

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MAKARNALIK BUĞDAYDA (*Triticum durum* Desf.) FARKLI 2,4-D ve PİCLORAM
DOZLARININ KALLUS OLUŞUMUNA VE KROMOZOM YAPISINA ETKİSİ**

EZGİ DOĞAN

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN

ANKARA

2010

Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN danışmanlığında, Ezgi DOĞAN tarafından hazırlanan bu çalışma 16/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN

İmza:



Üye: Doç Dr. Sertaç ÖNDE

İmza:



Üye: Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Enstitü Müdürü

Makarnalık Buğdayda (*Triticum durum* Desf.) Farklı 2,4-D ve Picloram Dozlarının Kallus Oluşumuna Ve Kromozom Yapısına Etkisi

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye florasında genetik materyal olarak ve yetiştiricilik açısından önem taşıyan Çakmak-79 ve Kunduru-1149 (*Triticum durum* Desf.) makarnalık buğday çeşitleri ile 2,4-D ve picloram bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır. Bu araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu tezde, doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan sentetik oksinlerden 2,4-D'nin ve günümüzde kullanılmaya başlanılan picloramın kallus gelişimi üzerine olan etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir ve en yüksek kallus oluşumu değerlerini veren picloram ve 2,4-D dozları belirlenmiştir. Ayrıca her iki bitki büyüme düzenleyicisinin, kallus gelişiminde en etkili olarak belirlenen dozlarının, makarnalık buğday çeşitlerinde herhangi bir kromozomal bozukluğa neden olup olmadıkları sitolojik çalışmalarla saptanmıştır. Bu sayede bitki biyoteknolojisi alanında yapılan doku kültürü çalışmalarında en az zararlı etkiye sahip bitki büyüme düzenleyicisi kullanımı sağlanmaya çalışılmıştır.

Kontrol olarak 0 dozunun değerlendirildiği çalışmada, her iki bitki büyüme düzenleyicisi için 3, 6, 9, 12 mg/l olmak üzere, 5 farklı 2,4-D ve 5 farklı picloram'dan oluşan toplam 10 dozda yapılan incelemelerin sonunda; her iki çeşitte de en iyi kallus gelişimi 3 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l picloram içeren ortamlardan elde edilmiştir. Daha sonra bu bitkilerden elde edilen kök uçlarından aceto-carmin ve feulgen boyalar kullanılarak yapılan sitogenetik çalışma sonucunda 3 mg/l 2,4-D ve 3 mg/ picloram içeren ortamlarda kültüre alınan Çakmak-79 ve Kunduru-1149 çeşitlerinin kromozomlarının morfolojik yapısında ve kromozom sayısında herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır.

2010, 93 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Triticum durum*, Buğday, Kallus Oluşumu, 2,4-D, Picloram, Kromozom

The Effect Of Different 2,4-D and Picloram Doses On Callus Induction And Chromosome Structure In Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.)

ABSTRACT

In this study, durum wheat varieties, Çakmak-79 and Kunduru-1149 (*Triticum durum* Desf.) are used as genetic material, which are important in terms of cultivation. This study has been carried out in University of Ankara, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops and Biotechnology Laboratory. In this thesis, the effect of 2,4-D, as a synthetic auxin which is widely used in tissue culture studies, and picloram, which is beginning to be used nowadays on growing of callus, has been analysed comparatively and picloram and 2,4-D doses which provide the highest degrees on callus induction has been determined. The best callus inducing doses of both plant growth regulators are also investigated in terms of their potential for creating chromosomal abnormalities by using cytological studies. The result of this study is intended to identify the least adverse effect-bearing plant growth regulator to be used in the field of plant biotechnology.

In this study, hormone free media was used as the control and the callus induction responses of the studied varieties were compared with a total of 10 doses, comprising 5 different doses of both 2,4-D and picloram at 3,6,9 and 12 mg/l. Best callus inductions were achieved when 2,4-D and picloram were used at 3 mg/l concentrations separately. The root tips of the plants regenerated from the callus were stained with aceto-carmin and feulgen dyes and cytogenetic studies revealed that the best performing concentrations of both of these plant growth regulators did not cause any morphological or chromosomal abnormalities in Çakmak-79 and Kunduru-1149 varieties.

2010, 93 Pages

Keywords: *Triticum durum*, Wheat, Callus Induction, 2,4-D, Picloram, Chromosome

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, öneri ve yorumları ile çalışmamı düzenleyen, sistemli bir şekilde çalışmayı öğreten ve yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Murat ÖZGEN'e çok teşekkür ederim.

Çalışmamın çeşitli basamaklarında desteğini gördüğüm, hayat görüşü ile beni aydınlatan ve yaşamımda doğru kararlar almamda etkili olan Doç. Dr. Melahat AVCI BİRSİN'e;

Yüksek lisansa başladığımdan beri yanımda ve bana her konuda destek olan, yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşım ve dostum Ziraat Mühendisi İrem ALTUNGÖZ'e;

Deneylerimin son aşamasında tanıştığım fakat çok fazla yardımını gördüğüm, bıkmadan beni dinleyen ve destek olan Fırat ALABAY'a;

Çalışmalarım boyunca desteklerini ve arkadaşlıklarını esirgemeyen Dr. Ziraat Mühendisi Nur Koyuncu, Gıda Yüksek Mühendisi Burçak ÇABUK, Parisa ve Mahsa POURALI KAHRİZ ve Biyolog Gökben SOMUN'a

çok teşekkür ederim.

Uzakta olsalar da her zaman güvenleri, maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan, her şeyimi borçlu olduğum sevgili annem Selma DOĞAN, babam Recep S. DOĞAN ve kardeşim Hande DOĞAN'a; Ankara'da geçirdiğim iki yıl boyunca beni yalnız bırakmayan hayatımı paylaştığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

EZGİ DOĞAN

ANKARA, Haziran 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM	41
3.1 Materyal.....	41
3.2 Yöntem.....	42
3.2.1 <i>In vitro</i> yöntemler	42
3.2.1.1 Kullanılan ekipmanların sterilizasyonu.....	42
3.2.1.2 Steril distile su hazırlanması	43
3.2.1.3 Stok 2,4 D ve picloram çözeltilerinin hazırlanması	43
3.2.1.4 Besin ortamlarının hazırlanması.....	44
3.2.1.5 Eksplantların yüzey sterilizasyonu	45
3.2.1.6 Kallus oluşumu aşaması	46
3.2.1.7 Kallus gelişimi aşaması.....	46
3.2.2 Sitolojik yöntem.....	48
3.2.2.1 Prefiksasyon aşaması.....	48
3.2.2.2 Fiksasyon aşaması.....	48
3.2.2.3 Hidroliz aşaması	49
3.2.2.4 Boyama aşaması.....	49
3.2.2.5 Preparatların hazırlanması ve mikroskopta incelenmesi	49
3.2.2.6 Sitolojik çalışmalarda kullanılan çözelti ve boyaların hazırlanması	50
3.2.3 Verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesi.....	52

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	53
4.1 Çakmak-79 Çeşidinin Farklı 2,4-D Dozlarında <i>In vitro</i> Parametrelere Tepkisi	53
4.2 Çakmak-79 Çeşidinin Farklı Picloram Dozlarında <i>In vitro</i> Parametrelere Tepkisi	59
4.3 Kunduru-1149 Çeşidinin Farklı 2,4-D Dozlarında <i>In vitro</i> Parametrelere Tepkisi	64
4.4 Kunduru-1149 Çeşidinin Farklı Picloram Dozlarında <i>In vitro</i> Parametrelere Tepkisi	69
4.5 Çakmak-79 ve Kunduru-1149 Çeşitlerinin Rejenerasyon Çalışmaları.....	74
4.6 Çakmak-79 ve Kunduru-1149 Çeşitlerine Ait Sitogenetik Çalışmalar	75
5. SONUÇ	79
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Tez çalışması boyunca gerçekleştirilen sterilizasyon, besin ortamı hazırlanması, embriyo çıkarılması, besin ortamına yerleştirilmesi ve kallus gelişimi aşamaları	47
Şekil 3.2 Buğday kök ucu örneklerinden preparat hazırlanma aşamaları	52
Şekil 4.1 Farklı 2,4-D dozları uygulanan Çakmak-79 çeşidinin dozlara bağlı kallus ağırlığı..	56
Şekil 4.2 Çakmak-79 çeşidinin 14 günün sonunda 0 mg/l 2,4-D (kontrol grubu) içeren ortamdaki gelişimi.....	56
Şekil 4.3 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 3 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi	57
Şekil 4.4 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 6 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi	57
Şekil 4.5 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 9 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi	57
Şekil 4.6 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 12 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi	58
Şekil 4.7 Farklı picloram dozları uygulanan Çakmak-79 çeşidinin dozlara bağlı kallus ağırlığı.....	61
Şekil 4.8 Çakmak-79 çeşidinin 14 günün sonunda 0 mg/l picloram (kontrol grubu) içeren ortamdaki gelişimi.....	61
Şekil 4.9 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 3 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi	62
Şekil 4.10 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 6 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi	62
Şekil 4.11 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 9 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi	62
Şekil 4.12 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 12 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi	63
Şekil 4.13 Farklı 2,4-D dozları uygulanan Kunduru-1149 çeşidinin dozlara bağlı kallus ağırlığı.....	66
Şekil 4.14 Kunduru-1149 çeşidinin 14 günün sonunda 0 mg/l 2,4-D (kontrol grubu) içeren ortamdaki gelişimi.....	66
Şekil 4.15 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 3 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi	67

Şekil 4.16 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 6 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi	67
Şekil 4.17 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 9 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi	67
Şekil 4.18 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 12 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi	68
Şekil 4.19 Farklı picloram dozları uygulanan Kunduru-1149 çeşidinin dozlara bağlı kallus ağırlığı.....	71
Şekil 4.20 Kunduru-1149 çeşidinin 14 günün sonunda 0 mg/l picloram (kontrol grubu) içeren ortamdaki bitki gelişimi.....	71
Şekil 4.21 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 3 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi	72
Şekil 4.22 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 6 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi	72
Şekil 4.23 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 9 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi	72
Şekil 4.24 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 12 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi	73
Şekil 4.25 1 ay sonunda rejenere olan bitkicikler; 3 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki Çakmak-79 (a), 3 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki Kunduru-1149 (b), 3 mg/l picloram içeren ortamdaki Çakmak-79 (c), 3 mg/l picloram içeren ortamdaki Kunduru-1149 (d)	75
Şekil 4.26 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kültüre alınan Çakmak-79 (2n=28)	76
Şekil 4.27 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kültüre alınan Kunduru-1149 (2n=28)	76
Şekil 4.28 3 mg/l picloram içeren ortamda kültüre alınan Çakmak-79 (2n=28)	77
Şekil 4.29 3 mg/l picloram içeren ortamda kültüre alınan Kunduru-1149 (2n=28).....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Yıllara göre ülkemiz buğday üretimi	4
Çizelge 4.1 Çakmak-79 çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında kallus gelişim oranına ilişkin varyans analizi sonuçları	53
Çizelge 4.2 Çakmak-79 çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında kallus ağırlığına ilişkin varyans analizi sonuçları	54
Çizelge 4.3 Çakmak-79 çeşidine uygulanan farklı 2,4-D dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin LSD analizi sonuçları.....	55
Çizelge 4.4 Çakmak-79 çeşidine farklı 2,4-D dozları uygulanması sonucu elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin AÖF testi sonuçları.....	55
Çizelge 4.5 Çakmak-79 çeşidinin farklı picloram dozlarında kallus gelişim oranına ilişkin varyans analizi sonuçları	56
Çizelge 4.6 Çakmak-79 çeşidinin farklı picloram dozlarında kallus ağırlığına ilişkin varyans analizi sonuçları	59
Çizelge 4.7 Çakmak-79 çeşidine uygulanan farklı picloram dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin LSD analizi sonuçları.....	60
Çizelge 4.8 Çakmak-79 çeşidine farklı picloram dozları uygulanması sonucu elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin AÖF testi sonuçları.....	60
Çizelge 4.9 Kunduru-1149 çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında kallus gelişim oranına ilişkin varyans analizi sonuçları	64
Çizelge 4.10 Kunduru-1149 çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında kallus ağırlığına ilişkin varyans analizi sonuçları	64
Çizelge 4.11 Kunduru-1149 çeşidine uygulanan farklı 2,4-D dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin LSD analizi sonuçları.....	65
Çizelge 4.12 Kunduru-1149 çeşidine farklı 2,4-D dozları uygulanması sonucu elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin AÖF testi sonuçları.....	65
Çizelge 4.13 Kunduru-1149 çeşidinin farklı picloram dozlarında kallus gelişim oranına ilişkin varyans analizi sonuçları	69
Çizelge 4.14 Kunduru-1149 çeşidinin farklı picloram dozlarında kallus ağırlığına ilişkin varyans analizi sonuçları	69

Çizelge 4.15 Kunduru-1149 çeşidine uygulanan farklı picloram dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin LSD analizi sonuçları..... 70

Çizelge 4.16 Kunduru-1149 çeşidine farklı picloram dozları uygulanması sonucu elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin AÖF testi sonuçları..... 70

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
ABA	Absisik asit
AFLP	Amplifiye edilmiş parça uzunluk polimorfizmi
AgNO ₃	Gümüş nitrat
AÖF	Asgari önemli fark
BA	Benziladenin
BAP	6-benzil amino pürin
BNOA	β-naptaoksiasetik asit
bp	Baz çifti
C	Sitozin
CH ₃ COOH	Glasiyel asetik asit
cm	Santimetre
DArT	Çeşitlilik dizi teknolojisi
Dicamba	3,6-dikloro-o-anisik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EBR	Epibrassionolid
EST	İfade edilmiş dizi etiketi
FISH	Fluoresan <i>in situ</i> hibridizasyonu
G	Guanin
g	Gram
GA	Giberellik asit
GISH	Genomik <i>in situ</i> hibridizasyonu

Hg	Civa
HCl	Hidrojen klorür
IAA	İndolasetik asit
IBA	İndolbütirik asit
İH	İkiye katlanmış haploid
K	Kelvin
kg	Kilogram
KKD	Kardeş kromatit değişimi
L	Litre
LD ₅₀	%50 öldürücü doz
M-1	Metafaz 1
mg	Miligram
Mg	Magnezyum
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog besi ortamı
N	Normal
NAA	Naftelenasetik asit
NaCl	Sodum klorür
NaOH	Sodyum hidroksil
QTL	Kantitatif özellik lokus
PAGE	Poliakliramid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Picloram	4-amino-3,5,6- trikloropikolinik asit

PMC	Polen Ana hücresi
ppm	Parts per million (derişim birimi)
psi	Pounds per inch square (basınç birimi)
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RDS	Rekombinant doğal sıra
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
SAT	Satellit taşıyan kromozom
SDS	Sodyon dodesil sülfat
SSR	Basit Sekans Tekrarı
T	Timin
2-MCPP	2-(2Methyl-4chlorophenoxy) propanoic acid
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
2,4,5-T	2,4,5- triklorofenooksiasetik asit
2,4,5-TP	2,4,5-triklorofenoksipropionik asit
3-CPA	3-klorofenoksipropionamid
4-CPA	4- klorofenoksipropionamid
⁰ C	Celcius
β	Beta
μm	Mikrometre
μM	Mikromol
μl	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Günümüzde yaklaşık 250.000 bitki türünden, 3000 kadarı kullanılmakta olup, sadece 150 türün düzenli olarak kültürü yapılmaktadır. Buğdaygiller (*Gramineae/Poaceae*) familyasından olan tahıllar da ilk kültüre alınan bitkilerdendir ve yeryüzünde ekilişi ve üretimi en yüksek ürün grubunu oluştururlar. Tahıllar grubunda yer alan buğday (*Triticum*), arpa (*Hordeum*), mısır (*Zea*), çeltik (*Oryza*), darılar (*Sorghum*, *Panicum*, *Seteria*) ve kuşyeminden (*Phalaris*) ilk dördü ‘‘Serin İklim Tahılları’’; diğerleri ise ‘‘Sıcak İklim Tahılları’’ adı altında toplanmaktadır (Kün 1996).

Tahıllar dünyada insanların harcadıkları günlük kaloringin % 50’den fazlasını karşılayan temel ürünlerdir. Yeryüzünün 1.4 milyar hektar olan işlenen alanlarının yarısında tahıl üretimi yapılmaktadır. Kurak ve yarı kurak bölgelerdeki nadas alanlarının da büyük çapta tahıllar için boş bırakıldığı göz önüne alındığında, dünya tarım alanlarının büyük çoğunlukla tahıl üretimine ayrılmış olduğu açıkça görülmektedir.

Tahıllar özellikle bir hasat döneminden diğerine kadar depolanmalarının kolaylığı ve basit bir uygulama ile pek çok kültürde temel yiyecek olarak kullanılan ekmeğin hazırlanma kolaylığı nedenleriyle tarih boyunca hep tercih nedeni olmuş ve geniş alanlarda yetiştirilmiştir (Şehrali ve Özgen 2007).

Serin iklim tahıllarından buğday; geniş bir adaptasyon yeteneğine sahip olmasına rağmen fazla sıcak ve nemden hoşlanmayan bir bitkidir. Özellikle gelişiminin ilk dönemlerinde (çimlenme-kardeşlenme) sıcaklığın 8–10 °C, bağıl nemin % 60’ın üzerinde olması yeterlidir. Kardeşlenme ve sapa kalkma arasında da fazla sıcaklık istemez. 10–15 °C sıcaklık, % 65 nem, az ışıklı ve yarı kapalı havalar uygundur. Sapa kalkma ile sıcaklık ve nem isteği artar. Başaklanma döneminin hemen öncesinde bağıl nemin yüksek olması buğday verimini olumlu yönde etkiler. Döllenme ile birlikte, düşük nem ve yüksek sıcaklık tanenin niteliğini yükseltir. Gelişme dönemine uygun dağılmış 500 mm bir yağış maksimum verim için yeterlidir. Bununla birlikte bazı buğday çeşitleri 250 mm yağış alan alanlarda da yetiştirilebilmektedir. Buğday değişik tip topraklarda yetişebilen bir bitkidir. Verimsiz kıraç topraklarda ve verimli taban alanlarda yetiştirilebilen birçok buğday çeşidi vardır. Bununla birlikte buğday için en uygun topraklar, drenajı yeterli olan derin killi-tınlı topraklardır. Su tutma kapasitesi % 25–30 olan toprak buğday için uygundur. Derin, killi, tınlı-killi olan ve yeterli organik maddesi olan fosfor ve kireci bulunan, kumlu tınlı

topraklar en iyi buğday topraklarıdır. Toprakta organik madde arttıkça, buğdayın verimi de artar. Besin maddesi yönünden fakir topraklarda kaplıca çeşitleri, orta şartlarda ekmeklik çeşitleri, en iyi şartlarda da makarnalık çeşitlerin ekilmesi daha uygundur (Ünal 2008).

Tanesinin uygun beslenme değeri, taşınma, saklama ve işlenmesindeki kolaylık ve bitkisinin geniş adaptasyon sınırları nedeniyle buğday, günümüzde 50 ülkenin temel besini durumundadır. Dünya nüfusunun yaklaşık % 35'inin temel besini olarak buğday, tüm dünyada besinlerden alınan kalorinin % 20'sini sağlamaktadır

Buğday, gıda sanayinin önemli hammaddelerinden biri olmasının yanında; son yıllarda kozmetik sanayinde de kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca, kaplıca buğdayı ve bazı topbaş buğday çeşitleri dünyada ve ülkemizde hayvan yemi olarak önem taşımaktadır.

Ülkemizde ise nüfusumuzun temel besini, buğday ürünleri ve özellikle buğday ekmeğidir. Ayrıca, ülkemizde ekmeğin yanı sıra besin değeri yüksek, saklanması, taşınması, hazırlanması kolay ve hammaddesi makarnalık buğday olan bulgur ve makarnanın tüketimi de gün geçtikçe önemli ölçüde artmaktadır. Ulusal düzeyde günlük kalori tüketiminin % 53'ü ekmek ve buğday ürünlerinden karşılanır. Türkiye nüfus başına buğday tüketiminin en yüksek seviyede olduğu ülkelerdendir.

ABD Tarım Bakanlığı Ekonomik Araştırmalar Servisi, (ERS)'nin verilerine göre dünyada 2009 sezonu küresel buğday üretimi rekor düzeyde 656 milyon ton olarak öngörülmektedir. ERS, 2008/09 sezonu için öngörülen üretim miktarının 2007/08 üretiminden (606,4 milyon ton) % 8 ve önceki rekor olan 2004/05 üretiminden ise (625,7 milyon ton) %5 oranında yüksek olduğunu belirtmiştir (Anonymous 2008).

Rapora göre AB-27, Avustralya, Kanada, Rusya ve Ukrayna'yı da içeren dünyanın başlıca buğday ihracatçısı ülkelerinin çoğunluğunda yüksek üretim beklenmektedir. ERS, yüksek buğday fiyatları ve AB-27 ve Eski Sovyetler Birliği ülkelerinin çoğunluğundaki uygun hava koşullarının 2008 yılı üretimini yükselttiğini belirtmiştir. Benzer şekilde, üretim Brezilya, Çin ve Hindistan'da da yüksek düzeyde öngörülmektedir. Üretimdeki kısmi sapmaların ise Arjantin ve Kazakistan'daki azalmalar olduğu belirtilmiştir. Kışlık buğday için en önemli sorun olan kuraklığın ise Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde ortaya çıktığı açıklanmıştır. Dünyada makarnalık buğday üretimi ise; toplam buğday üretiminin % 6'sı kadardır. Üretimde ilk sırayı % 24,2 oranında AB alırken, sonra sırasıyla % 11,7 oranında Türkiye, % 10.7 oranında ise İtalya gelmektedir. Dünyadaki buğday üretimi ile

İlgili bu olumlu gelişmelerin önümüzdeki dönemlerde, beklenen küresel iklim değişikliği nedeniyle, sürdürülmesi olanaksız görülmektedir.

Ülkemizde ise, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, 2001 yılında 19 milyon ton olan buğday üretiminin 2008 yılında önceki yıla göre, kuraklık nedeniyle 2 milyon 776 bin ton azalarak 17 milyon 234 bin tona düştüğü belirtilmiştir. Çizelge 1.1’de yıllara göre ülkemizin buğday üretimi gösterilmektedir. Türkiye’de en fazla buğday üretimi İç Anadolu ve Marmara Bölgesi’nde gerçekleşmektedir. Bu iki bölge üretimin yaklaşık % 47’sini karşılamaktadır. Ülkemiz makarnalık buğday üretimine uygun olmasına karşın, makarnalık buğday ekim alanı buğday ekim alanının yalnızca % 19’unu kapsamaktadır. Makarnalık buğday üretiminde ise Güneydoğu Anadolu, Orta Anadolu ve Trakya-Marmara Bölgeleri ve bu bölgelerin diğer bölgelere geçiş oluşturan bölümleri, ekolojileri ile kaliteli makarnalık buğday üretimi için uygundur. Bu bölgelerin içinde ise; Güneydoğu ve İç Anadolu Bölgesi önde gelmekte ve toplam makarnalık buğday üretiminin yaklaşık % 60’nı bu bölgeler karşılamaktadır. Türkiye’de yılda yaklaşık 3 milyon ton makarnalık buğday üretiminin yapıldığı, fakat 2008 yılında özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde yaşanan kuraklık nedeniyle makarnalık buğday rekoltesinin 400 bin ton kadar azaldığı kaydedilmiştir. Ülkemizde makarnalık buğday, toplam buğday ekim alanının yaklaşık % 11’ini, üretimin ise % 9’unu oluşturmaktadır (Anonim 2008).

Ülkemizde yüksek verimli ekmeklik buğday çeşitlerinin, makarnalık buğday ekim alanlarında ekilmesi nedeniyle makarnalık buğday üretiminde önemli oranda düşüşler söz konusu olmaktadır. Bir yandan bu verime dayalı gelirin düşüklüğü, diğer yandan da yanlış fiyat politikaları nedeniyle azalan makarnalık buğday üretiminin arttırılması için, bu ürün lehine verim düşüklüğünü ortadan kaldırabilecek fiyat politikası uygulamaları yanında yüksek verimli yeni çeşitlerin ortaya konması büyük önem taşımaktadır.

Çizelge 1.1 Yıllara göre ülkemiz buğday üretimi

Dönemi	Buğday Üretimi(Ton)
2008	17 800 000
2007	17 234 000
2006	20 010 000
2005	21 500 000
2004	21 000 000
2003	19 000 000
2002	19 500 000
2001	19 000 000
2000	21 000 000
1999	18 000 000
1998	21 000 000
1997	18 650 000
1996	18 500 000
1995	18 000 000

Bilindiği gibi yerkürede yaşamın sürmesi ve besin döngüsünün (bitki-hayvan-insan) devamlılığı bitkisel üretime bağlıdır. Ekim alanlarının tarım dışı kullanımlara yönelik olarak değerlendirilmesi, erozyon, tuzlanma ve çölleşme yoluyla toprak verimliliğinin azalması, üretim alanlarının daralmasına neden olmaktadır. Bu etmenler karşısında üretimin artırılarak sürdürülmesi yüksek verimli, biyotik (hastalık ve zararlı) ve abiyotik (kuraklık, soğuk, tuzluluk gibi) baskılara dayanıklı kaliteli çeşitlerin geliştirilmesi ile sağlanabilecektir.

Diğer yandan buğdayın hem kalitesi hem miktar artışı açısından, daha hızlı bir genetik gelişime gereksinim duyulmaktadır. Bu yüzden buğdayla ilgili sitogenetik, karyotipleme ve haritalama çalışmalarının önemi giderek artmaktadır.

Kalıtımın temel kanunları ilk kez 1865'te Gregor Mendel tarafından atılmış ve o tarihlerde bilim adamları tarafından yeterince destek bulamamıştır. 19. yüzyılın ortalarında hücre bölünmesinin organizmaların çoğalmasında temel bir olay olduğu kabul edildikten sonra hücre, kalıtım ve evolüsyon kavramları birbirleriyle ilişkilendirilmiştir. Amerikalı sitolog W.A. Cannon ve E.B. Wilson 1902-1903 arasında genlerin ve kromozomların davranışları arasındaki ilişkiyi açıklamaya çalışmışlardır.

Genetik materyal denildiğinde ilk olarak kromozom terimi akla gelmektedir. Anne ve babaya ait kalıtsal karakterlerin açıklanmasında veya bir sonraki dölle aktarılmasında kromozomlar görev almaktadır. Kromozomlar ilk kez hücre bölünmesi araştırmaları sırasında 1880'li yıllarda keşfedilmiştir. W. Waldeyer 1888 yılında bazik boyalarla çok fazla boyanma kabiliyetinde olan bu iplikçiklere renkli cisim anlamına gelen kromozom adını vermiştir.

Bölünme halinde olmayan hücrelerde, genetik materyal kromatin olarak adlandırılan şekilsiz ve granüler bir yapı halindedir. Kromatinin boncuk dizisini andıran yoğun spiral yaptığı bölgeler kromomer olarak adlandırılır. Hücre bölünmeye başladığında kromatin daha sıkışık ve kitlesel bir yapı kazanarak kromozomları oluşturur. Kromozomlar en iyi hücre bölünmesinin metafaz ve anafaz safhalarında görülürler (Temizkan 1994, Kuru ve Gözükara 2001).

Kromozomlar üzerinde birbirinden farklı boyanma özelliğine sahip iki ayrı kısım vardır. Bunlardan koyu boyanan bölgeler heterokromatin, açık boyanan bölgeler ökromatin olarak adlandırılır. Genetik olarak inaktif olan heterokromatin bölgeler sıkıca katlanmış kromozom ipliklerinden oluşmaktadır (Temizkan 1994, Bozcuk 2000).

Her canlı türünün kromozom sayısı, şekli ve yapısı kendine özgü ve sabittir. Kromozom sayısı ile canlının organizasyon derecesi arasında bir ilişki bulunmamaktadır. Bir kromozomun uzunluğu 0.2 ile 50 µm arasında değişmektedir. Çapı ise; 0.2 ile 2 µm arasındadır. (Ozban 1994, Temizkan 1994).

Buğdayda temel kromozom sayısının 7 olduğunun saptanmasından ve doğada buğdayların 14, 28, 42 kromozom sayıları gösteren üç grup oluşturduklarının anlaşılmasından sonra, bu üç grubun oluşumunda allopoliploidinin etkili olduğu, melezleme çalışmalarıyla gösterilmiş; diploid, tetraploid ve hekzaploid türler için genom formülleri belirlenmiştir (Kün 1983).

Diploid buğday grubunun genom formülü (AA), *T. timopheevi* dışındaki tetraploid grubun genom formülü (AABB), hekzaploid grubunki ise (AABBDD)'dir. Hekzaploid buğdaylardaki üçüncü genoma, yaygın olarak (D), bazı çalışmalarda ise (C) genomu adı verilmektedir. Poliploid buğdaylardaki genomlardan ikisinin (B ve D) *Aegilops* türlerinden kazanıldığını belirten görüşler, özellikle sitolojik ve moleküler tekniklerdeki gelişmelerin de katkısıyla, geniş çapta araştırılma olanağına kavuşmuştur.

Diploid buğdaylar kaplıca grubu olarak da bilinmektedirler. Bir genom çiftini (AA) içeren bu grupta somatik kromozom sayısı; $2n=14$ 'tür. Gruptaki buğdayların başak eksenini kırılıcıdır. Dış kavuzlar boydan boya kalın damarlı ve dış kavuz uçları dişlidir. Taneler sıkı yapılı ve camsıdır. Kavuzlar taneleri sıkıca sarar. Başakçıkta genellikle bir çiçek tane bağlar. Grubun yabani formu *T. boeoticum* adı verilen yabani kaplıcadır. Grubun kavuzlu kültür formu; *T. monococcum*'dur. Diploid grupta çıplak taneli kültür formu yoktur.

Tetraploid buğdaylar makarnalıklar grubu olarak da bilinmektedir. İki genom çiftini (AABB) içeren bu gruptaki buğdaylarda somatik kromozom sayısı $2n=28$ 'dir. Gruptaki buğdaylar genel olarak kılçıklıdır. Üst boğum arasının başak altındaki kesimi özle doludur. Başak eksenini üzerinde başakçıklar sık ve düzgün biçimde dizilmişlerdir. Başağın görünüşü yanlardan basıktır. Tane yapısı ise, uzunca ve camsı yapıdadır. Tetraploid grupta yabani form iki tanedir: (AABB) genomlarını taşıyan *T. dicocoides* ve (AAGG) genomlarını taşıyan *T. timopheevi*. Grubun kavuzlu kültür formu *T. dicoccum*; çıplak taneli kültür formları ise; *T. durum*, *T. turanicum (orientale)*, *T. turgidum*, *T. polanicum* ve *T. carthlicum (persicum)* türleridir (Gill *et al.* 1991).

Makarnalık buğday (*T. durum*), tetraploid grubun çıplak taneli kültür formlarındandır ve grubun genel karakteristik özelliklerini tam olarak taşır. Kalitesi nedeniyle ülkemizde ve dünyada tarımı yaygın olarak yapılan bir buğday türüdür. Üç alt türü vardır:

1-) *T. durum ssp. commune*: Asıl makarnalık buğday alttürüdür. Akdeniz ülkelerinde, A.B.D.'nde, Kanada'da önemli bir kültür formudur. Kökenini Türkiye'den alan bu alttür, buğdaylarımızın yaklaşık 1/3'ünü oluşturur. Bu alttürde başak uzunluğu ve sıklığı normaldir.

2-) *T. durum ssp. duro-compactum* (Makarnalık-topbaş buğday): Başak üzerinde başakçıkları daha sık dizilmiştir. Un verimi ve makarnalık kalitesi çok yüksektir. Güneydoğu, Trakya ve Doğu geçit bölgelerimizde yetiştirilmektedir.

3-) *T. turanicum* (Turandili buğday): Tanesi iri ve uzun, camsı fakat makarnalığa elverişli değildir. Kardeşlenmesi az, yaprakları geniş, verim ve kalitesi düşüktür. Ege ve Akdeniz kıyı bölgelerimizde az da olsa ekimi yapılmaktadır.

Hekzaploid buğdaylar ekmeçlik grubu olarak da bilinmektedirler. Üç genom çiftini (AABBDD) içeren bu grup buğdaylarda somatik kromozom sayısı $2n=42$ 'dir. Gruptaki buğdayların başak eksenini, özellikle speltoid formlarda uzundur. Ancak başak eksenini en kısa olan *sphaerococcum* alttürü de bu gruptadır. Omurga, dış kavuz boyunun üstten yarısı boyunca belirgindir. Dış kavuzun alt kesimi, öteki gruplardakine oranla daha geniştir. Bu yüzden grubun çıplak taneli formlarında tane dökme önemli bir sorundur. Grubun kavuzlu kültür formları; *spelta*, *macha* ve *vavilovii*; çıplak taneli kültür formları ise; *vulgare*, *compactum* ve *sphaerococcum* alttürleridir (Chao *et al.* 1989, Kam-Morgan *et al.* 1989).

Japonya'da Kihara (1965) *T. monococcum* x tetraploid buğday melezinin F_1 'inde 7 bivalent ve 7 univalent oluşturduğuna dayanarak, *T. monococcum*'la tetraploid buğdaylarda yalnız bir genomun (A) ortaklaşa bulunduğunu göstermiştir. Daha sonra *T. spelta* x *T. monococcum* melezinin F_1 'inde en çok 7 bivalent bulunmasıyla; hekzaploid buğdayların da *T. monococcum*'la ortaklaşa bir genomu (A) taşıdıkları anlaşılmıştır. Böylece gerek tetraploid gerek hekzaploid buğdayların oluşumuna *T. monococcum*'un (A) genomuyla katıldığı görüşü yaygın biçimde benimsenmiştir.

Buğdaydaki (B) genomunun bir *Aegilops* türünden gelmiş olduğu görüşü yaygındır. Yapılan çalışmalarda; diploid ve tetraploid buğdaylar ve tetraploid buğdayla *Aegilops speltoides* arasındaki morfolojik benzerlik ve ayrılıkları göz önünde bulundurarak; (AABB) genomlu tetraploid buğdayların, (A) genomunu *T. monococcum*'dan, (B) genomunu *Ae. speltoides*'ten almış olduğu belirtilmiştir (Gupta 1991). Son yıllarda, moleküler tekniklerin ilerlemesiyle birlikte, B genomunun kökeniyle ilgili görüş ayrılıkları olmakla birlikte çalışmalar devam etmektedir.

Kromozom sayısı bakımından tetraploid buğdaylar arasında yer alan *T. timopheevi*, öteki buğdaylarla kolaylıkla melezlenememektedir. Bunun nedeni; kromozom sayısı aynı olmakla ($2n=28$) birlikte, *T. timopheevi*'deki ikinci genomun öteki tetraploidlerdeki ikinci genomdan farklı olmasıdır. Böylece *T. timopheevi*'nin (AAGG), öteki tetraploidlerin ise (AABB) genomunda oldukları anlaşılmıştır (Blanco *et al.* 1998).

Hekzaploid buğdaylardaki üçüncü genomun (D) kökeni konusundaki ilk araştırmalar *Ae. cylindrica* x *T. aestivum* melezleriyle başlatılmıştır. Bu melezlerin F₁'inde 7 bivalent + 21 univalent biçimde mayotik eşleşme görülmesiyle; bu anaçlardaki birer genomun aynı genomlar olduğu; daha sonra *Ae. cylindrica*'nın da iki diploid *Aegilops* türünden (*Ae. caudata* x *Ae. squarrosa*) birer genom almış olduğu anlaşılmıştır. Bu iki diploid türden *Ae. squarrosa* kromozomları, hekzaploid buğday kromozomlarından 7'siyle eşleşebilmektedir (Dubcovsky *et al.* 1996).

T. monococcum ve *Ae. speltoides*'in doğadaki melezlenmesi ve melezin poliploidleşmesinden tetraploid *T. dicoccoides*; *T. dicoccoides* x *Ae. squarrosa* melezlenmesi ve melezin poliploidleşmesinden de hekzaploid buğdayların türediği anlaşılmaktadır (Gupta and Reddy 1991). Kuşkusuz; bu melezlemelerle ortaya çıkan ilk türlerin binlerce yıllık evriminden sonra, buğdayın bugünkü formları meydana gelmiştir.

Bir bireye ait kromozomların sayıları, biçim ve büyüklükleri o ferden karyotipini oluşturur. Farklı karyotiplerin karşılaştırılması amacı ile bir karyotipteki kromozomların uzunlukları, uzun ve kısa kolların birbirine oranı ve sentromerin yeri göz önüne alınarak çizilen şematik şekillerine idiogram denir (Temizkan 1994).

Buğday kromozom morfolojisi, kromozomların toplam uzunlukları, uzun ve kısa kol uzunlukları ve oranları, sekonder boğumların sayısı ve yerleri gibi kriterleri kapsar. Mitoz incelemeleriyle kromozom morfolojilerine ilişkin ilk karyotip analizleri 1930'lara doğru Japonya'da başlamış, daha sonra birçok ülkede buğday ve ona genetik yakınlığı olan türler üzerinde yürütülmüştür. Moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte; özellikle SSR, AFLP, RAPD, RFLP markörleri ile *in situ* hibridizasyon tekniği buğday genom araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Glick and Pasternak 1998).

Buğdayda kromozom morfolojisinin incelenmesinde tek tek kromozom uzunlukları, toplam kromozom uzunluğu ya da hücre başına kromozom uzunluğu, uzun kol boyunun kısa kol boyuna oranı, satellitli kromozom sayıları, hücredeki nukleolus sayısı, ayrıca özel boğum ve segmentlerin bulunup bulunmaması gibi karakteristikler üzerinde durulur.

Yapılmış olan araştırmalara göre, buğdayda en kısa kromozom boyu en uzun kromozomun yaklaşık yarısı kadardır. Boylarına göre kromozomlar, uzundan kısaya doğru sıralanıp, numaralandırılırlar. Ancak, kromozom uzunluğu çevre koşullarına göre az-çok değişebildiğinden, tek başına güvenilir bir kriter olarak kabul edilemez.

Toplam kromozom uzunluğu ya da çekirdek başına düşen kromatin uzunluğu değişik ploidi gruplarında farklılık göstermektedir. Bu oranların, diploid: tetraploid: hekzaploid gruplar arasında 1:2:3 olması beklenirse de; yapılan farklı çalışmalarda 1:1; 5:2 olarak bulunması, tetraploid ve hekzaploid buğdayların evrim süreci içinde bir miktar kromatin kaybına uğramış olmalarından ileri gelmektedir (Dvorak and Zhang 1990).

Çevre koşullarının kromozom uzunluklarında yol açabileceği değişiklikler göz önünde tutulursa, kromozomların incelenmesinde kromozomun toplam boyu yerine; uzun kol/kısa kol oranının daha güvenilir bir kriter olabileceği anlaşılmıştır.

Diploid buğdaylarda kromozomların çoğunda kol uzunlukları arasındaki fark az olup buğday kolları az-çok simetrik. Diploid buğday türlerinden A genomunu taşıyan *Triticum boeoticum*'da satellitleri çok küçük olan 2 SAT kromozom, 3 submedian ve 2 median kromozom bulunmaktadır.

Tetraploid buğdayların kromozom kollarında böyle bir simetrik durum yoktur. Tetraploid buğday türlerinde 7 submedian, 2 subterminal ve 2 SAT kromozom yer almaktadır. Bu tetraploid türlerin kapsadığı 14 kromozomdan yalnız 3 tanesi median olan bir morfoloji göstermektedir.

Hekzaploid buğday kromozomlarında asimetri daha da belirgindir. Birçok *T. aestivum* çeşitleri, gerek uzun kol/kısa kol oranı; gerekse kromozom boyları bakımından, birbirlerinden bazı farklar göstermektedirler. Türler ve çeşitler arasında görülen bu farkların, kollardaki parça değişimlerinden (inversiyon, translokasyon ve delesyon) kaynaklanabildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Werner *et al.* 1992, Hohmann *et al.* 1994).

Kromozom sayısı yüksek ($2n=42$) olan hekzaploid buğdaylarda kromozom morfolojisinin incelenmesi, preparatlarda kromozomların net bir şekilde dağıtımının her zaman sağlanamaması nedeniyle, daha zordur. Hekzaploid buğdaylarda uzun kolun kısa kola oranı yaklaşık 1-2,5 arasında değişmektedir. Satellitli kromozomların sayısı 2-3 ve çoğunlukla 4'tür.

Kromozom morfolojilerinin incelenmesinde üzerinde durulan bir başka kriter de kromozomlardaki boğumların sayısıdır. Sentromeri birinci boğum kabul ederek, iki koldan oluşan tüm kromozomların en az bir boğum göstermeleri doğaldır. Sekonder boğumlar ise, uç kısımda satelliti taşıyan boğumlardır. Bu yüzden asıl farklı karakter tersiyer boğumun

bulunup bulunmamasıdır. Ekmeklik buğdayda bulunan tersiyer boğumlu kromozom sayısı üçtür. Satellitli kromozomlar ve üçüncül boğumlu kromozomlar, karyotip incelemesinde ötekilerden kolaylıkla ayırt edilebilir (Elçi 1982).

Buğdayda tür ya da populasyon düzeyinde, belli lokuslardaki farklılıkların saptanması için ise moleküler markörler kullanılmaktadır. Bu araçlar yüksek derecede polimorfizm görülmesine olanak sağlayarak farklılıkların saptanmasını mümkün kılarlar. İki türlü moleküler markör sistemi mevcuttur. Bunlardan birincisi PCR esaslı yöntemlerdir. Moleküler markör tekniklerinden RAPD, SSR, AFLP; PCR esaslıdır. Bu yöntemlerde esas, nükleotid sıralaması bilinen bir DNA parçasığının Polymerase Chain Reaction (PCR) aleti ile çoğaltılmasıdır. Bu amaçla yüksek ısıya dayanıklı bir polimeraz enzimi genellikle (Taq), dört temel nükleotid (A,T,G,C) ve 30 bp kadar uzunlukta bir DNA parçasığı (Primer) ile çoğaltılacak DNA'ya ihtiyaç vardır.

Buğdayın genetik linkage (bağlantı) haritaları, binlerce klasik mutasyon lokuslarından, restriksiyon parça uzunluk polimorfizm (RFLP), basit sekans-tekrar (SSR), kantitatif özellik lokus (QTL) ve ifade edilmiş sekans etiket (EST) işaretleyicilerinden oluşmaktadır (Davis *et al.* 1999, Lee *et al.* 2002, Fernandes *et al.* 2002, Sharopova *et al.* 2002).

RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polimorphic DNAs) ilk defa 1990'da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reksiyonu'nu (PCR) temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Williams *et al.* 1990). RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır. Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir (Welsh *et al.* 1990).

RAPD tekniğinin en büyük avantajı ilgilenilen taksonun genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir (Williams *et al.* 1990). Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilir ve bu oligonükleotid özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapmaktadır (Welsh *et al.* 1991). Bir primerle, farklı bitkilerin genomik DNA'ları farklı olacağından oluşacak RAPD belirteçler farklı olacaktır (Glick and Pasternak 1998). Bu farklılık organizmaların karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca radyoaktiviteye, Southern transferlere veya DNA hibridizasyonuna gerek

duyulmamaktadır. RAPD karakterlerinin sayısı ihtimal olarak sınırsızdır. Kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacaktır. Bu açıdan yakın türleri ayırmada izozimden daha duyarlıdır (Mathieu-Daudé *et al.*1997). Bununla beraber metodun sınırlılıkları da vardır. RAPD kullanım açısından kolay olmasına karşılık, belirteçleri dominanttır ve heterozigotları teşhis etmek zordur. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden önce yöntemin optimize edilmesi oldukça önemlidir (Tingey and Del Tufa 1993).

SSR (Simple Sequence Repeat, mikrosatellit) markörleri, ökaryotik genomlar boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır (Hamada *et al.* 1982, Weber 1990). Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'ların PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık SSR tekrarların sayısındaki farklılık PCR sonucunda farklı uzunlukta parça çoğaltımıyla sonuçlanır. SSR'ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PCR metodu vasıtasıyla bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir. Bitkiler aleminde ilk çalışmalar tarla bitkileri ile olmuş soya, pirinç, arpa ve buğday gibi bitkiler ile oldukça yakın zamanda SSR'ların karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (Aka-Kaçar 2001).

Mikrosatellitler kodominant kalıtım özelliği göstermeleri, lokusa özgü olmaları, yüksek bilgi içeriğine sahip olmaları ve PCR ile kolayca tespit edilebilmeleri gibi birçok özellikleri ile tercih edilen bir moleküler belirleyici grubudur. Mikrosatellitler ile ilgili en belirgin dezavantaj ise bir türe ait yeni mikrosatellitlerin elde edilmesidir. Bu işlem çoğunlukla zaman alıcı olup fazla miktarda emek gerektirir (Büyükünel-Bal 2003). SSR tekniğinin bitkilerde genetik haritalamadaki kullanımı, avantajlarından ötürü her geçen gün artmaktadır. SSR'lar yüksek oranda polimorfik olduklarından bitkilerde oldukça fazla bilgi verici özellik gösterirler. Ayrıca eş baskın markör vermesi ve PCR kolaylığına sahip olması nedeniyle kullanım oranı giderek artmaktadır.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi (EcoRI/MseI) ve biyotinle işaretlenmiş 2 adaptör kullanılarak restriksiyon fragmentlerinin uygun bir DNA ligaz ile birleştirilmesi, ligaz edilen bu adaptörlere uygun primer ile restriksiyon fragmentlerinin preamplifikasyonu, bu fragmentlerin özel

oluşturulan ve radyoaktif işaretlenmiş primerlerle gerçek amplifikasyonu ve PAGE (poliakrilamid jel elektroforez) de koşılması aşamalarından oluşur (Ergül 2000). Polimorfizm oranı çok yüksektir. Uygulanabilirliği, RAPD tekniğine göre kolay olmasa da RFLP tekniğine göre çok kolaydır. Kuruluş aşamasında maliyet gerektirir (Walton 1993). Masraf, iş gücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve RFLP arasında yer alır (Maughan *et al.* 1995).

RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism markerları) (Botstein *et al.* 1980), dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve oluşan DNA parçalarının elektroforezde ayrıldıktan sonra naylon veya nitroselüloz membrana transfer edilerek DNA proplarıyla etiketlenmesi esasına dayanır. RFLP markırları ile türler arasındaki ve içindeki farklılık kolayca belirlenir. Güvenilir, eş baskın (co-dominant) özellikte olup polimorfizm oranı orta düzeydedir. En önemli dezavantajı ise analizlerinin pahalı olması, fazla zaman, işgücü gerektirmesi ile fazla miktarda ve yüksek kalitede DNA'ya gereksinim duyulmasıdır (Walton 1993).

In situ melezleme (hibridizasyon) ise, nükleik asit dizilerinin morfolojik olarak korunmuş kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinde saptanarak gösterilmesini sağlayan ve temel olarak çift iplikli nükleik asit oluşumu kinetiğini kullanan güçlü bir tekniktir. *In situ* melezlemenin diğer melezleme yöntemlerinden (örneğin, Southern, Northern emdirimi) farkı; nükleik asitlerin kendi hücre ortamında tanınarak gösterilmesidir. Böylece hedef nükleik asit dizisinin hücredeki yeri belirlenmiş olur. Nükleik asitlerin buldukları yerde saptanması; kromozomların fiziksel haritalarının yapılmasında, kromozom yapılarının analizinde, kromozomların ve genomun yapı, işlev ve evriminin araştırılmasında, gen anlatımının belirlenmesinde önemlidir (Wilkinson 1992).

In situ hibridizasyon (Gall and Pardeu, 1969, John *et al.* 1969) ve yukarıda belirtilen moleküler markörlere dayalı tekniklerin geliştirilmesinden bu yana, buğdayda yapılan genetik ve hücre biyolojisi çalışmalarının, karyotipleme (Chen *et al.* 2000, Dong *et al.* 2000) ve fiziksel haritalama (Sadder *et al.* 2000, Sadder and Weber 2001) gibi birçok dalında bu teknikler kullanılmıştır. Ancak, buğday sitogenetiğinin zengin tarihine rağmen, buğday genlerinin fiziksel lokasyonu çoğunlukla bilinmemektedir (Harper and Cande 2000). Bu yüzden kromozom tanımlama için yeni tekniklerin geliştirilmesi, genom analizi ve sitogenetik için önemlidir (Dong *et al.* 2000).

Ancak, bu çalışmaların çoğunda, yüksek kallus oluşumu ve rejenerasyon frekansına sahip olan, etkili bir bitki doku kültürü yöntemi uygulamak ön koşuldur. Diğer yandan, dünya nüfusu gün geçtikçe artmaktadır. Artan nüfusun, besin ihtiyacının yeterli ve dengeli şekilde karşılanması için; besin maddeleri üretiminin hızlı bir şekilde artırılması gerekmektedir. Bitkisel üretimi arttırmanın iki yolu vardır. Ekim alanlarını arttırmak ve birim alan verimini arttırmak.

Günümüzde ekim alanlarının son sınırlarına gelinmiştir; toprak işlenmesinin erozyona yol açtığı alanlarda bile tarım yapılmaktadır. Artık işlenen alanları genişleterek, hızla artan nüfusun beslenme gereksinimlerini karşılama olanağı kalmamıştır. Hatta erozyonun önlenmesi için işlenen tarım alanlarının daraltılması söz konusudur. Bu yüzden, birim alan veriminin yükseltilmesi gerekmektedir. Bu da üstün verimli, kaliteli, biyotik ve abiyotik streslere dayanıklı çeşitlerin ıslahı ve uygun yetiştirme teknikleri kullanılarak yetiştirilmeleri ile mümkündür.

Buğdayın, bugün tarımı yapılan kültür formlarının oluşmasında yabani buğday türleri ile *Aegilops* türleri arasında doğada kendiliğinden meydana gelen melezlemelerin, poliploidleşmelerin ve seleksiyonun etkili olduğu kabul görmektedir.

Buğday ıslahında kullanılan yöntemler; introdüksiyon, seçme, melezleme, mutasyon ve poliploididir. Bu yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen ıslah çalışmalarında, başarıyı etkileyen iki önemli konu vardır. Bunlar; varyasyon ve seleksiyondur. Varyasyon, küçük değişmelerle yıllar boyunca kendiliğinden olduğu gibi; melezleme, mutasyon ve poliploidi ile yapay olarak da oluşturulabilir. Seleksiyon, amaca uygun bitkilerin seçilmesidir. Seleksiyon yapılırken sürekli kontrolle karşılaştırma yapılır.

Günümüze kadar binlerce çeşidin geliştirilmesini sağlayan, klasik ıslah yöntemlerinin birçok eksik ve olumsuz yönleri de vardır.

Seleksiyonda başarı varyasyonun genişliğine bağlıdır. Bu yöntem geçmişte başarıyla uygulanmasına karşın, günümüzde yerel ve köy çeşitlerinin ekim alanlarının daralması ve bu değerli genetik materyallerin kaybolması sonucu seçmenin yapılacağı populasyon çok daralmıştır. Ayrıca geniş ekim alanlarına ihtiyaç duyulması, seçmelerin uzun yıllar sürmesi ve masraflı olması bu yöntemin olumsuz yönleridir.

Melezleme ile ancak yakın türler arasında gen geçişi sağlanabilmekte, uzak türler ve cinsler arasında doğal izolasyon nedeniyle melez bitki elde edilememektedir. Bu yüzden yabancı türler arasında genetik çeşitlilik zengin olmasına karşın; kültür bitkilerinde genetik çeşitlilik giderek daralmaktadır. Ayrıca melezlemede bağlılık nedeniyle istenen genlerin geçişinin yanında istenmeyen genler de geçmekte, bağlılığın kırılması ise bazen mümkün olmamaktadır. Bağlı olmayan genlerde ise; sadece istenen karakterlerin bir genotipte toplanıp, diğerlerinin elenmesi uzun yıllar süren geri melezleme çalışmalarını gerektirmektedir. Bütün bunlar, uzun zaman süren, yoğun iş gücü isteyen, masraflı çalışmalardır.

Mutasyon ıslahında ise, uygulanan mutagenlerin ne tür etki göstereceğini önceden saptamak mümkün olmamakta; düşük doz mutagen uygulamaları etkisiz, yüksek dozlar ise öldürücü olmaktadır. Somatik hücrelerde meydana gelen değişimler ise, tohumla üreyen bitkilerde gelecek nesillere aktarılamamaktadır.

Poliploidi ıslahında da bazı problemler ortaya çıkmaktadır. Poliploid bitkilerde mayoz bölünme sırasında; kromozomlar homologlarını bulmakta güçlük çekmekte, kromozom sayısı dengesiz gametler oluşmakta, kısırlık sorun olmaktadır. Bu yüzden tane bağlama oranı düşmektedir.

Sayılan bütün bu olumsuzluklar modern biyoteknoloji ve genetik mühendisliği teknikleriyle ortadan kaldırılabilmektedir. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla, izole edilmiş bir genin doğrudan aktarılması söz konusu olduğundan, öncelikle farklı türler ve cinsler arası gen aktarımında melezleme zorluğu ortadan kaldırılmakta, klasik ıslahta yabancı gen kaynaklarından yararlanmada en önemli engel olan doğal izolasyon bir başka deyişle kısırlık ve uyumsuzluk sorunu da çözülmektedir. Modern biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasıyla, klasik ıslahta farklı cinsler arası gen aktarımında ikinci büyük engel olan bağlılık (linkage) nedeniyle istenmeyen genlerin de mezlere geçmesi sorun olmaktan çıkmaktadır. Klasik bitki ıslahının temelini oluşturan varyasyon ve seleksiyon, biyoteknolojik çalışmalarda karşımıza transformasyon ve *in vitro* seleksiyon olarak çıkmaktadır. *In vitro* seleksiyonlar, tüm bitki yerine hücre seçimine olanak sağlamakta; bu ise tarlada bitlerce bitki yerine, petri kutularında hücre düzeyinde çalışmak anlamına gelmektedir. *In vitro* koşullarda seleksiyonun herhangi bir zamanda yapılabilmesi nedeniyle, bitkinin gelişme dönemlerine bağlı kalınmaması da önemli bir olanak

sağlamaktadır. Bu nedenle gelecekte yeni bitki çeşitlerinin geliştirilmesinde biyoteknolojik yöntemlerden önemli ölçüde yararlanılması gerekmektedir (Özgen vd. 2005).

Buğdaya uygulanan ileri tekniklerden olan ve gen aktarımı gibi ileri biyoteknolojik tekniklerin uygulanması için temel basamağı oluşturan doku kültürü; aseptik şartlarda yapay bir besin ortamında hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından (eksplant) kontrollü çevre koşullarında, yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak, kaybolmakta olan türlerin korunması ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde rutin olarak uygulanmaktadır.

Doku kültürü çalışmalarının başlangıcı hücresel teorilere dayanmaktadır. Bu teorilere göre; hücre kendi kendine çoğalabilir ve totipotenttir (Schleiden 1838, Schwann 1839).

Son yüzyılda, klasik ıslah yöntemlerinden yararlanılarak, üstün verimli ve kaliteli birçok çeşit geliştirilmesine rağmen başta hastalık ve zararlılar olmak üzere bazı biyotik ve abiyotik çevresel baskılara karşı dayanıklılıkta istenilen sonuca ulaşamamıştır (Özgen vd. 2000).

Kallus kültürü ve embriyo kültürü en önemli doku kültürü yöntemleri arasında yer almaktadır. Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınması embriyo kültürü olarak tanımlanmaktadır. Embriyo kültürleri; temel araştırmalarda, tohumdaki çimlenme durgunluğunu (dormancy) ortadan kaldırmak, belirli bir süre içerisinde daha fazla generasyon elde ederek ıslah süresini kısaltmak, haploid bitki üretmek ve bu haploidlerden bitki ıslahı ve genetik çalışmalarda faydalanmak amacıyla uygulanmaktadır. Bunun yanı sıra, türler arası ve cinsler arası melezlerin elde edilmesi bakımından da büyük önem taşımaktadır. Türler ve cinsler arası melezlemeden sonra normal bir şekilde oluşan fakat etrafındaki dokunun (endosperm ve kotiledonların) olumsuz etkisinden dolayı gelişemeyen embriyoları kurtarmak ve bunlardan canlı melez bitkiler elde etmek için embriyo kültürü tekniğine başvurulur. Böylece normal yolla elde edilemeyen melez bitkiler elde edilir (Bohorova 1985). Ayrıca embriyo kültürleri, genellikle fizyolojide zigotik embriyoların gelişmesi üzerine çevre şartlarının, fitohormonların etkisi, embriyoların besin metabolizması, embriyolojik incelemeler, özellikle bitkilerin besin istekleri, dormansinin durumu ve sebepleri, tohum gelişme fizyolojisi, morfogenesis çalışmaları, embriyo ile endosperm

veya embriyo ile kotiledonlar arasındaki karşılıklı ilişkilerin araştırılması için de kullanılabilir (Yeung *et al.* 1991).

İki tip embriyo kültüründen söz edilmektedir. Bunlardan ilki olgun embriyoların kültürüdür. Bu kültür oldukça kolaydır ve basit bir kültür ortamı ile başarılı sonuç alınmaktadır. Böylece embriyonik büyümeyi incelemek ve büyüme dönemlerini ortaya koymak, dormansi ve çimlenmenin metabolik ve biyokimyasal ayrıntılarını analiz etmek mümkün olmaktadır. Diğeri ise; olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyoların kültürüdür. Bu tip kültür erken embriyo dönemlerinden itibaren embriyoların besin ihtiyaçlarının ortaya konulmasını ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Embriyonun izolasyonu oldukça zor bir iştir bu nedenle güç olan bir kültür yöntemidir.

Genellikle doku kültürü çalışmalarında olgunlaşmamış embriyolar, diğer eksplantlara oranla bitki rejenerasyonu bakımından daha yüksek verime sahip olduklarından, yaygın olarak kullanılmaktadır (Huang and Wei 2004). Ancak, olgunlaşmamış embriyoların elde edilmelerindeki sınırlamalar bu eksplantın kullanımını güçleştirmektedir. Bu nedenle, yılın her döneminde elde edilmesi mümkün olan olgunlaşmış embriyoların kullanılmasına ilişkin araştırmalara ağırlık verilmiş ve son yıllarda geliştirilen endosperm-destekli kallus oluşturma tekniklerinin kullanılmasına da başlanılmıştır (Bartok ve Sagi 1990, Özgen vd 1996, Özgen vd 1998).

Bilindiği gibi, bitki biyoteknolojisinde önemli bir yeri olan kallusların elde edilmesinde kallus kültürü yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle doku kültüründe, rejenerasyon oranının düşük olduğu tahıllar gibi monokotiledon bitkilerde rejeneratif bitkilerin oluşturulmasında bu kültürün ayrı bir önemi vardır.

Kallus kültürü, bitki parçalarının uygun besin ortamlarında kallus oluşturmasıdır. Kallus ise, düzenli olmayan hücrelerin oluşturduğu bir yara dokusudur (Gamborg *et al.* 2001) ve doku kültüründe yapılan çalışmaların çoğunda bir kallus aşamasından geçilerek başarıya ulaşılır (Gamborg *et al.* 2001, Groose *et al.* 2004). Bu nedenle kallus dokusunun başlatılması, geliştirilmesi ve sonuçta bunlardan bitkilerin elde edilmesi her doku kültürü çalışmasında olduğu gibi, buğdayda yapılan doku kültürü çalışmalarında da başarılması gereken ön şartlardandır (Torello *et al.* 2004). Yani kallus kültürleri bu yönüyle bitki doku kültürlerinin en önemli başlangıç adımını oluştururlar. Bunun yanı sıra kallus kültürü değişik amaçlarla da yapılmaktadır.

Kallus kültüründe genellikle, gövde ve köklerdeki kambiyal dokular kullanılmakla birlikte; meyve, polen, endosperm, özellikle de olgun ya da olgunlaşmamış embriyolar da başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır. Ancak herhangi bir tür veya çeşidin başarılı rejenerasyonu için özel bir eksplant gerekli olabilir.

Kallus kültüründen öncelikle bitkilerin çoğaltılması için faydalanılır (Ahlodwalia 1981, Han and Quqian 1981). Burada kültüre alınan bitki kısımlarından önce kallus oluşumu sağlandıktan sonra bu kallus parçalanarak, parçalardan sürekli alt kültür yapılır ve çoğaltılır. Daha sonra bunların gelişme ortamlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin (oksinler, sitokininler vb.) değişik miktarları katılarak bunlardan kök ve sürgün gelişimi teşvik edilip, bitkicikler elde edilir (Evans *et al.* 1981, Gamborg *et al.* 2001, Torello *et al.* 2004).

Kallus kültüründen elde edilen varyasyonlardan çeşitli şekillerde yararlanılmaktadır. Kallus kültüründen elde edilen bitkiler arasında, morfolojik, ploidi düzeyi, kromozom sayısı, verim ve enzimatik ürünler yönünden varyasyonlar birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Groose *et al.* 2004). Bu tür genetik varyasyonlar uzun süreli kültürlerde, kültürün yaşı ilerledikçe artar (Oomd 1991).

Kallus kültürünün uzun süre devam ettirilmesi sonucunda kromozom sayısında azalma ya da artmalar meydana gelmektedir. Kallusun gelişmesi sırasında kromozom katlanmasına (poliploidleşme) eğilimi vardır ve bu endopoliploidi yoluyla meydana gelir (Skirvin 1998). Kromozom sayılarındaki bu değişmelere ek olarak, delesyonlar, translokasyonlar, inversiyon ve benzeri gibi kromozomal yapı değişiklikleri de meydana gelmektedir (Evans and Reed 1981). Kallus kültürlerinde görülen kromozom yapı ve sayısındaki değişmelerin neden olduğu genetik varyasyonlar, başlangıçta tekniğin kullanışlı olmaması açısından araştırmacılar tarafından bir engel gibi kabul edilmişse de, daha sonra bu varyasyonlardan bitki ıslahında ve genetik çalışmalarda faydalanılabileceği anlaşılmıştır. Varyasyonlar bitki ıslah çalışmalarında çok önemlidir. Bitki ıslahında bir gelişme ve ilerleme sağlanabilmesi için öncelikle üzerinde çalışılan populasyonun belirli bir varyasyon göstermesi gerekmektedir. Ancak üzerinde yoğun ıslah çalışmaları yapılmış bitkilerde bu genetik varyasyon daralmış ve bu durum ıslahçıların yeni varyasyon kaynaklarına yönelmelerini gerektirmiştir. (Crocoma *et al.* 1991). İşte kallus kültürleri bu yönden sahip olduğu potansiyelle ıslahçıların ihtiyaçlarına cevap vermekte ve kallus kültürlerinden zirai kullanıma elverişli bitkilerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Kallus kültüründe

görülen poliploidleşme özelliğinden anter kültürüyle elde edilmiş haploidlerin katlanmasında ve ayrıca diğer katlama işlemlerinde de faydalanılmaktadır (Skirvin 1998).

Kallus kültürleri, gerek sahip oldukları genetik varyabilite ve gerekse mutasyon çalışmalarında kullanım kolaylığı ve seleksiyonda etkinlik sebebiyle üstün genotipli bitkilerin geliştirilmesinde büyük bir potansiyele sahiptir. Bunun yanı sıra, kallus kültürü; hücre ve protoplast kültürlerinin elde edilmesinde başlangıç materyali olarak, gen transferi için eksplant olarak kullanılmaktadır. Diğer bir kullanım alanı ise; bitkilerden elde edilen alkaloid, sitokinler, steroidler ve benzeri ikincil metabolit ürünlerin kallus kültürüyle üretimidir. Kallus oluşturmanın yararlarından biri de kallustan farklılaşan bitkiler arasında görülen somaklonal varyasyondan ıslah programlarında yararlanılmasıdır. Ayrıca *in vitro* ortamda kimyasal ve fiziksel mutagen uygulamalarıyla hastalıklara, antibiyotiklere, herbisitlere dayanıklılık ve yüksek tuz, düşük sıcaklık ve susuzluğa toleranslı mutant hücre seçimleri yapılabilmektedir (Sharma *et al.* 2003). Yine bitki ıslahında önemli konulardan biri olan genetik materyalin muhafazası için, doku kültürüyle muhafaza yöntemi kullanılmaktadır. Bu amaçla bitkilerin çeşitli şekillerde doku kültürlerine alınmaları da bunlardan biridir. Fakat kallus kültürleri sahip oldukları genetik varyabilite nedeniyle bazı araştırmacılar tarafından özellikle önerilmektedir.

Bununla birlikte asıl gelişmeler, bitkilerde doğal olarak bulunan büyüme düzenleyicilerin fark edilip kullanılmasından sonra olmuştur. Ardından bitkilerin mikroçoğaltım çalışmaları süre gelmiştir.

Bitkilerde büyüme en önemli fizyolojik olaylardan biridir. Uzun yıllar boyunca, bitkilerin büyüme nedenleri hakkında ayrıntılı bilgiler elde edilememiş, büyüme fizyolojisi bilinmekle beraber bu büyümeyi sağlayan maddelerin neler olduğu bulunamamıştır. Daha sonraları bitki bünyesinde bazı büyümeyi teşvik eden maddelerin sentezlendiği tespit edilmiş ve bunlara hormonlar ya da fitohormonlar denilmiştir. Zamanla bitki bünyesinde sadece büyümeyi teşvik eden maddelerin değil aynı zamanda büyümeyi engelleyen maddelerin de sentezlendiği anlaşılmıştır. Bu maddeler bitkilerde çok düşük yoğunluklarda bulunmakta ve bitkilerde önemli görevler üstlenmektedirler. Ayrıca, yapıları bitkilerde bulunan doğal hormonlara benzeyen sentetik düzenleyiciler de üretilmiştir ve bunlara, büyüme ve gelişme düzenleyicileri denmiştir. Elde edilen maddelerin bir kısmı büyümeyi teşvik ederken diğer bir kısmı da engellemektedir. Hatta aynı düzenleyici farklı zaman ve yoğunluklarda uygulanırsa, farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (Westwood 1993).

Doğal büyüme düzenleyicilerinin bir grubu olan oksinler, doğal ve sentetik oksinler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Doğal oksinler; IAA (Indoleacetic acid), 4-CPA (4-chloro-indole asetik asit) ve fenil asetik asittir. Sentetik oksinler ise NAA (Naphthaleneacetic acid), BNOA (β -naphthoxyacetic acid), IBA (Indolebutyric acid), 3-CPA (3-chlorophenoxypropionamide), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid), 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) ve 2,4,5-TP (2,4,5-trichlorophenoxy propionic acid) vb.'den oluşurlar.

Oksinler, bitkilerin büyüme gösteren uç kısımlarında (kök, tomurcuk, yaprak vb.) en yüksek yoğunluğa ulaşmaktadır. Oksinlerin uzamayı hızlandırması, hücre büyüme ve bölünmesini artırmasının bir sonucudur. Hücre büyümesini artırması oksinin hücrenin ozmotik sisteminde oluşturduğu bazı değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Oksinler, hücrede osmozun artırılması, hücrenin suya karşı geçirgenliğini yükseltmesi, hücre çeperi basıncında düşmeye neden olması, hücre çeperi sentezinde artış oluşturması, hücre çeperi esnekliğini ve genişliğini artıran özel RNA ve protein yapısındaki enzimlerin sentezini artırması gibi nedenlerden dolayı, hücre büyümesinde etkili olmaktadır (Westwood 1993).

Doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak sentetik oksinlerden, özellikle de 2,4-D'den yararlanılmaktadır. 2,4 D genellikle düşük konsantrasyonlarda; hücre gelişimi, hücre bölünmesi, meyve gelişimi, köklendirme çalışmaları için kullanılmaktadır (Holt *et al.* 1993). Açık formülü $C_8H_6Cl_2O_3$, moleküler ağırlığı $221,04 \text{ gr Mol}^{-1}$, erime noktası $140,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ($413,5 \text{ K}$), kaynama noktası $160 \text{ }^\circ\text{C}$ ($0,4 \text{ mm Hg}$), su içerisindeki çözünürlüğü $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de 900 mg/l ' dir. Sıçanla yapılan çalışmalarda LD_{50} akut toksisite değeri 639 mg/kg olarak belirtilmiştir (Lerda *et al.* 1991). Farklı araştırmacılar ve kurumlar tarafından 2,4-D'nin kanserojen etkisi ile ilgili farklı açıklamalar ve yayınlar yapılmıştır. 8 Ağustos 2007 tarihinde Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı yapılan çalışmaların 2,4-D'nin insanda kanser yapıcı etkisi olduğunu kanıtlamadığını açıklamıştır (Anonymous 2009a). Ancak Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) 2,4-D içerisindeki kimyasalların insanda kanser yapıcı özellikte olduğu ile ilgili çeşitli yayınlar yapmıştır (Anonymous 2009b). Amerika Birleşik Devletleri'nde 13 bilim adamının katıldığı panelde çeşitli görüş ayrılıkları yaşanmasına rağmen 2,4-D'nin kanserojen etkisi bulunduğu belirtilmiştir (Bond *et al.* 1991). Avrupa Birliği 2,4-D kullanımını belli şartlar çerçevesinde onaylamıştır ama insan ve hayvan sağlığı üzerine olumsuz etkileri olduğunu belirtmiştir (Anonymous

2009c). Bununla birlikte Danimarka, Norveç, Kuveyt, Kanada'da 2,4-D'nin kullanımı sınırlandırılmıştır (Anonymous 2009d).

2,4-D laboratuvar çalışmalarında, bitki doku kültürü ortamında yaygın olarak yer almasının yanı sıra yüksek konsantrasyonlarda; tarımda önemli bir herbisit olarak da kullanılmaktadır. Zirai mücadele yöntemleri içinde yabancı otlarla mücadelede çok yaygın olarak kullanılan 2,4-D herbisitinin özellikle yüksek dozlarda, rejeneratif bitkilerin kromozomlarında yapısal ya da sayısal olarak önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Ahloowalia 1982, Bai and Knott 1993). 2,4-D yaklaşık 50 yıldır dünyada yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır ve yüksek dozlarda kullanıldığında bitki metabolizmasında gerçekleşen enzim aktivitesi, nükleik asit sentezi, protein sentezi ve hücre bölünmesi gibi bazı olayları etkileyerek bitki gelişimini engellemektedir (Seiler 2006). 2,4-D'nin *in vitro* ortamda kromozomlar üzerindeki olumsuz etkisinin de olduğu sitolojik çalışmalar ile belirlenmiştir. Aynı zamanda 2,4-D'nin yüksek dozu somaklonal varyasyona neden olmaktadır. Bu nedenle doku kültürü kaynaklı varyasyonu azaltmak için 2,4-D seviyelerinin daha düşük olması gerekmektedir (Mendoza and Kaepler 2002). Çeşitli konsantrasyonlarda 2,4-D'nin kullanıldığı çalışmalar sonucunda, kromatit ve kromozomlarda kırıkların arttığı, yapısal ve sayısal değişikliklerin olduğu bilinmektedir (Zeljezic and Garaj-Vrhovac 2004). Bu nedenle, yüksek oranda kallus oluşumunu sağlayan ve kromozom yapısına zarar vermeyen yeni oksinlerin belirlenmesine büyük gereksinim duyulmaktadır. Bu maddelerden biri olan picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) bitki biyoteknolojisi çalışmalarında genellikle 0.001-10 mg/lt konsantrasyonlarında kullanılan, somatik embriyogenesisi arttıran ve düzenleyen önemli bir sentetik oksindir. Moleküler formülü $C_6H_3Cl_3N_2O_2$, molekül ağırlığı 241.5 g'dır. İlk olarak Collins (1978) tarafından bitki doku kültürü çalışmalarında oksin olarak kullanılmıştır. Kristal yapıda ve beyaz renklidir. Oda sıcaklığında muhafaza edilir, 1 N NaOH içerisinde çözünür, erime noktası 218,5 °C'dir.

Picloram bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılmasının yanı sıra, Grazon ve Tordon ticari isimleriyle bilinen, odunsu bitki kontrolü ve geniş yapraklı otların kontrolü için kullanılan bir herbisittir. 2,4-D'nin kanserojen ve toksik etkisini kanıtlayan çalışmaların varlığının yanı sıra, picloramın kanserojen ve toksik etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda herhangi bir olgu kanıtlanamamıştır. Farelerle, yüksek ve geniş bir doz aralığında (1.000 ile 2.000 mg / kg / gün) 13 hafta süreyle yapılan çalışmada farelerin

klirik ve kan değerlerinde herhangi bir değişime rastlanmamıştır. Farklı dozlarda (30-1,000 mg/kg/gün) yapılan 32 gñnlük çalışmada ise; yaşayan farelerde herhangi bir etkiye rastlanmamıştır (Anonymous 1984). Köpek, koyun ve sığırla 1 ay süreyle yapılan çalışmada hiçbir etkiye rastlanmamıştır. 1,000 mg/kg doz ile beslenen hamile farelerde yapılan çalışmada herhangi bir teratojenik etkiye rastlanmamıştır (Anonymous 1992). *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan testte herhangi bir mutajenik etkiye rastlanmamıştır. (Anonymous 1983). Günde 150 mg/kg veya 250 mg/kg ortalama dozlarla beslenen farelerle yapılan ve 80 hafta süren çalışmada herhangi bir kanserojen etki görülmemiştir (Walker *et al.* 1992). Bu yüzden, picloramın 2,4-D'ye alternatif oluşturabilecek, çok daha az zararlı bir bitki büyüme düzenleyicisi olduğu söylenebilir.

Bu tezde, doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan sentetik oksinlerden 2,4-D'nin (dichlorophenoxyacetic acid) ve günümüzde kullanılmaya başlanılan picloramın (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) kallus gelişimi üzerine olan etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. En yüksek kallus oluşumu değerlerini veren picloram ve 2,4-D dozları belirlenmiştir. Ayrıca bu iki bitki büyüme düzenleyicisinin, kallus gelişiminde etkili olarak belirlenen dozlarının, bitkide herhangi bir kromozomal bozukluğa neden olup olmadıkları da sitolojik çalışmalarla saptanmıştır. Bu sayede bitki biyoteknolojisi alanında yapılan doku kültürü çalışmalarında en az zararlı etkiye sahip bitki büyüme düzenleyicisi kullanımı sağlanmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sears and Deckard (1982), buğdayın olgunlaşmamış embriolarından embriyogenik kallus oluşumunu ve kallusların rejenerasyon kabiliyetlerini araştırmışlardır. Ele alınan 29 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriolarını MS+1 mg/l 2,4-D içeren ortam üzerinde kültüre almışlardır. Elde edilen embriyogenik kalluslar MS+1 mg/l 2,4-D içeren ortam üzerinde kültüre alınarak çoğaltılmıştır. Buğday kallusları MS+0.1 mg/l 2,4-D içeren ortam üzerinde kültüre alınarak bitki rejenerasyonu teşvik edilmiştir. Kalluslardan rejenere edilen bitkiler bazal MS ortamı üzerinde kültüre alınarak rejenerasyon işlemi tamamlanmıştır. Yapılan bu çalışmada 18 buğday genotipi 4 kez alt kültüre alındıktan sonra (yaklaşık 90-125 gün) kalluslarda rejenerasyon yeteneği belirlenirken, 5 buğday genotipinde ise 240 gün sonra totipotensinin kaybolduğu belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, kallus oluşum ve gelişiminin, kalluslardaki totipotensinin, rejenerasyon kabiliyetinin genotipe bağlı olduğu ve uygun genotip kullanıldığında ise olgunlaşmamış embriolardan stabil bir şekilde embriyogenik kalluslar elde edilebileceği belirlenmiştir.

Ozias-Akins and Vasil (1983), Gamborg B5 ortamında 2,4-D'nin farklı miktarlarının (0; 0,4; 1,0; 4,0 ve 8,0 mg/l) kallus oluşumu ve gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar 2,4-D miktarındaki artışla birlikte eksplant başına kallus taze ağırlığının ve hücre sayısının arttığını ve 2,4-D'nin 2 mg/l ve daha yüksek miktarlarında düzensiz büyüdüklerini, ancak hücre bölünmesinin arttığını aynı zamanda kallus oluşumu ve gelişimi için 2 mg/l 2,4-D miktarının optimum olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sitolojik deneylerle, aceto-carmine boyama yöntemi kullanılarak yapılan preparatlarla, kromozom sayısında değişme olmadığını ($2n=6x=42$) göstermişlerdir.

Zhou and Lee (1983), "Chinese spring" ve "Frederick" buğday çeşitlerinde 2,4-D ve diğer 12 oksin tipinin olgun embriyodan kallus oluşum oranına etkisini araştırmışlardır. Yazlık "Chinese spring" buğday çeşidinde kallus gelişimi üzerine 2,4-D ve dicambanın picloramdan daha üstün olduğunu bunun aksine kışlık "Frederick" buğday çeşidinde ise dicambanın ve picloramın kallus gelişimi üzerine etkisinin 2,4-D'ye eşit olduğunu bildirmişlerdir.

Bajaj (1984), buğday ve çeltiğin, anter ve olgunlaşmamış embriolarını sıvı azot içerisinde saklayarak eksplantların rejenerasyon kabiliyetini araştırmıştır. Sıvı azot içerisinden çıkarılan eksplantlar MS+0.2 mg/l 2,4-D içeren ortam üzerinde kallus gelişimini araştırmak

için kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyogenik kalluslar rejenerasyon için MS+1 mg/l IAA+ 5 mg/l BAP+ 500 mg/l kasein hidrolizat içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda, polen ve olgunlaşmamış embriyoların sıvı azot içerisinde uzun süre canlılığını koruduğu ve bunlardan da bitkiler elde edilebildiği ortaya konulmuştur.

Wernicke and Milkovits (1987), *Triticum timopheevi* Zukh'un genç yapraklarından elde edilen 1 mm. uzunluğundaki kesitleri laboratuvar ortamında kültüre almışlardır. Düşük oksin konsantrasyonunda en temeldeki hücreler, oldukça meristemsi eksplantlar kültürde kolayca bölünmüştür, fakat oksin yokluğunda kısa zamanda bölünmeyi bırakmışlar ve mitoz hücre döngüsünün G1 ve G2'sinde kalmışlardır. Çoğu hücrenin G1'de kaldığı meristemin bitişiğindeki bölgede hücre bölünmesini tekrar başlatmak için çok yüksek oksin konsantrasyonu kullanılmak zorunda kalmıştır. Toplam yaprak uzunluğunun %50'sinden daha azına denk gelen ve potansiyel olarak oksine duyarlı bölgenin üzerinde, kesip çıkarıldığı zaman oksin yokluğundaki bir kısım hücrede çekirdeksel DNA replikasyonu sergileyen doku izlenmiştir. Bununla beraber bu hücreler ne oksin varlığında ne de yokluğunda mitoz döngüyü tamamlamamışlardır. Bu duyarlılık kaybının hücre döngüsü kontrolündeki bir oksin ayrımıyla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür.

Tuberosa *et al.* (1988), 8 ekmeklik buğdayla yaptıkları çalışmada; olgunlaşmamış embriyo kültüründe, embriyoların besi ortamına konulurken skutellumun yukarı doğru gelmesi; olgun embriyolarda ise skutellumun ortamla temas etmesi halinde kallus oluşabileceğini bildirmişlerdir. Olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyoların bunun aksi şekilde yerleştirildiğinde çimlendikleri görülmüştür. Araştırmacılar kallus oluşumunun 10-14. günde başladığını, çimlenme durumunda ise, 3-4 gün içerisinde koleoptilin çıktığını gözlemişlerdir.

Kim and Kim (1989), bir buğday çeşidinin (*T.aestivum* L. Cv. Jang Kwang) olgun embriyolarından oluşturulan kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurarak tek hücre kültürleri elde etmiş ve bu hücre kültürlerinde bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca hücrelerin 10 µM 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alındıklarında embriyogenik kallus gelişiminin olumlu yönde arttığı saptanmıştır. Embriyogenik kallusların 10 mg/l gümüş nitrat (AgNO₃) içeren bitki büyüme düzenleyicisiz MS ortamına transfer edildiklerinde somatik embriyo ve sürgün oluşumunun gerçekleştiği bildirilmiştir.

Murata (1989), yapay oksinlerin (NAA, 2,4-D, ve 2,4,5-T) mutasyona neden olan etkilerini ve laboratuvar ortamındaki bir sitokinini (kinetin) ayırt etmek için kardeş kromatid

değişimlerini (KKD'ler) bir hekzaploid buğdayın (*Triticum aestivum* L.) islah edilmiş hücrelerinde analiz etmiştir. 2.0 mg/l 2,4-D ile orta derecede katkı sağlanmış MS'de KKD'lerin sayısı hücre başına 15.2 ve DNA pg'si başına 0.42 olarak bulunmuştur. 0.5-10.0 mg/l konsantrasyonunda NAA ya da 2,4-D'yle yapılan uygulamalarda hiçbir belirgin etki tespit edilmemiştir, 2,4,5-T'nin 2.0 mg/l'sinin olağanüstü KKD artışına neden olduğu belirlenmiştir. Kinetinin kendisinin KKD indüksiyonu üzerinde hiçbir belirgin etkisi olmadığı fakat 2,4,5-T tarafından indüklenen KKD'lerin kinetin tarafından bastırılma eğiliminin olduğu saptanmıştır.

Bannikova and Barabanova (1990), *in vitro*'da kültüre alınan kışlık buğdayın olgun embriyolarının histolojik karakterlerini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, kültüre alınan olgun embriyolarda bazı değişikliklerin meydana geldiğini, materyalin kültüre alındıktan 2 gün sonra skutellum bölgesinde mitotik bölünmelerin başladığını, ancak somatik embriyoların oluşmadığını, bunun yanında bazı koleoptillerin ve ikincil köklerin oluştuğunu gözlemişlerdir. Ayrıca olgun embriyolardan elde edilen kallusların bitki rejenerasyon yeteneğinin çok düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Redway *et al.* (1990), embriyogenik kallus elde etmek amacıyla 8 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını, yapraklarını ve anterlerini 12 farklı ortam üzerinde kültüre almışlardır. En fazla embriyogenik kallus oluşumu olgunlaşmamış embriyolardan elde edilirken, anterlerden ve buğday yapraklarından elde edilen kallus oranı oldukça düşük olmuştur. Olgunlaşmamış embriyolardan kallus teşviki denenen farklı ortamlardan 11 tanesinde önemli ölçüde embriyogenik buğday kallusları elde edilmiştir. Ortam denemesinde en fazla embriyogenik kallus oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında gözlenmiştir. Bu kallusların 2 MS 2 mg/l 2,4-D ortamında gelişen kalluslar ile arasında bir fark gözlenmemiştir. Ortamlar üzerinde nodular kompakt kirli beyaz ve kompakt beyaz renkte iki tip embriyogenik kallus elde edilmiştir. Kalluslar bitki rejenerasyonunu sağlamak amacıyla MS+1 mg/l IAA+1 mg/l zeatin içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Her iki embriyogenik kallustan da bitki rejenerasyonu gözlenmiştir. Bir aylık kalluslar rejenerasyon ortamına alındığında yeşil sürgünler elde edilmiştir, fakat anterlerden elde edilen kalluslardan bitki rejenerasyonu diğer eksplantlara göre daha az olmuştur. Kalluslar yaklaşık beş ay kadar alt kültüre alındıktan sonra rejenerasyon kapasitesini kaybettiği gözlenmiştir.

Vasi *et al.* (1990), yapmış oldukları çalışmada buğdayın olgunlaşmamış embriyolarını 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre aldıktan sonra elde ettikleri embriyogenik kallusların rejenerasyonunu sağlamak amacıyla farklı bitki büyüme düzenleyicisi konsantrasyonları ve kombinasyonlarını içeren (BAP, Kinetin, zeatin, 2,4-D, IAA) MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. En iyi rejenerasyon ortamının 1mg/l Zeatin+ 1mg/l IAA içeren MS ortamı olduğunu belirlemişlerdir

Devos and Gale (1992), buğdayın genetik yapısını araştırmak amacıyla RAPD-PCR analiz yöntemini kullanmışlardır. Alınan sonuçlara göre polimorfizm homozigot tek kromozomlu rekombinant hatlarda ve selekte edilmiş yabancı genomik DNA'larda tespit edilmiştir. RAPD-PCR'da Mg²⁺, DNA konsantrasyonu, polimeraz konsantrasyonu ve denatürasyon sıcaklığı sonuçlar üzerine etkili faktörler olarak bulunmuştur. Buğdayda, homolog olmayan dominant RAPD-PCR ürünleri genetik haritalamada sınırlı kalmasına rağmen değişikliğe uğramış tek kromozom veya kromozom segmentleri genotipik analizlerin uygulamasında kullanılabilmiştir.

Felföldi and Purnhauser (1992), 44 buğday ve 3 tritikale çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alarak kallus teşvikini araştırmışlardır. Genotiplere bağlı olarak kallus oluşumunda belirgin bir fark gözlenmemiştir. Kalluslar daha sonra bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı üzerinde kültüre alınarak bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. Rejenerasyon yeteneğini buğdayda % 1-90 oranında (ortalama % 40) iken tritikale de bu oran % 5-84 (ortalama % 38) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca buğdayda embriyogenik kallus benzeri kalluslar % 0-39 oranında (ortalama % 4), tritikalede ise % 0-81 oranında (ortalama % 32) tespit edilmiştir.

Qiao *et al.* (1992), tozlanmadan 12-14 gün sonra hekzapoloid bir buğday çeşidi olan Oderzo'nun olgunlaşmamış embriyolarını MS+ 2 mg/l 2,4-D içeren ortam üzerinde kültüre almışlardır. Bu ortam üzerinde yüksek kapasitede elde edilen kalluslardan hücre süspansiyonu ve protoplast izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen protoplastlar MS+ 1mg/l IAA+0.5 mg/L zeatin içeren ortam üzerinde rejenerasyonu teşvik etmek için kültüre alınmıştır. Protoplastlardan 2 ay içerisinde rejenere edilen ve köklendirilen bitkilerin doğal koşullara adaptasyonu sağlanmıştır.

Pijnacker and Ferwerda (1994), *Triticum aestivum* (on çeşit), *T. durum*, *T. dicoccum* ve *T. monococcum*'un olgunlaşmamış embriyolarını 3 gün 1 ya da 2 mg/l 2,4-D ve 20 veya 30 g/l sakkarozla orta derecede katkı sağlanarak, MS üzerinde laboratuvar ortamında kültüre

almışlardır ve her kromozomda kardeş kromatid değişimlerini (KKD'ler) hesaplamak için işlem den geçirmişlerdir. Ortam bileşenlerinin üretimin başından itibaren DNA replikasyonunu kötü etkilediğini belirtmişlerdir. KKD frekanslarının genotipe bağlı olduğunu ve plooidinin derecesiyle ilişkili olmadığını açıklamışlardır. *T. aestivum*'un bir çeşidi haricinde 2,4-D ve/veya sakaroz konsantrasyonunu iki misline çıkardıktan sonra KKD'lerin arttığını açıklamışlardır. *T. aestivum* (bir çeşit) ve *T. durum*'un regenerantlarının olgunlaşmamış embriyoları parental hücre kültürlerindeki mutasyonların neden olmuş olabileceği çeşitli KKD frekansları göstermiştir. *T. aestivum* embriyolarında rejenerantlarda bulunan en düşük frekanslar en yüksek frekanslara sahip eksplantlardan elde edilmiştir.

Bommineni and Jauhar (1996), makarnalık buğday çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşumu için % 2 ve % 3 sükröz ile 3 jelleştirici madde (% 0.8 agar, %0.8 agaros ve %4 phytigel) kullanılmıştır. Bütün çeşitlerde 2 mg/l 2,4-D % 3 sükröz ve % 0.8 agar içeren MS ortamında 2-3 gün içinde somatik embriyo oluşumu gözlediklerini, somatik embriyoların 3-4 hafta içerisinde küçük ve yoğun somatik topluluklar halinde geliştiklerini, bu toplulukların bitki rejenerasyon ortamına aktarıldıklarında bitki oluşumu gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Fennel *et al.* (1996), 48 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını 3 farklı ortamda kültüre alarak embriyogenesis oranını araştırmışlardır. Denemede olgunlaşmamış embriyolar N6+picloram (E1), MS+ 2,4-D (E3) ve MS+2,4-D+ aminoasitler (E5) içeren ortamlar üzerinde kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyogenik kalluslar bitki rejenerasyonu için MS+0.5 mg/l IAA+1 mg/l BAP+40 mg/l thiamin+150 mg/l l-asparagin+% 2 sakkaroz içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Buğday genotipine bağlı olarak olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslar % 2-94 oranında olmuştur. E5 ortamı üzerinde gelişen 13 buğday çeşidinin, E3 ortamı üzerinde gelişen 3 buğday çeşidinin ve E1 ortamı üzerinde gelişen 1 buğday çeşidinin kalluslarından bitki rejenerasyonu % 50 oranında olmuştur. Kallus ortamları üzerinde elde edilen embriyonik kalluslar dört kez alt kültüre alındıktan sonra bitki rejenerasyon oranı 41 buğday hattında % 85 olurken, 7 hatta ise bu oran % 15'dir.

Özgen *et al.* (1996), 7 kışlık durum buğday genotipinde (Çakmak 79, Kırmızı 5132, S. Bursa 7113, Kunderu 414/44, Berkmen 469, T-104, T-105) olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyoda yapmış oldukları çalışmada, olgunlaşmamış embriyoda en

yüksek kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonun Kunduru 414/44 ve Kırmızı 5132 çeşitlerinde, olgunlaşmış embriyoda ise Berkmen 469 çeşidinde meydana geldiğini ve ayrıca her iki eksplant kültüründe de kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda genotipin etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Karaca ve Bürün (1997), Doğu 88 buğday çeşidinin olgun ve olgun olmayan embriyolarını farklı 4 madde katılmış MS ortamında kültüre almışlardır. Deneme, faktöriyel deneme desenine göre iki tekerrürlü olarak kurulmuş ve değerlendirilmiştir. Verilere karekök transformasyonu uygulanmıştır. Gözlemler 42 gün sürmüştür. Gözlemler sonunda, kallus, sürgün ve kök oluşturan tüp sayıları belirlenmiştir. Olgunlaşmamış embriyoların kültüründe en yüksek kallus oluşumu (Ort. % 94) 2 mg/l 2,4-D+ 1 mg/l kinetin katılmış MS ortamında elde edilmiştir. Olgun embriyoların kültüründe ise en yüksek kallus oluşumu (Ort. % 95) 2 mg/l 2,4-D katılmış MS ortamında gözlenmiştir. Kallus ağırlıkları bakımından olgun embriyolar daha iyi sonuç vermiştir. En yüksek kallus ağırlığı ortalama 395.3 mg olarak 2 mg/l 2,4-D +1 mg/l kinetin içeren MS ortamında bulunmuştur.

Okumuş (1997), tarafından yapılan çalışmada aseto-carmin boyama yöntemi kullanılarak, *Triticum aestivum* L. çeşidi olan Atilla-1 ve Katae-1 isimli iki buğday varyetesinin PMC'leri mayoz bölünmenin metafaz-1 devresinde incelenmiştir. Kromozom konfigürasyonları kiazma frekanslarıyla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Kiazma frekansı, Atilla-1 hattında 41.54 olarak, Katae-1 hattında ise 39.85 olarak bulunmuş ve kiazma frekansının kromozom eşlenmesiyle ilgili literatürün ışığı altında homolog kromozomların aralarındaki homoloji kaybından kaynaklandığı tartışılmıştır.

Cannell *et al.* (1998), buğdayın genetik yapısını değiştirmenin mümkün olmasına karşın bu teknolojinin yaygın olarak uygulanmasının düşük toplam verim ve bu tekniğin güvenilir olmaması sebebiyle sınırlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, farklı oksin sistemleri altında bir transgenik buğday ve tritordeum hatları nüfusu meydana getirmişler ve tarif edilen koşullar altında picloram varlığının 2,4-D varlığından daha yüksek başkalaşım verimliliğiyle sonuçlandığını göstermişlerdir. Moleküler analiz bu transgenik sıralarda yaygın olacak basit entegrasyon örneklerini ve düşük kopya sayılarını göstermiştir. T₁ neslindeki transgenlerin Mendel kalıtımı sıraların büyük bölümünde gözlemlenmiştir.

Ivanov *et al.* (1998), 5 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını kullanarak MS+2 mg/l 2,4 dichlorophenoxyacetic asit (2,4-D)+ 20 g/l sakkaroz 8 g/l agar pH 5,8 ortamı üzerinde kültüre almışlar ve embriyogenik kalluslar elde etmişlerdir. Daha sonra

embriyogenik kalluslar, bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmek için MS+ 0.1 mg/IAA+ 0.5 mg BAP+ 20 g/l sakkaroz 8 g/l agar pH 5.8 ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Bitki boyu 5-6 cm'ye ulaştığında köklendirilmek üzere 5 mg/IAA+ 0.1 mg/l Kinetin+ 146 mg/l L-glutamin+20 g/l sakkaroz +8 g/l agar içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Köklenen bitkilerin vernalize edilmek üzere tüpler içerisinde 2-4 °C'de 4-5 hafta muhafaza edilmiştir. R0 rejenerantları daha sonra sera koşullarında normal fizyolojik gelişimini tamamlamıştır. Yapmış oldukları çalışmada R3 ve R4 generasyonlarını elde etmişlerdir.

Machii *et al.* (1998), 107 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından embriyogenik kallus oluşumunu ve bitki rejenerasyon kabiliyetini araştırmışlardır. Tozlanmadan yaklaşık 14 gün sonra alınan olgunlaşmamış buğday embriyoları embriyogenik kallus teşviki için MS+2 mg/l 2,4-D+0.25 mg/l absisik asit (ABA)+ 500 mg/l L-glutamin+100 mg/l proline+ 100 mg/l casein hydrolysate+ 60 mg/l maltoz+ pH 5,8 ve 2 g/l fitojel içeren ortamlar üzerinde karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyogenik kallusların rejenerasyon için MS+ 0.5 mg BAP+ 30 g/l sakkaroz+ 2 g/l fitojel pH 5,8 olan rejenerasyon ortamı kullanılmıştır. Araştırmada ele alınan 107 buğday çeşidinden 83 tanesinde embriyogenik kalluslar elde edilmiş, bunlardan 45 buğday çeşidinde bitki rejenerasyonu gözlenmiştir. Sadece 9 genotipte yeşil bitkiler, 25 genotipte sadece albino bitkiler, 11 genotipte ise hem yeşil hem de albino bitkiler elde edilmiştir. Genellikle embriyogenik kallusların elde edilmesi buğday embriyolarının kalitesine ve canlılığına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Özgen *et al.* (1998), 12 kışlık buğday çeşidinin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarından kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu çalışması yapmışlardır. Tozlaşmadan 15 gün sonra olgunlaşmamış embriyolar tohumlardan elde edilmiş ve skutellum yukarı gelecek şekilde 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamına yerleştirilmiştir. Olgunlaşmış embriyolar ise 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamına konulmuştur. Oluşan kalluslar ve bitkiler daha sonra 2,4-D içermeyen MS ortamına alınmıştır. Her iki eksplanttan elde edilen bitkiler vernalizasyondan sonra toprağa aktarılmıştır. Kallus oluşum oranı, kallus rejenerasyon kapasitesi ile eksplant başına oluşan bitki sayısı genotipe göre değişmiştir.

Tosun (1998), CIMMYT kaynaklı hekzaploid (2n=42) tritikalenin Nutria 7272 hattında karyotip ve idiogram analizleri yoluyla kromozomların morfolojik yapılarını belirlenmeye çalışmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda kromozomlar, satellitin bulunup bulunmaması

durumuna ve kol oranına göre satellitli, median, submedian ve subterminal olmak üzere dört grupta incelenmiştir. Denemede kullanılan Nutria 7272 hattında 42 kromozomdan 4 tanesinin satellitli, 14 tanesinin median, 18 tanesinin submedian ve 6 tanesinin de subterminal olduğu saptanmıştır. Kromozom uzunluğu 4.844 μ (M7) - 8.066 μ (SM1), kol oranı ise 1.091 (M7) - 2.125 (SM1) arasında değişmiştir. Satellit uzunluğu SAT1 ve SAT2 kromozomlarında sırasıyla 0.878 ve 0.823 μ olmuştur.

Barro *et al.* (1999), 8 buğday çeşidinin ve 7 arpa çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını ve yapraklarını kullanarak somatik embriyogenesisi ve bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Buğday yapraklarını ve olgunlaşmamış embriyoları 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l piclorom içeren MS ortamları üzerinde karanlık koşullarda kültüre alarak somatik embriyogenesisi teşvik etmişlerdir. Alınan sonuçlara göre piclorom içeren kallus ortamları üzerinde buğday yapraklarından somatik embriyo gelişimi piclorom içermeyen kallus ortamlarına göre iki kat daha fazla olmuştur. Buğday yapraklarından somatik embriyogenesis oluşumu ise (%92), olgunlaşmamış embriyolardan somatik embriyogenesis oluşumundan (%85) daha fazla olmasına rağmen, bitki rejenerasyonu olgunlaşmamış buğday embriyolarından elde edilen kalluslardan (%62) buğday yapraklarına oranla (%18) daha fazla olmuştur.

Jonses *et al.* (1999), *Dasypyrum villosun* türüne spesifik yüksek oranda tekrarlanan bir DNA dizini (p380) ile buğdayın grup 4 kromozomlarına ait RFLP markörleri, bir geri melez populasyonunda oluşan adisyon ve subsitasyon olaylarının belirlenmesinde kullanılmıştır. *Dasypyrum villosun*'un 4V kromozomundan PchDv geninin buğdaya aktarımı sırasında üretilen geri melez populasyonunda, Southern analizi sonucunda birçok tam ve telesomik adisyon hatları ile bazı kromozom içi ve kromozomlar arası translokasyon olayları belirlenmiştir. Bu hatların sitolojik tanımlanmaları da yapılmıştır.

Varshney *et al.* (1999), olgun embriyoları 2,4-D'nin farklı dozlarına (0,5; 2,5 ve 5,0 mg/l) sahip MS ortamında kültüre almışlar ve 2,5 mg/l 2,4-D'nin optimum olduğunu belirlemişlerdir.

Benkirane *et al.* (2000), 10 buğday çeşidinin yapraklarından ve buğday koleoptilinden somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Bitki parçalarını farklı 2,4-D konsantrasyonu (2.3-11.3 μ M) içeren MS ortamları üzerinde kültüre almışlardır. Kültüre alma işleminden 4-6 hafta sonra her iki bitki dokusundan da embriyogenik ve embriyogenik olmayan kalluslar elde edilmiştir. En fazla 0.5-1 cm uzunluğundaki bitki yapraklarından 6.8 μ M 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde embriyogenik kalluslar elde

edilmiştir. Elde edilen embriyogenik kalluslar bitki rejenerasyonu için MS+0.9 µM 2,4-D+ 0.5 µM 2iP içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Koleoptil segmentlerinden kallus oluşumunun ve bitki rejenerasyon oranının yaprak segmentlerine göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Koleoptilin büyüklüğünün bitki rejenerasyonunda önemli olduğu tespit edilmiş ve 1 mm uzunluğundaki koleoptillerden bitki rejenerasyonunun 2-4 mm'lik doku parçalarına oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kallus oluşumunda 2,4-D konsantrasyonları arasında bir farklılık gözlenmezken, bitki rejenerasyonu aşamasında 9 µM 2,4-D içeren ortamlar daha iyi sonuç vermiştir.

Delporte *et al.* (2001), Odean ve Minaret buğday çeşitlerinin olgun embriolarından kallus oluşumunu ve bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Buğday çeşitlerinden elde edilen olgun embriolar 10 µM 2,4-D içeren kallus ortamları üzerinde kültüre alınarak kallus teşvik edilmiştir. Olgun embriolar kültüre alındıktan 8 gün sonra % 59 oranında kallus elde edilmiş ve en yüksek embriyogenik kallus oluşumu % 47 oranında belirlenmiştir. Embriyogenik kalluslardan bitki rejenerasyonu için iki farklı rejenerasyon yöntemi kullanılmıştır. Rejenerasyon ortamı olarak MS+0.45 µM 2,4-D+ 46 µM zeatin ve ½ MS ortamı kullanılmıştır. Embriyogenik kalluslardan 513 adet bitki elde edilmiştir. Protokole göre her 100 embriyodan 25-30 adet bitki elde edilmiştir.

Gonzales *et al.* (2001), 12 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriolarından kallus oluşumunu ve kallus yüzdesini araştırmak için, elde ettikleri embrioları 4 farklı MS ortamı üzerinde kültüre almışlar ve farklı karbon kaynakları ile NaCl içeren bu ortamların her birine 2 mg/l 2,4-D ilave etmişlerdir. Elde edilen kallusların bazıları hem kompakt hem de embriyogenik olduğu gibi, bazı kalluslar ise yumuşak ve sulumsu bir görünüşte olmuşlardır. Genotiplere bağlı olarak elde edilen kallus oranı % 54-100 arasında değişmiştir. Kalluslar rejenerasyon için MS+2.22 µM BAP+2.68 µM NAA+20 g/l sakkaroz içeren ortamlar üzerinde kültüre alınmıştır. Genotiplere ve kallus ortamlarına bağlı olarak kompakt kalluslardan bitki rejenerasyonu yumuşak kalluslara göre daha fazla olmuştur. En iyi kompakt kallus gelişimi 30 g/l maltoz ve 30 g/l sakkaroz+ 2 mg/l NaCl içeren ortamlar üzerinde gözlenmiş ve bu ortamlar üzerinde elde edilen kalluslardan en fazla bitki rejenerasyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir.

He and Lazzeri (2001), 4 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriolarını ve bitki parçalarını kullanarak *in vitro*'da embriyogenesis sıklığını ve bitki regenerasyon yeteneğini araştırmışlardır. Embriyogenesisin teşviki için farklı konsantrasyonlarda piclorom ve 2,4-D

denenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, olgunlaşmamış buğday embriyolarında somatik embriyogenesis oluşumunun 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l piclorom içeren ortamlarda daha fazla olduğu saptanmıştır. Bitki rejenerasyonunun olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslardan, yeşil aksamdan elde edilen kalluslara göre çok daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Optimize edilen bu ortam üzerinde olgunlaşmamış embriyolardan bitki rejenerasyon oranı % 97-100 oranında gözlenirken (2 mg/l piclorom içeren ortam üzerinde) yeşil aksamdan bitki rejenerasyonunun ise % 45-85 oranında olduğu (4 mg/l piclorom içeren ortam üzerinde) tespit edilmiştir. Bitki rejenerasyonu için kültüre alınan embriyogenik kalluslarda 5 mg/l zeatin+0.1 mg/l 2,4-D içeren ortam üzerinde bitki rejenerasyon oranında % 20-30 arasında bir artış gözlenmiştir.

Özgen vd. (2001), 4 farklı kışlık buğday çeşidinin olgun embriyolarını kültüre alarak bunlardaki embriyogenik kallus oluşumunu araştırmışlardır. Olgunlaşmış buğday tanelerinden elde edilen embriyolar, kallus gelişimini teşvik etmek için 8 mg/l 2,4-D içeren sıvı ortam içerisinde karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Kültüre alınma işleminden 11 gün sonra gelişen kalluslar bitki rejenerasyonu için MS+2 mg/l glycine+20 g sakkaroz+ 7 g/l agar içeren ortamlar üzerinde kültüre alınmıştır. Deneme sonucuna göre, olgun embriyolardan kallus oluşumu % 75-100 oranında tespit edilmiş ve her 100 olgun embriyodan 14.1 bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir.

Mendoza and Kaepler (2002), Bobwhite buğday çeşidinin olgun embriyolarında 4 oksin tipinin 2,4-D, dicamba, picloram, ve 2-MCPP [2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid]'nin 4,5; 9,0 ve 18,0 µM miktarlarını ve iki farklı şekerin (maltoz ve sakkaroz) farklı sterilizasyonlarının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Kallus oluşumu için 25±10C'de 48 saat karanlıkta çimlendirilen tohumların embriyolarını kullanmışlardır. Kallus oluşum ortamında MS besinlerine ilave olarak 5 mg/l glutamine, 2 mg/l glycine, 1 mg/l myo-inositol, 1mg/l casein hydrolysate 0,5 mg/l nicotinic acid, 0,5 mg/l pyrodoxine ve 0,1 mg/l thiamine içeren ortam kullanmışlardır. Bitki rejenerasyonu ortamı olarak da yarı dozda MS inorganik tuzlarına ilave olarak kallus oluşumunda kullanılan benzer organik bileşikler kullanmışlardır. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak ise 0,1 mg/l oksin (kallus oluşumunda kullanılan oksin tipine göre) ve 0,5 mg/l BA kullanılmıştır. Çalışma sonucunda kallus oluşumuna oksin tipinin ve dozunun etkisinin çok önemli olduğunu belirlemişlerdir. 2-MCPP hariç diğer oksinlerde kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Picloram ve dicamba konsantrasyonunun artması kallus taze ağırlığını artırmış, buna karşın 2,4-D konsantrasyonunun artması azaltmıştır. Yine, aynı

çalışmada en yüksek rejenerasyon oranının 18 µM (Yaklaşık 4 mg/l) dicamba içeren ve filtre sterilizasyonu yapılan sakkaroz içeren ortamda gözlemlenmiştir.

Przetakiewicz *et al.* (2003), Buğday, arpa ve triticale üzerinde yaptıkları çalışmada, olgunlaşmamış embriyoları MS tuzları + B5 vitamini + % 3 sakkaroz içeren besi ortamında üç farklı oksin tipinin (2,4-D, dicamba, picloram) 3 mg/l dozlarını ve kombinasyonlarını (1 mg/l picloram + 1 mg/l 2,4-D; 1,5 mg/l picloram + 1,5 mg/l dicamba; 1,5 mg/l picloram + 1,5 mg/l 2,4-D; 1,5 mg/l dicamba + 1,5 mg/l 2,4-D) kullanarak kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda uygun oksin tipinin ve dozunun genotipe göre değiştiğini saptamışlardır.

Wu *et al.* (2003), doku kültüründe 45 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından somatik embriyogenesis oluşumunu incelemek için araştırmalar yapmışlardır. Elde edilen aseptik embriyolar $N_6 + 9.05 \times 10^{-6}$ mol/l 2,4-D + 60 g/l sakkaroz içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyogenik kallusların bir kısmı $N_6 + 8.88 \times 10^{-6}$ mol/l BAP + 1.07×10^{-7} mol/l + 500 mg/l kazein hidrolizat + 30 g/l sakkaroz içeren ortam üzerinde, bir kısmı da $N_6 + 4.52 \times 10^{-6}$ mol/l 2,4-D + 30 g/l sakkaroz içeren ortam üzerinde bitki rejenerasyonu için kültüre alınmıştır. Yeşilimsi, hızlı gelişen kalluslarda organogenesisin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Erken dönemde rejenerasyon ortamına alınan kalluslarda bitki rejenerasyon oranı daha fazla olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, sürgün sayısı ve sürgün boyunun organogenesisle pozitif bir korelasyonunun olduğu tespit edilmiştir.

Yorgancılar vd. (2003), yaptıkları çalışmada Anadolu'da en fazla yetiştirilen 3 makarnalık (*Triticum durum* Desf.; Kızıltan-91, Kunduru-1149, Selçuklu-97) ve 3 ekmeklik (*Triticum aestivum* L.; Bezostaja-1, Gerek-79, Gün-91) buğday çeşidinde doku kültürü yoluyla kallus oluşturma ve dolaylı bitki rejenerasyonu kabiliyetlerinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Tarlada yetiştirilen çeşitlerden, döllenen 10-15 gün sonra alınan henüz olgunlaşmamış taneler % 70 (h/h)'lik alkolde 2 dakika, % 25 (h/h)'lik ticari sodyum hipoklorit çözeltisinde de 10 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Steril şartlarda, mikroskop altında henüz olgunlaşmamış embriyolar izole edilmiş ve buğdayda doku kültüründe daha önce başarılı olduğu bildirilen M_1 (MS 4.43 g/l + L-asparagine 150 mg/l, thiamine-HCl 40 mg/l, maltoz 20 mg/l + 2,4-D 2 mg/l) ve M_2 (MS 4.43 g/l, sakkaroz 30 g/l, agar 7 g/l, 2,4-D 2 mg/l) ortamlarında kültüre alınmıştır. Eksplantlardan, kültürlerinden 20, 30, 40 gün sonra kallus oluşumu, kallus ağırlığı ve çapları belirlenmiştir. Ayrıca 30 günlük kalluslar MS 4.43 g/l (a/h), sakkaroz 30 g/l (a/h) ve agar 7 g/l (a/h) içeren rejenerasyon ortamına alınmış

ve rejenerasyon frekansları tespit edilmiştir. Çeşitlerin hepsinde kallus oluşumu meydana gelmiş, çaplara ve kallus ağırlıklarına bakıldığında en yüksek kallus çapı Kunduru-1149 çeşidinde meydana gelirken, kallus ağırlığı ise en yüksek Gün-91 çeşidinden elde edilmiştir. En yüksek kallus çapı ve kallus ağırlığı M₁ ortamında ve 40. gün elde edilmiştir. Rejenerasyon bakımından en iyi tepkiyi Kızıltan-91 ve en düşük tepkiyi Kunduru-1149 vermiştir. Rejenerasyonun tipi daha önce literatürde belirtildiği gibi bütün çeşitlerde somatik embriyogenesis şeklinde olmuştur.

Keresa *et. al.* (2004), 8 Hırvatistan kışlık buğday çeşidinin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriolarından kallus kültürü ve bitki rejenerasyonu kapasitesini incelemişlerdir. Olgunlaşmamış embriolarda en yüksek oranda rejenerasyon (%57) Zitaraka ve Edita (%54) çeşitlerinden elde edilmiştir. Olgunlaşmış embriolarda en yüksek rejenerasyon (%26) Magdalen çeşidinden elde edilmiştir. Kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için en iyi sonuçların picloram içeren ortamlardan sağlandığı belirtilmiştir.

Pellegrineschi *et al.* (2004), ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde farklı NaCl ve 2,4-D konsantrasyonlarını deneyerek kallus teşvikini ve kallusdan bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip olan MPB-Bobwhite 26 ve Mexicali adlı buğday çeşitlerinin olgunlaşmamış embrioları aseptik koşullar altında çıkarılarak 2.5 mg/l 2,4-D +% 2 sakkaroz+% 0.9 bacto agar içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. Bir ay sonra oluşan kalluslar farklı konsantrasyonlarda NaCl ve 2,4-D içeren sıvı ortam içersinde 20 gün süreyle kültüre alındıktan sonra yeniden 2.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Bunu takiben 45 gün sonra embriyogenik kalluslar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı üzerine alınarak bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Deneme sonucunda MPB-Bobwhite buğday çeşidinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunun Mexicali buğday çeşidine göre çok yüksek olduğu gözlenmiştir. MPB-Bobwhite buğday çeşidinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu 1 mg/l 2,4-D+ 1 mg/l NaCl içeren MS ortamı üzerinde, Mexicali buğday çeşidinde ise 2 mg/l 2,4-D+ 2 mg/l NaCl içeren MS ortamı üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Satyavathi *et al.* (2004), biyoteknoloji araçlarını kullanarak durum buğdayının (*Triticum turgidum* L.) gelişimi üzerindeki çalışmaların sınırlı olduğunu, bu önemli tahıla yönelik laboratuvar ortamında güvenilir bir bitki rejenerasyon prosedürünün ilerlemesinin onun genetik başkalaşım yoluyla gelişimi için ön koşul olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada,

üç bitki büyüme düzenleyicisinin; 2,4-D (2,4-, dichlorophenoxyacetic asit), picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolin- asit), ve dicamba (3,6-dichloro-o-anisic asit), kallus gelişimi ve dört ticari durum çeşidinin (Ben, Maier, Munich, ve Lebsack) skutellum kültürlerindeki bitki rejenerasyonları üzerindeki etkileri sunulmuştur. Kallus gelişimini sağlamak için, Murashige Skoog (MS) üzerinde yetiştirilen izole edilmiş skutellumlardan yararlanılmıştır. Kallus gelişiminden 4 hafta sonra tüm kalluslar rejenerasyon için yeni MS üzerine yerleştirilmiştir. Rejenerasyona uğramış bitkiciklerin verimli, normal kromozom sayısını ($2n = 4x = 28$) ve melezleşmenin (fl-GISH) meydana geldiği yerdeki fluoresan genomünün açığa çıkardığı yapıyı korudukları ve hiçbir belirgin somaklonal varyasyon göstermedikleri belirlenmiştir. Sitolojik çalışmalarda; 3:1 oranında glasiyal asit: etanol fiksasyon için kullanılmış, ardından karbon-fuksin boyama yöntemi ile preparatlar hazırlanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. Kromozomların detaylı incelemesi için ise; fl-GISH yönteminden faydalanılmıştır. Dicamba yoğun kallusu indüklemeye yönelik en iyi bitki büyüme düzenleyicisi olarak belirlenmiştir ve ayrıca dört çeşit üzerindeki rejenerasyona uğraşım bitkiler arasında en yüksek oranı (0.16) vermiş. Sonuçta dicamba 2.0 mg/l konsantrasyonunda başlangıçtaki kallus gelişimi için kullanıldığı zaman, Maier bitkicik rejenerasyonu açısından en yüksek oranını (0.27) vermiştir. Bu sonuçların durum buğdayıyla yapılan genetik başkalaşım çalışmasını kolaylaştıracağı düşünülmüştür.

Gupta *et al.* (2005), heksaploid buğdayın en kapsamlı sitogenetik çalışmalara tabi tutulmuş bir tür olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma ile kromozom çiftleşmesinin homolog kromozomlara yönelik genetik sınırlama yoluyla diploidizasyonu kapsayan poliploidlerin evrim mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlanmıştır. Ekmeklik buğdaydaki ph mutantlar (Ph1 ve Ph2) ve aneuploidlerin bir çeşidinin kullanılabilirliği; yabancı ilave sıralarının gelişimi ve buğday genomu içerisindeki yabancı kromozom segmentlerinin integrasyonu ile sonuçlanan kromozom manipülasyonlarına imkan verdiği belirtilmiştir. Genomik çağda, yakın zamanlarda moleküler araçların yaygın olarak sadece moleküler haritaların yapımında değil ayrıca pek çok agronomik özelliğe yönelik genlerin/QTLlerin (epistatik QTLler, eQTLler ve PQLler dahil) tanımlanması ve izolasyonu için kullanıldığı açıklanmıştır. Ayrıca buğday genomunda şu an BAC kütüphanelerinin gelişimi yoluyla genom seviyesinde sıralamaya tabi tutulan rekombinasyon aktif noktaları ve gen bakımından zengin bölgeleri tanımlamanın da mümkün olduğu belirtilmiştir. EST veritabanında; tüm bitkiler arasında buğday EST'lerinin sayı bakımından en fazla olanlar olduğu ve insan, fare, *Ciona intestinalis* (bir omurgalı hayvan), sıçan ve zebra balığı

genomları için olanların bitişğinde yer aldığı gösterilmiştir. Bu EST'ler ve pek çok genomik bölge sırasının moleküler işaretleyicilerin gelişiminin dahil olduğu uygulamaların birine tabi tutulduğunu, doğal mahallinde melezleme tekniği (FISH, GISH ve McFISH dahil) ve delesyon yığınlarının gelişiminin de ayrıca fiziksel haritaların hazırlanmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Moleküler işaretleyicilerin ayrıca pek çok ülkede buğday ıslah programlarında işaretleyici destekli seleksiyon için kullanıldığı açıklanmıştır. Yakında uygulanabilir hale de gelecek olan bir buğday DNA çipinin yapımının ek olarak buğday genomu araştırmasını kolaylaştırabileceği öngörülmüştür. Bilgi birikimi ve genotip oluşturmaya varan yüksek verimlilik ve ek moleküler araçların hızla gelişiminin; gelecekte buğday araştırmalarında son derece kullanışlı olacakları ve bu çalışmaların ıslah edilmiş buğday çeşitlerinin geliştirilmesiyle sonuçlanacağı belirtilmiştir.

Jauhar (2005), bu çalışmada tahıl ürünlerinden örnekler alınarak ekinin verimini arttırmak için kullanılan geleneksel ıslah etme, klasik sitogenetik ve modern biyoteknolojiyi ele almıştır. Bitki ıslahının genetik ve sitogenetikten daha öncelere dayandığını, genetiğin kurucusu Mendel'den (1822-1884) çok önce Kölreuter, Knight, Gartner ve diğerleri gibi bitkileri melezleyenlerin dikkatli ve süre gelen seleksiyon yoluyla beşeriyetin devamını sağlayan irsi özellikleri geliştirilmiş kültür bitkileri ürettiklerini, daha sonra ise genetik kurallarının keşfi ve 20. yüzyıla girilirken sitogenetik tekniklerinin ortaya çıkmasıyla bitki ıslahının bitki ıslah bilimine ulaştığını belirtmiştir. Her ıslah faaliyetinin bahsi geçen kültür bitkisinin sitogenetik yapısının yeniden yapılandırılmasıyla ilişkilendirildiğini ya da beraber yapıldığını ve uygulanabilir hale gelen hızlı genomik rekonstrüksiyon yöntemleriyle bitkinin verimini arttırma işleminin hatırı sayılır derecede hızlandırıldığını ifade etmiştir. Klasik sitogenetik araçları kullanılarak hastalığa dirençli spesifik ıslah örnekleri tarif edilmiştir. *Fusarium* head blight direncini diploid buğday çiminden (*Lophopyrum elongatum*; $2n = 2x = 14$; E genomu) arzu edilen durum buğdayı (*Triticum turgidum*; $2n=4x= 28$; AABB) gen kaynaklarına nasıl aktarıldığı açıklanmıştır. Durum genomuna entegre edilen yabancı kromatini nitelendirmedeki (melezlemenin olduğu yerde fluoresan genomu gibi) modern teknikler de ayrıca açıklanmıştır. Ek değer özellikleri için genlerin doğrudan eklenmesine imkan sağlamış modern biyoteknoloji araçlarının bu işleme faydalı olduğu belirtilmiştir. Kültür bitkilerinin genetik gelişimine yönelik bu teknikler tarif edilmiş ve geleneksel ıslah, klasik sitogenetik ve modern biyoteknoloji arasındaki birliğin verimliliği ele alınmıştır.

Kubalakova *et al.* (2005), bu çalışmada durum buğdayında (*Triticum turgidum* Desf. var. *durum*, $2n=4x=28$) kromozom sıralanmasına yönelik flow sitometri potansiyelini değerlendirmişlerdir. Floresan yoğunluğunun histogramları (flow karyotipler) üç uç noktayı içeren DAPI-boyalı kromozomların analizinden sonra elde edilmiştir. Bunlardan bir tanesi 3B kromozomunu temsil etmiştir, küçük bir uç 1A ve 6A kromozomlarına karşılık gelmiştir ve geniş bir uç geri kalan 11 kromozomu temsil etmiştir. Mikroskop lamları üzerinde sınıflandırılan kromozomlar melezleşmenin (FISH) doğal ortamında gerçekleştiği yerdeki floresandan sonra GAA microsatellite, *pSc119.2* ve *Afa* tekrarlarına yönelik incelemelerle tanımlanmıştır. Bu dizilerin genomik dağılımı ilk olarak durum buğdayında tespit edilmiştir ve moleküler karyotip bu ürün için geliştirilmiştir. Durum buğdayının iki misli ditelosomik hatlarında flow karyotipleme, hatların A ve B genomlu buğday kromozomlarının herhangi bir kolunu sınıflandırmayı kolaylaştırdığını ortaya çıkarmıştır. Hekzaploid buğdayla karşılaştırılınca durum buğdayının flow karyotipinin daha az karmaşık olduğu belirtilmiştir. Bu özellik telesomlara yönelik daha iyi bir ayırma ve % 90'dan % 98'e kadar değişen sıralanmış fraksiyonlarda yüksek saflığa neden olmuştur. Geniş ek kütüphanelerin sitometri kullanarak arıtılmış DNA'dan ortaya çıkarılabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışma flow sitogenetiğin buğday genomiklerinde kullanımına yönelik potansiyelini hatırı sayılır derecede genişletmiştir ve bu önemli ürünün genomunu bir seferde tek bir kromozom kolu şeklinde sıralama imkanının önünü açmıştır.

Thomas *et al.* (2005), tarafından genlerin kümelenmesine yardımcı olacak, buğdayın (*Triticum aestivum* L.) resiprokal olmayan Robertsonian translokasyonlarına yönelik potansiyel sitolojik ve genetik davranışları değerlendirilmiştir. Translokasyonları elde etmek için iki misli monosomik (3B+5A; $2n=40=19ii+2i$) zıtlık gösteren bir disomikle karşılıklı olarak çaprazlanmıştır. Kopuk bir monosomu miras alan taneler karşıt kola yönelik bir işaretleyici retansiyonuyla eşleşen tek bir kola özgü DNA işaretleyicisinin kaybıyla tanımlanmıştır. İki misli monosomiğin poleninden kurtulan 180 karşıt nesilde, hiçbir bozulmaya (potansiyel translokasyonlar) rastlanmamıştır fakat yumurtacıklardan kurtulan 251 nesilde iki duruma (5AL artı 3BS'nin kaybı; 5AL artı 3BL'nin kaybı) rastlanmıştır. Meyotik eşleşme ve melezleşmenin (mcGISH) meydana geldiği yerdeki çok renkli genom spesifik floresan, iki misli bir bozukluğu olan her bitkinin sentromerde tekrar bir araya gelmiş ve PMC'nin yaklaşık % 83'ünde bir trivalan (üç değerli) (19ii + 1iii) şeklini almış A ve B genomları arasında bir adet translokasyona uğramış kromozom içerdiği gösterilmiştir. Geri kalanı çizgisel "I" (bitişik ayrışım) ya da belirsiz "L"

biçimlerinde hizalanmışken, trivalanların çoğu (yaklaşık olarak % 92) metafazda bir “V” biçiminde (sıralı ayrışım) hizalanmıştı. “Füzyon monosomikleriyle” ilgili bir test çaprazının genetik analizi, trivalanın bu ayrıcalıklı birlikte oryantasyonunun bulunduğu kromozom kollarının sınıflandırmasını etkilediğini göstermişlerdir. Bu genetik veri, sıralı ayrışım ve doğal seleksiyonun birbirine karışmış etkisi altında füzyon monosomik neslinin süreç içerisinde iki hemizigot kolun da gen içeriğini sabitleyerek standart disomik düzene geri döneceğini göstermektedir. Bu yüzden herhangi bir gen çiftinin ayrılan bir populasyon içerisinde onları geçici olarak bağlayacak füzyon monosomu izole ederek ortak bağlanma olması amaçlanabilmektedir.

Sağsöz ve Aydın (2006), olgun embriyolardan etkili bir kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu sistemi geliştirerek, bazı buğday genotiplerinin doku kültürüne tepkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, Kırık, Gerek-79, Sivas 111/33 ve Haymana-79 genotiplerinin olgun embriyoları kullanılmıştır. Araştırmada 3 oksin tipi (2,4-D, dicamba, picloram), oksin tiplerinin 3 farklı dozu (2,5; 3,0; 4,0 mg/l) ve 2 farklı jel yapıcı madde'nin (phytagel, agar) kallus oluşumuna ve bitki rejenerasyon kapasitesine ve yine iki farklı rejenerasyon ortamının (R1: 0,1mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA ve R2: 0,2 mg/l 2,4-D) bitki rejenerasyon kapasitesine olan etkileri belirlenmiştir. Kallus, embriyogenik kallus ve somatik embriyo oluşumuna ve bitki rejenerasyon kapasitesine genotipin, jel yapıcı maddenin, oksin tipleri ve dozlarının etkileri çok önemli olmuştur. En yüksek kallus oluşumu Kırık genotipinde (%92,0), en yüksek bitki rejenerasyon kapasitesi ise Sivas 111/33 genotipinde (%78,7) meydana gelmiştir. Tüm genotiplerde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu phytagel içeren ortamlarda agar içeren ortamlardan daha yüksek olmuştur. Kallus oluşumunda ve bitki rejenerasyon kapasitesinde dicambanın, 2,4-D ve picloramdan daha etkili olduğu saptanmıştır. Rejenerasyon ortamının rejenerasyon kapasitesine etkisi çok önemli olmuştur. En yüksek rejenerasyon kapasitesi R1 (0,1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP) (%76,5) ortamında meydana gelmiştir.

Dağüstü (2007), kışlık buğdaylarda (*Triticum aestivum* L.) olgunlaşmamış embriyo kültüründen en etkili biçimde kallus oluşumu ve bitkicik rejenerasyonunu elde edebilmek için, 7 genotipi 2005 yılında ve 17 genotipi 2006 yılında araştırmıştır. Tozlanmadan 12-16 gün sonra alınan olgunlaşmamış embriyolar içerisinde 1 mg 2,4-D bulunan MS besi ortamına skutellum yukarıda olacak şekilde yerleştirilmiştir. Sürgün ve bitkicikler 2,4-D içermeyen ortama embriyogenik kallusların aktarılmasıyla elde edilmiştir. Genotip rejenerasyon kapasitesi üzerinde önemli bir rol oynamıştır. Genotipin kallus oluşum

sıklığı, kök oluşum sıklığı, yaprak görünümlü yeşil noktalar bulunduran kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyon sıklığı üzerinde etkisi oldukça önemli bulunmuştur. Genotipe bağlı olmak üzere yüzde kallus oluşumu % 2,4 ile % 100 arasında değişmiştir. Kallus dokularından 250'den fazla bitkicik eldesi olmuştur. Buğdayın olgunlaşmamış embriyolarından bitkicik rejenerasyonunun uygun genotip kullanıldığında pratik ve etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

Tabur ve Demir (2008); tuz stresi altında çimlendirilen arpa tohumlarının (*Hordeum vulgare* L. var. Bülbül 89) mitotik indeks ve kromozom anormallikleri üzerine gibberellik asit (GA3), kinetin (Kin), benziladenin (BA), 24-epibrassinolid (EBR), etilen (E) ve poliamilerin (kadaverin-Kad, putressin-Put, spermidin-Spd, spemin-Spm) ikili, üçlü ve dördü kombinasyonlarının etkilerini araştırmışlardır. Tuz konsantrasyonunun artışına paralel olarak mitotik aktivite önemli ölçüde azalmış ve kromozom anormallik yüzdesi artmıştır. Çalışılan büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarının büyük bir çoğunluğu yüksek tuz konsantrasyonlarında mitotik aktivite üzerinde olumlu bir etki göstermiştir. Ayrıca bu büyüme düzenleyicilerinin büyük bir çoğunluğu tüm tuz seviyelerinde kromozom anormallik yüzdesi üzerindeki olumsuz etkiyi önemli ölçüde hafifletmiştir. Sonuç olarak, söz konusu bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarının arpa tohumlarının mitotik indeks ve kromozom anormallikleri üzerinde farklı derecelerde etkili oldukları ve bu farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir.

Cifuentes and Benavente (2009), tarafından yapılan bu çalışmada Homolog metafaz I (MI) eşleşme modeli, durum buğdayı x *Aegilops cylindrica* melezlerinde ($2n = 4x = 28$, ABC^CD^C) her buğday ve yabani bileşen genomunun farklı olarak ayrılmasına izin vermiş doğal mahallinde gerçekleşen melezleşme prosedürü yoluyla tamamen karakterize edilmiştir. İncelenen üç melez genotipten bir tanesinin ph1c mutasyonunu taşıdığı belirtilmiştir. Her durumda, iki türün de kromozomları arasındaki MI ortaklıklarının toplamda üçte ikine yaklaşık bir orana denk geldiği açıklanmıştır. Analizin sonuçları aşağıdaki gibidir: (a) A genom kromozomları dikkate alınan yabancı genom hesaba katılmaksızın B genom partnerlerinden daha sık bir şekilde buğday-yabani MI eşleşmesine dahil edilmiştir; (b) iki durum buğdayı da *Aegilops cylindrica* DC genomuyla eşleşmektedir. Bu bulgular buğday mahsulleri ve *Aegilops* arasındaki genetik transfer potansiyeli konusunda ele alınmıştır.

Franciki *et al.* (2009), DNA işaretleyicilerinin zenginliğini arttıracak ve genetik analize uygun yüksek çözünürlüklü genetik eşleştirmeyi (kartografiyi) geliştirmeye katkı sağlayacak bir kısım teknolojinin bulunmakta olduğunu belirtmişler ve bu çalışmanın amacının buğday genomunda gösterilebilen buğday dizisi üzerinde Diversity Array Technology (DArT) işaretleyicilerinin sayısını arttırmak ve simple sequence repeat (SSR) (basit dizi tekrarı) işaretleyicileri konusunda kromozomal lokasyonlarını ve sitogenetik harita üzerindeki pozisyonlarını belirlemek olduğunu açıklamışlardır. Sırasıyla 749'un tamamı ve 512 ayrı DArT ve SSR işaretleyicileri rekombinant doğal sıra (RDS) ya da ikiye katlanmış haploid (İH) populasyonlarından elde edilen dört genetik haritanın en azından bir tanesinde tanımlanmıştır. Bir kısım kümelenmiş DArT işaretleyicileri her bir genetik haritada gözlemlenmiştir ki bunlarda işaretleyicilerin % 20-34'ünün gereksiz olduğu saptanmıştır. DArT ve SSR işaretleyicilerinin ayrışım bozukluğu da her bir eşleştirme (kartografi) populasyonunda gözlemlenmiştir. Version 2.0 buğday dizisi üzerindeki işaretleyicilerin sadece % 14'ü aneuploid sıraları kullanarak delesyon eşleştirmesi (kartografisi) yoluyla kromozomal gözlere yerleştirilmiştir. Bu konuda metilleme eVects'inin DArT işaretleyicisini genetik eşleştirmeye (kartografiye) uygularken hesaba katılması gerektiği belirtilmiştir. Bununla beraber DArT işaretleyicilerinin delesyon eşleştirmesi (kartografi) genetik ve sitogenetik haritaları sıralamak ve buğday genomu üzerindeki DNA işaretleyicilerinin kapsamını hesaplamak için bir referans sağladığı sonucuna ulaşılmıştır.

Gill and Friebe (2009), sitogenetiğin, genetik ve sitolojiyle bağlantılı çalışmalar olduğunu ve tahıllarda, sitogenetik araştırmanın beş evresinin geçerliliğinin doğrulanabildiğini belirtmişlerdir : (i) F1 melezlerinin mayotik çiftleşme analizi; (ii) aneuploidi (çok kromozomluluk); (iii) moleküler sitogenetik (C-sarma ve melezleşmenin gerçekleştiği yerde); (iv) göz eşleştirmenin çıkarılması; ve (v) flow sitogenetik. Bu çalışmada özellikle buğday ve çavdarın kromozom analizine ilişkin olarak sitogenetik araştırmanın ilk dört evresi yeniden incelenmiştir. Mayoz eşleşme analizi diploid ve poliploid türler üzerinde genomik ilişkileri açığa çıkartılmıştır. Aneuploidi kromozom/kol ve karşılaştırmalı eşleştirme (kartografi) olasılıklarının önü açılmıştır. C-sarma ve yerinde gerçekleşen melezleşme buğday ve çavdar kromozomlarının heterokromatik ve ökromatik bileşenlerinin hızlı bir şekilde tanımlanmasına ve analiz edilmesine imkan sağlanmıştır. Delesyon stoklarının izolasyonu ve buğday genomunun belirtilen kısmının yapısını ve fonksiyonunu araştırmak için kullanılmalarına ek olarak, buğday kromozomlarının yapısal

ve fonksiyonel farklılıkları açığa çıkartılmıştır. Yukarıda bahsi geçen yapısal ve fonksiyonel farklılıkların mayoz evredeki kromozom davranışlarıyla harekete geçmiş olabileceği belirtilmiştir. DNA dizisinin bilgisi kullanılabilir hale geldikçe ve DNA düzeyi ve kromozom düzeyi incelemeleri arasındaki boşluğu dolduran Fiber Fish gibi tekniklerin ve diğerlerinin uygulanmasıyla gerçek anlamda tahıl kromozomlarının yapısal ve fonksiyonel farklılıklarının ve organizasyonunun biyolojik içeriğini anlamaya başlayabileceğimiz belirtilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Materyal olarak Türkiye'de halen yetiştirilmekte olan ve geniş ekim alanlarına sahip 2 adet makarnalık buğday çeşidi kullanılmıştır.

Çalışmada materyal olarak kullanılan makarnalık buğday çeşitleri T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü'nden sağlanmıştır.

Kullanılan çeşitlere ait özellikler aşağıda verilmiştir.

Çakmak-79: Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından 1979 yılında tescil edilmiştir. Tetraploid bir bitkidir. Sapı sağlam yapıda ve boyu 65-75 cm'dir. Yaprakları kısa normal saplı orta uzun büyüklükte, açık yeşil renkli ve tüsüzdür. Başakları kılçıklı, kavuzları çıplak; kırmızı, kahverengi renktedir. Başak boyu kısa, çok sık dizilimli ve dik yapıdadır. Boyunun kısa olmasından ve sapının sağlam yapıda olmasından dolayı yatmaya dayanıklıdır. Tanesi amber rengindedir ve camsı yapıdadır. Yabancı otlara karşı rekabete dayanamaz. Alternatif gelişme gösterir. Kışa ve kurağa dayanımı iyi olup, orta erkenci bir çeşittir. Özellikle sulanabilen alanlarda yüksek verim vermektedir. Gübreye reaksiyonu iyi olup, tane dökmemesi ve harman olma kabiliyetinin yüksek olması ile bilinmektedir. Orta kaliteli bir makarnalık çeşittir. Olumsuz şartlarda dönme oranı artmaktadır, ayrıca dönme oranının yüksek olması, makarnalık buğday çeşitlerinde oluşan unsu yapı nedeniyle istenmeyen bir özelliktir. Sarı pasa hassas, kahverengi pasa orta dayanıklı, kara pasa orta hassastır. Sürmeye dayanıklı, راستیға ise hassastır. Orta Anadolu ve Geçit Bölgeleri'ne tavsiye edilir. Ayrıca Marmara Bölgesi'nin kıyı bölgelerine de tavsiye edilmektedir. Başak verimi 1,84 g, dekara tane verimi 206 kg/da, başaktaki tane sayısı 35,3 şeklindedir (Ayçiçek ve Yıldırım 2006).

Kunduru-1149: Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından 1967 yılında tescil edilmiştir. Islah yöntemi seleksiyondur. Başak tipi kahverengi, tane görünümü amber kırmızısı ve camsı, bitki boyu 115-130 cm'dir. Tarımsal özellikleri; orta geççi, kışlık tabiatlı ve en geniş ekim alanına sahip, gübrelemeye karşı tepkisi iyi olan

kaliteli makarnalık buğday çeşididir. Aşırı yağışlı yıllarda uzun boylu olması nedeniyle verim potansiyelinin yüksek olduğu (özellikle taban arazi) yerlerde yatmaya hassastır. Stres koşullarına dayanıklılığı nedeniyle verim stabilitesi yüksek, kardeşlenme azdır. Tane ve sap verimi yüksektir. Hektolitre ağırlığı 81-84 kg, protein % 13-15, mikro SDS sedimentasyonu 8-11 ml ve karoten miktarı 7-9 ppm. olup makarnalık kalitesi iyidir. Tarla şartlarında rastık ve sürmeye dayanıklı, sarı pasa orta dayanıklı, kara ve kahverengi pasa hassastır. Önerildiği bölgeler; Orta Anadolu Geçit Bölgeleri, Trakya yarı taban, taban alanlarıdır (Anonim 2009).

3.2 Yöntem

3.2.1 *In vitro* yöntemler

Araştırmada bitki büyüme düzenleyicisi olarak farklı 2,4-D ve picloram dozları kullanılmıştır. Kontrol olarak 0 dozunun değerlendirildiği çalışmada, her iki bitki büyüme düzenleyicisi için 3, 6, 9, 12 mg/l olmak üzere, 5 farklı 2,4-D ve 5 farklı picloram'dan oluşan toplam 10 dozda incelemeler yapılmıştır.

Geniş bir doz aralığının kullanıldığı çalışmada buğday çeşitlerinde, doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan sentetik oksinlerden 2,4-D'nin (dichlorophenoxyacetic acid) ve günümüzde kullanılmaya başlanılan picloramin (4-amino-3,5,6- trichloropicolinic acid) kallus gelişimi üzerine olan etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve en yüksek kallus oluşum değerlerini veren picloram ve 2,4- D dozlarını içeren bitki örneklerinin kallus ağırlığı ve kallus yüzdesi hesaplanarak belirlenmiştir.

Tez çalışması boyunca gerçekleştirilen ve *in vitro* yöntemler içerisinde yer alan; sterilizasyon, besin ortamı hazırlanması, embriyo çıkarılması ve besin ortamına yerleştirilmesi, kallus gelişimi aşamaları Şekil: 3.1'de gösterilmektedir.

3.2.1.1 Kullanılan ekipmanların sterilizasyonu

In vitro çalışmalarda, çalışılan laboratuvarın ve kullanılan tüm ekipmanların steril olması bakteriyel bulaşma olmadan başarılı sonuçlar elde etmede büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle her çalışma öncesinde ekipmanların özelliklerine göre steril edilmeleri sağlanmıştır.

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

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

3.2.1.2 Steril distile su hazırlanması

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

3.2.1.3 Stok 2,4 D ve picloram çözeltilerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan picloram ve 2,4-D bitki büyüme düzenleyicilerinden her biri için 25 ml'lik 1 mg/ml (1:1) oranında stok çözelti hazırlanmıştır.

1 mg/ml'lik 25 ml 2,4-D stok çözeltisi için 0.025 g 2,4-D tartım kağıdı üzerinde hassas terazide tartılmış ve 25 ml alkol içerisinde çözüldürülmüştür. Ardından vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Kullanımın ardından stok çözelti + 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

1 mg/ml'lik 25 ml picloram stok çözeltisi için 0.025 g picloram tartım kağıdı üzerinde hassas terazide tartılmış ve 25 ml NaOH içerisinde çözüldürülmüştür. Ardından vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Kullanımın ardından stok çözelti + 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.1.4 Besin ortamlarının hazırlanması

Olgunlaşmış embriyolardan kallus gelişiminin sağlanması için hazır MS (Murashige and Skoog, 1962) ile katı besin ortamları hazırlanmıştır. Besin ortamı, formülünde belirtilen organik, inorganik ve diğer maddelerden oluşan, bitkilere topraktan karşıladıkları her türlü besin maddesi ve su gereksinimlerini *in vitro* koşullarda sağlayan karışımdır.

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

Buna göre 250 ml'lik besin ortamı hazırlamak için:

- 500 ml'lik behere 200 ml distile su konulmuş ve içine uygun büyüklükte bir balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir.
- 1,1 g MS (Duchefa)
- 5 g sukroz (Sigma) tartılarak, su içerisine ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı ile tamamen erimeleri sağlanmıştır.
- Farklı 2,4-D ve picloram dozları olarak 0, 3, 6, 9, 12 mg/l'lik yaygın olarak kullanılan yoğunluklar uygulanmıştır.
- 0 mg/l'lik dozlar için bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmamıştır.
- Her biri 3 mg/l picloram ve 3 mg/l 2,4-D içeren besin ortamı hazırlamak için, 1 mg/ml'lik hazır stoklardan mikropipet yardımı ile 750 µl çekilerek ortama eklenmiştir.
- Her biri 6 mg/l picloram ve 6 mg/l 2,4-D içeren besin ortamı hazırlamak için, 1 mg/ml'lik hazır stoklardan mikropipet yardımı ile 1500 µl çekilerek ortama eklenmiştir.
- Her biri 9 mg/l picloram ve 9 mg/l 2,4-D içeren besin ortamı hazırlamak için, 1 mg/ml'lik hazır stoklardan mikropipet yardımı ile 2250 µl çekilerek ortama eklenmiştir.
- Her biri 12 mg/l picloram ve 12 mg/l 2,4-D içeren besin ortamı hazırlamak için, 1 mg/ml'lik hazır stoklardan mikropipet yardımı ile 3000 µl çekilerek ortama eklenmiştir.
- Hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 1 N NaOH ve 1N HCl kullanılarak pH, kallus gelişimi için en uygun değer olan 5.8'e ayarlanmıştır.

- Ortamı katılaştırmak için 1,5 g agar tartılarak Duran şişesine konulmuş ve üzerine hazırlanan ortam eklenmiştir.
- Şişe kapağı sıkılmadan ortam, otoklavda (121 °C, 1.2 psi basınç, 25 dakika) steril edilmiştir.
- Daha sonra biraz soğutularak steril kabindeki önceden steril edilmiş olan 10 cm'lik petri kaplarına, her birinde yaklaşık 30 ml olacak şekilde dökülmüştür.
- Steril kabin içerisindeki ortamların yaklaşık yarım saat süre ile soğutularak katılaşması sağlanmış ve petrilere kapakları kapatılarak kenarları streç film ile kaplanmıştır.
- En yüksek kallus gelişiminin gözlemlendiği 3 mg/l 2,4-D içeren Çakmak-79, 3 mg/l 2,4-D içeren Kunduru-1149, 3 mg/l picloram içeren Çakmak-79 ve 3 mg/l picloram içeren Kunduru-1149'a ait petrilere dökülen örneklerin rejenerasyonu için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS-0 ortam yukarıdaki prosedüre göre hazırlanmıştır. Ortamın pH'ı aynı şekilde 5.8'e ayarlanmış ve otoklavda steril edildikten sonra steril kabin içerisinde petrilere dökülmüştür.

3.2.1.5 Eksplantların yüzey sterilizasyonu

Eksplant olarak olgun embriyoların kullanıldığı çalışmada yüzey sterilizasyonu steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

- Tohumlar kavanozlara konularak (85 tohum/kavanoz) manyetik karıştırıcı üzerinde (200 devir/dakika) % 70'lik (v/v) alkolde 5 dakika süresince karıştırılmıştır.
- Tohumlar üç kez steril distile su ile yıkanmış, yıkama süreleri 30 saniye olarak uygulanmıştır.
- Bunu izleyen aşamada tohumlar %5'lik (v/v) ticari sodyum hipoklorit (Ace, Colgate Palmolive Co.) solüsyonunda, manyetik karıştırıcı üzerinde (200 devir/dakika) 25 dakika çalkalanmıştır.
- Tohumlar yedi kez steril distile su ile yıkanarak ortamdan sodyum hipokloritin uzaklaşması sağlanmış, yıkama süreleri 30 sn olarak uygulanmıştır.
- Steril distile su içine alınan tohumlar su banyosunda (33 °C), 2 saat süre ile şişirilerek embriyo çıkarma aşamasına hazır hale getirilmiştir (Özgen vd. 1998).

3.2.1.6 Kallus oluşumu aşaması

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

- Steril ve yumuşamış tohumlarda embriyolar steril kabin içerisinde bistüri ve pens yardımıyla endospermelerinden ayrılmıştır.
- Embriyolar kalkancık tarafı ortama değmeyecek şekilde kallus ortamı içeren petri kaplarına 10'ar adet yerleştirilmiştir. Çalışma her bir bitki büyüme düzenleyicisi dozu için 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür.
- Petriler, kenarları streçlenerek 14 gün süre ile 26 °C'deki inkübatörde (Bellco, Shellab) karanlıkta bekletilmiştir.

3.2.1.7 Kallus gelişimi aşaması

- 14 günün sonunda oluşan kalluslar, içinde buldukları petri kaplarıyla birlikte tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir.
- Steril kabinde, kallus oluşturmuş olan embriyolardan bistüri yardımıyla oluşan sürgünler ayrılarak bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen (MS-0) besin ortamlarına alınmıştır.
- Sürgünleri, kallus gelişim ortamını ve tartılırken kenarında bulunan streçi içeren petri tekrar tartılmış ve aradaki fark 'kallus ağırlığı' (mg) olarak değerlendirilmiştir.
- Kallus oluşturan embriyo sayısı belirlenerek 'kallus oluşumu' (%) değerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.
- Maksimum kallus ağırlığının ve kallus oluşumunun gözlemlendiği 3 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l picloram içeren ortamdaki kalluslar Özgen vd. (1998)'e uygun olarak rejenerasyon ortamına (MS-0) köklendirilmek üzere alınmıştır.
- Kültür odasına yerleştirilerek 4 hafta süreyle 16 saatlik fotoperitodda (1500 Lux) ve 25 °C sıcaklıkta bekletilerek rejenere edilmiştir.
- Kalluslardan gelişen kök uçları sitogenetik çalışmada kullanılmak üzere gerekli işlemlere tabi tutulmuştur.



Şekil 3.1 Tez çalışması boyunca gerçekleştirilen sterilizasyon, besin ortamı hazırlanması, embriyo çıkarılması, besin ortamına yerleştirilmesi ve kallus gelişimi aşamaları

3.2.2 Sitolojik yöntem

Araştırma materyali olarak kullanılan Çakmak-79 ve Kunduru-1149 makarnalık buğday çeşitlerinde, en iyi kallus gelişiminin görüldüğü 3 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l picloram dozlarını içeren besi ortamlarındaki örneklerden rejenerasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kalluslardan oluşan bitki sürgünlerindeki kök uçlarından örnekler alınarak, sitolojik analiz yapılmıştır ve buğday hatlarının kromozom sayıları ve yapılarında oluşabilecek değişiklikler belirlenmeye çalışılmıştır.

Buğday kök uçlarından kromozomların tespiti ve preparatların hazırlanmasında Shigenega ve Larter (1971) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır.

3.2.2.1 Prefiksasyon aşaması

Elde edilen kök uçlarına uygulanan ilk işlem prefiksasyondur. Bu ilk işlemin amacı kromozomları incelenebilecek düzeyde tutmaktır. Bu işlem ile iğ ipliklerinin oluşumu durdurulur, kromozomların kısalması ve düzelmesi, ayrıca kromozomların güvenilir bir şekilde sayılması ve büyüklüklerinin karşılaştırılması sağlanır.

Bu amaçla, kesilen kök uçları (15-20 adet) 50 ml saf su içine 300 µl α - monobromonaftalin konarak vorteks yardımıyla çalkalanır ve oda sıcaklığında 2 saat, daha sonra 16 saat, 4°C' de buzdolabında bekletilir.

3.2.2.2 Fiksasyon aşaması

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

Bu amaçla, buzdolabındaki, 50 ml'lik şişe içerisindeki örnekler pens yardımıyla Ependorf tüplerine alınır. Mikropipet yardımıyla çekilen 1 ml saf su ile örnekler 2 kez yıkanır. Ardından kökler %99'luk glasiyel asetik asitte ($\text{CH}_3\text{-COOH}$) 30 dakika bekletilir.

3.2.2.3 Hidroliz aşaması

Hidroliz, dokuların hücrelerini birbirinden ayırıp, daha iyi gözlenebilmesi bakımından önemlidir. Özellikle bitki dokularının Feulgen ile boyanmadan önce hidroliz yapılması gerekir. Hidroliz için zaman, sıcaklık derecesi, hidrolizde kullanılan HCl'in konsantrasyonu önemlidir.

Bu aşamada, örneklerden glasiyel asetik asit mikropipet yardımıyla uzaklaştırılır ve 2 kez 5'er dakika saf su ile yıkanır. Yıkamadan sonra kök uçları 1 N HCl' de $60\text{ }^\circ\text{C}$ 'lik sıcak su banyosunda 12 dakika bekletilir. Bu işlemin ardından örnekler saf su ile 5 dakika yıkanır.

3.2.2.4 Boyama aşaması

Kök uçları oda sıcaklığında 2 saat feulgen boyada bekletilip, daha sonra tüm gece feulgen boya içerisinde $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında bekletilmiştir. Feulgen, örnek HCl ile hidroliz edildikten sonra kullanılır. Feulgenin yapılışında kullanılan fuksin bazik çözültisi kromatini seçici olarak boyar. Feulgenin boyamadaki etkisi aldehit reaksiyonuna bağlıdır.

Boyanmış kök ucu örneklerinden preparatlar hazırlanarak aceto-carmine boya ile mitotik metafaz 1 döneminde mikroskopta inceleme yapılmıştır.

3.2.2.5 Preparatların hazırlanması ve mikroskopta incelenmesi

Buzdolabında feulgen boya içerinden çalışılacak miktardaki kök ucu pens yardımıyla alınır ve içerisinde saf su bulunan petriye koyulur. Kök ucu su içerisinde yaklaşık 10 dakika bekletildikten sonra pens yardımıyla üzerindeki suyun uzaklaştırılması için filtre kağıdı üzerine alınır, ardından lama aktarılır. Mikropipet yardımıyla $20\text{ }\mu\text{l}$ aceto-carmine çekilir ve lam üzerindeki örneğin üzerine bırakılır. Pipetaj yapılarak örneğin boyayı absorbe etmesi sağlanır. Daha sonra örneğin uç kısmındaki daha koyu boyanmış, kısa bölge (kök ucu) bistüri yardımıyla kesilir ve diğer kısım uzaklaştırılır. Bir süre daha kök ucu aceto-carmine'de bekletilir. Ardından bistüri yardımıyla kök ucu ufak parçalara ayrılır. $45\text{ }^\circ\text{C}$ 'lik açı ile lamel lamın üzerine kapatılır, hava kabarcığı önlenir. Üzerine filtre kağıdı ile sıkıca

bastırılarak, mikroskopta gözlenmesi istenmeyen 3 boyutlu görüntü giderilir ve hücrelerin parçalanıp, kromozomların birbirinden ayrılması için kurşun kalemin tersiyle örneklerin (filtre kağıdının üzerinden) üzerine vurularak, preparat ezilir. Buğday kök ucu örneklerinden preparat hazırlanma aşamaları Şekil 3.2’de gösterilmektedir.

Hazırlanan preparat öncelikle 10x’lik küçük büyütmede daha sonra sırasıyla, 20x, 40x’lik büyütmelelerde incelenir. En son olarak 100x’lik büyütmede, immersiyon objektifinde, immersiyon yağı yardımıyla incelenir. Sayılabilen ve net olan kromozom görüntüleri mikroskoba bağlı fotoğraf makinesi ile fotoğraflanır ve bilgisayar ortamına aktarılır.

3.2.2.6 Sitolojik çalışmalarda kullanılan çözelti ve boyaların hazırlanması

Sitolojik çalışmalarda 1 N HCl çözeltisi, feulgen ve aceto-carmine boyaları kullanılmıştır.

1 N HCl çözeltisinin hazırlanması

Normal çözelti yapmak için eşdeğer gramı alınacak asitlerin çoğu sulu çözelti halinde bulunur. Normal çözelti yapmak için ne kadar asidin distile suya ilave edileceği aşağıdaki formülle bulunur.

$$1 \text{ L Normal çözelti için gerekli miktar (ml)} = \frac{\text{Molekül Ağırlığı}}{\text{Birleşme Değeri} \times \text{Özgül Ağırlık} \times \text{Çözelti Kons.}}$$

HCl’ de eşdeğer gram = 36,5 / 1 = 36,5 bulunur.

1 N HCl çözeltisi hazırlamak için 36,5 g HCl alınır 1000 ml’ye distile su ile tamamlanır. Yoğunluğu (d) = 1,19 ve % 37’ lik çözeltiden 1 N hazırlamak için;

$$1 \text{ litre Normal çözelti için gerekli miktar (ml)} = \frac{36,5}{1 \times 1,19 \times \left(\frac{37}{100}\right)} = 83 \text{ ml bulunur.}$$

83 ml % 37’lik HCl çözeltisinden alınır, geniş bir kaba konur, distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır ve 1 N HCl çözeltisi hazırlanmış olur.

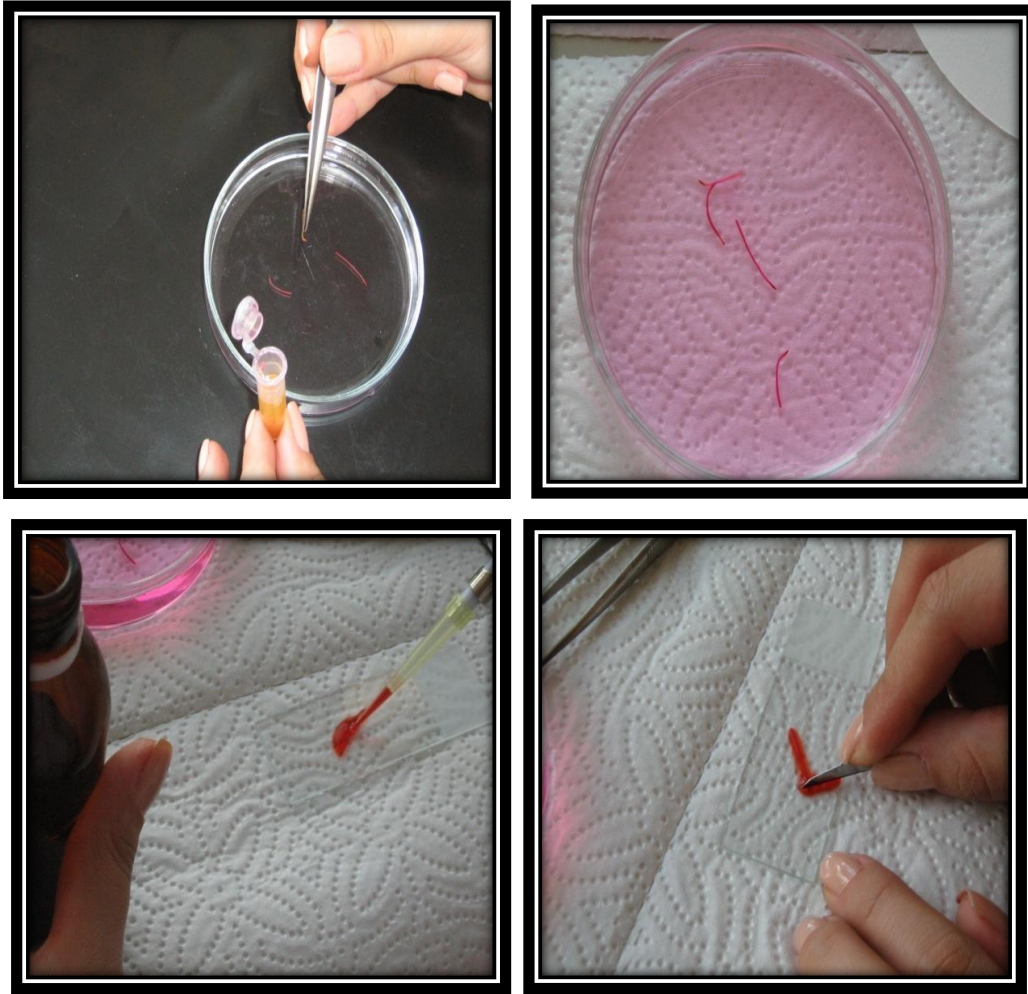
Feulgen boyasının hazırlanması

Feulgen boyasının hazırlanması için 1 g kristal halinde fuksin bazik tartılır ve küçük bir havanda ezilir. 500 ml’lik bir erlen mayerin içine ezilmiş olan bazik fuksin dikkatlice

etrafına bulaştırılmadan konur. Bir başka erlen mayerde 200 ml'lik damıtık su kaynatılır. Toz halindeki bazik fuksin üzerine bu kaynamış su yavaş yavaş ilave edilir ve 50°C'ye soğuyuncaya kadar karıştırılır. 20 ml'lik 1 N HCl ilave edilir. Filtre kağıdı (Whatmann No:1) ile süzülür. 2 g potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) ilave edilir. Boya ağzı iyice kapatılmış bir şişeye koyup karanlık bir dolapta bir gece bekletilir. Böylece vişne çürüğü rengindeki boya açık çay rengi olur. Daha sonra hazırlanan boya etrafı alüminyum folyo ile sarılmış cam şişe içerisinde 4°C'de buzdolabında saklanır.

Aceto-carmine boyasının hazırlanması

Aceto carmine boyasının hazırlanması için, %45'lik 45 ml asetik asit, bir kapta bulunan 55 ml distile su içine konur ve daha sonra başka bir kapta kaynayan sıcak su içine bu kap yerleştirilir ve 10 dakika daha kaynatmaya devam edilir. Isınan %45'lik asetik asit içine, tartılan 1 g carmine boya yavaş yavaş ve karıştırılarak eklenir, 10 dakika daha karıştırılarak ısıtılır. Daha sonra hızlı bir şekilde soğutmak için, içine balık konmuş olan solüsyon kabı, soğuk su dolu bir kaba yerleştirilir ve karıştırıcıda, içine termometre konup, oda sıcaklığına gelinceye kadar karıştırılır. Filtre edilip koyu renkli 100 ml'lik kapaklı kaba konarak, buzdolabında saklanır.



Şekil 3.2 Buğday kök ucu örneklerinden preparat hazırlanma aşamaları

3.2.3 Verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesi

Kallus oluşum yüzdesi; kültürün 14. gününde her petride kallus oluşturan embriyoların sayısının toplam embriyo sayısına oranlanıp, yüzde değerlere çevrilmesiyle belirlenmiştir. Kallus ağırlığı ise; kültürün 14. gününde embriyolardan oluşan kallusların tartılmasıyla elde edilmiştir.

Çakmak-79 ve Kunderu-1149 çeşitlerinde iki farklı bitki büyüme düzenleyicisi ve 5'er farklı bitki büyüme düzenleyicisi dozu için 3 tekrarlamalı olarak yürütülen bu çalışmada; incelenen karakterler için ayrı ayrı elde edilen verilerin SPSS programı kullanılarak istatistiki analizleri yapılmıştır. Her bir çeşit ve bitki büyüme düzenleyicisi dozu arasındaki farkın belirlenmesinde varyans analizi ve Asgari Önemli Fark (AÖF) testinden yararlanılmıştır (Düzgüneş 1983).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Ülkemiz tarımında, hem yetiştiricilik hem de genetik materyal olarak önem taşıyan Çakmak-79 ve Kunduru-1149 makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyolarından en iyi kallus gelişimini sağlamak amacıyla, 5'er farklı dozda (0, 3, 6, 9, 12 mg/l) picloram ve 2,4-D bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır. En yüksek kallus oluşum oranını veren dozları içeren petriyelerdeki örneklerden bitki rejenerasyonu yapılmış ve rejenere olan bitkilerden elde edilen kök uçlarından sitogenetik çalışma yapılarak, bitki büyüme düzenleyicilerinin en yüksek kallus gelişimini veren dozlarının her iki çeşitte kromozom sayısı ve yapısında değişiklik oluşturup oluşturmadığı mitoz bölünmenin metafaz 1 evresinde incelenmiştir. Tüm bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile tartışma ve değerlendirmeler bu bölümde sunulmuştur.

Araştırmada, Çakmak-79 ve Kunduru-1149 buğday çeşitlerinin olgun embriyoları farklı dozlarda picloram ve 2,4-D içeren ortamlara alınmıştır. Kallus gelişim aşaması 14 gün sürmüştür ve 14 günün sonunda kallus oluşum oranları ve kallus ağırlıkları belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre en yüksek gelişimin gözlemlendiği 3 mg/l 2,4-D içeren Çakmak-79, 3 mg/l 2,4-D içeren Kunduru-1149 ile 3 mg/l picloram içeren Çakmak-79, 3 mg/l picloram içeren Kunduru-1149 örneklerinden bitki rejenerasyonu çalışması yapılmıştır. Örnekler rejenerasyon aşaması için bir ay süreyle iklim odasında muhafaza edilmişlerdir. Rejenere olan bitkilerden gelişen kök uçlarından sitogenetik çalışma yapılmıştır.

4.1 Çakmak-79 Çeşidinin Farklı 2,4-D Dozlarında *In vitro* Parametrelere Tepkisi

Çakmak-79 çeşidinin 5 farklı 2,4-D (0, 3, 6, 9, 12 mg/l) dozundaki kallus oluşum oranı ve kallus ağırlığına ait verilere uygulanan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Çakmak-79 çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında kallus gelişim oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Genel	14	217,734	-	
Dozlar	4	215,067	53,767	201,625**
Hata	10	2,667	0,267	

** : Ortalamalara ilişkin olarak % 1 düzeyinde farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.2 Çakmak-79 çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında kallus ağırlığına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Genel	14	1,154	-	
Dozlar	4	3,245	0,811	104,755**
Hata	10	0,077	0,008	

** : Ortalamalara ilişkin olarak % 1 düzeyinde farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi; varyans analizinin sonuçlarına göre; 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisinin Çakmak-79 bitkisine uygulanan 0, 3, 6, 9, 12 mg/l’lik dozlarının sonucunda elde edilen kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları birbirinden önemli düzeyde farklıdır ($F_{4,14}=201,625$ ve $F_{4,14}=104,755$, $p<0.01^{**}$).

Çakmak-79 çeşidine uygulanan farklı 2,4-D dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıkları, uygulanan dozlara göre alt gruplara ayrılmıştır (Çizelge 4.3). Buna göre; 3 mg/l picloram uygulaması sonucu elde edilen kallusların ortalama ağırlığı; kontrol grubundan (0 mg/l) 0,7863 mg daha fazladır. Bu iki grup arasındaki ortalama gelişim ağırlığı farkının standart sapması 0.01906’dır. Ortalama farkla standart sapma toplanıp, çıkarılırsa 3 mg/l’lik dozun kontrol grubuna göre ortalama ağırlığının minimumu 0,7439 mg; maksimumu 0,8288 mg olarak hesaplanır. Benzer şekilde her bir doz için değerler tabloda gösterilmiştir. Buna göre; Çakmak-79 çeşidine uygulanan farklı 2,4-D dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıkları 0-0,7863 mg arasında değişmektedir.

Çizelge 4.3 Çakmak-79 çeşidine uygulanan farklı 2,4-D dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin LSD analizi sonuçları

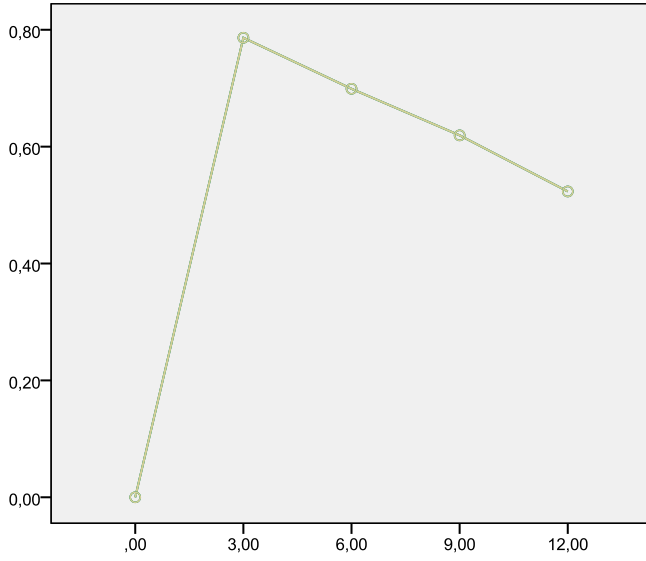
2,4-D Miktarı	Doz	Ort. ağırlık	Std.	En az (min)	En çok (max)
0	3	0,7863	0,01906	0,7439	0,8288
	6	0,6990	0,01906	0,6565	0,7415
	9	0,6193	0,01906	0,5769	0,6618
	12	0,5233	0,01906	0,4809	0,5658
3	0	0,7863	0,01906	0,7439	0,8288
	6	0,0873	0,01906	0,0449	0,1298
	9	0,1670	0,01906	0,1245	0,2095
	12	0,2630	0,01906	0,2205	0,3055
6	0	0,6990	0,01906	0,6565	0,7415
	3	0,0873	0,01906	0,0449	0,1298
	9	0,0797	0,01906	0,0372	0,1221
	12	0,1757	0,01906	0,1332	0,2181
9	0	0,6193	0,01906	0,5769	0,6618
	3	0,1670	0,01906	0,1245	0,2095
	6	0,0797	0,01906	0,0372	0,1221
	12	0,0960	0,01906	0,0535	0,1385
12	0	0,5233	0,01906	0,4809	0,5658
	3	0,2630	0,01906	0,2205	0,3055
	6	0,1757	0,01906	0,1332	0,2181
	9	0,0960	0,01906	0,0535	0,1385

Dozlar arasındaki farklılığın nedenini belirlemek için yapılan Asgari Önemli Fark testi sonuçları Çizelge 4.4'te gösterilmektedir. Farklı 2,4-D dozları uygulanan Çakmak-79 bitkisinin dozlarının % 1'e göre 5 farklı gruba düştüğü görülmektedir.

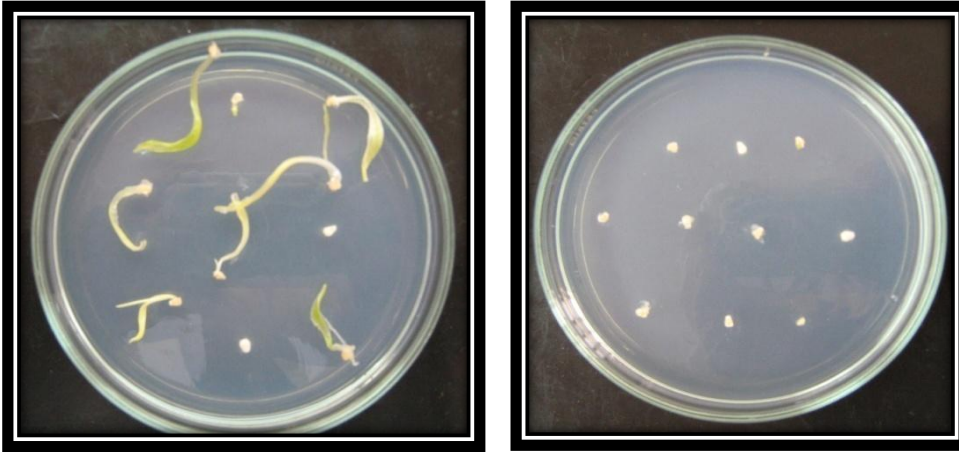
Çizelge 4.4 Çakmak-79 çeşidine farklı 2,4-D dozları uygulanması sonucu elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin AÖF testi sonuçları

Doz	Ortalama Ağırlık	% 1
0 mg/l	0	A
3 mg/l	0,786	E
6 mg/l	0,699	D
9 mg/l	0,619	C
12 mg/l	0,523	B

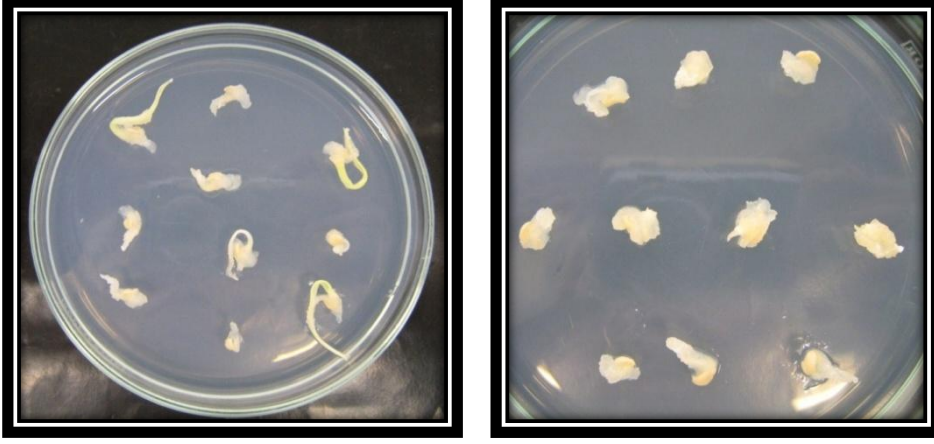
Kallus ağırlığı ve dozlar arasındaki ilişki Şekil 4.1’de gösterilmektedir. Şekilde x eksenini dozları, y eksenini kallus ağırlıklarını belirtmektedir. 0 mg/l 2,4-D içeren ortamda (Kontrol Grubu) kallus gelişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.2). 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kallus gelişim oranı ve kallus ağırlığı en yüksek olmuştur (Şekil 4.3). 6 mg/l’den itibaren kallus gelişim oranı ve kallus ağırlığında düşüş izlenmiştir. 14 günün sonunda gözlenen kallus oluşumları 6 mg/l picloram içeren ortam için Şekil 4.4’te, 9 mg/l 2,4-D içeren ortam için Şekil 4.5’te, 12 mg/l 2,4-D içeren ortam için Şekil 4.6’da gösterilmektedir.



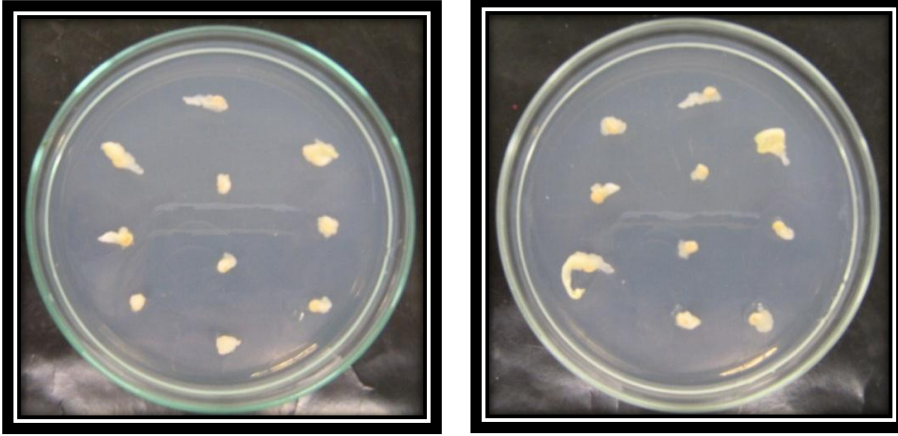
Şekil 4.1 Farklı 2,4-D dozları uygulanan Çakmak-79 çeşidinin dozlara bağlı kallus ağırlığı



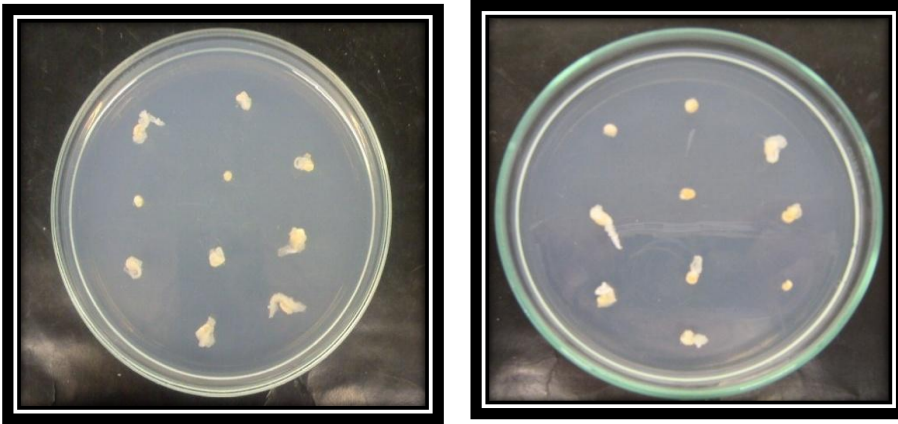
Şekil 4.2 Çakmak-79 çeşidinin 14 günün sonunda 0 mg/l 2,4-D (kontrol grubu) içeren ortamdaki gelişimi



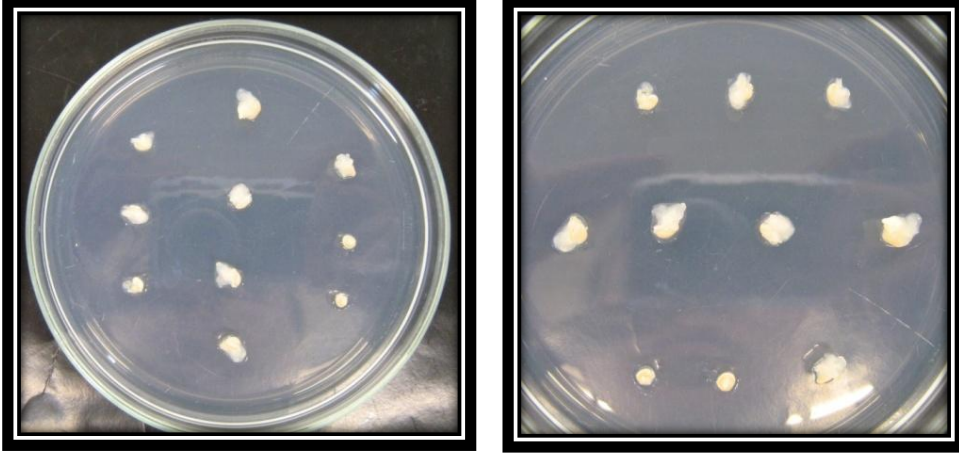
Şekil 4.3 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 3 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.4 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 6 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.5 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 9 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.6 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 12 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi

Farklı 2,4-D dozlarında kallus kültürüne alınan Çakmak-79 çeşidinde incelenen özellikler bakımından en yüksek değerler 3 mg/l doz uygulanan kültürden elde edilmiştir. Benzer sonuçlar çeşitli araştırmacılar tarafından da yayınlanmıştır. Ozias-Akins and Vasil (1983) ekmeklik buğdayda 2,4-D'nin farklı miktarlarının kallus oluşumu ve gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlar ve 2 mg/l 2,4-D'nin optimum olduğunu bildirmişlerdir. Redway *et al.* (1990) embriyogenik kallus elde etmek amacıyla 8 buğday çeşidinin embriyolarını 12 farklı ortam üzerinde kültüre almışlardır. Ortam denemesinde en fazla embriyogenik kallus oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında gözlenmiştir. Varshney *et al.* (1999) olgun embriyoları 2,4-D'nin farklı dozlarına sahip MS ortamında kültüre almışlar ve 2,5 mg/l 2,4-D'nin optimum olduğunu belirtmişlerdir. Pellegrineschi *et al.* (2004) ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde olgun embriyolarında farklı 2,4-D ve NaCl konsantrasyonlarının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonuçları genotipe göre değişmekle birlikte 2,5 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda kallus oluşumu en yüksek düzeyde olmuştur. Sağsöz ve Aydın (2006) buğdayda olgun embriyolardan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için farklı 2,4-D dozlarını denemişlerdir. 3 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda kallus gelişiminin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bulgularımız bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

4.2 Çakmak-79 Çeşidinin Farklı Picloram Dozlarında *In vitro* Parametrelere Tepkisi

Çakmak-79 çeşidinin 5 farklı picloram (0, 3, 6, 9, 12 mg/l) dozundaki kallus oluşum oranı ve kallus ağırlığına ait verilere uygulanan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.5 Çakmak-79 çeşidinin farklı picloram dozlarında kallus gelişim oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Genel	14	223,333	-	
Dozlar	4	222,000	55,500	416,250**
Hata	10	1,333	0,1333	

** : Ortalamalara ilişkin olarak % 1 düzeyinde farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.6 Çakmak-79 çeşidinin farklı picloram dozlarında kallus ağırlığına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Genel	14	3,322	-	
Dozlar	4	3,245	0,811	104,755**
Hata	10	0,077	0,008	

** : Ortalamalara ilişkin olarak % 1 düzeyinde farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi; varyans analizinin sonuçlarına göre; picloram bitki büyüme düzenleyicisinin Çakmak-79 bitkisine uygulanan 0, 3, 6, 9, 12 mg/l'lik dozlarının sonucunda elde edilen kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları birbirinden önemli düzeyde farklıdır ($F_{4,14}=104,755$ ve $F_{4,14}=416.250$, $p<0.01$ **).

Çakmak-79 çeşidine uygulanan farklı picloram dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıkları, uygulanan dozlara göre alt gruplara ayrılmıştır (Çizelge 4.7). Buna göre; 3 mg/l picloram uygulaması sonucu elde edilen kallusların ortalama ağırlığı; kontrol grubundan (0 mg/l) 1,4563 mg daha fazladır. Bu iki grup arasındaki ortalama gelişim ağırlığı farkının standart sapması 0,07006'dır. Ortalama farkla standart sapma toplanıp, çıkarılırsa 3 mg/l'lik dozun kontrol grubuna göre ortalama ağırlığının minimumu 1,2143 mg; maksimumu 1,6984 olarak hesaplanır. Benzer şekilde her bir doz için değerler tabloda gösterilmiştir. Buna göre; Çakmak-79 çeşidine uygulanan farklı picloram dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıkları 0-1,4563 mg arasında değişmektedir.

Çizelge 4.7 Çakmak-79 çeşidine uygulanan farklı picloram dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin LSD analizi sonuçları

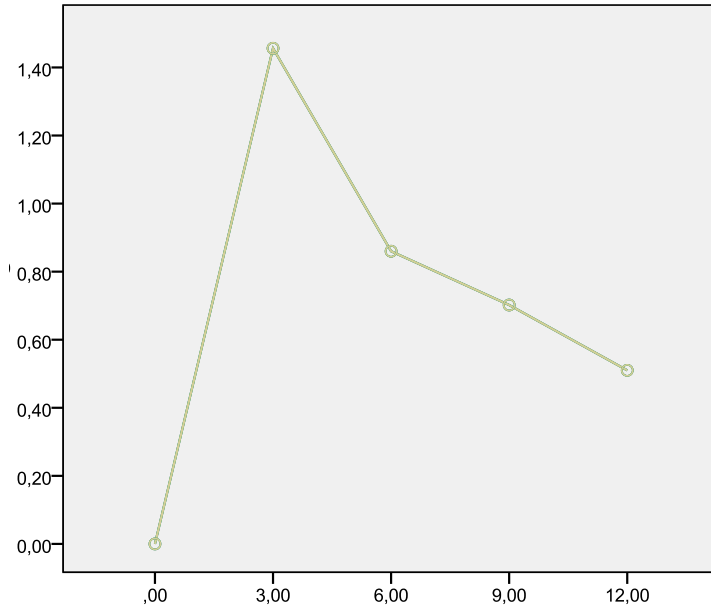
Picloram Miktarı	Doz	Ort. ağırlık	std.	En az (min)	En çok (max)
0	3	1,4563	0,07006	1,2143	1,6984
	6	0,8600	0,07006	0,6180	1,1020
	9	0,7020	0,07006	0,4600	0,9440
	12	0,6690	0,07006	0,4270	0,9110
3	0	1,4563	0,07006	1,2143	1,6984
	6	0,5963	0,07006	0,3543	0,8384
	9	0,7543	0,07006	0,5123	0,9964
	12	0,7873	0,07006	0,5453	1,0294
6	0	0,8600	0,07006	0,6180	1,1020
	3	0,5963	0,07006	0,3543	0,8384
	9	0,1580	0,07006	0,0840	0,4000
	12	0,1910	0,07006	0,0510	0,4330
9	0	0,7020	0,07006	0,4600	0,9440
	3	0,7543	0,07006	0,5123	0,9964
	6	0,1580	0,07006	0,0840	0,4000
	12	0,0330	0,07006	0,2090	0,2750
12	0	0,6690	0,07006	0,4270	0,9110
	3	0,7873	0,07006	1,0294	0,5453
	6	0,1910	0,07006	0,0510	0,4330
	12	0,0330	0,07006	0,2090	0,2750

Dozlar arasındaki farklılığın nedenini belirlemek için yapılan Asgari Önemli Fark testi sonuçları Çizelge 4.8’de gösterilmektedir. Farklı picloram dozları uygulanan Çakmak-79 bitkisinin dozlarının % 1’e göre 4 farklı gruba düştüğü görülmektedir.

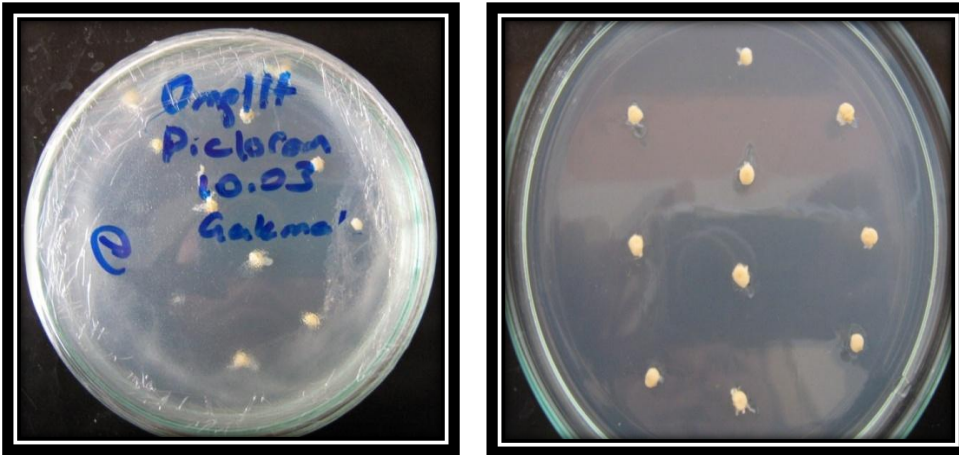
Çizelge 4.8 Çakmak-79 çeşidine farklı picloram dozları uygulanması sonucu elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin AÖF testi sonuçları

Doz	Ortalama Ağırlık	% 1
0 mg/l	0	A
3 mg/l	1,456	D
6 mg/l	0,860	C
9 mg/l	0,702	B
12 mg/l	0,669	B

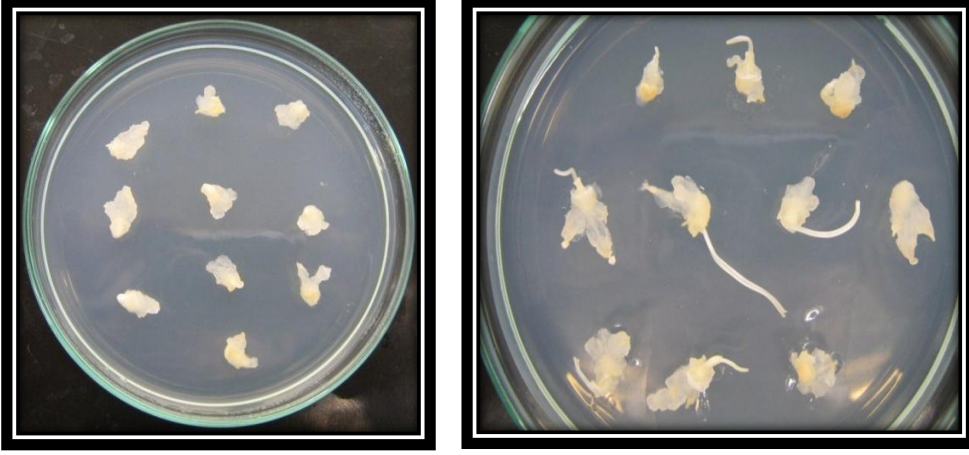
Kallus ağırlığı ve dozlar arasındaki ilişki Şekil 4.7’de gösterilmektedir. Şekilde x eksenini dozları, y eksenini kallus ağırlıklarını belirtmektedir. 0 mg/l picloram içeren ortamda (Kontrol Grubu) kallus gelişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.8). 3 mg/l picloram içeren ortamda kallus gelişim oranı ve kallus ağırlığı en yüksek olmuştur (Şekil 4.9). 6 mg/l’den itibaren kallus gelişim oranı ve kallus ağırlığında düşüş izlenmiştir. 14 günün sonunda gözlenen kallus oluşumları 6 mg/l picloram içeren ortam için Şekil 4.10’da, 9 mg/l picloram içeren ortam için Şekil 4.11’de, 12 mg/l picloram içeren ortam için Şekil 4.12’de gösterilmektedir.



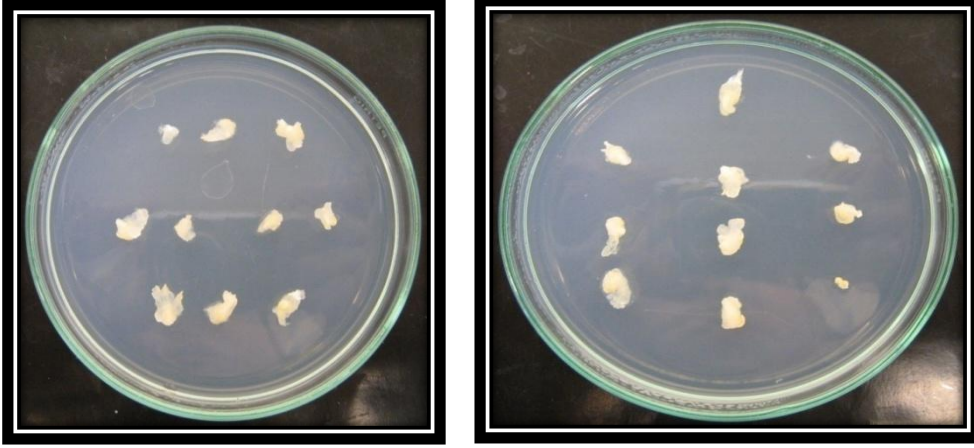
Şekil 4.7 Farklı picloram dozları uygulanan Çakmak-79 çeşidinin dozlara bağlı kallus ağırlığı



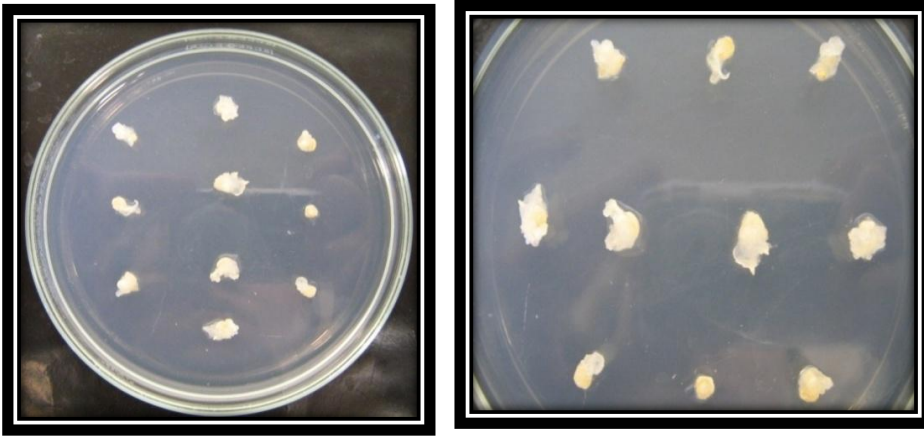
Şekil 4.8 Çakmak-79 çeşidinin 14 günün sonunda 0 mg/l picloram (kontrol grubu) içeren ortamdaki gelişimi



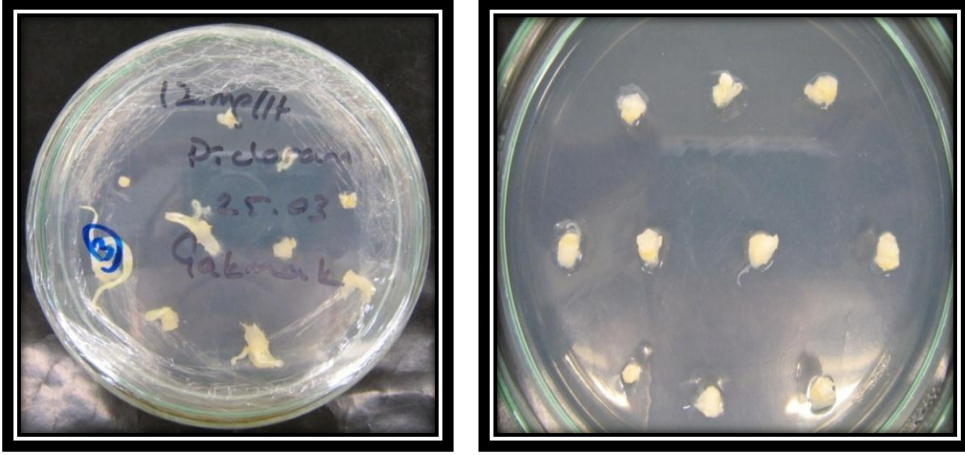
Şekil 4.9 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 3 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.10 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 6 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.11 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 9 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.12 Çakmak-79 çeşidine ait 14 günün sonunda 12 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi

Farklı picloram dozlarında kallus kültürüne alınan Çakmak-79 çeşidinde incelenen özellikler bakımından en yüksek değerler 3 mg/l doz uygulanan kültürden elde edilmiştir. Benzer sonuçlar çeşitli araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir. Buna göre Barro *et al.* (1999) 8 buğday ve 7 arpa çeşidinin olgunlaşmamış embriyoları ve yapraklarını kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada 2 mg/l picloram içeren MS ortamı üzerinde bitkileri kültüre almıştır ve alınan sonuçlara göre picloram içeren kallus ortamları üzerinde buğday yapraklarından somatik embriyo gelişimi picloram içermeyen kallus ortamlarına göre iki kat daha fazla olmuştur. He and Lazzeri (2001) 4 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını ve bitki parçalarını farklı konsantrasyonlarda picloram içeren ortamlarda kültüre almışlardır. Buna göre olgunlaşmamış buğday embriyolarında somatik embriyogenesis oluşumunun 2 mg/l picloram içeren ortamlarda daha fazla olduğunu saptamışlardır. Przetakiewicz *et al.* (2003); buğday, arpa, triticale üzerinde yaptıkları çalışmada; olgunlaşmamış embriyoları, içerisinde picloramın da yer aldığı 3 farklı oksin tipinin, dozlarının ve kombinasyonlarının yer aldığı ortamlarda kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda uygun oksin tipinin ve dozunun genotipe göre değişmekle birlikte 3 mg/l picloramın buğday, arpa ve tirticalede kallus oluşumunu teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Satyavathi *et al.* (2005); 4 farklı makarnalık buğdayda 3 farklı bitki büyüme düzenleyicisinin skutellum kültürlerine etkisini araştırmışlardır. 3 mg/l uygulanan picloram dozunun kallus gelişimini teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Bulgularımız bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

4.3 Kunduru-1149 Çeşidinin Farklı 2,4-D Dozlarında *In vitro* Parametrelere Tepkisi

Kunduru-1149 çeşidinin 5 farklı 2,4-D (0, 3, 6, 9, 12 mg/l) dozundaki kallus oluşum oranı ve kallus ağırlığına ait verilere uygulanan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 Kunduru-1149 çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında kallus gelişim oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Genel	14	223,600	-	
Dozlar	4	219,600	54,900	137,250**
Hata	10	4,000	0,400	

** : Ortalamalara ilişkin olarak % 1 düzeyinde farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.10 Kunduru-1149 çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında kallus ağırlığına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Genel	14	1,227	-	
Dozlar	4	1,216	0,304	271,890**
Hata	10	0,011	0,001	

** : Ortalamalara ilişkin olarak % 1 düzeyinde farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi; varyans analizinin sonuçlarına göre; 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisinin Kunduru-1149 bitkisine uygulanan 0, 3, 6, 9, 12 mg/l'lik dozlarının sonucunda elde edilen kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları birbirinden önemli düzeyde farklıdır ($F_{4,14}=137,250$ ve $F_{4,14}=271,890$, $p<0.01$ **).

Kunduru-1149 çeşidine uygulanan farklı 2,4-D dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıkları, uygulanan dozlara göre alt gruplara ayrılmıştır (Çizelge 4.11). Buna göre; 3 mg/l 2,4-D uygulaması sonucu elde edilen kallusların ortalama ağırlığı; kontrol grubundan (0 mg/l) 0,849 mg daha fazladır. Bu iki grup arasındaki ortalama gelişim ağırlığı farkının standart sapması 0,02730'tür. Ortalama farkla standart sapma toplanıp, çıkarılırsa 3 mg/l'lik dozun kontrol grubuna göre ortalama ağırlığının minimumu 0,7882 mg; maksimumu 0,9098 olarak hesaplanır. Benzer şekilde her bir doz için değerler tabloda

gösterilmiştir. Buna göre; Kunduru-1149 çeşidine uygulanan farklı 2,4-D dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıkları 0-0,849 mg arasında değişmektedir.

Çizelge 4.11 Kunduru-1149 çeşidine uygulanan farklı 2,4-D dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin LSD analizi sonuçları

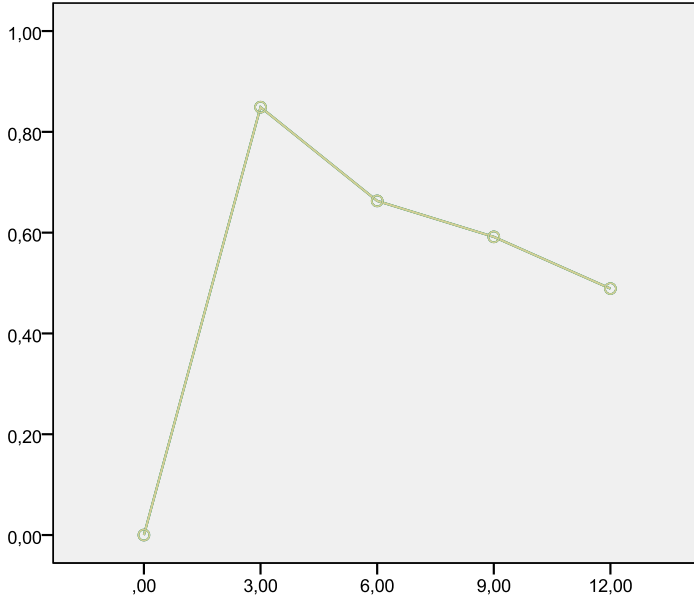
2,4-D Miktarı	Doz	Ort.ağırlık	std.	En az (min)	En çok (max)
0	3	0,8490	0,02730	0,7882	0,9098
	6	0,6630	0,02730	0,6022	0,7238
	9	0,5917	0,02730	0,5308	0,6525
	12	0,4890	0,02730	0,4282	0,5498
3	0	0,8490	0,02730	0,7882	0,9098
	6	0,1860	0,02730	0,1252	0,2468
	9	0,2573	0,02730	0,1965	0,3182
	12	0,3600	0,02730	0,2992	0,4208
6	0	0,6630	0,02730	0,6022	0,7238
	3	0,1860	0,02730	0,1252	0,2468
	9	0,0713	0,02730	0,0105	0,1322
	12	0,1740	0,02730	0,1132	0,2348
9	0	0,5917	0,02730	0,5308	0,6525
	3	0,2573	0,02730	0,1965	0,3182
	6	0,0713	0,02730	0,0105	0,1322
	12	0,1027	0,02730	0,0418	0,1635
12	0	0,4890	0,02730	0,4282	0,5498
	3	0,3600	0,02730	0,2992	0,4208
	6	0,174	0,02730	0,1132	0,2348
	9	0,1027	0,02730	0,0418	0,1635

Dozlar arasındaki farklılığın nedenini belirlemek için yapılan Asgari Önemli Fark testi sonuçları Çizelge 4.12’de gösterilmektedir. Farklı 2,4-D dozları uygulanan Kunduru-1149 bitkisinin dozlarının % 1’e göre 4 farklı gruba düştüğü görülmektedir.

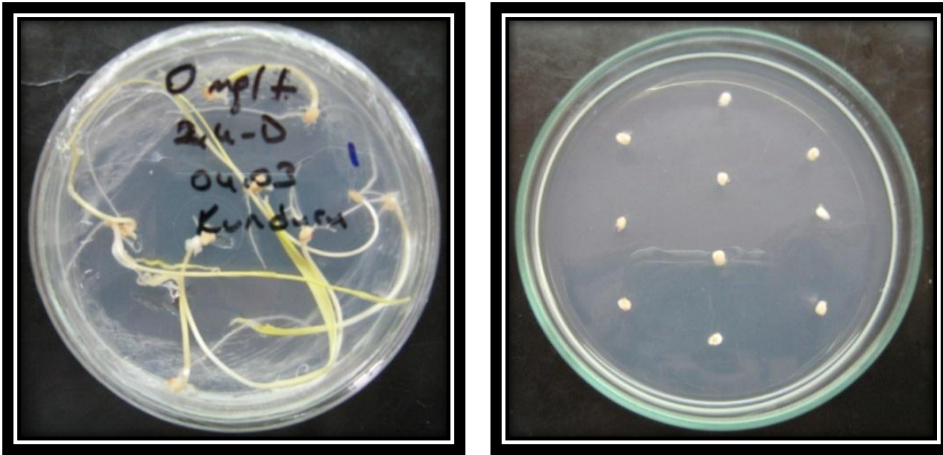
Çizelge 4.12 Kunduru-1149 çeşidine farklı 2,4-D dozları uygulanması sonucu elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin AÖF testi sonuçları

Doz	Ortalama Ağırlık	% 1
0 mg/l	0	A
3 mg/l	0,849	D
6 mg/l	0,663	C
9 mg/l	0,591	C
12 mg/l	0,489	B

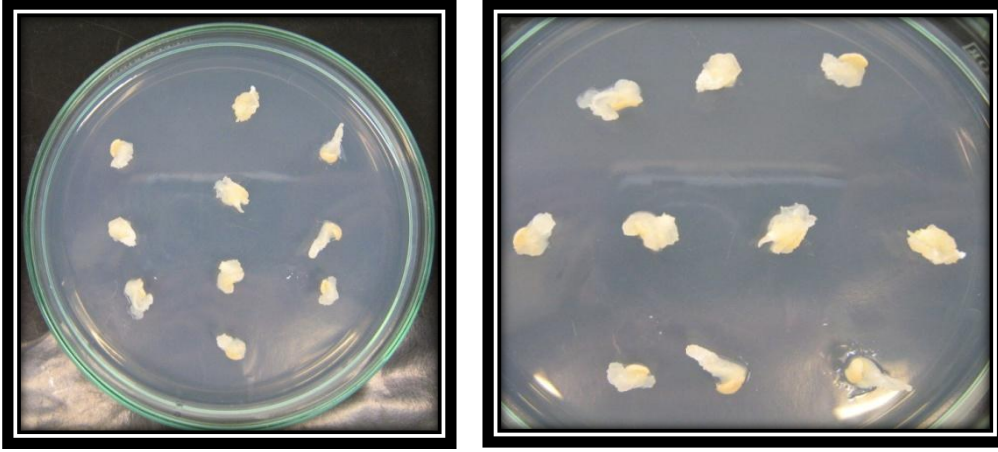
Kallus ağırlığı ve dozlar arasındaki ilişki Şekil 4.13’de gösterilmektedir. Şekilde x eksenini dozları, y eksenini kallus ağırlıklarını belirtmektedir. 0 mg/l 2,4-D içeren ortamda (Kontrol Grubu) kallus gelişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.14). 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kallus gelişim oranı ve kallus ağırlığı en yüksek olmuştur (Şekil 4.15). 6 mg/l’den itibaren kallus gelişim oranı ve kallus ağırlığında düşüş izlenmiştir. 14 günün sonunda gözlenen kallus oluşumları 6 mg/l 2,4-D içeren ortam için Şekil 4.16’da, 9 mg/l 2,4-D içeren ortam için Şekil 4.17’de, 12 mg/l 2,4-D içeren ortam için Şekil 4.18’de gösterilmektedir.



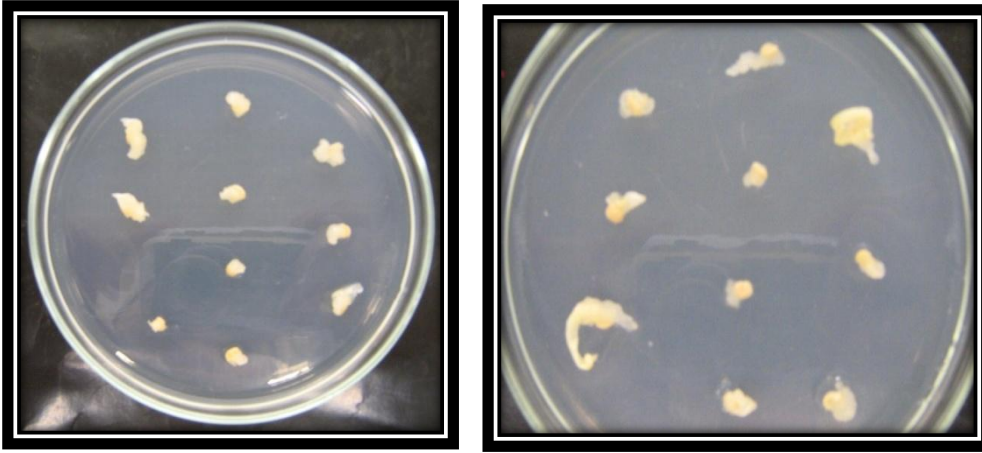
Şekil 4.13 Farklı 2,4-D dozları uygulanan Kunduru-1149 çeşidinin dozlara bağlı kallus ağırlığı



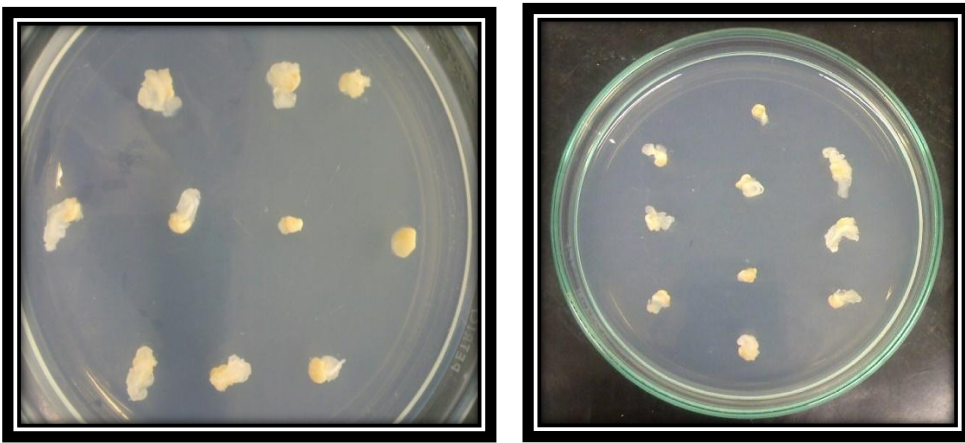
Şekil 4.14 Kunduru-1149 çeşidinin 14 günün sonunda 0 mg/l 2,4-D (kontrol grubu) içeren ortamdaki gelişimi



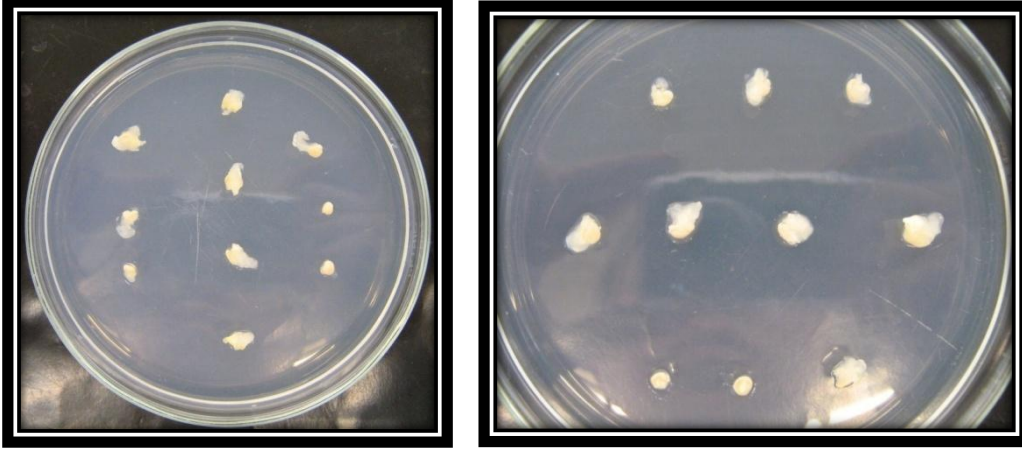
Şekil 4.15 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 3 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.16 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 6 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.17 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 9 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.18 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 12 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki kallus gelişimi

Farklı 2,4-D dozlarında kallus kültürüne alınan Kunduru-1149 çeşidinde incelenen özellikler bakımından en yüksek değerler 3 mg/l doz uygulanan kültürden elde edilmiştir. Benzer sonuçlar çeşitli araştırmacılar tarafından da yayımlanmıştır. Ozias-Akins and Vasil (1983) ekmeklik buğdayda 2,4-D'nin farklı miktarlarının kallus oluşumu ve gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlar ve 2 mg/l 2,4-D'nin optimum olduğunu bildirmişlerdir. Redway *et al.* (1990) embriyogenik kallus elde etmek amacıyla 8 buğday çeşidinin embriyolarını 12 farklı ortam üzerinde kültüre almışlardır. Ortam denemesinde en fazla embriyogenik kallus oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında gözlenmiştir. Varshney *et al.* (1999) olgun embriyoları 2,4-D'nin farklı dozlarına sahip MS ortamında kültüre almışlar ve 2,5 mg/l 2,4-D'nin optimum olduğunu belirtmişlerdir. Pellegrineschi *et al.* (2004) ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde olgun embriyolarında farklı 2,4-D ve NaCl konsantrasyonlarının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonuçları genotipe göre değişmekle birlikte 2,5 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda kallus oluşumu en yüksek düzeyde olmuştur. Sağsöz ve Aydın (2006) buğdayda olgun embriyolardan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için farklı 2,4-D dozlarını denemişlerdir. 3 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda kallus gelişiminin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bulgularımız bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

4.4 Kunduru-1149 Çeşidinin Farklı Picloram Dozlarında *In vitro* Parametrelere Tepkisi

Kunduru-1149 çeşidinin 5 farklı picloram (0, 3, 6, 9, 12 mg/l) dozundaki kallus oluşum oranı ve kallus ağırlığına ait verilere uygulanan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.13 Kunduru-1149 çeşidinin farklı picloram dozlarında kallus gelişim oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Genel	14	232,400	-	
Dozlar	4	230,400	57,600	288,000**
Hata	10	2,000	0,200	

** : Ortalamalara ilişkin olarak % 1 düzeyinde farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.14 Kunduru-1149 çeşidinin farklı picloram dozlarında kallus ağırlığına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
Genel	14	2,321	-	
Dozlar	4	2,302	0,575	305,134**
Hata	10	0,019	0,002	

** : Ortalamalara ilişkin olarak % 1 düzeyinde farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14'te görüldüğü gibi; varyans analizinin sonuçlarına göre; picloram bitki büyüme düzenleyicisinin Kunduru-1149 bitkisine uygulanan 0, 3, 6, 9, 12 mg/l'lik dozlarının sonucunda elde edilen kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları birbirinden önemli düzeyde farklıdır ($F_{4,14}=288,000$ ve $F_{4,14}=305,134$, $p<0.01$ **).

Kunduru-1149 çeşidine uygulanan farklı picloram dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıkları, uygulanan dozlara göre alt gruplara ayrılmıştır (Çizelge 4.15). Buna göre; 3 mg/l picloram uygulaması sonucu elde edilen kallusların ortalama ağırlığı; kontrol grubundan (0 mg/l) 1,1277 mg daha fazladır. Bu iki grup arasındaki ortalama gelişim ağırlığı farkının standart sapması 0,035460'tır. Ortalama farkla standart sapma toplanıp, çıkarılırsa 3 mg/l'lik dozun kontrol grubuna göre ortalama ağırlığının minimumu 1,0487 mg; maksimumu 1,2066 olarak hesaplanır. Benzer şekilde her bir doz için değerler tabloda

gösterilmiştir. Buna göre; Kunduru-1149 çeşidine uygulanan farklı picloram dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıkları 0-1,1277 mg arasında değişmektedir.

Çizelge 4.15 Kunduru-1149 çeşidine uygulanan farklı picloram dozları sonucunda elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin LSD analizi sonuçları

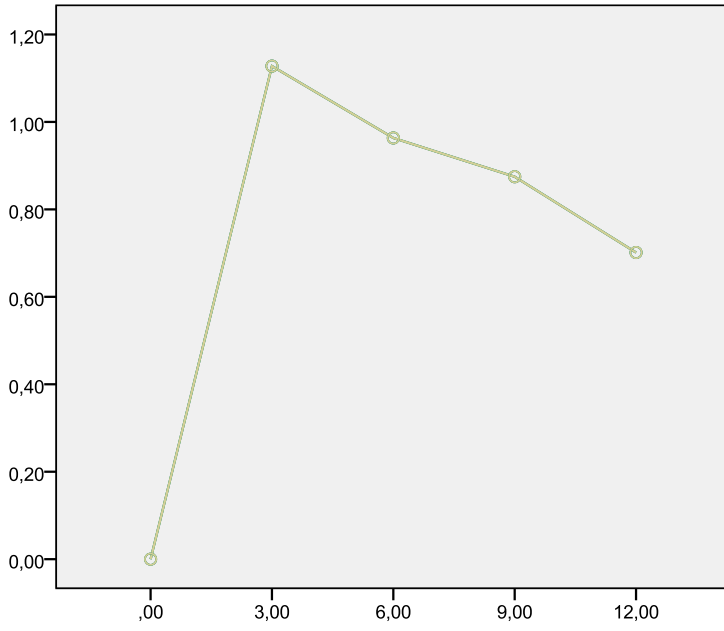
Picloram Miktarı	Doz	Ort. ağırlık	std.	En az (min)	En çok (max)
0	3	1,1277	0,035460	1,0487	1,20667
	6	0,9633	0,035460	0,8843	1,0423
	9	0,8747	0,035460	0,7957	0,9537
	12	0,7013	0,035460	0,6223	0,7833
3	0	1,1277	0,035460	1,0487	1,2067
	6	0,1643	0,035460	0,0853	0,2433
	9	0,2530	0,035460	0,1740	0,3320
	12	0,4263	0,035460	0,3473	0,5053
6	0	0,9633	0,035460	0,8843	1,0423
	3	0,1643	0,035460	0,0853	0,2433
	9	0,0887	0,035460	0,0097	0,1677
	12	0,2620	0,035460	0,1830	0,3410
9	0	0,8747	0,035460	0,7957	0,9537
	3	0,2530	0,035460	0,1740	0,3320
	6	0,0887	0,035460	0,1677	0,0097
	12	0,1733	0,035460	0,0943	0,2523
12	0	0,7013	0,035460	0,6223	0,7803
	3	0,4263	0,035460	0,3473	0,5053
	6	0,2620	0,035460	0,1830	0,3410
	9	0,1733	0,035460	0,0943	0,2523

Dozlar arasındaki farklılığın nedenini belirlemek için yapılan Asgari Önemli Fark testi sonuçları Çizelge 4.16’da gösterilmektedir. Farklı picloram dozları uygulanan Kunduru-1149 bitkisinin dozlarının % 1’e göre 4 farklı gruba düştüğü görülmektedir.

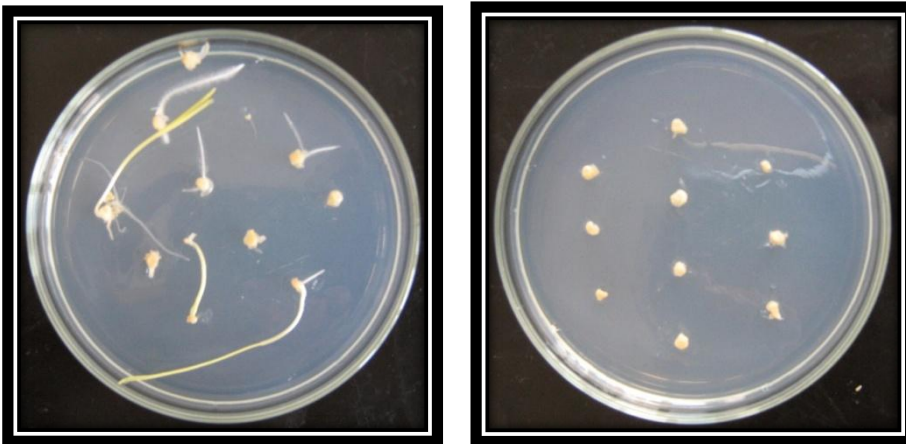
Çizelge 4.16 Kunduru-1149 çeşidine farklı picloram dozları uygulanması sonucu elde edilen kallus ağırlıklarına ilişkin AÖF testi sonuçları

Doz	Ortalama Ağırlık	% 1
0 mg/l	0	A
3 mg/l	1,127	D
6 mg/l	0,963	C
9 mg/l	0,874	C
12 mg/l	0,701	B

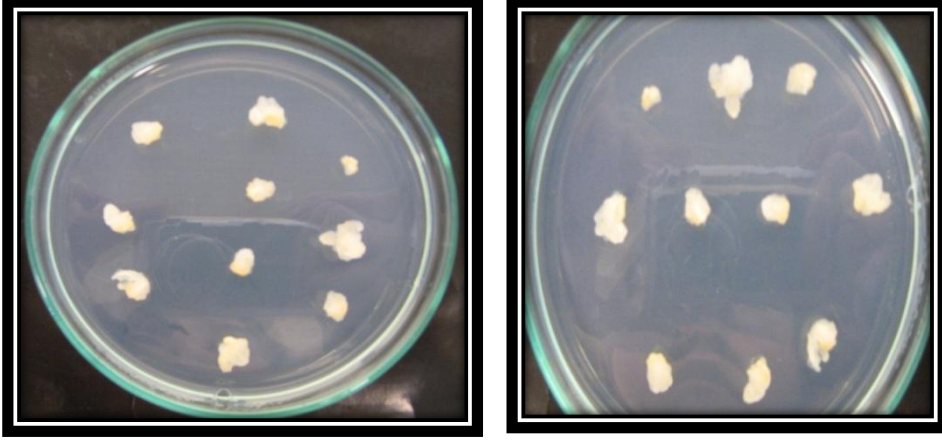
Kallus ağırlığı ve dozlar arasındaki ilişki Şekil 4.19’da gösterilmektedir. Şekilde x eksenini dozları, y eksenini kallus ağırlıklarını belirtmektedir. 0 mg/l 2,4-D içeren ortamda (Kontrol Grubu) kallus gelişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.20). 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kallus gelişim oranı ve kallus ağırlığı en yüksek olmuştur (Şekil 4.21). 6 mg/l’den itibaren kallus gelişim oranı ve kallus ağırlığında düşüş izlenmiştir. 14 günün sonunda gözlenen kallus oluşumları 6 mg/l 2,4-D içeren ortam için Şekil 4.22’de, 9 mg/l 2,4-D içeren ortam için Şekil 4.23’te, 12 mg/l 2,4-D içeren ortam için Şekil 4.24’te gösterilmektedir.



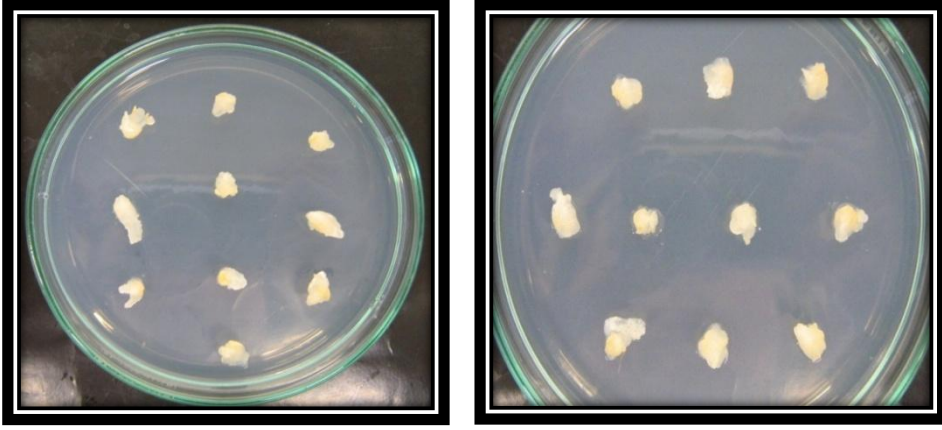
Şekil 4.19 Farklı picloram dozları uygulanan Kunduru-1149 çeşidinin dozlara bağlı kallus ağırlığı



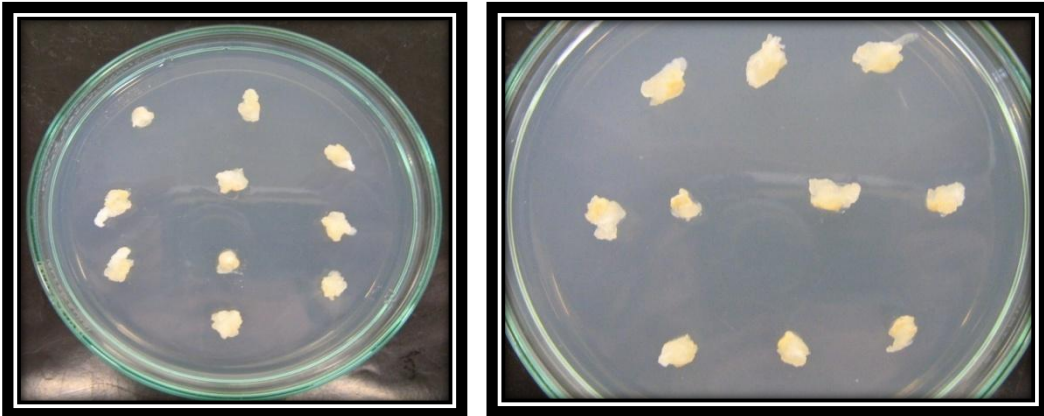
Şekil 4.20 Kunduru-1149 çeşidinin 14 günün sonunda 0 mg/l picloram (kontrol grubu) içeren ortamdaki gelişimi



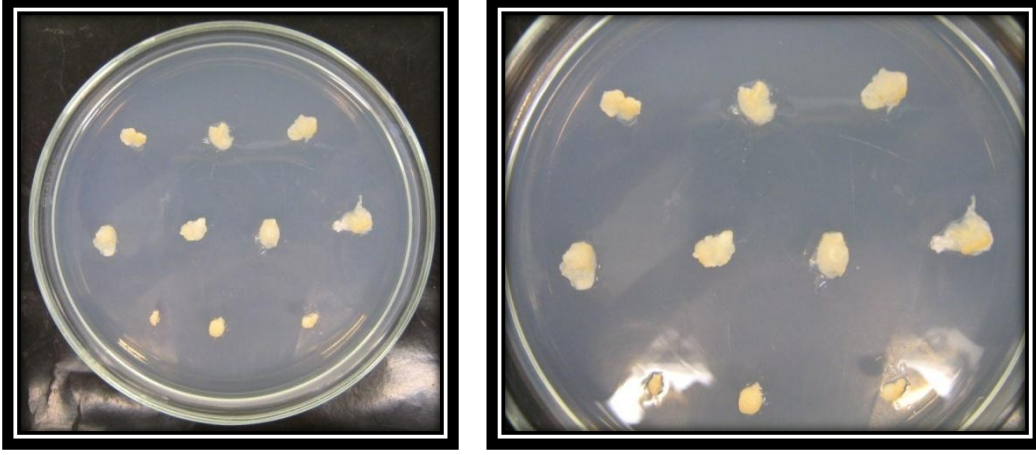
Şekil 4.21 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 3 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.22 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 6 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi



Şekil 4.23 Kunduru-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 9 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi

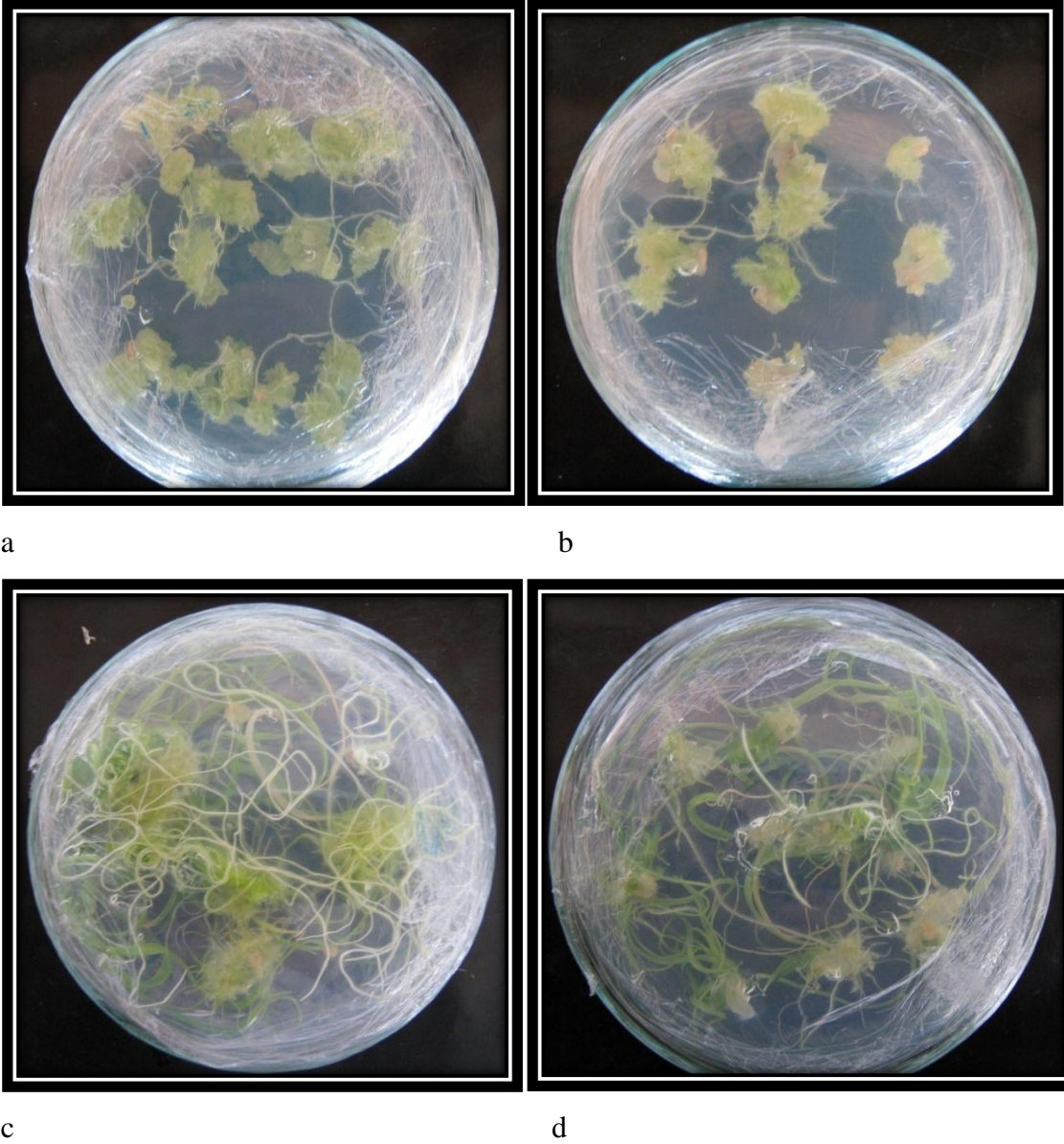


Şekil 4.24 Kunderu-1149 çeşidine ait 14 günün sonunda 12 mg/l picloram içeren ortamdaki kallus gelişimi

Farklı picloram dozlarında kallus kültürüne alınan Kunderu-1149 çeşidinde incelenen özellikler bakımından en yüksek değerler 3 mg/l doz uygulanan kültürden elde edilmiştir. Benzer sonuçlar çeşitli araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir. Buna göre Barro *et al.* (1999) 8 buğday ve 7 arpa çeşidinin olgunlaşmamış embriyoları ve yapraklarını kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada 2 mg/l picloram içeren MS ortamı üzerinde bitkileri kültüre almıştır ve alınan sonuçlara göre picloram içeren kallus ortamları üzerinde buğday yapraklarından somatik embriyo gelişimi picloram içermeyen kallus ortamlarına göre iki kat daha fazla olmuştur. He and Lazzeri (2001) 4 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını ve bitki parçalarını farklı konsantrasyonlarda picloram içeren ortamlarda kültüre almışlardır. Buna göre olgunlaşmamış buğday embriyolarında somatik embriyogenesis oluşumunun 2 mg/l picloram içeren ortamlarda daha fazla olduğunu saptamışlardır. Przetakiewicz *et al.* (2003); buğday, arpa, tirticale üzerinde yaptıkları çalışmada; olgunlaşmamış embriyoları, içerisinde picloramın da yer aldığı 3 farklı oksin tipinin, dozlarının ve kombinasyonlarının yer aldığı ortamlarda kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda uygun oksin tipinin ve dozunun genotipe göre değişmekle birlikte 3 mg/l picloramın buğday, arpa ve tirticalede kallus oluşumunu teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Satyavathi *et al.* (2005); 4 farklı makarnalık buğdayda 3 farklı bitki büyüme düzenleyicisinin skutellum kültürlerine etkisini araştırmışlardır. 3 mg/l uygulanan picloram dozunun kallus gelişimini teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Bulgularımız bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

4.5 akmak-79 ve Kunduru-1149 eşitlerinin Rejenerasyon alışmaları

akmak-79 ve Kunduru-1149 eşitlerinde farklı 2,4-D ve picloram dozlarının kallus oluşumuna etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda; kallus ağırlığı, kallus oluşum yüzdesi ve bu değerlere ait istatistik analizlerin sonuçlarına göre en yüksek kallus gelişiminin saptandığı 3 mg/l 2,4-D içeren akmak-79, 3 mg/l 2,4-D içeren Kunduru-1149 ile 3 mg/l picloram içeren akmak-79, 3 mg/l picloram içeren Kunduru-1149 örneklerinden bitki rejenerasyonu çalışması yapılmıştır. Örnekler rejenerasyon aşaması için bir ay süreyle iklim odasında muhafaza edilmişlerdir. 1 ayın sonunda rejenere olan bitkiler Şekil 4.25'te gösterilmektedir. Bu bitkilerden elde edilen kök uçları sitogenetik çalışmada kullanılmıştır.



Şekil 4.25 1 ay sonunda rejenera olan bitkicikler; 3 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki Çakmak-79 (a), 3 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki Kunduru-1149 (b), 3 mg/l picloram içeren ortamdaki Çakmak-79 (c), 3 mg/l picloram içeren ortamdaki Kunduru-1149 (d)

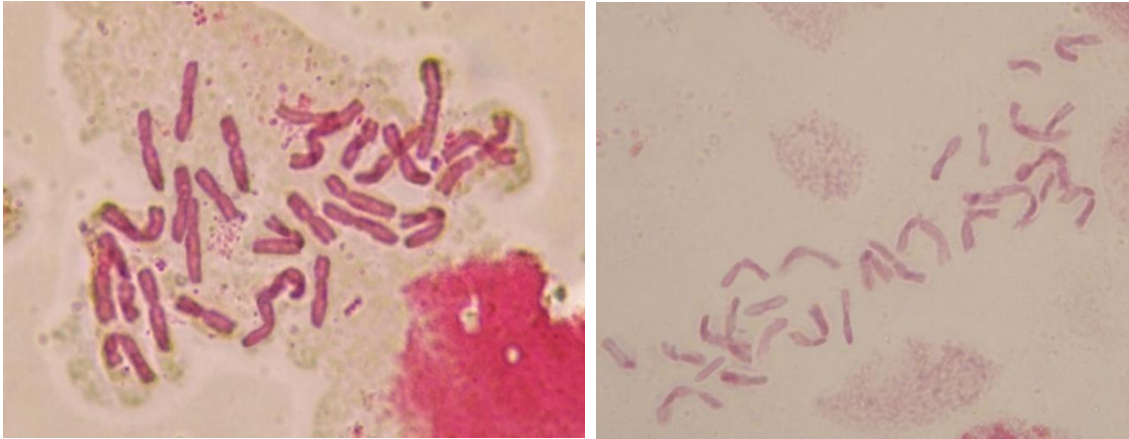
4.6 Çakmak-79 ve Kunduru-1149 Çeşitlerine Ait Sitogenetik Çalışmalar

Araştırma materyali olarak kullanılan Çakmak-79 ve Kunduru-1149 makarnalık buğday çeşitlerinde, en iyi kallus gelişiminin görüldüğü 3 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l picloram dozlarını içeren besi ortamlarındaki örneklerden rejenerasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kalluslardan oluşan bitki sürgünlerindeki kök uçlarından örnekler alınarak, sitolojik analiz

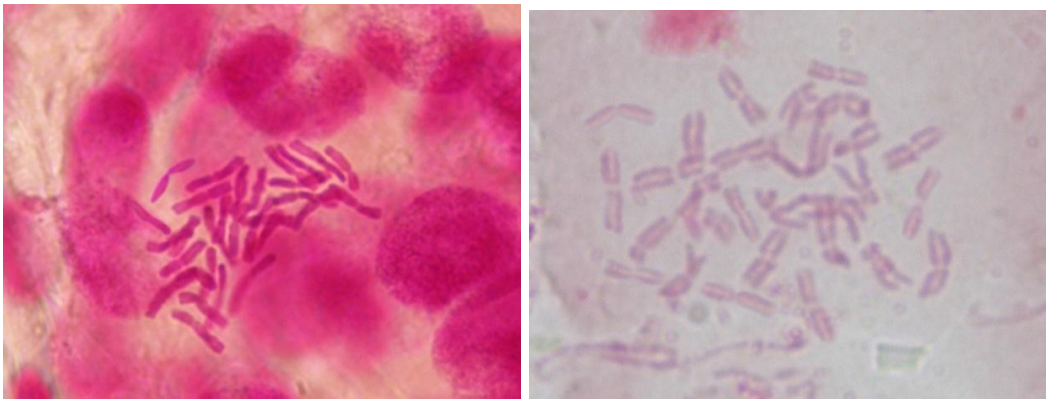
yapılmıştır ve buğday hatlarının kromozom sayıları ve yapılarında oluşabilecek değişiklikler belirlenmeye çalışılmıştır.

Buğday kök uçlarından kromozomların tespiti ve preparatların hazırlanmasında Shigenega ve Larter (1971) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. Hazırlanan preparat öncelikle 10x'lik küçük büyütmede daha sonra sırasıyla, 20x, 40x'lik büyütmelerde incelenmiştir. En son olarak 100x'lik büyütmede, immersiyon objektifinde, immersiyon yağı yardımıyla incelenmiştir. Sayılabilen ve net olan kromozom görüntüleri mikroskoba bağlı fotoğraf makinesi ile fotoğraflanmış ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

Buna göre 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kültüre alınan Çakmak-79 ve Kunduru-1149 çeşitlerine ait örneklerin sitogenetik analizleri sonucu kromozomların morfolojik yapısında ve kromozom sayısında herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kültüre alınan Çakmak-79 çeşidinin sitogenetik çalışmalarına ait bulgular Şekil 4.26'da, 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kültüre alınan Kunduru-1149 çeşidinin sitogenetik çalışmalarına ait bulgular Şekil 4.27'te gösterilmektedir.

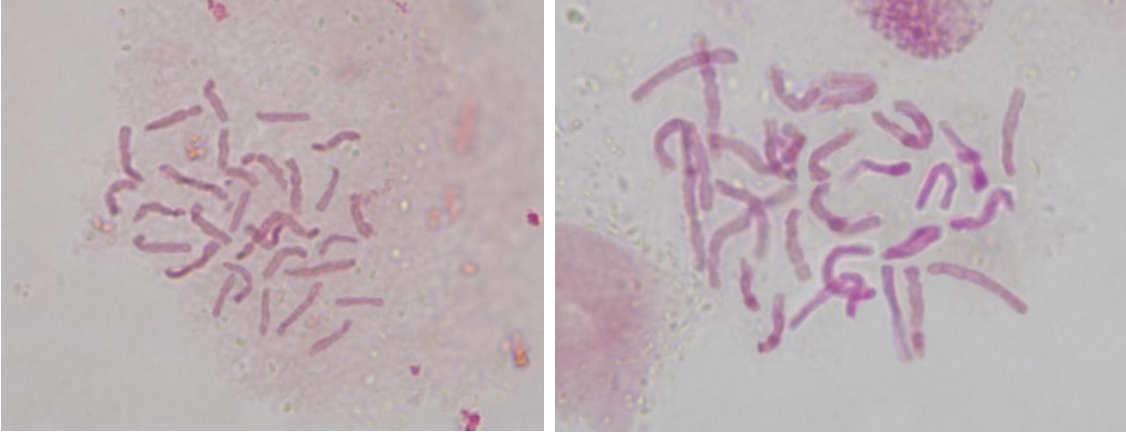


Şekil 4.26 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kültüre alınan Çakmak-79 ($2n=28$)

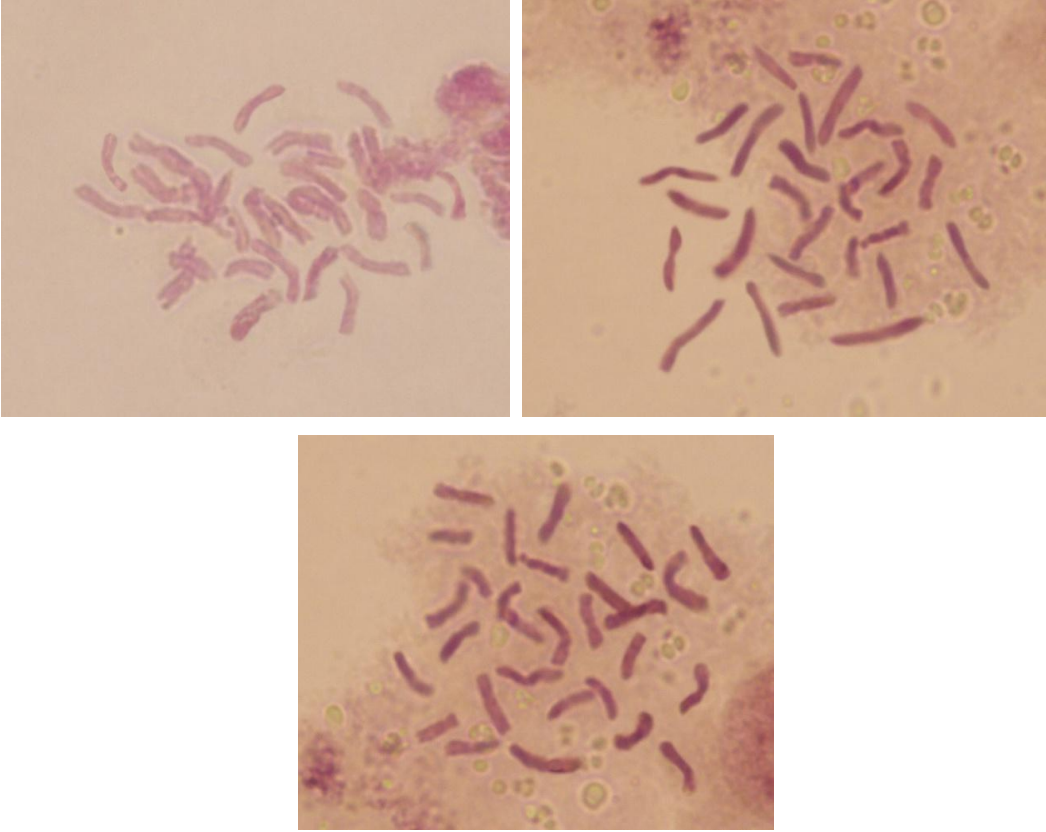


Şekil 4.27 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kültüre alınan Kunduru-1149 ($2n=28$)

Aynı şekilde 3 mg/l picloram içeren ortamlarda kültüre alınan Çakmak-79 ve Kunduru-1149 çeşitlerine ait örneklerin sitogenetik analizleri sonucu kromozomların morfolojik yapısında ve kromozom sayısında herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. 3 mg/l picloram içeren ortamda kültüre alınan Çakmak-79 çeşidinin sitogenetik çalışmalarına ait bulgular Şekil 4.28'de, 3 mg/l picloram içeren ortamda kültüre alınan Kunduru-1149 çeşidinin sitogenetik çalışmalarına ait bulgular Şekil 4.29'da gösterilmektedir.



Şekil 4.28 3 mg/l picloram içeren ortamda kültüre alınan Çakmak-79 ($2n=28$)



Şekil 4.29 3 mg/l picloram içeren ortamda kültüre alınan Kunduru-1149 ($2n=28$)

Benzer sonuçlar; Ozias-Akins and Vasil (1983)'in ekmeklik buğdayda (*Triticum aestivum* L.) 2,4-D'nin farklı miktarlarının kallus oluşumu ve gelişimi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışma sonucunda da elde edilmiştir. Kallus oluşumu ve gelişimi için 2 mg/l 2,4-D miktarının optimum olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sitolojik deneylerle, acetocarmine boyama yöntemi kullanılarak yapılan preparatlarla, kromozom sayısında değişme olmadığını ($2n=6x=42$) göstermişlerdir. Aynı zamanda Satyavathi *et al.* (2004); makarnalık buğdayda (*Triticum durum* Desf.) üç bitki büyüme düzenleyicisinin (2,4-D, picloram, dicamba) ve bu büyüme düzenleyicilerin 4 farklı dozunun (0.5, 1.0, 2.0, 2.5 mg/l) kallus gelişimi ve kromozom yapısı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada; rejenerasyona uğramış bitkiciklerin verimli, normal kromozom sayısını ($2n = 4x = 28$) ve melezleşmenin (fl-GISH) meydana geldiği yerdeki fluoresan genomünün açığa çıkardığı yapıyı korudukları ve hiçbir belirgin somaklonal varyasyon göstermediklerini belirlemişlerdir. Bulgularımız bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ

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

Bilindiği gibi yerkürede yaşamın sürmesi ve besin döngüsünün (bitki-hayvan-insan) devamlılığı bitkisel üretime bağlıdır. Ekim alanlarının tarım dışı kullanımlara yönelik olarak değerlendirilmesi, erozyon, tuzlanma ve çölleşme yoluyla toprak verimliliğinin azalması, üretim alanlarının daralmasına neden olmaktadır. Bu etmenler karşısında üretimin artırılarak sürdürülmesi yüksek verimli, biyotik (hastalık ve zararlı) ve abiyotik (kuraklık, soğuk, tuzluluk gibi) baskılara dayanıklı kaliteli çeşitlerin geliştirilmesi ile sağlanabilecektir.

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

Genellikle doku kültürü çalışmalarında olgunlaşmamış embriyolar, diğer eksplantlara oranla bitki rejenerasyonu bakımından daha yüksek verime sahip olduklarından, yaygın

olarak kullanılmaktadır. Ancak, olgunlaşmamış embriyoların elde edilmelerindeki sınırlamalar bu eksplantın kullanımını güçleştirmektedir. Bu nedenle, yılın her döneminde elde edilmesi mümkün olan olgunlaşmış embriyoların kullanılmasına ilişkin araştırmalara ağırlık verilmiş ve son yıllarda geliştirilen endosperm-destekli kallus oluşturma tekniklerinin kullanılmasına da başlanılmıştır.

Bilindiği gibi, bitki biyoteknolojisinde önemli bir yeri olan kallusların elde edilmesinde kallus kültürü yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle doku kültüründe, rejenerasyon oranının düşük olduğu tahıllar gibi monokotiledon bitkilerde rejeneratif bitkilerin oluşturulmasında bu kültürün ayrı bir önemi vardır. Günümüzde bitkilerde kallus oluşturulmasında genellikle 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid) kullanılmaktadır. Ancak, kuvvetli bir herbisit olan bu maddenin, özellikle yüksek dozlarda, rejeneratif bitkilerin kromozomlarında yapısal ya da sayısal olarak önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir.

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülen bu çalışmada, sentetik oksinlerden olan ve canlıların kalıtsal yapılarında çok daha az oranda zararlı olduğu belirtilen picloramın, 2,4-D ile karşılaştırılarak, bitkilerde kallus oluşturma amacıyla kullanılma olanakları ve kromozomal yapıya fiziksel etkilerinin belirlenmesi sağlanmıştır.

Çalışmada; Çakmak-79 ve Kunduru-1149 makarnalık buğday çeşitlerinin olgunlaşmış embriyoları, en iyi kallus gelişimini sağlayan bitki büyüme düzenleyicisinin saptanması amacıyla farklı dozlarda (0, 3, 6, 9, 12 mg/l) picloram ve 2,4-D bitki büyüme düzenleyicilerini içeren besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Kallus gelişim aşamasının sonunda elde edilen kültür tepkileri; kallus oluşum oranı ve kallus ağırlığı bakımından değerlendirilmiştir. Bu öğeler bakımından elde edilen değerler incelendiğinde, uygulanan bitki büyüme düzenleyicisi dozları bakımından her iki buğday çeşidinde de önemli farklılıklar olduğu saptanmıştır.

Kallus gelişim aşaması sonunda Çakmak-79 çeşidinde incelenen özellikler bakımından her iki bitki büyüme düzenleyicisi için de en yüksek kallus oluşum değerleri 3 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l picloram içeren ortamlardaki kültürlerden elde edilmiştir.

Kunduru-1149 çeşidinde de Çakmak-79 çeşidinde olduğu gibi her iki bitki büyüme düzenleyicisi için de en yüksek kallus oluşum değerleri 3 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l picloram içeren ortamlardaki kültürlerden elde edilmiştir.

Bulgularımız aynı konuda çalışan farklı araştırmacıların çoğuyla benzerlik gösterirken bir kısmı ile farklıdır. Farklılıklar; uygulanan dozların farklı olmasından, genotiplerin farklılığından, kullanılan şeker dozlarının farklı olmasından, kullanılan jel yapıcı maddelerin ve besin ortamı bileşiminin farklı olmasından kaynaklanmakta ise de; 2-3 mg 2,4-D ve picloram uygulamasının en iyi sonucu verdiği diğer araştırmacılarca da belirtilmiştir.

Her iki çeşitte de 3 mg/l'lik bitki büyüme düzenleyicisi uygulaması en yüksek kallus oluşumu sonucunu vermiştir. Yapılan varyans analizi ve AÖF analizleri sonucunda tüm dozlar arasında anlamlı fark bulunmuştur. Her iki bitki büyüme düzenleyicisinin 5'er farklı dozunda kültüre alınan Çakmak-79 ve Kunduru-1149 çeşitlerinde 6 mg/l'den itibaren kallus ağırlığı ve kallus gelişim oranında düşüş izlenmiştir. Bu düşüş gerek istatistik analizler, gerekse istatistik analizler sonucu elde edilen grafiklerle gösterilmiştir.

En iyi kallus gelişiminin görüldüğü 3 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l picloram dozlarını içeren besi ortamlarındaki örneklerden rejenerasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kalluslardan oluşan bitki sürgünlerindeki kök uçlarından örnekler alınarak, sitolojik analiz yapılmıştır ve buğday hatlarının kromozom sayıları ve yapılarında oluşabilecek değişiklikler belirlenmeye çalışılmıştır.

Buğday kök uçlarından kromozomların tespiti ve preparatların hazırlanmasında Shigenega ve Larter (1971) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. 3 mg/l 2,4-D içeren ortamda kültüre alınan Çakmak-79 ve Kunduru-1149 çeşitlerine ait örneklerin sitogenetik analizleri sonucu kromozomların morfolojik yapısında ve kromozom sayısında herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. Aynı şekilde 3 mg/l picloram içeren ortamlarda kültüre alınan Çakmak-79 ve Kunduru-1149 çeşitlerine ait örneklerin sitogenetik analizleri sonucu kromozomların morfolojik yapısında ve kromozom sayısında herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. Benzer sonuçlar bu konuda çalışan diğer araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir.

Sonuç olarak bu tezde, doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan sentetik oksinlerden 2,4-D'nin (dichlorophenoxyacetic acid) ve günümüzde kullanılmaya başlanılan picloramın (4-amino-3,5,6- trichoropicolinic acid) kallus gelişimi üzerine olan

etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir ve en yüksek kallus oluşumu değerlerini veren picloram ve 2,4-D dozları belirlenmiştir. Ayrıca bu bitki büyüme düzenleyicilerin, kallus gelişiminde en etkili olarak belirlenen dozlarının, bitkide herhangi bir kromozomal bozukluğa neden olmadıkları da sitolojik çalışmalarla saptanmıştır. Bu sayede bitki biyoteknolojisi alanında yapılan doku kültürü çalışmalarında en az zararlı etkiye sahip bitki büyüme düzenleyicisi kullanımı sağlanmaya çalışılmıştır.

KAYNAKLAR

- Ahlodwalia, B. S., 1981. Plant Regeneration from Callus in Wheat. *Crop. Sci.* 22: 405-410.
- Aka-Kaçar, Y., 2001. Türkiye’de Yetiştirilen Önemli Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Vişne (*Prunus cerasus* L.) Çeşit ve Tiplerinin DNA Parmakizi Yöntemi ile Sınıflandırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kod No:640, Adana, Türkiye.
- Anonim 2008. Bitkisel Üretim İstatistikleri. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, <http://www.tuik.gov.tr>.
- Anonim 2009. Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Tescilli Çeşitler listesi. <http://www.ataem.gov.tr/tesces.asp?s1=146&s2=37&s3=79&s2b=Bu%F0day>.
- Anonymous 1983. National Research Council (1983). Drinking Water and Health, Volume 5. Board on Toxicology and Environmental Health Hazards, Commission on Life Sciences, Safe Drinking Water Committee, National Academy Press, Washington, DC.
- Anonymous 1984. Forest Service. (1984). Pesticide Background Statements, Vol. I Herbicides. United States Department of Agriculture, Agriculture Handbook No. 633.
- Anonymous 1992. National Library of Medicine (1992). Hazardous Substances Databank. TOXNET, Medlars Management Section, Bethesda, MD.
- Anonymous 2008. ABD Tarım Bakanlığı, Ekonomik Araştırma Servisi ve Yabancı Tarım Servisi, Zaman Serileri/USDA/ERS-FAS, Time Series.
- Anonymous 2009a. EPA: Federal Register: 2,4-D, 2,4-DP, and 2,4-DB; Decision Not to Initiate Special Review
- Anonymous 2009b. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: An updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. Supplement 7, WHO, Lyon, France.
- Anonymous 2009c. <http://sv.wikipedia.org/wiki/2,4-diklorfenoksiättiksyra>
- Anonymous.2009d.http://www.mddep.gouv.qc.ca/pesticides/permis-en/code_gestion/en/espace-vert.htm
- Ayçiçek, M., Yıldırım, T., 2006. Bazı Makarnalık Buğday (*Triticum turgidum* var. *durum* L.) Çeşitlerinin Erzurum Koşullarındaki Verim Yetenekleri Fırat Üniversitesi Fen ve Müh. Bil. Der. Science and Eng. J of Fırat Univ. 18 (2), 151-157, 2006.
- Bajaj, Y.P.S., 1984. The Regeneration of Plants from Frozen Pollen, Embryos and Zygotic Embryos of Wheat and Rice. *Theor. Appl. Genet.*, 67: 525-528.
- Bannikova, V.P., and Barabanova, E.A., 1990. Induction and Histological Features of Somatic Embryogenesis in the Tissue Culture of Gramineae. *Sitologiya Genetika*, 24(2): 61-68.

- Barro, F., Martin, A., Lazzeri, P.A., and Barcelo, P., 1999. Medium Optimization for Efficient Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Inflorescences and Immature Scutella of Elite Cultivars of Wheat, Barley and Triticum. *Euphytica*, 108: 161-167.
- Bartok, T., Sagi, F. (1990). A New Endosperm Supported Callus Induction Method for Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cul.* 22: 37-41.
- Benkirane, H., Karima, S., Chlyah, A. and Chlyah, H., 2000. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Fragments of Immature Inflorescences and Coleoptiles of Durum Wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61: 107-113.
- Blanco, A., Bellomo, M.P., Cenci, A., De Giovanni, C., D'Ovidio, R., Iacono, E., Laddomada, B., Pagnolia, M.A., Porceddu, E., Sciencalepore, A., Simeone, R., Tanzarella, O.A., 1998. A genetic map of durum wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 721-728.
- Bohorova, N. A. et al. 1985. *In vitro* organogenesis, androgenesis and embryo culture in genus *Helianthus* spp. *Z. f. Pflanzenzuchtung.* 95, 35-44.
- Bommineni, V. R., Jauhar, P. P., 1996. Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. *Plant Science*, 116, 197-203.
- Bond G. G., Burke, T. A., Cole, P., Dost, F. N. , Enterline, P. E., Gough, M., Greenberg, R. S., Halperin, W. E., McConnell, E., Munro, I. C., Swenberg, J. A., Zahm, S. H. and Graham, J. D., 1991. Weight of the evidence on the human carcinogenicity of 2,4-D, *Environ Health Perspect.*, 96: 213-222.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980. Construction of a Genetic Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American Journal of Human Genet.* 32: 314-331.
- Bozcuk, A. N. 2000. *Genetik*. Palme Yayıncılık, Ankara, 320 s.
- Büyükcinal Bal, E.B., 2003. Arpa Mikrosatelitlerinin Ekmeklik Buğdaydaki Genetik Çalışmalar İçin Kullanım Olanaklarının Araştırılması, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 6(2): 34-40.
- Cannell, M. E., Lazzeri, P.A., and Barcelo, P., Barro, F., 1998. The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants, *Theor Appl Genet* (1998) 97: 684-695
- Chao, S., Sharp, P.S., Worland, A.J., Warham, E.J., Koebner, R.M.D., Gale, M.D. 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homologue group of chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, 789: 495-504.
- Chen, C. C., Chen, C. M., Hsu, F. C., Wang, C. J., Yang, J. T., Kao, Y. Y. (2000). The Pachytene Chromosomes of Maize as Revealed by Fluorescence *in situ* Hybridization with Repetitive DNA Sequences. *Theor. Appl. Genet.* 101, 30-36.

- Cifuentes, M., Benavente, E., 2009. Complete characterization of wheat–alien metaphase I pairing in interspecific hybrids between durum wheat (*Triticum turgidum* L.) and jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host), *Theor Appl Genet* (2009) 118:1609–1616.
- Crocoma, O. J. et al. 1991. Biosynthesis of secondary Products *in vitro*. *Plant Tissue Culture Acad. Pres. New York*, 359-372.
- Dağüstü, N., 2007. Buğday (*Triticum aestivum* L.) Olgunlaşmamış Embriyo Kültüründen Yüksek Oranda Bitkicik Oluşumu. Türkiye 7. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Haziran 2007, (Sunulu Bildiri), s 346-351. Erzurum.
- Davis, G. L., McMullen, M. D., Baysdorfer, C., Musket, T., Grant, D., Staebell, M., Xu, G., Polacco, M., Koster, L., Melia-Hancock, S., Houchins, K., Chao, S., Coe, Jr., E. H., 1999. A Maize Map Standard With Sequenced Core Markers, Grass Genome Reference Points and 932 Expressed Sequence Tagged Sites (ESTs) in a 1736-Locus Map. *Genetics* 152: 1137-1172.
- Delporte, F., Mostade, O., and Jacquemin, J.M., 2001. Plant Regeneration through Callus Initiation from Thin Mature Embryo Fragments of Wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Culture*, 67: 73-80.
- Devos, K.M., and Gale, M.D., 1992. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 567-572.
- Dong, F., Song, J., Naess, S. K., Helgeson, J. P., Gebhardt, C., Jiang, J., 2000. Development and Applications of a Set of Chromosome-specific Cytogenetic DNA Markers in Potato. *Theor Appl. Genet.* 101: 1001-1007.
- Dubcovsky, J., Luo, M.C., Zhong, G.Y., Bransteitter, R., Desai, A., Kilian, A., Kleinhofs, A., Dvorak, J. 1996. Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*, 143: 983-999.
- Düzgüneş, O., Kesici, T. ve Gürbüz, F. 1983. İstatistik Metotları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 861. Ders Kitabı, 229, Ankara.
- Dvorak, J., Zhang, H.B. 1990. Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 9640- 9644.
- Elçi Ş, 1982. Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları, 3, 37-85. Elazığ.
- Ergül, A., 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs) Genomik DNA Parmakizi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı.
- Evans, D. A. and Reed, S. M. 1998. *Cytogenetics Techniques*. *Plant Tissue Culture Acad. Pres. , New York* 213-240.

- Evans, D. A. 1981. Growth and Behavior of Cell Cultures Embryogenesis and Organogenesis. Plant Tissue Culture (Ed. T. A. Thorpe). Acad. Press. New York 45-114.
- Felföldi K., and Purnhauser, L., 1992. Induction of Regenerating Callus Cultures from Immature Embryos of 44 Wheat and 3 Triticale Cultivars. Cereal Research Communication, 20 (3-4): 273-277.
- Fennel, S., Bohorova, N., Van Ginkel, M., Crossa, J., and Hoisington, D., 1996. Plant Regeneration from Immature Embryos of 48 Elite CIMMYT Bread Wheats. Theor. Appl. Genet., 92: 163-169.
- Fernandes, J., Brendel, V., Gai, X., Lal, S., Chandler, V. L., Elumalai, R. P., Galbraith, D. W., Pierson, E. A., Walbot, V., 2002. Comparison of RNA Expression Profiles Based on Maize Expressed Sequence Tag Frequency Analysis and Micro-Array Hybridization. Plant Physiol. 128: 896-910.
- Francki, G. M., Walker, E., Crawford, A. C., Broughton, S., Ohm H. W., Barclay, I., Wilson, R. E., McLean, R., 2009. Comparison of genetic and cytogenetic maps of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR and DArT markers, Mol Genet Genomics (2009) 281:181–191.
- Gall J. G., Pardeu, M. L., 1969. Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations. Proc. Natl. Acad. Sc. USA 63: 378-383.
- Gamborg, O. L. and J. P. Shyluk, 2001. Nutrition, media and characteristic of Plant Cell and Tissue Cultures. Plant Tissue Culture. (Ed. T. A. Thorpe). Acad. Press. New York 21-44.
- Glick B.R., Pasternak J.J., 1998. Molecular Biotechnology (Principles and Applications of Recombinant DNA), ASM Press., Washington, D.C.
- Gill, B.S., Friebe, B., Endo, T.R., 1991. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). Genome, 34: 830-839.
- Gill, B. S., Friebe, B., 2009. Cytogenetic Analysis of Wheat and Rye Genomes, DOI 10.1007/978-0-387-77489-34, Springer Science Business Media, LLC 2009.
- Gonzales, J.M., Frierio, E., and Jouve, N., 2001. Influence of Genotype and Culture Medium on Callus Formation and Plant Regeneration from Immature Embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars. Plant Breeding, 120: 513-517.
- Groose, R. W., Bingham, E. T., 2004. Variation in Plants Regenerated from Tissue Culture of Tetraploid Alfaalfa Heterozygous for several traits. Crop. Sci. 24: 655-658.
- Gupta, P.K., 1991. Cytogenetics of wheat and its close wild relatives-Triticum and Aegilops. In: Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breedings,

- Evolution, Part A. (eds. Gupta P.K., Tsuchiya, T.). New York, Elsevier Press, pp. 335-359.
- Gupta, P. K., Kulwal, P. L., Rustgi, 2005. Wheat cytogenetics in the genomics era and its relevance to breeding. *Cytogenetics and Plant Breeding*, Vol. 109, No. 1-3, 2005 .
- Hamada, H., Petrino, M.G., and Kakunaga, T., 1982. A Novel Repeated Element with Z-DNA Forming Potential is Widely Found in Evolutionarily Diverse Eukaryotic Genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 6465–6469.
- Han, H., Quqian, S., 1981. Advances in Plant Cell and Tissue Culture in China. *Advances in Agronomy* 34: 1-13.
- Harper, L. C., Cande, W. Z., 2000. Mapping a New Frontier; Development of Integrated Cytogenetic Maps in Plants. *Funct. Integr. Genomics.* 1: 89-98.
- He, G.Y., and Lazzeri, P.A., 2001. Improvement of Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Durum Wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.) Scutellum and Inflorescence Cultures. *Euphytica*, 119, 369-376.
- Hohmann, U., Endo, T.R., Gill, K.S., Gill, B.S. 1994. Comparison of genetic and physical maps of group 7 chromosomes from *Triticum aestivum* L. *Mol. Gen. Genet.*, 245: 644-653.
- Holt, J. S., Powles, S. B., and Holtum, J. A. M. (1993). Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 203-229.
- Huang, X.-Q, Wei, Z.-M. (2004). High- Frequency Plant Regeneration Through Callus Initiation from Mature Embryos of Maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.* 22: 793-800.
- Ivanov, P., Anatanssov, Z., Mikova, V., and Nikolava, L., 1998. Culture Selected Somaclonal Variation in Five *Triticum aestivum* L. Genotypes. *Euphytica*, 104: 167-172.
- Jauhar, Prem., 2005. Classical Cytogenetics and Modern Biotechnology: An Alliance for Crop Improvement. In: *Symposium on Classical Cytogenetics and Modern Biotechnology*, Calcutta, India.
- John, H. A., Birnstiel, M. L., Jones, K. W. (1969). RNA-DNA Hybrids at the Cytological Level. *Nature* 223: 582-587.
- Jonses, S., Yıldırım, A., 1999. Buğdayda Bir Geri Melez Populasyonlarında Oluşan Yabancı Kromozom Eklenmesi ve Translokasyonlarının RFLP Markörleri İle Saptanması. Türkiye 3. Tarla Bitkileri Kongresi, 15-18 Kasım 1999, (Sunulu Bildiri) Cilt 1, Genel ve Tahıllar, s 17-22. Adana.
- Kam-Morgan, L.M.W., Gill, B.S., Muthukrishnan, S. 1989. DNA restriction fragment polymorphisms: a strategy for genetic mapping of D genome of wheat. *Genome*, 32: 724-732.

- Karaca, Ö., Bürün, B., 1997. Buğdayda Embriyo Kültüründen Kallus Oluşumu. Tr. J. of Agriculture and Forestry 23 (1999) Ek Sayı 2, 269-274
- Keresa, S., Baric, M., Sarcevic, H., and Marchetti, S. 2004. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos and immature inflorescences of eight Croatian winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) Die bodenkultur-austria Journal of Agricultural Research Inhante/ Contents, 45. Band/ heft 3.
- Kihara, H., 1965. The origin of wheat in the light of comparative genetics. Japan J. Genet. 40/1 : 45-54.
- Kim, S.C, and Kim, S.G., 1989. Plant Regeneration from Single Cell Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). The Korean Journal Of Botany, 32(4): 227-233.
- Kubalaková, M., Kovarova, P., Suchankova, P., Cihalikova, J., Bartos, J., Lucretti, S., Watanabe, N., Kianian, S., F., Dolezel, J., 2005. Chromosome Sorting in Tetraploid Wheat and Its Potential for Genome Analysis, Copyright 2005 by the Genetics Society of America DOI: 10.1534/genetics.104.039180.
- Kuru, M., Gözükara, S.E., 2001. Genetik. Palme Yayıncılık, Ankara, 360 s.
- Kün, E., 1983. Serin İklim Tahılları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 875, 93-108.
- Kün, E., 1996. Tahıllar-1 (Serin İklim Tahılları). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1431, 322s., Ankara.
- Lee, J-H., Arumuganathan, K., Kaeppler, S. M., Park, S-W., Kim, K-Y., Chung, Y-S., Kim, D-H., Fukui, K., 2002. Variability of Chromosomal DNA Contents in Maize (*Zea mays* L.) Inbred and Hybrid Lines. Planta, 215: 666-671.
- Lerda, D., R. Rizzi, 1991. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).", *Mutation Research*, Vol. 262, No. 1, pp. 47-50.
- Machii, H., Mizuno, H., Hirabayashi, T., LI, H., and Hagio, T., 1998. Screening What Genotypes for High Callus Induction and Regeneration Capability from Anter and Immature Embryo Cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 53: 67-74.
- Mathieu-Daudé, F., Ralph D. and McClelland M., 1997. Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA, ed. Taylor, G. R., CRS Press, Boca Raton.
- Maughan, P.J., Saghai-Maroo, M.A., and Buss, G.R., 1995. Microsatellite and Amplified Sequence Length Polymorphisms in Cultivated and Wild Soybean. Genome, 38: 715-723.
- Mendoza, M. G. and Kaeppler, H. F., 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of Wheat (*Triticum aestivum*). In vitro Cell. Dev. Biol.-plant 38: 39-45.

- Murata, M., 1989. Effects of auxin and cytokinin on induction of sister chromatid exchanges in cultured cells of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Theor Appl Genet* (1989) 78:521- 524.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15; 473- 497.
- Okumuş, Ahmet., 1997. Buğdayda Mayoz Bölünme: Metafaz-1 Gözlemleri, 2. Tarla Bitkileri Kongresi, 22-25 Eylül 1997, s 547-549. Samsun.
- Oomd, K 1991. In vitro Methods Applied to Rice. *Plant Tissue Culture*. (Ed. T. A. Thorpe). Acad. Pres. New York 273-298.
- Ozban, N., 1994. Hücre Sitolojisi. İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 250 s.
- Ozias-Akins P.and Vasil, I. K., 1983. Callus induction and growth from the mature embryo of wheat. *Protoplasma*, 115, 104–113.
- Özgen, M., Türet, M., Özcan, S. and Sancak, C., 1996. Callus Induction and Plant Regeneration from Immature and Mature Embryos of Winter Durum Wheat Genotypes. *Plant Breeding*, 115: 455-458.
- Özgen, M., Türet, M., Altinok, S., Sancak, C., 1998. Efficient Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Embryo Culture of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes. *Plant Cell Reports*. 18: 331-335.
- Özgen, M., Adak, M.S., Söylemezoğlu, G. ve Ulukan, H., 2000. Bitkisel gen kaynaklarının koruma ve kullanımında yeni yaklaşımlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği 5. Teknik Kongresi, 17-20 Ocak 2000, s.259-289, Ankara.
- Özgen, M., Türet, M., and Avcı, M., 2001. Cytoplasmic Effect on The Tissue Culture Response of Callus from Winter Wheat Mature Embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 64: 81-84.
- Özgen, M., Şehrali, S., 2007. Bitki Islahı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 1527, 261s., Ankara.
- Özgen, M., Ertunç, F., Kınacı, G., Yıldız, M., Birsen, M., Ulukan, H., Koyuncu, N. ve Sancak, C., 2005. Tarım teknolojilerinde yeni yaklaşımlar ve uygulamalar. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi. 3-7 Ocak 2005, s. 315-346. Ankara.
- Pellegrineschi, A., Brito, R.M., Mclean, S., and Hoisington, D., 2004. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and NaCl on The Establishment of Callus and Plant Regeneration in Durum and Bread Wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77: 245-250.
- Pijnacker, L. P., Ferwerda, M. A., 1994. Sister chromatid exchanges in cultured immature embryos of wheat species and regenerants *Theor Appl Genet* (1994) 89:287-292.

- Przetakiewicz, A., Orczyk, W. And Nadolska-Orczyk, A., 2003. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant cell, tissue and organ culture*, 73, 245-256.
- Qiao, Y.M., Cattaneo, M., Locatelli, F., and Lupatto, E., 1992. Plant Regeneration from Long Term Suspension Culture-Derived Protoplast of Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 11: 262-265.
- Raghavan, V., 1980. Embryo Culture. In: Vasil IK (ed), *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*, pp.209- 236, Academic Press, Newyork.
- Redway, F.A., Vasil, V., LU, D., and Vasil, K., 1990. Identification of Callus Types for Long- Term Maintenance and Regeneration from Commercial Cultivars of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. App. Genet.*, 79: 609-617.
- Sadder M. T., Onolies, N., Born, U., Weber, G., 2000. Physical Localization of Single-copy Sequences on Pachytene Chromosomes in Maize (*Zea mays* L.) by Chromosome *in situ* Suppression Hybridization. *Genome* 43: 1081- 1083.
- Sadder, M. T., Weber, G., 2001. Karyotype of Maize (*Zea mays* L.) Mitotic Metaphase Chromosomes as Revealed by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with Cytogenetic DNA Markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 117-123.
- Sağsöz, S., Aydın, M., 2006. Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Olgun Embriyo Kaynaklı Kallus Oluşumu ve Rejenerasyon Kapasitesini Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi Atatürk Üniverstesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Satyavathi, V. V., Jauhar, P. P., Elias, E. M., Rao, M. B., 2004. Effects of Growth Regulators on *In Vitro* Plant Regeneration in Durum Wheat, *Crop Science Society of America* Published in *Crop Sci.* 44:1839–1846 (2004).
- Sears, R.G., and Deckard, E.L., 1982. Tissue Culture Variability in Wheat: Callus Induction and Plant Regeneration. *Crop Science*, 22: 546-550.
- Seiler J.P., 2006. The genetic toxicology of phenoxy acids other than 2, 4, 5- T. *Mutat. Res.*, 1978; 55: 197- 226.
- Sharma, G.C., Bello, L.L.; Sapra, V.T. and Peterson, C.M., 2003. Callus Initiation and Plant Regeneration from Triticale Embryos, *Crop Science*, Vol. 21, P.11:18.
- Sharopova, N., McMullen, M., Schultz, L., Schroeder, S., Sanchez-Villeda, H., Gardier, J., Bergstrom, D., Houchins, K., Melia- Hancock, S., Musket, T., Duru, N., Polacco, M., Edwards, K., Ruff, T., Register, J. C., Brouwer, C., Thompson, R., Velasco, R., Chin, E., Lee, M., Woodman-Clikeman, W., Long, M. J., Liscum, E., Cone, K., Davis, G., Coe, Jr. E. H. (2002). Development and Mapping of SSR Markers for Maize. *Plant Molecular Biology*. 48: 463- 481.
- Shigenega S., Larter E. N. 1971. Karyotype Analysis of Hexaploid Triticale, *Can. J. Genet. Cytol.*, 13: 585-591.

- Skirvin, M. T. 1998. Natural and Induced Variation in Tissue Culture. *Euphytica* 27: 241-266.
- Tabur, S., Demir, K., 2008. Tuz Stresi Altında Çimlendirilen Arpa Tohumlarının Mitotik İndeks ve Kromozom anormallikleri Üzerine Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicisi Kombinasyonlarının Etkisi. *SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi(E- dergi)*. 3 (2)162-173.
- Temizkan, G., 1994. Genetik (Temel Genetik). İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 276 s.
- Thomas, J., Riedel, E., Benabdelmouna, A., Armstrong, K., 2004. A cytogenetic method for stacking gene pairs in common wheat, *Theor Appl Genet* (2004) 109: 1115–1124.
- Tingey, S.V., Del Tufa, J.P., 1993. Genetic Analysis With Random Amplified Polimorphic DNA Markers, *Plant Physiol.*101, 349-352.
- Torello, W. A. Et al., 2004. Callus Initiation, Plant Regeneration and Evidence of Somatic Embryogenesis in Red Fescue. *Crop. Sci.* 24: 1037-1040.
- Tosun, M., 1998. Hekzaploid Tritikalede Karyotip Analizi. *Tr. J. of Agriculture and Forestry* 23 (1999) Ek Sayı 4, 943-949.
- Tuberosa, R., Rauaglia, S. and Lucchese, C., 1998. Callus induction and plant regeneration in Italian cultivars of bread wheat. *Agriculture of Meditterrian*, 18; 361-365.
- Ünal, S., 2008. Hububat Teknolojisi, Ege Üniversitesi Yayınları 4: 65s. , İzmir.
- Varshney, A., Jain, S. and Kothari, S. L., 1999. Plant regeneration from mature embryos of 20 cultivars of wheat. *Cereal Research Communications*, 27 (1-2), 163-170.
- Vasi V., Redway, F., and Vasıl, I.K., 1990. Regeneration of Plants from Immature Embryogenic Suspensionculture Protoplasts of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology*, 8: 425-433.
- Walker, M. M., Lawrence H. K., 1992. EPA's Pesticide Fact Sheet Database. Lewis Publishing. Chelsea, MI.
- Walton, M., 1993. Molecular Markers: Which ones to use? *Seed World*, July 1993, p: 23-29.
- Weber, J. L., 1990. Informativeness of Human (dC-dA)*n*.(dG-dT)*n* Polymorphisms. *Genomics*, 7: 524–530.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers, *Nucleic Acids Research*, Vol 18,7213-7218.
- Welsh, J., Petersen, C., 1991. Polymorphisms Generated By Arbitrarily Primed PCR in the Mouse: Application To Strain Identification And Genetic Mapping, *Nucleic AcidsResearch*, Vol 19, 303-306.

- Werner, J.E., Endo, T. R., Gill, B.S., 1992. Towards a cytogenetically based physical map of the wheat genome. Proc. Natl Acad. Sci., 89: 11307-11311.
- Wilkinson, D. G. 1992. In situ Hybridization: A Practical Approach, IRL Pres, Oxford, England.
- Wernicke, W., Milkovits, L., 1987. Effect of auxin on the mitotic cell cycle in cultured leaf segments at different stages of development in wheat, DOI: 10.1111/j.1399-3054.1987.tb01940.
- Westwood, M. N., 1993. Hormones and Growth Regulators, Temperate Zone Pomology: Physiology and Culture. Timber Press, Inc. 9999 S.W. Wilshire, Suite 124, Portland, Oregon 97225.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA Polymorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers, *Nucleic Acids Research*, Vol 18, 6531-6535.
- Wu, B.H., Zheng, Y.L., Liu, D.C, and Zhou, Y.H., 2003. Trait Correlation of Immature Embryo Culture in Bread Wheat. *Plant Breeding*, 132, 47-51.
- Yeung, E. C. Et al., 1991. *In vitro* fertilization and embryo culture . The Plant Tissue Culture (Ed. T. A. Thorpe), Academic Press, New York, 253-271.
- Yorgancılar, M., Atalar, E., Babaoğlu, M., 2003. Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Henüz Olgunlaşmamış Embriyolardan Kallus Oluşumu ve Sürgün Rejenerasyonu. Türkiye 5. Tarla Bitkileri Kongresi, 13-17 Ekim 2003, (Sunulu Bildiriler), Cilt 1, Tarla Bitkileri Islahı, s 25-29. Diyarbakır.
- Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V., 2004. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology*, 200: 39-44.
- Zhou, M. D., Lee, T. T., 1983. Selectivity of auxin for induction and growth of callus from embryos of spring and winter wheat. *Can. J. Bot.*, 62, 1393-1397.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ezgi DOĞAN

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi: 17.05.1985

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Hasan Polatkan Anadolu Lisesi

Lisans: İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2003-2007)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı (2007-2010)

Çalıştığı Kurumlar

İONTEK BİYOTEKNOLOJİ VE İLAÇ TANI AŞ. (2010-)