

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**MISIRDA (*Zea mays* L.) FARKLI 2,4-D DOZLARININ
KALLUS OLUŞUMU VE KROMOZOMAL YAPIYA ETKİSİ**

Gıda Yük.Müh. Burçak ÇABUK

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN

ANKARA
2010

Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN danışmanlığında, Burçak ÇABUK tarafından hazırlanan bu çalışma 10/02/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

- Başkan:** Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN (Danışman) İmza :
Ankara Üniversitesi
Ziraat Fakültesi
Tarla Bitkileri Bölümü
- Üye:** Prof. Dr. M.Sait ADAK (TİK Üyesi) İmza :
Ankara Üniversitesi
Ziraat Fakültesi
Tarla Bitkileri Bölümü
- Üye:** Prof. Dr. Zeki KAYA İmza :
Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
- Üye:** Doç. Dr. Sertaç ÖNDE (TİK Üyesi) İmza :
Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
- Üye:** Doç. Dr. Melahat Avcı BİRSİN İmza :
Ankara Üniversitesi
Ziraat Fakültesi
Tarla Bitkileri Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan ATAKOL
Enstitü Müdür V.

Mısırdaki (*Zea mays* L.) Farklı 2,4-D Dozlarının Kallus Oluşumu ve Kromozomal Yapıya Etkisi

ÖZET

Günümüzde Türkiyede üretimi yapılmakta olan, tescilli 10 mısır çeşidinin (Pioneer 31N27, Pioneer 31P41, Pioneer 3223, Pioneer 34N24, ADA 8924, DKC 6022, BC 666, TECTOR, ADA 523 ve HELEN) olgunlaşmış embriyolarının bitki materyali olarak kullanıldığı araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

In vitro ve *in vivo* koşullarda düzenlenen çalışmanın *in vitro* aşamasında, kallus kültürü aracılığı ile 6 farklı 2,4-D dozunun (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/l), mısır çeşitlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisi araştırılmıştır. *In vivo* aşamasında ise, tüm mısır çeşitlerinin kalluslarından oluşan kök uçlarından örnekler alınmış, mısır hatlarının kromozom sayılarında gözlenen değişiklikler incelenmiştir.

Bulguların değerlendirilmesi sonucunda, farklı dozlarda, farklı mısır çeşitlerine 2,4-D oksininin uygulanması ile elde edilen kök uçlarının mikroskopik analizi sonucunda, 10 mg 2,4-D uygulanan Pioneer 31N27 (2n=18), Pioneer 3223 (2n=19) ve Pioneer 34N24 (2n=19) mısır çeşitlerinin kromozom sayılarında değişim gözlenmiştir.

2,4-D uygulanmasıyla gözlenen mitotik anormalliğin aneuploidi (genomdaki kromozomların sayısının değişmesi) olduğu ve kromozom sayısının azalması (hipoploidi) şeklinde meydana geldiği belirlenmiştir.

Elde edilen verilere göre, Türkiye'de yapılabilecek olan transgenik mısır elde etme çalışmalarında da kullanılacak en yüksek kallus oluşturma oranını sağlayan ancak kromozomal sapmalar oluşturmeyen 2,4-D dozunun, 2 mg/l olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Zea mays*, Mısır, Kallus Oluşumu, Kromozom Sayısı

**The Effect of Different 2,4-D Doses
on Callus Induction and Chromosomal Structure in Maize (*Zea mays* L.)**

ABSTRACT

This research in which the matured embryos of 10 registered common corn varieties which are grown in Turkey (Pioneer 31N27, Pioneer 31P41, Pioneer 3223, Pioneer 34N24, ADA 8924, DKC 6022, BC 666, TECTOR, ADA 523 and HELEN) have been used as plant materials was carried out in Biotechnology Laboratory, Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Ankara University.

In the stage of *in vitro* of this research which was arranged *in vitro* and *in vivo* media, the effect on callus induction and plant regeneration in 6 different varieties of 2,4-D doses (0, 2, 4, 6, 8 and 10 mg/l) through callus culture was investigated. In the stage of *in vivo*, samples from the root tips composed of the callus of all maize varieties were taken and changes observed in the chromosomal numbers in maize lines were evaluated.

As a result of the microscopic analyses of the root tips obtained through the application of 2,4-D auxin in different corn varieties in different doses, changes have been observed in the chromosomal numbers of Pioneer 31N27 (2n=18), Pioneer 3223 (2n=19) and Pioneer 34N24 (2n=19) maize varieties.

Mitotic anomaly observed through the application of 2,4-D was established as aneuploidy (the change of the chromosomal number in genome) and it was found to form as the decrease of the chromosomal number (hipoploidy).

According to the data found, providing the highest callus formation ratio but causing no chromosomal deviations, the dose of 2,4-D to be used in the transgenic maize producing studies to be utilized in Turkey was determined to be 2 mg/l.

Key Words: *Zea mays*, Corn, Maize, Callus Induction, Chromosome Number

TEŞEKKÜR

Doktora tezi çalışmam sırasında ilgi ve önerileriyle beni yönlendiren, laboratuvarının kapısını güvenerek bana açan, bilimsel ve manevi desteğini hep hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN'e, Tez İzleme Komitesi üyelerim, Sayın Prof. Dr. Sait ADAK ve Sayın Doç. Dr. Sertaç ÖNDE'ye,

Doktora eğitimim süresince bana "Yurtiçi Doktora Burs"u vererek beni destekleyen ve onurlandıran TÜBİTAK'a,

Her zaman bilgileriyle beni aydınlatan hocam Sayın Doç. Dr. Melahat AVCI BİRSİN'e, istatistiksel analizlerin yapılmasında ve yorumlanmasında yardımcı olan Sayın Arş. Gör. Gökhan DUMAN'a ve laboratuvar çalışmalarım sırasında beni yalnız bırakmayan arkadaşlarım İrem ALTUNGÖZ'e, Ezgi DOĞAN'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Yine doktora eğitimim süresince, DAAD Genç Bilimadamı Destekleme Programı Bursiyeri olarak gittiğim Rostock Üniversitesi (Almanya)'nde 6 ay boyunca sevdiğilerimden uzaktayken bana hiç yalnızlık hissettirmeyen, bilimsel gelişimime katkıda bulunan hocam Sayın Prof. Dr. Inge BROER'e, arkadaşlarım Dr. Heike MITCHOFISKY, Dr. Jana HUCKAUF, Kristina BETHGE, Kerstin THOß, Sonja KONOPKA'ya ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

İyi ve kötü günümde hep yanımda olan, başarımlarım için benden daha çok çaba sarfeden, yaşam ve mutluluk kaynağım annem Nimet ÇABUK'a, babam Bahri İlker ÇABUK'a, ablam Arş. Gör. Burcu ÇABUK'a ve biricik yeğenim Beril Çabuk ÖZER'e, ayrıca bugüne kadar bende emeği olan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Burçak ÇABUK

Ankara, Şubat 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	16
2.1. Bitkilerde 2,4-D ile ilgili yapılan doku kültürü çalışmaları ve gözlenen kromozomal değişimler.....	16
2.2. Hayvanlarda ve insanlarda 2,4-D ile ilgili yapılan çalışmalar ve gözlenen kromozomal değişimler.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Kullanılan mısır çeşitlerine ait genel özellikler.....	35
3.1.2. Çalışmada kullanılan deney ekipmanları.....	38
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. <i>In vitro</i> yöntemler.....	39
3.2.1.1. Kullanılan ekipmanların sterilizasyonu.....	39
3.2.1.2. Steril distile su hazırlanması.....	40
3.2.1.3. Besin ortamlarının hazırlanması.....	40
3.2.1.4. Eksplantların yüzey sterilizasyonu.....	43
3.2.1.5. Kallus oluşumu ve gelişimi	43
3.2.1.6. Rejenerasyon	44
3.2.2. <i>In vivo</i> yöntemler.....	47

	Sayfa No
3.2.2.1. Sitolojik çalışmalar.....	47
3.2.2.1.1. Prefiksasyon	47
3.2.2.1.2. Fiksasyon	48
3.2.2.1.3. Hidroliz	49
3.2.2.1.4. Boyama	50
3.2.2.1.5. Kök uçlarının mikroskopta incelenmesi...	51
3.3. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi.....	55
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	56
4.1. 2,4-D uygulanan Pioneer 3223 mısır çeşidinde gözlenen değişimler.....	56
4.2. 2,4-D uygulanan Pioneer 31N27 mısır çeşidinde gözlenen değişimler.....	60
4.3. 2,4-D uygulanan Pioneer 31P41 mısır çeşidinde gözlenen değişimler.....	64
4.4. 2,4-D uygulanan Pioneer 34N24 mısır çeşidinde gözlenen değişimler.....	68
4.5. 2,4-D uygulanan TECTOR mısır çeşidinde gözlenen değişimler.....	72
4.6. 2,4-D uygulanan ADA 523 mısır çeşidinde gözlenen değişimler.....	76
4.7. 2,4-D uygulanan BC 666 mısır çeşidinde gözlenen değişimler.....	80
4.8. 2,4-D uygulanan ADA 8924 mısır çeşidinde gözlenen değişimler.....	84
4.9. 2,4-D uygulanan HELEN mısır çeşidinde gözlenen değişimler.....	88
4.10. 2,4-D uygulanan DKC 6022 mısır çeşidinde gözlenen değişimler.....	92
4.11. 2,4-D uygulanan tüm mısır çeşitlerinde gözlenen değişimler.....	96
4.12. 2,4-D'nin mısır kromozomlarına etkisi.....	106

	Sayfa No
5. SONUÇ.....	110
KAYNAKLAR.....	113
EKLER.....	129
EK 1. Pioneer 31N27 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.....	129
EK 2. Pioneer 31P41 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.....	130
EK 3. Pioneer 3223 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.....	131
EK 4. Pioneer 34N24 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.....	132
EK 5. ADA 8924 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.....	133
EK 6. DKC 6022 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.....	134
EK 7. BC 666 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.....	135
EK 8. TECTOR mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.....	136
EK 9. ADA 523 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.....	137
EK 10. HELEN mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.....	138
ÖZGEÇMİŞ.....	139

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. Mısır kallusundan kök oluşumu aşamaları.....	39
Şekil 3.2. Mısır kallusundan kök oluşumu (I).....	45
Şekil 3.3. Mısır kallusundan kök oluşumu (II).....	46
Şekil 3.4. Çalışmada geliştirilen kök ucu boyama yöntemi.....	53
Şekil 3.5. Kök uçlarının mikroskopta incelenmesi.....	54
Şekil 4.1. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 3223 mısır çeşidinde kallus oluşumu.....	58
Şekil 4.2. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 3223 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.....	59
Şekil 4.3. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 31N27 mısır çeşidinde kallus oluşumu.....	62
Şekil 4.4. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 31N27 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.....	63
Şekil 4.5. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 31P41 mısır çeşidinde kallus oluşumu.....	66
Şekil 4.6. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 31P41 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.....	67
Şekil 4.7. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 34N24 mısır çeşidinde kallus oluşumu.....	70
Şekil 4.8. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 34N24 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.....	71
Şekil 4.9. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan TECTOR mısır çeşidinde kallus oluşumu.....	74
Şekil 4.10. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan TECTOR mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.....	75
Şekil 4.11. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan ADA 523 mısır çeşidinde kallus oluşumu.....	78
Şekil 4.12. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan ADA 523 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.....	79
Şekil 4.13. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan BC 666 mısır çeşidinde kallus oluşumu.....	82

	Sayfa No
Şekil 4.14. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan BC 666 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.....	83
Şekil 4.15. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan ADA 8924 mısır çeşidinde kallus oluşumu.....	86
Şekil 4.16. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan ADA 8924 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.....	87
Şekil 4.17. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan HELEN mısır çeşidinde kallus oluşumu.....	90
Şekil 4.18. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan HELEN mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.....	91
Şekil 4.19. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan DKC 6022 mısır çeşidinde kallus oluşumu.....	94
Şekil 4.20. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan DKC 6022 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.....	95
Şekil 4.21. Uygulanan 2,4-D miktarına göre ortalama kallus oluşum oranları (%)	97
Şekil 4.22. Uygulanan 2,4-D miktarına göre ortalama kallus ağırlıkları (g).....	100
Şekil 4.23. Genotiplere göre ortalama kallus oluşum oranları (%).....	103
Şekil 4.24. Genotiplere göre ortalama kallus ağırlıkları (g).....	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. MS kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları.....	41
Çizelge 4.1. Pioneer 3223 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında <i>in vitro</i> parametrelere tepkileri (%)......	56
Çizelge 4.2. Pioneer 3223 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	57
Çizelge 4.3. Pioneer 31N27 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında <i>in vitro</i> parametrelere tepkileri (%)......	60
Çizelge 4.4. Pioneer 31N27 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	61
Çizelge 4.5. Pioneer 31P41 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında <i>in vitro</i> parametrelere tepkileri (%)......	64
Çizelge 4.6. Pioneer 31P41 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	65
Çizelge 4.7. Pioneer 34N24 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında <i>in vitro</i> parametrelere tepkileri (%)......	68
Çizelge 4.8. Pioneer 34N24 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	69
Çizelge 4.9. TECTOR mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında <i>in vitro</i> parametrelere tepkileri (%)......	72
Çizelge 4.10. TECTOR çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	73
Çizelge 4.11. ADA 523 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında <i>in vitro</i> parametrelere tepkileri (%)......	76
Çizelge 4.12. ADA 523 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	77
Çizelge 4.13. BC 666 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında <i>in vitro</i> parametrelere tepkileri (%)......	80

Çizelge 4.14.	BC 666 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	81
Çizelge 4.15.	ADA 8924 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında <i>in vitro</i> parametrelere tepkileri (%)......	84
Çizelge 4.16.	ADA 8924 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	85
Çizelge 4.17.	HELEN mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında <i>in vitro</i> parametrelere tepkileri (%)......	88
Çizelge 4.18.	HELEN çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	89
Çizelge 4.19.	DKC 6022 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında <i>in vitro</i> parametrelere tepkileri (%)......	92
Çizelge 4.20.	DKC 6022 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	93
Çizelge 4.21.	Farklı dozlarda 2,4-D oksini içeren ortamlarda çeşitlere göre kallus oluşumu (%)......	97
Çizelge 4.22.	Tüm çeşitlerde 2,4-D miktarı ve kallus oluşumu (%) değişkenlerinin çapraz tablosu.....	99
Çizelge 4.23.	Farklı dozlarda 2,4-D oksini içeren ortamlarda çeşitlere göre kallus ağırlığı (g)......	101
Çizelge 4.24.	2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşumu oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları.....	102
Çizelge 4.25.	Genotipin kallus oluşumu oranına göre varyans analizi sonuçları...	102
Çizelge 4.26.	Tüm çeşitlerin ve kallus oluşum oranı (%) değişkenlerinin çapraz çizelgesi.....	104
Çizelge 4.27.	Kallus oluşum oranı, 2,4-D miktarı, sürgün gelişim oranı ve kallus ağırlığı arasındaki korelasyon.....	105
Çizelge 4.28.	Çalışılan çeşitlerde farklı 2,4-D dozlarında gözlenen kromozomlar.....	107

SİMGELER DİZİNİ

2-4,D	2,4-diklorofenoksiasetik asit
2,4,5-T	2,4,5-triklorofenoksiasetik asit
2,4,5-TP	2-(2,4,5-triklorofenoksi) propiyonik asetik
2-MCPP	2-(2-metil-4-klorofenoksil) propiyonik asit
3-CPA	3-klorofenoksipropionamid
4-CPA	4-kloro-indolasetik asit
ABA	Absisik Asit
AÖF	Asgari Önemli Fark
B5	Gamborg Besin Ortamı
BAP	Benzil amino pürin
BNOA	β -naftoksiasetik asit
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
cDNA	Tamamlayıcı DNA
cm	Santimetre
°C	Celsius
DCP	2,4-Diklorofenol
Dikamba	3,6-dikloro-2 metoksibenzoik asit
DKW	Driver ve Kuniyuki Besin Ortamı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
g	Gram
g Mol ⁻¹	Mol kütle
GA3	Giberellik Asit
HCl	Hidrojen Klorür
IAA	İndol-3-asetik asit
IBA	İndol-3-bütirik asit
IPA	İndol-3-propiyonik asit
K ₂ S ₂ O ₅	Potasyum Metabisülfid
K.O.	Kareler Ortalaması
LS	Linsmaier ve Skoog Besin Ortamı
m	Metre
MCPA	Metal-4-klorofenoksiasetik asit
M	Molar
mm	Milimetre
MM	Morel ve Müller Besin Ortamı
mm Hg	Milimetre Civa
MS	Murashige ve Skoog Besin Ortamı
N6	Chu Besin Ortamı
NAA	Naftalen asetik asit

NaCl	Sodyum Klorür
NN	Nitsch ve Nitsch Besin Ortamı
Pikloram	4-amino-3,5,6,-trikloropiklonik asit
psi	Basınç birimi (pounds per inch square)
r değeri	Korelasyon katsayısı
RNA	Ribo nükleik asit
rRNA	Ribosomal RNA
SH	Schenk ve Hildebrant Besin Ortamı
TDZ	Thidiazuron
UV	Ultraviyole
W	White Besin Ortamı
WPM	Lloyd ve McCown Besin Ortamı
μM	Mikromolar
\bar{x}	Aritmetik Ortalama
α	Alfa Parçacığı
β	Beta Parçacığı

1. GİRİŞ

Mısır (*Zea mays* L.), dünyada yaygın olarak yetiştirilen, endüstriyelmiş ve sahip olduğu zengin besin maddeleri nedeniyle hem insan, hem de hayvan beslenmesi bakımından çok değerli ve kullanım çeşitliliği olan bir tarla bitkisidir. Mısır bitkisi, dünyada tüm serin iklim ve sıcak iklim tahılları içinde en yüksek verimi gösteren, güneş enerjisini en iyi şekilde kullanan (C₄ bitkisi) ve birim alandan en fazla kuru madde üreten tahıldır.

Mısır, hem doğrudan insan beslenmesinde, hem de nişasta, glukoz, yağ ve yem sanayinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Mısır proteininde lizin ve triptofan proteinlerinin biyolojik değeri de aminoasitlerin sınırlayıcı etkisi altındadır. Tanesindeki ham yağ yulaftan sonra en yüksek değer veren besin maddesidir. Ülkemizde hayvancılığın gelişmesine paralel olarak artan karma yem isteğine bağlı olarak, mısır tüketimi de artmaktadır. Mısır tanesi çok iyi bir yenilenebilir enerji kaynağı olup, nişasta yönünden zengin olması ve nişastanın hazmolabilirlik derecesinin yüksekliği, mısırın beslenme değerini artırmaktadır. Mısır ayrıca, yeşil ve silaj olarak hayvan beslenmesinde de kullanılan önemli bir kaba yemdir. Dünya mısır üretiminin büyük bölümü hayvan yemi olarak kullanılmaktadır.

Mısır bitkisinin ortaya konmuş yabani formu bulunmadığından orijini henüz tam olarak bulunamamıştır. Mısırın orijini konusunda çeşitli teoriler ileri sürülmekle birlikte bu teorilerin hiçbiri tam olarak kabul görmemiştir. Ancak, Meksika ve Orta Amerika kökenli olduğu ve 1600'lü yıllarda Suriye yoluyla Mısır'dan ülkemize geldiği düşünülmektedir.

Kökeni bakımından mısır, tropik alanların bitkisi olarak kabul edilmesine karşılık, dünya mısır üretiminin büyük kısmı karasal iklimli bölgelerden elde edilmektedir. Günümüzde üretimi yapılan hibrit mısır çeşitleri ilk olarak Amerika'da yapılan ıslah çalışmaları sonucunda elde edilmiş ve 1800'lü yıllarda Avrupa'ya, Güney Amerika'ya, Afrika'ya ve Avustralya'ya yayılmıştır.

Mısır tohumundan 4 ay gibi kısa bir zaman içinde 2.5-4.5 m boyunda dev bir bitki ve koçanında kendisini meydana getiren 600-1000 mısır tanesi meydana gelmektedir. Mısır potansiyelinin bu kadar yüksek olması, mısır tanesinin yüksek oranda enerji depolamasından ve kökleri, yaprakları, sapları ve çiçek organlarıyla doğada bulunan etkili

enerji faktörlerini kullanarak yüksek bir üretim sağlama yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Kün 1997).

Ülkemizde tahıllar grubu içerisinde buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanı ve üretime sahip olan mısır, Türkiye tarımında önemli bir yere sahiptir. Ana ürün ve ikinci ürün olarak ülkemizde birçok yerde yetiştirilebilmektedir.

Türkiye’de mısır, deniz seviyesinden 1500 m yüksekliğe kadar olan ve yağışı 250-2500 mm arasında değişen alanlarda, ana ürün ve ikinci ürün olarak yetiştirilmektedir. Türkiye, mısıra ayırdığı ekim alanı, elde ettiği üretim ve verimi ile Ortadoğu ülkeleri içinde sürekli olarak ilk sırayı almaktadır (Kün 1997).

Ülkemizde, 1984 yılında tohumluk üretiminde özel sektör kuruluşlarının faaliyetine izin verilmesi ve 1987 yılında tohumluk dağıtımında devlet tekelinin kaldırılması ile tohumculuk teknolojisinde hızlı bir gelişme gözlenmiştir. Farklı bölgelerdeki üreticiler için en uygun olarak tanımlanabilecek tek bir mısır çeşidi söz konusu değildir. Her üretici, kendi koşullarına uyan en iyi çeşidi seçmek durumundadır. Çeşit seçiminde olgunlaşma süresi, koçan özelliği, yatmaya hastalık, zararlılara, soğuk ve sıcağa dayanıklılık, ekim sıklığına tepki ve verim gibi faktörler dikkate alınmaktadır (Kün 1997).

Mısır bitkisi, yazlık tahıl cinsleri içinde birim alandan yüksek verim sağlaması ve yıl içinde özellikle kısa dönemde yetiştirilebilen ürün olması yönünden büyük önem taşımaktadır (Emeklier 1990).

Ülkemizde hemen hemen tüm bölgelerde az ya da çok mısır üretilmektedir. En çok üretimin yapıldığı yerler Akdeniz, Karadeniz, Marmara ve Ege Bölgeleridir. Mısır için kullanılan üretim alanının %50-60’ında hibrit tohum kullanılmaktadır. Karadeniz Bölgesi dışında hibrit tohum kullanımı daha yüksektir. Adana, Sakarya, İçel gibi illerde üretimde %95 oranında hibrit tohumluklar kullanılmaktadır. Üretimdeki artışa rağmen ülkemizde mısır üretimi ihtiyaca yetmemektedir.

Sıcak iklim tahılları içinde mısır üretimi, birinci sırayı almaktadır. Ülkemizde de Karadeniz, Akdeniz, Marmara ve Ege Bölgelerinden sonra iç bölgelerimizde mısır tarımı büyük önem kazanmış ve bölgeler için uygun çeşit arayışları ortaya çıkmıştır. Kısa vejetasyon süreli

hibrit mısır çeşitleri, verimlerinin orta seviyede olması, kurutma masraflarının düşük ve kurutulmalarının kolay olması nedeniyle, İç Anadolu Bölgesinde daha da önem kazanmaktadır (Emeklier 1990).

Buğdaygiller familyasının *Maydeae* oymağına giren mısır bitkisi, *Plantea* aleminde, *Magnoliophyta* (Kapalı tohumlar) bölümünde, *Liliopsida* (bir çenekliler) sınıfında, *Poales* takımında, *Poaceae* (Buğdaygiller) familyasında, *Zea* cinsinde ve *Z.mays* L. türünde yer almaktadır (Iltis ve Doebley 1980).

Mısır çeşitleri, *Zea mays indentata* Sturt. (At dişi mısır), *Zea mays indurata* Sturt. (Sert mısır), *Zea mays amylaceae* Sturt. (Unlu mısır), *Zea mays sacharata* Sturt. (Şeker mısır), *Zea mays everta* Sturt. (Cin mısır), *Zea mays ceratina* Kulesch. (Mumlu mısır), *Zea mays tunicata* Sturt. (Kavuzlu mısır) ve *Zea mays enduricang* Sturt. (Kaltır mısır) olmak üzere sekiz grup altında toplanmaktadır (Iltis ve Doebley 1980).

Ülkemizde, genelde yetiştirilen mısır varyete grupları at dişi mısır, sert mısır, cin mısır ile şeker mısırdır. Bunlardan at dişi mısır hibrit çeşitleri tohumlarının kolayca temin edilerek çiftçiler arasından yaygınlaşması ile ekiliş alanı 1980'li yıllardan sonra hızlı bir artış göstermiştir. Sert mısırın ekiliş alanı genellikle Karadeniz Bölgesi gibi mısır unundan ekmek yapılan yerlerde yaygındır. Cin mısır ve şeker mısır çerezlik olarak tüketilmek üzere, küçük alanlarda ülke genelinde ekilmektedir. Şeker mısır tüketiminde, turizm ve büyük kentlerde önemli bir artış gözlenmektedir.

Dünyada üretilen mısırın %19'u insan beslenmesinde (doğrudan tüketim), %64'ü hayvan yemi olarak, %8.5'i mamul gıda (dolaylı tüketim), %3.1'i diğer tüketimler, %0.25'i de tohumluk olarak kullanılmaktadır.

Gelişmekte olan ülkelerde mısırın kullanımı, hayvan beslenmesinde %46, insan beslenmesinde ve sanayi hammaddesi olarak %54'dür. Gelişmiş ülkelerde ise bu oran hayvan beslenmesinde %91, insan beslenmesinde ve sanayi hammaddesi olarak %9'dur (Kırtok 1998). Özetle, mısırın, insan beslenmesinde kullanım oranı gelişmekte olan ülkelerde, gelişmiş ülkelere göre daha yüksek oranlardadır.

2009 yılında Devlet İstatistik Enstitüsü çalışmalarından alınan verilere göre mısır üretimi, dünyada ~746000000 ton, ülkemizde ise ~3535000 ton olarak gerçekleşmiştir (Anonim 2009a).

Ülkemizde, son 20 yılda ekim alanında önemli bir değişim olmamasına karşın, mısır üretiminde iki katına yakın artış gerçekleşmiştir. Bu gelişme, özellikle yeni melez çeşitlerin kullanımının yaygınlaşması, üretim tahminlerinin ve mekanizasyonun iyileşmesi ile yükselen verim seviyesinden kaynaklanmaktadır.

Son yıllarda üretim artışı, dünya nüfus artışından daha hızlı olan mısır bitkisinin, gerçek önemi de gün geçtikçe artmaktadır. Ancak, sınırlı ekim alanları, su kaynaklarının azalması ve dünya popülasyonun hızlı artışı gibi nedenlerden dolayı, hem kalite hem de miktar artışı açısından, mısır bitkisinde daha hızlı bir genetik gelişime gereksinim duyulmaktadır.

Günümüzde klasik ıslah çalışmalarının yanında, partikül bombardımanı (Klein vd 1989, Gordon-Kamm vd 1990, Bohorova vd 1999) ve *Agrobacterium* enfeksiyonu (Ishida vd 1996, Sidorov vd 2006) gibi çeşitli yöntemlerle elde edilen, genetiği değiştirilmiş mısır bitkisi ile ilgili çalışmalarda da önemli ilerlemeler sağlanmıştır.

İlk moleküler işaretleyici mısır haritası, Helentjaris vd (1986) tarafından yayımlanmıştır. Bu harita, 116 lokus içermektedir ve bu haritalamada cDNA ve proplar gibi rastgele genomik klonlar kullanılmıştır. Mısırın genetik bağlantı (linkage) haritaları, binlerce klasik mutasyon lokuslarından, restriksiyon parça uzunluk polimorfizm (RFLP; restriction fragment length polymorphism), basit sekans-tekrar (SSR; Simple Sequence Repeat), kantitatif özellik lokus (QTL; Quantitative Trait Loci) ve ifade edilmiş sekans etiket (EST; Expressed Sequence Tags) işaretleyicilerinden oluşmaktadır (Davis vd 1999, Fernandes vd 2002, Lee vd 2002, Sharopova vd 2002).

In situ hibridizasyon (Gall ve Pardeu 1969, John vd 1969) yöntemi geliştirildiğinden bu yana, söz konusu yöntem genetiğin ve hücre biyolojisinin, karyotipleme (Chen vd 2000, Dong vd 2000) ve fiziksel haritalama (Sadder vd 2000, Sadder ve Weber 2001) gibi birçok dalında kullanılmıştır. Ancak, mısır sitogenetiğinin zengin tarihine rağmen, mısır genlerinin fiziksel lokasyonu çoğunlukla bilinmemektedir (Harper ve Cande 2000). Yeni tekniklerin geliştirilmesi, kromozom tanımlama, genom analizi ve sitogenetik için önemlidir (Dong vd

2000). Bu amaçla, Kromozom II'deki 55 rRNA (Chen vd 2000) ve Kromozom I'deki *pI* geni gibi, birçok mısır sitogenetik kromozom işaretleyicileri bulunmuştur (Harper ve Cande 2000).

Yukarıda bahsedilen çalışmaların çoğunda, yüksek rejenerasyon frekansına sahip olan etkili bir bitki doku kültürü yöntemi uygulamak ön koşuldur.

Bitki doku kültürü, aseptik (steril) koşullarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları; eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından, yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir.

Doku kültürü için çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilmiş olan, White (1934) (W), Murashige ve Skoog (1962) (MS), Morel ve Müller (1964) (MM), Halperin ve Watherell (1965) (HW), Linsmaier ve Skoog (1965) (LS), Nitsch ve Nitsch (1965) (NN), Gamborg vd (1968) (B5), Schenk ve Hildebrandt (1972) (SH), Chu vd (1975) (N6), Lloyd ve McCown (1981) (WPM) gibi araştırmacıların geliştirildiği bazı besin ortamları mevcuttur. Bu besin ortamlarından en çok kullanılan temel ortamlar, MS besin ortamı ve B5 besin ortamıdır. Bitki rejenerasyonunda kullanılan besin ortamları bitki büyümesi için gerekli olan makro ve mikro elementleri içermektedir. Bu ortamlara enerji kaynağı olarak şeker ve katılaştırıcı olarak agar ilave edilerek karıştırılır.

Pratikte kullanımına 1960'lı yıllarda başlanan doku kültürü tekniklerinde, günümüze kadar hızlı gelişmeler kaydedilmiştir. Özellikle son 25 yıllık dönemde diğer biyolojik alanlarda olduğu gibi, doku kültürü alanında da gözle görülür ilerlemeler kaydedilmiştir. Bugün doku kültürlerinden elde edilen sonuçlar laboratuvar dışına çıkarak pratikte ve ticarete kullanım alanı bulmuş olup, gelişen teknikler her geçen gün daha da önem kazanmaktadır.

Ülkemizde son çeyrek yüzyılda başlayan bitki biyoteknolojisi çalışmaları, başlangıçta doku kültürü üzerine yoğunlaşmış olup, son 10 yılda moleküler biyoloji ve genetik teknikleri ile bütünleşmeye başlamıştır.

Bitki biyoteknolojisi ile ilgili araştırmaların büyük bir çoğunluğu doku kültürü üzerinedir. Üzerinde çalışılan bitkiler sırasıyla, tahıl, baklagil, sebze, meyve, çiçek, odunsu bitki ve yağlı tohum türleridir.

Doku kültürünün temel amaçları, çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerin genetik çalışmalarında rol oynamaktır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır.

Bitkilerden izole edilmiş sürgün, kök, yaprak, çiçek, hatta organize olmamış kallus gibi dokulardan bütün bir bitki rejenere edilebilmektedir. *In vitro* ortamda hücre ve dokulardan sürgün rejenerasyonunu başarabilmek için uygun eksplantın seçilmesi, büyümede aktif maddeleri içeren uygun ortamın belirlenmesi ve fiziksel koşulların uygun olması gerekmektedir (Murashige 1974, Ammirato 1983).

Bir bitkinin hücre, doku, organ, meristem veya embriyo gibi çeşitli parçalarından (eksplant) yeni bitki veya bitkiler elde edilmesine *bitki rejenerasyonu* denilmektedir. Bitki rejenerasyonu, kotiledon, embriyo, hipokotil, gövde, yaprak, sürgün ucu, kök, genç tomurcuklar, çiçek taç yapraklar, yumurta dokusu, yumurta hücreleri, yaprak sapı vb. eksplantlardan yapılabilmektedir.

Hücrelere ve dokulara baskı uygulayıp, değişikliklere neden olarak sürgün veya kök taslağı diye adlandırılan tek kutuplu ve vasküler sistemin kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesine *organogenesis* denmektedir. Organogeneizde, ilk önce bitki parçalarından adventif sürgün, kök ya da organize olmamış bir hücreler yığıını olan “kallus” ve daha sonra bu kallustan “sürgün” veya “kök” meydana gelmektedir (Vasil 1987). Bitki parçalarından organ gelişimi direkt olarak değil, önce *embrioid* adı verilen embriyo benzeri yapıların meydana gelmesiyle, daha sonra da bu embriyolardan kök ve sürgün gelişiminin meydana gelmesi (*embriyogenesis*) ile gerçekleşmektedir (Merkle vd 1990).

Embriyogenesis, bireysel bitkilerin hücrelerinden gelişen *somatik embriyogenesis* ve döllenmiş bir zigottan gelişen *gametik (zigotik) embriyogenesis* olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır (Ammirato 1987, Rashid 1988).

Somatik embriyogenesis, bağımsız vasküler sistemi olan ve kök ile sürgün aksini içeren iki kutuplu bir yapının oluşmasına yol açan bir süreçtir. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar da *somatik embriyo* olarak adlandırılmaktadır. Bireysel bitkilerin hücrelerinden geliştikleri için somatik embriyolardan elde edilen bitkiler genetik olarak klon oluşturmaktadır. Döllenmiş yumurtadan gelişen embriyoda olduğu gibi, iki çenekli bitkilerde somatik embriyolar da globular, kalp, torpedo ve kotiledon oluşum safhalarını geçirir. Gövde-kök eksenine aynı zamanda sahip olup, asıl doku ile vasküler bağıntıları olmadığından dolayı dokudan kolaylıkla ayrılabilirler (De Jong vd 1993).

Mısır bitkisinde doku kültüründen bitki rejenerasyonu, ilk defa Green ve Philips (1975) tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada, eksplant olarak *olgunlaşmamış* mısır embriyolarından yararlanılmıştır.

Ayrıca, yine başarılı bitki rejenerasyonları, başaklardan (Ting vd 1981), kavuzlardan (Suprasanna vd 1986), olgunlaşmamış çiçeklerden (Pareddy ve Petolino 1990), olgunlaşmamış saçaklardan (Rhodes vd 1986, Songstad vd 1992), olgunlaşmamış embriyolardan (Ahloowalia 1982, Bohorova vd 1995), yaprak parçalarından (Conger vd 1987, Ray ve Gosh 1990, Ahmadabadi vd 2007), fide parçalarından (Santos vd 1984), apikal meristemlerinden (Zhang vd 2002, Sairam vd 2003) ve genç salkımlardan (Can vd 2000) oluşan kalluslardan elde edilmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, bitki rejenerasyonu için olgunlaşmamış embriyodan oluşturulmuş kallusların, diğer eksplant dokularından oluşan kalluslardan daha yüksek verime sahip olduğu anlaşılmıştır (Özgen vd 1996, Huang ve Wei 2004). Olgunlaşmamış embriyoların eksplant kaynağı olarak kullanabilmeleri için donör bitkinin belli dönemlerde eksplant kaynağı temin etmesi ve kışlık çeşitlerde vernalizasyon ihtiyacının karşılanması için seralara ve kontrollü koşullara gereksinim duyulmaktadır. Olgunlaşmış embriyolar yılın belirli zamanlarına bağlı kalınmadan sağlanabildiğinden, kültüre alınması daha kolay olduğundan ve bol miktarda sağlanabildiğinden dolayı olgunlaşmamış embriyolara göre daha avantajlıdır (Özgen vd 1998). Ayrıca, endosperm-destekli kallus oluşum yöntemi gibi

bazı yeni teknikler, olgun embriyo kültürlerinden kallus oluşturmada başarıyla kullanılmaktadır (Bartok ve Sagi 1990, Ahmed vd 1992, Özgen vd 1996, Özgen vd 1998). Aynı zamanda, doku kültürü teknikleriyle yetiştirilen bitkilerin kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve dış ortama alıştırma aşamaları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmekte (Özgen vd 1998) ve olgun embriyolarda daha düşük olan rejenerasyon oranı, kallus ve sürgün oluşumunu yönlendiren büyüme düzenleyicilerin kullanımı ile artırılabilir.

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 destekleyen maddelerin sentezlendiği bulunmuş ve bunlara “*hormonlar*” ya da “*fitohormonlar*” denilmiştir. Zamanla bitki bünyesinde sadece büyümeyi destekleyen 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 üretilmiş ve bunlara, “*büyüme ve gelişme düzenleyiciler*” denmiştir. Elde edilen maddelerin bir kısmı büyümeyi desteklerken 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*, köklenmeyi, hücre gelişimini ve kallus oluşumunu, başka bir büyüme düzenleyici grubu olan *sitokininler* ise, hücre bölünmesini, yeniden farklılaşma ve bitki rejenerasyonunu destekler.

Oksin grubu hormonlar, “*doğal oksinler*” 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), 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) ve 2,4,5-TP (2-(2,4,5-trichlorophenoxy)propionic acid) vb.’den oluşurlar (George 2008).

Oksin grubu hormonların doğal olarak bulunan en önemli formu IAA’dır. Ancak IAA’nın ışık ve sıcaklıkta kararsız olması nedeniyle mikroçoğaltımda, IAA sınırlı kullanıma sahiptir.

Düşük oksin ve yüksek sitokinin konsantrasyonları sürgün morfogenezisini desteklemektedir (Özgen 1998). Ayrıca, somatik embriyogenesi uyarmak amacıyla bu hormonların yanı sıra başka maddeler de kullanılmaktadır. Bu maddelerden biri de poliaminlerdir. Putresin, spermin ve sipermidin gibi poliaminler, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan organik polivalent katyonlardır. Bitki hücre metabolizmasındaki rolleri tam olarak açıklığa kavuşturulmamış olmasına karşın, son yıllarda yapılan çalışmalarla polimerlerin bitki büyüme ve gelişme olaylarında önemli rol oynadığı bilinmektedir (Smith 1985). Doğal olarak meydana gelen poliaminler, hayvan hücrelerinde, aşağı ve yüksek organizasyonlu bütün bitki hücrelerinde bulunmakta ve hormonlardan çok sekonder mesajcı olarak adlandırılmaktadır (Evans vd 1989). Ancak Bagni (1986), çoğalan hücrelerde hızla sentez edilmeleri ve kolay taşınabilirlikleri nedeniyle, Rosella ve arkadaşları (1993) ise, düşük molekül ağırlıkları, geniş kapsamlı etkileri ve organizmada çok yüksek seviyede bulunmalarından dolayı poliaminlerin daha çok hormonlara benzerlik gösterdiğini ifade etmiştir. Diğer yandan Galston (1983), içsel poliaminlerin ışık, hormon, stres ve yaşlanma gibi uyarılara verdiği cevapları, taşınımını ve dışsal uygulama sonucundaki etkileri nedeniyle bitkilerde düzenleyici rol oynadığını ifade etmektedir. Poliaminler tek başlarına embriyogenesis, kök büyümesi, çiçeklenme, hücre büyümesi, nükleik asit, protein sentezi ve çimlenme gibi pek çok fizyolojik olayda etkili olabilmektedir.

Kelime anlamı, yunan orijinli olup “büyümek” ve “gelişmek” anlamına gelen oksinler, bitkilerin büyüme gösteren uç kısımlarında (kök, tomurcuk, yaprak vb.) en yüksek yoğunluğa ulaşmaktadır. Örnek olarak, Pilet ve Saugy (1985) ile Lur ve Setter (1993) tarafından yapılan mısır bitkisi doku kültürü çalışmaları sonucunda, mısır bitkisinin yapısında bulunan IAA miktarının yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Ayrıca oksinler, bitkilerde uzamayı hızlandırır. Bitkilerde uzamayı hızlandırması, hücre büyüme ve bölünmesini artırmasının bir sonucudur. Oksinin hücre büyümesini artırması, hücrenin ozmotik sisteminde oluşturduğu bazı değişikliklerden kaynaklanmaktadır.

Oksinler, hücrede osmozunu artırması, 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).

Embriyogenesi desteklemek için en fazla kullanılan oksin grubu hormon 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D)'tir. Kallus oluşumunu başlatmak için, sıklıkla 2,4-D kimyasalı tercih edilmektedir.

2,4-D, Amerika Kimyasal Kozmetik Anonim Şirketi tarafından 1940'ların ortalarında geliştirilmiş organik bir kimyasal olup, ana bileşimi asittir (Keller vd 1994). Aslında, hormonların biyolojik aktivitesine benzer organik bileşikler geliştirmek istenirken 2,4-D gibi etkili herbisitler bulunmuştur. 2,4-D, klorofenoksi bileşikler grubundandır. Klorlandırılmış fenoksi asit grubuna girer. Beyaz pudra halindedir. 2,4-D'nin asit formu, ticari olarak kendi başına kullanılamaz. Genellikle amin ve ester tuzları olarak kullanılır. 2,4-D'nin ester formu, buharlaşma ile kaybedileceğinden amin tuzlarının kullanımı daha yaygındır. Ayrıca, kil ve organik madde miktarı yüksek olan topraklarda, herbisit konsantrasyonunda absorpsiyon nedeniyle yüksek tutulması gerekir. Her iki form da geniş yapraklı yabancı otlarda etkilidir ancak ester formu uçucudur. Bu nedenle karışık tarım yapılan alanlarda kullanılması tavsiye edilmemektedir (Hayes ve Laws 1991).

Açık formülü $C_8H_6Cl_2O_3$, moleküler ağırlığı $221.04 \text{ g Mol}^{-1}$, erime noktası 140.5°C (413.5 K), kaynama noktası 160°C (0.4 mm Hg), su içerisindeki çözünürlüğü 25°C 'de 900 mg/l olan 2,4-D, monokloroasetik asit'in sodyum tuzu ile 2,4-Diklorofenol'ün reaksiyonu sonucu elde edilmektedir. 2,4-D, alkol, eter ve alkalilerde çözünürken, suda az çözünmekte, petrol yağlarında ise çözünmemektedir. Higroskopik değildir. Hafif fenolik kokuludur. Beyaz renklidir ve kristal toz halindedir. 2,4-D'nin esterleri genellikle emülsiyon formundadır. Sucul solüsyonları ise tuzlar halindedir. Emülsiyonlaştırılabilir derişikler ve ıslatabilen tuzlardır. En geniş ürünleri olan aminler, dimetil tuzlarıdır (Hayes ve Laws 1991).

2,4-D, süpürge darısında, mısırdada, otlaklarda, pirinçte, şeker kamışında, ormanlarda, meralarda, çayırlarda, çalılıklarda, yıllık ve çok yıllık geniş yapraklı yabancı otların kontrolünde yüksek dozlarda herbisit olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bond vd 1988, Lawruk vd 1994). Düşük dozlarda da erken büyüme yi kolaylaştıran bir hormon olarak kullanılmaktadır.

2,4-D, bitkilere kök ve yaprakları sayesinde alınmaktadır ve bunu takiben floem sayesinde yukarılara taşınmaktadır. Uzun süre, 2-4 hafta kadar bozulmadan suda, toprakta, sebze ve

meyveler üzerinde kalmaktadır. Besin zinciri ile de insana kadar ulaşmaktadır. Aynı zamanda, yer altı sularına karışma potansiyelinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı da çevre kirliliğine de neden olmaktadır (Göze vd 1995).

2,4-D'nin uygulandığı bitkilerin anatomileri, morfolojileri ve fizyolojileri üzerine olumsuz etkileri olduğu birçok araştırmada rapor edilmiştir (Deambrogio ve Dale 1980, Ozias-Akins ve Vasil 1988). Bitki hücrelerinde, *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda 2,4-D, mitotik ve mayotik düzensizliklere neden olmaktadır (Bayliss 1973, Bayliss 1977, Khalatkar ve Bhargava 1982). Bitki doku kültüründe, 5 mg/l 2,4-D konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonların bitkiye uygulanması sonucunda, kromozomal mutasyonlar ve kromozomal sapmaların oluşabildiği belirtilmiştir (Bayliss 1980).

Aynı zamanda, 2,4-D gibi pestisitler, güçlü immunotoksik etki göstermektedir. Söz konusu maddeler otoimmün reaksiyon riskini artırarak allerjik reaksiyonlarda artışa neden olmaktadır. Bahsedilen etkilerin dışında, pestisitlerin teratojenik etkilere sahip oldukları da bilinmektedir. Teratojenik etkinin oluşmasında doz ve stresin varlığı önemli etkindir. Teratojenik etkiye sahip pestisitler arasında 2,4-D ve 2,4,5-T herbisitler verilebilir.

2,4-D oksini; 2,4-D/2-Oksoglutarat dioksigenaz ile katalizlenerek, 2,4-Diklorofenol (DCP)'e dönüşmektedir. Hayvanlarda ve insanlarda DCP, deri iltihaplanmalarına, karaciğer hasarlarına ve yüksek dozlarda ise ölüme neden olmaktadır. Söz konusu nedenlerden dolayı çok tehlikeli bir kimyasal olan DCP, Avrupa Birliği Kara Listesinde yer almaktadır (Jensen 1996, Laurent vd 2006).

Bitki hücre ve doku kültürü çalışmaları *in vitro* koşullarda gerçekleştirildiği için, rejenerasyonun yapıldığı fiziksel ortam koşullarından veya ortamda kullanılan kimyasal maddelerden kaynaklanan gen seviyesinde birtakım farklılıkların meydana gelmesi olasıdır. Bu değişikliklere kromozomal sapmalar (somaklonal varyasyon) denmektedir (Ahloowalia 1982, Lee ve Philips 1988, Bai ve Knott 1993).

Söz konusu değişiklikler, doku kültürü çalışmalarının her safhasında meydana gelebilir. Kromozomal sapmalar, doğal olarak da meydana gelebilmektedir. Aynı zamanda bitkinin genotipi, ortam komponentleri, kullanılan doku kültürü yöntemleri, X ray ışınları (Stadler 1928, Mottinger 1970), UV (Faberge 1951) ve kimyasal işlemler (Faberge 1955) gibi birçok

etken, somaklonal varyasyonların nedenleri olabilmektedir (George ve Sherrington 1984, Karp 1989). Kromozomal sapmalar, çoğu zaman sitolojik tekniklerle ortaya çıkarılmaktadır. Örneğin, ezilmiş kök ucu kromozomlarının boyama yöntemiyle incelenmesi sonucunda, kromozomal sapmalar ve yapısal değişiklikler belirlenebilmektedir.

Dolezel vd (1987), May ve Sink (1995) ile Rakoczy-Trojanowska (2002) tarafından yapılan çalışmalarda da, somaklonal varyasyona neden olan önemli faktörlerden birinin, kallus oluşumunda kullanılan, yapay bir oksin türevidir ve aynı zamanda herbisit olarak bilinen 2,4-D hormonu olduğu belirtilmiştir.

Bitki ve hayvanların *in vitro* sistemlerinde hücre döngüsü esnasında, seyrek olarak gözlenen kromozom sayısı ve yapısındaki değişimlere “kromozomal mutasyon” denmektedir (D’Amato 1978, Bayliss 1980, Constantin 1981, Papes vd 1983). Kendiliğinden veya çevresel mutajenler nedeniyle meydana gelen kromozom mutasyonları; kromatid ve kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozomu, kardeş kromatidlerin birleşmesi, translokasyon, inversiyon, izokromozom, homolog kromozomlar arasında kromatidler arası değişim ve endoreduplikasyon şeklinde gözlenmektedir. Kallus veya hücre süspansiyonundan rejenere edilmiş bitkilerde, genetik ve fenotipik değişiklik (Larkin ve Scowcroft 1981), kromozom yapı değişikliği ve ayrıca poliploidi ve anöploidi (Bennici ve D’Amato 1978, D’Amato 1978) gözlenebilmektedir.

En büyük kromozomal sapmalardan biri trizomlardır. Trizomlar, birincil, sekonder (izokromozomlar), telotrizom ve tertiary (dördüncül) trizomları içermektedir (Yu vd 2006). Mısırdaki her kromozom için birincil trizomlar karakterize edilmiştir (McClintock ve Hill 1931, Emerson vd 1935). Yine, mısırdaki yapılan çalışmalarla, 4S (Schneerman vd 1998), 5S (Rhoades 1950), 6S (Maguire 1962) ve 7L (Muzumdar vd 1997) için izokromozomlar bulunmuş ve telotrizomlar ve tertiary trizomlar belirlenmiştir (Doyle 1988, Auger ve Birchler 2002).

Somaklonal varyasyonların belirlenmesinde RAPD yöntemi, pratik, radyoaktif madde kullanılmadığı için güvenli ve sağlıklı sonuçlar vermektedir. Somaklonal varyasyonların bulunmasında ne kadar çok primer kullanılırsa, o kadar sağlıklı sonuç elde edilebilmektedir. Genetik materyal denildiğinde ilk olarak kromozom terimi akla gelmektedir. Kalıtsal karakterlerin açıklanmasında veya bir sonraki generasyona aktarılmasında kromozomlar

görev almaktadır. Kromozomlar, ilk kez hücre bölünmesi araştırmaları sırasında 1880'li yıllarda keşfedilmiştir. Sonraki yıllarda, bazik boyalarla çok fazla boyanma kabiliyetinde olan bu iplikçiklere renkli cisim anlamına gelen *kromozom* adı verilmiştir.

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 bölünmesini *metafaz* ve *anafaz* safhalarında görölürler (Temizkan vd 1994).

Mısır genomunun yapısı ve fonksiyonu ile ilgili sitolojik olarak yapılan araştırmalar, 70 yılı aşkın bir süredir devam etmektedir (Arnason 1936, Carlson 1988). Emerson vd (1935) tarafından, 62 lokus içeren ilk mısır genetik haritası hazırlanmıştır (Davis vd 1999).

Her canlı türünün kromozom sayısı, şekli ve yapısı kendine özđü ve sabittir. 20 kromozomdan ($2n=2x=20$) oluşan mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin, kromozom boylarında oldukça büyük farklılıklar söz konusudur. Mısır kromozomlarının herbiri ayrı ayrı, relatif uzunluk (8-10 μ m), sentromer pozisyonu, satelit ve kromozomal yumrularının (knob) sayısı ve pozisyonu gibi yapısal karakteristikleri açısından, morfolojik olarak belirlenebilmektedir (Lee vd 2002).

Mısırın mitotik ve mayotik kromozomlarının mikroskopik analizi, transpozonların, telomerazların ve rekombinasyonların biyolojisi gibi, önemli konuların aydınlanmasında etkilidir (McClintock 1941). Mitoz bölünme, bitkilerde meristematik dokularda incelenebilmektedir. Bitkilerdeki meristematik dokular, bitkinin tüm yaşamı boyunca bölünebilme yetisine sahiptir. Meristematik dokular, kök ucu ve gövde sürgünlerinde bulunmaktadır.

Bitkilerde mitoz bölünme incelemeleri için, en çok kök ucundan, genç yapraklardan ve küçük iek tomurcuklarının petal yapraklarından yararlanılmaktadır. Kromozom sayımı yapabilmek için kullanılan materyalde, mitotik indeks yüksek olmalıdır yani bölünmekte olan hücrelerin oranı yüksek olmalıdır. Bazı bitkilerde mitozun periyodik değişim gösterdiği, yani günün belirli saatlerinde mitotik indeksin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kromozom hatalarının indüksiyonunu çalışmada kullanılan en eski, en basit

ve en ucuz yöntem, bitki kök uçlarının kullanılması olmuştur. Kök ucu tekniği, özellikle hatalara neden olan kimyasalların çalışılması için uygun ve güvenilirdir (Kihlman 1975).

Tarımsal ürünlerin korunması için kullanılan pestisit, insektisit, fungusit ve herbisitlerin uzun veya kısa vadede çevreye ve diğer canlılara verdiği zarar hala tartışılmaktadır. Fakat mantar, böcek, bakteri, virüs gibi canlılar tarafından meydana gelen hastalıklar da önemli ürün kaybına neden olmaktadır. 2,4-D gibi pestisitlerin kullanımı her ne kadar ürün miktarını artırsa da, daha önceden de değinildiği gibi, bu kimyasal maddelerin kalıntılarına, bitkilerden insanlara kadar doğada rastlanması mümkündür.

Herbisitlerin olumsuz etkisi ise, tohumların dölden dölle saf olarak aktarılamamasıdır. Herbisit uygulaması sonucunda yabancı otların dayanıklılık kazanarak genetik bütünlüğünün bozulduğu ve bu nedenle saf tohum elde edilemediği belirtilmiştir. Herbisit konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak da mitoz döneminde bulunan hücrelerin etkilendiği bilinmektedir (Seğmen 1977).

Bu nedenle pestisit, insektisit, fungusit ve herbisit kullanımları yerine, yeni yöntemlerin geliştirilmesi için çalışmalar sürdürülmektedir. Pestisit kullanımına alternatif olarak ortaya çıkan biyolojik mücadele günümüzde daha fazla önem kazanmıştır. Örneğin *Bacillus thuringiensis* (Bt) sporlarının biyolojik mücadelede kullanımı çok yaygındır.

Fakat günümüzdeki biyoteknolojideki gelişmeler sayesinde, böceklere ve çeşitli hastalıklara dayanıklı transgenik bitkiler üretilmiştir. Böceklere dayanıklılığın artırılması da, genelde Bt'den elde edilen endotoksinlerin bitkilerde sentetik genlerle sentezlenmesi temeline dayanmaktadır. Bir gram pozitif bakteri olan Bt'nin böcek öldürücü etkisinin, içinde bulunan kristal proteinlerden kaynaklandığı ortaya çıkarılmış ve bu proteini kodlayan genin izolasyonundan sonra bitkilere aktarımıyla çeşitli patojenlere dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmiştir (Stewart vd 1996).

Ancak, transgenik bitki üretiminin yararları beraberinde bazı sorunları da getirmektedir. Nitekim, yabancı genlerin diğer bitki türlerine geçmesi, herbisitlere dayanıklı yabancı otların gelişimi, monokültürlerin artması, üretici haklarının ihlal edilmesi ve ülke ekonomisi üzerine etkileri gibi konular sorun oluşturmaktadır.

Birçok ÷lkede transgenik bitki ekimine karşı çıkılmasına ve transgenik bitkilerin çeşitli olumsuz etkilerine rağmen, transgenik bitki ekimi oldukça fazladır. rnek olarak, transgenik bitki ekimi ilk ekildikleri 1996 yılından günümüze kadar geçen zamanda büyük artış göstererek, ~125 milyon hektara ulaşmıştır. Transgenik mısır ekimi ise 37.3 milyon hektardır (Anonim 2009b).

Bakteriyel genlerin kullanıldığı transgenik bitki üretimi çalışmalarının, uygun bitkisel kökenli genlerle yapılması halinde daha da yaygınlaşacağına kesin gözüyle bakılmaktadır (James 2006).

Bu tez çalışmasının temel amacı, ileride Türkiye’de de yapılabilir olacak olan transgenik mısır elde etme çalışmalarında kullanılabilir olacak, en yüksek kallus oluşturma oranını sağlayan, buna karşın kromozomal sapmalar oluşturmayan 2,4-D dozlarının belirlenmesidir. Bu nedenle, Türkiye’de yaygın olarak ekimi yapılan farklı kökenli mısır çeşitlerine, değişik 2,4-D dozları uygulanarak, en etkili fakat kromozomal yapı açısından en zararsız kallus oluşturma protokolü belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu bölümde, öncelikle “Bitkilerde 2,4-D ile ilgili yapılan doku kültürü çalışmaları ve gözlenen kromozomal değişimler” ile “Hayvanlarda ve insanlarda 2,4-D ile ilgili yapılan çalışmalar ve gözlenen kromozomal değişimler” tarih sırasına göre özetlenmiştir.

2.1. Bitkilerde 2,4-D ile ilgili yapılan doku kültürü çalışmaları ve gözlenen kromozomal değişimler

Unrau ve Larter (1952) ve Unrau (1954) tarafından yapılan çalışmalarda, 2,4-D herbisitinin arpa ve buğdayın mayotik hücrelerinde kromozomal anormallikleri artırıcı etkiye sahip olduğu, erkencilik ve boylanma üzerinde kalıtsal değişiklikler oluşturduğu belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar bu çalışmalarında, pentaklorofenol ve 2,4-D herbisitlerinin hücre bölünmesini azalttığını bulmuşlardır.

Crocker (1953)'ün belli dozlarda 2,4-D'yi *Allium cepa*'ya uygulaması ile ilgili çalışmada, 2,4-D dozunun artırılmasıyla, kromozomlarda kromatin köprüleri, kromatit parçaları, parçalanmış, halka veya geri kalmış (laggard) kromozom oluşumu, kromozomlarda yapışıklık bulunmuştur.

Kar (1975) tarafından, *Pisum sativum* bitkisine 2,4-D herbisitinin uygulanması sonucunda, tetraploidi ve daha yüksek seviyelerde poliploidi rapor edilmiştir. Ayrıca, 2,4-D'nin kromatin ve kromozomların parçalanmasına ve erezyonuna (aşınmasına) neden olduğu (Mohandas ve Grant 1972), poliploidi ve anöploidi gibi oluşumlara neden olarak kromozomal hata frekansını artırdığı (Deambrogio ve Dale 1980, Fiskeşjö vd 1981) bilinmektedir.

Schaeffer vd (1979), Kitt, Coker 75-6, Boart, GWO 1809, Arthur 71, Staddard, Olaf ve Centurk buğday çeşitlerinin olgunlaşmış embriyolarını üç ortamda kültüre almışlar ve kallus oluşumunu gözlemişlerdir. Denemede kullandıkları ortamlar, 0.5 mg/l NAA, 1 mg/l 2,4-D, 2 mg/l kinetin, 50 ml Hindistan cevizi sütü, 250 mg maya ekstraktı ve inorganik tuzlar içeren Bloydes ortamı, 0.1 mg/l sitokin, 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA ve 146 mg/l glutamin ilavesi yapılmış olan MS ortamı ile 5 mg/l IAA, 0.1 mg/l kinetin, 1 mg/l NAA ve

146 mg/l glutamin ilavesi yapılmış MS ortamlarıdır. Bu ortamlardan sadece, 0.1 mg/l sitokin, 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA ve 146 mg/l glutamin ilavesi yapılmış MS (1962) ortamının birçok çeşit için uygun olduğu belirlenmiştir. Yüksek kallus oluşum oranı ve farklılaşma kapasitesi açısından Kitt buğday çeşidinin, embriyo kültürü çalışmalarında en iyi sonucu verdiği belirtilmiştir.

Shimada ve Yamada (1979) tarafından Chinese Spring ve Salmon buğday çeşitleri embriyolarının 2 mg/l 2,4-D içeren RM-64 basal ortamda kültüre alındığı bir çalışmada, araştırmacılar 14. gün sonunda embriyoların yeşil noktalar ürettiğini bulmuşlardır. Buğday embriyolarında 8 ay süre ile yapılan doku kültürü çalışmalarında en uygun ortamın 2 mg/l 2,4-D olduğunu bildirmişlerdir.

Sears ve Deckard (1982), 29 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından embriyogenik kallus oluşumunu ve kallusların rejenerasyon kabiliyetlerini araştırmışlardır. Ele alınan buğday çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyolarını 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 desteklenmiştir. Kalluslardan rejenere edilen bitkiler MS ortamı üzerinde kültüre alınarak rejenerasyon işlemi tamamlanmıştır. Yapılan bu çalışmada 18 buğday genotipi 4 kez alt kültüre alındıktan yaklaşık 90-125 gün sonra 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 embriyolardan stabil bir şekilde embriyogenik kalluslar elde edilebileceği belirlenmiştir.

Ozias-Akins ve Vasil (1983), buğdayda 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 belirlemişlerdir. Aynı zamanda, 2,4-D'nin 2 mg/l ve daha yüksek miktarlarında kallusların düzensiz büyüdüklarını ancak bunun yanı sıra hücre bölünmesinin arttığını bildirmişlerdir. Kallus oluşumu ve gelişimi için 2 mg/l 2,4-D miktarının optimum olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca sitolojik deneylerle, aseto-karmin boyama yöntemi kullanılarak yapılan preparatlarla, kromozom sayısında değişme olmadığı belirlenmiştir.

Zhou ve Lee (1983), Chinese spring ve Frederick buğday çeşitlerinde 2,4-D ve diğer 12 oksin tipinin olgun embriyodan kallus oluşum oranına etkisini araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda, kallus oluşum oranının ve uygun oksin tipinin çeşitlere göre değiştiği belirlenmiştir.

Bajaj (1984), buğday ve çeltiğin anter ve olgunlaşmamış embriyolarını 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.

Lu vd (1984)'nin çavdarda yaptıkları doku kültürü çalışmasında, 2,4-D ve sakkarozun çeşitli konsantrasyonları ile hazırlanan MS ortamında çavdarın olgunlaşmamış embriyolarını kültüre almışlardır. En iyi sonuç 2.5 mg/l'lık 2,4-D uygulamasında elde edilmiştir. Fenoksiasetik asit, 2,4-D, 2,4,5-T ve MCPA (2-methyl-4-klorophenoksiasetik asit)'nin, embriyonik kallus başlatmada ve embriyo oluşumunda NAA, IAA ve IPA gibi oksinlerden daha etkili olduğu kaydedilmiştir. Embriyoların skutellumları yukarı gelecek şekilde kültüre alındıklarında, daha fazla embriyogenik kallus oluşturmuştur. Ayrıca embriyoların, sitokin ve GA3 içeren ortama aktarıldığında filizlendiği gözlemlenmiştir.

Tanner ve Scott (1986), buğdayın olgunlaşmamış embriyolarının epiblastlarından embriyogenik kallus oluşumunu etkileyen faktörleri inceledikleri çalışmada, embriyolar MS ortamında skutellumları yukarı gelecek şekilde ortama yerleştirmişlerdir. Epiblastlardan kallus oluşumunun genotip, embriyonun gelişim devresi ve 2,4-D konsantrasyonu tarafından etkilendiği, embriyogenik kallus oluşturan embriyo sayısının genotiplere göre %10-72 arasında değiştiği belirlenmiştir. Embriyogenik kallus oluşumu için 2,4-D'nin 1µM'dan daha yüksek seviyede olması gerektiği belirlenmiştir.

Chawla ve Wenzel (1987), arpada sürgün rejenerasyonunun hormonsuz ortamda ya da 2,4-D'nin düşük konsantrasyonlarında, IAA ve BAP içeren ortamlardan daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Papenfus ve Carman (1987), olgunlaşmamış buğday embriyolarının, 2,4-D ve dikamba ilavesi yapılmış MS ortamında, kallus oluşumu, çimlenme ve sürgün oluşturma durumlarını gözleme amacıyla bir çalışma yapmışlardır. 14 ile 24 günlük embriyoların 2 mg/l dikamba içeren MS ortamında, 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamına göre daha fazla kallus oluşturduğunu bulmuşlardır.

Wang (1987)'in üç mısır hattı (A632, B73, Mol17) kullandığı çalışmada, olgunlaşmış mısır embriyosunda kallus oluşumu belirlenmiştir. Kallus oluşumu için 1 mg/l 2,4-D; 2mg/l 2,4-D; 1mg/l 2,4-D, 10 µM IAA ve 10 µM Ze; 1mg/l 2,4-D, 10 µM IAA ve 10 µM Ze içeren MS ortamları kullanılmıştır. Kallus için MS ortamında ayrıca, 2 mg/l dikamba, 25 mM prolin ve 100 mg/l kasein hidrolizat kullanılmıştır. Kallus ortamında 2 hafta süresince karanlıkta, 26°C'de bekletilen örnekler, hormonsuz MS ortamına aktarılmış ve 8-10 cm bitkicik haline gelince rejenerasyonları tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kallus oluşumu %23 (B73) ile %100 (Mol17) arasında gözlenmiştir. 2 mg/l 2,4-D büyüme hormonu kullanılan örneklerde, kallus gelişimi en yüksek oranda bulunmuştur. 1 mg/l 2,4-D uygulanan mısır örnekleri ile 2 mg/l 2,4-D ile uygulanan mısır örneklerinden elde edilen sonuçların birbirlerine yakın olduğu belirlenmiştir.

Tuberosa vd (1988), 8 ekmeklik buğdayda 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 yerleştirildiği zaman çimlendikleri görülmüştür. Araştırmacılar, kallus oluşumunun 10-14. günde başladığını, çimlenme durumunda ise 3-4 gün içerisinde koleoptilin çıktığını gözlemişlerdir.

Kim ve 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 belirlenmiştir. Embriyogenik kallusların 10 mg/l gümüş nitrat (AgNO₃) içeren hormonsuz MS ortamına transfer edildiklerinde, somatik embriyo ve sürgün oluşumunun gerçekleştiği bildirilmiştir.

LoSchiavo vd (1989) tarafından bitkilerde yapılan çalışmalar sonucunda, 2,4-D hormonunun yüksek miktarlarda uygulanmasına bağlı olarak, sitozin metilasyonunun çarpıcı bir şekilde artığı belirlenmiştir. 0.5-2 µg/ml konsantrasyonlarında uygulanan 2,4-D hormonunun etkisiyle, 5-metilsitozin varlığında sadece 5 gün içerisinde %16-40 oranları arasında azalma gözlenmiştir.

Bannikova ve Barabanova (1990)'nın *in vitro* koşullarda kültüre alınan kışlık buğdayın olgun embriyolarının histolojik karakterlerini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, kültüre alınan olgun embriyolarda bazı değişikliklerin meydana geldiği, materyalin kültüre alımından 2 gün sonra, skutellum bölgesinde mitotik bölünmelerin başladığı ancak somatik embriyoların oluşmadığı, bunun yanında bazı koleoptillerin ve ikincil köklerin oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca olgun embriyolardan elde edilen kallusların bitki rejenerasyon yeteneğinin çok düşük olduğu bulunmuştur.

Redway vd (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 oluşumu 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. 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 kalluslardan 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. Kallusların, yaklaşık beş ay kadar alt kültüre alındıktan sonra, rejenerasyon kapasitesini kaybettiği gözlenmiştir.

Vasi vd (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 hormon konsantrasyonları ve kombinasyonları 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.

Pavlica vd (1991), *Allium ascalonicum* L.'ye farklı dozlarda 2,4-D kimyasalı uygulamışlardır. Uygulama sonucunda, 2,4-D'nin mutajenik etkili olduğu, güçlü bir sitotoksik olduğu belirlenirken, aynı zamanda laggard kromozomu ile köprü oluşumu da gözlenmiştir.

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

Roy vd (1992), adi mürdümük (*Lathyrus sativus*) kök eksplantlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında, kallus ve sürgün gelişiminin sadece 10.7 µM NAA ve kallus aşamasında kinetinin artırılan konsantrasyonlarının (14 gün 0.9 µM ve 18 gün 1.4 µM) bulunduğu MS besi ortamında elde edilebildiğini, oluşan sürgünlerin 0.5 µM IBA ilave edilmiş ½ MS ortamında köklendirildiklerini ve sürgün eldesinin yıl boyu devam ettiğini, ancak rejenerasyonu sağlayan bitki büyüme düzenleyicilerinin çok spesifik ve sınırlı olduğunu bildirmişlerdir.

Rakoczy-Trojanowska ve Malepszy (1995), çavdarda kendilenmiş hatların olgunlaşmamış embriyolarını 3 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Araştırmacılar, F1, F2 ve F3 generasyonlarında analizler yapmışlar, embriyogenik kallus üretenlerde rejenerasyonun resesi genler tarafından kontrol edildiğini, buna karşın embriyogenik kallus üretmeyenlerin dominant genler tarafından idare edildiğini ve hiç yanıt vermeyenlerin en az iki genin etkileşimiyle kontrol edildiğini bildirmişlerdir.

Bommineni ve Jauhar (1996), makarnalık buğdayın 4 çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından skutellumları olarak rejenerasyon çalışması yapmışlardır. Kallus

başlangıcı olarak sakkarozun farklı iki seviyesi ve üç değişik katılaştırıcı kullanmışlardır. Tüm çeşitler, 2 mg/l 2,4-D, % 3 sakkaroz ve % 0.8 agar içeren ortamda kültürün 2-3. gününde kallus oluşturmuştur. Araştırmacılar tarafından embriyogenik kallusların 3-4 hafta içerisinde somatik embriyo oluşturduğu, hormonsuz ortama aktarıldıktan sonra ise rejenerasyon görüldüğü bildirilmiştir.

Fennel vd (1996), 48 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını 3 farklı ortamda kültüre alarak embriyogenesis oranını araştırmışlardır. Denemede olgunlaşmamış embriyolar N6, dikamba (E1), MS, 2,4-D (E3) ve MS, 2,4-D ve 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 olarak gözlenmiş, yedi hatta ise bu oran %15 olarak belirlenmiştir.

Romagnoli vd (1996), Pampenea isimli bir yonca çeşidinden elde edilen R11 genotipinde yaprak segmentlerini 6 farklı ortamda kültür ettiklerini, somatik embriyo üretimi açısından en iyi uygulamanın, eksplantların 10µM 2,4-D ve 4,6 µM kinetin ilave edilmiş MS besi ortamında kültür edilmeleri sonrasında 10-20 µM NH₄ ve 30 µM prolin içeren MS ortamına transfer etmek olduğunu, bu şekilde yaptıkları uygulama sonucunda petri başına 500'ün üzerinde somatik embriyo elde ettiklerini ve oluşan somatik embriyolardan MS veya ½ MS ortamında, donör bitkilerden farklılık göstermeyen rejeneratlar elde ettiklerini bildirmektedirler.

Viertel ve Hess (1996), Turbo ve Nandu yazlık buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinde 4 ve 10 günlük fide kök uçlarının eksplant olarak kullandıkları araştırmada, induksiyon ortamında 10 µM 2,4-D ve alt kültürde 5µM 2,4-D kullanmak suretiyle modifiye edilmiş L3 ortamında Turbo çeşidinin 4 günlük fidelerden alınan kök uçlarının %90'unda embriyogenik kallus oluştuğunu, en yüksek bitki rejenerasyonunun 2,4-D içermeyen fakat 2.22 µM BAP ve 0.27 µM NAA ilavesi ile modifiye edilmiş MS ortamında sağlandığını,

Turbo genotipinde bütün embriyogenik kallusların 4 günlük fidelerden sağlandığını ve bitki rejenerasyonunun sadece embriyogenesis yoluyla gerçekleştiğini, Nandu genotipinde de benzer sonuçlar alındığını belirlemişlerdir.

Özgen vd (1997), *in vitro* koşullarda yonca (*Medicago sativa* L.) çeşitlerinin hızlı çoğaltımı için yaptıkları çalışmada, Elçi ve Mesa-Sirsa yonca çeşitlerinde çimlendirme ile elde edilen fidelerden alınan sapçıklarda, *in vitro* koşullarda sürgün oluşumu sağladıklarını bildirmişlerdir. Sapçıkların farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS ortamında büyütüldüğü, sürgün sayısının, Elçi çeşidinde en fazla 2 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA, Mesa-Sirsa çeşidinde ise 1 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA içeren kültür ortamlarında olduğu belirtilmiştir. Her iki çeşitte de, ortalama sap uzunluğunun 2 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA içeren kültür ortamında önemli bir şekilde daha fazla elde edildiği, kültür ortamına ilave edilen IBA oranının artırılması ile köklenme miktarının % 80-90 oranına ulaştığı ve çeşitlerde farklı IBA konsantrasyonlarının her bir sürgünde oluşan kök sayısını önemli miktarda etkilediği fakat her bir sürgünde oluşan kök uzunluğunda IBA konsantrasyonlarının bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Bununla beraber, Elçi çeşidinin her bir kök uzunluğunun Mesa-Sirsa çeşidinden daha fazla bulunduğu ve kültür ortamında üretilen sürgünlerde somatik kromozom sayılarının değişmediği gözlenmiştir.

Ivanov vd (1998), 5 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyoları kullanılarak MS, 2 mg/l 2,4-D, 20 g/l sakaroz, 8 g/l agar, pH 5,8 ortamı üzerinde kültüre alarak embriyogenik kalluslar elde etmişlerdir. Daha sonra embriyogenik kalluslar bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmek için MS, 0,1 mg/IAA, 0,5 mg BAP, 20 g/l sakaroz, 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 sakaroz, 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. Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmada, R3 ve R4 generasyonlarını elde etmişlerdir.

Machii vd (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 oluşumu için MS + 2 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l absisik asit (ABA) + 500 mg/l L-glutamin + 100 mg/l

prolin + 100 mg/l kazein hidrolizat + 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/l BAP + 30 g/l sakaroz + 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 edilmesinin, buğday embriyolarının kalitesine ve canlılığına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Özgen vd (1998), 12 adet kışlık buğday (*T. aestivum* L. Cv. Gerek 79, Haymana 79, Bezostaja 1, Bolal 2973, Başak 95, Sadova 1, Tosun 21, Yayla 305, Yektay 06, Sivas 111/33, Kırac 66 ve T-115) genotipini irdelemişlerdir. Çalışmada, tohumlar 2 saat süre ile steril suda (33°C) beletilip şişirilmiştir. Kallus ortamı için, 8 mg/l 2,4-D, 20 g/l sakkaroz ve 4g/l agar kullanılmıştır. İnkübatörde 25±1°C sıcaklık ve karanlıkta 11 gün bekletilerek gelişmesi sağlanan kalluslar, bu süre sonunda hormonsuz ortamlara aktarılmış ve petriyer iklim odasında 3 hafta süre ile 25±1°C sıcaklık ve 16 saat ışık- 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında bekletilmiştir. 3 hafta sonunda 1-1.5 cm boyundaki kök uçları kesilerek, α-monobromonaftalinin sudaki doymuş eriyiğinde (6ml/l) 4 saat bekletilmiştir. Daha sonra tespit için glasiyal asetik asitte, yarım saat oda sıcaklığında tutulmuş ve 1 N HCl asitte 60°C'de 10 dakika süre ile hidroliz edilmiştir. Feulgen boya içerisinde bekletilen köklerin uç kısmının üzerine bir damla %45'lik asetik asitten damlatılarak preperat hazırlanmıştır. Mikroskopta buğday mitotik kromozom sayıları incelenmiştir. İncelenen 12 adet kışlık buğday çeşidinde, T-115 çeşidinin en yüksek kallus frekansına (%98.3) ve yine en yüksek rejenerasyon kapasitesine (%96.6) sahip olduğu gözlenmiştir. Yapılan sitolojik araştırmalar sonucunda ise, söz konusu buğday çeşitlerinin 2n=6x=42 somatik kromozoma sahip olduğu gözlenmiştir.

Barro vd (1999), 8 buğday çeşidinin ve 7 arpa çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını ve yapraklarını kullanarak somatik embriyogenesisi ve bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Buğday yaprakları ve olgunlaşmamış embriyolar 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l pikloram içeren MS ortamları üzerinde karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre pikloram içeren kallus ortamları üzerinde buğday yapraklarından somatik embriyo

gelişimi, pikloram 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.

Varshney vd (1999), ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyolarına farklı 2,4-D dozları (0.5, 2.5 ve 5 mg/l) uygulayarak MS ortamında kültüre almışlar ve rejenerasyon için optimum dozun 2,5 mg/l 2,4-D olduğunu bulmuşlardır.

Benkirane vd (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 μM) 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 μM 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 sitokinin içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Koleoptil segmentlerinden kallus oluşumunun ve bitki rejenerasyon oranının yaprak segmentlerine göre daha az olduğu bulunmuştur. Koleoptilin büyüklüğünün bitki rejenerasyonunda önemli olduğu bulunmuş 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 vd (2001), buğdayda olgunlaşmış embriyolardan bitki rejenerasyonu etmişlerdir. Olgunlaşmış steril edilen ezilmiş parçaların eksplant olarak kullanıldığı çalışmada, eksplantlar 10 μM 2,4-D içeren ortamda kültüre alınmış ve 24 saat içerisinde hücrelerde gelişim gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, eksplantlardan birçok embriyo elde edilmiştir. Kallus oluşum oranının ise %90 olduğu rapor edilmiştir.

Birsin vd (2001) tarafından on yulaf çeşidi/hattı (Ankara-76, Ankara-84, A-803, A-804, A-805, A-821, A-822, A-823, A-824 ve A-825) kullanılan çalışmada, olgun yulaf embriyosundan kallus oluşumu ve rejenerasyon yeteneğini belirlenmiştir. Kallus oluşumu

için büyüümü düzenleyici olarak 2 mg/l 2,4-D, 20 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ve 4.43 g/l MS içeren katı MS ortamı kullanılmıştır. Bitki rejenerasyonu içinde, 20 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ve 4.43 g/l MS içeren katı MS ortamı kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre, kallus oluşumu %50 (A-805) ile %95 (A-821) arasında, kallus ağırlığı 0.8 (A-805) ile 1.4 (A-821) arasında, rejenerasyon kapasitesi %69.3 ile %93 arasında, kültür etkisi %38.8 ile %80.0 arasında, bitki sayısı 1.5 ile 9.3 arasında gözlenmiştir. Kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin çeşit ve hatlara göre değiştiği, kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi arasında önemli bir ilişkinin olmadığı, rejenere bitki sayısının doğrudan kallus oluşumuna bağlı olduğu belirlenmiştir.

Gallego vd (2001), *Medicago arborea*'nın somatik embriyolarının verimli üretimi için kotiledon, hipokotil, petiol ve yaprak gibi eksplantlar kullanılarak etkili bir bitki rejenerasyon sistemi geliştirmişlerdir. Kullanılan en uygun somatik embriyogenesis kaynağının iki basamaklı bir protokol olduğu bulunmuştur. Eksplantlar 16 saat fotoperiyotta iki ay 9 µM kinetin ve 9 µM 2,4-D içeren MS ortamında inkübe edilmiş, bunu takiben 2.25 µM 2,4-D içeren kinetinsiz MS ortamına transfer edilmiştir. Kültürün ikinci basamağında oksin miktarını azaltmanın (2.25µM) ve sitokinin yerini değiştirmenin somatik embriyo üretiminin artırılmasında uygun olmadığı belirtilmiştir. En iyi eksplantın kotiledon ve petioller olduğu bulunmuştur. Somatik embriyolar 5µM indolbutirik asit içeren temel MS ortamında kültüre alındıkları zaman normal bitkicikler oluştuğunu, kültür ortamında thidiazuron kullanıldığı zaman somatik embriyo oluşmadığı belirlenmiştir. 2.25µM 2,4-D'nin konsantrasyonu azaltıldığında ve ortamdan BA uzaklaştırıldığında petiol eksplantı ve BA kullanıldığında kültürün ikinci aşamasında embriyogenesisin gerçekleştiği belirtilmiştir.

Gonzales vd (2001), 12 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından kallus oluşumunu ve kallus %'sini araştırmak için, elde ettikleri embriyoları 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 kalluslar 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 sakaroz + 2 mg/l NaCl içeren ortamlar üzerinde gözlenmiş ve bu ortamlar üzerinde elde edilen kalluslardan en fazla bitki rejenerasyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir.

He ve Lazzeri (2001), 4 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriolarını ve bitki parçalarını kullanarak *in vitro* koşullarda embriyogenesis sıklığını ve bitki rejenerasyon yeteneğini araştırmışlardır. Embriyogenesisin oluşumu için farklı konsantrasyonlarda pikloram ve 2,4-D denenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, olgunlaşmamış buğday embriolarında somatik embriyogenesis oluşumunun 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l pikloram içeren ortamlarda daha fazla olduğu bulunmuştur. Bitki rejenerasyonunun olgunlaşmamış embriolardan elde edilen kalluslardan, yeşil aksamdan elde edilen kalluslara göre çok daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Optimize edilen bu ortam üzerinde olgunlaşmamış embriolardan bitki rejenerasyon oranı %97-100 oranında gözlenirken (2 mg/l pikloram içeren ortam üzerinde) yeşil aksamdan bitki rejenerasyonunun ise %45-85 oranında olduğu (4 mg/l pikloram içeren ortam üzerinde) bulunmuştur. 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.

Popelka ve Altpeter (2001), kendilenmiş üç çavdar hattının olgunlaşmamış embriolarını MS ortamında karbonhidrat ve oksin kaynaklarının çeşitli konsantrasyonlarında kültüre almışlardır. Araştırmacılar kallus oluşumu üzerine karbonhidrat kaynaklarının etkili olmadığını, 2,4-D içeren ortamın dikamba ve pikloram içeren ortamdaki daha önemli olduğunu bildirmişlerdir. Eksplant kaynağı olarak endosperm destekli olgun embriyo kullanılması durumunda, kültürden önce yüksek dozda uygulanan 2,4-D gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin somaklonal varyasyona neden olduğu belirlenmiştir.

Vikrant ve Rashid (2001), tritcalenin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriolarını MS ve N6 ortamlarında 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarında (4.5, 9.0, 18.0 ve 22.5 µM) kültüre almışlardır. En yüksek kallus oluşumunun MS ortamında 9.0 µM 2,4-D dozunda, buna karşın N6 ortamında 18 µM 2,4-D dozunda meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Vikrant ve Rashid (2002), DT-46 tritikale çeşidinin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriolarından elde edilen kalluslardan somatik embriyogenesisin oluşumu 2,4-D konsantrasyonu içeren (9-25 µM) MS ortamı ve N6 ortamı üzerinde araştırmışlardır.

Yapılan çalışmalar sonucunda, olgunlaşmamış tritikale tanelerinden alınan embriyolardan embriyogenik kallus oluşumunun daha iyi olduğu gözlenmiştir. 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak segmentlerinden kallus oluşumu bulunamamış, aksine sürgün gelişimi gözlenmiştir. N6 ortamı üzerinde somatik embriyogenesis oluşumunun MS ortamına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. 2,4-D içermeyen MS ortam üzerinde embriyogenik tritikale kalluslarından bitki rejenerasyonu gerçekleşmiştir.

Ateeq vd (2002) ise pentaklorofenol, 2,4-D ve bütaklor pestisitlerinin *Allium cepa* kök ucu hücrelerine uygulanmasıyla yüksek oranda kalın kromozom bulmuşlardır. Benzer şekilde birçok çalışmada pestisitlerin *Allium cepa* kök uçlarına uygulanmasıyla kalın kromozomlara rastlanmıştır (Skorupska 1978, Chauhan ve Sundararaman 1990).

Mendoza ve Kaepler (2002), Bobwhite buğday çeşidinin olgun embriyolarında 4 oksin tipinin 2,4-D, dikamba, pikloram, ve 2-MCPP [2-(2-metil-4-klorofenoksil) propiyonik asit]'nin 4.5, 9.0 ve 18.0 µM miktarlarını ve şekerin (maltoz ve sakkaroz) farklı sterilizasyonlarının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Kallus oluşumu için 25±10°C'de 48 saat karanlıkta çimlendirilen tohumların embriyolarını kullanmışlardır. Kallus oluşum ortamında MS besinlerine ilave olarak 5 mg/l glutamin, 2 mg/l glisin, 1 mg/l miyo-inositol, 1mg/l kazein hidrolizat, 0.5 mg/l nikotinik asit, 0.5 mg/l pirodoksin ve 0,1 mg/l tiamin içeren ortam kullanmışlardır. Bitki rejenerasyonu ortamı olarak, yarı dozda MS inorganik tuzlarına ilave olarak kallus oluşumunda kullanılan benzer organik bileşikler kullanmışlardır. Bitki büyüme düzenleyicileri olarak ise, kallus oluşumunda kullanılan oksin tipine göre 0.1 mg/l oksin ve 0.5 mg/l BA kullanılmıştır. Çalışma sonucunda kallus oluşumuna oksin tipinin ve dozunun etkisinin çok önemli olduğu belirlenmiştir. 2-MCPP hariç diğer oksinlerde kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Pikloram ve dikamba konsantrasyonunun artması kallus taze ağırlığını artırmış, buna karşın 2,4-D konsantrasyonunun artması kallus taze ağırlığını azaltmıştır. Yine, aynı çalışmada en yüksek rejenerasyon oranı, 18 µM (Yaklaşık 4 mg/l) dikamba içeren ve filtre sterilizasyonu yapılan sakkaroz içeren ortamda gözlemlenmiştir.

Naqvi vd (2002), mısırdaki (*Z. mays var. EV-2097*) farklı dozlarda 2,4-D (1, 2 ve 3 mg/l) kullanmışlardır. İnkübatörde 25±3°C sıcaklıkta 4 hafta bekletilerek kallusların gelişmesi sağlanmıştır. 4 hafta sonunda hormonsuz ortamlara aktarılmış ve petriyeler iklim odasında 3 hafta süre ile 25±3°C sıcaklık ve 16 saat ışık-8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında

bekletilmiştir. Elde edilen verilere göre kallus oluşum frekansı, en fazla 2 mg/l 2,4-D (%47)'de, daha sonra sırasıyla 3 mg/l 2,4-D (%18) ve 1 mg/l 2,4-D (%16) dozlarında gözlenmiştir.

Gürcan (2003) tarafından armut (*Pyrus communis* L. Cu "Ankara"), ayva (*Cydonia oblonga* Mill. Cu "ekmek"), elma (*Malus x domestica* Barkh. Cv. "Gloster"), erik (*Prunus domestica* L. Cu "Stanley"), kayısı (*Prunus armeniaca* L.cu "Şekerpare"), vişne (*Prunus cerasus* L. Cu "Kütahya"), kiraz (*Prunus avium* L.cu "Dalbastı"), ceviz (*Juglans regia* L. "Kaman"), fındık (*Corylus avellana* L. Cu "Tombul") ve limon (*Citrus limon* L. Burm. Cu "Kara limon")'da dişi organ dokularından stigma, stil ve ovaryumdan somatik embriyo ve kallus oluşum oranları üzerine, 1, 3 ve 5 mg/l 2,4-D oksinin etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda erik dışındaki tüm türlerde özellikle 2,4-D uygulamalarında, kallus oluşumları meydana gelmiştir.

Marcinska vd (2003), buğday x mısır melezleme metodunda haploid embriyodan oluşan kalluslar ve bitki rejenerasyonu üzerinde 2,4-D ve dikamba oksinlerinin karşılaştırmalı etkilerini araştırmışlardır. Denemelerde 7 adet kışlık heksaploid buğday (*Triticum aestivum*) çeşidi (Almari, Zorza, Tercja, Wanda, Emika, Izolda ve Kaja) kullanılmıştır. Melezleme işlemlerinden sonra oluşan haploid embriyolar, kallus gelişimini desteklemek için 2 ya da 4 mg/l 2,4-D veya dikamba bulunan MS kültür ortamına aktarılmışlardır. Bütün buğday genotipleri mısır ile melezlemeden sonra haploid embriyo oluşturmuşlardır. En yüksek embriyo sayısı %30 ile Almari çeşidinden alınmıştır. Diğer çeşitlerde bu oran %7.2 ile %17.9 arasında değişmiştir. Farklı oksin çeşitleri kullanmak sonuçları etkilemiştir. Izolda çeşidinde dikamba ile yapılan uygulamalarda 2,4-D'ye göre iki kat daha fazla haploid embriyo elde edilmiştir. Kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu sağlama yüzdesi olarak da dikamba oksini, 2,4-D'ye göre daha yüksek sonuç vermiştir.

Przetakiewicz vd (2003) buğday, arpa ve tritikalede olgunlaşmamış embriyolarda doku kültürü çalışmışlardır. Olgunlaşmamış embriyolarda MS tuzları, B5 vitamini, %3 sakkaroz içeren besi ortamında üç farklı oksin tipinin (2,4-D, dikamba ve pikloram) 3 mg/l dozlarını ve kombinasyonlarını (1 mg/l pikloram ve 1 mg/l 2,4-D; 1.5 mg/l pikloram ve 1.5 mg/l dikamba; 1.5 mg/l pikloram ve 1.5 mg/l 2,4-D) kullanılarak, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda uygun oksin tipinin ve dozunun genotipe göre değiştiği bulunmuştur.

Zale vd (2004) yaptıkları çalışmada, *Triticum monococcum*, *Triticum tausschii* ve *Aegilops speltoides* bitkilerine ait 47 farklı buğday çeşidi ile ıslah hatlarında, olgunlaşmış embriyolardan kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesini incelemişlerdir. Zak (SWS), Scarlet (HRS), Tara (SWS), Jageer (HRW), UC 1036 (HRS) ve Kyle durum buğday genotiplerinde Fielder ve Bobwhite kültür çeşitlerine göre daha fazla kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu gözlenmiştir. Kallus oluşumu ile kültür arasında 0.42 ve kallus oluşumu ile rejenerasyon kapasitesi arasında 0.39 gibi ilişkiler bulunmuştur.

Birsin ve Özgen (2004), eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış buğday embriyosu, endosperm destekli olgun buğday embriyosu ve endospermden tamamen ayrılmış buğday embriyosunu kullanmışlardır. Endosperm destekli olgun embriyoyu 8 mg/l 2,4-D'de, endospermden tamamen ayrılmış olgun embriyoları ise 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. En yüksek bitki rejenerasyonunun endosperm destekli olgun embriyoda meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Fazalienasab vd (2004) tarafından buğday genotiplerinde ABA'nın farklı dozlarının olgun embriyo kültürüne etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, olgun embriyolar MS ortamında 10 mg/l 2,4-D'ye ilave edilerek 0, 2, 4, 6 ve 8 mg/l ABA ile 30 g/l sakkaroz içeren ortama yerleştirilmişlerdir. Kallus gelişmesi bakımından kültür çeşitleri arasında farklılıklar bulunduğu belirtilmiştir. Meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonu için 0.5 mg/l IAA ve 1 mg/l benzilaminopürin (BAP) içeren MS ortamına aktarılarak, ABA ilavesinin oksin aktivitesini azalttığı, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunu azaltıcı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Huang ve Wei (2004), Çin'de yetiştirilen 7 mısır hattında (*Zea mays* 9046, C8605, 478, 8112, Mol7, Qi319 ve Su1), kallus potansiyelinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi üzerine çalışmışlardır. Kallus oluşum ortamı hazırlanırken, N6 bazal tuzları, B5 vitaminleri, 2 mg/l glisin, 690 mg/l prolin, 1 g/l kasein hidrolizat, 30 g/l sakkaroz ve 8 g/l agar kullanılmıştır. Ayrıca, kallus gelişimindeki farklılıkları gözlemlemek amacıyla farklı dozlarda 2,4-D (0, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l) büyüme düzenleyicisi kullanılmıştır. 3 hafta boyunca 27°C'de karanlıkta bekletilen mısır embriyolarının, kallus oluşumu ve kallus ağırlığı parametreleri belirlenmiştir. Kallus oluşumu, %28.5 ile %97.6 arasında ve en yüksek kallus gelişimi, 9046 ve C8605 mısır hatlarında gözlenmiştir. Kallus oluşumu için optimal 2,4-D dozu 4 mg/l olarak belirlenmiştir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlardaki 2,4-D dozlarının (5 mg/l

2,4-D ve üstü), kallus oluşum sayısı ve kalitesini önemli ölçüde değiştirmeyeceği ve hatta yüksek konsantrasyonlardaki 2,4-D dozlarının somatik mutasyona neden olabileceği vurgulanmıştır.

Mohamed vd (2004), *Macrotyloma uniflorum* bitkisinin süspansiyon kültüründe somatik embriyogenesis vasıtasıyla bitkilerin *in vitro* rejenerasyonunu sağladıkları çalışmada, embriyogenik kallusların 9 µM 2,4-D içeren katı MS ortamında yaprak segmentlerinden meydana geldiğini ve bu embriyogenik kallusların 2,4-D içeren sıvı MS ortamına aktırıldıklarında somatik embriyoların farklılaştığını bildirmişlerdir. 7.9 µM 2,4-D eklenen MS ortamında somatik embriyoların maksimum frekansa (%33.2) ulaştıklarını gözlemişlerdir. Kotiledon-torpedo biçimli embriyoların çimlenme ve olgunlaşma için büyüme düzenleyicisi içermeyen sıvı MS ortamına aktarıldıkları ve bunların yaklaşık %5'inin çimlendiği, aynı zamanda katı MS ortamında daha fazla geliştikleri, ayrıca somatik embriyoların indüksiyonunda ve çimlenmesinde oksin, sitokin, karbonhidrat, aminoasit varyasyonlarının etkili olduğu, ortama eklenen 7.9 µM 2,4-D, % 3 sakkaroz, 4 mg/l glutamin ve 1µM absisik asitin yüksek frekansta somatik embriyo eldesinde ve aynı zamanda gelişimde etkili olduğu bildirilmiştir.

Pellegrineschi vd (2004), ekmeçlik ve makarnalık buğday çeşitlerinde farklı NaCl ve 2,4-D konsantrasyonlarını deneyerek kallus oluşumunu ve kallusdan bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip olan MPB-Bobwhite 26 ve Mexicali adlı buğday çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyoları aseptik koşullar altında çıkarılarak 2.5 mg/l 2,4-D, % 2 sakkaroz, % 0.9 bacto agar içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. 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 hormon 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 gözlenmiştir.

Zapata vd (2004), arpada olgun embriyo kültüründe MS, N6, SH ve J 25-8 ortamlarını kullanmışlardır. En fazla kallus oluşumu %75.5 ile 2 mg/l 2,4-D içeren J 25-8 ortamından elde edilirken, 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında bu değer %35'e düşmüştür.

Ahmet ve Adak (2007), Irak florasında genetik materyal olarak, yetiştiricilik açısından önem taşıyan 5 buğday çeşidinde (*T. aestivum* L. Irak, Temmuz 2, Eliz 66, İba 99 Müsseccel ve İba 99 Musaddak) kallus ve rejenere bitkicik potansiyelinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi üzerine çalışmışlardır. Kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D içeren katı MS ortamı ve bitki rejenerasyonu için 20 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ve 4.43 g/l MS içeren katı MS ortamı kullanılmıştır. Çalışmada, kallus oluşumu, kallus ağırlığı, rejenerasyon kapasitesi, kültür etkisi ve rejeneratif bitki sayısı parametreleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kallus oluşumu %88.75 (Eliz 66) ile %98.75 (İba 99 Musaddak) arasında, kallus ağırlığı 0.7025 g (Temmuz 2) ile 7.2179 g (Eliz 66) arasında, kültür etkisi %77.50 (Eliz 66) ile %97.50 (İba 99 Musaddak) arasında, rejenerasyon kapasitesi %86.75 (Eliz 66) ile %98.75 (İba 99 Musaddak) arasında, bitki sayısı ise 3.50 (İba 99 Musaddak) ile 16.26 (Temmuz 2) arasında belirlenmiştir. Kallus ağırlığının yüksek olması bitki sayısını artırmıştır. Artan kallus ağırlığı, rejenerasyon yeteneğinin yüksek olmasını sağlamıştır.

Birsin vd (2007), cin mısırın (*Zea mays everta* Sturt) bazı yerel ve ithal genotiplerini irdelemişlerdir. Çalışmada, farklı büyüme düzenleyicileri olarak 2,4-D, BAP ve TDZ kullanılmıştır. Tohumların 3 gün süre ile steril suda (33°C) bekletilerek şişmeleri sağlanmıştır. Kallus ortamı için, 4 mg/l 2,4-D, 30 g/l sakkaroz ve 6 g/l agar kullanılmıştır. İnkübatörde 25±1°C sıcaklık ve karanlıkta 2 hafta bekletilerek gelişmesi sağlanan kalluslar, bu süre sonunda 2mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l BAP, 2mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l TDZ ve 2mg/l 2,4-D içeren ortamlara 3 gruba ayrılarak aktarılmış ve iki hafta daha inkübatörde tutulmuştur. Bu aşama sonunda gelişen kalluslar sayılarak, ağırlıkları belirlenmiştir. Rejenerasyon için, 2 mg/l 2,4-D içeren ortamda geliştirilen kalluslar MS0 (2,4-D içermeyen) ortamına, 2,4-D ve 0.2 mg/l BAP ortamında gelişen kalluslar 0.5 ve 1 mg/l BAP ortamına ve 2 mg/l 2,4-D+0.2 mg/l TDZ ortamında gelişen kalluslar ise 0.5 ve 1 mg/l TDZ ortamına aktarılmıştır. Petriler iklim odasında 4 hafta süre ile 25±1°C sıcaklık ve 16 saat ışık-8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında bekletilmiştir. Rejenere kallus sayıları belirlenerek, rejenerasyon ve kültür kapasitesi değerleri hesaplanmıştır. İthal genotipte

rejenerasyon kapasitesi 1 mg/l BAP dozunda (%88.87) elde edilmiştir. Her iki genotipte de BAP dozları ve 0.5 mg/l TDZ'de yüksek rejenerasyon kapasitesi oluşurken, 1 mg/l TDZ'de rejenerasyon kapasitesi düşmüştür. Yerel çeşitte kallus ağırlığının 2 mg/l 2,4-D içeren petride en yüksek (2.47 g) olduğu gözlenmiştir. Araştırma sonucuna göre, cin mısırdada en yüksek bitki rejenerasyonu ise, 0.5 mg/l TDZ ve 1 mg/l BAP dozlarından elde edilmiştir.

2.2. Hayvanlarda ve insanlarda 2,4-D ile ilgili yapılan çalışmalar ve gözlenen kromozomal değişimler

Prescott vd (1979), insanlarda klorofenoksi asidin yüksek miktarlarda yutulması sonucunda, 2,4-D gibi klorofenoksi asitlerin metabolizmada asidosis (kanda asitlenme) oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bunun sonuçları olarak, elektrokardiyografide değişimler, miyotoni, kas zafiyeti, kaslara oksijen taşıyan eritrositlerin idrarda görülmesi, kan serumunda kreatin fosfokinaz yükselmesi, çizgili kas hareketlerinde hasarlar meydana gelmektedir. Aynı zamanda kusma, ishal, baş ağrısı, zihin karışıklığı gibi davranışlar da gözlenmektedir.

2,4-D'nin insanlarda eritrosit, lökosit ve kırmızı kemik iliği hücrelerinde sayı ve biçim değişikliğine, hemoglobinde ise miktar değişikliğine neden olması, Non-Hodgkin lenfomalara (Hardell 1981) ve yumuşak doku sarkomasına (Sarma ve Jacons 1982) neden olduğu belirlenmiştir.

Turkula ve Jalal (1985), 2,4-D'nin memelilerde yüksek dozlarda protein ve nükleik asit sentezini azalttığını ve memeli enzim faaliyetlerini engellediğini bildirmişlerdir.

Flanagan vd (1990), vücuttan 2,4-D atılımının tüm türlerde idrar yoluyla gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, 2,4-D'nin insan vücudundaki ortalama yarılanma süresinin 13-39 saat arasında olduğu belirlenmiştir. Çok yoğun 2,4-D zehirlenmelerinde bilinç kaybı yaşanabilmektedir. Klorofenoksi bileşiklerin özellikle de 2,4-D'nin, sistematik toksisite oluşturmasıyla ilgili başlıca belirtilerinin, iştah kaybı olduğu bildirilmiştir. Böbreklerde bozulma, asidite, elektrolit dengesizliği sonucunda oluşan organ bozuklukları gözlenmiştir. Bloemen vd (1993) ve Knopp (1994) tarafından yapılan çalışmalarda ise, 2,4-D'nin doğumsal anomalilere neden olabileceği belirtilmiştir.

Keller vd (1994) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda, bahsedilen etkilerin yanı sıra 2,4-D ile, böbreklerdeki bozulmalarda yüksek potasyum ve düşük kalsiyum gözlenmesi ile kardiyovasküler yetmezlik ve mortalite oluşumu rapor edilmiştir.

Wang vd (1994), 2,4-D'nin gastrointestinal bölge tarafından iyi bir şekilde absorbe edildiğini belirtmişlerdir. Bu bileşiklerin akciğerler tarafından absorblanmasının daha düşük seviyede olduğu ve deriden absorpsiyonunun ise minimum miktarlarda seyrettiği bildirilmiştir. 2,4-D'nin suda çözünürlük oranının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu yüzden vücutta dağılımının yüksek oranlarda gerçekleştiği düşünülmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde, TÜBİTAK ve Ankara Üniversitesi Rektörlüğü tarafından desteklenen TOGTAG/1285 sayılı proje ile kurulan Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Materyal olarak Türkiye'de halen yetiştirilmekte olan ve yaygın olarak ekimi yapılan, farklı kökenli 10 adet ticari mısır çeşidi kullanılmıştır. Aynı zamanda tüm mısır çeşitleri tescil edildikleri kurumlardan sağlanmıştır.

Çalışmada materyal olarak kullanılan mısır çeşitleri Pioneer 31N27, Pioneer 31P41, Pioneer 3223, Pioneer 34N24, ADA8924, DKC 6022, BC666, TECTOR, ADA523 ve HELEN'dir.

3.1.1. Kullanılan mısır çeşitlerine ait genel özellikler

Pioneer 31N27: Verim potansiyeli çok yüksek bir çeşittir. Geniş bir adaptasyon yeteneğine sahiptir. Değişik toprak koşullarına uyumu iyidir. Genellikle orta ve hafif bünyeli topraklara ekilmesi tavsiye edilmektedir. Sapı ve kök sistemi çok kuvvetlidir. Taneleri parlak ve çok kalitelidir. Cips sanayine uygun bir çeşittir. Yaprak hastalıklarına dayanıklıdır. Hasat rutubeti düşüktür. Makinalı hasata çok uygundur. Akdeniz, Ege, Marmara ve Adapazarı'nda 1. ürün ekimlerine tavsiye edilmektedir (Pioneer Tohumculuk Firması, Adana).

Pioneer 31P41: Çukurova, Ege, Adapazarı, Bursa yörelerinde ana ürün olarak tavsiye edilen çok yüksek verim potansiyeline sahip, etanol üretimine uygun yüksek verimi olan bir çeşittir. Birim alandan üretilen ürün açısından, yüksek miktarda etanol ekstrakt edebilme imkanı sağlamaktadır. Taneleri portakal renginde ve hektolitre ağırlığı çok yüksektir. Temiz, parlak ve camsı tane yapısı oluşturur. Çok güçlü sap yapısı ve kök sistemi mevcuttur. Bu nedenle yatmaya ve yıkılmaya çok dayanıklıdır. Değişik toprak yapılarına karşı uyum yeteneği yüksektir. Hem kumsal

hem malaz (ağır) bünyeli tarlalarda ekilebilmektedir. Kısa süreli stres koşullarına yüksek seviyede tolerans gösterme yeteneğindedir. Tane rutubetini kaybetme hızı yüksek, hasat rutubeti düşük ve yeşil kalma yeteneği yüksektir. Türkiye’de yaygın olarak görülen yaprak hastalıklarına karşı yüksek seviyede toleranslıdır. Makineli hasata uygun bir çeşittir (Pioneer Tohumculuk Firması, Adana).

Pioneer 3223: Pioneer Şirketinin geliştirdiği ana ürün çeşididir. Geniş adaptasyon kabiliyetine ve yüksek verim potansiyeline sahip, yaprak hastalıklarına ve راستا dayanıklı, sap ve kök sistemi çok kuvvetli, strese dayanıklı ve değişik toprak koşullarına uyumlu, hasat rutubeti düşük, hektolitreye ağırlığı yüksek, tane kalitesi çok iyi olan, makinalı hasata çok uygun olan ve ekim sıklığı dekara 7400-7700 olan bir çeşittir (Pioneer Tohumculuk Firması, Adana).

Pioneer 34N24: Silaj verim potansiyeli çok yüksek, orta erkenci bir çeşittir. Sapı ve kök sistemi çok kuvvetlidir. Değişik toprak koşullarına uyumu iyidir. Bitki yapısı gösterişli olup, tane ve yaprak kalitesi çok iyidir. Silajın hayvana daya faydalı olması için Pioneer Silaj İnokulant'ı (bakterisi) ile birlikte kullanılması tavsiye edilmektedir. Silajın hazım edilebilirlik derecesi, enerji ve protein oranı çok yüksektir. Akdeniz, Ege, Marmara Bölgelerinde ve Adapazarı Yöresinde silajlık olarak ekilmesi tavsiye edilmektedir (Pioneer Tohumculuk Firması, Adana).

ADA 8924: Geniş adaptasyon kabiliyetine sahip bir çeşittir. Yaprak hastalıklarına özellikle pasa dayanıklıdır. Tane kalitesi iyidir. Sıcak ve kurak koşullara dayanıklıdır. Geniş ve yayvan yapraklıdır. Makinalı hasata uygundur. Ekim sıklığı dekara 7000-7200 bitkidir. Ege ve Akdeniz Bölge’sine ana ürün olarak kullanılmaktadır (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tohumluk ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü, Ankara).

DKC 6022: Yeşil ot verimi ve kalitesi çok yüksek bir çeşittir. Bölgelere, ekim tarihine ve iklim koşulları göz önüne alınarak, silajlık olarak 90-100 günde hasat edilebilmektedir. Makinalı hasadı kolaydır. Silajının enerji, protein ve hazmolabilir ham protein değeri yüksektir. Tane koçan oranı yüksektir. Dekardaki bitki sayısı 6500–7000’dür. Sarı-portakal renkli olan tanelerin hektolitreye ağırlığı yüksektir. Bölgelere göre birinci ve ikinci ürün olarak ekilebilir. Tanelerin içerdiği yüksek protein oranı nedeniyle sanayiciler tarafından tercih edilen bir çeşittir (Monsanto Dekalb Firması, Sakarya).

BC 666: Adaptasyon kabiliyeti oldukça yüksek bir çeşittir. Kurak koşullara maksimum derece dayanıklıdır. Hastalıklara karşı dayanıklılığı yüksek derecededir. Koçan uçlarında boşluk oluşturmaz. Sarı renkli geniş koçan yapısına sahiptir. Hasatta rutubet oranı düşük olur. Olgunlaşma süresi 125-130 gündür. Dekara 7500-7800 arası bitki olmalıdır. Ortalama boyu 250-300 cm civarındadır. Slajlık kabiliyeti yüksektir. Karadeniz, Marmara ve Trakya'da ana ürün, Akdeniz ve Ege Bölgelerinde hem ana hem de 2. ürün ekimine uygundur (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tohumluk ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü, Ankara).

TECTOR: Hafif ve orta bünyeli, derin profili topraklarda performansı çok yüksek olan bir çeşittir. Güçlü ve sağlam sap yapılıdır Olgunlaşma süresi 120-125 gündür. Yarı dik yapraklıdır. İdeal ekim sıklığı 7500-7800 bitki/dekar'dır. Taneleri derin, kırmızı-turuncu renklidir. Sıcaklık ve susuzluk stresine toleranslıdır. Yatmaya karşı dayanıklıdır. Orta ve uzun boyludur (275 cm-300 cm). Adaptayon özelliği çok iyidir. Akdeniz, Ege, Marmara, Karadeniz, Kahramanmaraş, Gaziantep ve Adıyaman Bölge ekolojisinde ana ürün olarak ekilmesi tavsiye edilmektedir. Akdeniz ve Ege ekolojisinde erken ikinci ürün olarak ekilebilir (Sygenta Firması, Sakarya).

ADA 523: Verim potansiyeli yüksek olan bir çeşittir. Çok hızlı bir gelişimi vardır. Yaprak hastalıklarına dayanıklılığı iyidir. Güçlü sap ve kök sistemi vardır. Makinalı hasata uygundur. Rutubetini çok hızlı kaybeder. Dolayısıyla hasat rutubeti çok düşüktür. Ayrıca serin bölgelerde buğday ve patatesten sonra ekilebilir. Dik yapraklı olup, 2.üründe ekim sıklığı dekara 8000-8400 bitkidir (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tohumluk ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü, Ankara).

HELEN: Çukurova ve diğer bölgelerde birinci ürün olarak ekime uygun olan orta geçici bir çeşittir. Koyu sarı renkli taneye sahiptir. Olgunlaşma süresi 130-135 gündür. Sağlam gövdeli, yatmaya dayanıklıdır. Bitki yapısı uniformdur. Beyaz renkli koçanlıdır. Taze tüketime uygundur. Hastalıklara dayanıklıdır. Hasatta tane rutubeti düşüktür. Geniş adaptasyon kabiliyeti ile çok yüksek verime sahiptir. Özellikle 2002 ve 2003 yıllarındaki tescil denemelerinin yapıldığı Türkiye, İspanya ve İtalya'nın yanında son iki yıldır Avrupa'da ve Amerika'da en popüler mısır tohumluğu çeşididir. HELEN mısır çeşidi, İspanya'da tescil edildiği 2003 yılında birinci ve Andalusia Bölge'sindeki tescil denemelerinde de 2002 ve 2003 yıllarında

üst üste birinci olmuştur. Bu denemelerde diğer rakip çeşitlerden % 15 -20 fazla verim sağlamıştır (Limagrain Firması, Sakarya).

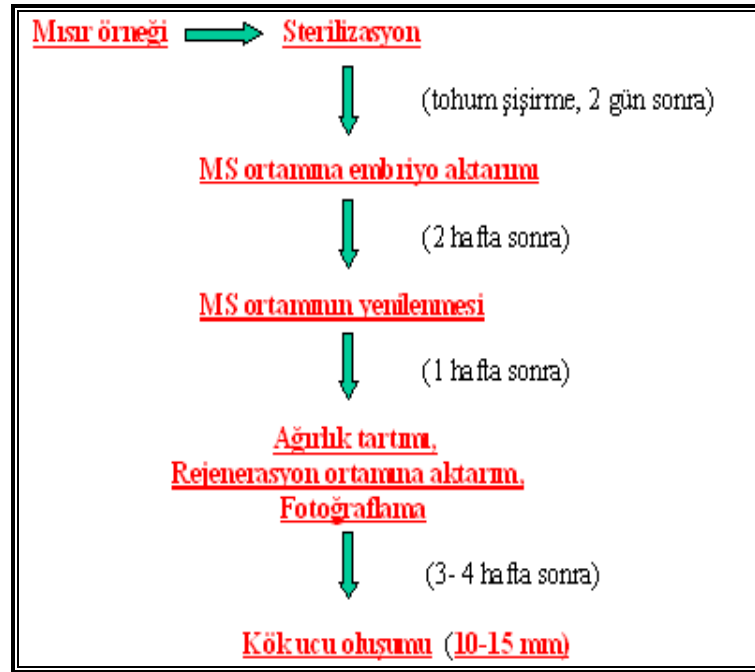
3.1.2. Çalışmada kullanılan deney ekipmanları

- a) Hassas Terazî: Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan hassas terazî kullanılmıştır.
- b) İnkübatör: Sıcaklık toleransı 100°C'ye kadar ayarlanan inkübatör kullanılmıştır. Ekimi yapılmış besiyerlerde kallus gelişimi için kullanılmıştır.
- c) Mikroskop: Olympus marka BX51/BX52 modeline sahip binoküler ışık mikroskobu kullanılmıştır. Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan x4, x10, x40, x100 büyütme gücüne sahip binoküler ışık mikroskobu preparatların incelenmesi aşamasında kullanılmıştır.
- ç) Buzdolabı: İç sıcaklığı +4-8°C arasında olan derin donduruculu buzdolabı kimyasalların saklanması için kullanılmıştır.
- d) Mikropipet: 20, 200 ve 1000 µl arası ayarlanabilen mikropipet ve buna uygun sarı ve mavi renkli steril pipet uçları kullanılmıştır.
- e) pH metre: Hazırlanacak solüsyonların pH'sını ölçmek ve ayarlamak amacıyla kullanılmıştır. Hassas ölçümler yapabilen laboratuvar tipi pH metre kullanılmıştır.
- f) Karıştırıcı (Vortex): Hızı manual olarak da ayarlanabilen masa tipi karıştırıcı kullanılmıştır. Vortex gerekli solüsyonların karıştırılması esnasında kullanılmıştır.
- g) Cam malzemeler: 25x60 mm'lik lam ve buna uygun ebatlarda lameller, 1 lt'lik erlen, 500 ml'lik erlen, 250 ml'lik erlen, 250 ml'lik beher, cam şale, cam huni ve falkon tüpleri kullanılmıştır.
- h) Steril kabin: Sürgülü cam kapaklı, U.V. lambalı ve hava filtresi olan steril kabin MS ortamlarının hazırlanmasında, ortamlara örnek yerleştirirken, ortam değiştirenken kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. *In vitro* yöntemler

Olgunlaşmış mısır embriyolarında kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve kök oluşumu aşamalarından oluşan *in vitro* çalışmalarında uygulanan yöntem Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil. 3.1. Mısır kallusundan kök oluşumu aşamaları.

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.

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 gevşetilmesinde kullanılan bistüri ucu gerekli görüldükçe özel koruması içindeki yeni steril uç (Surgeon, no 11) takılarak değiştirilmiştir.

Petri ve jarlar, kullanılmadan önce sterile edilmişlerdir. Petri ve jarlar steril edilirken, yanmaz kağıtlara sarılı olarak kuru sterilizatörde 180°C'de 2 saat bekletilmişlerdir. Daha sonrasında kağıtlara sarılı olarak, steril kabin içine konularak, kağıtlardan çıkarılıp kullanılmışlardır.

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 ilkesiyle çalışan distilasyon cihazı ile elde edilen distile su kullanılmaktadır.

Çalışmanın ortam hazırlama ve tohumların yüzey sterilizasyonu aşamalarında kullanılan distile su, otoklavda 121°C'de 15 psi basınç altında 25 dakika tutularak steril edilmiştir.

3.2.1.3. Besin ortamlarının hazırlanması

Çalışmada kallus oluşturma aşamasında MS, sakkaroz, NaCl, agar ve 2,4-D içeren katı besin ortamları, kallusların geliştirilmesi ve rejenere edilmesi aşamalarında ise MS, sakkaroz, NaCl, agar içeren katı besin ortamları kullanılmıştır.

Olgun embriyolardan kallus oluşumu ve gelişiminde Özgen vd (1998) tarafından yapılan çalışmadan yararlanılmıştır. Buna göre, yüzey sterilizasyonu uygulanan tohumlarda embriyolar bistüri ile skutellum yönünden kesilip, endospermle aralarında 45° açı olacak şekilde kaldırılarak tohum üzerinde bırakılmıştır. Endosperm-destekli yöntem olarak isimlendirilen bu yöntem ile kallus oluşumu aşamasında embriyonun gereksinim duyduğu besin maddelerini kendi endosperminden karşılaması sağlanmaktadır.

Kallusların gelişim ve rejenerasyon aşamaları için ise hazır MS (Murashige ve Skoog 1962) ile katı besin ortamları hazırlanmıştır. MS katı besin ortamında, Çizelge 3.1’de gösterilen inorganiklerden mikro ve makro elementler ve ayrıca bazı organikler mevcuttur.

Çizelge 3.1. MS Kültür ortamının kimyasal bileşimleri ve miktarları

Kullanılan Kimyasallar	Miktar (mg/l)
İNORGANİKLER	
Makro elementler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	332.2
MgSO ₄ .7H ₂ O	180.7
KH ₂ PO ₄	170
Mikro elementler	
Na ₂ EDTA	37.26
Fe ₂ (SO ₄).7H ₂ O	27.8
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
ORGANİKLER	
Glisin	2
Myo-inositol	100
Nikotinik asit	0.5
Pyridoksin HCl	0.5
Tiamin HCl	0.1

MS besin ortamı, Çizelge 3.1’de belirtilen organik, inorganik ve diğer maddelerden oluşan, bitkilere topraktan karşıladıkları her türlü besin maddesi ve su gereksinimlerini *in vitro* koşullarda sağlayan karışımdır.

Çalışmanın başlangıç aşaması olan kallus oluşumu için kullanılan MS ortamı, her 2,4-D dozu için ayrı ayrı hazırlanmıştır.

Bu doğrultuda, 1 litre 2,4-D’li MS ortamı hazırlamak için,

- 1000 ml’lik behere 500 ml distile su konulmuş ve içine uygun büyüklükte bir balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir.
- Behere, 4.43 g MS (Duchefa) ve 30 g sakkaroz (Sigma) eklenmiştir.
- Dozlara göre gerekli miktarda 2,4-D stok sıvı çözeltisinden (0 mg/l dozu için 2,4-D kullanılmamış, 2 mg/l dozu için 2 ml, 4 mg/l dozu için 4 ml, 6 mg/l dozu için 6 ml, 8 mg/l dozu için 8 ml, 10 mg/l dozu için 10 ml) tartılarak, manyetik karıştırıcı ile tamamen karışmaları sağlanmıştır.
- Hacim distile su ile 1000 ml’ye tamamlanmıştır.
- 1 N NaOH ile pH, bitki gelişimi için en uygun değer olan 5.8’e ayarlanmıştır. 2,4-D gibi sentetik oksinlerin doku kültüründe etkili olabilmesi için, ortam pH’sının 5.8’e ayarlanması gerekmektedir (George 2008).
- Ortamı katılaştırmak için 6 g agar tartılarak Duran şişesine konulmuş ve üzerine hazırlanan ortam eklenmiştir.
- Şişe kapağı sıkılanmadan otoklava yerleştirilmiş ve ortam steril edilmiştir.
- Daha sonra biraz soğutulularak steril kabindeki önceden steril edilmiş olan 10 cm’lik petri kaplarına, her birinde 30 ml olacak şekilde dökülmüştür.
- Ortamların yaklaşık yarım saat süre ile soğutulularak katılaşması sağlanmış ve petrilerin kapakları kapatılarak kenarları streç film ile kaplanmıştır.

Besin ortamlarının taze olarak kullanılması gerektiğinden her alt kültür öncesinde, yeni besin ortamları gerekli miktarda hazırlanarak kullanılmıştır.

3.2.1.4. Eksplantların yüzey sterilizasyonu

Eksplant olarak olgun embriyoların kullanıldığı çalışmada yüzey sterilizasyonu için,

- 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 birkaç damla Tween 20 içeren %5'lik (v/v) ticari sodyum hipoklorit (Ace, Colgate Palmolive Co.) solüsyonunda, manyetik karıştırıcı üzerinde (200 devir/dakika) 35 dakika çalkalanmıştır.
 - Tohumlar yedi kez steril distile su ile yıkanarak ortamdan sodyum hipokloritin uzaklaşması sağlanmış, yıkama süreleri 30-40 sn. olarak uygulanmıştır.
 - Steril distile su içine alınan tohumlar su banyosunda (35°C), 2 gün süre ile şişirilerek embriyo gevşetme aşamasına hazır hale getirilmiştir (Özgen vd 1998).
- Her bitki tohumunun mikroorganizmalardan temizlenebilmesi için gerekli sterilizasyon süresi farklıdır. Bu nedenle öncelikle mısır doku kültürü çalışması için en uygun sterilizasyon süresi belirlenmiştir.
- Steril distile su içine alınan mısır tohumlarının şişerek, embriyolarının gevşeme süresi, diğer bitki tohumlarına göre farklılık göstermiştir. Öncelikle, 35°C'de tohum embriyoları 6-8 saat bekletilmiş ancak gevşeme gözlenmemiştir. 1 gün su banyosunda bekletilen mısır tohumlarının embriyolarında ise az gevşeme gözlenmiştir. Son olarak, 2 gün süre ile şişirilen mısır tohumlarının embriyoları, bistüri yardımıyla rahat bir şekilde çıkarılabilmektedir.

3.2.1.5. Kallus oluşumu ve gelişimi

- Steril kabinde kallus oluşturmuş olan embriyolar, bistüri ile endospermden ayrılarak, 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/l olmak üzere farklı yoğunluklarda 2,4-D dozları içeren katı MS ortamına alınmıştır.

- Olgunlaşmış embriyolarda kallus oluşum ortamı MS besin ortamı (4.43g/l) (Murashige ve Skoog 1962), farklı 2,4-D dozları ve 30 g/l sakkarozdan oluşup, 6 g/l agar ile katılaştırmıştır (Özgen vd 1996).
- Besin ortamının pH'si (1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak) 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır.
- İçleri boşalmış endospermeleri ve tartılırken kenarında bulunan streçi içeren petri tekrar tartılarak, aradaki fark "kallus ağırlığı" (g) olarak değerlendirilmiştir.
- Kallus oluşturan embriyo sayısı belirlenerek "kallus oluşumu" (%) değerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.
- Kallusları içeren ortamlar yine karanlık inkübatöre (26°C) konularak 21 gün süresince kallusların gelişimi sağlanmıştır.

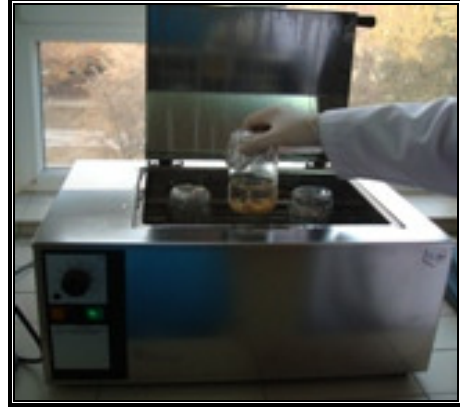
3.2.1.6. Rejenerasyon

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

- 2,4-D uygulanarak elde edilen kalluslardan kök uçlarının oluşturulması hormonsuz MS ortamında yapılmıştır. Manyetik karıştırıcıda hazırlanan ortama 30 g/l sakkarozdan, 6g/l agar ve 4.43 g/l MS ilave edilerek pH'sı 5.8'e ayarlanarak, 20 dakika 121°C ve 1,1 kg/ cm² basınçta otoklavlanarak steril edilmiştir.
 - Otoklavlanan ortam, 10 cm'lik petri kaplarına dökülerek katılması beklenmiştir.
 - Kalluslar, hormonsuz petri ortamına aktarılarak, 4 hafta süreyle 25±1°C sıcaklıkta ve 16 saat ışık- 8 saat karanlık fotoperiyot (1500 Lux) koşullarında bekletilmek üzere, kültür odasına yerleştirilmiştir.
 - Kromozom çalışmaları yapabilmek için gerekli olan kök uçları, 30 gün sonunda 10-20 mm yüksekliğe ulaşan rejenere bitkiciklerden sağlanmıştır.
 - Bitkicik oluşumu gözlenen kalluslardan bitkicikler bistüri yardımıyla kesilerek kök ucunda kromozom tespiti yapılmıştır (Şekil 3.2).
- Çalışma her genotip için 10 embriyo içeren petrilere üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur.



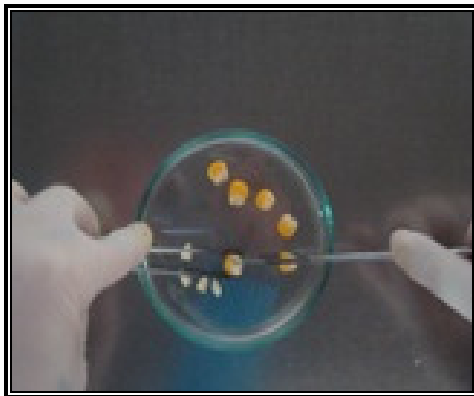
(a) Mısır tohumlarının yüzey stetilizasyonu aşaması



(b) Su banyosunda mısır tohumlarının gevşeme aşaması



(c) Mısır tohumlarının steril kabinde petriye aktarımı aşaması



(ç) Mısır embriyolarının steril kabinde bistüri yardımıyla çıkarılması aşaması



(d) Mısır embriyolarının MS ortamına aktarılması aşaması.

Şekil 3.2. Mısır kallusundan kök oluşumu (I).



(e) Embriyo aktarılmış petrilerin, karanlık inkübatörde bekletilmesi aşaması (3 hafta).



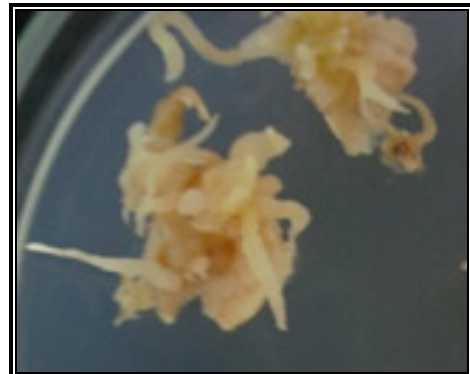
(f) Kallus oluşumu.



(g) Kalluslu petrilerin tartım aşaması.



(h) Hormonsuz petri ortamına aktarılmış kallusların kültür odasında bekletilmesi aşaması (~4 hafta).



(ı) Olgunlaşmış embriyolardan elde edilen kalluslardan kök oluşumu.

Şekil 3.3. Mısır kallusundan kök oluşumu (II).

3.2.2. *In vivo* yöntemler

3.2.2.1. Sitolojik çalışmalar

Araştırma materyali olarak kullanılan tüm mısır çeşitlerinin kalluslarından oluşan kök uçlarından örnekler alınmış, mısır hatlarının kromozom sayılarında oluşan değişiklikler incelenmiştir.

3.2.2.1.1. Prefiksasyon

Bistüri ile kesilmiş kök uçlarına α -monobromonaftalin uygulanması, materyale uygulanan ilk işlemdir. Bu ilk işlemin amacı, kromozomları incelenebilecek seviyede tutmaktır. Bu işlem ile, iğ ipliklerinin oluşumu durdurulmakta, kromozomların kısalması ve düzelmesi sağlanmaktadır. Ayrıca, kromozomların güvenilir bir şekilde sayılması ve büyüklüklerinin karşılaştırılması gerçekleştirilmektedir.

α -monobromonaftalinin su içerisinde çözünmemesinden dolayı, %1'lik α -monobromonaftalin stok çözeltisi hazırlanmıştır.

- 1 ml α -monobromonaftalinin, 100 ml etanolde çözündürülmesi hazırlanan stok çözeltiden, yine 1ml alınarak, 250 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür.
- Hazırlanan α -monobromonaftalin çözeltisi beklemeden kullanılabilir.
- İçerisine kök uçları eklenerek, 4 saat boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ ' de buzdolabında bekletilmiştir.

➤ Elde edilen kök uçları, Elçi (1965)'nin bitkilerde kullandığı α -monobromonaftalin yöntemine göre, α -monobromonaftalinin sudaki doymuş çözeltisinde (250 ml saf su içine 5 damla α -monobromonaftalin damlatılarak çalkalanan çözelti) 16 saat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Ayrıca, Elçi (1982) tarafından belirtilen, buzlu su ve kolşisin ajanları kullanılarak hazırlanan prefiksasyon yöntemleri de denenmiştir. Ancak bu yöntemlerin uygulandığı kök uçlarından elde edilen preparatlarda, kromozom sayımı yapılamamıştır.

- Bu tez çalışmasında en iyi sonuç, α -monobromonaftalin stok çözeltisinden hazırlanan ve Elçi (1982)'nin yöntemi uygulanan kök uçlarından elde edilmiştir.
- Söz konusu yöntemle göre, kesilen kök uçları (15 adet) 100 ml saf su içine 4-5 damla (600 μ l) α -monobromonaftalin ve 1 damla DMSO damlatılarak çalkalanmış ve 2 saat oda sıcaklığında, 16 saat +4°C' de buzdolabında bekletilmişlerdir.

3.2.2.1.2. Fiksasyon

Tespit çözeltisinin hazırlanması aşamasıdır. Özellikle kromozomların, canlının 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.

Buzdolabından çıkarılan kökler saf su ile birkaç kez yıkanmış ve aşağıda belirtilen 3 ayrı fikstasyon yöntemi de farklı kök uçlarına uygulanmıştır;

- 1) Kökler, “%99'luk asetik asit”te 1/2 -1 saat bekletilmiştir.
- 2) Kökler, “3 Asetik asit (%95): 1 Ethanol (%95 veya %100)” karışımında 2-3 saat bekletilmiştir.
- 3) Kökler, “1 Asetik asit (%95): 3 Ethanol (%95 veya %100)” (Carnoy solüsyonu) karışımında 24 saat (oda sıcaklığında) bekletilmiştir.

- Mısır örneklerinde, yukarıda belirtilen 3 ayrı fikstasyon yöntemi de uygulanmış olup, gözlenen en iyi sonuç, köklerin %99'luk asetik asitte 30-60 dk. bekletilmesiyle elde edilmiştir. Tüm kökler, bu fikstasyon yöntemine göre işlem görmüştür.

Fiksasyon işleminden sonra, eldeki köklerin hepsini bir günde inceleme olanağı yoktur. Ancak, bu materyalin uzun süre bozulmadan saklanması gerekir. Tespit çözeltisinden çıkarılan materyal genellikle alkolde saklanır.

Glasiyal asetik asitte 30-60 dk. bekletilerek bir tespit yapılır ve bu materyal %70'lik alkolde oda sıcaklık derecesinde 5'er dakika olmak üzere, 2 defa yıkanır. Böylece asetik asit temizlenir ve sonra yine %70'lik alkol içinde buzdolabında +4°C de depolanır. Materyalin uzun süre saklanabilmesi için, tüplerin ağzı mantar tıplarla kapatılır.

3.2.2.1.3. Hidroliz

Köklerin, 1 N HCl'de su banyosunda bekletilmesi aşamasıdır. Hidroliz, dokuların hücrelerini birbirinden ayırıp onların daha iyi gözlenmesi bakımından önemlidir. Özellikle bitki dokularında, feulgen boya ile boyamadan önce hidroliz işleminin yapılması gerekmektedir.

Kalın dokulardan iyi preparatların yapılabilmesi için dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, mikroskop alanında düzgün bir şekilde dağılımı sağlayacak ve birbirinden ayrılmış hücreleri görece kadar elverişli bir hidroliz işlemi uygulamaktır. Kromozomların boyanması ve gözleminde etkili bir faktör de hidroliz aşamasıdır.

Hidroliz için zaman, sıcaklık derecesi ve hidrolizde kullanılan HCl'in konsantrasyonu önemlidir. En çok kullanılan hidroliz yöntemlerinde 60°C'de 1 N HCl'de materyalin 5 ile 20 dakikaya kadar uzayan sürelerde bekletilmesidir. Çünkü bu süre materyalden materyale büyük değişimler göstermektedir. Özellikle feulgen ile yapılan boyamalarda kromozomların optimum boyayı almasının en önemli kurallarından biri de hidroliz süresinin materyale göre doğru belirlenmiş olmasıdır (Elçi 1982). Hidroliz işlemiyle hücreler, aralarında birleştirici bir kuvvet bulunmayan serbest hücrelerden oluşan bir yığın durumuna getirilmektedir.

➤ Hidroliz aşamasında, materyale farklı sürelerde (14, 12, 10 ve 8 dakika) 60°C'de uygulama yapılmış ve hidroliz süresi, kök uçlarının en iyi boyandığı süre olan 10 dakika olarak belirlenmiştir.

3.2.2.1.4. Boyama

Hidrolizden çıkarılan materyalin boya içinde bekletilerek, kök uçlarının boyanmasının sağlandığı aşamadır.

Bitki kök uçlarının boyanmasında birçok boya kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Feulgen ve Aseto-karmin boyaları (Elçi 1982) ile kromozomlar iyi boyanmıştır.

a. Feulgen boyanın hazırlanışı:

- 1) 500 ml'lik bir erlenmayerin içine 1 g bazik fuksin, dikkatlice etrafına bulaştırılmadan eklenir.
- 2) Bir başka erlenmayerde 200 ml'lik damıtık su kaynatılır.
- 3) Toz halindeki bazik fuksin üzerine kaynatılmış damıtık su yavaş yavaş ilave edilir ve 50°C'e soğuyuncaya kadar karıştırılır.
- 4) 20 ml'lik 1N HCl ilave edilir.
- 5) Süzülür (Whatmann 1 kağıdıyla).
- 6) 2 g Potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) ilave edilir.
- 7) Boya, ağzı iyice kapatılmış bir şişeye koyup karanlık bir dolapta 24 saat bekletilir (Vişne çürüğü rengindeki boya, 24 saat sonra açık çay rengine dönüşür).
- 8) Daha sonra boya, 4°C'de buzdolabında muhafaza edilir.
- 9) Açık sarı çay rengini gidermek ve su gibi renksiz bir boya elde etmek için, ½ g renk gideren norit (bitkisel kömür) ilave edilip, çalkalanır.
- 10) İri gözenekli filtre kağıdından süzülür. Böylece su gibi renksiz bir boya elde edilir.
- 11) Boya, 4°C'de buzdolabında muhafaza edilir.

b. Aseto-karmin boyanın hazırlanışı

- 1) 45 ml asetik asit, bir kapta bulunan 55 ml destile su (%45'lik asetik asit) içine konur ve daha sonra başka bir kapta kaynayan sıcak su içine bu kap yerleştirilerek 10 dakika kaynatmaya devam edilir.

- 2) Isınan %45'lik asetik asit içine, tartılan 1 g karmin boya, yavaş yavaş ve eklenerek 10 dakika karıştırılarak, ısıtılır.
- 3) 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.
- 4) Filtre edilip koyu renkli 100 ml'lik kapaklı kaba konarak, buzdolabında muhafaza edilir.

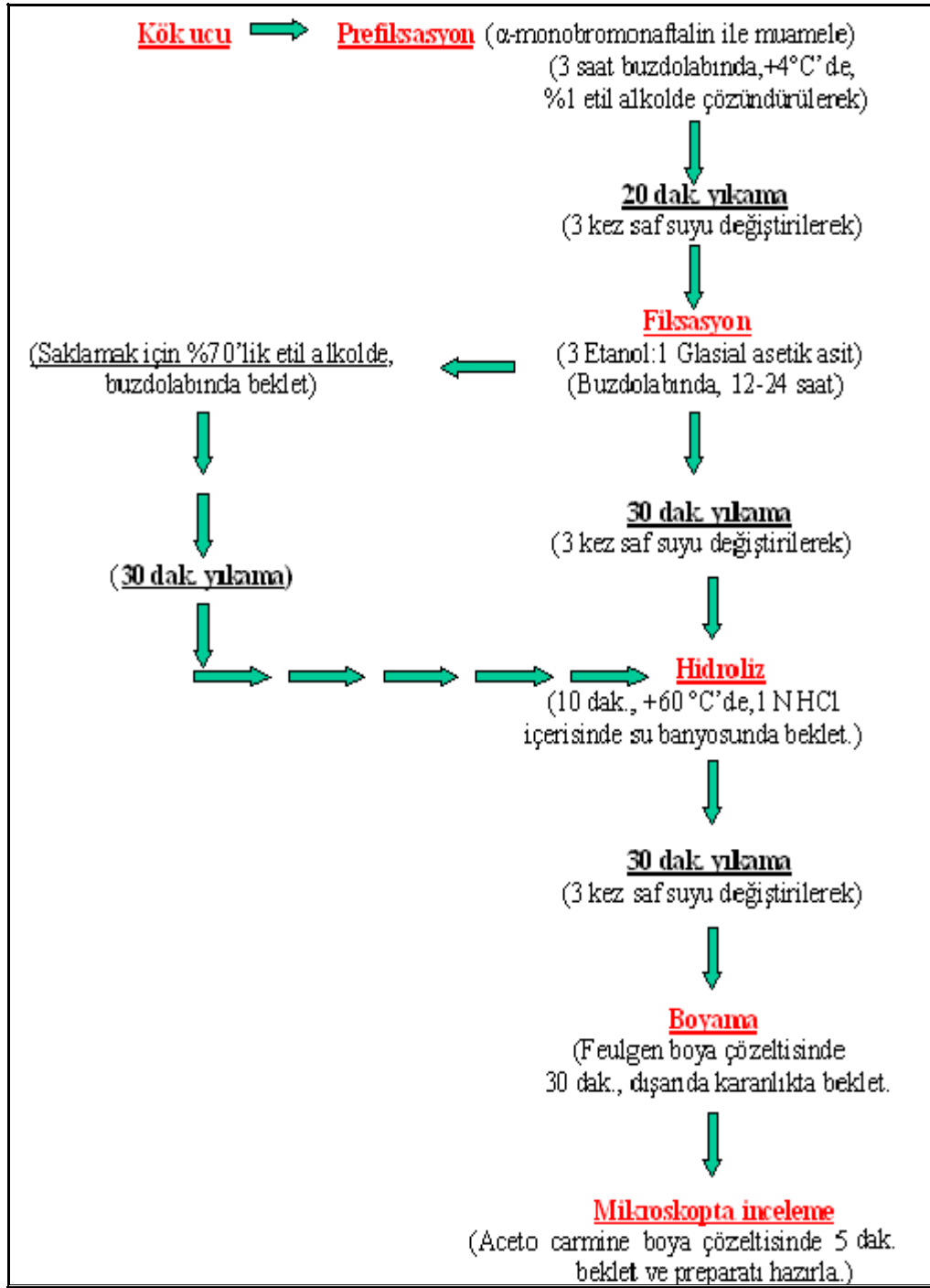
3.2.2.1.5. Kök uçlarının mikroskopta incelenmesi

- Feulgen boyası içindeki kök uçları, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilip, daha sonra yatay cam kap içine boya ile birlikte aktarılır ve cam kap alkol alevinden birkaç kez geçirilir. Boyama işleminden sonra bütün köklerin kırmızı viyole renginde boyanmış olduğu görülür.
- Kök uçları destile su içine aktarılarak 10 dakika su içerisinde bekletilir. Bir saat boyamadan sonra kök uçları musluk suyu içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Bu işlemin boyamayı daha da artırdığı gözlenmiştir (Elçi 1982).
- Tek kök ucu filtre kağıdına yerleştirilir. Üzerindeki su uzaklaştırıldıktan sonra lama aktarılır en kısa zamanda kök uçlarının 1-2 mm'lik koyu mor renk alan uç kısmı, açık renkli kısımdan ayrılır. Meristem hücrelerinin bulunduğu 1-2 mm. uzunluğundaki bu kısım, mikroskop gözlemi için hazırlanan preparatlarda kullanılan kısımdır.
- Koyu mor renkli kısım küçük parçalara bölünerek, üzerine lamın orta kare kısmını kapatacak şekilde aseto-karmin boya damlatılır ve hemen üzerine lam kapatılır. Açık renkli kök ucu kısmı ise atılır.
- Üzeri 45°lik açı yapılarak hafifçe tutulup bırakılan lamelle düzgün bir şekilde kapatılan preparat, 3-4 kez alkol alevinden geçirilir. Katlanmış olan kurutma kağıdının arasına yerleştirilir ve lamelin üzerine kurşun kalemin düz tarafı ile vurularak ezme işlemi gerçekleştirilir. Böylece, hücrelerin daha iyi dağılması sağlanırken, aynı zamanda hem hücreler yassılaşırlar, hem de kromozomların hepsinin bir düzlem üzerine gelmesi sağlanır.
- Uygun hücre bulunduğunda, lamelin kenarı saydam oje yardımıyla çevrilerek, lama yapıştırılır ve yarı devamlı preparat elde edilir.

- Birkaç preparat hazırlandıktan mikroskopta inceleme yapılarak, vurma şiddeti tespit edilir.
 - Yarı devamlı preparatlardan düzgün ve istenilen Mitotik metafaz 1 dönemindeki 300 adet hücrenin fotoğrafları mikroskoba monte edilen fotoğraf makinesi ile çekilir (Şekil 3.4.).
- Hücre bölünmesinin metafaz evresi, kromozomların en iyi gözlemlendiği ve incelendiği evredir. Metafaz evresinde silindirik şekilde görülen kromozomlar en kısa ve en kalın hallerinde olurlar ve tipik şekillerini gösterirler. Bu safhadaki bir kromozomda genel olarak sentromer, primer boğum, sekonder boğum, telomer ve satellit kısımları ayırt edilebilmektedir.
- Preparat yapımında, Elçi (1965 ve 1982) yönteminden de faydalanılmıştır. Feulgen ile boyanmış kök ucundan kesilen kısma aseto-karmin boya yerine, %45'lik asetik asit damlatılmış ancak iyi sonuç alınamamıştır.
- Ayrıca, hidrolizden sonra en iyi boyama yöntemini belirlemek için, sadece aseto-karminle boyama yapılmıştır. Bu boyama yöntemiyle de, kromozomların yeterince boyanmadığı gözlemlenmiştir.
- Çalışmada ayrıca, Martínez-Gómez vd (2005)'nin farklı kök ucu hazırlama ve boyama yöntemleri de denenmiş ancak iyi sonuç alınamamıştır.

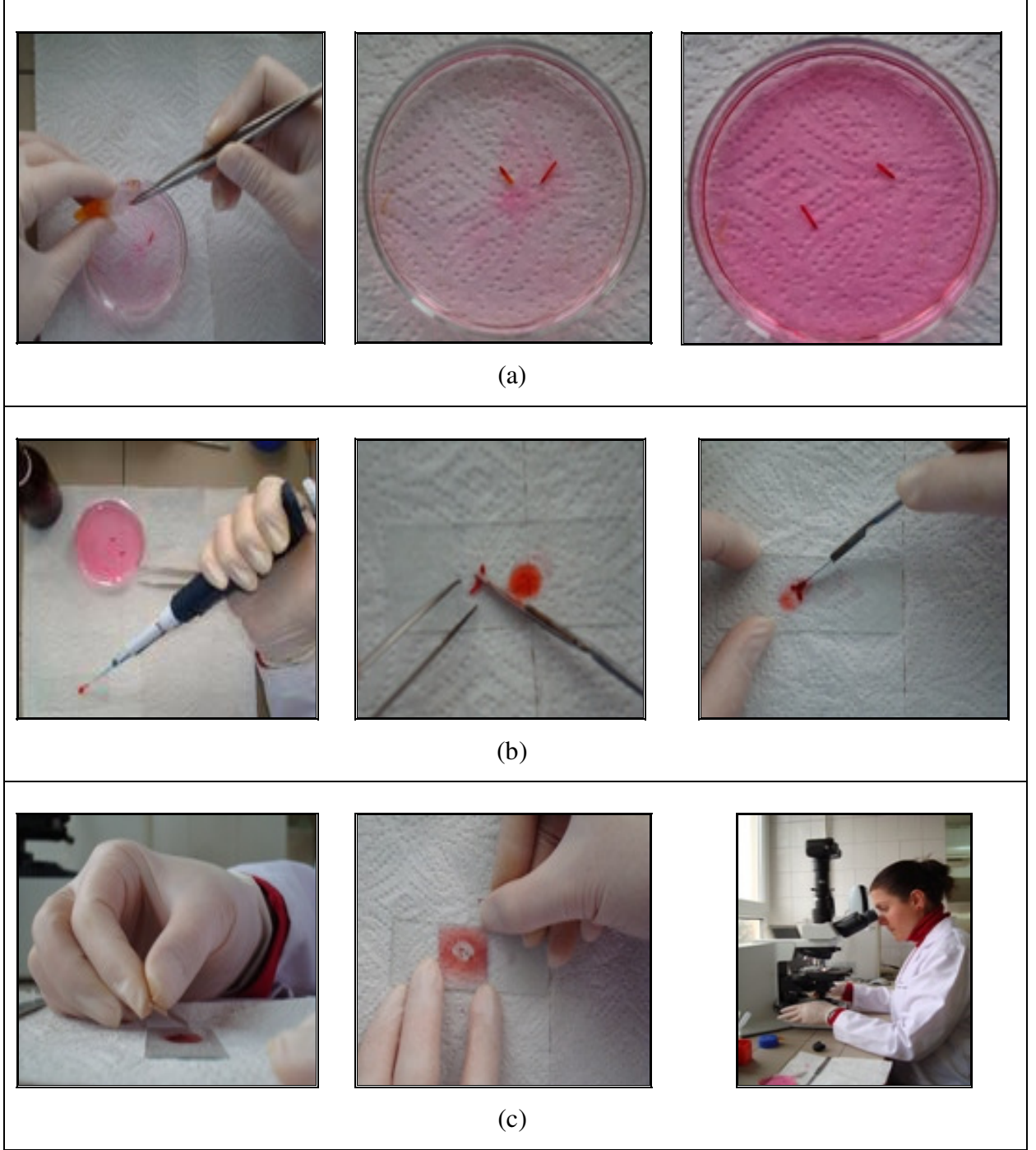
Martínez-Gómez vd (2005)'nin yöntemine göre,

- Islatılıp iki filtre kağıdı arasına yerleştirilen kök uçları petri kutusuna konarak, üstü buzla kaplanacak şekilde buz dolu bir kaptaki buzdolabında 4 saat bekletilmiş,
- Kök uçlarına, 3 saat boyunca %0.2'lik kolşisin uygulanmış,
- 24 saat süre ile, buzdolabında metanol: propiyonik asit: kloroform, solüsyonunda bekletilmiş,
- 24 saat sonunda distile su ile yıkanan kök uçları, saklamak için %70'lik alkolde, buzdolabında +4°C'de bekletilmiş,
- Doğrudan kromozom incelemesi yapılacak kök uçları, 1N HCl'de 10 dakika 60°C'de hidroliz edilmiş,
- Hidrolize edilen kök uçları, asetik asit/ %50'lik aseto-karmin solüsyonu ile 2 saat boyanmıştır.



Şekil 3.4. Çalışmada geliştirilen kök ucu boyama yöntemi.

- Mısır bitkisi küçük kromozomlara sahip olduğundan, preparat hazırlanırken, kuvvetli kurşun kalem darbeleri ile kromozomları bir düzlem üzerine getirmek mümkün olmuştur. Bu tez çalışmasında, vuruşun şiddeti her mısır çeşidine göre birkaç preparat yapılarak ve preparatları mikroskopta incelemek suretiyle bulunmuştur. Ancak, lamele çok şiddetli darbeler ile vurulduğunda, hücrelerin tamamen parçalandığı ve kromozomların hepsinin dağıldığı gözlenmiştir.



Şekil 3.5. Kök uçlarının mikroskopta incelenmesi

- (a) Feulgen boyası ile boyanmış kök uçlarının destile su içine aktarılması.
- (b) Kök uçlarının 1-2 mm'lik koyu mor renk alan uç kısmının, açık renkli kısımdan ayrılması, koyu mor renkli kısmın küçük parçalara bölünmesi ve aseto-karmin boya uygulanması.
- (c) Preparatın hazırlanması ve mikroskopta incelenmesi.

3.2. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, her uygulama, içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü 100x10 mm'lik petri kutularından oluşmuştur.

In vitro çalışmalarda kallus oluşumu (%), kallus ağırlığı (g) ve sürgün gelişimi (%) parametreleri dikkate alınmıştır. *In vivo* çalışmalarda ise kök uçlarından elde edilen kromozom sayıları değerlendirilmiştir. Kallus oluşumu (%), kültürün 14. gününde her petride kallus oluşturan embriyoların sayısının toplam embriyo sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir. Kallus ağırlığı (g), kültürün 14. gününde embriyolarda oluşan kallusların tartılmasıyla elde edilmiştir.

Verilerin varyans ve korelasyon analizleri, en uygun paket programı olan “*SPSS 17 İstatistik Paket Programı*” ile değerlendirilmiştir.

İlişkisiz iki ya da daha çok örneklem ortalaması arasındaki farkın sıfırdan anlamlı bir şekilde farklı olup olmadığını test etmek üzere, “*Tek Yönlü (Faktörlü) Varyans Analizi*” uygulanmıştır.

İki ve daha fazla değişken arasındaki ikili ilişkinin, yönünü, büyüklüğünü ve önemini belirlemek için ise “*Korelasyon Analizi*” yapılmıştır.

Değişkenlerin frekans tablosu biçiminde gösterilmesi için tanımlayıcı istatistik yöntemlerinden biri olan “*çapraz tablolar (crosstabs)*” oluşturulmuştur.

Değişkenlerin dağılımı hakkında görsel bilgi vermek amacıyla “*histogram grafikleri*” çizilmiştir.

Ortalamalar arasındaki farklılıkların istatistiki anlamda önemlilikleri *AÖF (Asgari Önemli Fark)* ($P \leq 0.05$) testi yapılarak belirlenmiştir (Düzgüneş vd 1983). Yüzde değerler, istatistiksel analizden önce “*arcsin*” değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran 1967).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. 2,4-D uygulanan Pioneer 3223 mısır çeşidinde gözlenen değişimler

Çizelge 4.1. Pioneer 3223 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında *in vitro* parametrelere tepkileri (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Tekrar	Kallus Oluşum Oranı	Sürgün Gelişimi Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
0	a	80	20	0.49
	b	70	30	0.41
	c	70	30	0.37
		$\bar{x}=73\pm3.3$	$\bar{x}=27\pm3.3$	$\bar{x}=0.42\pm0.04$
2	a	100	20	2.58
	b	90	30	2.73
	c	90	10	2.46
		$\bar{x}=93\pm3.3$	$\bar{x}=20\pm5.8$	$\bar{x}=2.59\pm0.08$
4	a	90	20	2.45
	b	90	30	2.40
	c	100	10	2.67
		$\bar{x}=93\pm3.3$	$\bar{x}=20\pm5.8$	$\bar{x}=2.51\pm0.08$
6	a	80	20	2.51
	b	100	10	2.40
	c	90	10	2.36
		$\bar{x}=90\pm5.8$	$\bar{x}=13\pm3.3$	$\bar{x}=2.42\pm0.04$
8	a	90	10	2.33
	b	100	10	2.41
	c	90	10	2.37
		$\bar{x}=93\pm3.3$	$\bar{x}=10\pm0$	$\bar{x}=2.37\pm0.02$
10	a	100	20	2.30
	b	90	10	2.49
	c	80	10	2.40
		$\bar{x}=90\pm5.8$	$\bar{x}=13\pm3.3$	$\bar{x}=2.40\pm0.05$

Pioneer 3223 mısır çeşidi genotipi için 10'ar adet embriyo içeren petrilere üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Uygulanan farklı 2,4-D dozlarından elde edilen kallus örnekleri Şekil 4.1'de ve kök ucu oluşturan örnekler ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Pioneer 3223 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	802.661	1.328*
	Gruplar içi	12	120.841	
	Toplam	17		
Sürgün Gelişim Oranı	Gruplar arası	5	62.861	2.241*
	Gruplar içi	12	28.050	
	Toplam	17		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	16.954	211.154**
	Gruplar içi	174	0.075	
	Toplam	179		

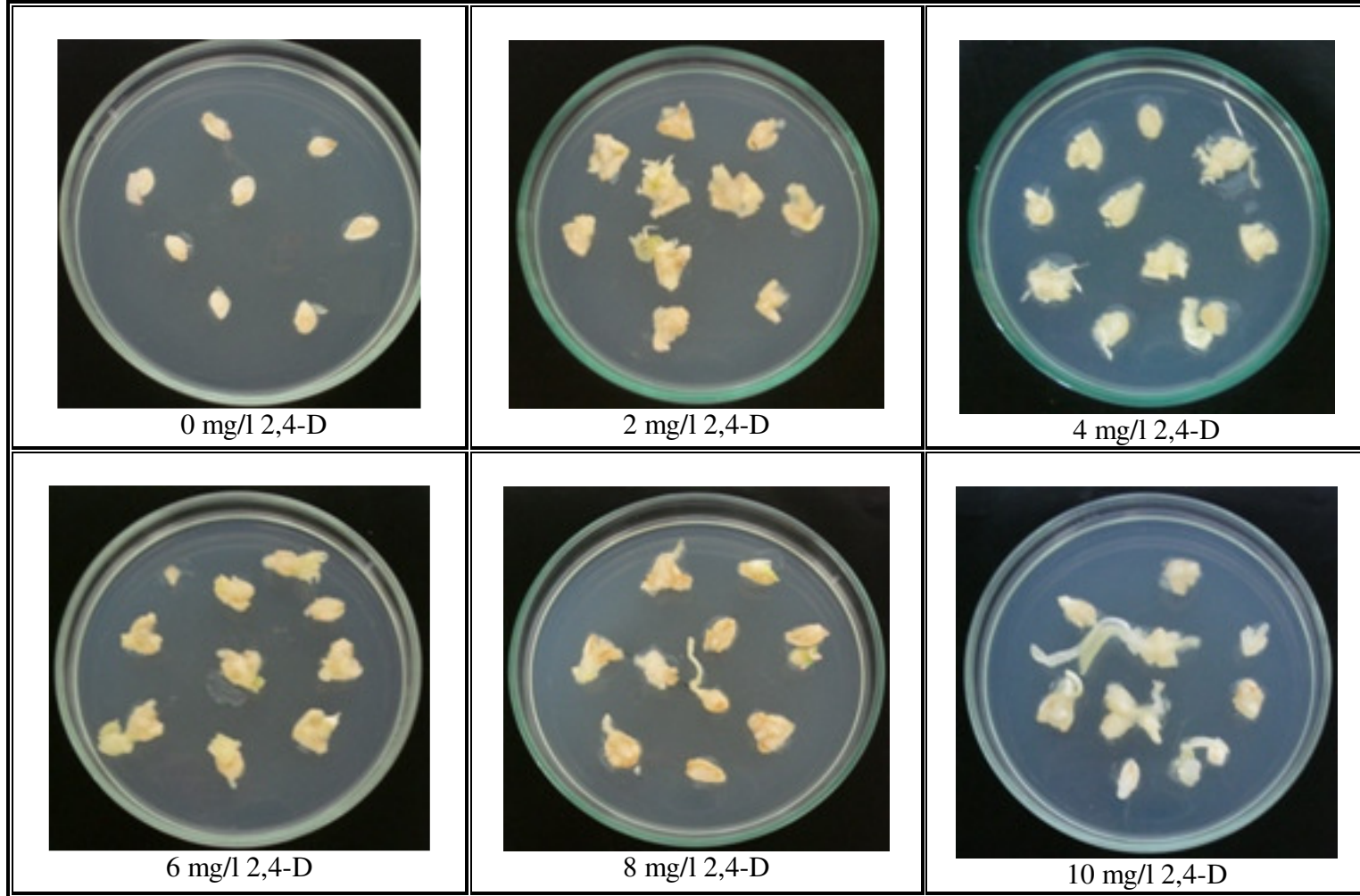
** 0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

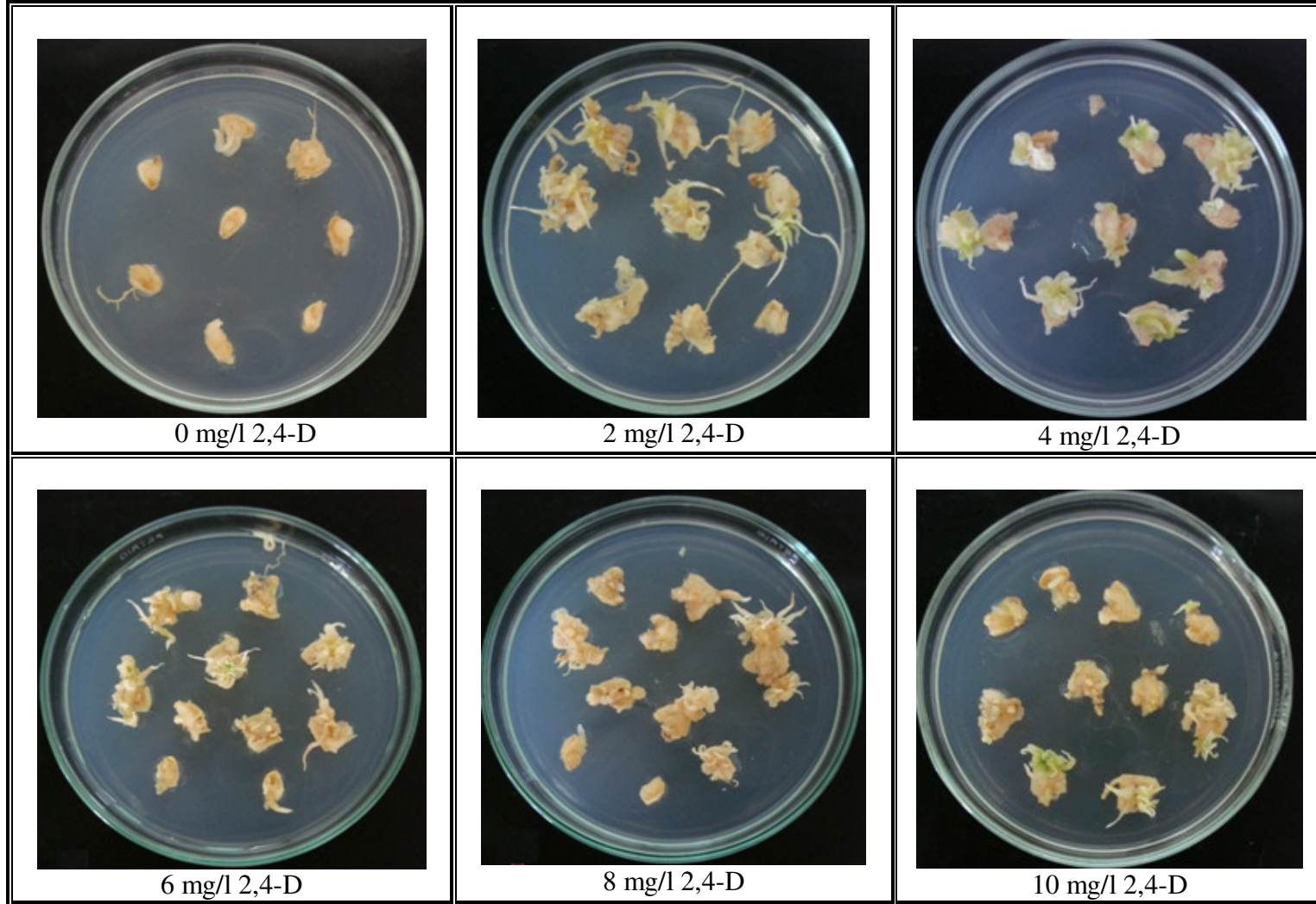
Farklı 2,4-D dozları uygulanan Pioneer 3223 çeşidinde kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığı oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Buna göre; Pioneer 3223 çeşidine uygulanan 2,4-D dozlarının, kallus oluşumu ve sürgün gelişiminde etkisinin önemli olduğu ($p < 0.05$), kallus ağırlığında ise etkisinin çok önemli ($p < 0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Kallus oluşum oranları yönünden Pioneer 3223 çeşidine bakıldığında; 2, 4 ve 8 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken (%93), 6 ve 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde ise kallus oluşumunun %90 olduğu gözlenmiştir. Hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus oluşumunun %73 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1.).

Elde edilen verilere göre, Pioneer 3223 mısır çeşidinde, 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin (2.59 g) en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus ağırlığının 0.42 g olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişimi ise en çok hormon uygulanmayan örneklerde (%27) gözlenirken, en az 8 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%10) gözlenmiştir (Çizelge 4.1.).



Şekil 4.1. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 3223 mısır çeşidinde kallus oluşumu.



Şekil 4.2. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 3223 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.

4.2. 2,4-D uygulanan Pioneer 31N27 mısır çeşidinde gözlenen değişimler

Çizelge 4.3. Pioneer 31N27 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında *in vitro* parametrelere tepkileri (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Tekrar	Kallus Oluşumu Oranı	Sürgün Gelişimi Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
0	a	80	10	0.54
	b	70	40	0.58
	c	60	30	0.50
		$\bar{x}=70\pm 5.8$	$\bar{x}=27\pm 8.8$	$\bar{x}=0.54\pm 0.02$
2	a	100	20	2.17
	b	80	20	1.95
	c	80	30	2.21
		$\bar{x}=87\pm 6.7$	$\bar{x}=23\pm 3.3$	$\bar{x}=2.11\pm 0.08$
4	a	100	10	1.87
	b	80	20	1.65
	c	80	20	1.72
		$\bar{x}=87\pm 6.7$	$\bar{x}=17\pm 3.3$	$\bar{x}=1.75\pm 0.06$
6	a	100	30	1.52
	b	90	20	1.46
	c	80	10	1.63
		$\bar{x}=90\pm 5.8$	$\bar{x}=20\pm 5.8$	$\bar{x}=1.54\pm 0.05$
8	a	90	20	1.49
	b	70	10	1.55
	c	100	10	1.60
		$\bar{x}=87\pm 8.8$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=1.55\pm 0.03$
10	a	100	20	1.29
	b	80	10	1.26
	c	90	10	1.17
		$\bar{x}=90\pm 5.8$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=1.24\pm 0.04$

Pioneer 31N27 mısır çeşidi genotipi için 10'ar adet embriyo içeren petrilere üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Uygulanan farklı 2,4-D dozlarından elde edilen kallus örnekleri Şekil 4.3'te ve kök ucu oluşturan örnekler ise Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

Kallus oluşum oranları yönünden Pioneer 31N27 çeşidine bakıldığında; 6 ve 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken (%90), 2, 4 ve 8 mg/l 2,4-D

uygulanmayan örneklerde ise kallus oluşumunun %70 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3.).

Elde edilen verilere göre, Pioneer 31N27 mısır çeşidinde, 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin (2.11 g) en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus ağırlığının 0.54 g olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişimi ise en çok hormon uygulanmayan örneklerde (%27) gözlenirken, en az 8 ve 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%13) gözlenmiştir (Çizelge 4.3.).

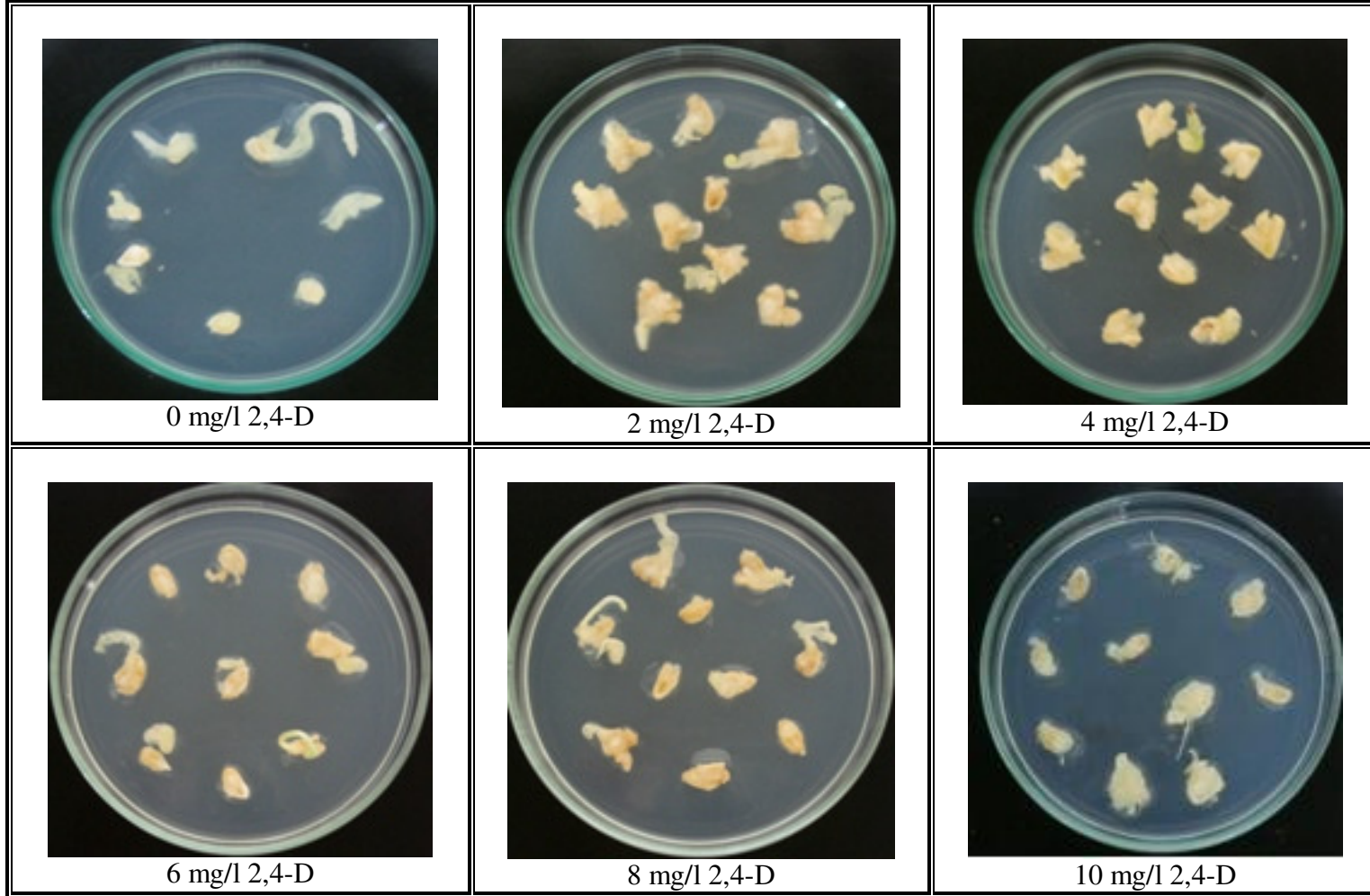
Çizelge 4.4. Pioneer 31N27 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	140.467	0.728*
	Gruplar içi	12	192.983	
	Toplam	17		
Sürgün Gelişim Oranı	Gruplar arası	5	44.517	0.425*
	Gruplar içi	12	41.679	
	Toplam	17		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	0.848	105.505**
	Gruplar içi	174	0.008	
	Toplam	179		

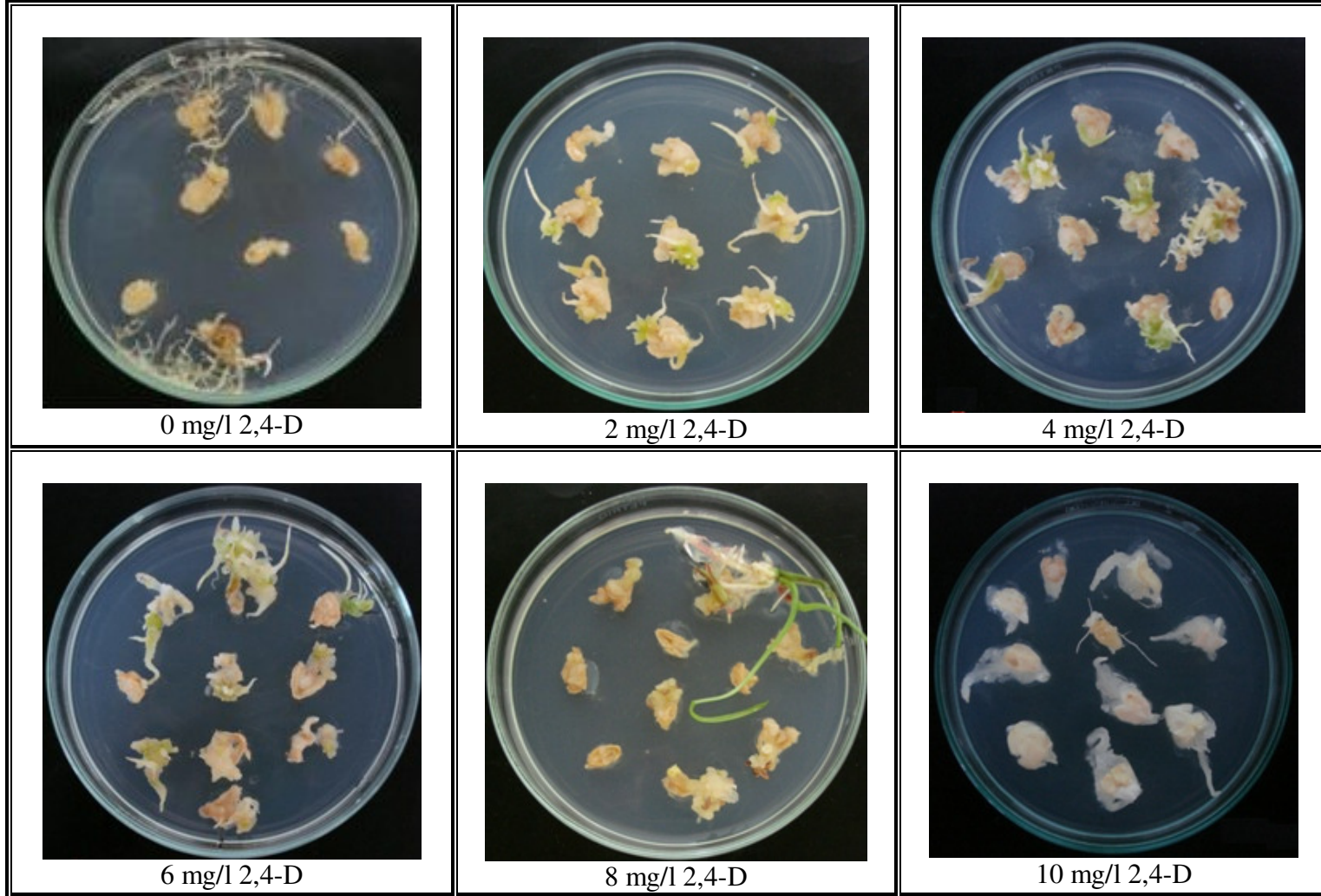
** 0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

Farklı 2,4-D dozları uygulanan Pioneer 31N27 çeşidinde kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığı oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Buna göre; Pioneer 3223 çeşidine uygulanan 2,4-D dozlarının, kallus oluşumu ve sürgün gelişiminde etkisinin önemli olduğu ($p < 0.05$), kallus ağırlığında ise etkisinin çok önemli ($p < 0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4.).



Şekil 4.3. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 31N27 mısır çeşidinde kallus oluşumu.



Şekil 4.4. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 31N27 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.

4.3. 2,4-D uygulanan Pioneer 31P41 mısır çeşidinde gözlenen değişimler

Çizelge 4.5. Pioneer 31P41 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında *in vitro* parametrelere tepkileri (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Tekrar	Kallus Oluşum Oranı	Sürgün Gelişimi Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
0	a	100	20	0.46
	b	90	10	0.51
	c	60	10	0.41
		$\bar{x}=83\pm 12.0$	$\bar{x}=27\pm 3.3$	$\bar{x}=0.46\pm 0.03$
2	a	100	30	2.33
	b	90	20	2.42
	c	100	10	2.37
		$\bar{x}=97\pm 3.3$	$\bar{x}=20\pm 5.8$	$\bar{x}=2.37\pm 0.03$
4	a	100	20	2.24
	b	100	30	2.13
	c	90	30	2.31
		$\bar{x}=97\pm 3.3$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=2.23\pm 0.05$
6	a	90	20	2.25
	b	90	10	2.09
	c	100	20	2.14
		$\bar{x}=93\pm 3.3$	$\bar{x}=17\pm 3.3$	$\bar{x}=2.16\pm 0.05$
8	a	100	10	1.95
	b	100	10	2.04
	c	80	20	2.09
		$\bar{x}=93\pm 6.7$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=2.03\pm 0.04$
10	a	80	10	1.91
	b	80	20	1.88
	c	100	10	2.07
		$\bar{x}=87\pm 6.7$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=1.95\pm 0.06$

Pioneer 31P41 mısır çeşidi genotipi için 10'ar adet embriyo içeren petrilere üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Uygulanan farklı 2,4-D dozlarından elde edilen kallus örnekleri Şekil 4.5'te ve kök ucu oluşturan örnekler ise Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Pioneer 31P41 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	97.704	0.490**
	Gruplar içi	12	199.239	
	Toplam	17		
Sürgün Gelişim Oranı	Gruplar arası	5	46.602	0.193*
	Gruplar içi	12	28.050	
	Toplam	17		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	1.491	256.003**
	Gruplar içi	174	0.066	
	Toplam	179		

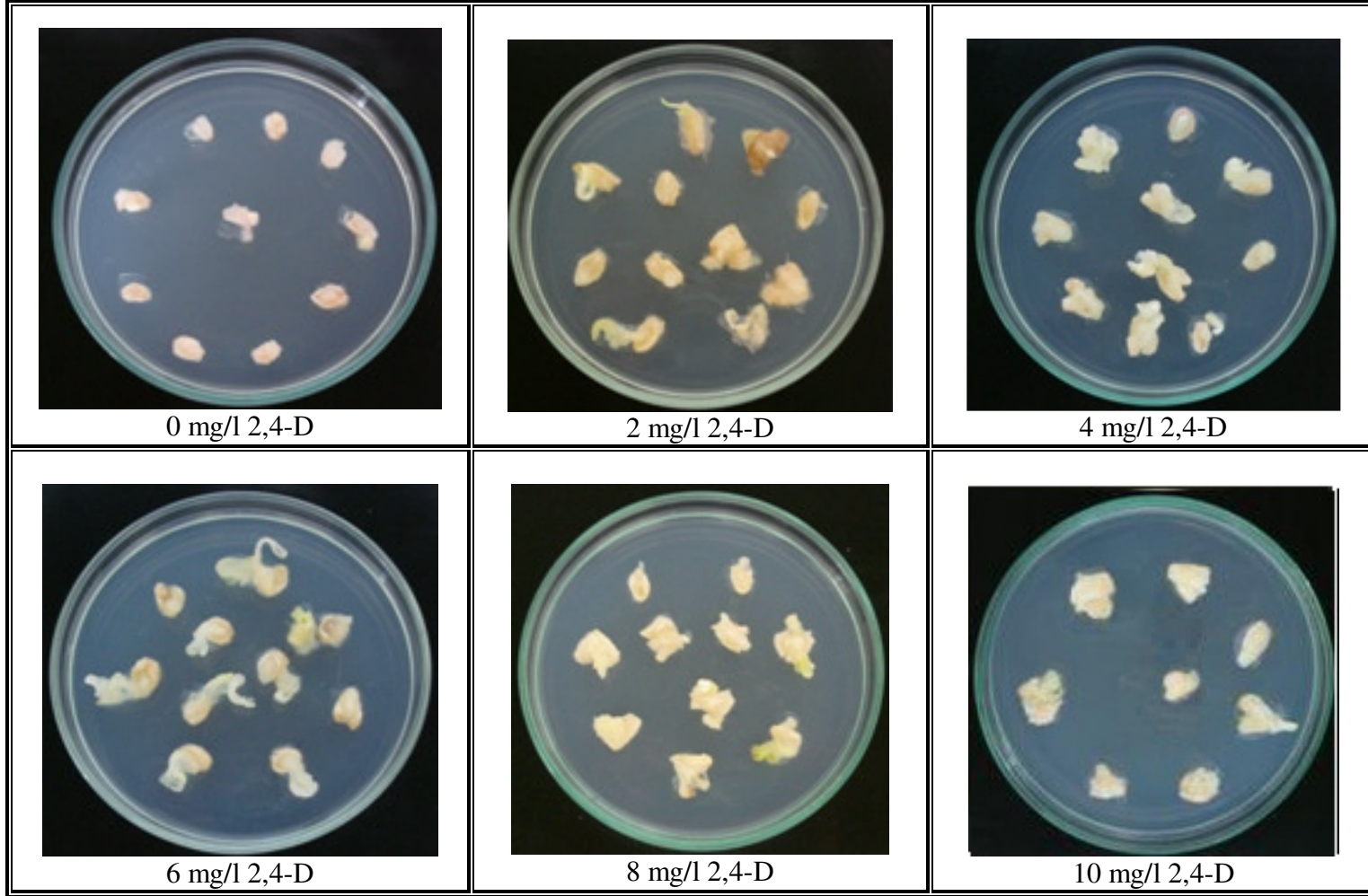
** 0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

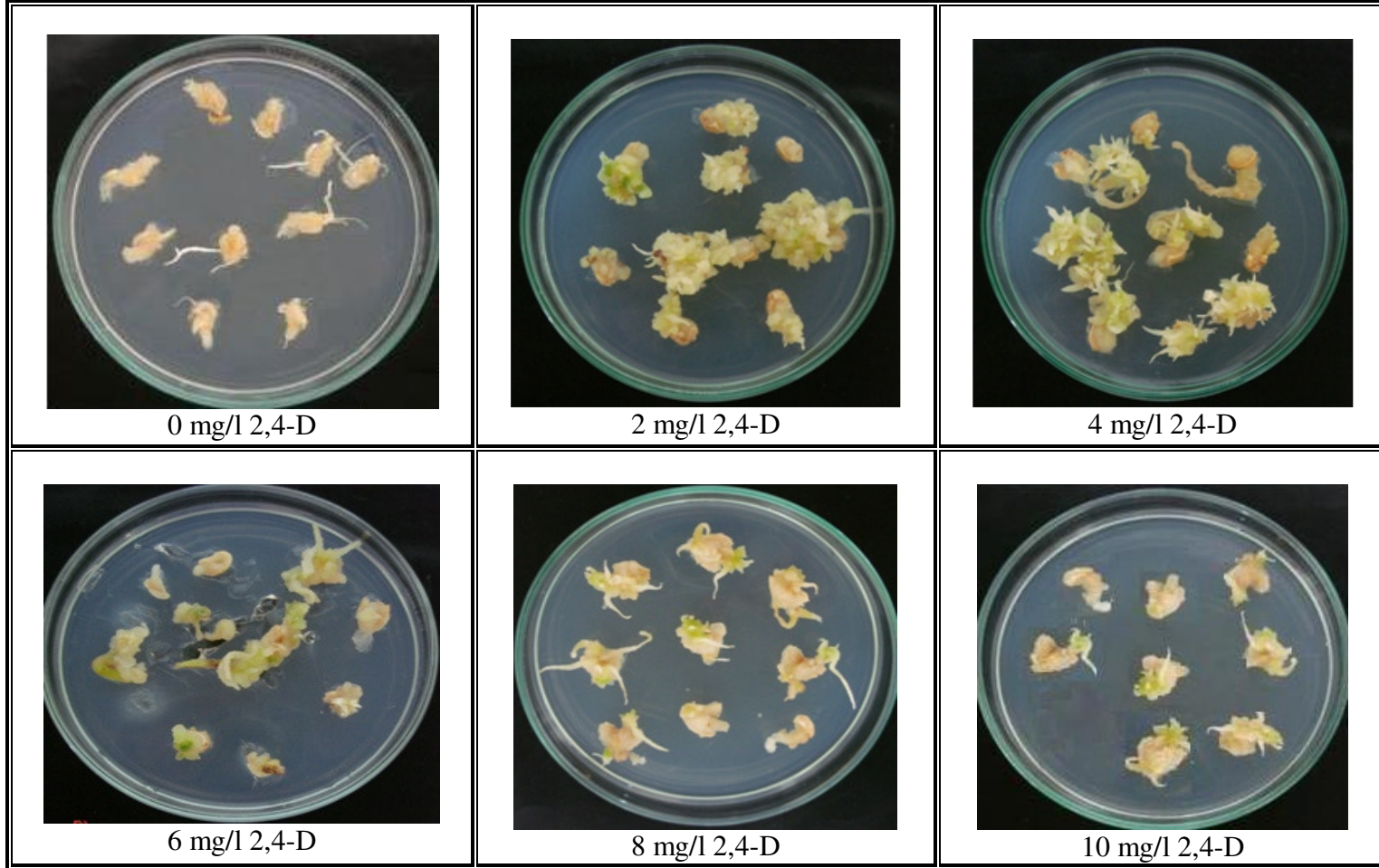
Farklı 2,4-D dozları uygulanan Pioneer 31P41 çeşidinde kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığı oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir. Buna göre; Pioneer 3223 çeşidine uygulanan 2,4-D dozlarının, sürgün gelişiminde etkisinin önemli olduğu ($p < 0.05$), kallus oluşumu ve kallus ağırlığında ise etkisinin çok önemli ($p < 0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6.).

Kallus oluşum oranları yönünden Pioneer 31P41 çeşidine bakıldığında; 2, 4 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken (%97), 6 ve 8 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %93, 10 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %87, hormon uygulanmayan örneklerde de kallus oluşumunun %83 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5.).

Elde edilen verilere göre, Pioneer 31P41 mısır çeşidinde, 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin (2.37 g) en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus ağırlığının 0.46 g olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişimi ise en çok hormon uygulanmayan örneklerde (%27) gözlenirken, en az 4, 8 ve 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%13) gözlenmiştir (Çizelge 4.5.).



Şekil 4.5. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 31P41 mısır çeşidinde kallus oluşumu.



Şekil 4.6. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 31P41 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.

4.4. 2,4-D uygulanan Pioneer 34N24 mısır çeşidinde gözlenen değişimler

Çizelge 4.7. Pioneer 34N24 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında *in vitro* parametrelere tepkileri (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Tekrar	Kallus Oluşum Oranı	Sürgün Gelişimi Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
0	a	70	30	0.46
	b	90	20	0.52
	c	60	30	0.43
		$\bar{x}=73\pm 8.8$	$\bar{x}=27\pm 3.3$	$\bar{x}=0.47\pm 0.03$
2	a	90	30	2.37
	b	100	20	2.15
	c	80	20	2.24
		$\bar{x}=90\pm 5.8$	$\bar{x}=23\pm 3.3$	$\bar{x}=2.25\pm 0.06$
4	a	80	10	2.46
	b	100	20	2.31
	c	80	20	2.27
		$\bar{x}=87\pm 6.7$	$\bar{x}=17\pm 3.3$	$\bar{x}=2.34\pm 0.06$
6	a	90	10	2.23
	b	70	20	1.97
	c	100	10	2.15
		$\bar{x}=87\pm 8.8$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=2.11\pm 0.08$
8	a	80	20	2.08
	b	90	10	2.18
	c	100	10	2.13
		$\bar{x}=90\pm 5.8$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=2.13\pm 0.03$
10	a	100	20	1.83
	b	70	10	1.96
	c	90	10	2.08
		$\bar{x}=87\pm 8.8$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=1.96\pm 0.07$

Pioneer 34N24 mısır çeşidi genotipi için 10'ar adet embriyo içeren petrilere üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Uygulanan farklı 2,4-D dozlarından elde edilen kallus örnekleri Şekil 4.8'de ve kök ucu oluşturan örnekler ise Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Pioneer 34N24 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	100.276	0.472*
	Gruplar içi	12	212.313	
	Toplam	17		
Sürgün Gelişim Oranı	Gruplar arası	5	56.813	2.900*
	Gruplar içi	12	19.594	
	Toplam	17		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	1.482	147.604**
	Gruplar içi	174	0.01	
	Toplam	179		

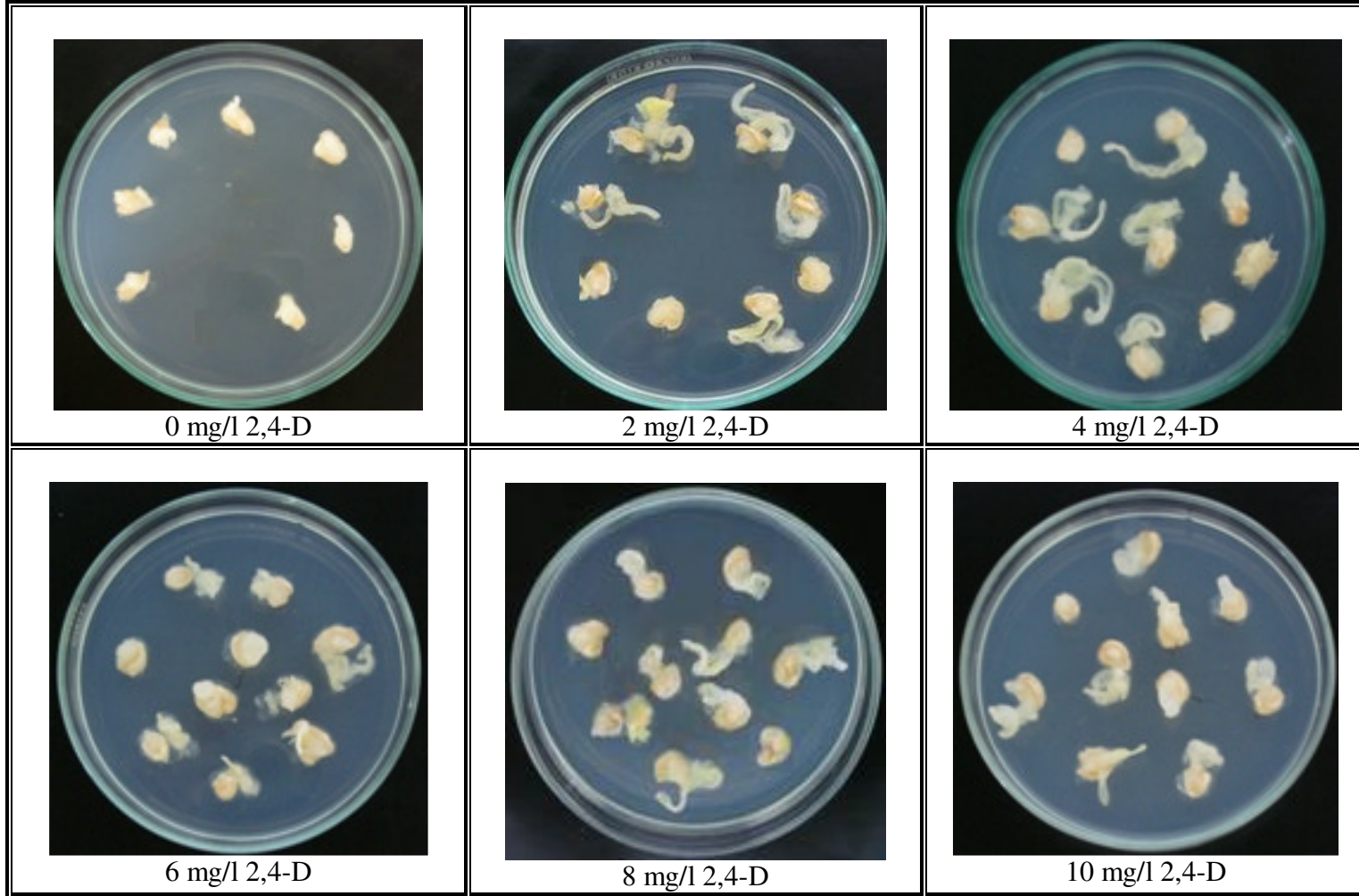
** 0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

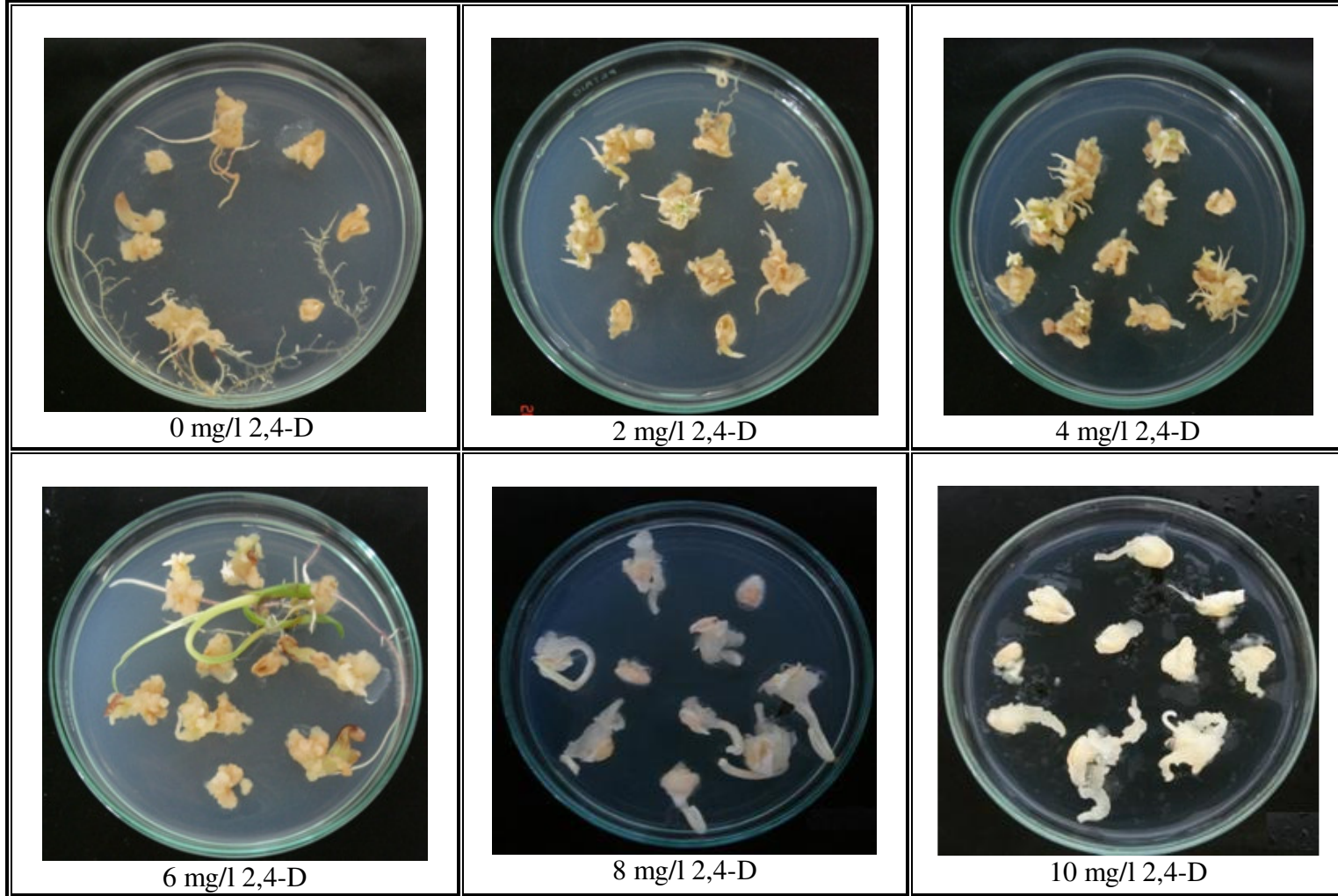
Farklı 2,4-D dozları uygulanan Pioneer 34N24 çeşidinde kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığı oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Buna göre; Pioneer 3223 çeşidine uygulanan 2,4-D dozlarının kallus oluşumu ve sürgün gelişiminde etkisinin önemli olduğu ($p \leq 0.05$), kallus ağırlığında ise etkisinin çok önemli ($p < 0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8.).

Kallus oluşum oranları yönünden Pioneer 34N24 çeşidine bakıldığında; 2 ve 8 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken (%90); 4, 6 ve 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %87 olduğu gözlenmiştir. Hormon uygulanmayan örneklerde de kallus oluşumunun %73 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7.).

Elde edilen verilere göre, Pioneer 34N24 mısır çeşidinde 4 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin (2.34 g) en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus ağırlığının 0.47 g olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişimi ise en çok hormon uygulanmayan örneklerde (%27) gözlenirken, en az 6, 8 ve 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%13) gözlenmiştir (Çizelge 4.7.).



Şekil 4.7. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 34N24 mısır çeşidinde kallus oluşumu.



Şekil 4.8. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan Pioneer 34N24 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.

4.5. 2,4-D uygulanan TECTOR mısır çeşidinde gözlenen değişimler

Çizelge 4.9. TECTOR mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında *in vitro* parametrelere tepkileri (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Tekrar	Kallus Oluşum Oranı	Sürgün Gelişimi Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
0	a	60	30	0.42
	b	90	20	0.50
	c	70	30	0.53
		$\bar{x}=73\pm 8.8$	$\bar{x}=27\pm 3.3$	$\bar{x}=0.48\pm 0.03$
2	a	100	10	2.64
	b	90	20	2.76
	c	100	20	2.55
		$\bar{x}=96\pm 3.3$	$\bar{x}=17\pm 3.3$	$\bar{x}=2.65\pm 0.06$
4	a	100	10	2.88
	b	90	10	2.75
	c	90	20	2.73
		$\bar{x}=93\pm 3.3$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=2.79\pm 0.05$
6	a	90	20	2.55
	b	90	10	2.44
	c	80	20	2.46
		$\bar{x}=87\pm 3.3$	$\bar{x}=17\pm 3.3$	$\bar{x}=2.48\pm 0.03$
8	a	80	10	2.35
	b	90	10	2.41
	c	90	10	2.42
		$\bar{x}=87\pm 3.3$	$\bar{x}=10\pm 0$	$\bar{x}=2.39\pm 0.02$
10	a	90	30	2.39
	b	80	20	2.45
	c	80	10	2.44
		$\bar{x}=83\pm 3.3$	$\bar{x}=20\pm 5.8$	$\bar{x}=2.43\pm 0.02$

TECTOR mısır çeşidi genotipi için 10'ar adet embriyo içeren petrielerde üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Uygulanan farklı 2,4-D dozlarından elde edilen kallus örnekleri Şekil 4.9'da ve kök ucu oluşturan örnekler ise Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Farklı 2,4-D dozları uygulanan TECTOR çeşidinde kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığı oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Buna

göre; TECTOR çeşidine uygulanan 2,4-D dozlarının kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığında etkisinin çok önemli ($p<0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.10. TECTOR çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

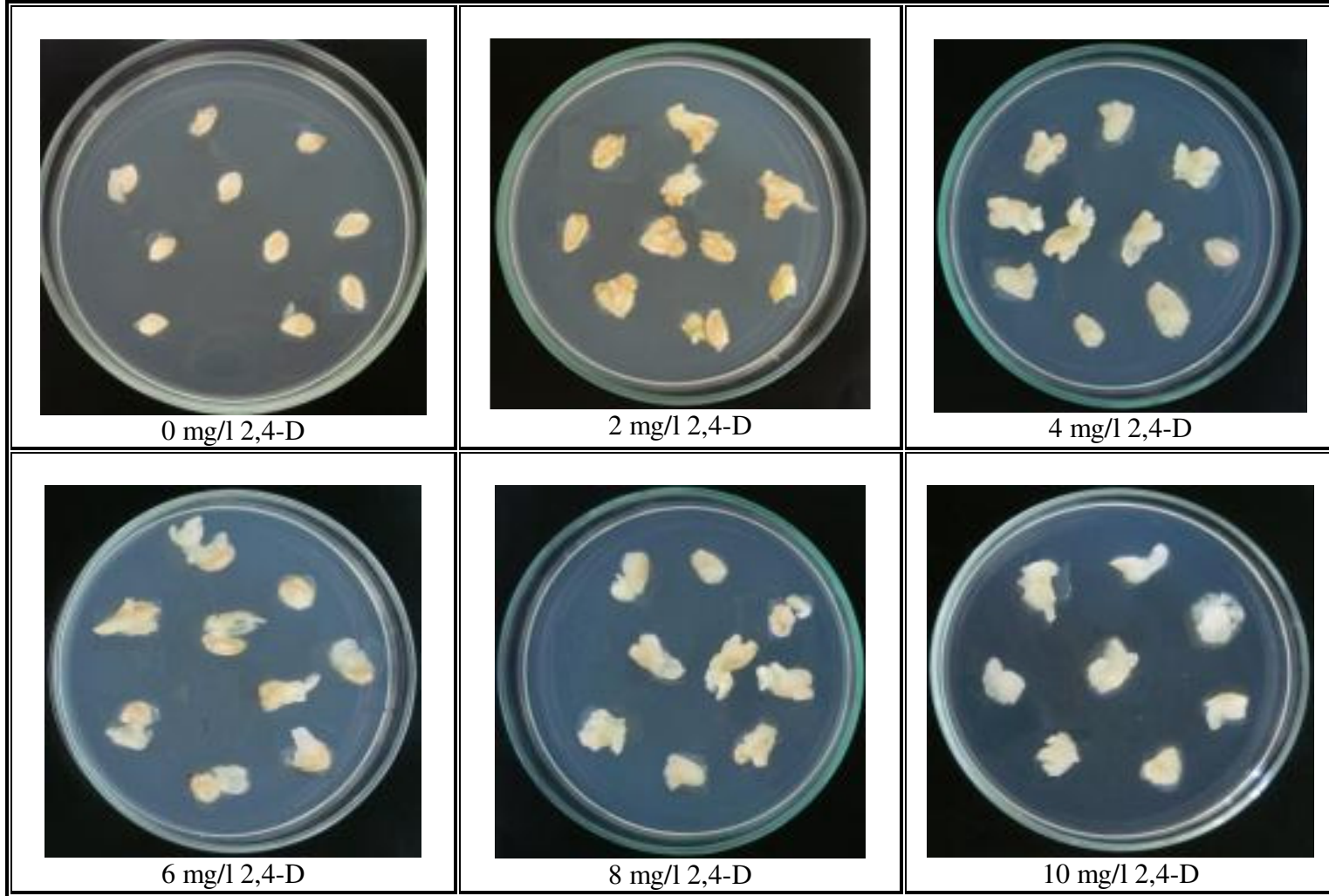
		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	398.849	8.144**
	Gruplar içi	12	58.977	
	Toplam	17		
Sürgün Gelişim Oranı	Gruplar arası	5	55.414	2.452**
	Gruplar içi	12	22.595	
	Toplam	17		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	2.198	490.766**
	Gruplar içi	174	0.004	
	Toplam	179		

** 0.01 düzeyinde önemli

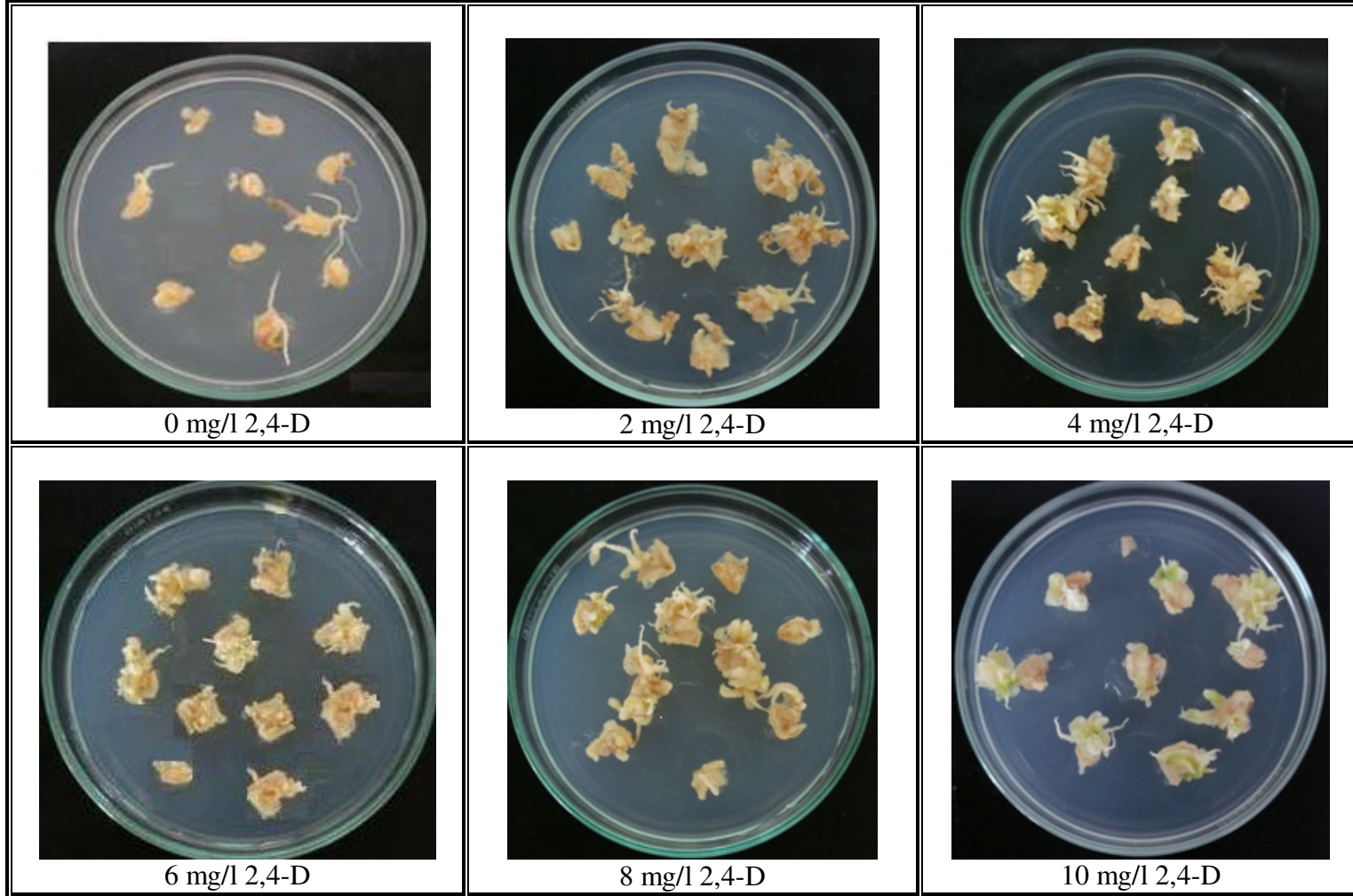
* 0.05 düzeyinde önemli

Kallus oluşum oranları yönünden TECTOR çeşidine bakıldığında; 2 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken (%96); 4 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde %93 olduğu, 6 ve 8 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde %87, 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun ise %83 olduğu gözlenmiştir. Hormon uygulanmayan örneklerde de kallus oluşumunun %73 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9.).

Elde edilen verilere göre, TECTOR mısır çeşidinde 4 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin (2.79 g) en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus ağırlığının 0.48 g olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişimi ise en çok hormon uygulanmayan örneklerde (%27), en az 8 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%10) gözlenmiştir (Çizelge 4.9.).



Şekil 4.9. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan TECTOR mısır çeşidinde kallus oluşumu.



Şekil 4.10. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan TECTOR mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.

4.6. 2,4-D uygulanan ADA 523 mısır çeşidinde gözlenen değişimler

Çizelge 4.11. ADA 523 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında *in vitro* parametrelere tepkileri (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Tekrar	Kallus Oluşum Oranı	Sürgün Gelişimi Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
0	a	70	20	0.51
	b	60	20	0.44
	c	90	30	0.46
		$\bar{x}=73\pm 8.8$	$\bar{x}=23\pm 3.3$	$\bar{x}=0.47\pm 0.02$
2	a	100	20	2.68
	b	90	20	2.51
	c	100	10	2.56
		$\bar{x}=97\pm 3.3$	$\bar{x}=17\pm 3.3$	$\bar{x}=2.58\pm 0.05$
4	a	90	20	2.31
	b	100	20	2.26
	c	80	30	2.45
		$\bar{x}=90\pm 5.8$	$\bar{x}=23\pm 3.3$	$\bar{x}=2.34\pm 0.06$
6	a	90	10	2.30
	b	90	20	2.28
	c	100	10	2.42
		$\bar{x}=93\pm 3.3$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=2.33\pm 0.04$
8	a	90	20	2.23
	b	100	10	2.31
	c	80	10	2.24
		$\bar{x}=90\pm 5.8$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=2.26\pm 0.03$
10	a	80	30	2.25
	b	90	20	2.18
	c	80	30	2.30
		$\bar{x}=83\pm 3.3$	$\bar{x}=27\pm 3.3$	$\bar{x}=2.24\pm 0.03$

ADA 523 mısır çeşidi genotipi için 10'ar adet embriyo içeren petrilere üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Uygulanan farklı 2,4-D dozlarından elde edilen kallus örnekleri Şekil 4.11'de ve kök ucu oluşturan örnekler ise Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

Farklı 2,4-D dozları uygulanan ADA 523 çeşidinde kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığı oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.12'de verilmiştir. Buna

göre; ADA 523 çeşidine uygulanan 2,4-D dozlarının kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığında etkisinin çok önemli ($p < 0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12.).

Çizelge 4.12. ADA 523 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

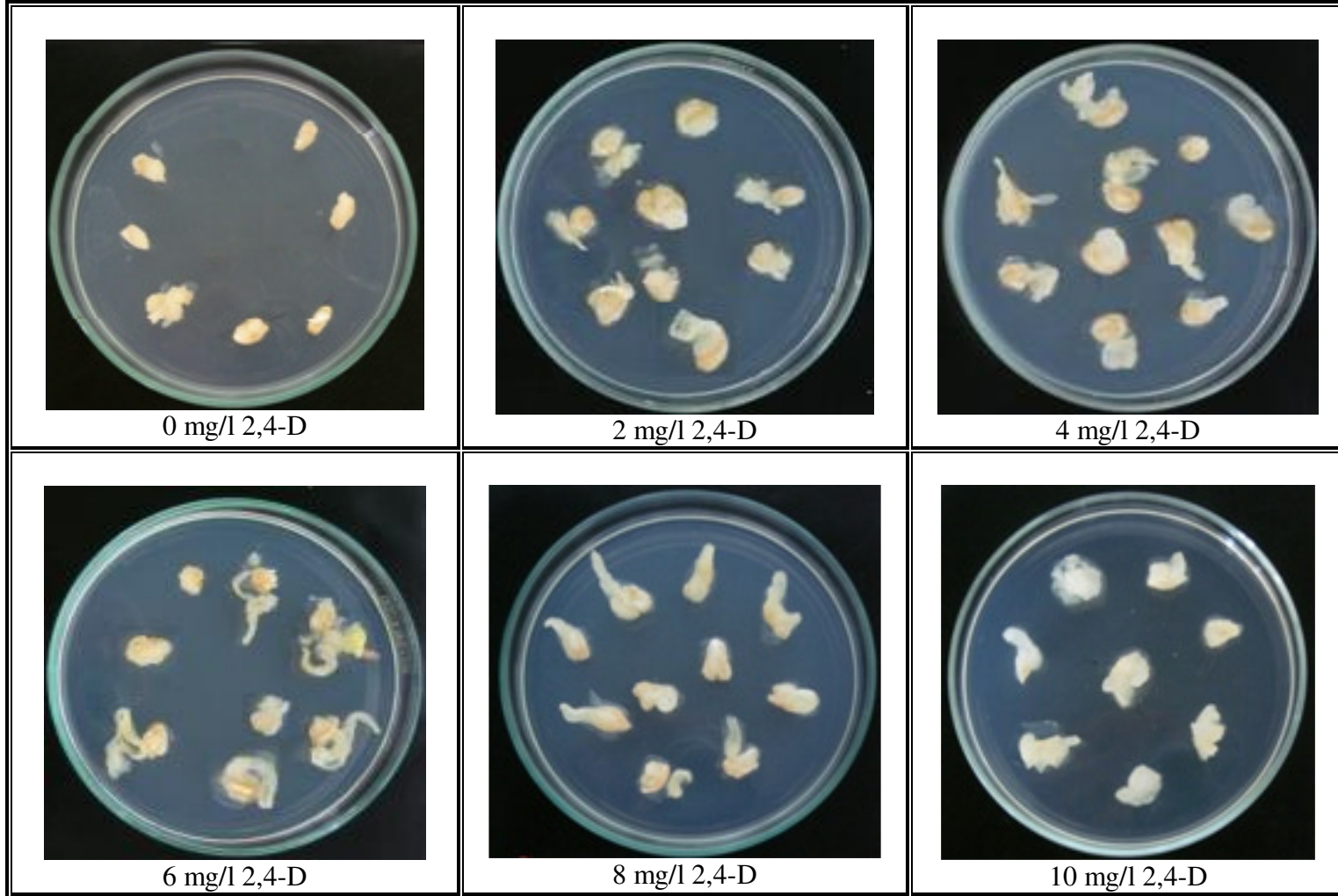
		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	222.961	1.824**
	Gruplar içi	12	122.264	
	Toplam	17		
Sürgün Gelişim Oranı	Gruplar arası	5	55.122	3.000**
	Gruplar içi	12	18.376	
	Toplam	17		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	1.816	364.320**
	Gruplar içi	174	0.005	
	Toplam	179		

** 0.01 düzeyinde önemli

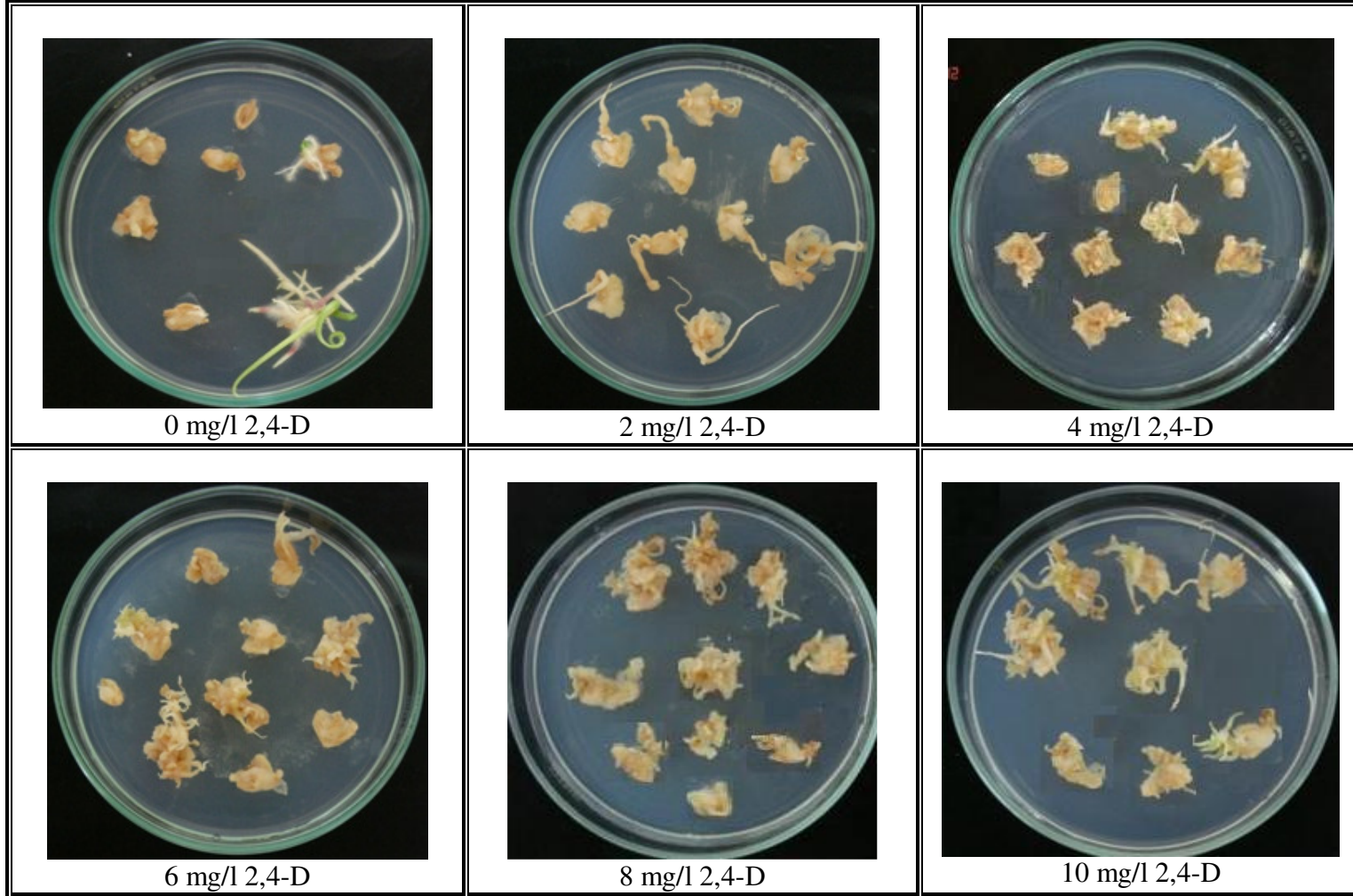
* 0.05 düzeyinde önemli

Kallus oluşum oranları yönünden ADA 523 çeşidine bakıldığında; 2 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken (%97), 6 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %93, 4 ve 8 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %90, 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %83 olduğu gözlenmiştir. Hormon uygulanmayan örneklerde de kallus oluşumunun %73 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.11.).

Elde edilen verilere göre, ADA 523 mısır çeşidinde 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin (2.58 g) en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus ağırlığının 0.47 g olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişimi ise en çok hormon 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%27) gözlenirken, en az 4 ve 6 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%13) gözlenmiştir (Çizelge 4.11.).



Şekil 4.11. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan ADA 523 mısır çeşidinde kallus oluşumu.



Şekil 4.12. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan ADA 523 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.

4.7. 2,4-D uygulanan BC 666 mısır çeşidinde gözlenen değişimler

Çizelge 4.13. BC 666 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında *in vitro* parametrelere tepkileri (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Tekrar	Kallus Oluşum Oranı	Sürgün Gelişimi Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
0	a	60	10	0.38
	b	80	20	0.43
	c	50	20	0.34
		$\bar{x}=63\pm 8.8$	$\bar{x}=17\pm 3.3$	$\bar{x}=0.38\pm 0.03$
2	a	80	20	2.36
	b	80	30	2.53
	c	80	10	2.49
		$\bar{x}=80\pm 0$	$\bar{x}=20\pm 5.8$	$\bar{x}=2.46\pm 0.05$
4	a	90	20	2.41
	b	100	20	2.54
	c	90	20	2.48
		$\bar{x}=93\pm 3.3$	$\bar{x}=20.0\pm 0$	$\bar{x}=2.48\pm 0.04$
6	a	80	20	2.35
	b	90	10	2.23
	c	70	30	2.28
		$\bar{x}=80\pm 5.8$	$\bar{x}=20.0\pm 5.8$	$\bar{x}=2.29\pm 0.03$
8	a	80	10	2.21
	b	90	20	2.23
	c	100	10	2.14
		$\bar{x}=90\pm 5.8$	$\bar{x}=13.0\pm 3.3$	$\bar{x}=2.19\pm 0.03$
10	a	90	10	2.15
	b	80	10	2.19
	c	70	10	2.08
		$\bar{x}=80\pm 5.8$	$\bar{x}=10.0\pm 0$	$\bar{x}=2.14\pm 0.03$

BC 666 mısır çeşidi genotipi için 10'ar adet embriyo içeren petrielerde üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Uygulanan farklı 2,4-D dozlarından elde edilen kallus örnekleri Şekil 4.13'te ve kök ucu oluşturan örnekler ise Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

Farklı 2,4-D dozları uygulanan BC 666 çeşidinde kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığı oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.14'te verilmiştir. Buna göre, BC 666 çeşidine uygulanan 2,4-D dozlarının sürgün gelişiminde etkisinin önemli ($p<0.05$)

olduğu, kallus oluşumu ve kallus ağırlığında ise etkisinin çok önemli ($p<0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.14.).

Çizelge 4.14. BC 666 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	240.171	2.900**
	Gruplar içi	12	82.827	
	Toplam	17		
Sürgün Gelişim Oranı	Gruplar arası	5	32.227	1.259*
	Gruplar içi	12	25.597	
	Toplam	17		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	1.915	496.579**
	Gruplar içi	174	0.004	
	Toplam	179		

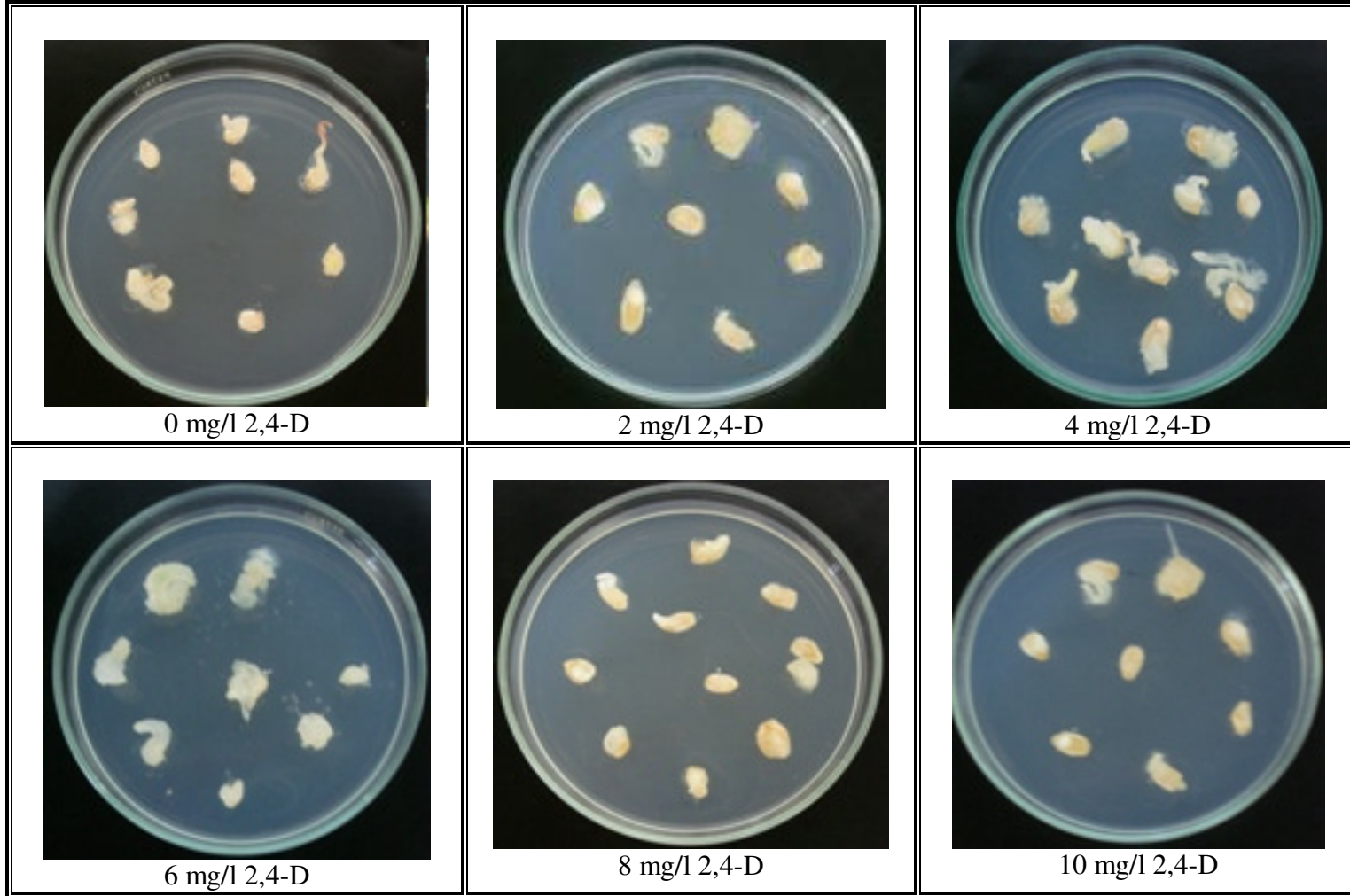
** 0.01 düzeyinde önemli

* 0.05 düzeyinde önemli

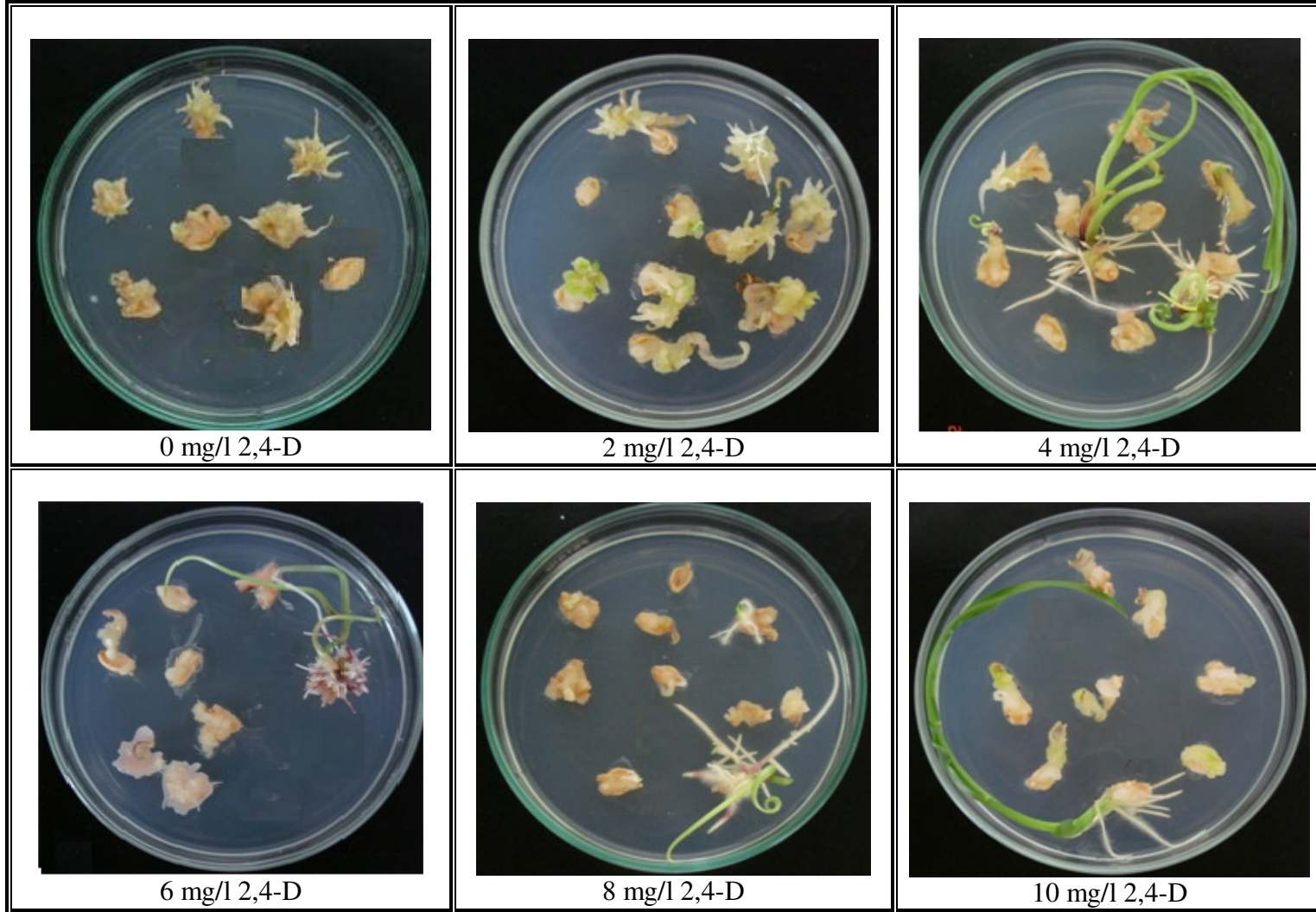
Kallus oluşum oranları yönünden BC 666 çeşidine bakıldığında, 4 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken (%93), en az kallus oluşumu hormon uygulanmayan örneklerde (%63) belirlenmiştir (Çizelge 4.13.).

Elde edilen verilere göre, BC 666 mısır çeşidinde 4 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin (2.48 g) en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus ağırlığının 0.38 g olduğu belirlenmiştir.

Sürgün gelişimi ise en çok hormon içermeyen örnekler ile 4 ve 6 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%20) gözlenirken, en az 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%10) gözlenmiştir (Çizelge 4.13.).



Şekil 4.13. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan BC 666 mısır çeşidinde kallus oluşumu.



Şekil 4.14. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan BC 666 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.

4.8. 2,4-D uygulanan ADA 8924 mısır çeşidinde gözlenen değişimler

Çizelge 4.15. ADA 8924 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında *in vitro* parametrelere tepkileri (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Tekrar	Kallus Oluşum Oranı	Sürgün Gelişimi Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
0	a	70	20	0.47
	b	80	40	0.48
	c	70	30	0.39
		$\bar{x}=73\pm3.3$	$\bar{x}=30\pm5.8$	$\bar{x}=0.44\pm0.03$
2	a	100	30	2.15
	b	90	20	2.18
	c	100	20	2.23
		$\bar{x}=97\pm3.3$	$\bar{x}=23\pm3.3$	$\bar{x}=2.82\pm0.09$
4	a	100	10	2.16
	b	100	20	2.14
	c	90	10	2.05
		$\bar{x}=97\pm3.3$	$\bar{x}=13\pm3.3$	$\bar{x}=2.74\pm0.06$
6	a	80	20	2.04
	b	80	10	2.07
	c	70	20	1.96
		$\bar{x}=77\pm3.3$	$\bar{x}=17\pm3.3$	$\bar{x}=2.57\pm0.04$
8	a	90	10	2.00
	b	100	30	1.92
	c	80	10	1.95
		$\bar{x}=90\pm5.8$	$\bar{x}=17\pm6.7$	$\bar{x}=2.50\pm0.02$
10	a	80	10	1.85
	b	100	20	1.80
	c	80	10	1.71
		$\bar{x}=87\pm6.7$	$\bar{x}=13\pm3.3$	$\bar{x}=2.41\pm0.04$

ADA 8924 mısır çeşidi genotipi için 10'ar adet embriyo içeren petrilere üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Uygulanan farklı 2,4-D dozlarından elde edilen kallus örnekleri Şekil 4.15'te ve kök ucu oluşturan örnekler ise Şekil 4.16'da gösterilmiştir.

Farklı 2,4-D dozları uygulanan ADA 8924 çeşidinde kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığı oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.16'da verilmiştir. Buna

göre; ADA 523 çeşidine uygulanan 2,4-D dozlarının kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığına etkisinin çok önemli ($p<0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.16.).

Çizelge 4.16. ADA 8924 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

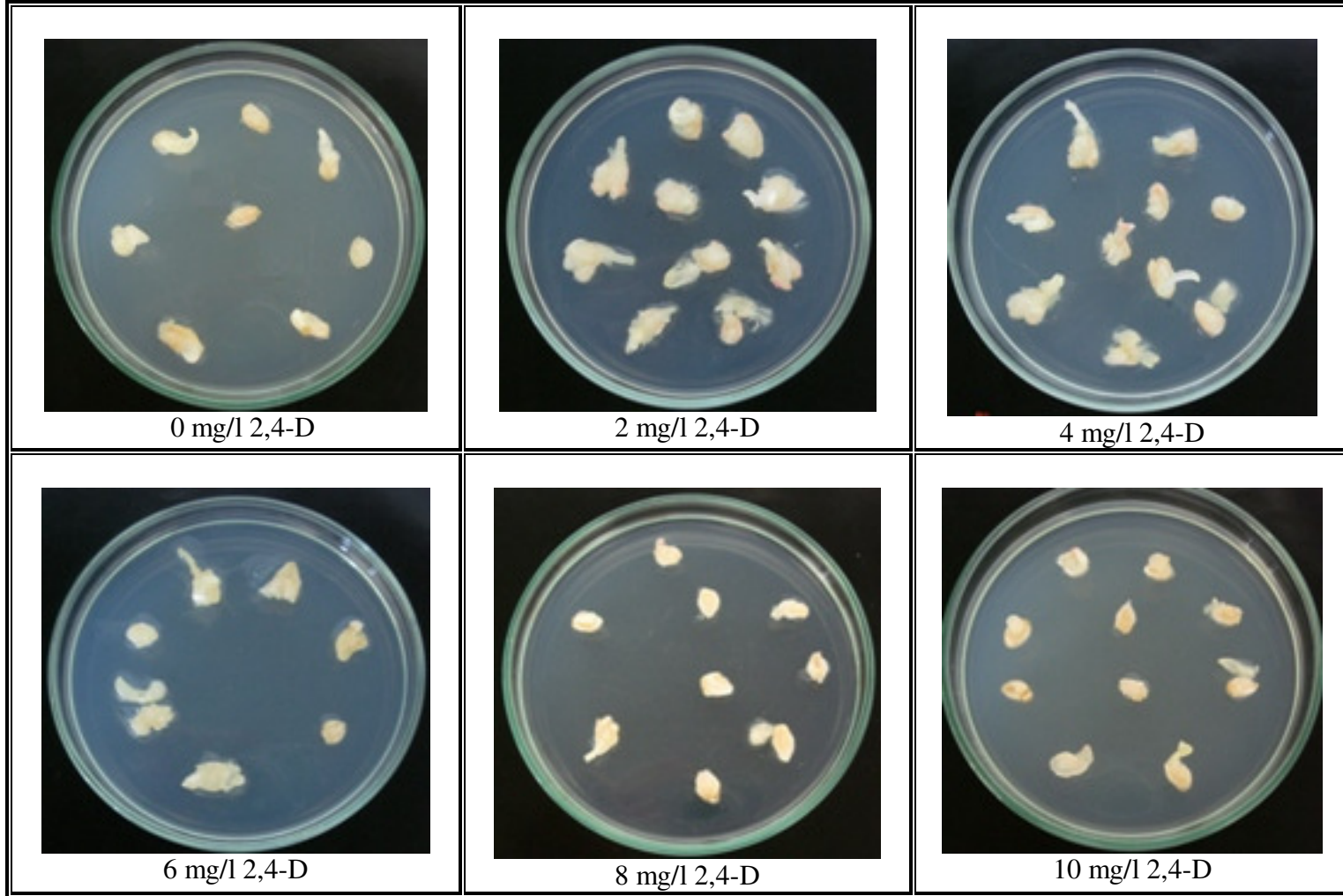
		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	338.889	6.100**
	Gruplar içi	12	55.556	
	Toplam	17		
Sürgün Gelişim Oranı	Gruplar arası	5	128.889	2.109**
	Gruplar içi	12	61.111	
	Toplam	17		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	1.286	443.280**
	Gruplar içi	174	0.003	
	Toplam	179		

** 0.01 düzeyinde önemli

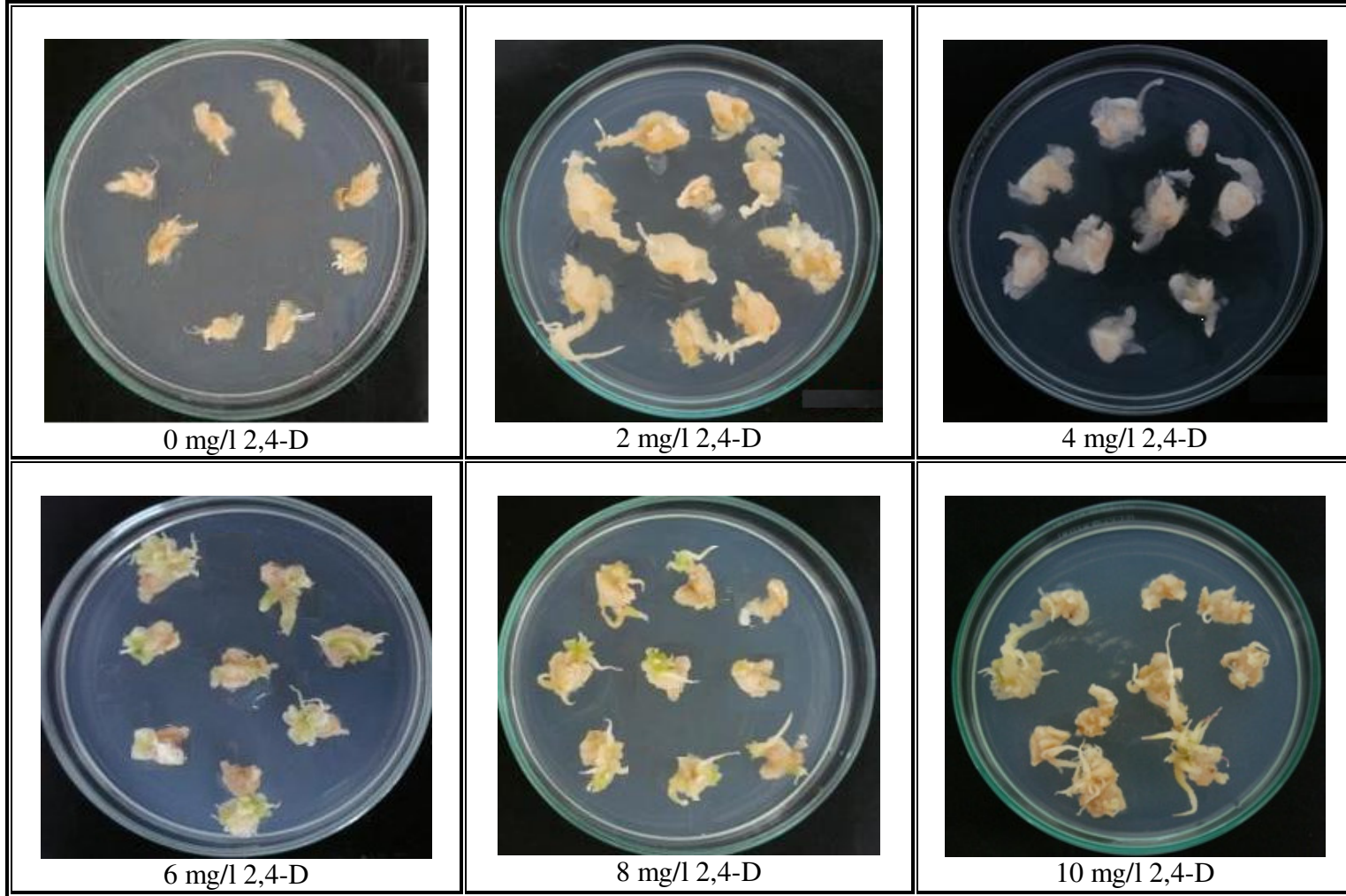
* 0.05 düzeyinde önemli

Kallus oluşum oranları yönünden ADA 8924 çeşidine bakıldığında, 2 ve 4 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken (%97), 8 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %90, 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %87 olduğu gözlenmiştir. Hormon uygulanmayan örneklerde de kallus oluşumunun %73 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.15.).

Elde edilen verilere göre, ADA 8924 mısır çeşidinde 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin (2.82 g) en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus ağırlığının 0.44 g olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişimi ise en çok hormon uygulanmayan örneklerde (%30) gözlenirken, en az 4 ve 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%13) gözlenmiştir (Çizelge 4.15.).



Şekil 4.15. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan ADA 8924 mısır çeşidinde kallus oluşumu.



Şekil 4.16. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan ADA 8924 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.

4.9. 2,4-D uygulanan HELEN mısır çeşidinde gözlenen değişimler

Çizelge 4.17. HELEN mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında *in vitro* parametrelere tepkileri (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Tekrar	Kallus Oluşum Oranı	Sürgün Gelişimi Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
0	a	90	30	0.35
	b	80	20	0.41
	c	100	50	0.43
		$\bar{x}=90\pm 5.8$	$\bar{x}=33\pm 8.8$	$\bar{x}=0.40\pm 0.02$
2	a	100	30	2.64
	b	100	20	2.57
	c	100	10	2.31
		$\bar{x}=100\pm 0$	$\bar{x}=20\pm 5.8$	$\bar{x}=2.51\pm 0.01$
4	a	100	20	2.56
	b	90	20	2.65
	c	100	20	2.42
		$\bar{x}=97\pm 3.3$	$\bar{x}=20\pm 0$	$\bar{x}=2.54\pm 0.07$
6	a	90	20	2.55
	b	100	10	2.48
	c	100	20	2.44
		$\bar{x}=97\pm 3.3$	$\bar{x}=17\pm 3.3$	$\bar{x}=2.49\pm 0.03$
8	a	90	10	2.27
	b	100	20	2.05
	c	80	10	2.14
		$\bar{x}=90\pm 5.8$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=2.15\pm 0.06$
10	a	100	10	2.12
	b	90	10	1.95
	c	90	20	2.07
		$\bar{x}=93\pm 3.3$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=2.05\pm 0.05$

HELEN mısır çeşidi genotipi için 10'ar adet embriyo içeren petrilere üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Uygulanan farklı 2,4-D dozlarından elde edilen kallus örnekleri Şekil 4.17'de ve kök ucu oluşturan örnekler ise Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

Farklı 2,4-D dozları uygulanan HELEN çeşidinde kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığı oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Buna göre; HELEN çeşidine uygulanan 2,4-D dozlarının kallus oluşumu ve sürgün gelişimine etkisinin önemli ($p<0.05$) olduğu, kallus ağırlığına etkisinin çok önemli ($p<0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.18.).

Çizelge 4.18. HELEN çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

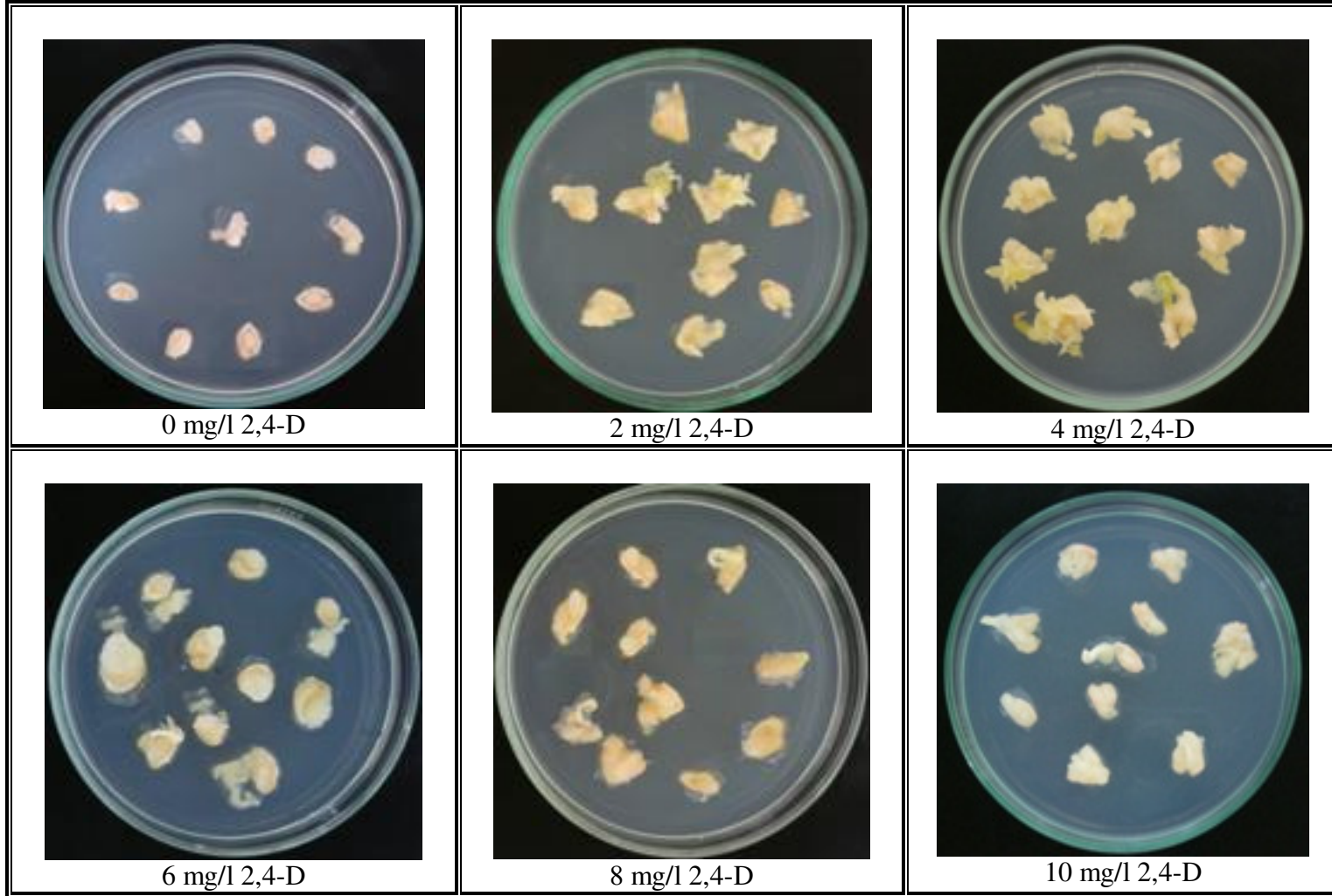
		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	108.031	0.913*
	Gruplar içi	12	118.387	
	Toplam	17		
Sürgün Gelişim Oranı	Gruplar arası	5	78.503	2.264*
	Gruplar içi	12	34.668	
	Toplam	17		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	2.031	178.259**
	Gruplar içi	174	0.011	
	Toplam	179		

** 0.01 düzeyinde önemli

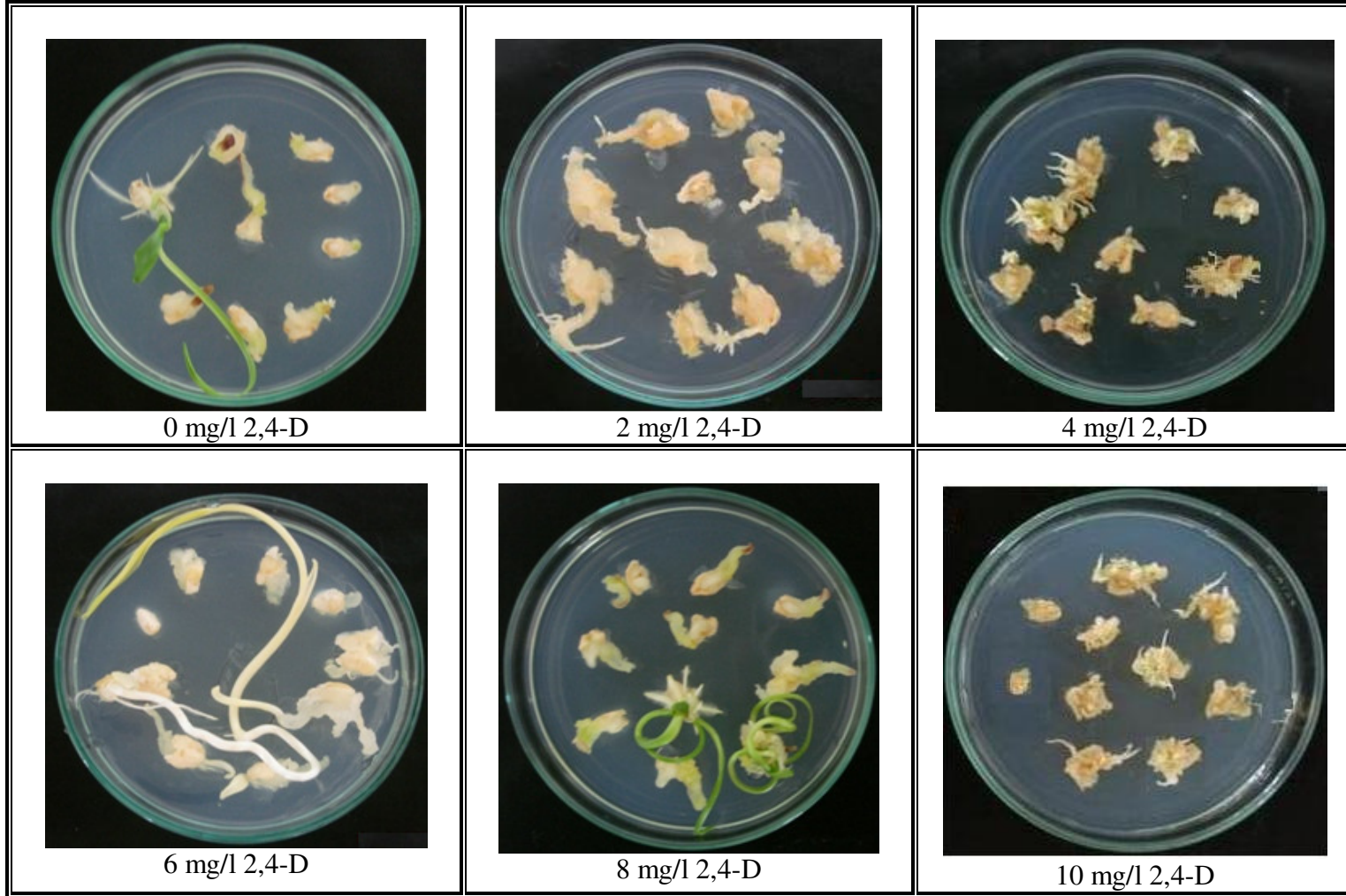
* 0.05 düzeyinde önemli

Kallus oluşum oranları yönünden HELEN çeşidine bakıldığında, 2 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken (%100), 4 ve 6 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %97, 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %93 olduğu gözlenmiştir. 8 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde ve hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus oluşumunun %90 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.17.).

Elde edilen verilere göre, ADA 8924 mısır çeşidinde 4 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin (2.54 g) en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus ağırlığının en az (0.40 g) olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişimi ise en çok hormon uygulanmayan örneklerde (%33) gözlenirken, en az 8 ve 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%13) gözlenmiştir (Çizelge 4.17.).



Şekil 4.17. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan HELEN mısır çeşidinde kallus oluşumu.



Şekil 4.18. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan HELEN mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.

4.10. 2,4-D uygulanan DKC 6022 mısır çeşidinde gözlenen değişimler

Çizelge 4.19. DKC 6022 mısır çeşidinin farklı 2,4-D dozlarında *in vitro* parametrelere tepkileri (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Tekrar	Kallus Oluşum Oranı	Sürgün Gelişimi Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
0	a	60	30	0.52
	b	90	20	0.46
	c	100	20	0.41
		$\bar{x}=83\pm 12$	$\bar{x}=23\pm 3.3$	$\bar{x}=0.46\pm 0.03$
2	a	100	20	2.94
	b	90	20	2.82
	c	90	30	2.79
		$\bar{x}=93\pm 3.3$	$\bar{x}=23\pm 3.3$	$\bar{x}=2.85\pm 0.05$
4	a	90	10	2.83
	b	90	30	2.66
	c	90	20	2.75
		$\bar{x}=90\pm 0$	$\bar{x}=20\pm 5.8$	$\bar{x}=2.75\pm 0.05$
6	a	100	30	2.64
	b	90	20	2.57
	c	90	30	2.60
		$\bar{x}=93\pm 3.3$	$\bar{x}=27\pm 3.3$	$\bar{x}=2.60\pm 0.02$
8	a	90	20	2.56
	b	80	20	2.59
	c	90	10	2.53
		$\bar{x}=87\pm 3.3$	$\bar{x}=17\pm 3.3$	$\bar{x}=2.56\pm 0.02$
10	a	90	10	2.48
	b	70	20	2.43
	c	90	10	2.26
		$\bar{x}=83\pm 6.7$	$\bar{x}=13\pm 3.3$	$\bar{x}=2.39\pm 0.07$

DKC 6022 mısır çeşidi genotipi için 10'ar adet embriyo içeren petrilere üç tekrarlamalı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Uygulanan farklı 2,4-D dozlarından elde edilen kallus örnekleri Şekil 4.19'da ve kök ucu oluşturan örnekler ise Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

Farklı 2,4-D dozları uygulanan DKC 6022 çeşidinde kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığı oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Buna göre, DKC 6022 çeşidine uygulanan 2,4-D dozlarının kallus oluşumu, sürgün gelişimi ve kallus ağırlığına etkisinin çok önemli ($p < 0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.20.).

Çizelge 4.20. DKC 6022 çeşidinde 2,4-D miktarının, sürgün ve kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

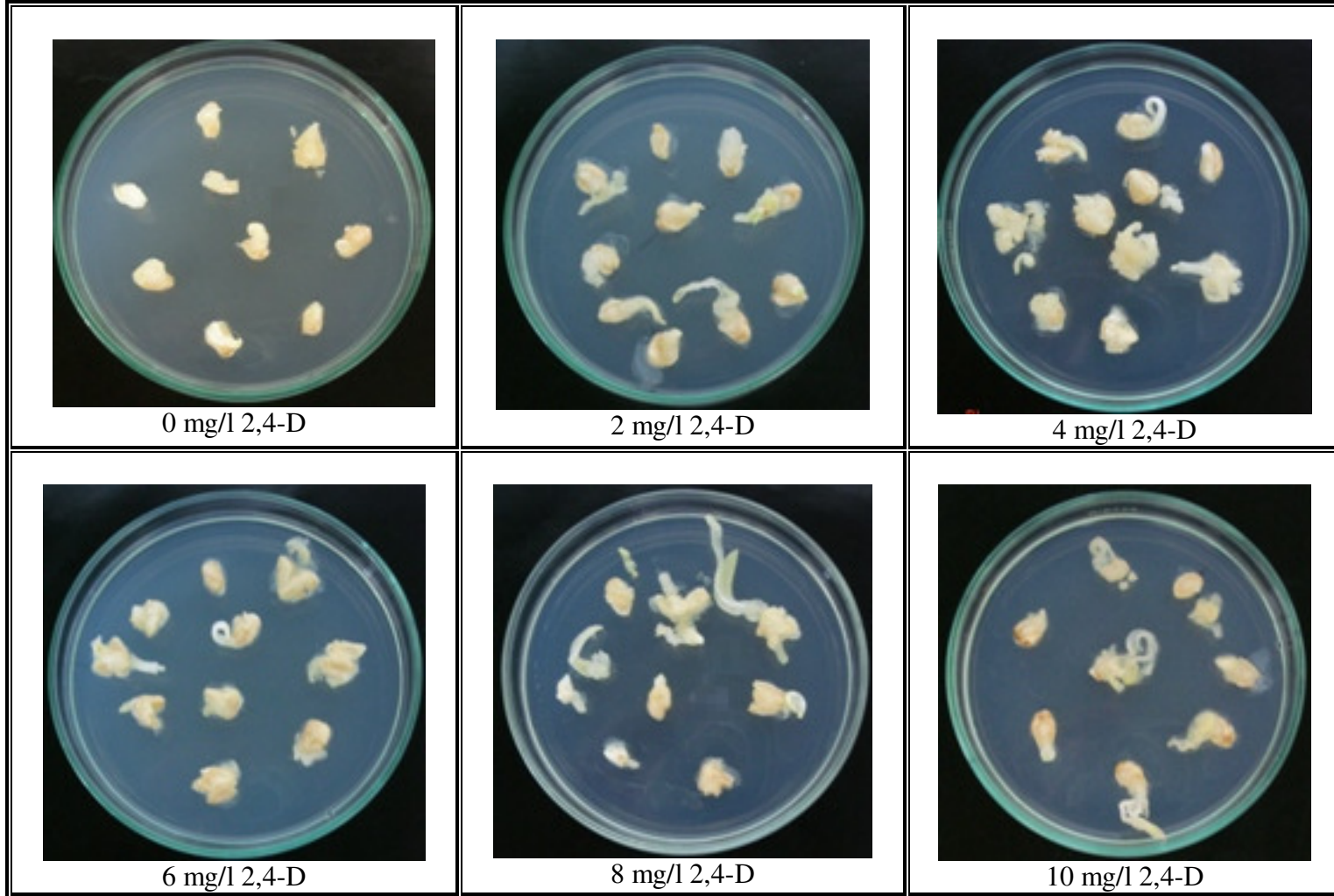
		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	63.144	0.536**
	Gruplar içi	12	117.757	
	Toplam	17		
Sürgün Gelişim Oranı	Gruplar arası	5	39.837	1.672**
	Gruplar içi	12	23.831	
	Toplam	17		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	2.422	454.192**
	Gruplar içi	174	0.005	
	Toplam	179		

** 0.01 düzeyinde önemli

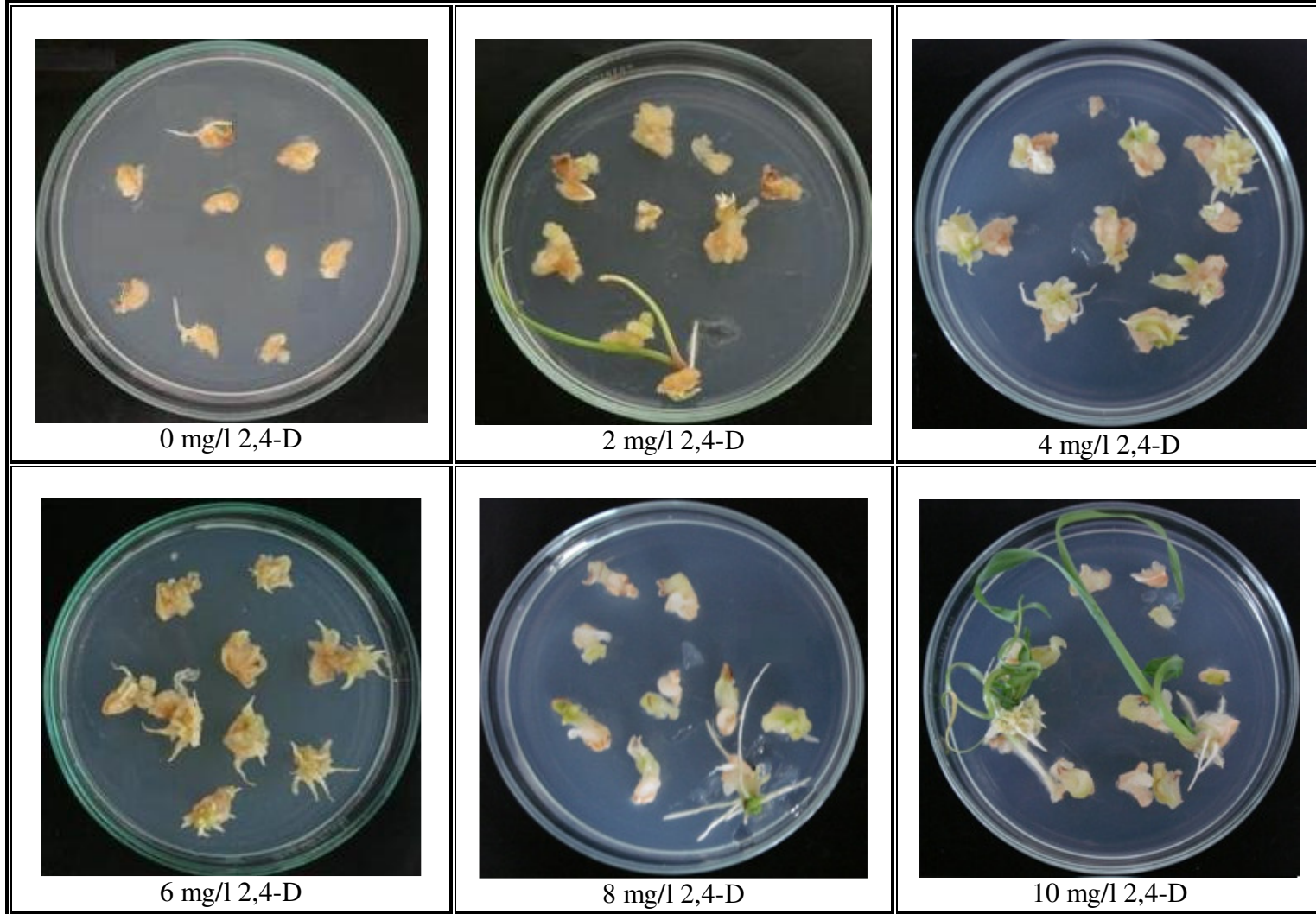
* 0.05 düzeyinde önemli

Kallus oluşum oranları yönünden DKC 6022 çeşidine bakıldığında, 2 ve 6 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken (%93), 4 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %90, 8 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde kallus oluşumunun %87 olduğu gözlenmiştir. 10 mg/l 2,4-D uygulanan ve hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus oluşumunun %83 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.19.).

Elde edilen verilere göre, DKC 6022 mısır çeşidinde 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin (2.85 g) en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, hormon uygulanmayan örneklerde ise kallus ağırlığının en az (0.46 g) olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişimi ise en çok 6 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%27) gözlenirken, en az 10 mg/l 2,4-D uygulanan örneklerde (%13) gözlenmiştir (Çizelge 4.19.).



Şekil 4.19. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan DKC 6022 mısır çeşidinde kallus oluşumu.



Şekil 4.20. Farklı dozlarda 2,4-D uygulanan DKC 6022 mısır çeşidinde kök ucu oluşumu.

Araştırma bulgularına göre, mısır çeşitlerinin olgun embriyolarında 2,4-D'siz MS ortamında da kallus oluşumu gözlenmiştir. Bu nedenle başka bir marka MS ortamında (Duchefa) 2,4-D hormonu uygulamadan, mısırın olgun embriyolarında kallus oluşumuna bakılmıştır. Bu çerçevede yapılan çalışmalar sonucunda, Duchefa Marka MS ile hazırlanan 2,4-D'siz ortamda da mısır embriyolarında kallus oluşumu gözlenmiştir.

Elliott ve Greenwood (1974), Pilet (1976), Rivier ve Pilet (1974), Pernet ve Pilet (1976), Gabathuler ve Pilet (1981), Pilet ve Saugy (1985) ve Lur ve Setter (1993) tarafından yapılan mısır bitkisi doku kültürü çalışmaları sonucunda, mısır bitkisinin yapısında bulunan IAA miktarının yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumda, MS ortamı oksin içermese bile, yüksek besin ortamında, mısır bitkisinde kültür koşullarında kallus oluşumu gözlenebilmektedir. Söz konusu çalışmalarla, yapılan tez çalışmasında elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada, kontrol gruplarındakileri de dikkate alınarak, diğer dozlardaki kallus artışları gözlemlenmiş ve en yüksek kallus oluşturma protokolü belirlenmiştir.

4.11. 2,4-D uygulanan tüm mısır çeşitlerinde gözlenen değişimler

Çalışmada materyal olarak kullanılan mısır çeşitlerinin her biri için kallus oluşum oranı, sürgün gelişim oranı ve kallus ağırlığı olmak üzere elde edilen veriler çizelgeler haline getirilmiştir.

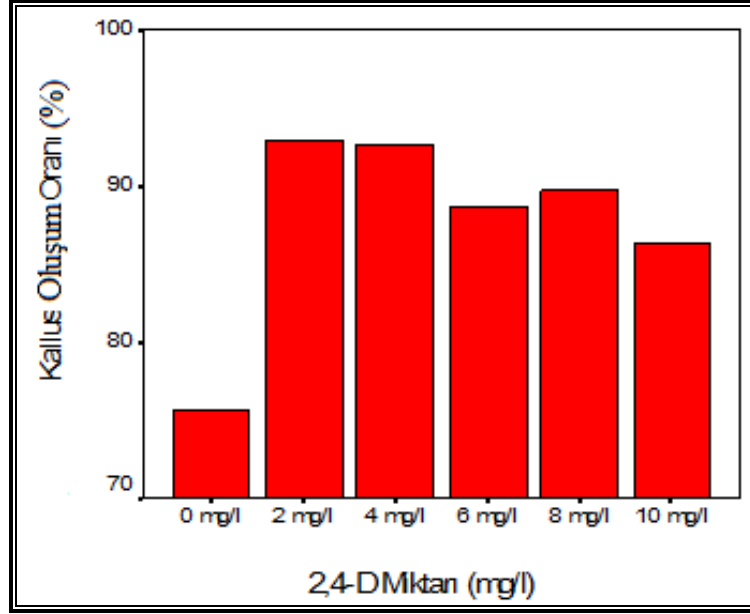
Farklı dozlarda 2,4-D oksini içeren MS ortamlarında kallus oluşumu Çizelge 4.21'de sunulmuştur. Kallus oluşumu ortalama olarak, en çok 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan mısır embriyolarında gözlenirken, daha sonra sırasıyla, 4 mg/l, 8 mg/l, 6 mg/l, 10 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerde ve en son 2,4-D uygulanmayan örneklerde belirlenmiştir (Şekil 4.21).

Söz konusu tez çalışmasına paralel olarak, buğdayda olgun embriyo kültüründe 2,4-D'nin farklı miktarlarının kallus oluşumu üzerine olan etkilerini araştıran Ozias-Akins ve Vasil (1983), kallus oluşumunda 2 mg/l 2,4-D miktarının optimum olduğu belirtmişlerdir. Wang (1987) ve Naqvi ve arkadaşları (2002)'nin olgunlaşmış mısır embriyolarında yaptığı çalışmalarda ise, 2 mg /l 2,4-D kullanılan örneklerde, kallus oluşumu en yüksek oranda bulunmuştur.

Çizelge 4.21. Farklı dozlarda 2,4-D oksini içeren ortamlarda çeşitlere göre kallus oluşumu (%).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Mısır Çeşidi									
	Pioneer 3223	Pioneer 31N27	Pioneer 31P41	Pioneer 34N24	TECTOR	ADA 523	BC 666	ADA 8924	HELEN	DKC 6022
0 mg/l	73.3±3.3 b ¹	70.0±5.8 c	83.3±12.0 c	73.3±8.8 b	73.3±8.8 b	73.3±8.8 b	63.3±8.8 b	73.3±3.3 c	90.0±5.8 c	83.3±12.01 c
2 mg/l	93.3±3.3 a	86.7±6.7 abc	96.7±3.3 a	90.0±5.8 ab	96.7±3.3 a	96.7±3.3 a	80.0±0 ab	96.7±3.3 a	100.0±0 a	93.3±3.3 ab
4 mg/l	93.3±3.3 a	86.7±6.7 abc	96.7±3.3 a	86.7±6.7 ab	93.3±3.3 a	90.0±5.8 ab	93.3±3.3 a	96.7±3.3 a	96.7±3.3 ab	90.0±0 abc
6 mg/l	90.0±5.8 ab	90.0±5.8 ab	93.3±3.3 ab	86.7±8.8 ab	86.7±3.3 b	93.3±3.3 ab	80.0±5.8 ab	76.7±3.3 bc	96.7±3.3 ab	93.3±3.3 ab
8 mg/l	93.3±3.3 a	86.7±6.7 abc	93.3±3.3 ab	90.0±5.8 ab	86.7±3.3 b	90.0±5.8 ab	90.0±5.8 a	90.0±5.8 ab	90.0±5.8 c	86.7±3.3 abc
10 mg/l	90.0±5.8 ab	90.0±5.8 ab	91.7±2.6 abc	86.7±8.8 ab	83.3±3.3 b	83.3±3.3 ab	80.0±5.8 ab	86.7±6.7 abc	93.3±3.3 abc	83.3±3.3 c
Ortalama	88.9±2.3	85.0±2.8	91.7±2.6	85.6±2.9	87.8±2.6	87.8±2.6	81.1±3.0	87.2±2.8	94.4±1.7	88.3±2.3

¹ Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.21. Uygulanan 2,4-D miktarına göre ortalama kallus oluşum oranları (%).

Ancak, mısır çeşitlerine ayrı ayrı bakıldığında, TECTOR (%96.7), ADA 523 (%96.7), HELEN (%100) mısır çeşitlerinde en yüksek kallus oluşumu 2 mg/l 2,4-D dozunda gözlenirken, BC 666 (%93.3) mısır çeşidinde en yüksek kallus oluşumu 4 mg/l 2,4-D dozunda gözlenmiştir. Pioneer 31P41 (%96.7) ve ADA 8924 (%96.7) mısır çeşitlerinde 2 ve 4 mg/l 2,4-D dozunda, Pioneer 3223 (%93.3) mısır çeşidinde 2,4 ve 8 mg/l 2,4-D dozunda ve Pioneer 31N27 (%90) mısır çeşidinde 6 ve 10 mg/l 2,4-D dozunda, Pioneer 34N24 mısır çeşidinde (%90) 2 ve 8 mg/l 2,4-D dozunda ve DKC 6022 (%93.3) mısır çeşidinde 2 ve 6 mg/l 2,4-D dozunda en yüksek kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.21).

2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan HELEN (%100) mısır çeşidinde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken, 2,4-D uygulanmayan BC 666 (%63.3) mısır çeşidinde en düşük kallus oluşumu meydana gelmiştir (Çizelge 4.21). Oluşan kallus sayısının mısır çeşitlerine göre değişim göstermesinin en önemli nedeni, kullanılan eksplant kaynağının ve genotipinin farklı olmasıdır. Örneğin, eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış embriyoların diğer eksplantlara göre doku kültürüne daha iyi tepki verdiği, Özgen vd (1996), Huang ve Wei (2004) tarafından yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir.

Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular, Huang ve Wei (2004) tarafından yapılan çalışma tarafından desteklenmektedir. Huang ve Wei (2004)'ün 7 mısır hattında kallus oluşumundaki farklılıkları gözlemlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, kallus oluşumu için optimal 2,4-D dozu 4 mg/l olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.22. Tüm çeşitlerde 2,4-D miktarı ve kallus oluşumu (%) değişkenlerinin çapraz tablosu.

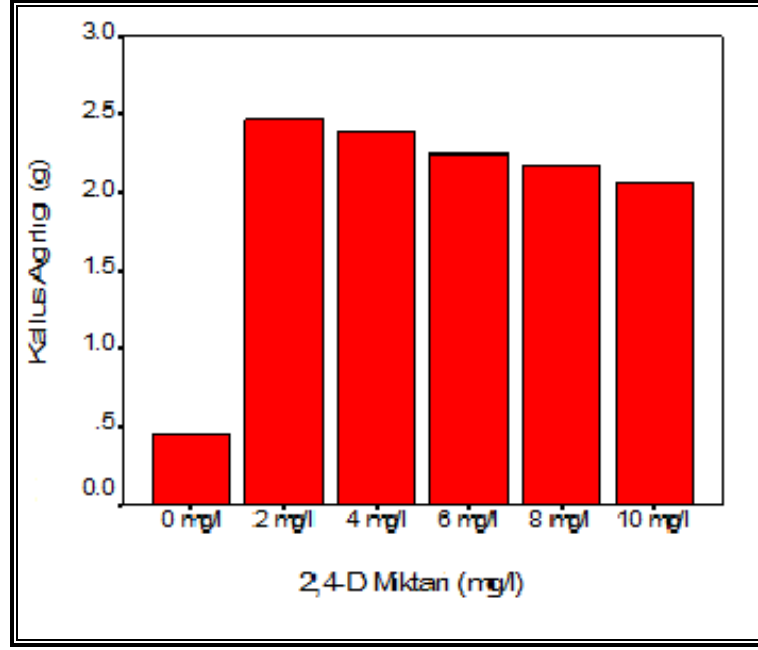
		Kallus Oluşum Oranı (%)						Toplam
		50	60	70	80	90	100	
2,4-D Miktarı (mg/l)	0 mg/l	1	7	8	5	6	3	30
	2 mg/l	0	0	0	6	9	15	30
	4 mg/l	0	0	0	5	10	15	30
	6 mg/l	0	0	3	6	13	8	30
	8 mg/l	0	0	1	8	12	9	30
	10 mg/l	0	0	3	11	10	6	30
	Toplam	1	7	15	41	60	56	180

2,4-D içermeyen 14 petride, 2 mg/l 2,4-D içeren 26 petride, 4 mg/l 2,4-D içeren 20 petride, 6 mg/l 2,4-D içeren 19 petride, 8 mg/l 2,4-D içeren 9 petride, 10 mg/l 2,4-D içeren 10 petride bulunan tüm embriyolarda kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.22.).

2,4-D içermeyen 5 petride, 2 mg/l 2,4-D içeren 6 petride, 4 mg/l 2,4-D içeren 5 petride, 6 mg/l 2,4-D içeren 6 petride, 8 mg/l 2,4-D içeren 8 petride, 10 mg/l 2,4-D içeren 11 petride %80 kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.22.).

2,4-D içermeyen 6 petride, 2 mg/l 2,4-D içeren 9 petride, 4 mg/l 2,4-D içeren 10 petride, 6 mg/l 2,4-D içeren 13 petride, 8 mg/l 2,4-D içeren 12 petride, 10 mg/l 2,4-D içeren 10 petride %90 kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.22.).

2,4-D içermeyen 8 petride, 6 mg/l 2,4-D içeren 3 petride, 8 mg/l 2,4-D içeren 1 petride, 10 mg/l 2,4-D içeren 3 petride %70, 2,4-D içermeyen 7 petride %60 ve 2,4-D içermeyen 1 petride %50 kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.22.).



Şekil 4.22. Uygulanan 2,4-D miktarlarına göre kallus ağırlığı (g).

Farklı dozlarda 2,4-D oksini içeren MS ortamlarında gözlenen kallus ağırlığı Şekil 4.23’de sunulmuştur. 2,4-D uygulanan mısır çeşitlerinde ortalama kallus ağırlığı en fazla 2 mg/l 2,4-D uygulanan mısır çeşitlerinde gözlenirken, daha sonra sırasıyla 4 mg/l, 6 mg/l, 8 mg/l, 10 mg/l uygulanan mısır çeşitlerinde ve en son 2,4-D dozu uygulanmayan mısır örneklerinde gözlenmiştir (Şekil 4.22.).

Mısır çeşitlerine ayrı ayrı bakıldığında, Pioneer 3223 (2.59 g), Pioneer 31N27 (2.11 g), Pioneer 31P41 (2.37 g), ADA 523 (2.58 g), ADA 8924 (2.19 g), DKC 6022 (2.85 g) mısır çeşitlerinde 2 mg/l 2,4-D dozunda en fazla kallus ağırlığı gözlenirken, Pioneer 34N24 (2.35 g), TECTOR (2.79g), BC 666 (2.48 g) ve HELEN (2.54 g) mısır çeşitlerinde 4 mg/l 2,4-D dozunda en fazla kallus ağırlığı gözlenmiştir (Çizelge 4.23.).

Çizelge 4.23. Farklı dozlarda 2,4-D oksini içeren ortamlarda çeşitlere göre kallus ağırlığı (g).

2,4-D Miktarı (mg/l)	Mısır Çeşidi									
	Pioneer 3223	Pioneer 31N27	Pioneer 31P41	Pioneer 34N24	TECTOR	ADA 523	BC 666	ADA 8924	HELEN	DKC 6022
0 mg/l	0.42±0.04 c ¹	0.54±0.02 e	0.46±0.03 e	0.47±0.03 d	0.48±0.03 d	0.47±0.02 c	0.38±0.03 d	0.45±0.03 e	0.40±0.02 c	0.46±0.03 d
2 mg/l	2.59±0.08 a	2.11±0.08 a	2.37±0.03 a	2.25±0.06 ab	2.65±0.06 b	2.58±0.05 a	2.46±0.05 a	2.19±0.02 a	2.51±0.1 a	2.85±0.05 a
4 mg/l	2.51±0.08 ab	1.74±0.06 b	2.23±0.05 b	2.35±0.06 a	2.79±0.05 a	2.34±0.06 b	2.48±0.04 a	2.12±0.03 ab	2.54±0.07 a	2.75±0.05 a
6 mg/l	2.42±0.04 ab	1.54±0.05 c	2.16±0.05 bc	2.12±0.08 bc	2.48±0.03 c	2.33±0.04 b	2.29±0.03 b	2.02±0.03 bc	2.49±0.03 a	2.60±0.02 b
8 mg/l	2.37±0.02 b	1.55±0.03 c	2.03±0.04 cd	2.13±0.03 bc	2.39±0.02 c	2.26±0.03 b	2.19±0.03 bc	1.96±0.02 c	2.15±0.06 b	2.56±0.02 b
10 mg/l	2.40±0.05 b	1.24±0.04 d	1.95±0.06 d	1.96±0.07 c	2.43±0.02 c	2.24±0.03 b	2.14±0.03 c	1.79±0.04 d	2.05±0.05 b	2.39±0.07 c
Ortalama	2.11±0.04	1.45±0.05	1.87±0.04	1.88±0.06	2.20±0.04	2.04±0.04	1.99±0.03	1.76±0.03	2.02±0.06	2.27±0.04

¹ Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.24. 2,4-D miktarının, kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığına göre varyans analizi sonuçları

		df	Kareler Ortalaması (K.O.)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar arası	5	1192.456	9.318**
	Gruplar içi	174	127.970	
	Toplam	179		
Kallus Ağırlığı (g)	Gruplar arası	5	16.954	226.768**
	Gruplar içi	174	0.075	
	Toplam	179		

** 0.01 düzeyinde önemli

2,4-D miktarının kallus oluşumu ve kallus ağırlığında etkisinin çok önemli olduğu ($p < 0,01$) bulunmuştur. Elde edilen Duncan gruplandırılması verilerine bakıldığında, 2,4-D miktarına bağlı olarak kallus ağırlığı ve kallus oluşum oranının değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.24.).

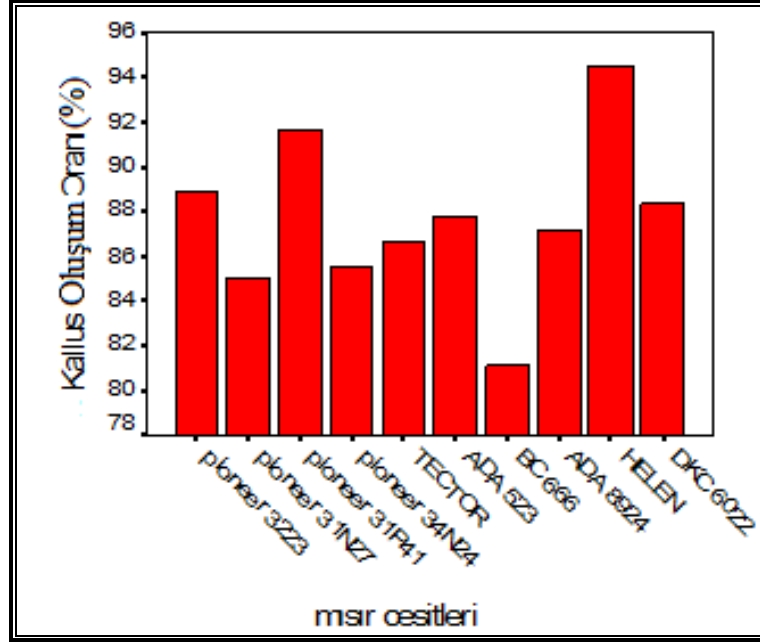
Bu araştırmada ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda kallus oluşumu için belirlenen optimal 2,4-D dozlarında gözlenen farklılığın, mısır genotiplerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.26. Genotipin, kallus oluşum oranına göre varyans analizi sonuçları.

		df	Kareler Ortalaması (KO)	F
Kallus Oluşum Oranı	Gruplar Arası	9	2,457	3,801**
	Gruplar içi	56	0,646	
	Toplam	179		

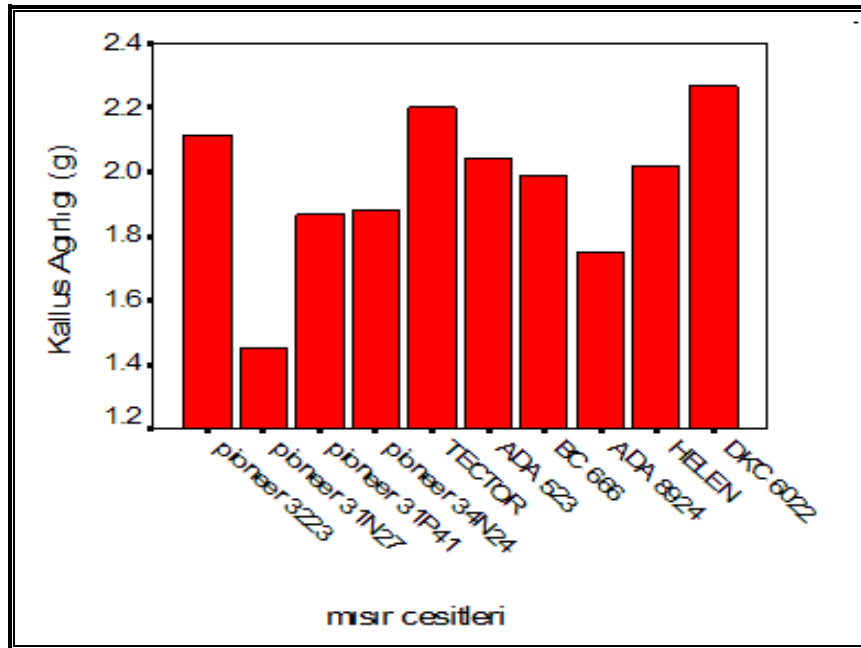
**0.01 düzeyinde önemli

Bu çalışmada kallus oluşumunda genotiplerin etkisinin çok önemli ($p < 0,01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.25). Bu konuda yapılan birçok çalışmada da benzer bulgular elde edilmiştir (Özgen vd 1996, Özgen vd 1998, Bohorova vd 2001, Delporte vd 2001, Li vd 2003, Przetakiewicz vd 2003, Zale vd 2004). Ayrıca, kallus oluşumu bakımından genotipler arasındaki farklılıkların bitki bünyesindeki hormon seviyesindeki farklılıklardan dolayı olabileceği belirtilmiştir (Bhaskaran ve Smith 1990, Carman 1990).



Şekil 4.23. Genotiplere göre ortalama kallus oluşum oranları (%).

Genotiplere göre ortalama kallus oluşum oranlarına bakıldığında, en çok HELEN mısır çeşidinde (%94.4) kallus oluşumu gözlenirken, daha sonra sırasıyla Pioneer 31P41 (%91.7), Pioneer 3223 (%88.9), DKC 6022 (%88.3), TECTOR ve ADA 523 (%87.8), ADA 8924 (%87.2), Pioneer 34N24 (%85.6), Pioneer 31N27 (%85) ve BC 666 (%81.1) mısır çeşitlerinde gözlenmiştir (Şekil 4.23., Çizelge 4.21.).



Şekil 4.24. Genotiplere göre ortalama kallus ağırlıkları (g).

Genotiplere göre ortalama kallus ağırlığına bakıldığında da DKC 6022 (2.27 g) mısır çeşidinde kallus ağırlığı en fazla iken, Pioneer 31N27 (1.45 g) mısır çeşidinde kallus ağırlığı en az olarak gözlenmiştir (Şekil 4.24., Çizelge 4.23.).

Çizelge 4.26. Tüm çeşitlerin ve kallus oluşum oranı (%) değişkenlerinin çapraz çizelgesi.

		Kallus Oluşum Oranı (%)						Toplam
		50	60	70	80	90	100	
Çeşitler	Pioneer 3223	0	0	2	3	8	5	18
	Pioneer 31N27	0	1	2	7	3	5	18
	Pioneer 31P41	0	1	0	3	5	9	18
	Pioneer 34N24	0	1	3	4	5	5	18
	TECTOR	0	1	1	4	10	2	18
	ADA523	0	1	1	4	7	5	18
	BC666	1	1	2	7	5	2	18
	ADA8924	0	0	3	6	2	7	18
	HELEN	0	0	0	2	7	10	18
	DKC 6022	0	1	1	1	10	3	18
	Toplam	1	7	16	41	62	53	180

Mısır çeşitlerindeki kallus oluşum oranı incelendiğinde, HELEN mısır çeşidine ait 10, Pioneer 31P41 mısır çeşidine ait 9, ADA 8924 mısır çeşidine ait 7, Pioneer 3223, Pioneer 31N27, Pioneer 34N24, ADA 523 mısır çeşitlerine ait 5'er, DKC 6022 mısır çeşidine ait 3, BC 666 ve TECTOR mısır çeşitlerine ait 2'şer petride tüm embriyolarda kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.26.).

DKC6022 mısır çeşidine ait 10, TECTOR mısır çeşidine ait 9, Pioneer 3223 mısır çeşidine ait 8, ADA 523 mısır çeşitlerine ait 7, Pioneer 31P41, Pioneer 34N24 ve BC 666 mısır çeşitlerine ait 5'er, Pioneer 31N27 mısır çeşidine ait 3 ve ADA8924 mısır çeşidine ait 2 petride %90 kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.26.).

Aynı zamanda, Pioneer 31N27 ve BC666 mısır çeşitlerine ait 7'şer, ADA8924 mısır çeşidine ait 6, Pioneer 34N24, TECTOR ve ADA523 mısır çeşitlerine ait 4'er, Pioneer 3223 ve Pioneer 31P41 mısır çeşitlerine ait 3'er, HELEN mısır çeşidine ait 2 ve DKC 6022 mısır çeşidine ait 1 petride %80 kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.26.).

Pioneer 34N24 ve ADA 8924 mısır çeşitlerine ait 3'er, Pioneer 3223, Pioneer 31N27 ve BC 666 mısır çeşitlerine ait 2'şer, TECTOR, ADA 523 ve DKC 6022 mısır çeşitlerin ait 1'er petride %70 kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.26.).

Pioneer 31N27, Pioneer 31P41, Pioneer 34N24, TECTOR, ADA 523, BC 666 ve DKC 6022 mısır çeşitlerin ait 1'er petride %60 kallus oluşumu ve BC666 mısır çeşidine ait 1 petride %50 kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.26.).

Çizelge 4.27. Kallus oluşum oranı, 2,4-D miktarı, sürgün gelişim oranı ve kallus ağırlığı arasındaki korelasyon

		Kallus Oluşum Oranı	2,4-D Miktarı (mg/l)	Sürgün Gelişim Oranı	Kallus Ağırlığı (g)
Kallus Oluşum Oranı	Pearson Korelasyonu	1,000	-0,247(**)	-0.163(*)	-
	Sig (p).	-	0,021	0,029	0,042
	N	180	180	180	180
2,4-D Miktarı (mg/l)	Pearson Korelasyonu	-0,247(**)	1,000	-0,441(**)	-0,457(**)
	Sig (p).	0,021	-	-	-
	N	180	180	180	180
Sürgün Gelişim Oranı	Pearson Korelasyonu	-0.163(*)	-0,441(**)	1,000	-0,338(**)
	Sig (p).	0,029	-	-	-
	N	180	180	180	180
Kallus Ağırlığı (g)	Pearson Korelasyonu	-	-0,457(**)	-0,338(**)	1,000
	Sig (p).	0,042	-	-	-
	N	180	180	180	180

* p<0,05 seviyesinde önemli

** p<0,01 seviyesinde önemli

Mısırdaki olgun embriyo kültüründe karakterler arasında yapılan korelasyon analizi sonucunda, 2,4-D miktarı ile kallus oluşum oranı arasında orta seviyede, negatif ve anlamlı bir ilişki olduğu görülmektedir ($r = -0,247$, $p \leq 0,05$). Buna göre 2,4-D miktarı arttıkça, kallus oluşumunun azaldığı söylenebilir. 2,4-D miktarı ile sürgün gelişim oranı arasında orta seviyede, negatif ve anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir ($r = -0,441$, $p \leq 0,05$). Buna göre 2,4-D miktarı arttıkça, sürgün gelişiminin de azaldığı söylenebilir (Çizelge 4.27).

Kallus ağırlığı ile somatik embriyolarda sürgün gelişim oranı arasında orta seviyede, olumsuz ve anlamlı bir ilişki olduğu görülmektedir ($r = -0,338$, $p \leq 0,05$). Buna göre sürgün gelişimi artıkça, kallus ağırlığının azaldığı söylenebilir (Çizelge 4.27).

Aynı şekilde, 2,4-D miktarı ile kallus ağırlığı oranı arasında orta seviyede, olumsuz ve anlamlı bir ilişki olduğu görülmektedir ($r = -0,457$, $p \leq 0,05$). Buna göre 2,4-D miktarı artıkça, kallus ağırlığının azaldığı söylenebilir. Kallus oluşum oranı ile kallus ağırlığı arasında ise, herhangi bir ilişki bulunamamıştır (Çizelge 4.27).

Özgen vd (1998) tarafından buğdayın olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyo kültüründe yapılan çalışma sonucunda da, kallus oluşum oranı ve kallus ağırlığı arasındaki ilişkinin önemsiz olduğu belirlenmiştir.

4.12. 2,4-D'nin mısır kromozomlarına etkisi

Hücre döngüsü üzerine bitki düzenleyicilerinin etkili olduğu ve bu durumun somaklonal varyasyona neden olduğu bilinmektedir (George 1993).

Bu çalışmada, farklı dozlarda, farklı mısır çeşitlerine 2,4-D oksininin uygulanması ile elde edilen kök uçlarının mikroskopik analizi sonucunda, 10 mg 2,4-D ile muamale edilen Pioneer 31N27 ($2n=18$), Pioneer 3223 ($2n=19$) ve Pioneer 34N24 ($2n=19$) mısır çeşitlerinin kromozom sayılarında değişim gözlenirken, geriye kalan farklı dozlarda 2,4-D uygulanan mısır çeşitlerinin kromozom sayılarında değişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.28.).

Pioneer 31N27, Pioneer 3223 ve Pioneer 34N24 mısır çeşitlerine uygulanan yüksek dozda (10 mg/l) 2,4-D'nin meydana getirdiği mitotik anormalliklerin, "aneuploidi" (genomdaki kromozomların sayısının değişmesi) olduğu ve kromozom sayısının azalması (hipoploidi) şeklinde meydana geldiği gözlenmiştir.

Örneklere gözlenen bu kromozomal azalma "monosomi" (diploid bir canlıda sadece bir kromozomun eksik olması durumu ($2n-1$)) ve "nullisomi" (diploid bir canlıda bir kromozomun homologula beraber eksik olması durumu ($2n-2$)) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.28. Çalışılan çeşitlerde farklı 2,4-D dozlarında gözlenen kromozomlar.

Mısır çeşidi	2,4-D dozu (mg/l)	Kromozom sayısı	Mısır çeşidi	2,4-D dozu (mg/l)	Kromozom sayısı
1. Pioneer 31N27	0	2n=20	6. ADA 8924	0	2n=20
	2	2n=20		2	2n=20
	4	2n=20		4	2n=20
	6	2n=20		6	2n=20
	8	2n=20		8	2n=20
	10	2n=18		10	2n=20
2. Pioneer 31P41	0	2n=20	7. DKC 6022	0	2n=20
	2	2n=20		2	2n=20
	4	2n=20		4	2n=20
	6	2n=20		6	2n=20
	8	2n=20		8	2n=20
	10	2n=20		10	2n=20
3. Pioneer 3223	0	2n=20	8. BC 666	0	2n=20
	2	2n=20		2	2n=20
	4	2n=20		4	2n=20
	6	2n=20		6	2n=20
	8	2n=20		8	2n=20
	10	2n=19		10	2n=20
4. ADA 523	0	2n=20	9. TECTOR	0	2n=20
	2	2n=20		2	2n=20
	4	2n=20		4	2n=20
	6	2n=20		6	2n=20
	8	2n=20		8	2n=20
	10	2n=20		10	2n=20
5. Pioneer 34N24	0	2n=20	10. HELEN	0	2n=20
	2	2n=20		2	2n=20
	4	2n=20		4	2n=20
	6	2n=20		6	2n=20
	8	2n=20		8	2n=20
	10	2n=19		10	2n=20

Monosomik bir bitkinin, hücre bölünmesi sırasında eş kromozomların bölünmemesi (non-disjunction) nedeniyle bir kromozomu eksik olan bir gametin normal bir gametle birleşmesi sonucu meydana geldiği bilinmektedir. Bitkide nullisomi ise, bir kromozomun homoloğuyla

beraber eksik olmasından dolayı bir kromozom çeşidinin hiç bulunmamasıdır. Nullisomik bitkiler tesadüfen aynı çeşit kromozomunu kaybetmiş iki gametin birleşmesi ile oluşmaktadır (Temizkan, 1994).

Bu çalışmaya paralel olarak De Klerk (1990) ve George (1993) 2,4-D oksinini aneuploidi gibi genetik anormalliklere neden olarak göstermektedir. Benzer şekilde, Sinha vd (1989), Butani ve Shukla (1994), Antonucci ve Colus (2000), 2,4-D gibi birçok pestisit bitki kromozomlarında anormalliklere neden olduğunu gözlemlemiştir. Chauhan ve Sundararaman (1990) ile Türkoğlu ve Koca (1997) tarafından yapılan araştırmalarda, bu tür anormalliklerin pestisit DNA üzerine olan etkisinden kaynaklandığı belirtilmektedir.

Bu çalışmada gözlenen kromozom sayısı varyasyonunun, DNA metilasyonundaki değişimlerden oluştuğu düşünülmektedir. DNA yüksek oranda metillendiği zaman gen aktivitesi baskılanmaktadır. *In vitro* ortamda doğal olmayan koşullar nedeniyle hücre fizyolojisini değiştiren bir stresin oluşmasıyla, DNA metilasyonunda değişim gözlenebilmekte ve böylece genetik varyasyon oluşmaktadır. Örneğin, 2,4-D'nin, havuç hücre kültüründe DNA'nın metilasyonuna ve dolayısıyla havuç kültürünün gelişmemesine neden olduğu kaydedilmiştir (LoSchiavo vd 1989).

Ayrıca Cai vd (1990) ile George (1993) tarafından da belirtildiği gibi, genetik varyasyonun meydana gelmesinde mısır çeşitlerinin genotip özelliklerinin ve kullanılan doku kültürü yönteminin çok etkili olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde;

2,4-D miktarının kallus oluşumu ve kallus ağırlığında etkisinin çok önemli olduğu bulunmuştur.

Pioneer 3223, Pioneer 31N27, Pioneer 31P41, ADA 523, ADA 8924 ve DKC 6022 mısır çeşitlerinde 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu, Pioneer 34N24, TECTOR, BC 666 ve HELEN mısır çeşitlerinde 4 mg/l 2,4-D dozu uygulanan örneklerin en yüksek kallus ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir.

Farklı dozlarda 2,4-D oksini uygulanan mısır çeşitlerinde kallus ağırlıklarına bakıldığında, 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan DKC 6022 mısır çeşidinde en yüksek kallus ağırlığı belirlenirken, hormon uygulanmayan BC 666 mısır çeşidinde en az kallus ağırlığı belirlenmiştir. Genotiplere göre kallus ağırlığına bakıldığında da yine DKC 6022 mısır çeşidinde kallus ağırlığı en fazla iken, Pioneer 31N27 mısır çeşidinde kallus ağırlığının en az olduğu gözlenmiştir.

Kallus oluşumunda genotiplerin etkisinin çok önemli olduğu belirlenmiştir. Genotiplere göre kallus oluşum oranlarına bakıldığında, en çok HELEN mısır çeşidinde kallus oluşumu gözlenirken, en az kallus oluşumunun BC 666 mısır çeşidinde olduğu belirlenmiştir.

Farklı 2,4-D dozları içeren MS ortamlarında ise, 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan HELEN mısır çeşidinde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken, hormon uygulanmayan BC 666 mısır çeşidinde ise en az kallus oluşumu meydana gelmiştir.

Farklı dozlarda, tüm mısır çeşitlerine 2,4-D uygulanması ile elde edilen kök uçlarının mikroskopik analizi sonucunda, 10 mg/l 2,4-D uygulanan Pioneer 31N27 (2n=18), Pioneer 3223 (2n=19) ve Pioneer 34N24 (2n=19) mısır çeşitlerinin kromozom sayılarında değişim gözlenirken, diğer 2,4-D uygulanan örneklerde kromozom sayılarında değişim gözlenmemiştir.

Mısırdaki, 2 mg/l 2,4-D uygulanması sonucunda, en yüksek kallus oluşumu ve kallus ağırlığı değerleri elde edilmiştir. Yine 2 mg/l 2,4-D uygulanan mısırların kromozom sayılarında da anormallik gözlenmemiştir. Elde edilen araştırma bulgularına bakıldığında, en yüksek kallus oluşumu ve gelişimi gösteren ve aynı zamanda kromozomal sapmalara neden olmayan oksin dozu 2 mg/l 2,4-D dozu olarak belirlenmiştir.

5. SONUÇ

Türkiye’de yaygın olarak ekimi yapılan farklı kökenli mısırların olgun embriyoları kullanılarak, doku kültüründe 2,4-D oksin dozlarının (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/l), farklı genotiplerde (Pioneer 31N27, Pioneer 31P41, Pioneer 3223, Pioneer 34N24, ADA8924, DKC6022, BC666, TECTOR, ADA523 ve HELEN) etkisi incelenmiştir.

Bu araştırmada materyal olarak kullanılan mısır, ucuz ve elde edilmesi kolay bir tahıl olması, son yıllarda yenilenebilir enerji kaynağı olarak gündeme gelmesi, insan ve hayvan beslenmesinde birçok ürünün hammaddesi olması, aynı zamanda kromozom sayısının az ($2n=20$) ve kromozomlarının çok küçük olmaması (8-10 μm) nedeniyle, deneme materyali olarak tercih edilmiştir. Ayrıca, olgun embriyolarda kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu yüksek olduğu ve yılın her döneminde kolay bulunabileceği için mısırın olgun embriyolarıyla çalışılmıştır.

Bitki büyüme düzenleyici olarak kullanılan 2,4-D oksini ise, doku kültürü çalışmalarında kallus oluşumunu başlatma ve geliştirmede etkin olduğundan dolayı kullanılmıştır. Aynı zamanda 2,4-D ilaveli kültürlerde aneuploidi, poliploidi ve endoreduplikasyon gibi genetik değişimlerin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada değişik 2,4-D dozları uygulanarak en etkili fakat kromozomal yapı açısından en zararsız kallus oluşturma protokolü belirlenmiştir.

Kromozom hatalarının gözlenmesi amacıyla bu çalışmada, bitki kök uçları kullanılmıştır. Kök ucu tekniğinin kullanılmasının nedeni, özellikle hatalara sebep olan kimyasalların çalışılması için uygun ve güvenilir olmasıdır.

Bu tez çalışmasında uygulanan *in vitro* ve *in vivo* yöntemler, elde edilen sonuçlar ve daha sonra yapılacak çalışmalara yönelik öneriler aşağıdaki şekilde sıralanabilir,

- Çalışmada, tohumlar 2 gün süre ile steril suda (35°C) bekletilip şişirilmiştir. Kallus ortamı için, farklı 2,4-D dozları (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/l), 30 g/l sakkaroz ve 6g/l agar kullanılmıştır. İnkübatörde $25\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve karanlıkta 11 gün bekletilerek gelişmesi sağlanan kalluslar, bu süre sonunda hormonsuz ortamlara aktarılmış ve petriler iklim

odasında 3 hafta süre ile $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat ışık- 8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında bekletilmiştir.

- 3 hafta sonunda 1-1.5 cm boyundaki kök uçları kesilerek, α -monobromonaftalinin sudaki doymuş eriyiğinde 16 saat bekletilmiştir. Daha sonra tespit için glasiyal asetik asitte, yarım saat oda sıcaklığında tutulmuş ve 1 N HCl asitte 60°C 'de 10 dakika süre ile hidroliz edilmiştir. Feulgen boya içerisinde bekletilen köklerin uç kısmının üzerine bir damla aseto-karmin boya damlatılarak preparat hazırlanmıştır.

- Işık mikroskopunda incelenen her preparatta, kromozomları en iyi şekilde boyanan, hücre protoplazması ile en iyi kontrastı oluşturan, kromozomları tam metafaz safhasında ve birbirinden ayrı olan ve kromozomları aynı düzlem üzerinde yayılış gösteren 5'er hücre belirlenerek, preparattaki yerleri işaretlenmiştir. Daha sonra mikroskopta yerleri belirlenen mitotik metafaz hücrelerinin görüntüleri fotoğraflanarak, bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

- Elde edilen kök uçlarının mikroskopik analizi sonucunda, 10 mg 2,4-D uygulanan Pioneer 31N27 ($2n=18$), Pioneer 3223 ($2n=19$) ve Pioneer 34N24 ($2n=19$) mısır çeşitlerinin kromozom sayılarında değişim gözlenmiştir. Geriye kalan tüm örneklerin 20 kromozomdan ($2n=20$) oluştuğu belirlenmiştir.

- Kallus, sürgün oluşum oranı ve kallus ağırlığına ilişkin veriler elde edilmiştir. İncelenen 10 adet mısır çeşidinde, 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan HELEN (%100) mısır çeşidinde en yüksek kallus oluşumu gözlenirken, kallus ağırlığı en fazla olan çeşit ise 2 mg/l 2,4-D dozu uygulanan DKC 6022 (2.85 g) mısır çeşidi olarak belirlenmiştir.

- Elde edilen verilere göre, Türkiye'de yapılabilecek olan transgenik mısır elde etme çalışmalarında kullanılabilir en yüksek kallus oluşturma oranını sağlayan, buna karşın kromozomal sapmalar oluşturmayan, uygulanabilir 2,4-D dozunun 2 mg/l olduğu belirlenmiştir.

- Bu tez çalışmasında, 2,4-D kimyasalının yüksek dozda uygulanması sonucunda, *Zea mays*'ta kromozom sayısı varyasyonu yani kromozom sayılarında değişiklikler meydana gelmiştir. Bu tür mitotik anormalliklerin 2,4-D gibi pesitistlerin DNA üzerine

olan etkisinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Pestisitlerin farklı canlı sistemleri üzerine toksik etkileri birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu nedenle yaygın olarak kullanılan bu kimyasalın, insan da dahil olmak üzere birçok organizmada zararlı olabileceğinden dolayı, yüksek dozlarda kullanımında dikkatli olunmalıdır.

- Bitkilerde bakteri, mantar, böcek gibi biyolojik zararlıların (biyotik) ve kuraklık, tuzluluk gibi stres etmenlerinin (abiyotik) neden olduğu ürün kayıplarını azaltmak ve verimi artırmak amacıyla, dünyada transgenik bitki üretimi çalışmaları hız kazanmıştır. Bu çalışmalar arasında transgenik mısır çalışmaları da bulunmaktadır. Transgenik bitki üretimi için yapılan doku kültürü çalışmalarında, optimum kallus oluşumu, gelişimi ve rejenere bitki elde etmek amacıyla çok fazla zaman harcanmaktadır.
- Bu kapsamda, Türkiye’de yaygın olarak ekimi yapılan farklı kökenli mısır çeşitlerine, değişik 2,4-D dozları uygulanarak en etkili fakat kromozomal yapı açısından en zararsız kallus oluşturma protokolü belirlenmiştir. Bu protokol, ileriki günlerde Türkiye’de yapılacak olan transgenik mısır elde etme çalışmalarında da kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Ahloowalia, B.S. 1982. Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Science*. 22, 405-410.
- Ahmadabadi, M., Ruf, S. and Bock, R. 2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Research*. 16, 437-448.
- Ahmed, K. Z., Bartok, T. and Sagi, F. 1992. A modified method for rapid callus induction by utilization of endosperm metabolites in mature and immature seeds of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum durum* L.). *Cereal Res Commun*, 20, 81-86.
- Ahmet, H. ve Adak, M.S. 2007. Irak'ta yetiştirilen bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 13, 285-292.
- Ammirato, P.V. 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures. *Suspension Culture Techniques and Hormone Requirements*. 14(1), 68-74.
- Ammirato, P.V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. *Plant Tissue and Cell Culture*., Green, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P. and Biesboer, D.D. (eds.), Alan R Liss, New York, 57-81.
- Anonim, 2009a. Türkiye İstatistik Yıllığı 2008, TC Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, Yayın No 3248, TÜİK Matbaası, Mayıs 2009, Ankara.
- Anonim, 2009b. Web Sitesi. <http://www.gmo-compass.org>. Erişim tarihi: 25.11.2009
- Antonucci, G.A. and Cólus, I.M.S. 2000. Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. *Teratogen., Carcinogen. and Mutagenesis*, 20, 265-272.
- Arnason, T.J. 1936. Cytogenetics of hybrids between *Zea mays* and *Euchlaena mexicana*. *Genetics*. 21 (1),40-60.
- Ateeq, B., Abdul Farah, M., Niamat Ali, M. and Ahmad, W. 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by allium root tip test. *Mutation Research Toxicology and Enviromental Mutagenesis*, 514, 105-113.
- Auger, D.L. and Birchler, J.A. 2002. Maize tertiary trisomic stocks derived from B-A translocations. *J. Hered*, 93, 42-47.
- Bagni, N. 1986. The function and metabolism of polyamines in plants. *Acta Hort*. 179, 95-103.

- Bai, D. and Knott D.R. 1993. The effects of level of 2,4-D and time in culture on regeneration rate and chromosome numbers of regenerants from calli of the hybrid *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring ph1b x *Thinopyrum ponticum* ($2n = 10x = 70$). *Genome*, 36, 166–172.
- Bajaj, Y.P.S. 1984. The regeneration of plants from frozen pollen embryos and zygotic embryos of wheat and rice. *Theor. App. 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 Tritordeum. *Euphytica*, 1.8, 161-167.
- Bartok, T. and Sagi, F. 1990. A new endosperm supported callus induction method for wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cul.*, 22, 37-41.
- Bayliss, M.W. 1973. Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. *Nature*. 246, 529-530.
- Bayliss, M.W. 1977. Factors affecting the frequency of tetraploid cells in a predominantly diploid suspension culture. *Protoplasma*. 92, 109-115.
- Bayliss, M.W. 1980. Chromosomal variation in plant tissue culture, *Int. Rev. Cytol.*, Suppl. 11A.
- 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.
- Bennici, A. and D'Amato, F. 1978. *In vitro* regeneration of durum wheat plants, I. chromosome numbers of regenerated plantlets, *Z. Pflanzucht.*, 81, 305-311.
- Birsin, M.A., Önde, S. and Özgen, M. 2001. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of oat (*Avena sativa* L.). *Turk. J. Biol.* 25, 427-434.
- Birsin, M. ve Özgen, M. 2004. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explant of Triticale. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 353–361.
- Birsin, M.A., Koyuncu, N. ve Özgen, M. 2007. Mısırdaki (*Zea mays everta* Sturt) kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna farklı büyüme düzenleyicilerinin etkisi. XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 132-134.

- Bloemen, L.J., Mandel, J.S., Bond, G.G., Pollock, A., Vitek, R.P. and Cook, R.R. 1993. An update of mortality among chemical workers potentially exposed to the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Journal of Occupational Medicine*, 35, 12, 1208-1212.
- Bohorova, N.E., Luna, B., Brito, R.M., Kuerta, L.D. and Hoisington, D.A. 1995. Regeneration potential of tropical, subtropical, midaltitude and highland maize inbred. *Maydica*. 40, 275-281.
- Bohorova, N., Zhang, W., Julstrum, P., McLean, S., Luna, B., Brito, R.M., Diaz, L., Ramos, M.E., Estanol, P., Pacheco, M., Sakgado, M. and Hoisington, D. 1999. Production of transgenic tropical maize with cryIAb and cryIAc genes via microprojectile bombardment of immature embryos. 99, 437-444.
- Bohorova, N., Frutos, R., Royer, M., Estanol, P., Pacheco, M., Rascon, Q. and Hoisington, D. 2001. Novel synthetic *Bacillus thuringiensis cryIB* gene and *cryIB-cryIAb* translational fusion confer resistance to southwestern corn borer, sugarcane borer and fall armyworm in transgenic tropical maize. *Theor. Appl. Genet.* 103, 817-826.
- Bommineni, V.R. and Jauhar, P.P. 1996. Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. *Plant Science*. 116, 197-203.
- Bond, G.G., Wetterstroem, N.H., Roush, G.J., McLaren, E.A., Lipps, T.E. and Cook, R.R. 1988. Cause specific mortality among employees engaged in the manufacture, formulation or packaging of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T). *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 20, 11-26.
- Butani, J.V. and Shukla, P.T. 1994. Cytological effects of pesticides on onion (*Allium cepa* L.) root tip. *Gujarat Agricultural University Research J.*, 20 (1), 60-65.
- Can, E., Çeliktaş, N., Hatipoğlu, R. 2000. Sarı Sakalotu (*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng) bitkisinin genç salkımlarının *in vitro* kültüründe salkım uzunluğunun kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisi. *Turk. J. Agric For.*, 24, 399-404.
- Carlson, W.R. 1988. The cytogenetics of corn. In corn and corn improvement (Sprague, G. F. and Dudley, J.W., eds.). Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, pp. 259-344.

- Chauhan, L.K.S., Sundararaman, V. 1990. Effect of substituted ureas on plant cells I. cytological effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Cytologia*. 55, 91-98.
- Chawla, H.S. and Wenzel, G. 1987. Regeneration potential of callus from wheat and barley. *Archiv. Fur Zuchtungsforchung*. 17(6), 337-343.
- Chen, C.C., Chen, C.M., Hsu, F.C., Wang, C.J., Yang, J.T. and 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.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y. and Bi, F.Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources, *Sci.Sinica*. 18, 659-668.
- Conger, B.V., Novak, F.J., Afza, R. and Erdelsky, K. 1987. Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. *Plant Cell Reports*. 6, 345-347.
- Constantin, M.J. 1981. Chromosome instability in cell and tissue cultures and regenerated plants. *Environ. Exp. Bot.*, 21, 359-368.
- Crocker, B.H. 1953. Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid on mitosis in *Allium cepa*. *Bot. Gaz. (Chicago)*, 114, 274-283
- D'Amato, F. 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants, in T.A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of Plants Tissue Culture*. University of Calgary Offset Printing Services, Calgary. 287-295.
- 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. and 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.
- Deambrogio, E. and Dale, P.J. 1980. Effect of 2,4-D on the frequency of regenerated plants in barley and on genetic variability between them. *Cereal Res. Comm.* 8, 417-423.
- De Jong, A.J., Schmidt, E.D.L. and De Vries S.C. 1993. Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 22, 367-377.
- De Klerk, G.J. 1990. How to measure somaclonal variation. *Acta Bot. Neerl.*, 39(2), 129-144.

- Delporte, F., Mostade, O. and Jacquemin, J.M., 2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 67, 73-80
- Dolezel, J., Lucretti, S. and Novak., F.J. 1987. The influence of 2,4- D on cell cycle kinetics and sister-chromatid exchange frequency in garlic (*Allium sativum*) meristem cells. *Biol. Plant.*, 29, 253-257.
- Dong, F., Song, J., Naess, S.K., Helgeson, J.P., Gebhardt, C. And Jiang, J. 2000. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet.*, 101, 1001-1007.
- Doyle, G.G. 1988. The telocentrics of maize. *Maize Genet. Coop. Newsletter*, 62; 49-50.
- Düzgüneş, O., Kesici, T. ve Gürbüz, F. 1983. İstatistik metodları I. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları. 861. Ders Kitabı, 229, Ankara.
- Elçi, Ş. 1965. Memleketimizin önemli fiğ türlerinde kromozom sayılarının tespiti ve kromozom morfolojilerinin mukayesesi. Ankara Üniv., Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 254.
- Elçi, Ş. 1982. Sitogenetikte gözlemler ve araştırma yöntemleri. Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, Biyoloji: 3.
- Elliott, M.C. and Greenwood, M.S. 1974. Indol-3y-acetic acid in roots of *Zea mays*. *Phytochemistry*. 13, 239-241.
- Emeklier, H.Y. 1990. Yabancı menşei erkenci mısır çeşitlerinin dane verimi ve diğer özellikleri üzerinde araştırmalar. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları. 13, 107-119. Ankara.
- Emerson, R.A., Beadle, G.W. and Fraser, A.C. 1935. A summary of linkage studies in maize. *Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Memoir*, 180, 1-83.
- Evans, P.T. and Malmberg, R.L. 1989. Do polyamines have roles in plant development?. *Ann.Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 235-269.
- Faberge, A. 1951. Ultra-violet induced chromosome aberrations in maize. *Genetics*. 36, 549-550.
- Faberge, A. 1955. Types of chromosome abberations induced by ethylene oxide in maize. *Rec. Genet. Soc. Am.*, 24, 571.
- Fazalienasab, B., Omidi, M., Amiritokaldani, M. 2004. Effects of abscisic acid on callus induction and regeneration of different wheat cultivars to mature embryo culture. www.bcpc.org/Seminars.

- 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. and 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.
- Fiskesjö, G., Lassen, C. and Renberg, L. 1981. Chlorinated phenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified Allium test, *Chem-Biol. Interact.*, 34, 333-344.
- Flanagan, R.J., Meredith, T.J. and Ruprah, M. 1990. Alkaline diuresis for acute poisoning with chlorophenoxy herbicides and ioxynil. *Lancet*. 335, 454-458.
- Gabathuler, R. and Pilet, P.E. 1981. Light and Gravity Effects on Adenine Nucleotide Content and Energy Charge in Maize Roots. *Plant and Cell Physiology*, 22 (8), 1499-1506.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.
- Gall, J.G. and Pardeu, M.L. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 63, 378-383.
- Gallego, P., Hita, O., Villabos, N., Dorado, A., Martín, L. and Guerra, H. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Medicago arborea* L. *In Vitro Cellular and Development Biology- Plant*. 37(2), 199-203.
- Galston, A.W. 1983. Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience*. 33, 382-388.
- George, E.F., Sherrington, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Ltd., 73-87.
- George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part I. The technology. Exegetics Ltd., Basingstoke, UK.
- George, E.F. 2008. Plant growth regulators I. Introduction; Auxins, Their Analogues and Inhibitors. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, 175-204.

- Gonzales, J.M., Friero, 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.
- Gordon-Kamm, W.J., Spencer, T.M., Mangano, M.L., Adams, T.R., Daines, R.J., Start, W. G., O'Brien, J.V., Chambers, S.A., Adams, W.R., Willets, N.G., Rice, T.G., Mackey, C.J., Krueger, R.W., Kausch, A.P. and Lemaux, P.G. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants, *The Plant Cell*. 2, 603-618.
- Göze, İ., Yelkovan, İ. ve Çınar, Z. 1995. Daminozid'in civcivlerdeki enzimatik etkileri ve histopatolojisi. *Turkish Journal of Biology*. 19, 217-222.
- Green, C.E. and Philips, R.L. 1975. Plant regeneration from tissue culture of maize. *Crop. Sci.* 15, 417-421.
- Gürcan, K. 2003. Bazı meyve türlerinin dişi organ dokularından somatik embriyo oluşumu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Halperin, W. and Wetherell, D.F. 1965. Ontogeny of adventive embriyos in wild carrot. *Science*. 147, 756-758.
- Hardell, L. 1981. Kelatin of soft tissue sarkoma, maiignant lymphoma and cancer to phenoxy acids, chlorophenols and other agents. *Stand. J. Work. Environ. Health*. 7, 119-130.
- Harper, L.C. and Cande, W.Z. 2000. Mapping a new frontier; development of integrated cytogenetic maps in plants. *Funct. Integr. Genomics*. 1, 89-98.
- Hayes, W.J. and Laws, E.R. 1991. Handbook of pesticide toxicology Volume 3 classes of pesticides, 1318-1321.
- 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.
- Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A. and Nienhuis, J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 72, 761-769.
- Huang, X.Q and Wei Z.M. 2004. High- frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*. 22, 793-800.

- Iltis, H.H. and Doebley, J.F. 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). II. Subspecific Categories in the *Zea Mays* complex and a Generic Synopsis. Amer. J. Bot. 67(6), 994-1004.
- Ishida, Y., Satto, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nat Biotechnol. 14, 745-750.
- Ivanov, P., Anatanssov, Z., Milkova, V. and Nikolava, L. 1998. Culture selected somaclonal variation in five *Triticum aestivum* L. Genotypes. Euphytica. 104, 167-172.
- James, C. 2006. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006. ISAAA Briefs No. 35. Ithaca, NY.
- Jensen, J. 1996. Chlorophenols in the terrestrial environment. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 146, 25-51.
- John, H.A., Birnstiel, M.L. and Jones, K.W. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature. 223, 582-587.
- Kar, S. 1975. Cytogenetic effects of 2,4-D on *Pisum sativum*, Proc. Indian Sci. Congr. Bot., 62, 122.
- Karp, A. 1989. Can genetic instability be controlled in plant tissue culture? International Association of Plant Tissue Culture Newsletter 58, 2-11.
- Keller, T., Skopp, G. And Wu, M. 1994. Fatal overdose of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Forensic Sci. Int. 65, 13-18.
- Khalatkar, A.S. and Bhargava, Y.R. 1982. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid- A new environmental mutagen, Mutation Res. 103, 11-114.
- Kırtok, Y., 1998. Mısır Üretimi ve Kullanımı. Kocaeluk Basım ve Yayınevi, İstanbul.
- Kihlman, B.A. 1975. Root tip sor vicia faba for the study of the induction of chromosomal aberrations. Mutation Research. 31, 401-412.
- 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.
- Klein, T.M., Kornstein, L., Sanford, J.C. and Fromm, M.E. 1989. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment, Plant Physiol. 91, 440-444.
- Knopp, D. 1994. Assesment of exposure to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in the chemical industry: Results of a Five Year Biological Monitoring Study. Occupational and Environmental Medicine. 51, 152-159.

- Kün, E. 1997. Tahıllar II (Sıcak İklim Tahılları). A.Ü.Ziraat Fak. Yayınları No:1452. Ders Kitabı; 432, A.Ü. Basımevi, 317s. Ankara.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. TAG. 60, 197-214.
- Laurent, F., Debrauwer, L. And Pascal-Lorber, S. 2006. Metabolism of [¹⁴C]-2,4-Dichlorophenol in edible plants. Pest Management Science. 62, 558-564.
- Lawruk, T.S., Hottenstein, C.S., Fleeker, J.R., Hall, J.C., Herzog, D.P. and Rubio, F.M. 1994. Quantification of 2,4-D and related chlorophenoxy herbicides by a magnetic particle-based ELISA. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 52, 538-545.
- Lee, M. and Phillips, R.L. 1988. The chromosomal basis of somaclonal variation. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 413-437.
- Lee, J-H., Arumuganathan, K., Kaeppler, S.M., Park, S-W., Kim, K-Y., Chung, Y-S., Kim, D-H. and Fukui, K. 2002. Variability of chromosomal DNA contents in maize (*Zea mays* L.) inbred and hybrid lines. Planta. 215, 666-671.
- Linsmaier, E. M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18, 100-127.
- Lloyd, G. and McCown, B. 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel. *Kolonia latifolia*, by use of shoot tip culture. Int. Plant Prop. Soc. Proc. 30, 421-427.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S. and Terzi, M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theor. Appl. Genet. 77, 325-331.
- Lu, C.Y, Chandler, S.F. and Vasil, I.K. 1984. somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature embryos of rye (*Secale cereale* L.) J. Plant Physiol. 115, 237-244.
- Lur, H.S. and Setter, T.L. 1993. Role of auxin in maize endosperm development. Plant Physiol. 103, 273-280.
- 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.
- Maguire, M.P. 1962. Common loci in corn and Tripsacum. J. Hered. 53, 87-88.

- Marcinska, I., Pililpowicz, M., Filek, M., Biesaga-Koscielniak, J., Wedzony, M., Zur, I., Skrzypek, E., Golemiak, E., Czyczylo-Mysza, I. and Dubas, E. 2003. Influence of 2,4-D and dicamba on callus induction and plant regeneration from wheat haploid embryos obtained by the maize method. p:95, Poland.
- Martínez-Gómez, P., Sánchez-Pérez, R., Y. Vaknin, Y., Dicenta, F. and Gradziel, T. M. 2005. Improved technique for counting chromosomes in almond, *Scientia Horticulturae*. 105 (1), 139-143.
- May, R.A. and Sink, K.C. 1995. Genotype and auxin influence direct somatic embryogenesis from protoplasts derived from embryogenic cell suspension of *Asparagus officinalis*. L. *Plant Sci*. 108,71-84.
- McClintock, B. and Hill, H.E. 1931. The cytological identification of the chromosome association with the R-G linkage group in *Zea mays*. *Genetics*. 16, 175-190.
- McClintock, B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*. 26, 234-282.
- 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* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plants*. 38, 39–45.
- Merkle, S.A., Parrott, W.A. and Williams, E.G. 1990. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, Bhojwani, S.S.(ed.), Elsevier, Amsterdam, 67-102.
- Mohamed, V.S., Wang, C.S., Thiruvengadam, M. and Jayalaban, N. 2004. *In vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis through cell suspension cultures of Horsegram [*Macrotyloma Uniflorum* (Lam.) Verdc.]. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 40(3). 284- 286.
- Mohandas, T. and Grant, W. 1972. Cytogenetic effects of 2,4-D and amitrole in relation to nuclear volume and DNA content in some higher plants, *Can. J. Genet. Cytol.* 14, 773-783.
- Morel, G. And Müller, J.F. 1964. *In vitro* culture of the apical meristem of the potato. *Compt. Rend. Acad. Sci., Paris* 258, 5250-5252.
- Mottinger, J.P. 1970. The effects of X rays on the bronze and shrunken loci in maize. *Genetics*. 64(2), 247–258.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15, 473-497.

- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annu. Rev. Plant Physiology.* 25, 135-166.
- Muzumdar, D.A., Schneerman, M.C., Doyle, G.G. and Weber, D. 1997. Identification of an isochromosome for the long arm of chromosome 7 in maize. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 71, 67.
- Naqvi, S.M.S., Yasmin, T., Rashid, H., Chaudary, Z. and Quraishi, A. 2002. Callus induction from seeds of *Zea mays* var. EV-2097. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 5(9), 956-958.
- Nitsch, J.P. and Nitsch, C. 1965. Neof ormation de fleurs *in vitro* chez une espece de jours courts: *Plumbaga indica* L. *Ann. Phys.Vieg.* 7, 251-256.
- Ozias-Akins, P. and Vasil, I.K. 1983. Proliferation of plant regeneration from the epiblast of *Triticum aestivum* L. (wheat). *Amer. J. Bot.* 70, 1092-1097.
- Ozias-Akins, P. and Vasil, I.K. 1988. *In vitro* regeneration and genetic manipulation of grasses. *Physiologia Plantarum.* 73, 565-569.
- 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., Altınok, S., Özcan, S. and Sevimay, C.S. 1997. *In vitro* micropropagation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. *Tr. J. Of Botany.* 21, 1-4.
- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S. and Sancak, C. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes. *Plant Cell Reports.* 18, 331-335.
- Papes, D., Garaj-Vrhovac, V., Jelaska, S. and Kolevska-Pletikapic, B. 1983. Chromosome behaviour in cultured cell populations of higher plants, *Kew Chromosome Conference II.*
- Papenfus, J.M. and Carman, J.G. 1987. Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin. *Crop Science.* 27, 586-593.
- Pareddy, D.R. and Petolino, J.F. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. *Plant Sci.* 67, 211-219.
- Pavlica, M., Papeš, D. and Nagy, B. 1991. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.* 263, 77-81.

- 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.
- Pernet, J.J. and Pilet, P.E. 1976. Indoleacetic acid movement in the root cap. *Planta*, 128 (2), 183-184.
- Pilet, P.E. 1964. Auxin transport in roots. *Nature*. 204, 560-561.
- Pilet, P.E. and Saugy, M. 1985. Effect of applied and endogenous Indol-3yl-Acetic Acid on maize root growth. *Planta*. 164, 254-258.
- Popelka, J.C. and Altpeter, F. 2001. Interactions between genotypes and culture media components for improved *in vitro* response of rye (*Secale Cereale* L.) inbred lines. *Plant Cell Reports*. 20, 575-582.
- Prescott, L.F., Park, J. and Darrien, I. 1979. Treatment of severe 2,4-D and mecoprop intoxication with alkaline diuresis. *Bri Journal of Clinical Pharmacology*. 7, 111-116.
- 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.
- Rakoczy- Trojanowska, R.M. and Malepszy S. 1995. Genetic factors influencing regeneration ability in rye (*Secale cereale* L.). II. Immature Embryos.
- Rakoczy- Trojanowska, M. 2002. The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variations with increased agronomic traits. *Cellular& Molecular Biology Letters*. 7, 1111-1120.
- Rashid, A. 1988. Cell physiology and genetic of higher plants. Vol.1, CRC Press, Boca Raton, FL. 1-38, 67-103.
- Ray, D.S. and Ghosh, P.D. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultered leaf explants of *Zea mays*. *Ann Bot*. 66, 497-500.
- 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.
- Rhoades, M.M. 1950. Meiosis in maize. *J. Hered*. 61, 59-67.
- Rhodes, C.A., Green, C.E. and Phillips, R.L. 1986. Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels. *Plant Science*. 46, 225-232.

- Rivier, L. And Pilet, P.E. 1974. Indolyl-3-acetic acid in cap and apex of maize roots: identification and quantification by mass fragmentography. *Planta*. 120, 107-112.
- Romagnoli, M.V., Ortiz, J.P.A., Cervigni, G.D., Heisterborg, C. and Vallejos, R.H. 1996. High frequency somatic embryogenesis with a pampennea-derived genotype of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*. 90(1), 89-93.
- Rosella, P., Fabiana A. and Bagni, N. 1993. Polyamine uptake and transport in different plant systems. *Current Topics in Plant Physiol.* 1, 21-29
- Roy, P.K., Barat, G.K. and Mehta, S.L., 1992. *In vitro* plant regeneration from callus derived from root explants of *Lathyrus sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 29, 135-138.
- Sadder, M.T., Onolies, N., Born, U. and 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. and 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.
- Sairam, R.V., Parani, M., Franklin, G., Lifeng, Z., Smith, B., MacDougali, J., Wilber, C., Sheikhi, H., Kashikar, N., Meeker, K., Al-Abed, D., Berry, K., Vierling, R. and Goldman, S.L. 2003. Shoot meristem: An ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome*. 46, 323-329.
- Santos, M.A., Torne, J.M. and Blanco, J.L. 1984. Methods of obtaining maize totipotent tissues. I. seedling segments culture. *Plant Sci. Lett.* 33, 309-315.
- Sarma, P.K. and Jacons, J. 1982. Thoracic soft tissues sarcoma in vietnam vaterans exposed to agent orange. *New Eng. J. Med.* 306, 1109.
- Schaeffer, G.W., Baenziger, P.S. and Warley, J. 1979. Haploid plant development from anthers and *in vitro* embryo culture of wheat. *Crop Science*. Vol. 19.
- Schenk, R.U. and Hilderbrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50, 199-204.
- Schneerman, M.C., Lee, W.S., Doyle, G. and Weber, D.F. 1998. RFLP mapping of the centromere of chromosome 4 in maize using isochromosomes for 4S. *Theor. Appl. Genet.* 96, 361-366.

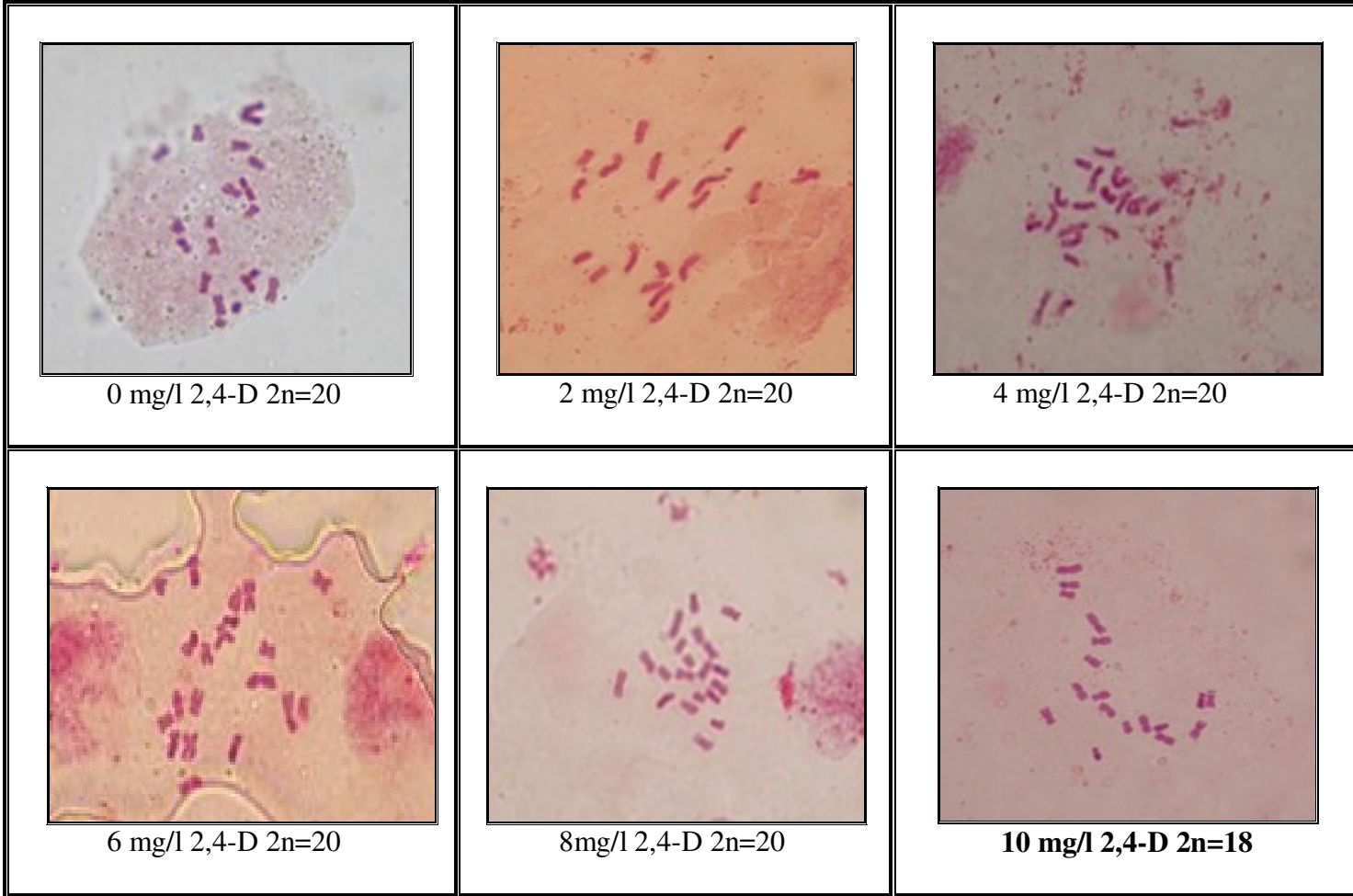
- Sears, R.G. and Deckard, E.L. 1982. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Science*. 22, 546-550.
- Seğmen, Y. 1977. Herbisitlerin bitki sitogenetiğine etkileri. *Fitopatoloji Derneği Yayınları*. 2, 63-66.
- Sharopova, N., McMullen, M., Schultz, L., Schroeder, 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. and Coe, Jr. E.H. 2002. Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Molecular Biology*. 48, 463-481.
- Shimada, T. and Yamada, Y. 1979. Wheat plants regenerated from embryo cell cultures *J.Genetics* 54. No.5, 379-385.
- Sidorov, V., Gilbertson, L., Addae, P. and Duncan, D. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of seedling-derived maize callus, *Plant Cell Report*, 25; 320-328.
- Sinha, R.K., Chudhury, R. and Mallick, R. 1989. Cytological effects of phosalone on root meristem of *Allium cepa* L. *Cytologia*. 54, 429-435.
- Skorupska, H. 1978. The Effect of some herbicides, chemomutagens and gamma radiation on meiosis in pea (*Pisum sativum*). *Genet. Pol.* 17, 149-157.
- Smith, T.A. 1985. Polyamines, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 117-145.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1967. *Statistical methods*. The Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Songstad, D.D., Petersen, W.L. and Armstrong, C.L. 1992. Establishment of friable embryogenic (Type II) Callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae). *American Journal of Botany*. 79 (7), 761-764.
- Stadler, L.J. 1928. Genetic effects of X-rays in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 14, 69-75.
- Stewart, J., C.N., Adang, M.J., All, J.N., Boerma, H.R., Cardineau, G., Tucker, D. and Parrott, W.A. 1996. Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene, *Plant Physiol.* 112, 121-129.
- Tanner, G. and Scott, K.J. 1986. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Science*. 45, 119-124.
- Temizkan, G. 1994. *Genetik (Temel Genetik)*. İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 276 s

- Ting, Y.C., Yu, M. and Zheng, W-Z. 1981. Improved anther culture of maize. *Plant Science Letters*. 23, 139-145.
- Tuberosa, R., Rauaglia, S. and Lucchese., C. 1998. Callus induction and plant regeneration in Italian cultivars of bread wheat. *Agriculture in Meditterian*. 18, 361–365.
- Turkula, T.E. and Jalal, S.M. 1985. Increased rates of sister chromatid exchanges induced by the herbicide 2,4-D. *The Journal of Heredity*. 76, 213-214.
- Türkoğlu, Ş. ve Koca, S. 1997. “Paraquat’ın (Gramaoxoe) *Vicia faba* L. da mitoz bölünmeye, kromozomlara ve DNA miktarı üzerine etkileri”. III. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Bildirgeleri, Ankara, 47-67.
- Unrau, J. and Larter, E. N. 1952. Cytogenetical response of cereals to 2,4-D. I. A study of meiosis of plants treated at various stages of growth. *Can. J. Bot.* 30, 22-27.
- Unrau, J. 1954. Cytogenetic effects of 2,4-D on cereals. *Annu. Rep. Can. Seed Growers’ Assoc.* 37-39.
- 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 Vasil, I.K. 1990. Regeneration of plants from immature embryogenic suspension culture protoplast of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology*. 8, 425-433.
- Vasil, I.K. 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereals and grass crops. *Journal of Plant Physiology*. 128, 193-218.
- Viertel, K. and Hess, D. 1996. Shoot tips of wheat as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44, 183-188.
- Vikrant, A. and Rashid, A. 2001. Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf base of triticale. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 64, 33-38.
- Vikrant, A. and Rashid, A. 2002. Somatic embryogenesis from immature and mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69, 71-77.
- Wang, A.S. 1987. Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. *Plant Cell Reports*. 6, 360-362.
- Wang, Y-S., Jaw, C-G. and Chen, Y-L. 1994. Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth. *Water Air Soil Pollut.* 74, 397-403.

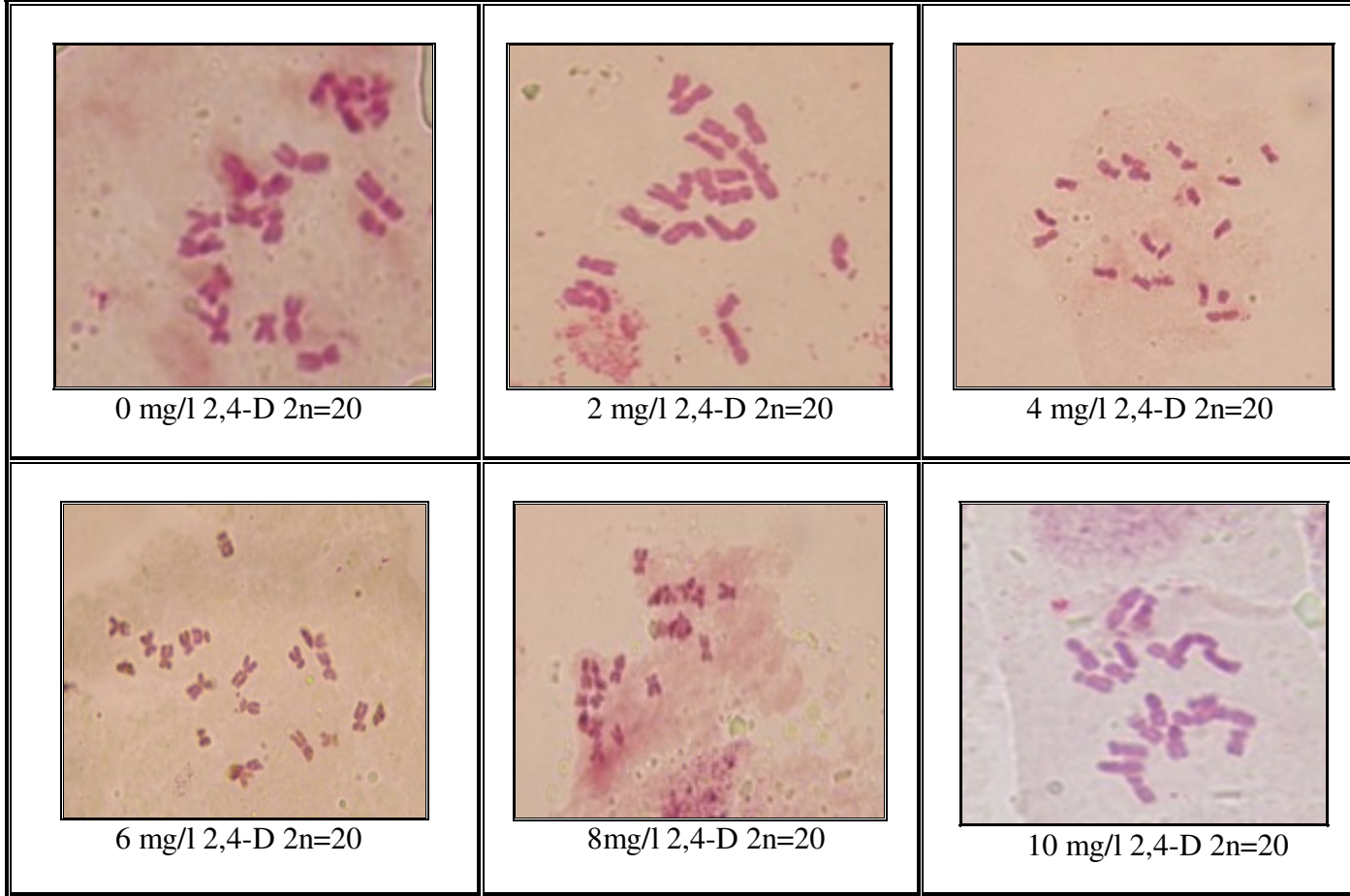
- Westwood, M.N. 1993. Hormones and growth regulators. Temperate Zone Pomology: Physiology and Culture. Timber Press, Inc. 9999 S.W. Wilshire, Suite 124, Portland, Oregon 97225.
- White, P.R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9, 585-600.
- Yu, W., Han, F., Kato, A. and Birchler, J.A. 2006. Characterization of a maize isochromosome 8S.8S. *Genome.* 49, 700-706.
- Zale, J.M., Wier, H.B., Kidwell, K.K. and Steber, C.M. 2003. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76, 277-281.
- Zapata, J.M., Sabater, B. and Martin, M. 2004. Callus induction and *in vitro* regeneration from barley mature embryos. *Biologia Plantarum.* 48(3), 473-476.
- Zhang, S., Williams-Carrier, R. and Lemaux, P. 2002. Transformation of recalcitrant maize elite inbreds using *in vitro* shoot meristematic cultures induced from germinated seedlings. *Plant Cell Reports.* 21, 263-270.
- Zhou, M.D. and 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.

EKLER

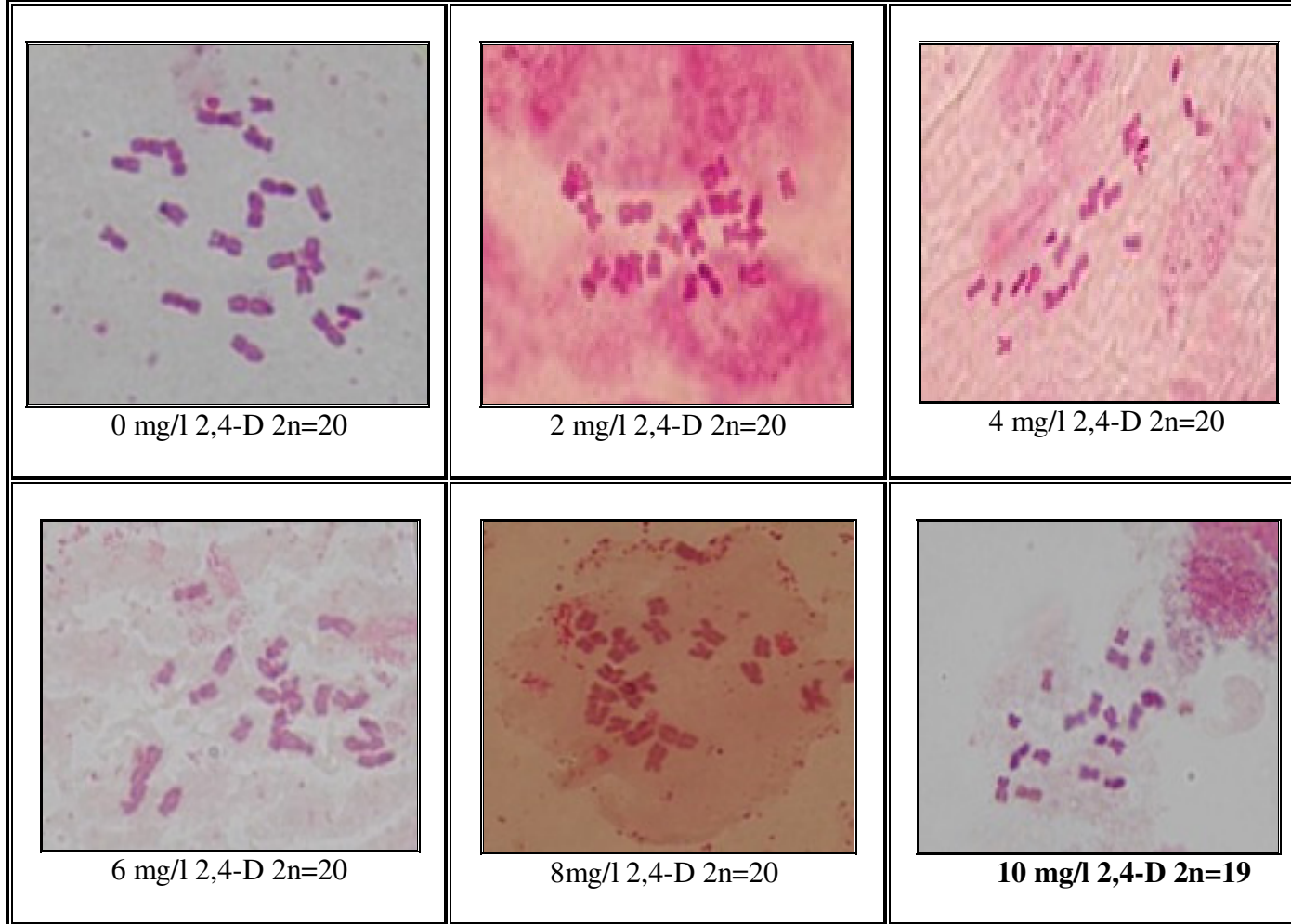
EK 1. Pioneer 31N27 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri



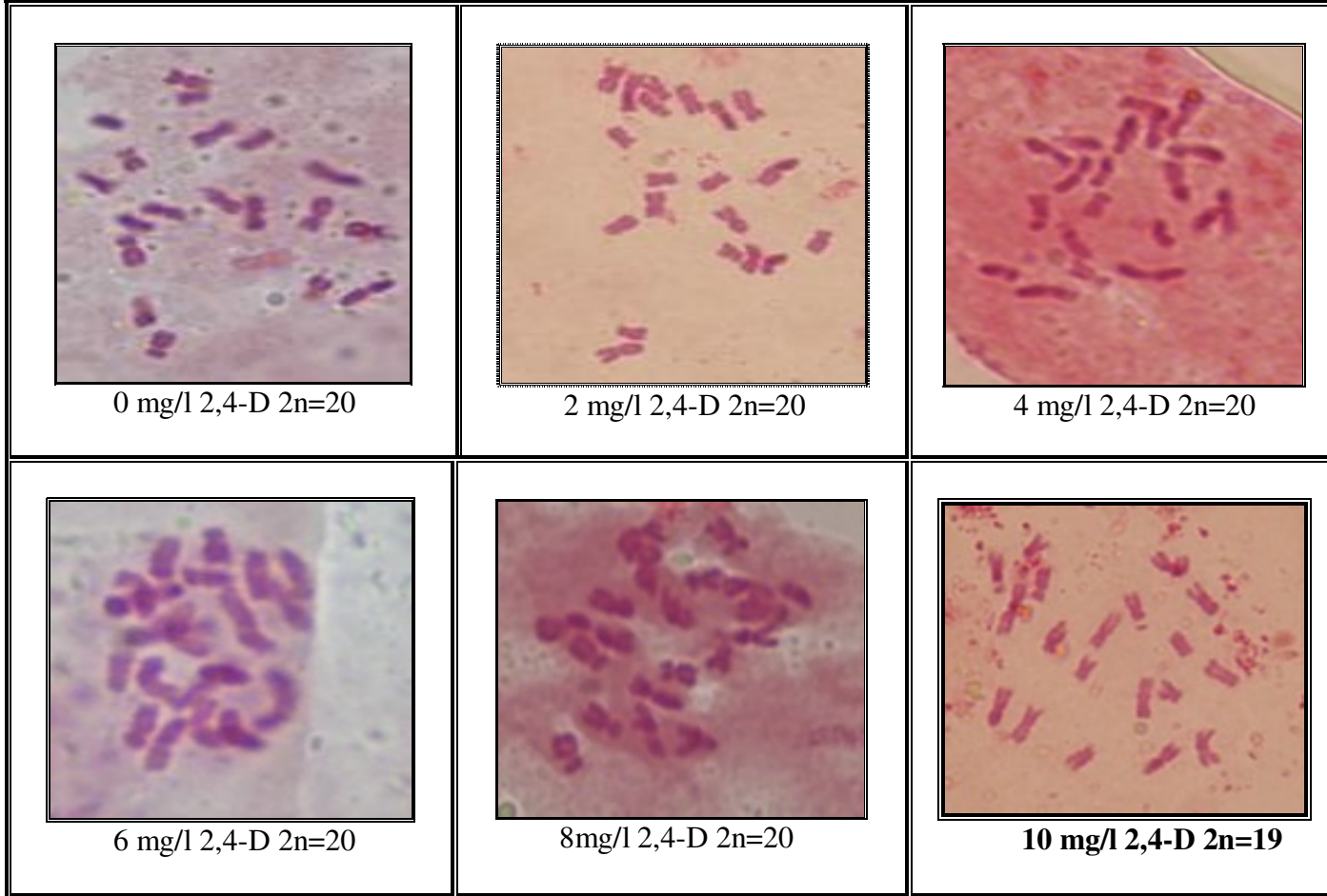
EK 2. Pioneer 31P41 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.



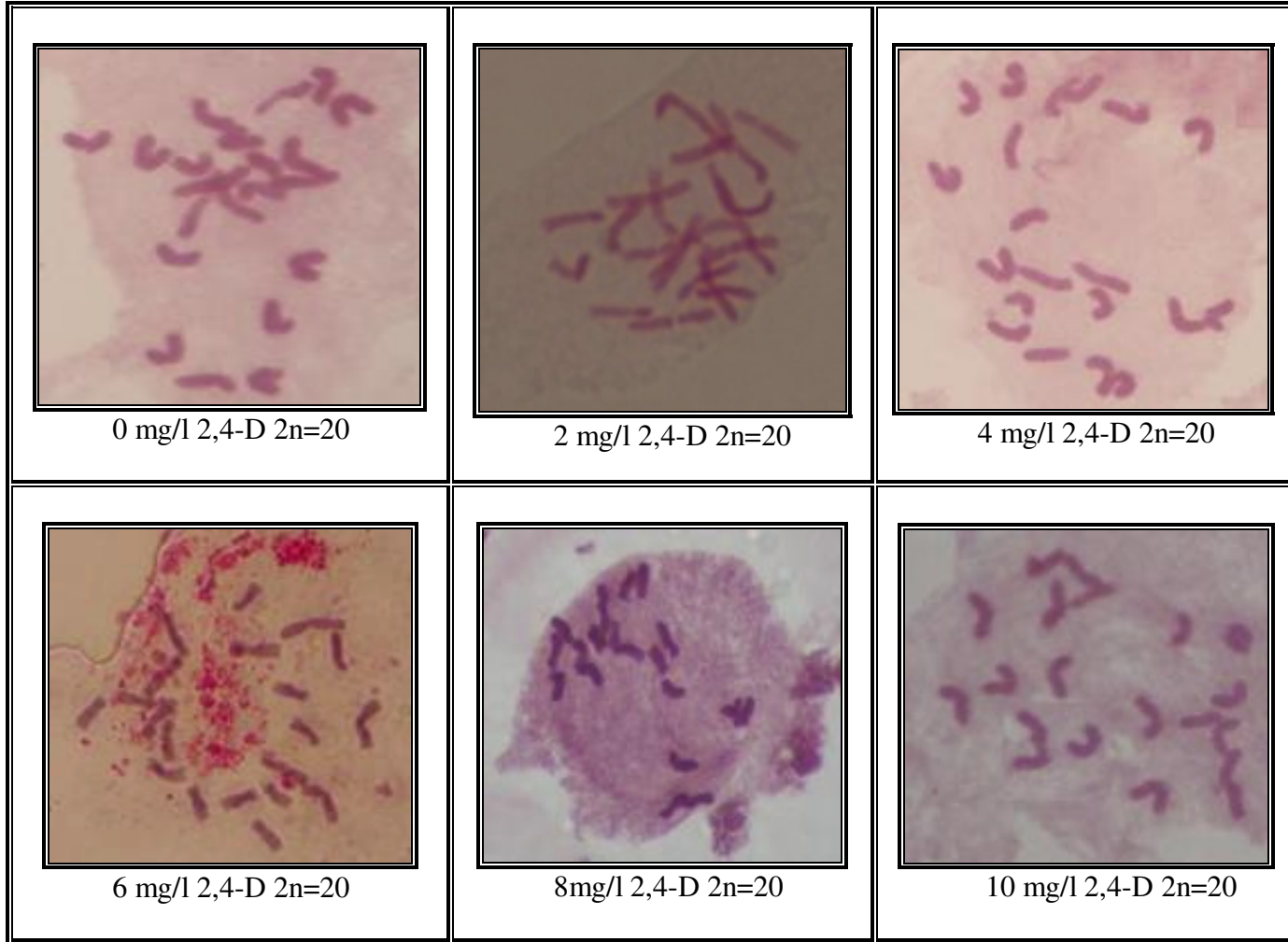
EK 3. Pioneer 3223 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.



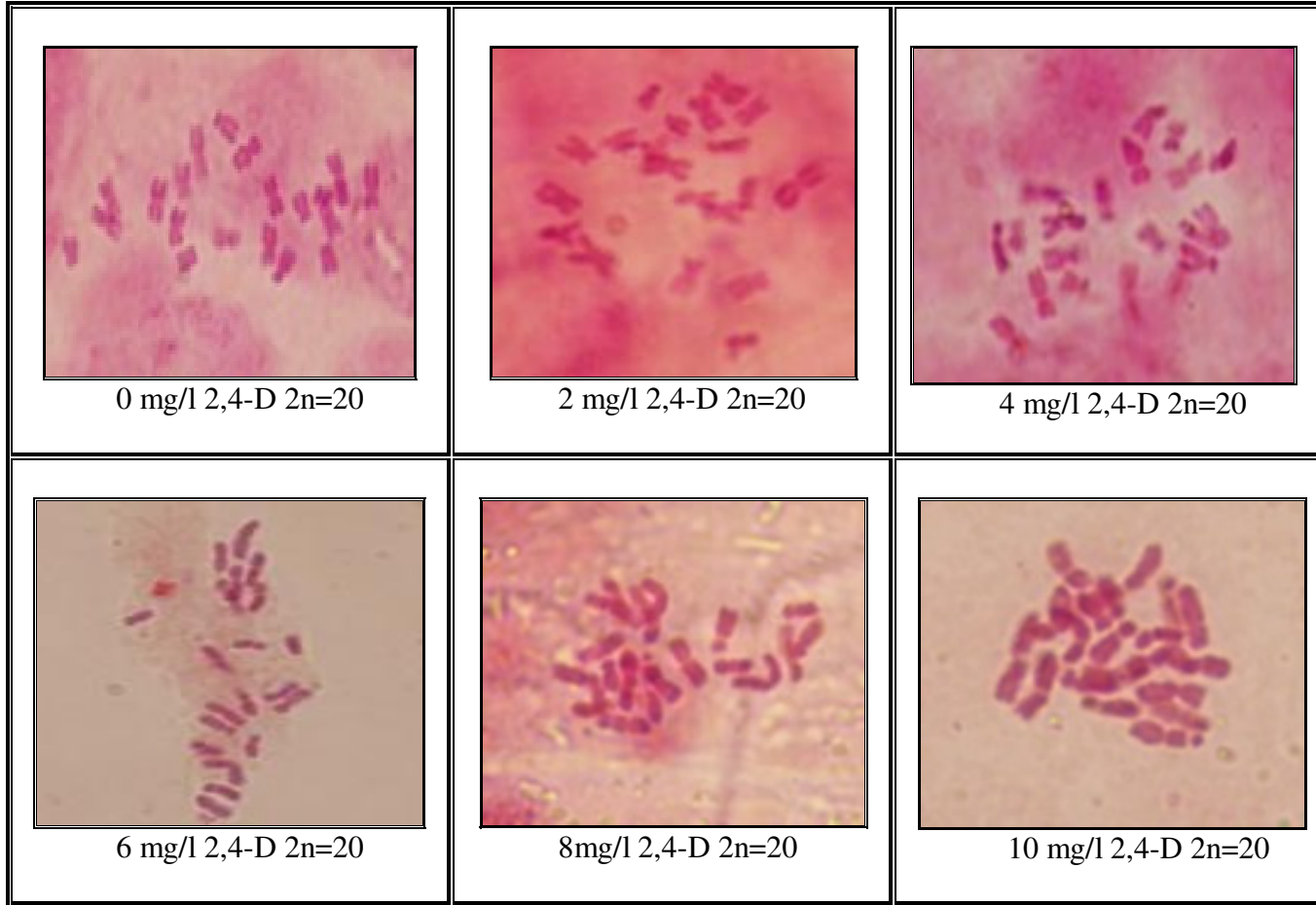
EK 4. Pioneer 34N24 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.



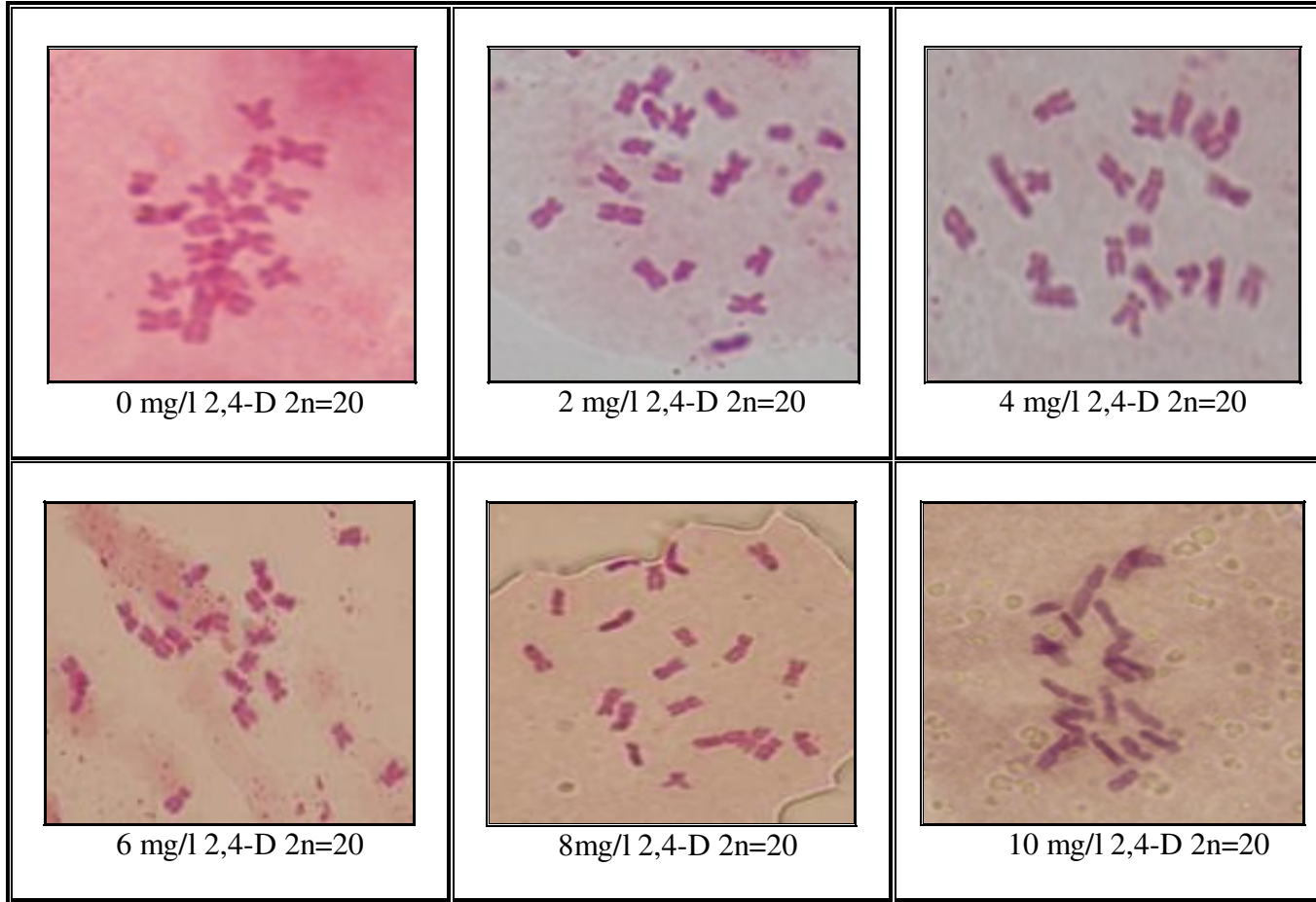
EK 5. ADA 8924 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.



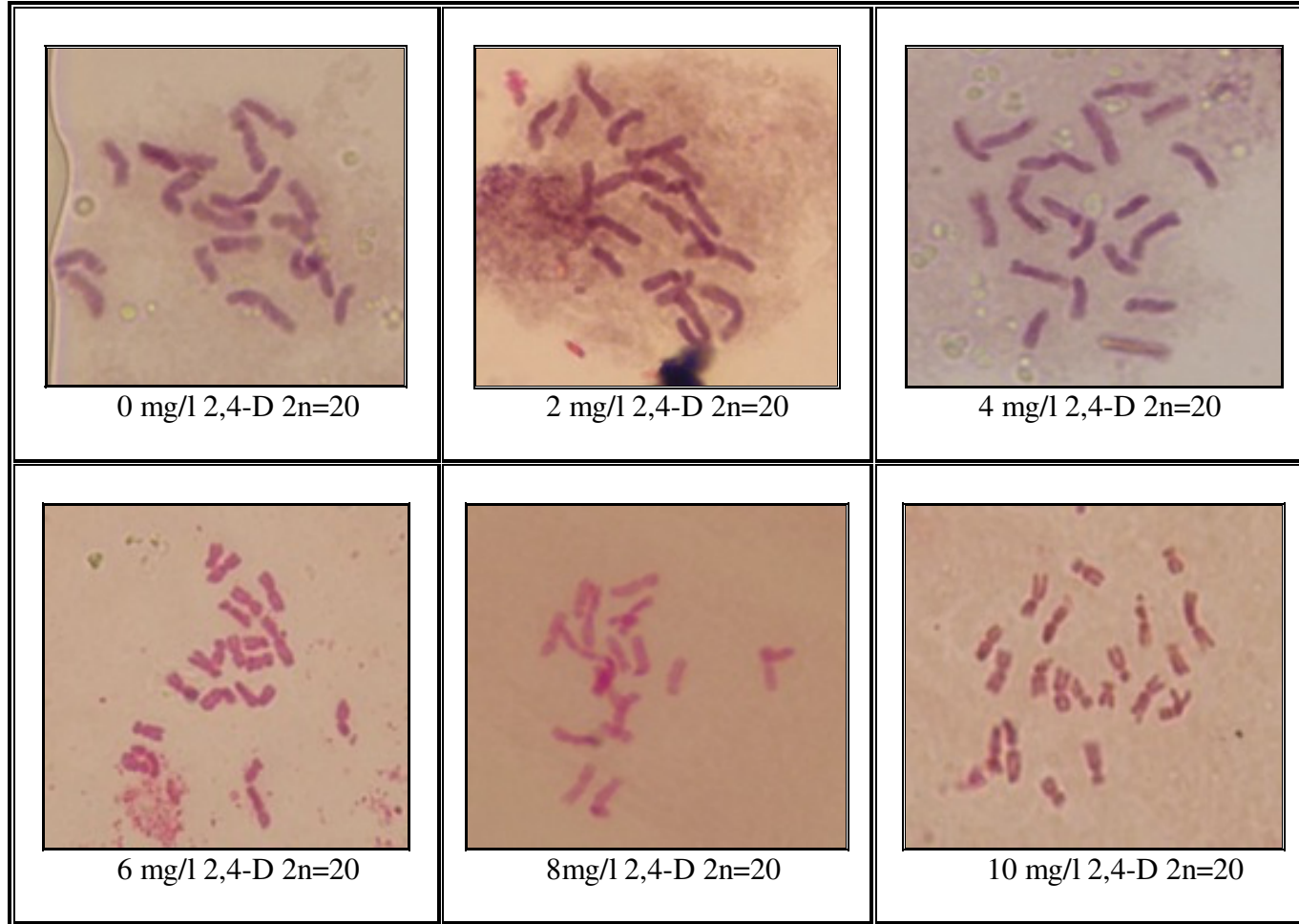
EK 6. DKC 6022 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.



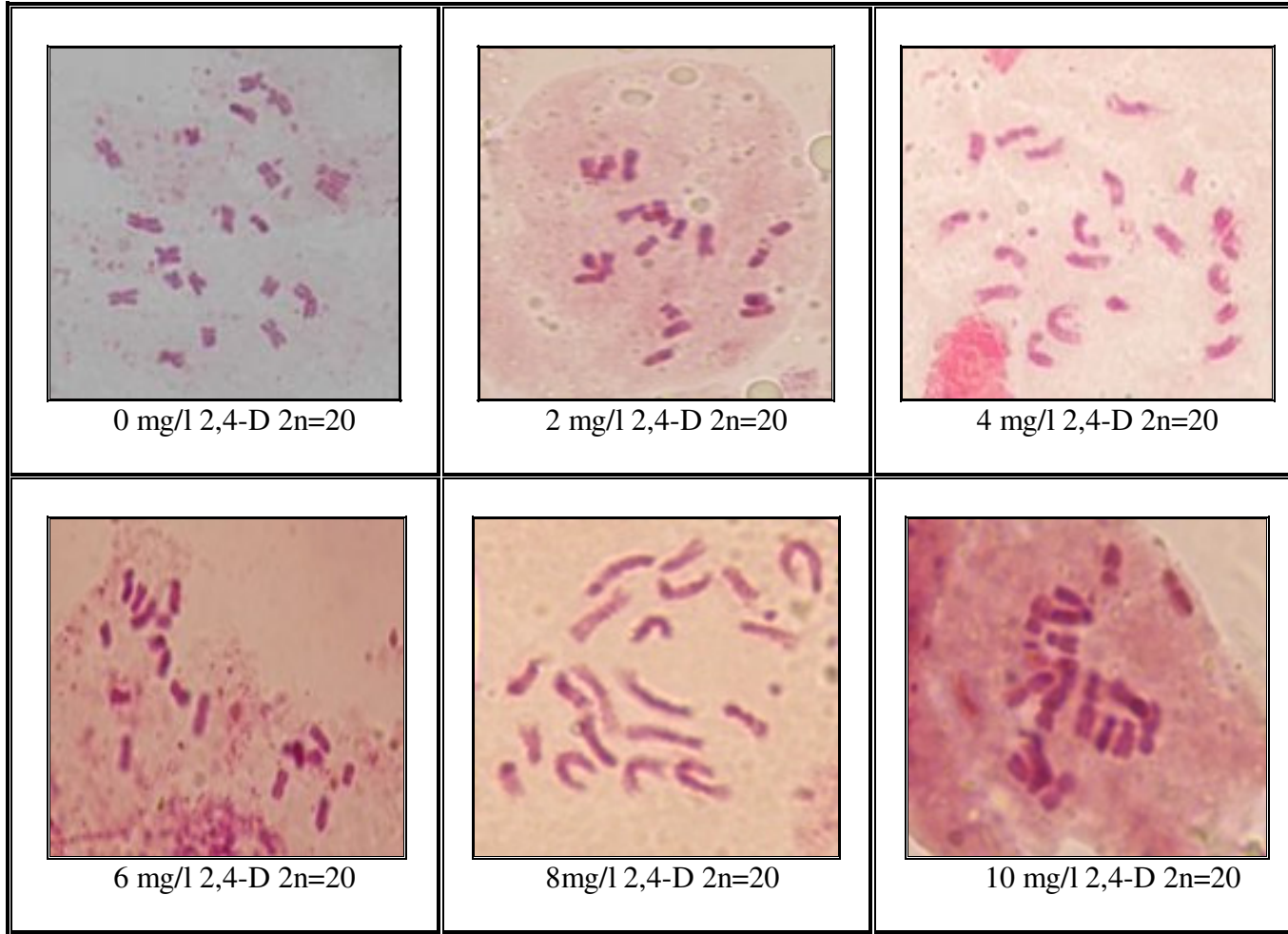
EK 7. BC666 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.



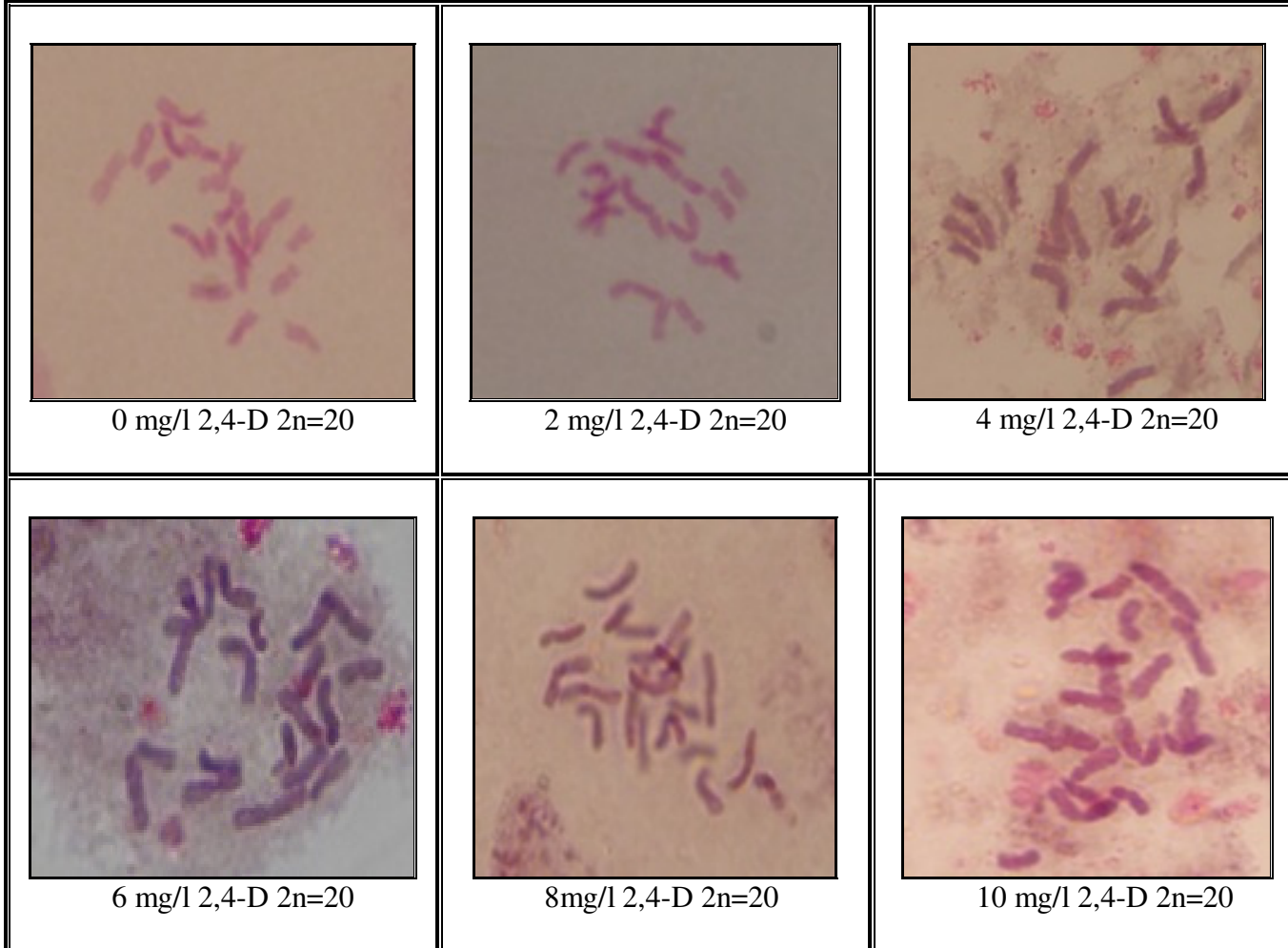
EK 8. TECTOR mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.



EK 9. ADA 523 mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.



EK 10. HELEN mısır çeşidinin kromozom görüntüleri.



ÖZGEÇMİŞ

Ankara’da 1978 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini TED Ankara Koleji Vakfı Özel Okulunda tamamladı. 1996 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nden 2001 yılında *Gıda Mühendisi* ünvanıyla mezun oldu. Şubat 2002-Şubat 2004 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programını tamamlayarak “*Genetik Uzmanı*” ünvanıyla mezun oldu. Şubat 2002-Ocak 2005 yılları arasında ise, yine Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümü’nde 2.Yüksek Lisans programını tamamlayarak “*Gıda Yüksek Mühendis*” ünvanıyla mezun oldu. 2006-2007 Eğitim-Öğretim yılında DAAD (Deutscher Akademischer Austausch Dienst; The German Academic Exchange Service) programı ile Almanya’ya gitti. 2004-2009 yılları arasında TÜBİTAK Yurrtiçi doktora bursu aldı.

Kasım 2008 yılından bu yana Genelkurmay BİLKARDEM (Bilimsel Karar Destek Merkezi) Başkanlığı’nda “*Moleküler Biyoloji ve Genetik Uzmanı*” olarak görev yapmaktadır.