemli derecede sapma göstermektedir. Buğday embriyo kültüründe kallusa uygulanan 15 Gy'lik Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonu sonucu elde edilen verilerin kontrol ve Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonuna göre büyük değişim göstermesinin muhtemel nedeni, Sezyum 137'nin hücreler üzerindeki olumsuz etkisidir.

Çizelge 4.13. Farklı kaynaklı 15 Gy'lik gamma radyasyonu uygulamasının kallustan gelişen bitkiciklerin yaprak hücreleri üzerine etkisi

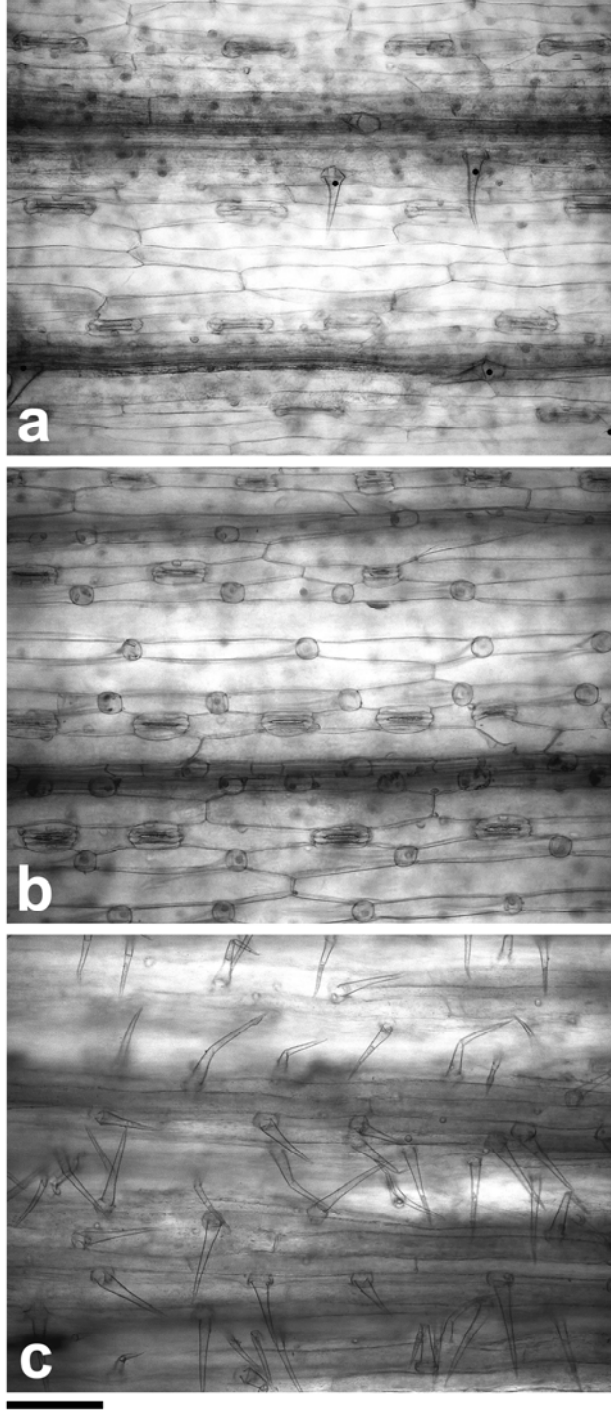
Çeşit	Gamma Kaynağı	Tüy Sayısı	Stoma Sayısı	Hücre Boyu (µm)
Bezostaja-1	Kontrol (0)	38.0 a	15.3 a	242.2 b
	Kobalt 60	36.7 a	17.0 a	215.0 b
	Sezyum 137	37.3 a	8.7 b	318.9 a
Çakmak 79	Kontrol (0)	44.0 a	10.7 a	246.9 b
	Kobalt 60	43.3 a	11.3 a	200.3 b
	Sezyum 137	11.0 b	7.7 b	356.4 a

4.5. Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Kallustan Gelişen Bitkiciklerin Yapraklarında Fotosentetik Aktivite Üzerine Etkisi

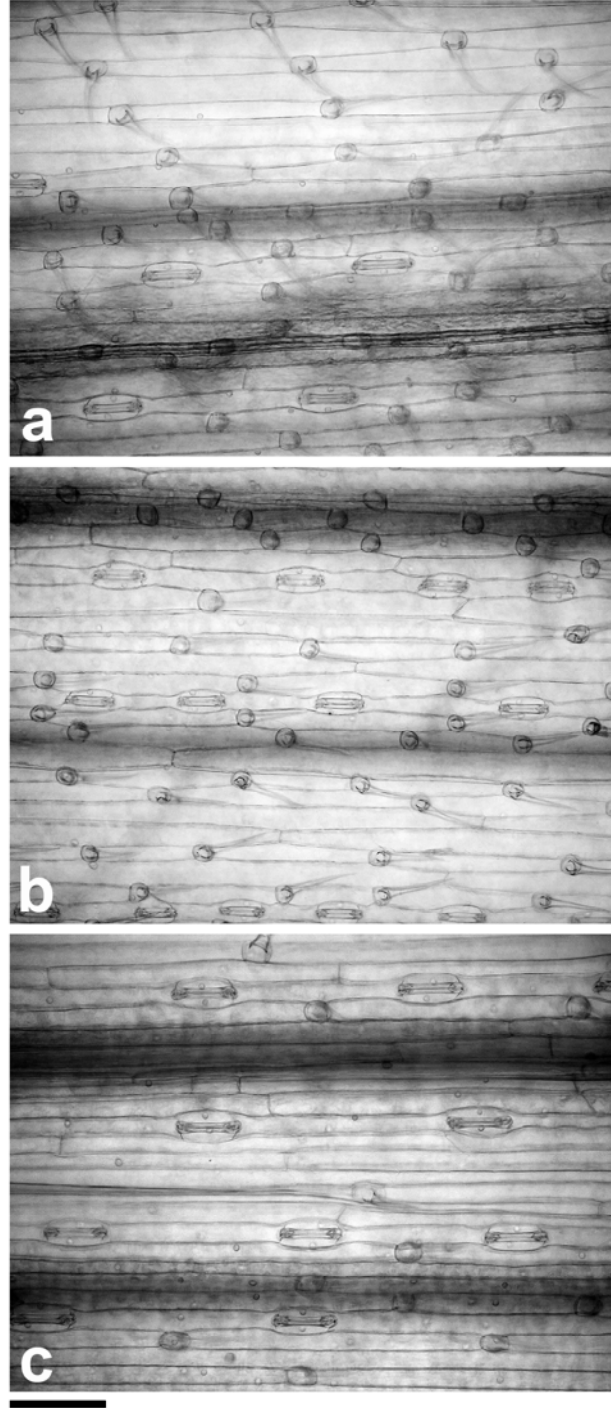
Buğday embriyo kültüründe kallusa uygulanan farklı kaynaklı (Kobalt 60 ve Sezyum 137) 15 Gy'lik gamma radyasyonunun fotosentetik aktivite üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, kallustan gelişen bitkiciklerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri "µg/taze doku" cinsinden ölçülmüştür.

Her iki çeşitte de Kobalt 60 kaynağının kullanıldığı uygulamalardan elde edilen sonuçlar kontrole göre biraz düşük çıkmış, ancak aradaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Bezostaja-1 çeşidinde, radyasyonun uygulanmadığı kontrolde "µg/taze doku" cinsinden 375.8 klorofil a, 123.6 klorofil b ve 268.8 toplam klorofil belirlenmiştir. Sezyum 137 kaynağının kullanıldığı durumda ise, tüm karakterlerde elde edilen sonuçlar önemli düşüşler göstermiştir (Çizelge 4.14).



Şekil 4.9. Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde kallusa uygulanan 15 Gy'lik gamma radyasyonunun gelişen bitkiciklerin yaprak hücreleri üzerine etkisi [a) Kontrol, b) Kobalt 60, c) Sezyum 137, bar= 100 µm]



Şekil 4.10. Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde kallusa uygulanan 15 Gy'lik gamma radyasyonunun gelişen bitkiciklerin yaprak hücreleri üzerine etkisi [a) Kontrol, b) Kobalt 60, c) Sezyum 137, bar= 100 µm]

Çakmak 79 çeşidinde, kontrol uygulamasında 349.8 µg/taze doku klorofil a, 121.3 µg/taze doku klorofil b ve 249.2 µg/taze doku toplam klorofil tespit edilmiştir. Sezyum 137 kaynağının kullanıldığı uygulamada klorofil a 182.8 µg/taze doku'ya, klorofil b 61.8 µg/taze doku'ya ve toplam klorofil ise 128.9 µg/taze doku'ya düşmüştür.

Çizelge 4.14. Farklı kaynaklı 15 Gy'lik gamma radyasyonu uygulamasının kallustan gelişen bitkiciklerin yapraklarında fotosentetik aktivite üzerine etkisi

Çeşit	Gamma Kaynağı	Klorofil a (µg/g taze doku)	Klorofil b (µg/g taze doku)	Toplam Klorofil (µg/g taze doku)
Bezostaja-I	Kontrol (0)	375.8 a	123.6 a	268.8 a
	Kobalt 60	340.2 a	118.3 a	242.9 a
	Sezyum 137	161.9 b	62.9 b	128.0 b
Çakmak 79	Kontrol (0)	349.8 a	121.3 a	249.2 a
	Kobalt 60	330.7 a	99.4 a	222.4 a
	Sezyum 137	182.8 b	61.8 b	128.9 b

Sonuç olarak; kültür süresinin uzatılması (12 haftaya çıkarılması) buğday embriyo kültüründe, kallusa uygulanan Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun yüksek dozlarında sürgün ve köklenmiş bitkicik gelişimi üzerinde olumlu herhangi bir etki yapmamış, en uygun kültür süresi daha önce buğdayla ilgili yapılan benzer çalışmalarda da belirtildiği gibi 4 hafta olarak tespit edilmiştir. Kültür süresinin 4 haftanın üzerine çıkarılması, gelişen sürgünlerin giderek solması ve sonuçta ölmelerine neden olmaktadır. Hücresel düzeyde yapılan incelemeler, Sezyum 137 gamma kaynağının hücrelerin gelişimine ve fotosentetik aktiviteleri üzerine olumsuz etki yaptığını göstermiştir. Bu nedenle, buğday embriyo kültürlerine uygulanan Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonu tüm karakterlerde sonuçları önemli derecede düşürmektedir.

4.6. Partikül Bombardmanı Tekniği ile Gen Aktarımı Üzerine Gamma Radyasyonunun Etkisi

Daha önce yapılan çalışmalarla buğday embriyo kültüründe en uygun gamma kaynağının Kobalt 60 (Co-60), gamma dozunun 15 Gy olduğu belirlenmişti. Hem kontrol (0 Gy) ve hem de 15 Gy'lik gamma dozlarında köklendirilmiş bitkicikler elde edilebilmiş olmasına karşın, daha yüksek dozlarda sürgün gelişimi gözlenirse de bu sürgünlerden köklenmiş

bitkicikler elde edilememiştir. Bu aşamada Bezostaja-1 ekmeklik buğday ve Çakmak 79 makarnalık buğday çeşitlerinde embriyo ve kallusa uygulanan 0 Gy (kontrol) ve 15 Gy'lik gamma dozunun partikül bombardımanı tekniği ile gen geçişine etkisi araştırılmıştır.

Partikül bombardımanı ile yapılan gen aktarımından sonra embriyo ve kallus eksplantları inkübatörde 2 gün boyunca gelişmelerine devam etmiştir. İki günün sonunda eksplantlara "Histokimyasal GUS Analizi" uygulanmış ve 37°C'de 24 saat tutularak reaksiyonun tamamlanması sağlanmıştır. Böylece dokular üzerinde gen aktarımının gerçekleştiğini gösterir mavi nokta ve bölgeler gözle seçilebilir hale gelmiş (Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13, Şekil 4.14), mavi noktalar sayılarak gen geçiş frekansı belirlenmiştir (Çizelge 4.15, Çizelge 4.16).

Sıfır ve 15 Gy'lik gamma dozlarının embriyoya gen geçişine etkisinin t testi ile karşılaştırıldığı Çizelge 5.15 incelendiğinde, en yüksek sonuçların 15 Gy'lik gamma dozundan elde edildiği görülmektedir. Uygulanan gamma dozları arasındaki fark, Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde gen aktarılmış embriyo sayısı hariç, tüm karakterlerde istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Embriyo başına mavi nokta sayısı Bezostaja-1 çeşidinde 15 Gy'lik gamma dozunda 9.0 adet iken, kontrolde (0 Gy gamma) bu sayı 3.8 adete düşmüştür. Çakmak 79 çeşidinde ise 15 Gy'lik gamma dozunda 9.2 olan embriyo başına mavi nokta sayısı, 0 Gy gamma dozunda 5.2'ye gerilemiştir.

Çizelge 5.16 incelendiğinde, kallusa yapılan gen aktarımında en yüksek sonuçların 15 Gy'lik gamma dozundan elde edildiği görülmektedir. Ancak, uygulanan gamma dozları arasındaki fark, her iki çeşitte de kallus başına mavi nokta sayısında istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Kallus başına mavi nokta sayısı Bezostaja-1 çeşidinde 15 Gy'lik gamma dozunda 10.3 adetten, kontrolde (0 Gy gamma) 4.3 adete düşmüştür. Yine aynı karakter bakımından Çakmak 79 çeşidinden elde edilen sonuçlar; 15 Gy'lik gamma dozunda 15.0, 0 Gy'lik gamma dozunda ise 4.3 olmuştur.

Partikül bombardımanı tekniği ile buğdayın embriyo ve kallus eksplantlarına yapılan gen aktarımında, mavi nokta sayısı bakımından en yüksek sonuçlar 15 Gy'lik gamma dozunun uygulandığı kalluslardan elde edilmiştir. Daha önce yaptığımız ve gamma radyasyonunun sürgün rejenerasyonu üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda da en iyi sonuçlar 15 Gy'lik dozun kallusa uygulanmasından alınmıştır. Araştırmadan elde edilen sonuçların ışığında, partikül bombardımanı tekniği ile buğdaya yapılacak gen aktarım çalışmalarında

kallusların kullanılması ve gen aktarımından önce kallusların 15 Gy'lik gamma radyasyonu ile ışınlanması önerilmektedir.



Şekil 4.11. 1100 psi basınç ve 9 cm yükseklikten Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde embriyoya gen aktarımı. a) 0 Gy (kontrol), b) 15 Gy gamma dozu



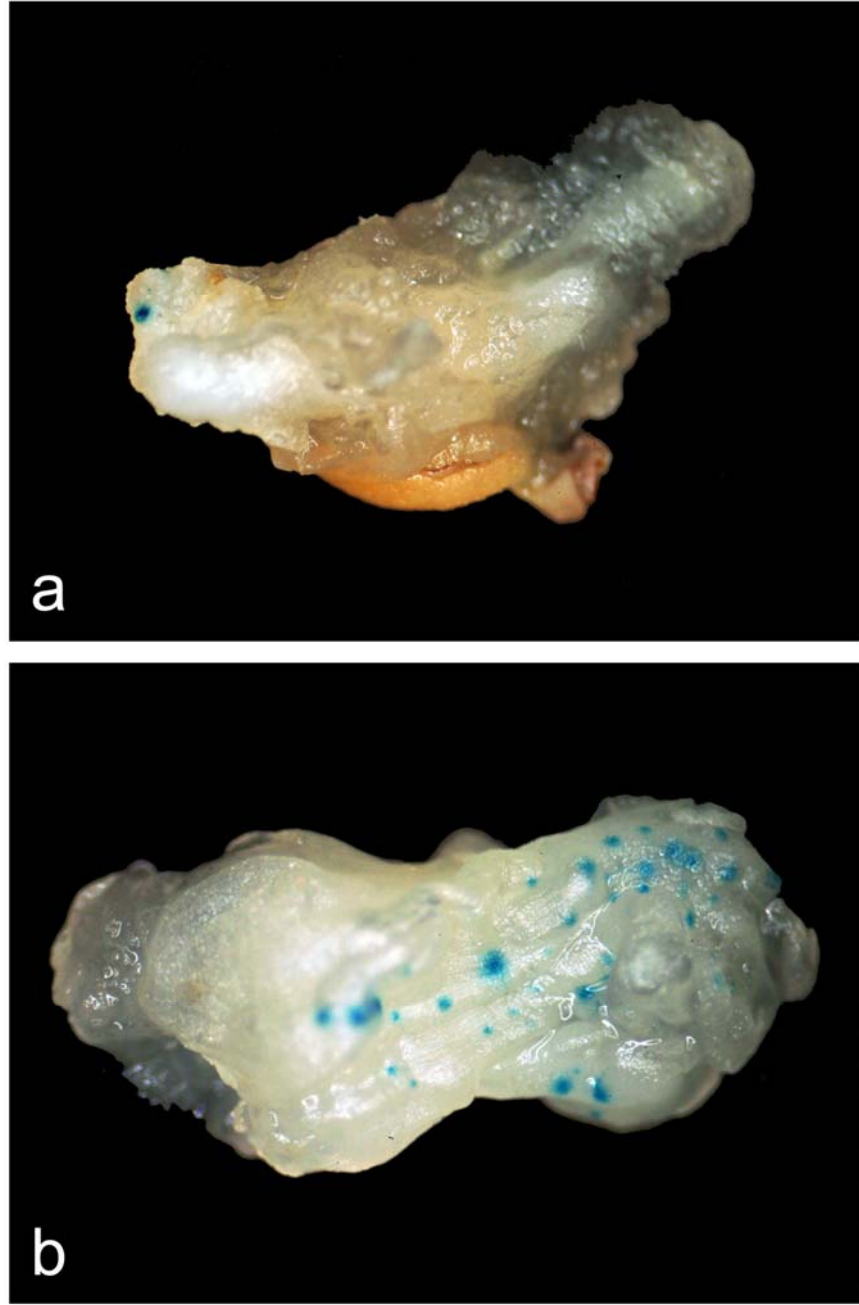
Şekil 4.12. 1100 psi basınç ve 9 cm yükseklikten Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde embriyoya gen aktarımı. a) 0 Gy (kontrol), b) 15 Gy gamma dozu

Çizelge 4.15. Buğdayda partikül bombardımanı yöntemi ile gen geçişine etkisi bakımından embriyoya uygulanan 0 Gy ve 15 Gy gamma dozlarının karşılaştırılması

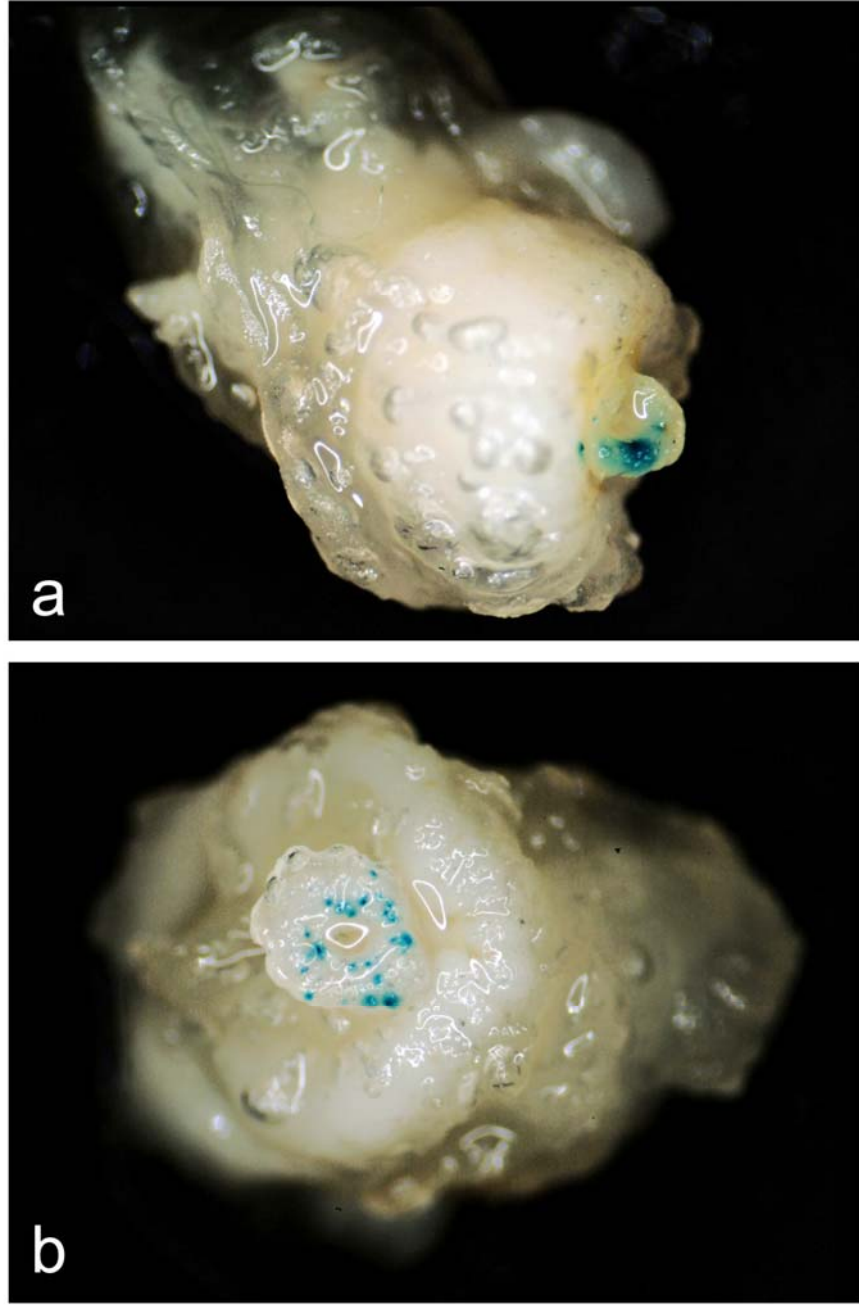
Çeşitler	Gen Aktarılmış Embriyo Sayısı		Gen Aktarım Başarısı (%)		Embriyo Başına Mavi Nokta Sayısı	
	Kontrol (0 Gy)	15 Gy	Kontrol (0 Gy)	15 Gy	Kontrol (0 Gy)	15 Gy
Bezostaja-1	3.7	6.3	7.3	12.7	3.8	9.0
t testi	5.657**		5.478**		10.285**	
Çakmak 79	1.3	2.3	2.7	5.3	5.2	9.2
t testi	ns		2.848*		5.367**	

*, ** 0.05 ve 0.01 düzeyinde önemli

ns önemsiz



Şekil 4.13. 900 psi basınç ve 6 cm yükseklikten Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde kallusa gen aktarımı. a) 0 Gy (kontrol), b) 15 Gy gamma dozu



Şekil 4.14. 900 psi basınç ve 6 cm yükseklikten Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde kallusa gen aktarımı. a) 0 Gy (kontrol), b) 15 Gy gamma dozu

Çizelge 4.16. Buğdayda partikül bombardımanı yöntemi ile gen geçişine etkisi bakımından kallusa uygulanan 0 Gy ve 15 Gy gamma dozlarının karşılaştırılması

Çeşitler	Gen Aktarılmış Kallus Sayısı		Gen Aktarım Başarısı (%)		Kallus Başına Mavi Nokta Sayısı	
	Kontrol (0 Gy)	15 Gy	Kontrol (0 Gy)	15 Gy	Kontrol (0 Gy)	15 Gy
Bezostaja-1	0.7	1.0	4.5	6.7	4.3	10.3
t testi	ns		ns		8.050**	
Çakmak 79	0.7	1.0	4.5	6.7	4.3	15.0
t testi	ns		ns		10.119**	

** 0.05 ve 0.01 düzeyinde önemli

ns önemsiz

5. TARTIŞMA

5.1. Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Olgun Buğday Embriolarından Kallus Kültürü Aracılığıyla Bitki Rejenerasyonu Üzerine Etkisi

Araştırmada kullanılan Bezostaja-1 ekmeklik ve Çakmak 79 makarnalık buğday çeşitlerinin her ikisinde de incelenen tüm karakterlerde en yüksek sonuçlar kontrol (0 Gy gamma) uygulamasından alınmış, bunu 15 Gy'lik gamma dozu uygulaması izlemiştir. Artan gamma dozlarında elde edilen sonuçlarda önemli düşüşler gözlenmiştir. 15 Gy'in üzerindeki gamma dozlarında sürgün rejenerasyonu görülmesine rağmen, herhangi bir bitkicik gelişimi olmamıştır. Bu durumun nedeni, Görpe ve Cantez (1992)'in belirttiği gibi, yüksek radyasyon dozlarında hücre büyümesinin baskılanması ve Lage vd. (2002)'nin bildirdiği gibi yüksek radyasyonla ışınlanan hücrelerin büyümeyi uyarıcı maddelere olan duyarlılığındaki azalma olarak açıklanabilir.

Çizelge 5.1 incelendiğinde, her iki çeşitte de radyasyon uygulamaları arasında en yüksek sonuçların Kobalt 60 gamma kaynağının kullanıldığı uygulamalardan elde edildiği görülmektedir. Sezyum 137 kaynağı kullanıldığında, incelenen tüm karakterlerden elde edilen sonuçlarda önemli düşüşler gözlenmiştir.

15 Gy'lik gamma radyasyonunun uygulandığı kallus ve embriyo eksplantları karşılaştırıldığında, tüm karakterlerde en yüksek sonuçların kallustan alındığı belirlenmiştir. Bu durum Yıldırım (1985)'in vurguladığı gibi, farklı dokuların radyasyona farklı derecede duyarlılık göstermesinden kaynaklanmaktadır. Eksplantlar arasındaki fark özellikle rejenere olan sürgün sayısı ve gelişen bitkicik sayılarında açıkça ortaya çıkmaktadır. Bezostaja-1 çeşidinde Kobalt 60 kaynağı kullanıldığında, rejenere olan sürgün sayısı kallusta 15.0 iken, embriyoda 3.0 olarak gerçekleşmiştir. Gelişen bitkicik sayısı kallusta 8.3 bulunurken, embriyoda bu sayı 3.0'a gerilemiştir. Aynı çeşitte gamma kaynağı Sezyum 137 olduğunda, kallusta rejenere olan sürgün sayısı 13.3 ve gelişen bitkicik sayısı da 5.0 olarak elde edilirken, embriyoya bakıldığında bu sayıların 3.0 ve 2.0 olarak gerçekleştiği görülmektedir. Çizelge 5.1 incelendiğinde, benzer durumların Çakmak 79 çeşidi için de geçerli olduğu, tüm karakterlerden elde edilen sonuçların kallus eksplantında embriyo eksplantından daha yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 5.1. Bezostaja-1 ve Çakmak 79 çeşitlerinde Kobalt 60 ve Sezyum 137 gamma kaynakları kullanılarak kallus ve embriyoya uygulanan 15 Gy'lik doz ile kontrol (0 Gy) uygulamasından elde edilen sonuçların karşılaştırılması

Çeşit	Gamma Dozu (Gy) – Gamma Kaynağı	Gamma Işınlaması Uygulanan Eksplant	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi ¹ (%)	Kültür Etkinliği ² (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Sürgün Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)
Bezostaja-1	0 Gy (kontrol)	-	98.3	98.3	18.0	11.0	13.9	2.4
	15 Gy – Kobalt 60	Kallus	96.7	96.7	15.0	8.3	11.9	1.8
		Embriyo	95.0	95.0	3.0	3.0	10.4	1.8
	15 Gy – Sezyum 137	Kallus	83.3	83.3	13.3	5.0	2.5	1.6
		Embriyo	80.0	80.0	3.0	2.0	1.7	0.8
	Çakmak 79	0 Gy (kontrol)	-	98.3	98.3	18.0	15.3	12.6
15 Gy – Kobalt 60		Kallus	90.0	90.0	13.7	11.3	10.9	2.1
		Embriyo	82.0	82.0	3.0	0.0	0.0	0.0
15 Gy – Sezyum 137		Kallus	75.0	75.0	12.0	3.7	2.1	1.7
		Embriyo	83.0	83.0	2.0	0.0	0.0	0.0

¹ Rejenere olabilir kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100; ² Rejenere olabilir kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

5.2. Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Kallustan Gelişen Bitkiciklerin Yapraklarında Hücre Gelişimi Üzerine Etkisi

Gamma radyasyonu uygulamasının kallustan gelişen bitkiciklerin yaprak hücreleri üzerine olan etkileri incelendiğinde, Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu ile kontrol uygulaması (0 Gy) arasındaki farkın incelenen tüm karakterlerde ve her iki çeşitte de önemli olmadığı, ancak Sezyum 137 kaynaklı 15 Gy'lik gamma uygulamasından elde edilen sonuçların önemli derecede düşüşler gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum aynı dozda olmasına rağmen, Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonunun dokular üzerinde daha zararlı etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bir başka ifade ile, dokular üzerinde Sezyum 137 gamma kaynağının 15 Gy'lik dozu, Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun yüksek dozlarına eşdeğer bir etki yapmaktadır. Yüksek dozdaki iyonlaştırıcı radyasyonun dokular üzerindeki olumsuz etkisi yapraklarda hücre bölünmesinin durması nedeniyle, hücre boyutlarındaki anormal artışlarla kendini göstermektedir. Araştırmamızdan elde ettiğimiz bu bulgular Schwartz ve Bay (1956), Foard ve Haber (1961) ve Doonan (2000) tarafından da desteklenmektedir. Birim mikroskop alanında gözlenen tüy ve stoma sayılarındaki düşüşlerin hücre boyutlarındaki aşırı artışlardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

5.3. Farklı Kaynaklı Gamma Radyasyonunun Kallustan Gelişen Bitkiciklerin Yapraklarında Fotosentetik Aktivite Üzerine Etkisi

Kallustan gelişen bitkiciklerin yapraklarında fotosentetik aktivite üzerine gamma radyasyonunun etkisi incelendiğinde, Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu uygulamasından alınan sonuçların incelenen tüm karakterlerde ve yine iki çeşitte de kontrolden daha düşük olduğu, ancak bu iki uygulama arasındaki farkın istatistiki olarak önemsiz bulunduğu görülmektedir. Sezyum 137 kaynaklı 15 Gy'lik gamma uygulaması fotosentetik aktiviteyi olumsuz etkilemiş ve elde edilen sonuçlar önemli düşüşler göstermiştir. Bu durum Kovacs ve Keresztes (2002)'in belirttiği gibi, iyonlaştırıcı radyasyonun klorofil sentezini engellemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.4. Partikül Bombardımanı Tekniği ile Gen Aktarımı Üzerine Gamma Radyasyonunun Etkisi

Yapılan gen aktarım çalışmalarında, incelenen bütün karakterlerde kullanılan her iki çeşitte (Bezostaja-1, akmak 79) ve eksplantta (embriyo, kallus) Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu ile yapılan ışınlamalarda, kontrol (0 Gy) uygulamasına göre daha yüksek sonuçlar alınmıştır. Çizelge 5.2 incelendiğinde, petri başına elde edilen mavi nokta sayısı bakımından sonuçların 15 Gy'lik gamma dozunda daha yüksek olduğu görölmektedir.

Bezostaja-1 çeşitinde, gen aktarılmış eksplant sayısı kallus eksplantının 15 Gy'lik dozunda 1.0, 0 Gy dozunda ise 0.7 olarak gerçekleşmiş, bu durumda petride gelişen mavi nokta sayısı 15 Gy'lik dozda 10.30 ve 0 Gy'lik dozda 3.01 olmuştur. Aynı şekilde, embriyo eksplantında gen aktarılmış eksplant sayısı 15 Gy'lik dozda 6.3 ve 0 Gy'lik dozda ise 3.7 olmuş, petride gelişen mavi nokta sayısı 15 Gy dozunda 56.70 iken, 0 Gy'lik dozda 14.06 olarak gerçekleşmiştir.

Benzer durumlar akmak 79 eşidi için de geçerlidir. Kallus eksplantında, gen aktarılmış eksplant sayısı 15 Gy dozunda 1.0 iken, 0 Gy'lik dozda 0.7olmuş; petride gelişen mavi nokta sayısı 15 Gy'lik dozda 15.00, 0 Gy dozunda 3.01 olarak gerçekleşmiştir. Embriyo eksplantında gen aktarılmış eksplant sayısı 15 Gy dozda 2.3, 0 Gy'de 1.3 olmuş, petri başına mavi nokta sayısı 15 Gy'lik dozda 21.16 iken, 0 Gy dozda 6.76'ya gerilemiştir.

Araştırma sonuçlarına göre, buğdaya partikül bombardımanı yöntemi ile yapılan gen aktarım çalışmalarında embriyo eksplantına uygulanan Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu gen aktarım frekansını önemli derecede artırmıştır. Araştırmamız gen geçişlerinin belirlenmesi aşamasında sonlandırılmıştır. Bundan sonra buğdayda yapılacak gen aktarım çalışmalarında aynı yöntemin kullanılarak transgenik bitkilerin elde edilmesi hedeflenmelidir. Gamma radyasyon dozunun dokulara gen geçişine etkisinin ilk defa araştırıldığı bu çalışmanın buğdaya gen aktarımına yeni bir ivme kazandıracadı düşünölmektedir.

Çizelge 5.2. İki buğday çeşidinde kallus ve embriyo eksplantlarına uygulanan 0 ve 15 Gy gamma dozlarının partikül bombardımanı yöntemi ile gen geçişi üzerine etkisi

Çeşit	Gen Aktarımı Yapılan Eksplant	Gamma Dozu (Gy)	Gen Aktarılmış Eksplant Sayısı ¹	Eksplant Başına Mavi Nokta Sayısı ³	Petri Başına Mavi Nokta Sayısı ^(1x3)
Bezostaja-1	Kallus	0	0.7	4.3	3.01
		15	1.0	10.3	10.30
	Embriyo	0	3.7	3.8	14.06
		15	6.3	9.0	56.70
Çakmak 79	Kallus	0	0.7	4.3	3.01
		15	1.0	15.0	15.00
	Embriyo	0	1.3	5.2	6.76
		15	2.3	9.2	21.16

6. SONUÇ

- Olgun buğday embriyolarından kallus kültürü aracılığıyla bitki rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan her iki buğday çeşidinde (Bezostaja-1 ve Çakmak 79) de incelenen tüm karakterlerde (rejenere olan sürgün sayısı, gelişen bitkicik sayısı, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu) en yüksek sonuçlar kontrol (0 Gy) uygulamasından alınmış, bunu 15 Gy'lik gamma dozu uygulaması izlemiştir.
- Gamma radyasyon dozlarındaki artışa paralel olarak elde edilen sonuçlarda önemli düşüşler gözlenmiştir.
- 15 Gy'in üzerindeki gamma dozlarında sürgün rejenerasyonu görülse de herhangi bir bitkicik gelişimi olmamıştır.
- Araştırmada kullanılan her iki çeşitte de en yüksek sonuçların Kobalt 60 gamma kaynağının kullanıldığı uygulamalardan elde edildiği görülmüştür.
- Sezyum 137 kaynağı kullanıldığında, incelenen tüm karakterlerden elde edilen sonuçlarda önemli düşüşler gözlenmiştir.
- 15 Gy'lik gamma radyasyonu uygulamasında kallus ve embriyo eksplantları karşılaştırıldığında, tüm karakterlerde en yüksek sonuçların kallustan alındığı belirlenmiştir.
- Denemeye alınan iki eksplant karşılaştırıldığında rejenere olan sürgün sayısı ve gelişen bitkicik sayıları arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir. Bir başka ifade ile, kallus eksplantından alınan sonuçlar embriyoya göre çok daha yüksektir.
- Farklı kaynaklı gamma radyasyonu uygulamasının kallustan gelişen bitkiciklerin yaprak hücreleri üzerine olan etkileri incelendiğinde, Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu ile kontrol uygulaması (0 Gy) arasındaki farkın incelenen tüm karakterlerde ve her iki çeşitte de önemli olmadığı belirlenmiştir.
- Sezyum 137 kaynaklı 15 Gy'lik gamma uygulamasından elde edilen sonuçların önemli derecede düşüşler gösterdiği tespit edilmiştir. Bir başka ifade ile, dokular üzerinde Sezyum 137 gamma kaynağının 15 Gy'lik dozu, Kobalt 60 kaynaklı gamma radyasyonunun yüksek dozlarına eşdeğer bir etki yapmaktadır.

- Kobalt 60 ve Sezyum 137 kaynaklı gamma radyasyonunun kallustan gelişen bitkiciklerin yapraklarında fotosentetik aktivite üzerine etkileri incelendiğinde, Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu uygulamasından alınan sonuçların incelenen tüm karakterlerde ve yine iki çeşitte de kontrolden daha düşük olduğu, ancak bu iki uygulama arasındaki farkın istatistiki olarak önemsiz bulunduğu görülmüştür.
- Sezyum 137 kaynaklı 15 Gy'lik gamma uygulaması fotosentetik aktiviteyi olumsuz etkilemiş ve elde edilen sonuçlar önemli düşüşler göstermiştir.
- Bitki rejenerasyonunun aksine, yapılan gen aktarım çalışmalarında, kullanılan her iki çeşitte (Bezostaja-1, Çakmak 79) ve eksplantta (embriyo, kallus) Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu ile yapılan ışınlamalarda, kontrol (0 Gy) uygulamasına göre incelenen bütün karakterlerde daha yüksek sonuçlar alınmıştır.
- Araştırmada kullanılan her iki çeşitte de petri başına gelişen en yüksek mavi nokta sayısının 15 Gy'lik gamma dozu ve embriyo eksplantından elde edildiği görülmektedir.
- Sonuç olarak, buğdaya partikül bombardımanı yöntemi ile yapılan gen aktarım çalışmalarında embriyo eksplantına uygulanan Kobalt 60 kaynaklı 15 Gy'lik gamma dozu gen aktarım frekansını önemli derecede artırmıştır.

7. KAYNAKLAR

- Adu-Dapaah, H.K., Sangwan, R.S. 2004. Improving bambara groundnut productivity using gamma irradiation and *in vitro* techniques. African Journal of Biotechnology 3: 260-265.
- Akbay, G., Önde, S., Özgen, M. 2000. Transient expression of β -glucuronidase gene in different explants of winter common wheat (*Triticum aestivum* L.) via microprojectile bombardment. XV. Ulusal Biyoloji Kongresi "Uluslararası Katılımlı", 5-9 Eylül 2000, Ankara.
- Akıncı, C. 1999. Sorgül makarnalık buğday çeşidinin (*Triticum durum* Desf.) tohumlarına uygulanan farklı dozlardaki gama ışınının M₁ ve M₂ bitkilerinin bazı özelliklerine etkisi üzerine araştırma. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Şanlıurfa.
- Akıncı, C., Baysal, İ. 2005. Sorgül makarnalık buğday çeşidinin (*Triticum durum* Desf.) tohumlarına uygulanan farklı dozlardaki gama ışınının M1 ve M2 bitkilerinin bazı agronomik özellikleri üzerine etkisi. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9 Eylül 2005, Antalya, 729-734.
- Altpeter, F., Vasil, V., Srivastava, V., Stöger, E., Vasil, I.K. 1996. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. Plant Cell Reports 16: 12-17.
- Al-Safadi, B., Ayyoubi, Z., Jawdat, D. 2000. The effect of gamma irradiation on potato microtuber production *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61: 183-187.
- Ammirato, P.V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. Plant Tissue and Cell Culture, Green, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P. and Biesboer, D.D. (eds.), Alan R Liss, New York, 57-81.
- Atila, S., Peşkiricioğlu, H. 1990. Gama radyasyonunun Çukurova-1518 pamuk çeşidi üzerine etkisi. TAEK, Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Bilimsel Araştırma ve İncelemeler 22.
- Barnabas, B., Pfahler, P.L., Kovacs, G. 1991. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum*). Theoretical and Applied Genetics 81: 675-678.

- Basiran, N., Armitage, P., Scott, R.J., Draper, J. 1987. Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*): regeneration of transformed shoots via a callus phase. *Plant Cell Reports* 6: 396-399.
- Becker, D., Brettschneider, R., Lörz, H. 1994. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *The Plant Journal* 5: 299-307.
- Bellini, C., Chupeau, M.C., Guerche, P., Vastra, G., Chupeau, Y. 1989. Transformation of *Lycopersicon peruvianum* and *Lycopersicon esculentum* mesophyll protoplasts by electroporation. *Plant Science* 65: 63-75.
- Bidney, D., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L., Huffman, G., 1992. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* 18: 301-303.
- Bio-Rad 2000. Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System. Catalog Numbers 165-2257 and 165-2250LEASE to 165-2255LEASE, Bio-Rad Laboratories, USA.
- Birsin, M.A., Önde, S., Özgen, M. 2003. Yulafta (*Avena sativa* L.) olgun embriyolara partikül bombardımanı tekniği ile belirleyici gen aktarımı. XIII. Biyoteknoloji Kongresi, 25-29 Ağustos 2003, Çanakkale, Bildiriler Kitabı, 82-86.
- Budak, N., Yıldırım, M.B. 2002. Heritability, correlation and genetic gains obtained in the populations of Ege 88 and Kunduru durum wheats irradiated with gamma ray. *Cereal Research Communications* 30: 47-53.
- Butcher, S.M., Deroles, S.C., Ledger, S.E. 1990. Transformation of *Geranium*. New Zealand Genetical Society, 36th Annual Meeting, Abstract 95.
- Carlson, P.S., Polacco, J.C. 1975. Plant cell cultures: Genetic aspects of crop improvement. *Science* 188: 622-625.
- Carlson, A.R., Letarte, J., Chen, J. and Kasha, K.J., 2001. Visual screening of microspore-derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green-fluorescent protein. *Plant Cell Reports* 20; 331-337.
- Catlin, D., Ochoa, O., McCormick, S., Quiros, C.F. 1988. Celery transformation by *Agrobacterium tumefaciens*: cytological and genetic analysis of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 7: 100-103.

- Chan, M.T., Lee, T.M., Chang, H.H. 1992. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant and Cell Physiology* 33: 577-583.
- Charbaji, T., Nabulsi, I. 1999. Effect of low doses of gamma irradiation on *in vitro* growth of grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 129-132.
- Chilton, M.-D., Saiki, R.K., Yadav, N., Gordon, M.P., Quetier, F. 1980. *Agrobacterium* Ti Plasmid is the nuclear fraction of crown gall tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77: 4060-4064.
- Chung, B.Y., Lee, Y.B., Baek, M.H., Kim, J.H., Wi, S.G., Kim, J.S. 2006. Effects of low-dose gamma-irradiation on production of shikonin derivatives in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* S. *Radiation Physics and Chemistry* 75: 1018-1023.
- Chupeau, M.-C., Bellini, C., Guerche, P., Maisonneuve, B., Vastra, G., Chupeau, Y. 1989. Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplasts. *Bio/Technology* 7: 503-508.
- Conner, A.J., Williams, M.K., Derolles, S.C., Gardner, R.C. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of asparagus. In: McWhirter, K.S., Downes, R.W. and Reid, B.J. (eds.), Ninth Australian Plant Breeding Conference, Proceedings. Agricultural Research Institute, Wagga Wagga, 131-132.
- Crossway, A., Oakes, J.V., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C., Shewmaker, C.K. 1986. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics* 202: 179-185.
- Curtis, O.F., Shetty, K. 1996. Growth medium effects on vitrification, total phenolics, chlorophyll, and water content of *in vitro* propagated oregano clones. *Acta Horticulture* 426: 498-503.
- Daniell, H., Krishnan, M., McFadden, B.F. 1991. Transient expression of β -glucuronidase in different cellular compartments following biolistic delivery of foreign DNA into wheat leaves and calli. *Plant Cell Reports* 9: 615-619.
- De Block, M. 1988. Genotype-independent leaf disk transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 767-774.

- Dekeyser, R.A., Claes, B., De Rycke, R.M.U., Habets, M.E., Van Montagu, M.C., Caplan, A.B. 1990. Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *Plant Cell* 2: 591-602.
- Deshayes, A., Herrera-Estrella, L., Cobache, M. 1985. Liposome mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *E. coli* plasmid. *Embo Journal* 4: 2731-2739.
- Doonan, J. 2000. Social controls on cell proliferation in plants. *Current Opinion in Plant Biotechnology* 3: 482-487.
- Draper, J., Scott, R., Kumar, A., Dury, G. 1988. Transformation of Plant Cells by DNA-mediated Gene Transfer, In: *Plant Genetic Transformation and Gene Expression; A Laboratory manual*, 161-198, Draper, J., Scott, R., Armitage, P. and Walden, R. (eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Dunwell, J.M. 1986. Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding. *Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications*, Withers, L.A. and Alderson, P.G. (eds.), Butterworths, New York, 375-404.
- Evans, D.A., Reed, S.M. 1981. Cytogenetic techniques. *Plant Tissue Culture*, Thorpe, T.A. (ed.), Acad. Press, New York.
- Everett, N.P., Robinson, K.E.P., Mascarenhas, D. 1987. Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus*). *Bio/Technology* 5: 1201-1204.
- Fang, G., Grumet, R. 1990. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of musk melon plants. *Plant Cell Reports* 9: 160-164.
- Fernando, D.D., Owens, J.N., Misra, S. 2000. Transient gene expression in pine pollen tubes following particle bombardment. *Plant Cell Reports* 19: 224-228.
- Finer, J.J. 1994. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Culture-A Practical Approach*, Dixon, R.A. and Gonzales, R.A. (eds.), Oxford University Press, Oxford, 67-102.
- Firoozabady, E., DeBoer, D.L., Merlo, D.J., Halk, E.L., Amerson, L.N., Rashka, K.E., Murray, E.E. 1987. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneratin of transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 10: 105-116.

- Foard, D.E., Haber, A.H. 1961. Anatomic studies of gamma-irradiated wheat growing without cell division. *American Journal of Botany* 48: 438-446.
- Freeman, J. 1988. An evaluation of procedures and markers for plant transformation, Ph.D. Thesis, University of Nottingham.
- Fromm, M.E., Taylor, L.P., Walbot, V. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319: 791-793.
- Fry, J., Barnason, A., Horsch, R.B. 1987. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors. *Plant Cell Reports* 6: 321-325.
- Gamborg, O.L., Shyluk, J.P. 1981. Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue cultures. *Plant Tissue Culture*, Thorpe, T.A. (ed.), Acad.Pres, New York.
- Gasser, C.S., Fraley, R.T. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science* 224: 1293-1299.
- Goose, R.W., Bingham, E.T. 1984. Variation in plants regenerated from tissue culture of tetraploid alfalfa heterozygous for several traits. *Crop Science* 24: 655-658.
- Gould, J., Devery, M., Hasegawa, O., Ulian, E.C., Peterson, G., Smith, R.H. 1991. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiology* 95: 426-434.
- Görpe, A., Cantez, S. 1992. *Pratik Nükleer Tıp*. İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
- Guerche, P., Charbonnier, M., Jouanin, L., Tourneur, C., Paszkowski, J., Pelletier, G. 1987. Direct gene transfer by electroporation in *Brassica napus*. *Plant Sci.* 52: 11-116.
- Guri, A., Sink, K.C. 1988. *Agrobacterium* transformation of eggplant. *Journal of Plant Physiology* 133: 52-55.
- Hain, R., Steinbib, H-H., Schell, J. 1984. Fusion of *Agrobacterium* and *E. coli* spheroplasts with *Nicotiana tabacum* protoplasts-direct gene transfer from microorganism to higher plant. *Plant Cell Reports* 3: 60-64.
- Hartmann, H.T., Kester, T.T., Davies, T.T. 1990. *Plant Propagation*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

- Harwood, W. A., Ross, S.M, Cilento, P., Snape, J.W. 2000. The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica* 111: 67-76.
- Hatipoğlu, R. 1995. *Biyoteknolojiye Giriş*. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ders Kitabı No:129, Adana.
- Hinchee, M.A., Conner-Ward, D.V., Newell, C.A., McDonnell, R.E., Sato, S.J., Grasser, C.S., Fischhoff, D.A., Re, D.B., Fraley, R.T., Horsch, R.B. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6: 915-922.
- Horn, M.E., Shillito, R.D., Conger, B.V., Harms, C.T. 1988. Transgenic plants of orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts. *Plant Cell Reports* 7: 469-472.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- Hu, C.Y., Wang, P.J. 1986. Embryo culture: technique and application. *Handbook of Plant Cell Cultures*, Evans, D.A., Sharp, W.R. and Ammirato, P.B. (eds.), Vol.4, Macmillan, New York, 43-94.
- Hyun, D.Y., Lee, I.S., Kim D.S., Lee, S.J., Seo, Y.W., Lee, Y. 2003. Selection of azetidine-2-carboxylic acid resistant cell lines by *in vitro* mutagenesis in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Biotechnology* 5: 43-49.
- James, D.J., Passay, A.J., Barbara, D.J., Bevan, M. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports* 7: 658-661.
- Jensen, J.S., Marcker, K.A., Otten, L., Schell, J. 1986. Nodule specific expression of a chimeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature* 321: 669-674.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405.
- Kaeppler, H.F., Gu, W., Somers, D.A., Rines, H.W., Cockburn, A.F. 1990. Silicon carbide fibre-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Reports* 9: 415-418.

- Kartha, K.K. 1981. Meristem culture and cryopreservation-methods and applications. Plant Tissue Culture, Thorpe, T.A. (ed.), Acad. Press, New York.
- Kerbaui, G.B., Hell, K.G. 1979. Effect of gamma radiation on the *in vitro* growth of excised pith cells of *Nicotiana tabacum* L. cv IAC-70. International Journal of Radiation Biology 35: 273-276.
- Kasha, K.J., Ziauddin, A., Cho, U.H. 1990. Haploids in cereal improvement: anther and microspore culture. Gene Manipulation in Plant Improvement II, Gustafson, J.P. (ed.), Plenum Press, New York, 213-235.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327: 70-73.
- Klein, T.M., Goff, S.A., Roth, B.A., Fromm, M.E. 1990. Applications of particle gun in plant biology. In: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, Nijkamp, H.J.J., vanderPlas, L.H.W. and Van Aartrijk, J. (eds), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 56-66.
- Kikkert, J.R., 1993. The Biolistic PDS-1000/He device. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 221-226.
- Kovacs, E., Keresztes, A. 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. Micron 33: 199-240.
- Koyuncu, N., Özgen, M. 2005. Marker gene transfer into mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.) by microprojectile bombardment. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi 18: 191-194.
- Krane, K.S. 1987. Introductory Nuclear Physics. Wiley, 3rd Edition.
- Lage, C.L.S., Vasconcellos, A.G., Silva, N.C.B., Esquibel, M.A. 2002. Changes in electrophoretic profiles of *Ipomoea batatas* (Sweet Potato) induced by gamma irradiation. Brazilian Archives of Biology and Technology 45: 177-182.
- Lee I.S., Kim, D.S., Hua, J., Kang, S.Y., Song, H.S., Lee, S.J., Lim, Y.P., Lee, Y. 2003. Selection and characterization of gamma radiation-induced submergence tolerant line in rice. Journal of Plant Biotechnology 5: 173-179.

- Li, H.Z., Zhou, W.J., Zhang, Z.J., Gu, H.H., Takeuchi, Y., Yoneyama, K. 2005. Effect of γ -radiation on development, yield and quality of microtubers *in vitro* in *Solanum tuberosum* L. *Biologia Plantarum* 49: 625-628.
- Lindsey, K., Jones, M.G.K. 1987. Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cell of sugar beet. *Plant Molecular Biology* 10: 43-52.
- Lindsey, K., Jones, M.G.K., Fish, N. 1988. Direct gene transfer into plant protoplasts, *New Nucleic Acid Techniques*, 519-536, Walker, J.M. (ed.), Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Lindsey, K., Jones, G.K. 1989. *Plant Biotechnology in Agriculture*. Chapter 4, *Current Applications of Plant Cell and Tissue Culture*, Open University Press, 57-78.
- Liu, C.M. 1981. *In vitro* methods applied to sugar cane improvement. *Plant Tissue Culture*, Thorpe, T.A. (ed.), Acad. Press, New York, 299-324.
- Lombardi, M.H. 2007. *Radiation safety in nuclear medicine*. Second Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Lonsdale, D., Önde, S., Cumming, A. 1990. Transient expression of exogenous DNA in intact viable wheat embryos following particle bombardment. *Journal of Experimental Botany* 41: 1161-1165.
- Lörz, H., Baker, B., Schell, J. 1985. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Molecular and General Genetics* 199: 178-182.
- Mankin, S.L. and Thompson, W.F., 2001. New green fluorescent protein genes for plant transformation: Intron-containing, ER-localized, and soluble-modified. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 13-26.
- McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J., Christou, P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6: 923-926.
- McGranahan, G.H., Leslie, C.A., Uratsu, S.L., Martin, L.A., Dandekar, A.M. 1988. *Agrobacterium* mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Bio/Technology* 6: 800-804.
- Mendel, R.R., Müller, B., Schulze, J., Kolesnikov, V., Zelenin, A., 1989. Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 31-34.

- Merkle, S.A., Parrott, W.A., Williams, E.G. 1990. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, Bhojwani, S.S. (ed.), Elsevier, Amsterdam, 67-102.
- Michelmore, R., Marsh, E., Seeley, S., Landry, B. 1987. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 6: 439-442.
- Mooney, P.A., Goodwin, P.B., Dennis, E.S., Llewellyn, D.J. 1991. *Agrobacterium tumefaciens*-gene transfer into wheat tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 209-218.
- Morel, G., Martin, C. 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. Pp. 235, 1324-1325. *Les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nagata, T., Todoriki, S., Hayashi, T., Shibata, Y., Mori, M., Kanegae, H., Kikuchi, S. 1999. γ -Radiation induces leaf trichome formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 120: 113-119.
- Nehra, N.S., Chibbar, R.N., Kartha, K.K., Datla, R.S., Crosby, W.L., Stushnoff, C. 1990. *Agrobacterium* mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 9: 10-13.
- Neuhaus, G., Spangenberg, G. 1990. Plant transformation by microinjection techniques. *Physiologia Plantarum* 79: 213-217.
- Ohta, Y. 1986. High efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83: 715-719.
- Okada, K., Takebe, I., Nagata, T. 1986. Expression and integration of genes introduced into highly synchronised plant protoplasts. *Molecular and General Genetics* 205: 398-403.
- Özcan, S., Özgen, M. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. *Kükem Dergisi* 1: 69-95.

- Öktem, H.A., Eyidoğan, F., Ertuğrul, F., Yücel, M., Jenes, B., Toldi, O. 1999. Marker gene delivery to mature embryos via particle bombardment. *Turkish Journal of Botany* 23: 303-308.
- Önde, S., Sancak, C., Altınok, S., Birsin, M., Özgen, M. 2001. Transient expression of β -glucuronidase in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) via microprojectile bombardment. *Turkish Journal of Biology* 25: 171-176.
- Özgen, M., Türet, M. 1995. Bitki ıslahı ve gen aktarma teknolojisi. Workshop “Biyoteknoloji ve Bitki Islahı”, 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, Bildiriler, Can Ofset, İzmir, 227-236.
- Özgen, M., Türet, M., Özcan, S., Sancak, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breeding* 115: 455-458.
- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S., Sancak, C. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Reports* 118: 331-335.
- Özgen, M., Önde, S., Birsin, M., Sancak, C. 1999. Transient expression of β -glucuronidase (GUS) gene in winter durum wheat mature embryos via microprojectile bombardment. *Wheat Information Service* 89: 30-32.
- Özgen, M., Adak, M.S., Söylemezoğlu, G., Ulukan, H. 2000. Bitkisel gen kaynaklarının korunma ve kullanımında yeni yaklaşımlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, 1. Cilt; 259-284.
- Potrykus, I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology* 8: 535-542.
- Puonti-Kaerlas, J., Eriksson, T., Engstrom, P. 1990. Production of transgenic pea (*Pisum sativum*) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 246-252.
- Raineri, D.N., Bottino, P., Gordon, M.P., Nester, E. W. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/Technology* 8: 33-38.
- Rashid, A. 1988. *Cell Physiology and Genetics of Higher Plants*. Vol.1, CRC Press, Boca Raton, FL, 1-38, 67-103.

- Reich, T.J., Iyer, V.N., Miki, B.L. 1986. Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti-plasmids. *Bio/Technology* 4: 1001-1004.
- Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D., Allen, N., 1987. Delivery of substance into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5: 27-37.
- Sanford, J.C. 1988. The Biolistic Process. *Trends in Biotechnology* 6: 299-302.
- Sanford J.C., Smith F.D., Rushell J.A. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological application. In: *The Methods in Enzymology*, Wu R (ed), Vol 217, pp 483-509, Academic Press, Orlando.
- Sayar, M., Birsin, M.A., Ulukan, H., Özgen, M. 1999. Effect of seed size on the tissue culture response of callus from mature embryos of wheat species. *Wheat Information Service* 89: 1-6.
- Scott, R.J., Draper, J. 1987. Transformation of carrot tissues derived from proembryogenic suspension cells: a useful model system for gene expression studies in plants. *Plant Molecular Biology* 8: 265-274.
- Shahin, E.A., Spielmann, A., Sukhapinda, K., Simpson, R.B., Yashar, M. 1986. Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Crop Science* 26: 1235-1239.
- Shahin, E.A., Yashar, M. 1986. Transformation of cabbage by a binary vector in *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Crucifer Genetics Workshop III Proceedings*. University of Guelph, Canada.
- Sheppard, S.C., Evenden, W.G. 1986. Factors controlling the response of field crops to very low doses of gamma irradiation of the seeds. *Canadian Journal Plant Science* 66: 431-441.
- Shillito, R.D., Saul, M.W., Paskowski, J., Müller, M., Potrykus, I. 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Technology* 3: 1099-1033.
- Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T., Fujimoto, H. 1989. Fertile transgenic plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G. 1967. *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Iowa, USA.

- Schwartz, D., Bay, C. 1956. Further studies on the reversal in the seedling height dose curve at very high levels of ionizing radiation. *The American Naturalist* 90: 323-327.
- Southgate, E. M., Davey, M. R., Power, J. B., Marchant, R., 1995. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotechnology Advances* 13: 631-651.
- Stiff, C.M., Kilian, A., Zhou, H., Kudrna, D.A., Kleinhofs, A. 1995. Stable transformation of barley callus using biolistic® particle bombardment and the phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) gene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 243-248.
- Töpfer, R., Gronenborn, B., Schell, J., Steinbiss, H.H, 1989. Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos. *Plant Cell* 1: 133-139.
- Trulson, A., Simpson, R., Shahin, E. 1986. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. *Theoretical and Applied Genetics* 73: 11-15.
- Tutluer, M.İ. 1993. Çok yıllık çavdardan (*Secale montanum* Guss.) gama radyasyonu ile yem çavdarı elde etme imkanları ve mitoz, mayoz bölünmelerde görülen değişiklikler. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara.
- Vasil, I.K. 1976. The progress, problems and prospects of plant protoplast research. *Advances in Agronomy* 28: 119-160.
- Vasil, I.K. 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereals and grass crops. *Journal of Plant Physiology* 128: 193-218.
- Vasil, V., Srivastava, V., Castillo, A M., Fromm, M. E., Vasil, I.K. 1993. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/Technology* 11: 1553–1558.
- Voisine, R., Vezina, L.P., Willemot, C. 1993. Modification of phospholipid catabolism in microsomal membranes of γ -irradiated cauliflower (*Brassica oleraceae* L.). *Plant Physiology* 102: 213-218.
- Weeks, J.T., Anderson, O.D., Blechl, A.E. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* 102: 1077-1084.

- William, H. 1994. Optimization of biolistic transformation using the helium-driven PDS-1000/He system. BioRad US/EG Bulletin, 1688.
- Wilmink, A., Dons, J.J.M, 1993. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. Plant Molecular Biology Reporter 11: 165-185.
- White, D.W.R., Greenwood, D. 1987. Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary *Agrobacterium* vectors. Plant Molecular Biology 8: 461-469.
- Yao, Q.A., Kasha, K.J. 1997. Potential of biolistic transformation of barley microspores based on viability and transient β -glucuronidase activity. Genome 40: 639-643.
- Yıldırım, H. 1985. Biyofizik. Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir.
- Yılmaz, A., Cevheri, C., Beyyavaş, V., Haliloğlu, H. 2005. Gamma ışınlamasının (Cobalt-60) Acalpi-952 pamuk (*G.hirsutum* x *G.barbadense* L.) çeşidinde M₁ ve M₂ generasyonlarında mutasyon etkilerinin saptanması. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9 Eylül 2005, Antalya, 1053-1058.
- Zaka, R., Chenal, C., Misset, M.T. 2004. Effects of low doses of short-term gamma irradiation on growth and development through two generations of *Pisum sativum*. Science of the Total Environment 320: 121-129.
- Zhang, H.M., Yang, H., Rech, E.L., Golds, T.J.Davis, A.S., Mulligan, B.J., Cocking, E.C., Davey, M.R. 1988. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. Plant Cell Reports 7: 379-384.
- Zhang, S., Cho, M.J., Koprek, T., Yun, R., Bregitzer, P., Lemaux, P.G. 1999. Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. Plant Cell Reports 18: 959-966.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Çiğdem YILDIZ

Doğum Yeri : Babadağ/Denizli

Doğum Tarihi : 01.01.1967

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Sarayköy Lisesi - 1984

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü - 1989

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü - 1995

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü –
1990-2000

Türkiye Atom Enerjisi Kurumu – 2000 -