

**BUĞDAY OLGUN EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE  
MEMELİ CİNSİYET HORMONLARININ  
KALLUS OLUŞUMU ve SOMATİK EMBRİYO  
OLUŞUMUNA ETKİSİ**

**Esra OTARAN**

**Yüksek Lisans Tezi  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı  
Yrd. Doç. Dr. Özcan ÇAĞLAR  
Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU**

**2012**

**Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BUĞDAY OLGUN EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE MEMELİ CİNSİYET  
HORMONLARININ KALLUS OLUŞUMU ve SOMATİK EMBRİYO  
OLUŞUMUNA ETKİSİ**

**Esra OTARAN**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ERZURUM  
2012**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

BUĞDAY OLGUN EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE MEMELİ CİNSİYET  
HORMONLARININ KALLUS OLUŞUMU ve SOMATİK EMBRİYO  
OLUŞUMUNA ETKİSİ

Yrd. Doç. Dr. Özcan ÇAĞLAR'ın danışmanlığı ve Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU'nun ortak danışmanlığında, Esra OTARAN tarafından hazırlanan bu çalışma 08./10./2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (X./...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Atilla DURSUN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Özcan ÇAĞLAR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emine ORHAN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.  
Proje No: BAP 2010 73

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BUĞDAY OLGUN EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE MEMELİ CİNSİYET HORMONLARININ KALLUS OLUŞUMU ve SOMATİK EMBRİYO OLUŞUMUNA ETKİSİ

Esra OTARAN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özcan ÇAĞLAR  
Ortak Danışman: Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

Genetik mühendisliği çalışmaları, etkili bir rejenerasyon sistemi için önemlidir. Bu yüzden çalışmada memeli cinsiyet hormonlarının buğday olgun embriyo kültüründeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada 3 buğday çeşidinin (Kırık, Palandöken 97 ve Nenehatun) endosperm destekli olgun embriyoları, kallus oluşumu için, 4 farklı memeli cinsiyet hormon tipinin (17  $\beta$ -östradiol, östrojen, progesteron ve testesteron) 3 değişik miktarını ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-6}$  mM) içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Genotiplerin ve uygulanan memeli cinsiyet hormon tiplerinin ve dozlarının kallus, embriyogenik kallus, somatik embriyo ve rejener bitki sayısının oluşumuna etkisi çok önemli olarak tespit edilmiştir. Hormon konsantrasyonlarının ise KSEKO oluşumuna etkisi önemsiz olarak bulunmuştur. Kallus oluşum oranı bakımından %86,8, KSEKO oranı bakımından %19,6 ve rejener bitki sayısı bakımından ilk sırayı 3,0 adet ile Palandöken 97 çeşidi alırken, ESEKO bakımından en yüksek oluşum %16,3 oranı ile Nenehatun çeşidinde tespit edilmiştir. En yüksek kallus oluşumu %86,0 ile testesteronda, en yüksek KSEKO ve ESEKO sırasıyla %23,8 ve %19,4 oranı ile 17  $\beta$ -östradiolde meydana gelirken, en yüksek rejener bitki sayısı 2,6 adet ile progesteronda bulunmuştur. Çalışmada rejenerasyon için en iyi sonuçlar Palandöken 97 çeşidinde, progesteron hormonunun  $10^{-5}$  mM konsantrasyonundan elde edilmiştir.

**2012, 68 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Buğday, progesteron, 17  $\beta$ -estradiol, östrojen, testesteron, olgun embriyo kültürü, hormon tipi, kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu.

## ABSTRACT

Master Thesis

### EFFECTS of MAMMALIAN SEX HORMONES on CALLUS and SOMATIC EMBRIYO FORMATION in WHEAT MATURE EMBRIYO CULTURE

Esra OTARAN

Ataturk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Field Crops

Adviser: Asst. Prof. Dr. Özcan ÇAĞLAR  
Assit. Adviser: Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

Genetic engineering studies are important for effective regeneration system. Therefore, the present study was performed to determine the effects of mammalian sex hormones in wheat mature embryo culture.

Callus formation of endosperm supported mature embryos of 3 wheat genotype were cultured in MS medium with 3 different doses of 4 mammalian sex hormones. The obtained results showed that application of mammalian sex hormones stimulated callus and embriogenic callus development and regeneration. There were significant effects of genotype and hormone types on the inductions of embryonic callus, plant regeneration and somatic embryo formation. On the other hand, hormone concentrations did not have any significant effect in KSEKO, whereas, there was significant effect on embrogenic callus, somatic embryo formation and regeneration. The highest callus induction (86,8%) and the highest plant regeneration (3,0%) were observed in genotype Palandöken 97. The highest plant regeneration induction was in progesteron (2,6%) while the highest callus induction was in testesteron hormone type (86,0%). The highest KSEKO was found in 17  $\beta$ -estradiol (23,8%) and highest ESEKO was in 17  $\beta$ -estradiol (19,4%).

The best results for plant regeneration were obtained from Palandöken 97 genotype applied with  $10^{-5}$  mM progesterone hormone type.

**2012, 68 pages**

**Keywords:** wheat, progesteron, 17  $\beta$ -estradiol, estrogen, testesteron, mature embryo culture, hormon type, callus induction, plant regeneration.

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin başlatılıp yürütülmesinde ilgi ve alakasını gösterip beni yönlendiren danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Özcan ÇAĞLAR'a (Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi), tezimin planlanıp, başlatılıp yürütülmesinden, laboratuardaki çalışmalarına ve tezimin sonuçlanmasına kadar desteğini esirgemeyen ortak danışmanım Sayın Prof. Dr. Kamil HALILOĞLU'na (Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi), tezimin düzenlenip, istatistiksel analizlerde ve sonuçların değerlendirmesindeki ilgi ve alakasından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN'a (Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi), laboratuarda tezimin başlatılıp yürütülmesi aşamasında, bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendirip, ilgilenen ve destek olan Sayın Yük. Zir. Müh. Pınar UYSAL'a (Tarla Bitkileri Doktora Öğrencisi), laboratuarda yine bilgisiyle yönlendirici olan Sayın Araş. Gör. Esin DADAŐOĞLU'na (Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Elemanı) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Esra OTARAN

Eylül 2012

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>5</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>13</b>
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Bitki materyali .....	13
3.1.2. Kimyasallar .....	14
3.1.2.a. Sterilizasyon için kullanılan kimyasallar.....	14
3.1.2.b. Kültür ortamları için kullanılan kimyasallar .....	14
3.1.2.c. Besi ortamındaki MS tuzları ve vitaminlere ilave olarak kullanılan kimyasallar .....	16
3.2. Yöntem .....	16
3.2.1. Uygulanan sterilizasyon teknikleri .....	17
3.2.1.a. Uygulamanın yapıldığı çalışma ortamı ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu.....	17
3.2.1.b. Çalışmada kullanılan tohumların yüzey sterilizasyonu.....	17
3.2.1.c. Kullanılan besiy ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu ...	17
3.2.1.d. Çalışma ortamının sterilizasyonunda kullanılan solüsyonların hazırlanışı ...	18
3.2.2. Uygulamada kullanılan eksplantın elde edilişi.....	18
3.2.3. Çalışmada kullanılan temel besiy ortamı ve hormonlar için stok solüsyonunun hazırlanışı .....	19
3.2.3.a. Kullanılan MS makro elementlerin stok solüsyonunun hazırlanışı.....	19
3.2.3.b. MS mikro elementlerin stok solüsyonunun hazırlanışı .....	19
3.2.3.c. Demir şelelatın hazırlanışı .....	20

3.2.3.d. MS vitamin stok solüsyonunun hazırlanışı .....	21
3.2.3.e. İnsan cinsiyet hormonlarının hazırlanışı.....	21
3.2.4. Kallus oluşum ortamının hazırlanışı.....	22
3.2.5. Bitki rejenerasyon ortamının hazırlanışı .....	23
3.2.6. Araştırmada incelenen karakterler.....	23
3.2.7. Rejenere bitki sayısı (adet).....	23
3.2.8. Verilerin istatistiksel analizi.....	24
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>25</b>
4.1. Kallus Oluşumu (%).....	25
4.2. Embriyogenik Kallus Oluşumu .....	33
4.2.1. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (ESEKO).....	33
4.2.2. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (KSEKO).....	42
4.3. Rejenere Bitki Sayısı (Adet).....	49
<b>5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....</b>	<b>56</b>
KAYNAKLAR .....	61
ÖZGEÇMİŞ .....	69



## SİMGELER DİZİNİ

cm	santimetre
d.w.	Kuru ağırlık (dry weight)
da	Dekar
dm	Desimetre
f.w	Yaş ağırlık (fresh weight)
g	gram
kg	Kilogram
kPa	Kilo paskal
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
pg	Pikogram
UV	Ultraviole
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikromolar
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ m	Mikrometre
$\beta$	Beta
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
%	Yüzde

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Memeli cinsiyet hormonlarının yapıları .....	6
<b>Şekil 3.1.</b> Sterilizasyon sonrası su emdirilmiş tohumun embriyosunun kesim kısımlarının gösterimi.....	18
<b>Şekil 4.1.</b> Çeşitlerin kallus oluşumuna etkisi (%).....	26
<b>Şekil 4.2.</b> Çeşitlere ait rejenerasyon ortamında 21. gündeki kallus oluşumu .....	27
<b>Şekil 4.3.</b> Memeli cinsiyet hormonlarının kallus oluşumuna etkisi (%).....	28
<b>Şekil 4.4.</b> Memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarının kallus oluşumuna etkisi (%).....	28
<b>Şekil 4.5.</b> Çeşitlerin farklı memeli cinsiyet hormon tiplerindeki kallus oluşumları (%) .....	29
<b>Şekil 4.6.</b> Çeşitlerin farklı konsantrasyonlardaki kallus oluşumları (%) .....	30
<b>Şekil 4.7.</b> Memeli cinsiyet hormonlarının farklı konsantrasyonlarının kallus oluşumuna etkisi (%).....	31
<b>Şekil 4.8.</b> Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon ve konsantrasyonlarındaki kallus oluşumu (%) .....	32
<b>Şekil 4.9.</b> Çeşitlerin ESEKO etkisi (%) .....	35
<b>Şekil 4.10.</b> Çeşitlere ait rejenerasyon ortamındaki somatik embriyo oluşumu .....	36
<b>Şekil 4.11.</b> Memeli cinsiyet hormonlarının ESEKO oluşumuna etkisi (%) .....	36
<b>Şekil 4.12.</b> Memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarının ESEKO oluşumuna etkisi (%) .....	37
<b>Şekil 4.13.</b> Çeşitlerin farklı memeli cinsiyet hormon tiplerindeki ESEKO oluşumları (%).....	38
<b>Şekil 4.14.</b> Çeşitlerin farklı konsantrasyonlardaki ESEKO oluşumları (%).....	39
<b>Şekil 4.15.</b> Memeli cinsiyet hormonlarının farklı konsantrasyonlardaki ESEKO oluşumları (%).....	40
<b>Şekil 4.16.</b> Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarındaki ESEKO.....	41
<b>Şekil 4.17.</b> Çeşitlerin KSEKO etkisi (%).....	43
<b>Şekil 4.18.</b> Memeli cinsiyet hormonlarının KSEKO etkisi (%).....	43

<b>Şekil 4.19.</b> Memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarının KSEKO oluşumuna etkisi (%) .....	44
<b>Şekil 4.20.</b> Çeşitlerin farklı memeli cinsiyet hormon tiplerindeki KSEKO oluşumları (%).....	45
<b>Şekil 4.21.</b> Çeşitlerin farklı konsantrasyonlarındaki KSEKO (%) .....	46
<b>Şekil 4.22.</b> Memeli cinsiyet hormonlarının farklı konsantrasyonlardaki KSEKO oluşumları (%).....	47
<b>Şekil 4.23.</b> Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarındaki KSEKO oluşumu .....	48
<b>Şekil 4.24.</b> Çeşitlerin rejenere bitki sayısına etkisi (%).....	50
<b>Şekil 4.25.</b> Çeşitlere ait kallustan meydana gelen rejenere bitki oluşumu.....	50
<b>Şekil 4.26.</b> Memeli cinsiyet hormonlarının rejenere bitki sayısına etkisi (adet) .....	51
<b>Şekil 4.27.</b> Memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarının rejenere bitki sayısına etkisi (adet).....	51
<b>Şekil 4.28.</b> Çeşitlerin farklı memeli cinsiyet hormon tiplerindeki rejenere bitki oluşumları (adet) .....	52
<b>Şekil 4.29.</b> Çeşitlerin farklı konsantrasyonlardaki rejenere bitki oluşumları (adet) .....	53
<b>Şekil 4.30.</b> Memeli cinsiyet hormonlarının farklı konsantrasyonlardaki rejenere bitki oluşumları (adet).....	54
<b>Şekil 4.31.</b> Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarındaki rejenere bitki oluşumları (adet) .....	55

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Araştırmada kullanılan buğday çeşitleri.....	13
<b>Çizelge 3.2.</b> MS kültür ortamı için kullanılan kimyasal bileşimleri ve miktarları .....	15
<b>Çizelge 3.3.</b> MS ortamına ek olarak kullanılan kimyasallar .....	16
<b>Çizelge 3.4.</b> İnsan cinsiyet hormonlarının stok solüsyonlarının hazırlanışı.....	21
<b>Çizelge 4.1.</b> Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon ve konsantrasyonlarında kallus oluşumları (%) .....	25
<b>Çizelge 4.2.</b> Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon ve konsantrasyonlarında ESEKO (%).....	34
<b>Çizelge 4.3.</b> Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon ve konsantrasyonlarındaki KSEKO (%) .....	42
<b>Çizelge 4.4.</b> Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon ve konsantrasyonlarındaki rejenere bitki sayısı (adet).....	49

## 1. GİRİŞ

İnsanların besin ihtiyaçlarını karşılaması bakımından beslenme unsurlarının başında gelen buğday, çeşitli birçok besinin hammaddesi olması, hayvansal yem kaynağı olarak kullanılabilmesi, ekim nöbetlerindeki kullanılabilirliği ve bu nedenle de tarım arazilerinin değerlendirilmesi açısından önemli bir bitkidir.

Buğday, dünyada en çok üretilen tahıllardan birisidir (FAO 2012). Un, irmik, nişasta, ekmek, bulgur, kuskus, tarhana, makarna, erişte, şehriye, kek, pasta, kurabiye ve bisküvi gibi pek çok kullanım alanı olanaklarının olması nedeniyle, yarı mamul ve/veya mamul ürüne işlenerek birçok alanda tüketilmektedir (Shewry *et al.* 1997). Kolay yetiştirilebilmesi ve insanların beslenme alışkanlıkları nedeniyle tahıllar içerisinde önemli bir yeri bulunmaktadır (Pylar 1988; Shewry *et al.* 1997).

2010 yılı verilerine göre Türkiye’de toplam tahıl ekim alanı, yaklaşık 12,1 milyon ha olmuş ve bu alan içerisinde buğdayın toplam ekim alanı ise 8,1 milyon ha olarak gerçekleşmiştir. Yine aynı yılın verilerine göre toplam tahıl üretimi 32 milyon ton olarak gerçekleşirken, buğday üretimi 19 milyon ton, verim ise 243 kg/da olmuştur (TÜİK 2012).

Günümüzde artan besin/ürün ihtiyacını karşılamak için çeşitli alternatif kaynaklara başvurulmuş, ancak sınırlı olan tarım arazileri nedeniyle insanlar birim alandan alınan verimi artırıcı çalışmalara yönelmişlerdir. Nitekim çalışmaların çoğu bu yönde yapılmış ve bu noktada da ıslah önem kazanmıştır. Bundan dolayı da özellikle bitki moleküler biyolojisi ve genetik mühendisliğinin gelişimiyle, buğdayın transformasyonu (gen aktarımı) moleküler ıslahta önemli konulardan biri haline gelmiştir (Vasil 1994).

Genetik mühendisliğinde tahılların kullanımı, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon oluşturma durumlarına bağlıdır. Doku kültüründeki çalışmalarda buğdaydan kallus teşekkülü ve bundan meydana gelecek iyi bir rejenerasyonu; kültür ortamı (Mathias and

Simpson 1986; Elena and Ginzo 1988; Lazar *et al.* 1983; Fennel *et al.* 1996), genotip (Sears and Deckard 1982; Mathies and Simpson 1986; Tuberosa *et al.* 1988; Chowdhury *et al.* 1991; Fennel *et al.* 1996; Şehirali ve Özgen 1998; Li *et al.* 2003; Bregitzer 1992), donör (verici) bitki büyüme şartları (Hess and Carman 1998) ve eksplant (başlangıç materyalinin) kaynağı (Ozias-Akins and Vasil 1982; Maddock *et al.* 1983; Zhang and Seilleur 1987; Redway *et al.* 1990) gibi birçok faktör etkilemektedir.

Genotip, buğdayın kallusundan oluşacak başarılı bir rejenerasyon için en önemli faktörlerden birisidir (Mathias 1990) ve yoğun bir şekilde araştırılmıştır (Fennel *et al.* 1996; Yu *et al.* 1999; Özgen *et al.* 1998). Buğdayda kallus kültüründen etkili bir rejenerasyon için en iyi eksplant kaynağını olgunlaşmamış embriyolar oluşturmaktadır (Redway *et al.* 1990; Özgen *et al.* 1996; Özgen *et al.* 1998; Mendoza and Kaepler 2002; Patnaik and Khurana 2003; Zale *et al.* 2004). Ancak elde edilmelerinin kolay olmayışı ve bu durumun da sebep olduğu maliyet ve zaman göz önünde bulundurulduğunda, kullanımları tercih nedeni olmamaktadır. Diğer taraftan, buğdayda kallus oluşumuna ve meydana gelecek olan bitki rejenerasyonuna, genotip ve ortamın yapmış olduğu etkinin de önemli olduğu yapılan araştırmalarda saptanmıştır (Bohorova *et al.* 2001; Przetakiewicz *et al.* 2003; Haliloğlu and Baenziger 2005).

Buğdayda; olgunlaşmamış embriyolar (Ahloowalia 1982; Sears and Deckard 1982; Felfoldi and Purnhauser 1992; Bohorova *et al.* 1995), olgunlaşmamış çiçek yapıları (Ozias-Akins and Vasil 1982; Maddock *et al.* 1983; Redway *et al.* 1990; Sharma *et al.* 1995), olgunlaşmamış yapraklar (Ahuja *et al.* 1982; Zamora and Scott 1983), olgun embriyolar (Ozias-Akins and Vasil 1983; Heyser *et al.* 1985; Kato *et al.* 1991), mezokotil (skutellum ile koleoptil arasındaki nod) (Yurkova *et al.* 1982), tohumlar (Gosch-Wackerle *et al.* 1979) ve apikal meristem (sürekli bölünen hücrelerden oluşan doku) (McHugen 1983) somatik kallus kültüründe kullanılmaktadır.

Buğday ve tahıllardan elde edilecek olan transgenik bitki, *Agrobacterium tumefaciens* (Haliloğlu and Baenzinger 2003) partikül bombardımanı (Patnaik and Khurana 2003) aracılığıyla yapılmaktadır. Yapılan çoğu çalışma buğday transformasyonu üzerine

yapılmış ve eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış embriyolar kullanılmıştır. Fakat bu eksplantların kullanımının sadece belirli dönemlerde mümkün olması ve elde edilmelerinin kolay olmayışı nedeniyle sorun oluşturmaktadır. Bundan dolayı da genetik transformasyon çalışmalarındaki kallusların üretimi için, olgun embriyolar alternatif bir eksplant kaynağıdır (Aydın vd. 2009).

Bitki gelişimini düzenleyiciler, bitki doku kültüründe tam bir embriyo teşekkülü, kallus (farklılaşmamış hücre topluluğu) teşekkülü ve sürgün oluşumu teşviki gibi etkileri nedeniyle kullanılmış ve etkileri incelenmeye çalışılmıştır. Doku kültürü ortamında bitki büyüme düzenleyicileri en önemli unsurlardan biridir. Bitkinin kendi bünyesinde üretilip, büyüme ve gelişmenin olacağı diğer kısımlara taşınan çok düşük konsantrasyonlarda dahi etkili olan endojen (içsel) organik bileşiklere bitki büyüme düzenleyicileri denmektedir. İndol asetik asit (IAA), zeatin, zeatin ribozid, GA (giberalik asit), absisik asit ve etilen bitkilerce üretilen hormonlardır (Babaoğlu vd. 2000).

Yapılan çalışmalarda birçok bitkide bu bitki büyüme düzenleyicilerinin yanında, doğal olarak memeli cinsiyet hormonlarının da meydana geldiği ve bu hormonların biyosentezi ve çevriminden sorumlu enzimlerin bitkilerde mevcut olduğu belirlenmiştir. Bu cinsiyet hormonlarından 17  $\beta$ -östradiol, adrosterone, testesteron veya progesteronun birçok bitkide mevcut olduğu saptanmıştır. Bu hormonlar ve ön maddelerinin uygulanmasının, bitki türüne bağlı olarak hücre bölünmesi, çiçeklenme, kallus oluşumu, kök, filiz, embriyo ve polen tüp gelişimi gibi durumları etkiledikleri belirlenmiştir (Janeczko and Skoczowski 2005).

Buğdayın doku kültüründe 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA ( $\alpha$ -naftalenasetik asit) ve IAA gibi oksinin farklı türevleri kallus oluşumu için, sitokinin ise (zeatin, 6-B, kinetin vs.) kallustan bitki rejenerasyonunun teşviki için kullanılmaktadır (Bhaskaran and Smith 1990). Buna rağmen buğday olgun embriyo kültüründe yapılan çalışmalarda memeli cinsiyet hormonlarının kullanımına yönelik herhangi bir bilgiye

rastlanmamıştır. Bu amaçla bu araştırmada buğday olgun embriyo kültüründe memeli cinsiyet hormonları kullanılarak buğday doku kültüründeki etkileri araştırılmıştır.

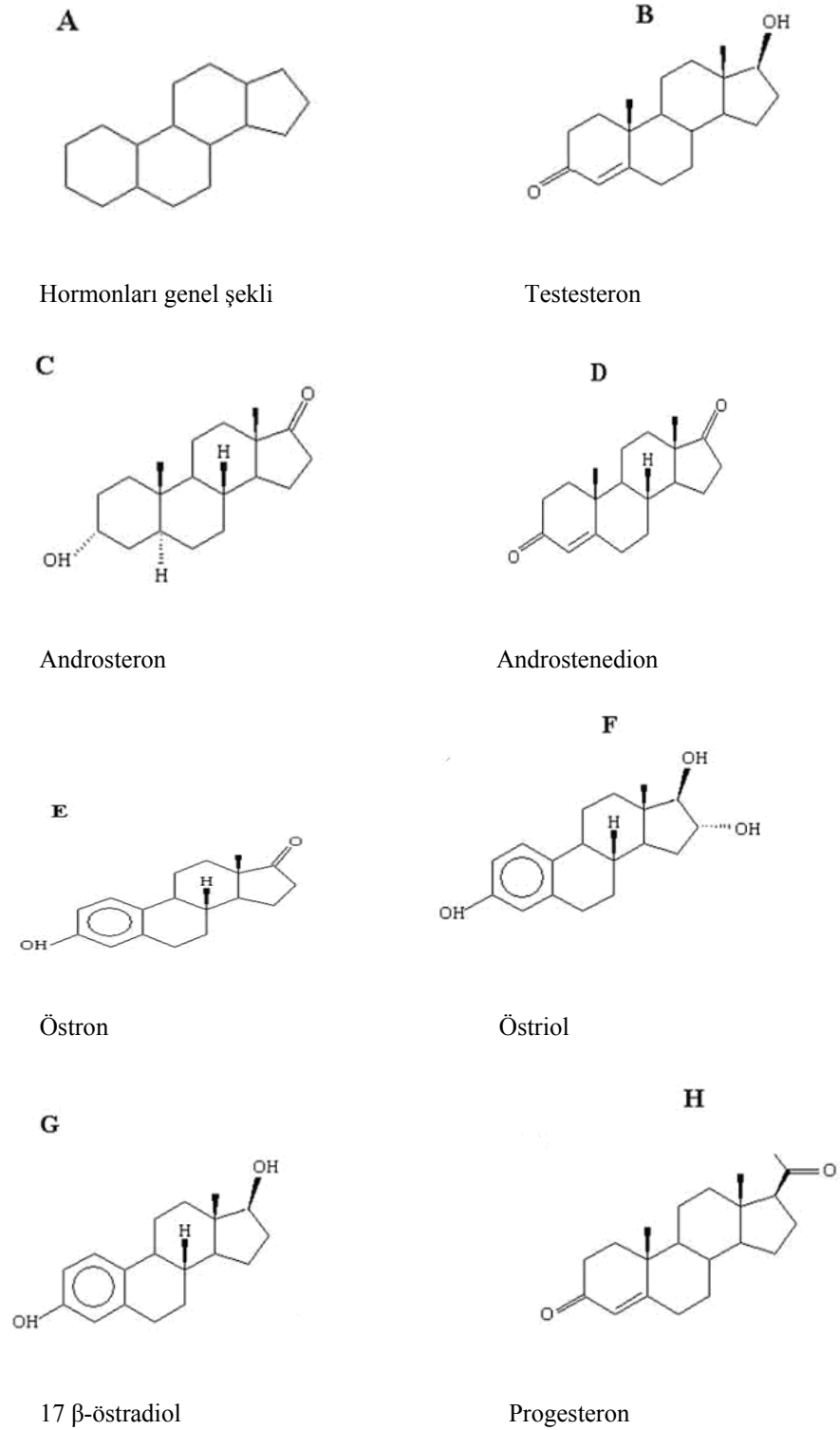


## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Memeli cinsiyet hormonlarından östrojenlerin öncü karakterleri ilk kez 1926 da Dohrn ve arkadaşları tarafından, sonra da 1930'lu yıllarda Butenandt, Jacobi and Skarzyoski tarafından saptanmıştır. 1980'li yıllarda ise hayvan ve insan cinsiyet hormonlarının bitkilerdeki kalitatif ve kantitatif analizleriyle ilgili birçok araştırma yapılmıştır (Janeczko and Skoczowski 2005).

Memeli cinsiyet hormonlarının bitkilerdeki varlığıyla ilgili yapılan çalışmalarda, bitkilerin %60-80 inde 17  $\beta$ -östradiol, androsteron, testesteron ve progesteronun mevcut olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu hormonların biyosentezi ve çevriminden sorumlu enzimlerin de yine bitkilerde mevcut olduğu tespit edilmiştir. Bitkilere bu hormonların veya uyarıcılarının uygulanmasıyla hücre bölünmesi, polen tüp gelişimi, kallus oluşumu, kök-sürgün gelişimi, embriyo gelişimi ve çiçeklenme üzerine etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Bu hormonların *in vitro* kültürlerde ve pratikte kullanmalarına etki eden faktör ise bitkilerdeki düzenleme kabiliyetleridir (Janeczko and Skoczowski 2005).

Memeli cinsiyet hormonlarından, protein metabolizması ve minerallerin kontrolünde görevli olan; östrojen, androjen ve progesteron, temel steron karbon iskeletine sahip bileşiklerin bir grubu olan steroidlere aittir (Şekil 2.1) (Janeczko and Skoczowski 2005).



**Şekil 2.1.** Memeli cinsiyet hormonlarının yapıları

Bitkilerde, östrojen hormonu ve miktarlarının belirlenmesinde, Kober renk reaksiyonu gibi bazı analitik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, bitkilerdeki östrojen seviyesinin

düşük olması nedeniyle, bu hormon miktarının belirlenebilmesi için daha hassas yöntemlerin kullanılması önerilmektedir (Van Rampuy and Zeexaart 1979).

Radioimmunoassay (RIA) yöntemiyle, bitki bünyesinde bulunan milyonda bir seviyesindeki hormon miktarı tespit edilmeye çalışılmış ve 50 familyaya ait 128 türde memeli siteroitlerinin bulunduğu miktarlar belirlenmiştir. Yapılan çalışmada bitki gelişimi süresince steroidlerin içeriğinin bitki kısımlarına, çeşidine ve türüne bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, bu steroidlerden androsteron ve progesteronun araştırmaya tabi tutulan bitkilerin yaklaşık %80'inden fazlasında bulunduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmaya göre araştırmaya tabi tutulan bitkilerde androjenlerin (testesteron ve dihidrotesteron) %70'inde, östrojenin (östron ve 17  $\beta$ -östradiol) ise %50'sinde bulunduğu tespit edilmiştir (Simons and Greenwich 1989).

*Brassica campestris* (Şalgam), *Zea mays* L. (Mısır) ve *Ginkgo biloba* L. (Mabet ağacı) bitkilerinin stil ve polenlerinde, östrojen ve 17  $\beta$ -östradiol içeriğini belirlemek için Zhang *et al.* (1991) RIA yöntemini kullanmışlardır. Yapmış oldukları incelemede bu bitkilerin polenlerinde 8-35  $\text{pg/g}^{-1}$  f.w., *Lilium davidii* Duch. bitkisinin dişicik borusunda ise 24-40  $\text{pg/g}^{-1}$  f.w. konsantrasyonunda 17  $\beta$ -östradiol bulunduğunu belirlemişlerdir. Diğer taraftan, yine aynı araştırmacılar çiçeklenme gelişimi süresince, östrojen ve özellikle 17  $\beta$ -östradiolün konsantrasyonlarında değişimler olduğunu bildirmişlerdir.

Bazı bitkilerin pistillerinde ve polenlerinde testesteronun varlığı ve miktarını Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) metodunu kullanarak belirlemeye çalışan Zhong-han *et al.* (1994); *Pinus bungeana* Zucc. ex. Endl. (11  $\text{ng/g}^{-1}$  d.w), *G. biloba* (87  $\text{ng/g}^{-1}$  d.w.) ve *Pinus tabulaeformis* Carr. (27  $\text{ng/g}^{-1}$  d.w.) bitkilerinin polenlerinde testesteronun bulunduğunu belirlemişlerdir. Ancak *Juglans regia* L. (Ceviz) ve *B. campestris* bitkisinde ise herhangi bir varlığına rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar, *L. davidii* Duch. bitkisinin pistilinde ise testesteron hormonunun bulunduğunu gözlemlediklerini kaydetmişlerdir.

RIA ve electrochemi-luminescence immunoassay tekniği kullanılarak *Solanum glaucophyllum* Desf. bitkisinde yapılan başka bir çalışmada, bitki organlarında ve kalluslarının lipit fonksiyonlarında, 17  $\beta$ -östradiol ve östrojenin bulunduğu belirtilmiştir (Milanesi *et al.* 2001).

Memeli cinsiyet hormonlarının *in vitro* şartlarda uygulanmasına yönelik yapılan çalışmalarda, hormonların yapmış oldukları etkiler belirlenmeye çalışılmıştır. 20. yy başlarında *in vitro* ortamda izole edilen bezelye embriyosu üzerine yapılan bir çalışmada, östrojenin embriyo gelişimini teşvik ettiği bulunmuştur (Bonner and Axtman 1937; Kögl and Haagen-Smit 1936). Yine, Helmkamp and Bonner (1952), 1 mg/dm<sup>3</sup> konsantrasyonundaki östrojeni bezelye embriyosuna uygulayarak, bezelye embriyosunun gelişimini teşvik ettiğini bildirmiştir.

Löve and Löve (1945), cinsiyet hormonlarıyla ilgili yaptıkları çalışmada östron ve 17  $\beta$ -östradiolün, *Melandrium dioeicum* spp. *Rubrum*, *Rumex acetosa* L. (Kuzukulağı) ve *Anthoxanthum aristatum* Boiss. (Yıllık kokuotu) bitkilerinin köklerindeki meristem aktivitesini teşvik ettiğini belirlemişlerdir.

1937'de Chouard, steroitlerin bitkilerdeki generatif gelişime etki ettiklerini bildirmiştir (Geuns 1978a). Yine başka bir çalışmada 17  $\beta$ -östradiolün, *Callistephus sinensis* L. (Saray patı) bitkisinin generatif gelişimi ve *Lemna minor* L. (Su mercimeği) bitkisinde ise çiçeklenmeyi teşvik edici etki yaptığı belirtilmiştir (Czygan 1962). Diğer taraftan, bitki başına uygulanan 0,1  $\mu$ g konsantrasyonundaki östrojenin, yaklaşık %40 oranında *Pisum sativum* L. (yem bezelyesi) bitkisinin gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir (Kopcewicz 1969).

Yapılan diğer çalışmalarda kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda, genotipler arasında meydana gelen farklılığın, endojen (bitki bünyesindeki) hormon seviyesindeki farklılıktan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Carman 1990; Bhaskaran and Smith 1990).

Atakan (2011) yapmış olduğu çalışmada, testesteron hormonunun ( $10^{-7}$  M), domates bitkisindeki çiçek sayısı üzerine etkisini önemli olarak bulmuştur. Çalışmaya göre en fazla çiçek testesteron ( $10^{-7}$  M), en az çiçeklenme ise östrojen ( $10^{-5}$  M) hormonunda gerçekleşmiştir. Yine aynı çalışmaya göre testesteron ( $10^{-6}$  M) hormonu en uzun fide kök verimini sağlarken, en kısa kök gelişimi ise yine östrojen ( $10^{-5}$  M) hormonunda meydana gelmiştir. En yüksek tohum çimlenmesi östrojen ( $10^{-7}$  M) hormonunda meydana gelirken, en az çimlenme kontrol grubunda oluşmuştur. Yine Hacıbektaşoğlu (2011)'nin hıyar bitkisinde yapmış olduğu çalışmada, en fazla fide kök uzunluğu testesteronda ( $10^{-7}$  M) meydana gelirken, en az östrojen ( $10^{-5}$  M) hormonunda gerçekleşmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada (Kopcewicz 1971), memeli cinsiyet hormonlarının bitkilere uygulanmasıyla, çift evcikli bitkilerde çiçeklerdeki cinsiyetin üzerine farklı etkiler yaptığı bildirilmiştir. Nitekim, *Ecballium elaterium* L. (Eşek hıyarı) bitkisine uygulanan östrojenler, toplamdaki çiçek sayısında değişikliğe sebep olup, dişi çiçeklerin, erkek çiçeklere olan oranını artırmıştır. Yine aynı şekilde uygulanan androjenler ise erkek çiçeklerin oranını artırarak cinsiyet üzerindeki tartışmalı etkisini gözler önüne sermiştir. Cucumber (Hıyar) bitkisine uygulanan testesterondan ziyade 17  $\beta$ -östradiol, bitkideki dişi çiçek sayısını artırıcı etki göstermiştir. Yine yapılan bu çalışmaya göre ilk çiçeğin, kontrol bitkilerinde 4. nodda görüldüğu, hormon uygulanan bitkilerde ise 1. nodda meydana geldiği belirtilmiştir (Gawienowski *et al.* 1971).

Bitki başına 5-15  $\mu$ g konsantrasyonunda 15 gün süreyle uygulanan 17  $\beta$ -östradiolün, normal şartlarda generatif gelişim göstermeyen *Salvia splendens* Sell. (Ateş çiçeği) bitkisinin generatif gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir. Ancak uygulanan androjenlerin ise generatif gelişmede etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Kopcewicz and Porazinski 1974). Farklı bir çalışmaya göre ise vernalize olmayan *Cichorium intybus* L. (Yabani hindiba) bitkisine uygulanan östron ve 17  $\beta$ -östradiol, bitki çiçeklenmesini teşvik etmiştir (Kopcewicz 1970). Diğer taraftan bu östrojenlerin uygulandığı bitkilerin çiçeklenme oranı %55 ve %85 olurken, kontrol bitkileri vejetatif dönemde kalmışlardır.

*Medicago Sativa* ile ilgili serada kontrollü şartlarda yapılan başka bir çalışmada ise (Awad 1974), 17  $\beta$ -östradiol, östron ve steroidal östrojenlerin uygulanması sonucunda; 0,5 ve 0,005  $\mu\text{g}/\text{dm}^{-3}$  oranındaki östrojenin kök ve gövde kuru ağırlığını artırdığını, 50-500  $\mu\text{g}/\text{dm}^{-3}$  konsantrasyonunda ise bitki büyümesini engellediğini belirlemiştir. Östrojenin büyümedeki etkisi, nitrojenin yokluğunda daha da belirgin olmuş ve östrojenin büyüme artışıdaki etkisi 17  $\beta$ -östradiolden daha fazla olmuştur. Östrojen uygulamasının bitki büyümesi, azot fiksasyonu aktivitesi ve nodül oluşumundaki etkisi ise önemsiz olarak bulunmuştur.

*Salvia splendens* bitkisine uygulanan testesteron gibi androjenlerin, bitkide generatif gelişmeyi teşvik edemediği bildirilmiştir (Kopcewicz and Porazinski 1974). Benzer şekilde Biswas *et al.* (1967), *Chrysanthemum sp.* (kasımpatı) bitkisinde androjenlerin çiçeklenme üzerine etkisinin olmadığını belirtmiştir. Buna karşın androsteron ve androsteredionun mutlak kışlık buğdayda vernalizasyon ihtiyacını karşıladığı ve başaklanmanın başlangıç süresinin 10-30 gün daha erken, başaklanma oranının ise %100 olduğu bildirilmiştir (Janeczko *et al.* 2002). *In vitro* ortamlarda yapılan çalışmalarda östrojenin, vernalizasyona ve fotoperiyoda ihtiyaç duyan bitkilerde çiçeklenmeyi teşvik etmek için kullanılabileceği, kışlık buğday ve *Arabidopsis Thaliana* L. bitkilerinde ispatlanmıştır (Janeczko *et al.* 2002; Janeczko *et al.* 2003a).

Ayçiçeği bitkisinin kök ve sürgün gelişimi üzerine memeli cinsiyet hormonlarının etkisini araştıran Bhattacharya and Gupta (1981), bitki başına uygulanan 0,25  $\mu\text{g}$  17  $\beta$ -östradiol ve progesteronun sürgün gelişimini artırdığını, kök gelişimini ise engellediğini bildirmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar 0,1 ve 0,25  $\mu\text{g}$  konsantrasyonundaki testesteronun kotiledon aksiller (koltuk altı) tomurcuk oluşumunu artırdığını, buna karşın en iyi kök gelişiminin ise 0,1  $\mu\text{g}$  konsantrasyonundaki progesteronda meydana geldiğini saptamışlardır.

Östrojenler yapılan birçok çalışmaya göre bitki bünyesindeki; aktif eriyebilir proteinlerde, şeker ve fotosentetik pigmentlerde, klorofil ve karetenoidlerde nükleik asitlerin birikimini artırmış ve fotosentetik işlevleri teşvik edici etki yapmıştır (Bajguz

and Czerpark. 1996; Czerpark 1993; Geuns 1978b; Gross and Parthier 1994; Heftman 1975; Hewitt *et al.* 1980; Janik and Adler 1984; Jones and Roddick 1988; Slama 1980; Kopcewicz 1969; Kopcewicz 1970; Kopcewicz and Rogozinska 1972).

Östrojen ve progesteron, bitkilerde hücre bölünmesi, polen büyümesi, filizlenme ve çiçeklenmeyi teşvik etmektedir. Nitekim, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde memeli cinsiyet hormonlarının etkileri araştırılmış, testosteron ve androsteronun, progesteron ve östrojenden daha fazla çiçeklenmeyi uyarıcı etki yaptıkları belirtilmiştir. 1,0 ve 0,1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonundaki androstenedion ve androsteron %96 oranında generatif bitki yüzdesini artırmış, kontrol bitkilerindeyse bu durum %41 oranında gözlemlenmiştir. Buna karşın 0,1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda uygulanan östrojenin ise generatif bitki sayısını azalttığı bildirilmiştir. Çalışmaya göre progesteron, östrojen ve 17  $\beta$ -östradiolün uygulaması androstenedion ve androsteron kadar çiçeklenmeyi teşvik etmemiştir (Janeczko *et al.* 2003a).

*Mung bean* ve domates fidelerine uygulanan östrojenin, yaprak kıvrılması ve epinasti (uyku) gibi morfolojik anormalliklere sebep olduğu yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Guan and Roddick 1988a; Guan and Roddick 1988b). Diğer bir çalışmada (Bajguz and Czerpak 1996) *Chlorella vulgaris* bitkisine uygulanan  $10^{-12}$  M ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonundaki 17  $\beta$ -östradiolün, klorofil ve karetenoid içeriğini artırdığı,  $10^{-3}$  ve  $10^{-8}$  M konsantrasyonunda ise bitki gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir.

Guan and Roddick (1988a), besi ortamında östron ve 17  $\beta$ -östradiolün sülfat türevlerini 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda kullanmışlar ve domates filizlerinin kök gelişimini ve sürgün sayısını azalttığını bildirmişlerdir.

Mısır bitkisine  $10^{-6}$  ve  $10^{-8}$  M konsantrasyonlarında uygulanan östron, testosteron ve pregnenolon asetat'ın bitki gelişimini artırdığı, ayrıca bitkideki çiçeklenmenin de erken olmasını sağladığı bildirilmiştir (Bhardwaj and Thukral 2000).

*Daucus carota* L. (Havuç) bitkisine 3-12 mg/dm<sup>3</sup> konsantrasyonunda 17 β-östradiol uygulanmasıyla ortamdaki kallus oluşum oranı %100 olmuş ve ayrıca bitkideki klorofil sentezinin de teşvik edildiği bildirilmiştir (Geuns 1978a). Yine diğer bir çalışmaya göre bu hormonların, *Polygonatum verticillatum* bitkisinde kallus üremesini teşvik ettiği gözlemlenmiştir (Janeczko and Szybka 2001; Szybka-Hryniewicz and Janeczko. 2004).

Anrodsteron ve androsterodion (1µM) skutellumdaki (kalkancık) kallus dokusunun üremesiyle birlikte, kışlık buğdayın olgunlaşmamış embriyolarının çimlenme ve gelişiminde teşvik edici etki göstermiştir. Östrojenlerden olan östron hormonu ise çimlenmeyi sınırlarken, kallus dokusunun oluşumunu engellememiştir (Janeczko 2000; Janeczko *et al.* 2002). Diğer taraftan yine benzer şekilde androsterodion *Arabidopsis thaliana* L.'de kallus dokusunun üremesini teşvik etmiştir (Janeczko 2000; Janeczko *et al.* 2003b).

*In vitro* koşullarda yapılan bir başka çalışmada (Janeczko 2000), östrojen ve progesteronun 1 µM uygulamasının kışlık buğday fidelerinin kök ve yaprak gelişimini teşvik ettiği, buna karşın 10 µM'lık östrojen ve progesteron uygulamasının sürgün gelişimini çok az da olsa engellediği bildirilmiştir.

Fasulye, bezelye, *Digitalis lanata* gibi vasküler (damarlı) bitkilerde yapılan çalışmalarda glukokortikoidlerin boyuna büyüme de etkili olduğu, özellikle hipokotil ve yan köklerde ise uyarıcı etkiye sebep oldukları belirlenmiştir. Optimum konsantrasyonlarda (10<sup>-6</sup> M ve 10<sup>-8</sup>M) uygulanmasının ise nükleik asit, protein, fotosentetik pigment ve indirgenmiş şeker içeriğinin ve dolayısıyla yaş-kuru ağırlık miktarlarının artışına sebep olduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan fitoöstrojen ve hayvan östrojenlerinin (optimum: 10<sup>-6</sup> M/10<sup>-10</sup> M) tohum çimlenmesi, büyüme-gelişme ve özellikle genç bitkilerin vejetasyon periyodunun başlamasında teşvik edici etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Czerpark 1993; Czerpark and Szamrej 2000; Czerpark *et al.* 2001; Geuns 1974; Geuns 1977; Geuns 1983; Loeys and Geuns 1978; Jacob *et al.* 1969; Johnson and Baxter 1978; Schena and Yamamoto 1988).



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki materyali

Yapılan araştırmada, Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve Tarla Bitkileri bölümü stoklarından temin edilen 3 buğday çeşidi kullanılmış ve çeşitlerle ilgili gerekli bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Araştırmada kullanılan buğday çeşitleri (Anonim 2012)

Çeşit	Pedigrisi	Tarımsal Özellikleri
PALANDÖKEN 97	AU//YT54*2/N10B/3/II8260 /5/PNC/CM//NB6977/3/CC/I NIA//BB/4/MXP//KR/FUN O	Mutlak kışlık bir çeşittir. Kıraç şartlardaki ekim için önerilmekle birlikte soğuğa ve kurağa karşı dayanıklı bir çeşittir. Kardeşenme özelliği iyi, orta geçi olan bu çeşidin gübreye reaksiyonu iyidir. Verimi bölgemiz kurak şartlarına göre ortalama 350-450 kg/da dır. Buğdayda görülen, sürme, rastık ve paslara dayanıklılıdır.
NENEHATUN	ND//P101/BLUEBOY SWM584 OP-1P-2P-OH	Mutlak kışlık bir çeşittir. Kıraç şartlar için önerilmekte, soğuk ve kurak şartlara dayanıklı bir çeşittir. Kardeşenme özelliği iyi olmakla birlikte, orta erkenci olan bu çeşidin gübreye reaksiyonu iyidir. Verimi ise bölgemizdeki kurak şartlara göre ortalama 300-350 kg/da dır. Sürme, rastık ve paslara dayanıklılık oranı iyidir.
KIRİK	Yerel Çeşit	Alternatif karakterli bir çeşittir. Kışlık ekimlerde kıraç, yazlık ekimlerde sulu şartlar için önerilmektedir. Soğuk ve kurak şartlara karşı orta dayanıklıdır. Kardeşenme özelliği çok iyi olup, orta erkenci bir çeşittir. Gübreye reaksiyonu iyi olmakla birlikte, verimi: kuru şartlara göre ortalama 150-200 kg, sulu şartlara göre ise 200-250 kg dır. Sürme, rastık ve paslara karşı hassas bir çeşit olup, uzun boylu ve zayıf sap yapısı itibariyle de yatmaya hassastır.

### **3.1.2. Kimyasallar**

#### **3.1.2.a. Sterilizasyon için kullanılan kimyasallar**

-Etil alkol (%70) ve %1'lik sodyum hipoklorit

#### **3.1.2.b. Kültür ortamları için kullanılan kimyasallar**

Kallus ve bitki rejenerasyonu ortamlarında Murashige and Skoog (1962) temel besi ortamı kullanılmıştır. MS ortamında bulunan kimyasal bileşimleri ve miktarları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** MS kültür ortamı için kullanılan kimyasal bileşimleri ve miktarları (Aydın 2006)

KİMYASAL BİLEŞİMİ	Miktar (mg/l)
<b>İNORGANİKLER</b>	
<b>Makro elementler</b>	
CaCl <sub>2</sub>	332,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub>	180,7
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
<b>Mikro elementler</b>	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	27,8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KI	0,83
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9
Na <sub>2</sub> EDTA	37,26
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
<b>ORGANİKLER</b>	
Glycine	2
Myo-inositol	100
Nicotonic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1

### 3.1.2.c. Besi ortamındaki MS tuzları ve vitaminlere ilave olarak kullanılan kimyasallar

MS ortamına ek olarak kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** MS ortamına ek olarak kullanılan kimyasallar

Komponentler	Miktar
Askorbik Asit	50 mg/l
MES hidrate	1,95 g/l
Pyhtagel	2g/l
Sakkaroz	20 g/l

### 3.2. Yöntem

Yapılan bu çalışmada, 3 buğday çeşidinin (Kırık, Palandöken 97 ve Nenehatun) endosperm destekli olgun embriyolarının kallus oluşumu incelenmiştir. Bunun için, 4 farklı memeli cinsiyet hormon tipinin (17  $\beta$ -östradiol, östrojen, progesteron ve testosteron), 3 değişik miktarını ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mM) içeren MS ortamında eksplantlar kültüre alınmıştır. Çalışma her bir tekerrürde 20 adet eksplant buldurmak üzere 4 tekerrürlü gerçekleştirilmiştir.  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık ortamda 3 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için hormonsuz MS ortamına aktarılmış ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık:karanlık fotoperiyotta bekletilmiştir. Aydınlatmada kaynak olarak floresan lambası ve yoğunluk olarak ise 1500 lüks kullanılmıştır. Çalışmanın yürütülmesi esnasındaki işlemler aşağıda verilmiştir.

### **3.2.1. Uygulanan sterilizasyon teknikleri**

#### **3.2.1.a. Uygulamanın yapıldığı çalışma ortamı ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu**

Steril olarak çalışılabilmesi için kullanılacak olan yüzeyler (steril kabin içi), kullanımdan en az 20 dakika önce %70'lik etil alkolle silinmiş ve ardından UV lambası açılmıştır. UV lambası kültüre alma işlemi başlamadan önce kapatılmıştır. Çalışmada kullanılan aletler (bisturi, pens vb.), çalışma esnasındaki kullanımdan önce etil alkol içine batırılmış, ardından alev lambasına tutularak, alev muamelesiyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Eksplantların kesimi esnasında kullanılan 10x15 cm boyutlarındaki kurutma kâğıtları alüminyum folyo içine sarılarak otoklav edilmiş, ardından bu siterilize edilmiş kurutma kâğıtları üzerinde kesimler yapılmıştır.

#### **3.2.1.b. Çalışmada kullanılan tohumların yüzey sterilizasyonu**

Çalışmada kullanılacak olan tohumlar musluk suyunda 10-15 dakika yıkandıktan sonra, %70'lik etil alkolde 5 dakika karıştırılmış, ardından steril kabin içersinde 3 defa steril saf suyla tekrar yıkanmıştır. İşlem tamamlandıktan sonra bir damla Tween 20 (Sigma) katılmış olan %1'lik sodyum hipokloritte 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra tekrar kabin içerisine sterile edilip alınmış ve 3 kez steril saf suyla tekrar yıkanmıştır. İşlemler bittikten sonra bir gece steril su içersinde 4°C'de bekletilmiş ve ardından endosperm destekli olgun embriyolar kültüre alınmıştır.

#### **3.2.1.c. Kullanılan besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu**

Çalışmada kullanılan besi ortamları, uygun bir sterilizasyon için otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'ye tabi tutulmuştur. Ancak sıcakla muamele edildiğinde bozulan vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu için

0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreleri (milipor) kullanılmıştır.

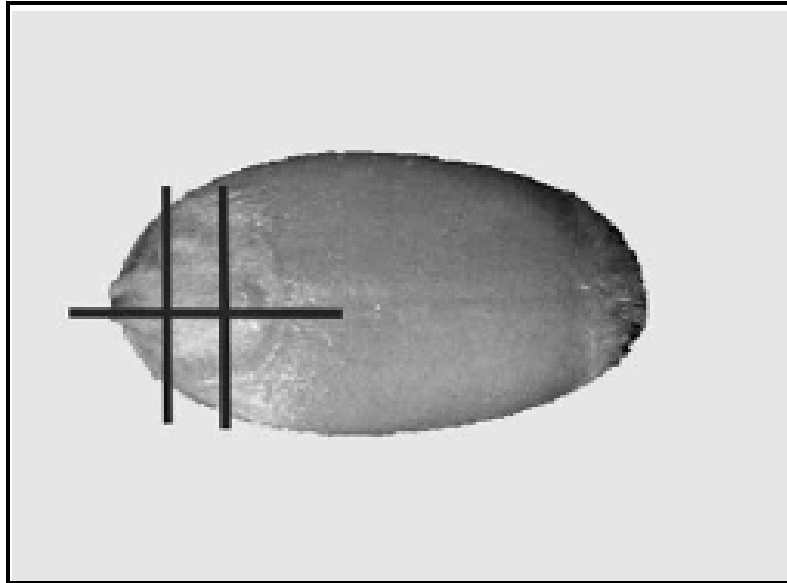
### **3.2.1.d. Çalışma ortamının sterilizasyonunda kullanılan solüsyonların hazırlanışı**

**1. %70'lik Etil alkolün hazırlanışı:** %96'lık etil alkolden 700 ml alınmış ve hacim 960 ml'ye tamamlanmıştır.

**2. %1'lik Sodyum hipoklorit solüsyonunun hazırlanışı:** %5 sodyum hipoklorit (NaOCl) içeren ticari *Ace®* marka çamaşır suyundan 200 ml alınmış ardından hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

### **3.2.2. Uygulamada kullanılan eksplantın elde edilişi**

Çalışmada kullanılan embriyolar tohum üzerinden ayrılmadan 6 parçaya bölünmüştür (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Sterilizasyon sonrası su emdirilmiş tohumun embriyosunun kesim kısımlarının gösterimi (Filippov *et al.* 2006).

### **3.2.3. Çalışmada kullanılan temel besi ortamı ve hormonlar için stok solüsyonunun hazırlanışı**

MS makro (10X) ve mikro (100X) elementler ile demir şelelat (100X) ve vitaminler (100X) için stok solüsyon hazırlanmıştır. Yine çalışmada kullanılan hormonlar içinde ayrıca stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Bu kimyasalların stok solüsyonlarının hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

#### **3.2.3.a. Kullanılan MS makro elementlerin stok solüsyonunun hazırlanışı**

Besi ortamında bulunması gereken makro elementlerin (Çizelge 3.2) stok solüsyonlarının hazırlanmasında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

- 1) Besi ortamının 1 litresinde bulunması gerekli makro elementlerin miktarlarının 10'ar katı hassas bir terazi ile tartılmıştır.
- 2) Tartılan makro elementler, içerisinde 200 ml bidistile su bulunan ve bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 2 litrelik bir erlenmayer kabına sırasıyla ilave edilmiştir.
- 3) İlave edilen makro elementler su içerisinde iyice çözüldükten sonra, karışımın hacmi bir litreye tamamlanmıştır.
- 4) Çözelti amber şişeye aktarıldıktan sonra, şişe üzerine hazırlanma tarihi ve hangi besi ortamına ait element çözeltisi olduğu ve konsantrasyonu (10X) belirtilen etiket yapıştırıldıktan sonra, muhafaza edilmek üzere buzdolabına (4°C) yerleştirilmiştir.

#### **3.2.3.b. MS mikro elementlerin stok solüsyonunun hazırlanışı**

- 1)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  hariç besi ortamının 1 litresinde bulunması gerekli mikro

elementlerin miktarlarının 100'er katı hassas bir terazi ile tartılmıştır.

2) Tartılan mikro elementler, içerisinde 200 ml bidistile su bulunan ve bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 2 litrelik bir erlenmayer kabına sırasıyla ilave edilmiştir.

3) İlave edilen mikro elementler su içerisinde iyice çözüldükten sonra, karışımın hacmi bir litreye tamamlanmıştır.

4) Çözelti amber şişeye aktarıldıktan sonra, şişe üzerine hazırlanma tarihi ve hangi besi ortamına ait element çözeltisi olduğu ve konsantrasyonu (100X) belirtilen etiket yapıştırıldıktan sonra, muhafaza edilmek üzere buzdolabına (4°C) yerleştirilmiştir.

### **3.2.3.c. Demir şelelatın hazırlanışı**

Bu şelelatın hazırlanmasında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

1) Besi ortamının bir litresinde bulunması gerekli olan  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  miktarlarının 100 katı olan 2,78 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve 3,726 g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  hassas terazide tartılmıştır.

2) 3,726 g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , içerisinde 350 ml bidistile su bulunan ve bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 1 litrelik erlenmayer kabına ilave edilmiş ısıtılarak çözdürülmüştür. Yine ayrı bir kaptaki 350 ml bidistile su içerisinde 2,78 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ısıtılarak çözdürülmüştür.

3) Bu iki ayrı çözelti birleştirilerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Bu birleştirme işleminden sonra bu çözeltinin rengi açık sarı renkte olmuştur. Hazırlanmış olan bu şelelat, amber renkli şişeye aktarılmış ve direkt güneş ışığı almayacak şekilde buzdolabında (4°C) saklanmıştır.



### 3.2.3.d. MS vitamin stok solüsyonunun hazırlanışı

Besi ortamında bulunması gerekli olan MS vitaminlerinin stok solüsyonun hazırlanmasında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir:

- 1) Besi ortamının bir litresinde bulunması gerekli olan vitamin miktarlarının 100 katı 100 ml'lik stok solüsyon için hesaplanmış ve buna göre hassas terazide tartılmıştır.
- 2) Tartılan vitaminler içinde 30 ml bidistile su bulunan ve bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 250 ml'lik erlenmayer kabına sırasıyla ilave edilmiştir.
- 3) İlave edilen vitaminler su içerisinde iyice çözdürüldükten sonra, karışımın hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 4) Hazırlanmış vitamin çözeltisi üzerine hazırlanma tarihi ve konsantrasyonu yazıldıktan sonra, amber renkli cam şişe içerisinde buzdolabında (4°C) saklanmıştır.

### 3.2.3.e. İnsan cinsiyet hormonlarının hazırlanışı

İnsan cinsiyet hormonlarının stok solüsyonunun hazırlanmasında çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasallar ile saklama sıcaklıkları ve çalışma konsantrasyonları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** İnsan cinsiyet hormonlarının stok solüsyonlarının hazırlanışı

Hormon Tipi	Çözücü	Seyreltici	Çalışma Konsantrasyonu	Saklama Sıcaklığı
17 $\beta$ -östradiol	Etil Alkol	Su	0,05 mM	+20°C
Östrojen	Dioxan	Su	0,05 mM	+20°C
Progesteron	Kloroform	Su	0,05 mM	+4°C
Testesteron	Etil Alkol	Su	0,05 mM	+4°C

### 3.2.4. Kallus oluşum ortamının hazırlanışı

Uygulamada kullanılan kallus oluşum ortamının hazırlanması için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. 500 ml'lik bidistile su içeren 2 litrelik bir behere, MS makro element stok solüsyonundan (10X) 100 ml, mikro element stok solüsyonundan (100X) 10 ml eklenmiştir.
2. Bunun üzerine demir şelelat stok solüsyonundan (100X) 10 ml, 20 g sakaroz ve 1,95 g MES (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate, 4- Morpholineethanesulfonic acid) tartılıp eklenmiş ve eriyinceye kadar karıştırılmıştır.
3. Dereceli silindire karışım aktarılmış ve ardından hacim bidistile su ile 965 ml tamamlanmıştır.
4. Beherde bulunan karışım tamamen çözününce, manyetik karıştırıcı kullanılarak 1N NaOH solüsyonları ilave edilmiş ve pH=5,8'e ayarlanmıştır.
5. 1,8 g Phytigel içeren erlene boşaltılan karışım otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121 °C'de sterilizasyona tabi tutulmuştur.
6. Isıyla muamelede bozulan maddeler otoklav aşaması bittikten sonra ilave edilmiştir. Bunun için 50 ml beher içersine MS vitamin stok solüsyonundan (100X) 10 ml, askorbik asit (50 mg/l) solüsyonundan 1 ml eklenmiştir ve karıştırıldıktan sonra 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtrelerden geçirildikten sonra eklenmiştir.
7. İnsan cinsiyet hormonları milipordan geçirilip sterilize edildikten sonra ısı ile bozulan maddelerle birlikte eklenmiştir.

### 3.2.5. Bitki rejenerasyon ortamının hazırlanışı

Kallus oluşum ortamından farklı olarak memeli cinsiyet hormonları bu aşamada kullanılmamıştır.

### 3.2.6. Araştırmada incelenen karakterler

**1. Kallus oluşum oranı (KOO) (%):** Kallus oluşum ortamına alınan eksplantlar 3 hafta sonra aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$KOO (\%) = (\text{Oluşan kallus sayısı} / \text{kültüre alınan eksplant sayısı}) \times 100$$

**2. Embriyogenik kallus oluşumu:** Kallus oluşum ortamındaki eksplant sayısına ve eksplantlardan meydana gelen kallus sayısına göre hesaplanmıştır.

**2.a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (ESEKO) (%):** Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$ESEKO = (\text{Embriyogenik kallus sayısı} / \text{eksplant sayısı}) \times 100$$

**2.b. Meydana gelen kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (KSEKO) (%):** Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$KSEKO = (\text{Embriyogenik kallus sayısı} / \text{kallus sayısı}) \times 100$$

### 3.2.7. Rejenere bitki sayısı (adet)

Her bir cinsiyet hormonu ve konsantrasyonu için meydana gelen bitkinin sayısı olarak belirlenmiştir.

### 3.2.8. Verilerin istatistiksel analizi

Araştırmada, doku kültürüne alınan çeşidin (Kırık, Palandöken 97 ve Nenehatun), cinsiyet hormonları tipinin (17  $\beta$ -östradiol, östrojen, progesteron ve testesteron) ve cinsiyet hormonları konsantrasyonlarının ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mM) etkileri araştırılmıştır. Kallus ve embriyogenik kallus oluşum oranı ve rejenere bitki sayısına ilişkin hesaplanan veriler, 3x4x3 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. İncelenen karakterlerde çeşit, cinsiyet hormon tipi ve konsantrasyonlarına ait ortalamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde LSD oklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

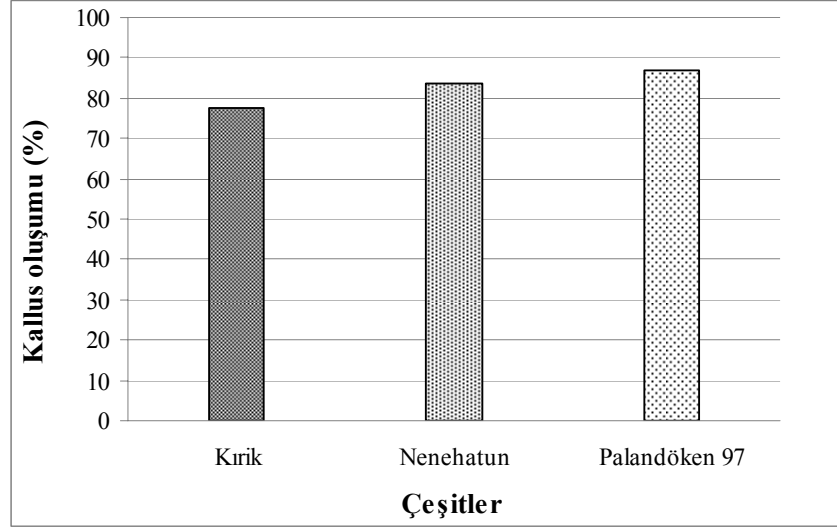
### 4.1. Kallus Oluşumu (%)

Kallus oluşum oranı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar çok önemli ( $p<0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.1). Kallus oluşum oranı bakımından ilk sırayı ortalama %86,8 ile Palandöken 97 çeşidi almış, bunu sırasıyla %83,4 ile Nenehatun ve %77,5 ile Kırık izlemiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

**Çizelge 4.1.** Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon ve konsantrasyonlarında kallus oluşumları (%)

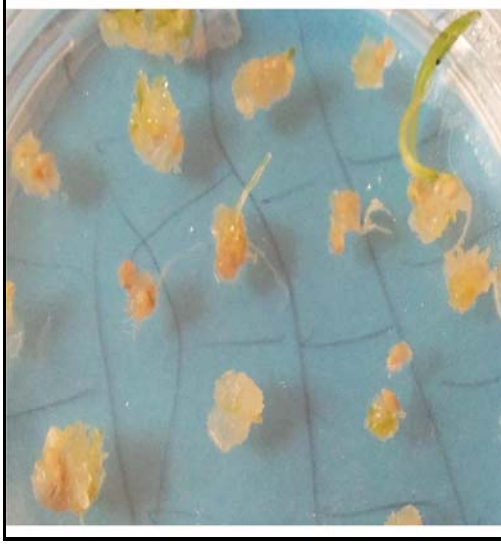
Hormon	Konsantrasyon (mM)	Kırık	Nenehatun	Palandöken 97	ORTALAMA
17 $\beta$ -östradiol	$10^{-4}$	86,3	83,8	88,8	86,3
	$10^{-5}$	72,5	90,0	76,3	79,6
	$10^{-6}$	72,5	88,8	80,0	80,4
	<i>Ortalama</i>	<i>77,1</i>	<i>87,5</i>	<i>81,7</i>	<i>82,1</i>
Östrojen	$10^{-4}$	63,8	83,8	77,5	75,0
	$10^{-5}$	77,5	85,0	91,3	84,6
	$10^{-6}$	62,5	83,8	86,3	77,5
	<i>Ortalama</i>	<i>67,9</i>	<i>84,2</i>	<i>85,0</i>	<i>79,0</i>
Progesteron	$10^{-4}$	75,0	67,5	83,8	75,4
	$10^{-5}$	75,0	85,0	91,3	83,8
	$10^{-6}$	90,0	87,5	93,8	90,4
	<i>Ortalama</i>	<i>80,0</i>	<i>80,0</i>	<i>89,6</i>	<i>83,2</i>
Testesteron	$10^{-4}$	85,0	80,0	95,0	86,7
	$10^{-5}$	83,8	80,0	86,3	83,3
	$10^{-6}$	86,3	86,3	91,3	87,9
	<i>Ortalama</i>	<i>85,0</i>	<i>82,1</i>	<i>90,8</i>	<i>86,0</i>
Hormonların ortalaması	$10^{-4}$	77,5	78,8	86,3	80,8
	$10^{-5}$	77,2	85,0	86,3	82,8
	$10^{-6}$	77,8	86,6	87,8	84,1
	<i>Konsantrasyon Ortalamaları</i>	<i>77,5</i>	<i>83,4</i>	<i>86,8</i>	<i>82,6</i>
F değeri (Çeşit)		160,45**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Çeşit)		1,04
F değeri (Hormon)		45,02**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Hormon)		1,20
F değeri (Konsantrasyon)		19,29**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Konsantrasyon)		1,04
F değeri (ÇXH)		49,89**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXH)		2,08
F değeri (ÇXD)		12,18**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXD)		1,80
F değeri (HXD)		54,20**	LSD <sub>(0,05)</sub> (HXD)		2,08
F değeri (ÇXHxD)		14,94**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXHxD)		3,60
Varyasyon Katsayısı (%)		3,11			

\*\* ile işaretli F değerleri 0.01 ihtimal düzeyinde önemlidir.

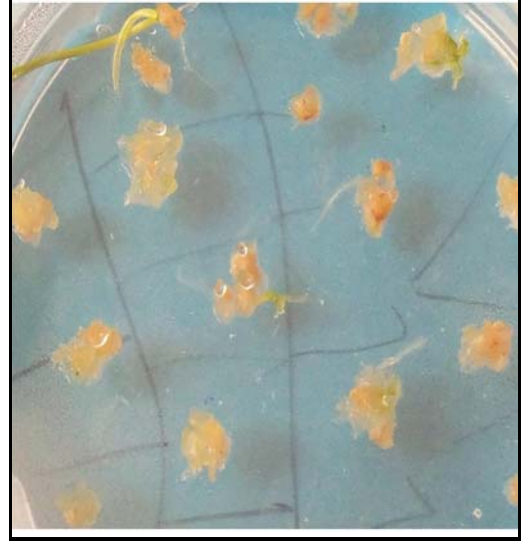


**Şekil 4.1.** Çeşitlerin kallus oluşumuna etkisi (%)

Memeli cinsiyet hormonlarının kallus oluşumu üzerine olan etkisi çok önemli ( $p < 0,01$ ) olmuştur. En yüksek kallus oluşumu (%86,0) testesteronda meydana gelirken, en düşük (%79,0) östrojende meydana gelmiştir. Bu oran progesteronda %83,2,  $17\beta$ -östradiolde %82,1 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



a) Palandöken 97 Çeşidi

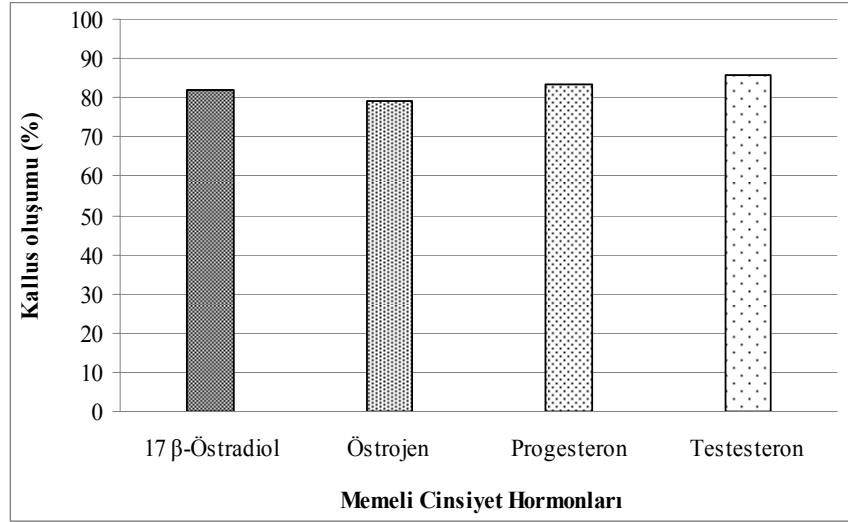


b) Nenehatun Çeşidi



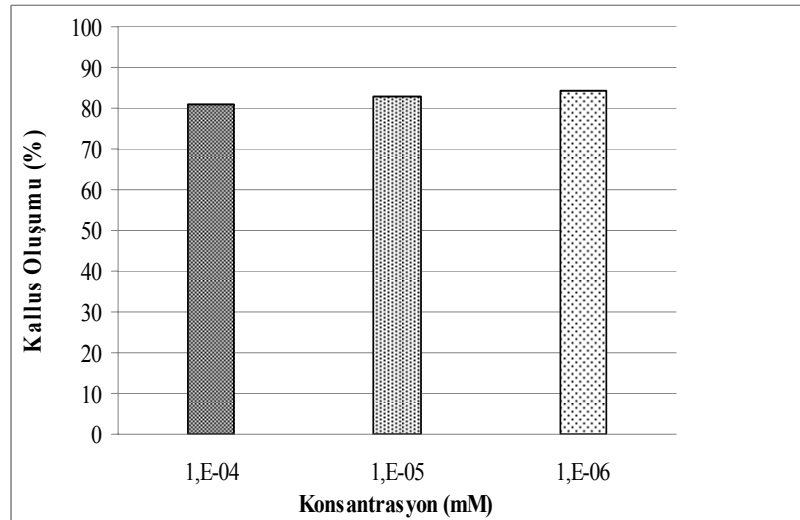
c) Kırık Çeşidi

**Şekil 4.2.** Çeşitlere ait rejenerasyon ortamında 21. gündeki kallus oluşumu



**Şekil 4.3.** Memeli cinsiyet hormonlarının kallus oluşumuna etkisi (%)

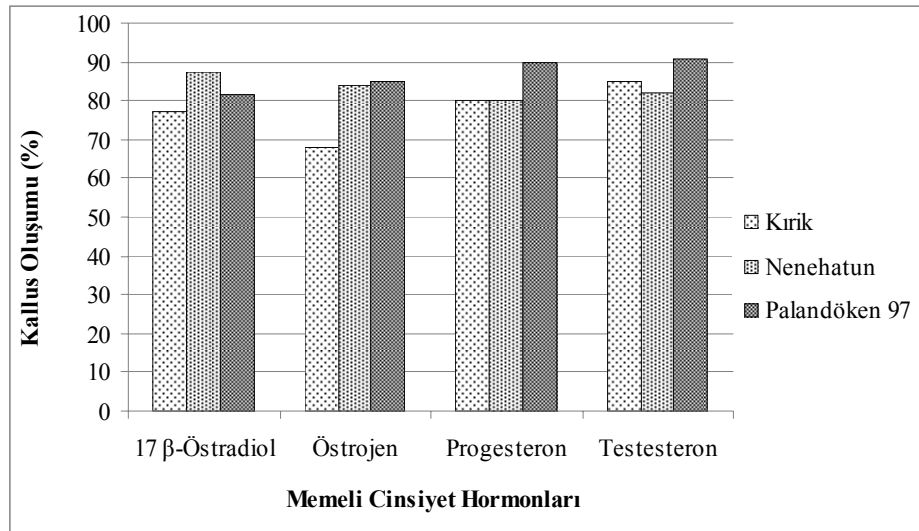
Kallus oluşumu üzerine memeli cinsiyet hormonlarının konsantrasyonları karşılaştırıldığında, konsantrasyonun ana etkisinin kallus oluşumu üzerine etkisi çok önemli ( $p < 0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.1). Konsantrasyon düştükçe kallus oluşumu artış göstermiştir. En yüksek kallus oluşumu, %84,1 ile  $10^{-6}$  mM'da meydana gelmiş, bunu sırasıyla  $10^{-5}$  mM (%82,8) ve  $10^{-4}$  mM (%80,8) izlemiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarının kallus oluşumuna etkisi (%)

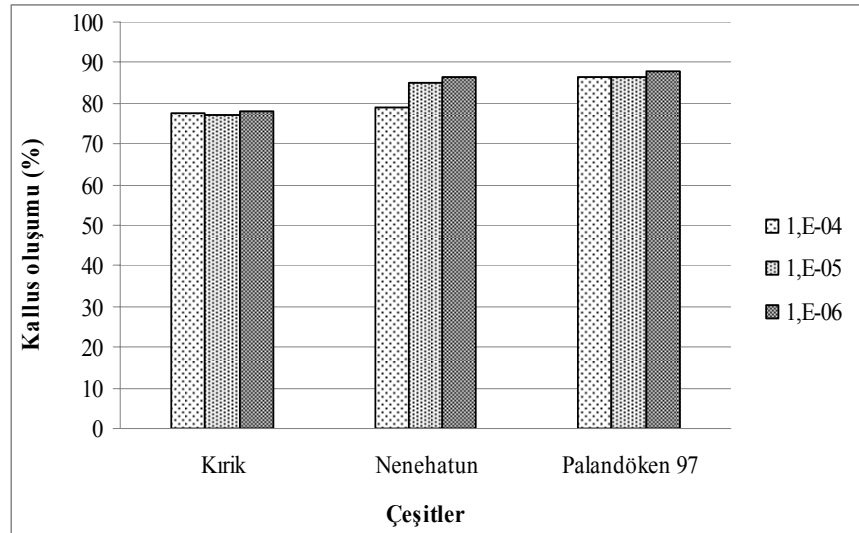


Çeşitlerin kallus oluşumları memeli cinsiyet hormon tipine göre değişmiş ve çeşitxhormon interaksyonu çok önemli ( $p<0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.1). En yüksek kallus oluşumu Kırık (%85,0) ve Palandöken 97 (%90,8) çeşitlerinde testeteronda meydana gelirken, Nenehatunda (%87,5) 17  $\beta$ -östradiolde meydana gelmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4). En düşük kallus oluşumları ise Kırık çeşidinde %67,9 ile östrojende, Nenehatun çeşidinde %80,0 ile progesteronda ve Palandöken 97 çeşidinde %81,7 ile 17  $\beta$ -östradiolde meydana gelmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.5)



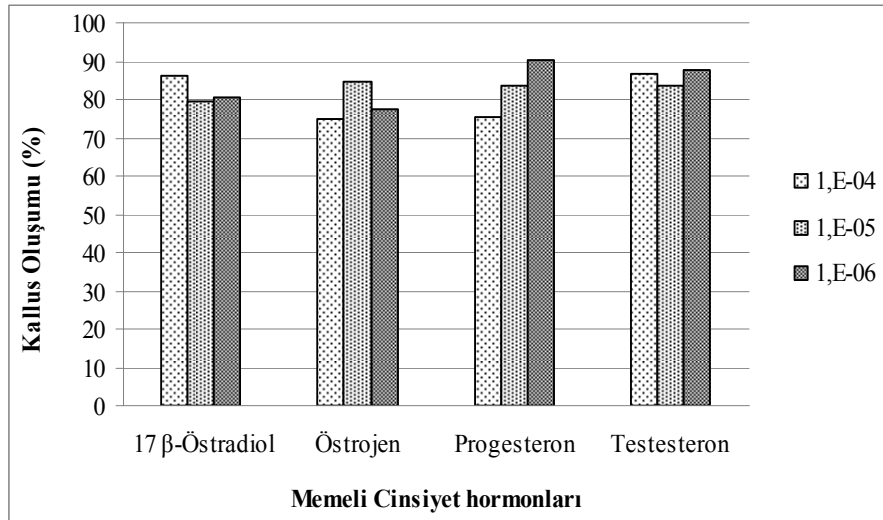
**Şekil 4.5.** Çeşitlerin farklı memeli cinsiyet hormon tiplerindeki kallus oluşumları (%)

Çeşitlerin kallus oluşumları memeli cinsiyet hormonlarının ortalama konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiş ve çeşitxkonsantrasyon interaksiyonunun çok önemli ( $p<0,01$ ) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.1). Çeşitlerin kallus oluşumları konsantrasyonlarına göre karşılaştırıldığında en yüksek kallus oluşumları tüm çeşitlerde  $10^{-6}$  mM'da ( Kırıkta %77,8, Nenehatunda %86,6 ve Palandöken 97'de %87,8) meydana gelmiştir. Buna karşın, en düşük kallus oluşumları Kırık ve Nenehatun çeşitlerinde  $10^{-4}$  mM'da sırasıyla %77,5 ve %78,8 olarak belirlenmiştir. Bu oran, Palandöken 97 çeşidinde  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  mM'da %86,3 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.6).



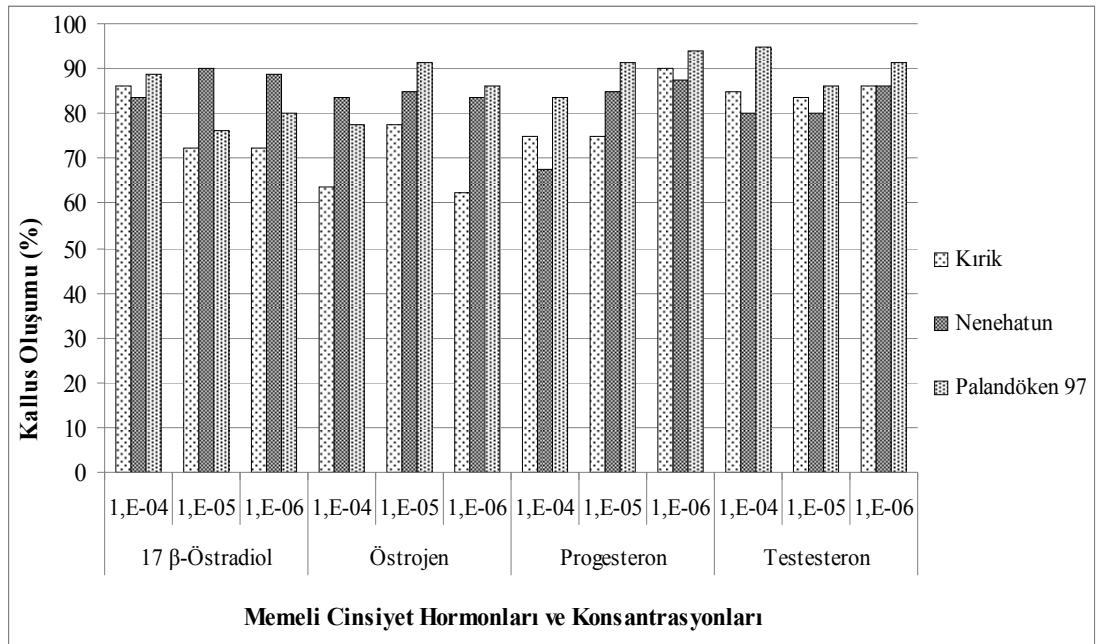
**Şekil 4.6.** Çeşitlerin farklı konsantrasyonlardaki kallus oluşumları (%)

Memeli cinsiyet hormonlarının kallus oluşumu üzerine olan etkisi konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiş ve hormonxkonsantrasyon interaksyonu çok önemli ( $p<0,01$ ) çıkmıştır (Çizelge 4.1). Her hormon tipine ait konsantrasyonlar kendi içerisinde karşılaştırıldığında en yüksek kallus oluşum oranları 17  $\beta$ -östradiolde  $10^{-4}$  mM'da %86,3, östrojende  $10^{-5}$  mM'da %84,6, progesteron ve testesteronda  $10^{-6}$  mM'da sırasıyla %90,4 ve %87,9 olarak belirlenmiştir. En düşük kallus oluşum oranları ise östrojen ve progesteronda  $10^{-4}$  mM'da sırasıyla %75,0 ve %75,4 olarak tespit edilmişken, 17  $\beta$ -östradiol ve testesteronda  $10^{-5}$  mM'da sırasıyla %79,6 ve %83,3 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** Memeli cinsiyet hormonlarının farklı konsantrasyonlarının kallus oluşumuna etkisi (%)

Çeşitlerin kallus oluşum oranları hormon ve onların konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiş ve çeşitxhormon tipixkonsantrasyon interaksyonu çok önemli olmuştur. Çeşitlerin en yüksek kallus oluşum oranları Kırık çeşidinde %90,0 ile progesteron hormonunun  $10^{-6}$  mM konsantrasyonunda, Nenehatun çeşidinde %90,0 ile 17  $\beta$ -östradiolin  $10^{-5}$  mM konsantrasyonunda meydana gelirken, Palandöken 97 çeşidinde ise testesteron hormonunun  $10^{-4}$ mM konsantrasyonunda %95,0 olarak belirlenmiştir. En düşük kallus oluşum oranları ise Kırık çeşidinde (%62,5) östrojenin  $10^{-6}$  mM konsantrasyonunda, Nihatunda (%67,5) progesteronun  $10^{-4}$  mM konsantrasyonunda, Palandöken 97 çeşidinde (%76,3) ise 17  $\beta$ -östradiolün  $10^{-5}$  mM konsantrasyonunda meydana gelmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon ve konsantrasyonlarındaki kallus oluşumu (%)

## **4.2. Embriyogenik Kallus Oluşumu**

Sert dokulu, dağılabilir özellikte, sıkı yapılı ve krem renkli kalluslar embriyogenik, beyaz ve sulu yapılı kalluslar ise embriyogenik olmayan kallus olarak değerlendirilmiştir (Aydın 2010).

Embriyogenik kallus oluşum oranı kültüre alınan eksplant sayısına göre ve meydana gelen kallus sayısına göre iki şekilde değerlendirilmiştir.

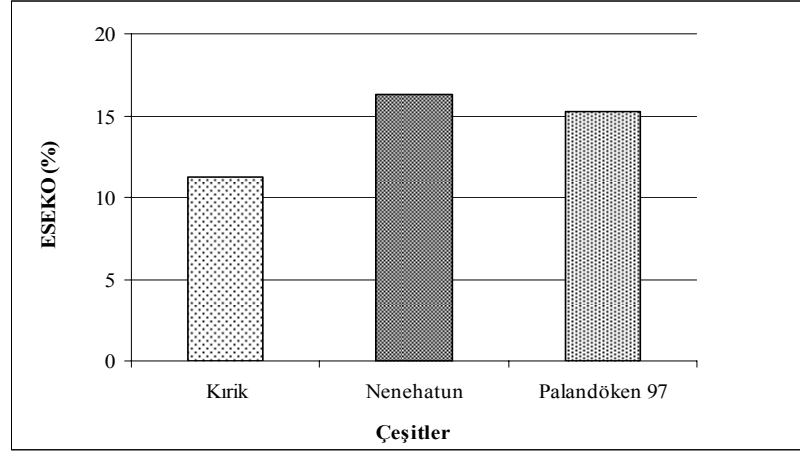
### **4.2.1. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (ESEKO)**

ESEKO oranına ilişkin varyans analizi sonuçları ve faktörlere ait ortalama değerler Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelge 4.2 incelendiğinde ESEKO’ya çeşidin etkisinin çok önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0,01$ ). ESEKO bakımından çeşitler karşılaştırıldığında en yüksek ESEKO Nenehatun çeşidinde %16,3 ile meydana gelirken, en düşük %11,3 ile Kırık çeşidinde meydana gelmiştir. Bu oran Palandöken 97 çeşidinde %15,2 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.9).

**Çizelge 4.2.** Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon ve konsantrasyonlarında ESEKO (%)

Hormon	Konsantrasyon (mM)	Kırık	Nenehatun	Palandöken 97	ORTALAMA
<b>17 β-östradiol</b>	10 <sup>-4</sup>	0.0	25.0	30.0	18.3
	10 <sup>-5</sup>	17.5	16.3	27.5	20.4
	10 <sup>-6</sup>	11.3	26.3	21.3	19.6
	<i>Ortalama</i>	<b>9.6</b>	<b>22.5</b>	<b>26.3</b>	<b>19.4</b>
<b>Östrojen</b>	10 <sup>-4</sup>	13.8	7.5	0.0	7.1
	10 <sup>-5</sup>	6.3	15.0	2.5	7.9
	10 <sup>-6</sup>	2.5	16.3	25.0	14.6
	<i>Ortalama</i>	<b>7.5</b>	<b>12.9</b>	<b>9.2</b>	<b>9.9</b>
<b>Progesteron</b>	10 <sup>-4</sup>	27.5	22.5	13.8	21.3
	10 <sup>-5</sup>	15.0	15.0	16.3	15.4
	10 <sup>-6</sup>	15.0	18.8	13.8	15.8
	<i>Ortalama</i>	<b>19.2</b>	<b>18.8</b>	<b>14.6</b>	<b>17.5</b>
<b>Testesteron</b>	10 <sup>-4</sup>	15.0	2.5	3.8	7.1
	10 <sup>-5</sup>	8.8	10.0	15.0	11.3
	10 <sup>-6</sup>	2.5	20.0	13.8	12.1
	<i>Ortalama</i>	<b>8.8</b>	<b>10.8</b>	<b>10.8</b>	<b>10.1</b>
<b>Hormonların ortalaması</b>	10 <sup>-4</sup>	14.1	14.4	11.9	13.4
	10 <sup>-5</sup>	11.9	14.1	15.3	13.8
	10 <sup>-6</sup>	7.8	20.3	18.4	15.5
	<i>Kons.Ort.</i>	<b>11.3</b>	<b>16.3</b>	<b>15.2</b>	<b>14.2</b>
F değeri (Çeşit)		52.47**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Çeşit)		1.0
F değeri (Hormon)		138.95**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Hormon)		1.2
F değeri (Konsantrasyon)		9.52**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Konsantrasyon)		1.0
F değeri (ÇXH)		40.33**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXH)		2.0
F değeri (ÇXD)		37.01**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXD)		1.8
F değeri (HXD)		19.30**	LSD <sub>(0,05)</sub> (HXD)		2.0
F değeri (ÇXHxD)		38.83**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXHxD)		3.5
Varyasyon Katsayısı (%)		17.7			

\*\* ile işaretli F değerleri 0.01 ihtimal düzeyinde önemlidir.

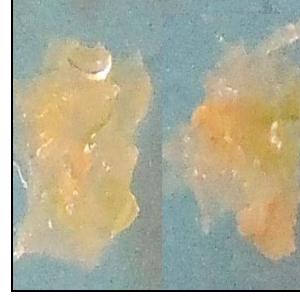


**Şekil 4.9.** Çeşitlerin ESEKO etkisi (%)

ESEKO oluşumu üzerine memeli cinsiyet hormonlarının etkisi çok önemli ( $p < 0,01$ ) olmuştur. En yüksek ESEKO %19,4 ile 17  $\beta$ -östradiolde meydana gelirken, en düşük %9,9 ile östrojende meydana gelmiştir. Bu oran progesteronda %17,5, testesteronda %10,1 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



a) Palandöken 97 Çeşidi

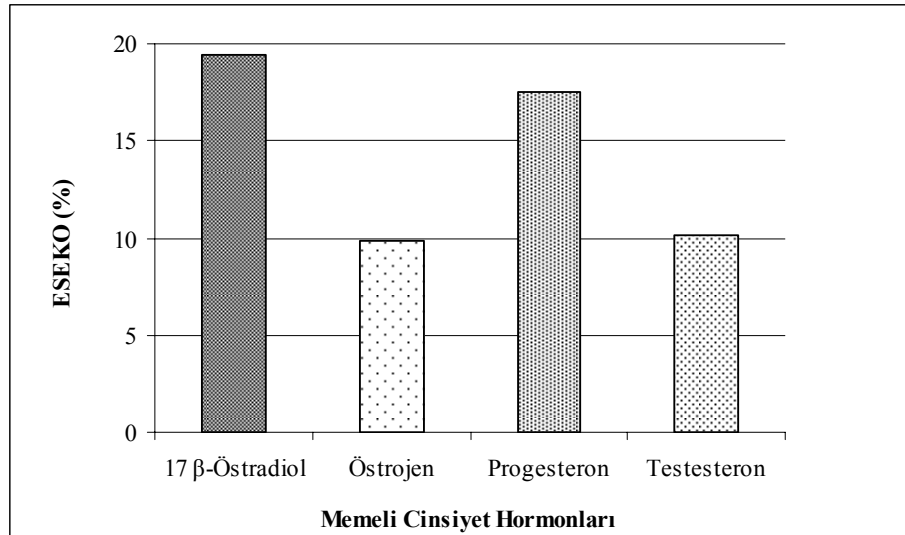


b) Nenehatun Çeşidi



c) Kırık Çeşidi

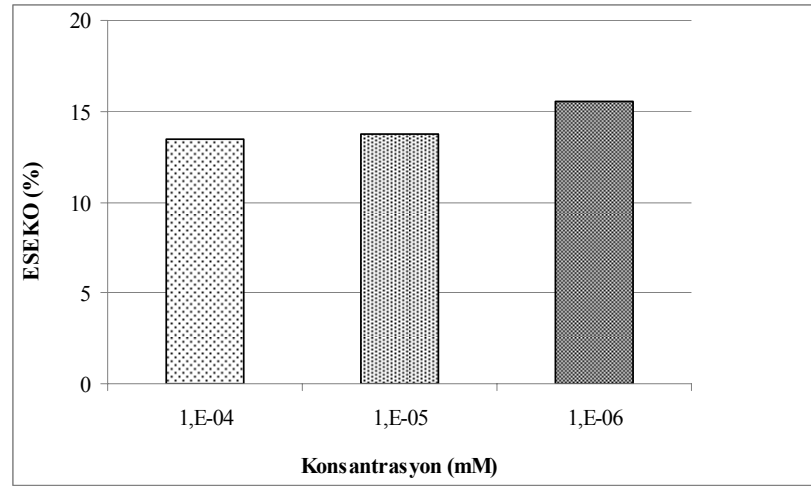
**Şekil 4.10.** Çeşitlere ait rejenerasyon ortamındaki somatik embriyo oluşumu



**Şekil 4.11.** Memeli cinsiyet hormonlarının ESEKO oluşumuna etkisi (%)

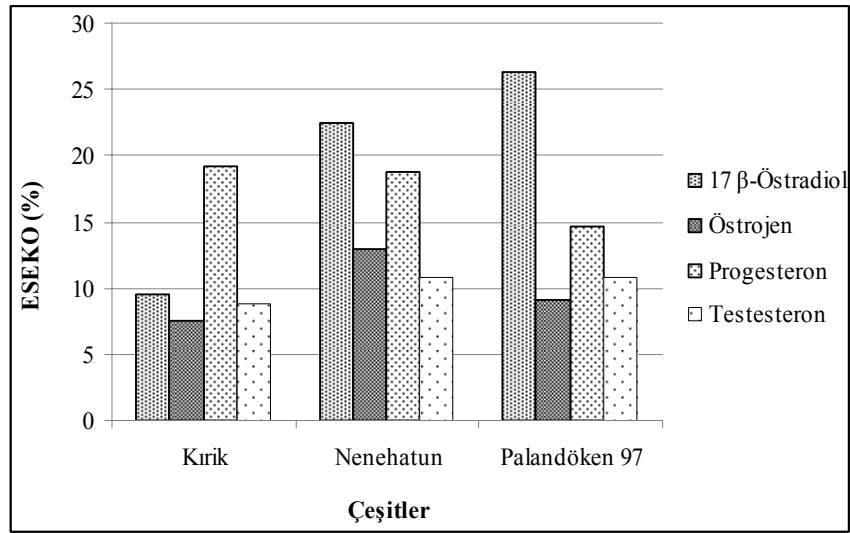


Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu üzerine konsantrasyonunana etkisinin çok önemli ( $p<0,01$ ) olmuştur (izelge 4.2). Kallus oluşumunda olduğu gibi konsantrasyon azalışına bağlı olarak ESEKO artış göstermiştir. En yüksek ESEKO en düşük konsantrasyon olan  $10^{-6}$  mM’da %15,5 olarak gerçekleşmiş, bunu %13,8 ile  $10^{-5}$  mM ve %13,4 ile  $10^{-4}$  mM konsantrasyonları izlemiştir (izelge 4.2 ve şekil 4.12).



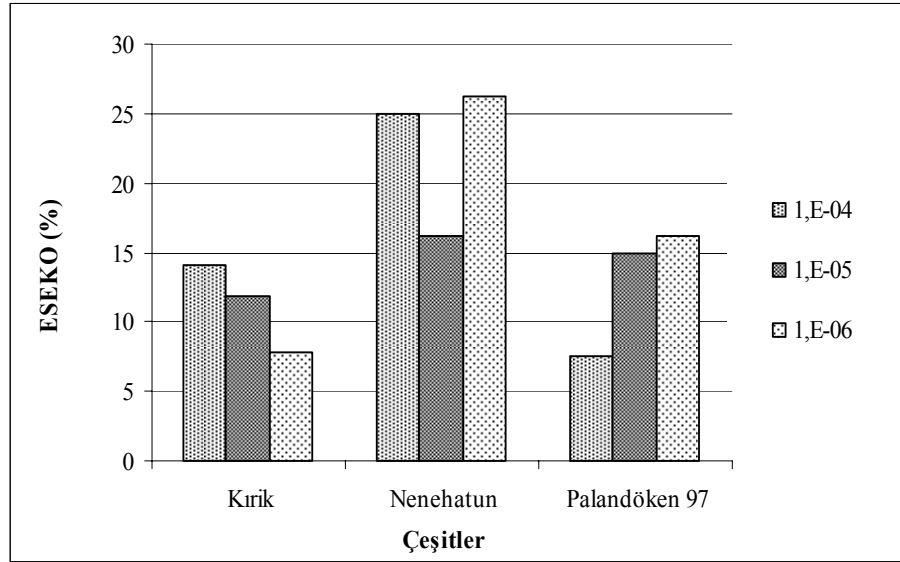
**şekil 4.12.** Memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarının ESEKO oluşumuna etkisi (%)

Çeşitlerin kallus oluşumları memeli cinsiyet hormon tipine göre değişmiş ve çeşitxhormon interaksiyonu çok önemli olarak ( $p<0,01$ ) bulunmuştur. En yüksek ESEKO oluşumu Palandöken 97 (%26,3) ve Nenehatun (%22,5) çeşitlerinde 17  $\beta$ -östradiolde meydana gelirken, Kırık çeşidinde progesteron (%19,2) hormon tipinde oluşmuştur. En düşük ESEKO oluşumları ise Kırık (%7,5) ve Palandöken 97 (%9,2) çeşitlerinde östrojen, Nenehatun çeşidinde %10,8 ile testesteronda belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.13).



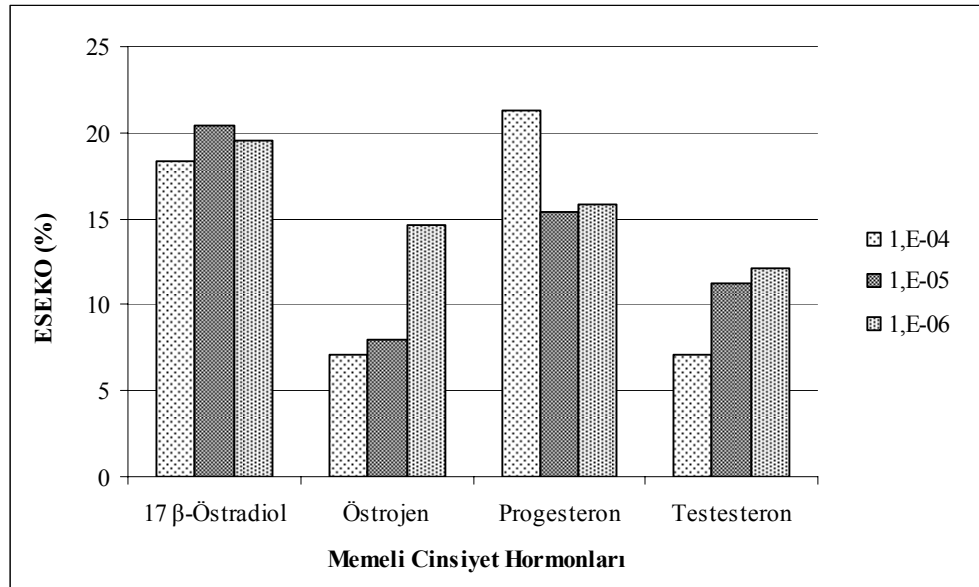
**Şekil 4.13.** Çeşitlerin farklı memeli cinsiyet hormon tiplerindeki ESEKO oluşumları (%)

Çeşitlerin ESEKO memeli cinsiyet hormonlarının konsantrasyonuna göre farklılık göstermiş ve buna bağlı olarak çeşitxkonsantrasyon interaksiyonun çok önemli ( $p<0,01$ ) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.2). Çeşitlerin ESEKO oranları konsantrasyonlara göre karşılaştırıldığında, en yüksek ESEKO Kırık çeşidinde %14,1 ile  $10^{-4}$  mM konsantrasyonda meydana gelirken, Nenehatun ve Palandöken 97 çeşitlerinde  $10^{-5}$  mM konsantrasyonda sırasıyla %20,3 ve %18,4 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.14).



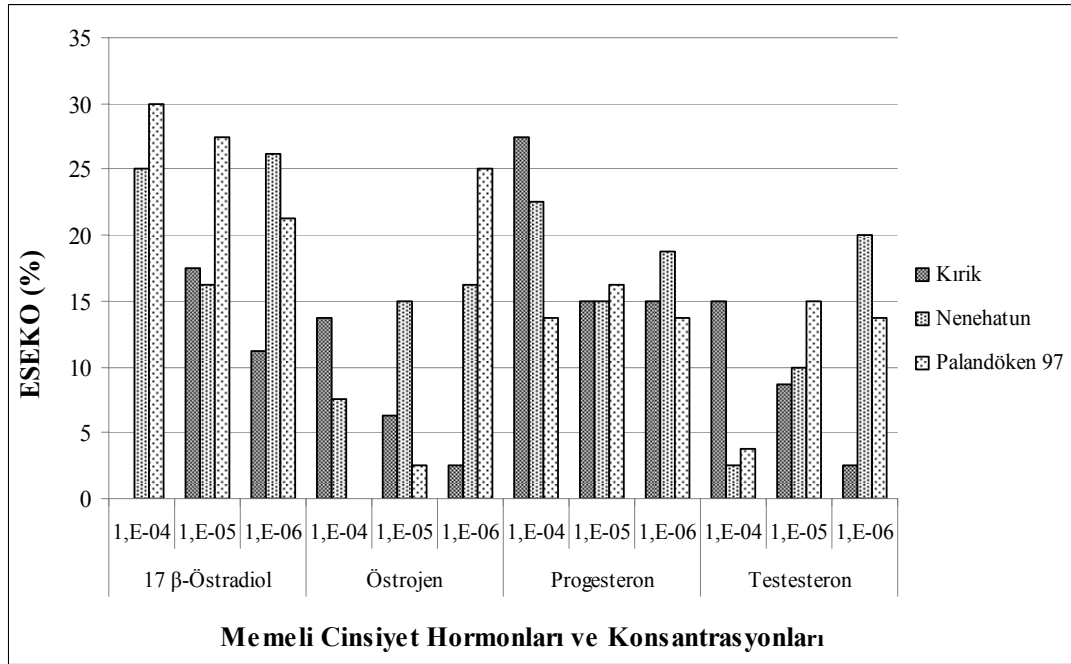
**Şekil 4.14.** Çeşitlerin farklı konsantrasyonlardaki ESEKO oluşumları (%)

ESEKO üzerine memeli cinsiyet hormonlarının etkisi konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiş ve bu nedenle hormonxkonsntrasyon interaksiyonunun etkisi çok önemli olmuştur ( $p<0,01$ ) (Çizelge 4.2). Hormon tiplerine ait konsantrasyonlar kendi içerisinde karşılaştırıldığında en yüksek ESEKO oluşum oranları sırasıyla progesteronda %21,3 ile  $10^{-4}$  mM'da, 17  $\beta$ -östradiolde  $10^{-5}$  mM'da %20,4, östrojende  $10^{-6}$  mM'da %14,6 ve testesteronda  $10^{-6}$  mM'da %12,1 olarak belirlenmiştir. En düşük ESEKO, 17  $\beta$ -östradiolde  $10^{-4}$  mM'da %18,3, progesteronda  $10^{-5}$  mM'da %15,4, testesteron ve östrojende ise  $10^{-4}$  mM'da %7,1 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** Memeli cinsiyet hormonlarının farklı konsantrasyonlardaki ESEKO oluşumları (%)

Çeşitlerin ESEKO, hormon ve hormon konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiş ve çeşitxhormonxkonsantrasyon interaksyonu buna bağlı olarak çok önemli çıkmıştır ( $p<0,01$ ). Çeşitlere göre en yüksek ESEKO, Kırık'te progesteron hormonunun  $10^{-4}$  mM konsantrasyonunda %27,5 olarak, Nenehatun ve Palandöken 97 çeşitlerinde 17  $\beta$ -östradiolün sırasıyla  $10^{-6}$  mM ve  $10^{-4}$  mM konsantrasyonlarında %26,3 ve %30,0 olarak belirlenmiştir. En düşük ESEKO ise Kırık'te 17  $\beta$ -östradiol hormonunun  $10^{-4}$  mM konsantrasyonunda %0,0, Nenehatunda testesteronun  $10^{-4}$  mM konsantrasyonunda %2,5 ve Palandöken 97 çeşidinde östrojen hormonunun  $10^{-4}$  mM konsantrasyonunda %0,0 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarındaki ESEKO

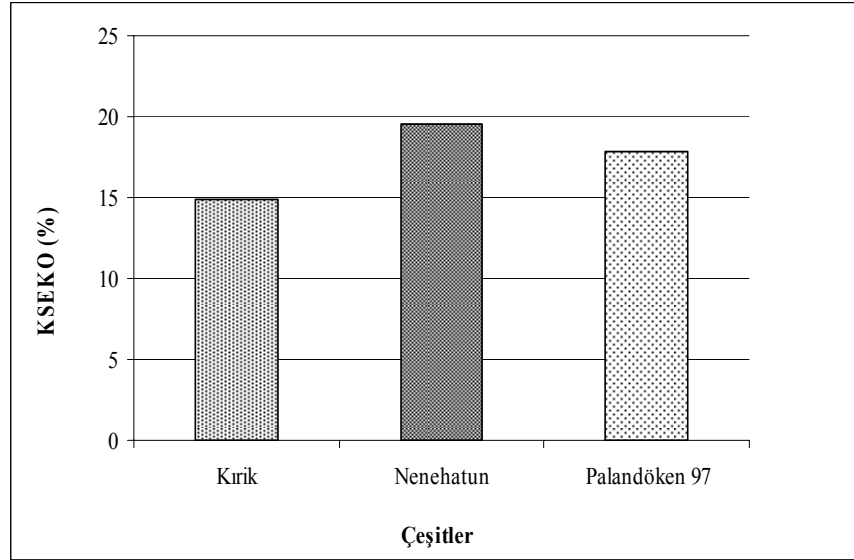
#### 4.2.2. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (KSEKO)

Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranına ilişkin varyans analizi sonuçları ve faktörlere ait ortalama değerler incelendiğinde, çeşidin etkisinin çok önemli olduğu ( $p < 0,01$ ) gözlenmiştir (Çizelge 4.3). En yüksek KSEKO, %19,6 ile Palandöken 97 çeşidinde belirlenirken, bunu sırasıyla %17,8 ile Kırık ve %14,8 ile Nenehatun çeşitleri izlemiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.17).

**Çizelge 4.3.** Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon ve konsantrasyonlarındaki KSEKO (%)

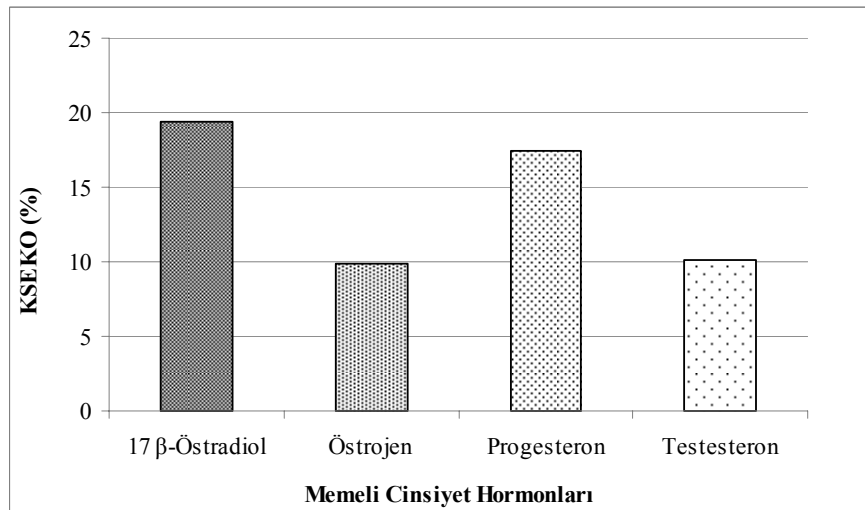
Hormon	Konsantrasyon (mM)	Kırık	Nenehatun	Palandöken 97	ORTALAMA
17 $\beta$ -östradiol	$10^{-4}$	0.0	29.9	33.8	21.2
	$10^{-5}$	24.2	18.1	36.1	26.1
	$10^{-6}$	15.6	29.6	26.6	23.9
	<i>Ortalama</i>	<b>13.3</b>	<b>25.8</b>	<b>32.2</b>	<b>23.8</b>
Östrojen	$10^{-4}$	21.6	8.9	0.0	10.2
	$10^{-5}$	8.1	17.6	2.7	9.5
	$10^{-6}$	4.2	19.4	29.0	17.5
	<i>Ortalama</i>	<b>11.3</b>	<b>15.3</b>	<b>10.6</b>	<b>12.4</b>
Progesteron	$10^{-4}$	36.7	33.5	16.4	28.8
	$10^{-5}$	20.0	17.6	17.8	18.5
	$10^{-6}$	16.7	21.5	14.7	17.6
	<i>Ortalama</i>	<b>24.4</b>	<b>24.2</b>	<b>16.3</b>	<b>21.7</b>
Testesteron	$10^{-4}$	17.7	3.1	3.9	8.3
	$10^{-5}$	10.5	12.5	17.4	13.5
	$10^{-6}$	2.9	23.2	15.1	13.7
	<i>Ortalama</i>	<b>10.3</b>	<b>12.9</b>	<b>12.2</b>	<b>11.8</b>
Hormonların ortalaması	$10^{-4}$	19.0	18.9	13.5	17.1
	$10^{-5}$	15.7	16.5	18.5	16.9
	$10^{-6}$	9.8	23.4	21.3	18.2
	<i>Kons.Ort.</i>	<b>14.8</b>	<b>19.6</b>	<b>17.8</b>	<b>17.4</b>
F değeri (Çeşit)		26.35**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Çeşit)		1.3
F değeri (Hormon)		131.67**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Hormon)		1.5
F değeri (Konsantrasyon)		2.21 <sup>öd</sup>	LSD <sub>(0,05)</sub> (Konsantrasyon)		1.3
F değeri (ÇXH)		38.14**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXH)		2.6
F değeri (ÇXD)		36.95**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXD)		2.3
F değeri (HXD)		27.72**	LSD <sub>(0,05)</sub> (HXD)		2.6
F değeri (ÇXHxD)		36.35**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXHxD)		4.5
Varyasyon Katsayısı (%)		18.6			

\*\* ile işaretli F değerleri 0.01 ihtimal düzeyinde önemlidir.<sup>öd</sup> ile işaretli F değerleri 0.05 ihtimal düzeyinde önemsizdir.



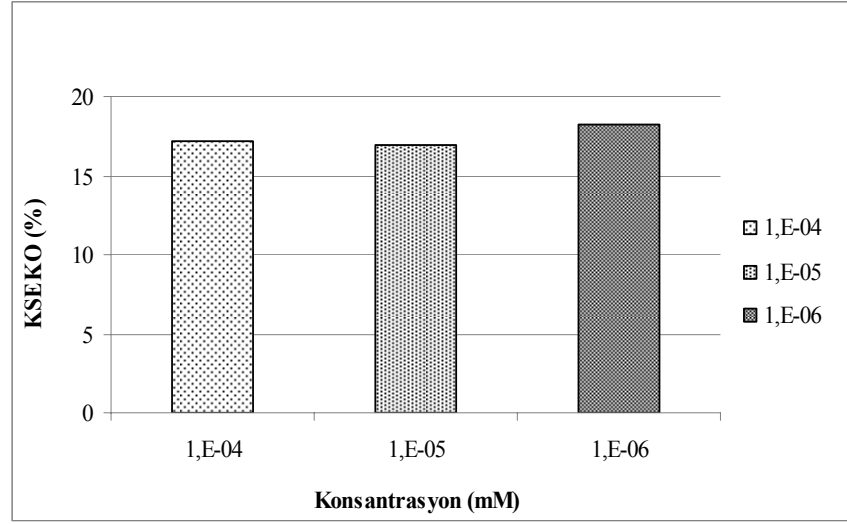
**Şekil 4.17.** Çeşitlerin KSEKO etkisi (%)

Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı üzerine memeli cinsiyet hormonlarının etkisi çok önemli olarak ( $p < 0,01$ ) bulunmuştur. Elde edilen verilere göre en yüksek KSEKO, %23,8 ile 17  $\beta$ -östradiolde görülürken, en düşük %11,8 ile testesteronda görülmüştür. Bu oran, progesteronda %21,7 ve östrojende %12,4 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** Memeli cinsiyet hormonlarının KSEKO etkisi (%)

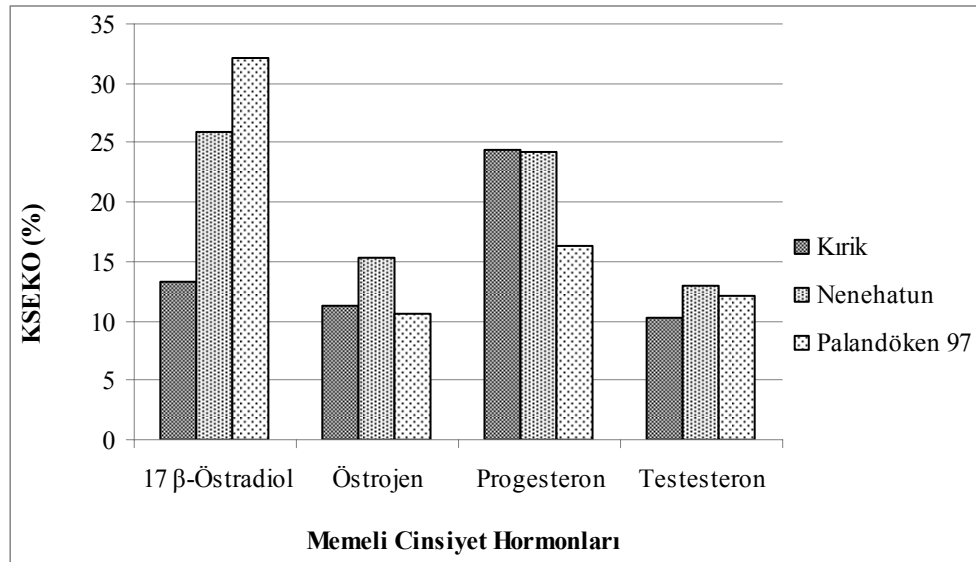
Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu üzerine hormonların uygulanan konsantrasyonlarının etkisi karşılaştırıldığında, konsantrasyonun etkisinin KSEKO üzerine etkisi önemsiz olarak ( $p \geq 0,05$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** Memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarının KSEKO oluşumuna etkisi (%)

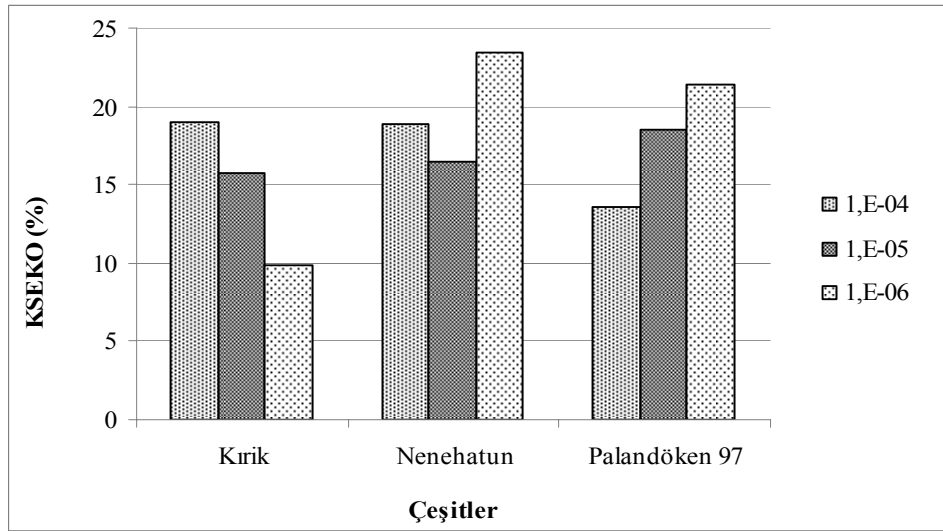


Çeşitli hormon interaksiyonu incelendiğinde çeşitlerin KSEKO, memeli cinsiyet hormonlarının tipine göre farklılık göstermiş ve çok önemli olarak ( $p<0,01$ ) belirlenmiştir (Çizelge 4.3). En yüksek KSEKO oluşumu Palandöken 97 ve Nenehatun çeşitlerinde 17  $\beta$ -östradiol hormon tipinde sırasıyla %32,2 ile %25,8 olarak belirlenirken, Kırıkta ise %24,4 ile progesteronda belirlenmiştir. En düşük KSEKO ise Kırık (%10,3) ve Nenehatun (%12,9) çeşitlerinde testesteron hormonunda oluşurken, Palandöken 97 çeşidinde (%10,6) ise östrojen hormonunda meydana gelmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.20).



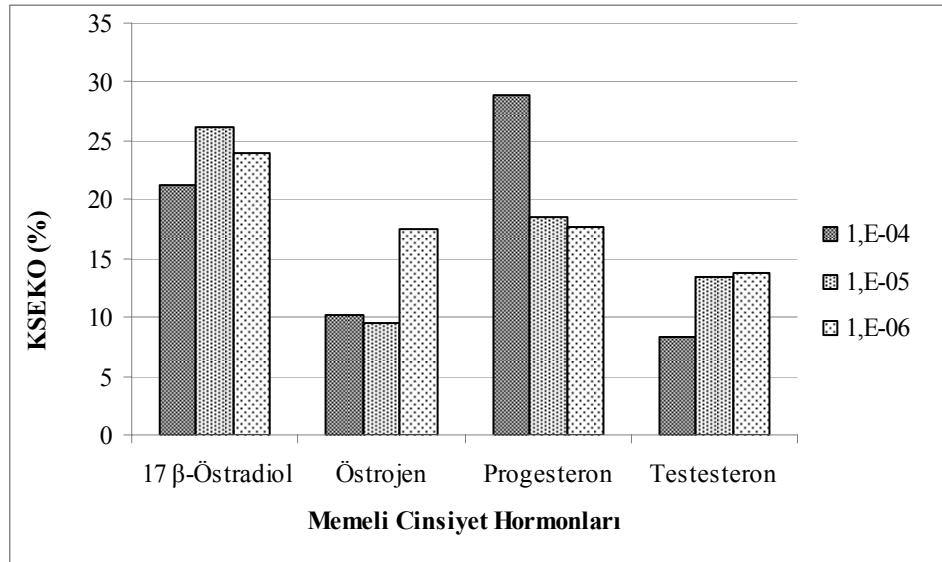
**Şekil 4.20.** Çeşitlerin farklı memeli cinsiyet hormon tiplerindeki KSEKO oluşumları (%)

Memeli cinsiyet hormon tiplerinin ortalama konsantrasyonlarına göre çeşitlerin KSEKO oluşumları farklılık göstermiş ve çeşitxkonsantrasyon interaksyonu çok önemli ( $p<0,01$ ) çıkmıştır (Çizelge 4.3). En yüksek KSEKO oluşumu Kırıkta %19,0 ile  $10^{-4}$  mM'da meydana gelirken, Nenehatun ve Palandöken 97 çeşitlerinde ise  $10^{-6}$  mM'da sırasıyla %23,4 ve %21,3 olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan en düşük KSEKO oluşumu Kırık çeşidinde %9,8 ile  $10^{-6}$  mM'da, Nenehatun çeşidinde %16,5 ile  $10^{-5}$  mM'da ve Palandöken 97 çeşidinde ise %13,5 ile  $10^{-4}$  mM'da tespit edilmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.21).



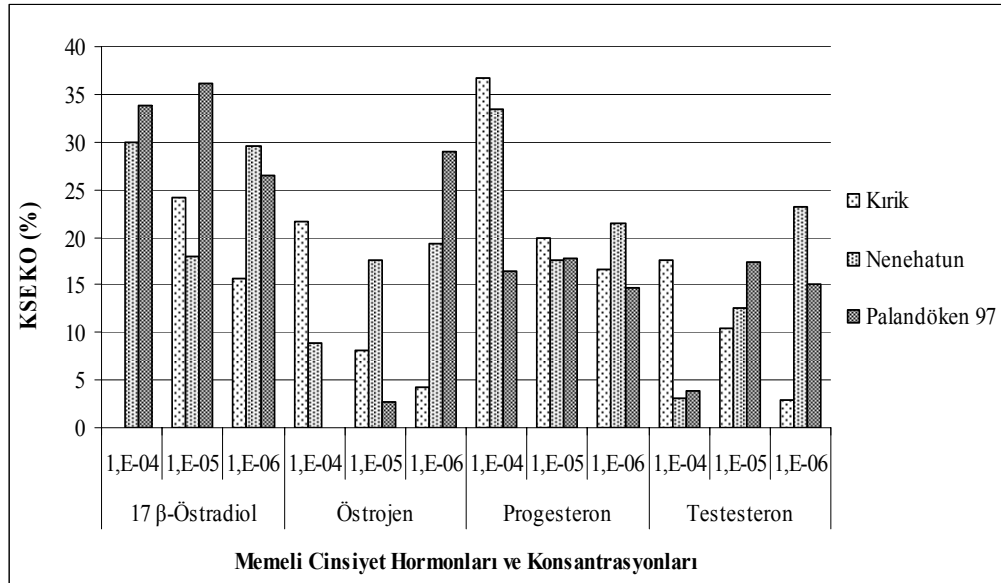
**Şekil 4.21.** Çeşitlerin farklı konsantrasyonlarındaki KSEKO (%)

Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşumuna memeli cinsiyet hormonlarının etkisi konsantrasyonlara göre farklılık göstermiş ve hormonxkonsantrasyon interaksiyonunun çok önemli çıkmasına neden ( $p<0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.3). KSEKO oluşumları konsantrasyonlara göre karşılaştırıldığında en yüksek KSEKO oluşumu 17  $\beta$ -östradiolde %26,1 ile  $10^{-5}$  mM'da, progesteron hormonunda %23,8 ile  $10^{-4}$  mM'da belirlenirken, östrojen ve testesteronda  $10^{-6}$  mM'da, sırasıyla %17,5 ve %13,7 olarak gerçekleşmiştir. En düşük KSEKO oluşumları ise 17  $\beta$ -östradiol (%21,2) ve testesteronda (%8,3)  $10^{-4}$  mM'da, östrojende (%9,5)  $10^{-5}$  mM'da ve progesteronda (%17,6)  $10^{-6}$  mM'da belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.22).



**Şekil 4.22.** Memeli cinsiyet hormonlarının farklı konsantrasyonlardaki KSEKO oluşumları (%)

Çeşitlerin KSEKO oluşumları hormonlara ve onların konsantrasyonlarına göre farklılık göstermesi, çeşitxhormonxkonsantrasyon interaksiyonunun çok önemli ( $p<0,01$ ) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.3). Çeşitlere göre en yüksek KSEKO oluşum oranı Kırık (%36,7) ve Nenehatun (%33,5) çeşitlerinde progesteron hormonunun  $10^{-4}$  mM konsantrasyonunda belirlenirken, Palandöken 97 çeşidinde ise (%36,1) östrojenin  $10^{-5}$  mM konsantrasyonunda meydana gelmiştir. En düşük KSEKO oluşum oranları Kırık ve Palandöken 97 çeşitlerinde (%0,0) 17  $\beta$ -östradiol ve östrojenin  $10^{-4}$  mM konsantrasyonunda tespit edilmiş, Nenehatunda %3,1 ile testesteron hormonunun  $10^{-4}$  mM konsantrasyonunda meydana gelmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.23).



**Şekil 4.23.** Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarındaki KSEKO oluşumu

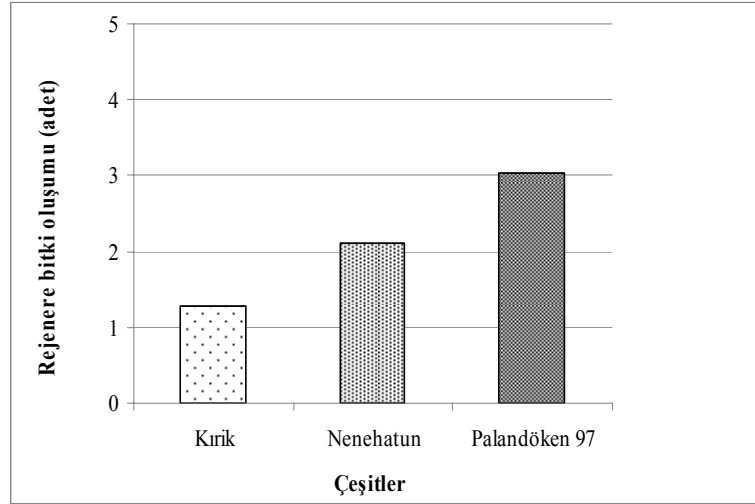
### 4.3. Rejenere Bitki Sayısı (Adet)

Rejenere bitki sayısı bakımından çeşitler arasındaki farkların çok önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0,01$ ) (Çizelge 4.4). Bitki oluşum oranı bakımından ilk sırayı ortalama 3,0 adet ile Palandöken 97 çeşidi almış, bunu sırasıyla 2,1 adet ile Nenehatun ve 1,3 adet ile Kırık izlemiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.24).

**Çizelge 4.4.** Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon ve konsantrasyonlarındaki rejenere bitki sayısı (adet)

Hormon	Konsantrasyon (mM)	Kırık	Nenehatun	Palandöken 97	ORTALAMA
17 $\beta$ -östradiol	$10^{-4}$	0.0	2.0	1.8	1.3
	$10^{-5}$	1.0	2.3	2.5	1.9
	$10^{-6}$	0.0	1.3	4.8	2.0
	<i>Ortalama</i>	<i>0.3</i>	<i>1.8</i>	<i>3.0</i>	<i>1.7</i>
Östrojen	$10^{-4}$	1.5	2.8	0.0	1.4
	$10^{-5}$	1.0	2.5	1.5	1.7
	$10^{-6}$	0.8	2.8	3.8	2.4
	<i>Ortalama</i>	<i>1.1</i>	<i>2.7</i>	<i>1.8</i>	<i>1.8</i>
Progesteron	$10^{-4}$	1.5	1.5	3.3	2.1
	$10^{-5}$	2.8	2.8	3.3	2.9
	$10^{-6}$	1.5	2.0	4.8	2.8
	<i>Ortalama</i>	<i>1.9</i>	<i>2.1</i>	<i>3.8</i>	<i>2.6</i>
Testesteron	$10^{-4}$	2.3	1.0	3.3	2.2
	$10^{-5}$	2.0	3.0	4.0	3.0
	$10^{-6}$	1.0	1.5	3.8	2.1
	<i>Ortalama</i>	<i>1.8</i>	<i>1.8</i>	<i>3.7</i>	<i>2.4</i>
Hormonların ortalaması	$10^{-4}$	1.3	1.8	2.1	1.7
	$10^{-5}$	1.7	2.6	2.8	2.4
	$10^{-6}$	0.8	1.9	4.3	2.3
	<i>Kons. Ort.</i>	<i>1.3</i>	<i>2.1</i>	<i>3.0</i>	<i>2.1</i>
F değeri (Çeşit)		75.35**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Çeşit)		0.3
F değeri (Hormon)		13.00**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Hormon)		0.3
F değeri (Konsantrasyon)		12.18**	LSD <sub>(0,05)</sub> (Konsantrasyon)		0.3
F değeri (ÇXH)		11.85**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXH)		0.6
F değeri (ÇXD)		23.03**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXD)		0.5
F değeri (HXD)		3.07**	LSD <sub>(0,05)</sub> (HXD)		0.6
F değeri (ÇXHxD)		3.23**	LSD <sub>(0,05)</sub> (ÇXHxD)		1.0
Varyasyon Katsayısı (%)		33.1			

\*\* ile işaretli F değerleri 0.01 ihtimal düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.24.** Çeşitlerin rejenere bitki sayısına etkisi (%)

Elde edilen veriler incelendiğinde memeli cinsiyet hormonlarının rejenere bitki sayısı üzerine etkisi çok önemli olarak gözlemlenmiştir ( $p < 0,01$ ) (Çizelge 4.4). Hormon tiplerine göre incelendiğinde en yüksek rejenere bitki sayısı progesteron 2,6 adet hormonunda oluşurken, en düşük rejenere bitki sayısı 1,7 adetile  $17 \beta$ -östradiolde olmuştur. Östrojen ve testesteronda ise bu sayı 1,8 adet ile 2,4 adet olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26).

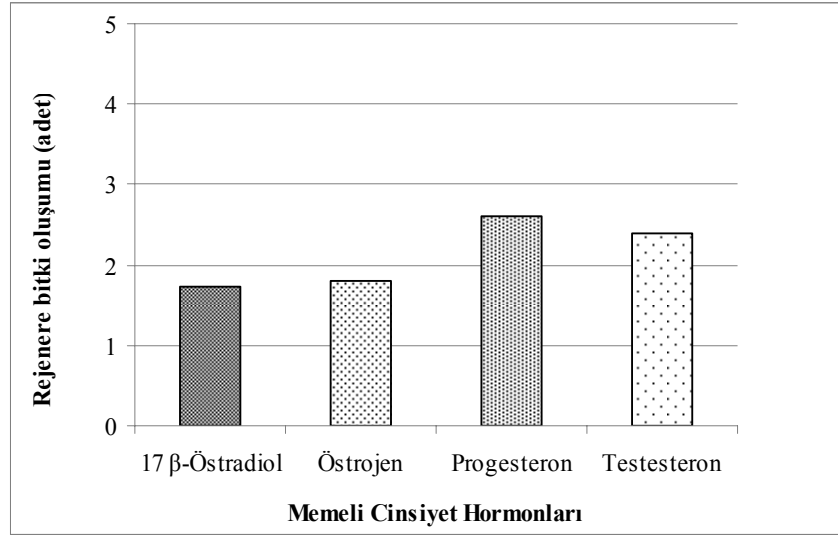


a) Palandöken 97 çeşidi

b) Nenehatun Çeşidi

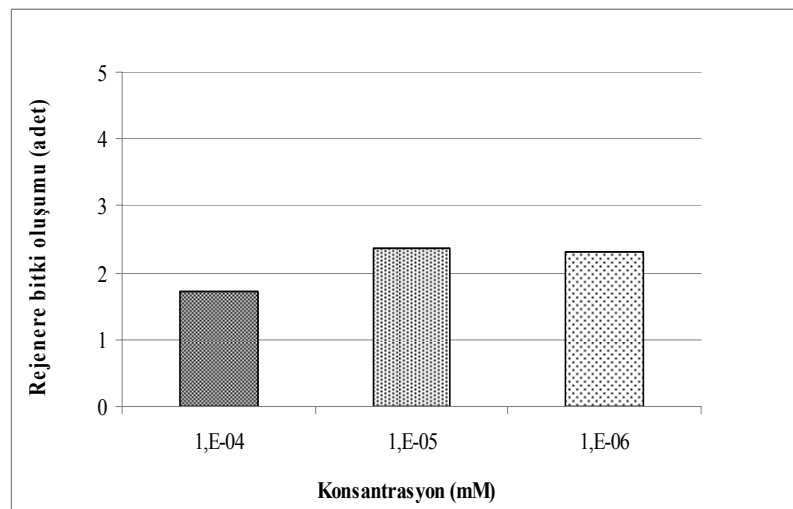
c) Kırık Çeşidi

**Şekil 4.25.**Çeşitlere ait kallustan meydana gelen rejenere bitki oluşumu



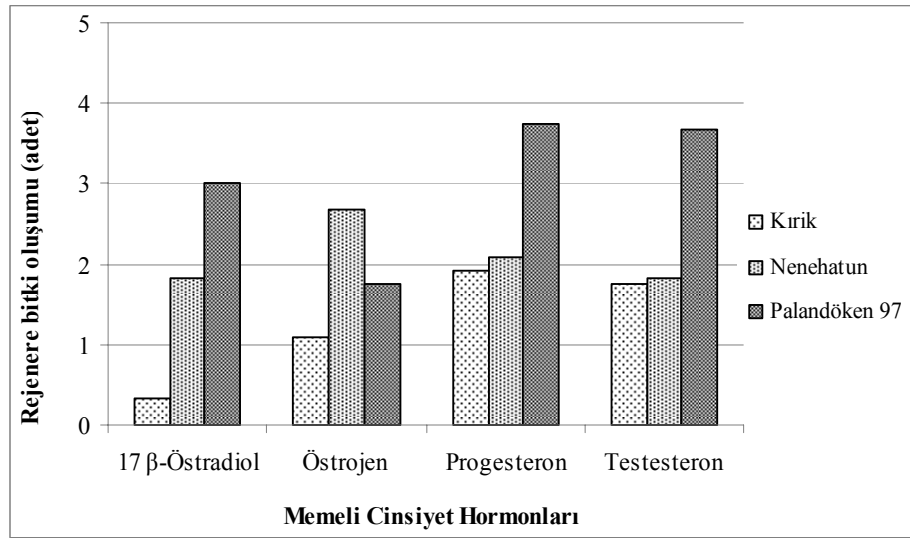
**Şekil 4.26.** Memeli cinsiyet hormonlarının rejenere bitki sayısına etkisi (adet)

Rejenere bitki sayısı üzerine memeli cinsiyet hormonlarının konsantrasyonları karşılaştırıldığında, konsantrasyonun etkisinin rejenere bitki oluşumu üzerine etkisi çok önemli ( $p < 0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.4). Rejenere bitki oluşumu konsantrasyonlara göre farklılık göstermiş ve en yüksek rejenere bitki oluşumu, 2,4 adet ile  $10^{-5}$  mM'da meydana gelmiş, bunu sırasıyla  $10^{-6}$  mM (2,3adet) ve  $10^{-4}$  mM (1,7adet) izlemiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.27).



**Şekil 4.27.** Memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarının rejenere bitki sayısına etkisi (adet)

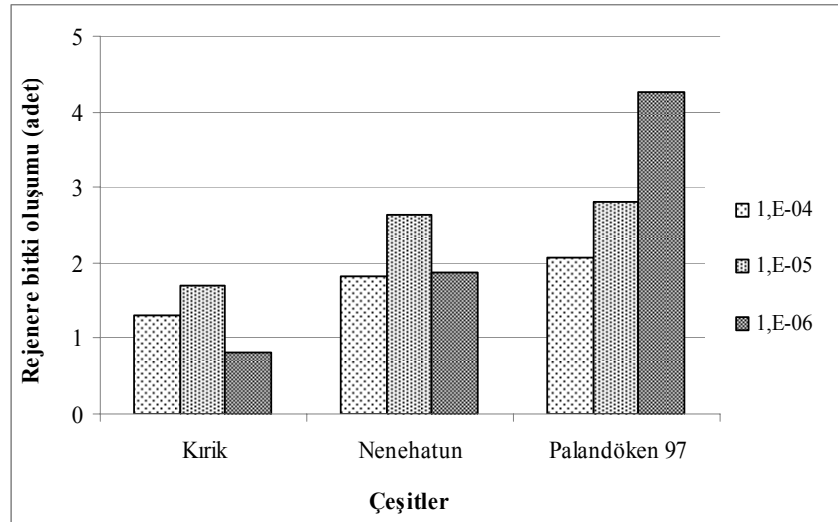
Çeşitlerin rejenere bitki sayısı memeli cinsiyet hormon tipine göre değişmiş ve çeşitxhormon interaksiyonu çok önemli ( $p<0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.4). Çeşitlerin en yüksek rejenere bitki sayısı Kırık ve Palandöken 97 çeşitlerinde progesteronda sırasıyla 1,9 ve 3,8 adet olarak belirlenirken, Nenehatun çeşidinde östrojende 2,7 adet olarak belirlenmiştir. En düşük bitki oluşumları ise Kırık çeşidinde 0,3 adet 17  $\beta$ -östradiol, Nenehatun çeşidinde 1,8 adet ile 17  $\beta$ -östradiol ve testesteronda, Palandöken 97 çeşidinde 1,8 adet ile östrojen hormonunda meydana gelmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.28).



**Şekil 4.28.** Çeşitlerin farklı memeli cinsiyet hormon tiplerindeki rejenere bitki oluşumları (adet)

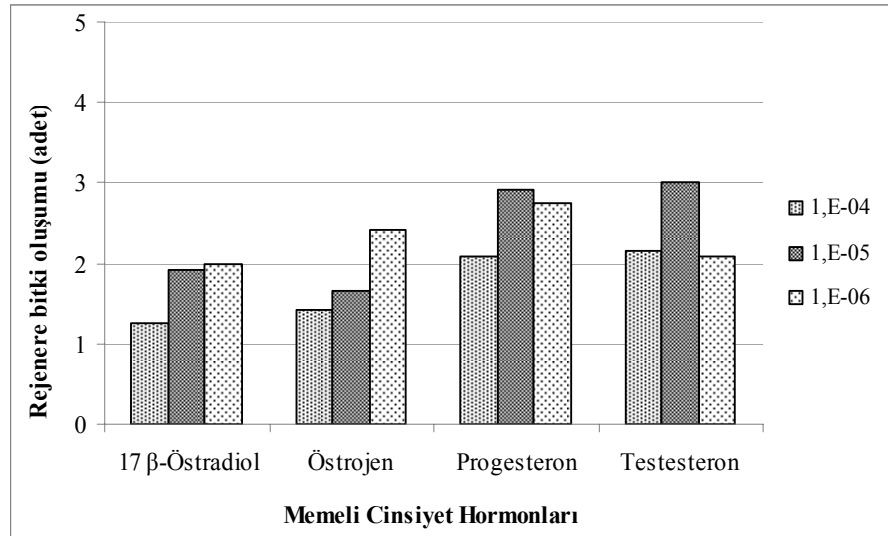


Çeşitlerin rejenere bitki oluşumları memeli cinsiyet hormonlarının konsantrasyonlarına göre farklılık göstermesi çeşitxkonsantrasyon interaksiyonunun çok önemli ( $p<0,01$ ) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.4). Çeşitlerin bitki oluşumları konsantrasyonlara göre karşılaştırıldığında en yüksek bitki sayısı Kırık ve Nenehatun çeşitlerinde  $10^{-5}$  mM'da sırasıyla 1,7 ve 2,6 adet olarak belirlenirken, Palandöken 97 çeşidinde  $10^{-6}$  mM 4,3 adet olarak gerçekleşmiştir. Buna karşın en düşük rejenere bitki oluşumları Kırık çeşidinde (0,8adet)  $10^{-6}$  mM'da meydana gelirken, Nenehatun ve Palandöken 97 çeşitlerinde  $10^{-4}$  mM'da sırasıyla 1,8 adet ve 2,1 adet olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.29).



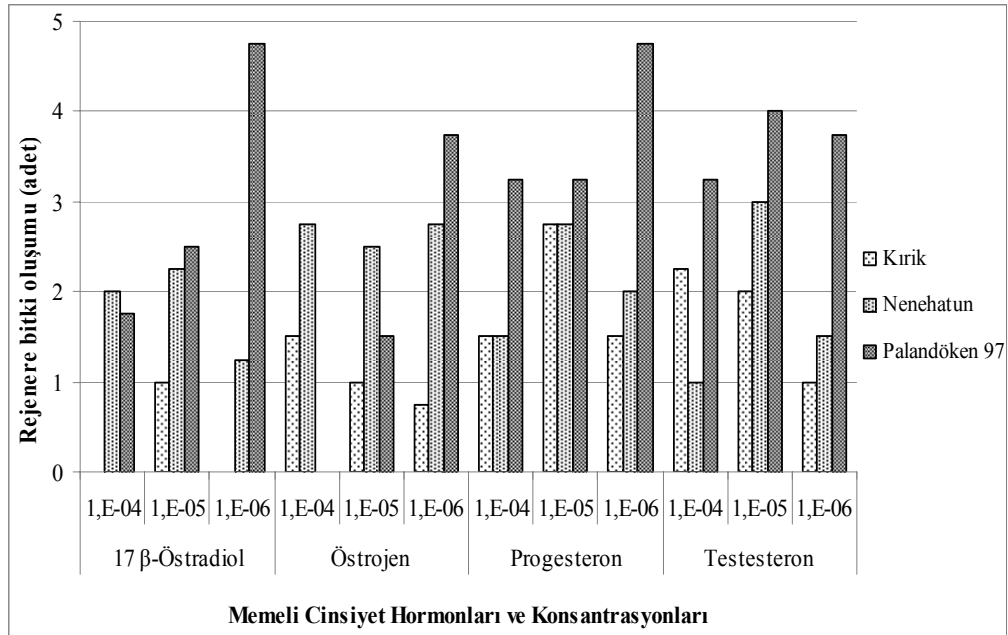
**Şekil 4.29.** Çeşitlerin farklı konsantrasyonlardaki rejenere bitki oluşumları (adet)

Memeli cinsiyet hormonlarının rejenere bitki oluşumu üzerine olan etkisi konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiş ve hormonxkonsantrasyon interaksyonu çok önemli ( $p<0,01$ ) çıkmıştır (Çizelge 4.4). Her hormon tipine ait konsantrasyonlar kendi içerisinde karşılaştırıldığında en yüksek rejenere bitki oluşum oranları 17  $\beta$ -östradiolde  $10^{-6}$  mM'da 2,0 adet, östrojende  $10^{-6}$  mM'da 2,4 adet, progesteron  $10^{-5}$  mM'da 2,9 adet ve testesteronda  $10^{-5}$  mM'da 3,0 adet olarak belirlenmiştir. En düşük rejenere bitki oluşum oranları ise 17  $\beta$ -östradiol, östrojen ve progesteronda  $10^{-4}$  M'da sırasıyla 1,3, 1,4 ve 2,1 adet olarak belirlenirken, testesteronda  $10^{-6}$  mM'da 2,1 adet olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.30).



**Şekil 4.30.** Memeli cinsiyet hormonlarının farklı konsantrasyonlardaki rejenere bitki oluşumları (adet)

Çeşitlerin rejenere bitki oluşum oranları hormon ve onların konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiş ve çeşitxhormon tipixkonsantrasyon interaksiyonu çok önemli olmuştur ( $p<0,01$ ) (Çizelge 4.4). Çeşitlerin en yüksek rejenere bitki oluşum oranları Kırık ve Nenehatun çeşitlerinde progesteronun sırasıyla 2,8 ve 3,0 adet olarak belirlenirken, Palandöken 97 çeşidinde ise  $17\beta$ -östradiolün ve progesteronun  $10^{-6}$  mM konsantrasyonunda 4,8 adet olarak belirlenmiştir. En düşük rejenere bitki oluşum oranları ise Kırık çeşidinde (0,0 adet)  $17\beta$ -östradiolün  $10^{-4}$  mM'da, Nenehatunda (1,0 adet) testesteronun  $10^{-4}$  mM konsantrasyonunda, Palandöken 97 çeşidinde (0,0 adet) ise östrojenin  $10^{-4}$  mM konsantrasyonunda meydana gelmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.31).



**Şekil 4.31.** Çeşitlerin memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarındaki rejenere bitki oluşumları (adet)

## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Başarılı bir *in vitro* gen aktarma sistemindeki kritik noktalardan biri kullanılan eksplantın gen aktarmaya uygun bir doku ve bu dokunun da tam bir rejenere bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olmasıdır. Bu anlamda, doku ve hücre kültürlerinde etkili bir rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir.

Buğdayda gen aktarmada, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda başarı sağlanabilmesi açısından en önemli etkenin genotip olduğu bilinmektedir (Şehirli ve Özgen 1998; Aydın vd. 2009). Yapılan bu çalışmada kallus, embriyogenik kallus ve bitki sayısı oluşumu üzerine genotipin etkisinin çok önemli olduğu belirlenmiştir. Nitekim, bu konuda yapılan birçok çalışmada benzer bulgular elde edilmiştir (Özgen *et al.* 1996; Rashid *et al.* 2002; Sarker and Biswas, 2002; Li *et al.* 2003; Zale *et al.* 2004; Chen *et al.* 2006; Patnaik *et al.* 2006; Ahmet and Adak, 2007; Bi *et al.* 2007; Aydın *et al.* 2011). Diğer taraftan yine yapılan araştırmalarda genotipin, buğdayda kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etki eden en önemli faktör olduğu bildirilmiştir (Bregitzer 1992; Li *et al.* 2003; Aydın *et al.* 2011). Ayrıca, Mathias and Simpson (1986) yaptığı bir çalışmada, doku kültürü çalışmalarında genotipin ortamdan daha önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda sitoplazmanın ve mitokondriyal genomun (Rode *et al.* 1998) rejenerasyonunda etkili olabileceği bildirilmiştir. Nitekim Özgen *et al.* (2001), doku kültürü üzerine sitoplazmik etkinin olup olmadığıyla ilgili yapmış olduğu çalışmada, sitoplazmanın kallus oluşumuna, rejenerasyon kapasitesine, kültür etkinliğine ve rejenere bitki sayısına olumlu yönde etki ettiğini ve bunun yanı sıra sitoplazmik etkinin de genotipe bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Araştırmada incelenen karakterler bakımından genotipler karşılaştırıldığında, en yüksek kallus oluşumu ve rejenere bitki sayısı Palandöken 97 çeşidinde meydana gelirken, en yüksek embriyogenik kallus oluşumu (ESEKO ve KSEKO) ise Nenehatun çeşidinde

belirlenmiştir. Genotiplerdeki farklılık oluşumlarına benzer şekilde Hacıbektaşoğlu (2011), farklı hıyar genotiplerinde östron ve testosteron hormonlarının etkisini incelemiş ve dişi çiçek/erkek çiçek ölçümleriyle ilgili Hasankale ve Gordion F1 genotiplerinde önemli farklılıklar olduğunu bildirmiştir. Yine yapılan diğer çalışmalara göre genotipin (Sears and Deckard 1982; Mathies and Simpson 1986; Fennel *et al.* 1996; Tuberosa *et al.* 1988; Chowdhury *et al.* 1991) ve eksplant kaynağının (Ozias-Akins and Vasil 1982; Maddock *et al.* 1983; Zhang and Seilleur 1987; Redway *et al.* 1990) buğday bitki rejenerasyonuna etki ettiği belirtilmiştir. İncelenen karakterler bakımından çeşitlerin farklı olmasının muhtemel nedeni bu karakterlere etki eden içsel (bitki bünyesi) hormon seviyelerinin farklı olmasındandır. Nitekim, Carman (1990) ve Bhaskaran and Smith (1990), kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu yönünden genotipler arasındaki farklılıkların içsel hormon seviyesindeki farklılıklardan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Buğday olgun embriyo kültüründe memeli cinsiyet hormonlarının etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, memeli cinsiyet hormonlarının kallus ve embriyogenik kallus oluşumu ile bitki rejenerasyonu oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde daha önce *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda, bitkisel ve hayvansal kaynaklardan üretilmiş olan çeşitli steroidlerin, farklı vasküler bitkiler ve alglerde, hücre büyümesi ve dokuyu etkilediği gözlemlenmiştir (Geuns 1978a; Buchala and Schmid 1979; Mandava *et al.* 1982). Nitekim, bitkilere bu hormonların veya uyarıcılarının uygulanmasıyla hücre bölünmesi, polen tüp gelişimi, kallus oluşumu, embriyo gelişimi, çiçeklenme, kök ve sürgün gelişiminin etkilendiği bildirilmiştir. Gözlemlenen bu etkilerin ise bu hormonların düzenleme kabiliyetlerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Janeczko and Skoczowski 2005). Yine, androsteron ve anrosteredionun scutellum içindeki kallus dokusunun üremesiyle birlikte, kışlık buğdayın olgunlaşmamış embriyolarının gelişimi ve çimlenmesini teşvik ettiği belirtilmiştir. Uygulanan östrojenin ise olgun olmayan embriyoların çimlenmesini engellediği, kallus dokusunun oluşumunu ise önleyici bir etki yapmadığı belirtilmiştir (Janeczko 2000; Janeczko *et al.* 2002). Diğer taraftan *in vitro* ortamda izole edilen bezelye embriyosuna uygulanan östrojenin ise embriyo gelişimini teşvik ettiği bulunmuştur (Bonner and Axtman 1937; Kögl and Haagen-Smit.

1936). Yine benzer şekilde Helmkamp and Bonner (1952), östrojen uygulamasının (1 mg/dm<sup>3</sup>) bezelyede embriyo gelişimini teşvik ettiğini bildirmiştir.

Araştırmada en yüksek kallus oluşumu testesteronda, embriyogenik kallus oluşumu ise 17 β-östradiolde gerçekleşmiştir. Bulgularımıza benzer şekilde testesteronun öncüsü olan androsterodionun, *Arabidopsis thaliana* L.'de kallus dokusunun üremesini teşvik ettiği bildirilmiştir (Janeczko 2000; Janeczko *et al.* 2003b). Ayrıca *Daucus carota* L. (Havuç) bitkisine 17 β-östradiolün 3-12 mg/dm<sup>3</sup> konsantrasyonunda uygulanmasıyla ortamdaki kallus oluşum oranının %100 olduğu bildirilmiştir (Geuns 1978a). Yine bu hormonların *Polygonatum Verticillatum*'da da kallus üremesini teşvik ettiği gözlemlenmiştir (Janeczko and Szybka 2001; Szybka-Hrynkiwicz and Janeczko. 2004). Bulgulara bakıldığında bu etkinin endojen hormon seviyesinden olduğunu söyleyebiliriz. Nitekim, bir araştırmaya göre *Solanum glaucophyllum* Desf. bitkisinin kalluslarında, çiçek, yaprak ve tohumlarında 17 β-östradiolün bulunduğu gözlemlenmiştir (Milanesi *et al.* 2001). Benzer şekilde yapılan bir araştırmada da bitkilerde testesteron ve 17 β-östradiol hormonlarının bulunduğu bildirilmiştir (Janeczko and Skoczowski 2005). Bu hormon veya uyarıcılarının uygulanmasıyla da hücre bölünmesi, polen tüp gelişimi, kallus oluşumu, embriyo gelişimi, kök-sürgün gelişimi ve çiçeklenmenin etkilendiği belirlenmiştir (Janeczko and Skoczowski 2005). Yine daha önce yapılan bir araştırmada, bitkilerde testesteronun verimlilik ve tozlaşma üzerine etkisinin olabileceğini belirtilmiştir (Zhang *et al.* 1991).

Araştırmamızda en yüksek rejenere bitki sayısının progesteron hormonunda meydana geldiği belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilere benzer olarak, Erdal (2010)'ın nohut bitkisinde yaptığı çalışmada, progesteron, β-östradiol ve androsteron (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-15</sup> M) uygulanan bitkilerde, maksimum gelişmenin progesteron hormonunda ve konsantrasyon olarak ise 10<sup>-6</sup> M'da meydana geldiği belirtilmiştir. Aynı şekilde yine arpa bitkisi üzerinde de bu hormon ve konsantrasyonlarının etkisini inceleyen araştırmacı, bitkilerde maksimum gelişmenin yine progesteron hormonunun 10<sup>-9</sup> M konsantrasyonunda olduğunu tespit etmiştir. Ayçiçeği bitkisinin kök ve sürgün gelişimi üzerine memeli cinsiyet hormonlarının etkisini araştıran Bhattacharya and Gupta

(1981), bitki başına uygulanan 0,25 µg konsantrasyonundaki 17 β-östradiol ve progesteronun sürgün gelişimini artırdığını, kök gelişimini ise engellediğini bildirmiştir.

Memeli cinsiyet hormon konsantrasyonlarının azalışına bağlı olarak araştırmada incelenen karakterlerin oluşum oranında genelde artış gözlenmiştir. Benzer şekilde *in vitro* koşullarda yapılan bir çalışmada (Janeczko 2000), östrojen ve progesteronun 1 µM uygulanmasıyla kışlık buğday fidelerinin kök ve yaprak gelişimini teşvik ettiğini, 10 µM'lık bir uygulamanın ise sürgün gelişimini çok az da olsa engellediğini bildirmiştir. Yine, *Medicago sativa* ile serada kontrollü şartlarda yapılan farklı bir çalışmada (Awad 1974) 17 β-östradiol, östrojen ve steroidal östrojenlerin uygulanması sonucunda; 0,5 ve 0,005 µg/dm<sup>-3</sup> oranındaki östrojenin kök ve gövde kuru ağırlığını artırdığı, 50-500 µg/dm<sup>-3</sup> konsantrasyonunda uygulanmasının ise bitki büyümesini engelleyici bir durum gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca Erdal ve Taşkın (2010) fasulye tohumlarının çimlenme hızı ve kök-gövde uzunluklarını inceledikleri bir çalışmada, benzer sonuç bulmuşlar ve daha önce yapılan diğer çalışmalara göre uygulanan hormon konsantrasyonlarından daha düşük konsantrasyonların, incelenen karakterler bakımından daha yüksek etki yaptığını belirtmişlerdir. Bu nedenle ileriki çalışmalarda memeli cinsiyet hormonlarının daha düşük konsantrasyonlarının uygulanması önerilebilir.

Yapılan araştırmada buğday olgun embriyo kültüründe rejenerasyon sisteminin başarılı bir şekilde elde edilmesi sağlanmaya çalışılmıştır. Bu araştırmamızda, buğday olgun embriyo kültüründe başarı elde edilmesinden dolayı, olgunlaşmamış embriyoların kullanılmasının tercih edilmediği durumlarda, olgun embriyoların kullanımının mümkün olabileceği sonucuna varılabilir. Yine çalışmaya göre kallus oluşumu, kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (KSEKO), eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumu (ESEKO) ve rejenere olan bitki bakımından sonuç önemli olarak bulunmuştur. Çeşitlere bakıldığında ise, Palandöken 97 çeşidinin kallus oluşumu, kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı (KSEKO) ve rejenere olan bitki oluşumuyla ilgili olumlu sonuç vermesi nedeniyle, yapılacak çalışmalarda iyi sonuçlar verebileceği söylenilebilir. Tüm parametreleri göz önünde bulundurduğumuzda ise, gen aktarımına uygun bir rejenere bitki elde edebilmek açısından Palandöken 97 çeşidini

kullanmak, bizi amaca uygun sonuca götürmesi bakımından önerilebilir. Ayrıca yine bu amaca yönelik olarak memeli cinsiyet hormon tiplerinden, progesteron  $10^{-5}$  mM konsantrasyonu yapılacak çalışmalar için yine önerebilir. Diğer taraftan bu şekildeki çalışmalarda memeli cinsiyet hormonlarının düşük konsantrasyonlarının uygulanması daha etkin bir sonuç için uygun olabilir. Hatta ileride yapılacak çalışmalarda bizim uyguladığımız konsantrasyonlardan daha düşük konsantrasyonların uygulanması yeni araştırmacılar için bir fikir oluşturabilir.



## KAYNAKLAR

- Ahloowalia, B. S., 1982. Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Science*, (22), 405-410.
- Ahmet, H., and Adak, MS., 2007. Callus induction and plant regeneration in some iraqi common wheat varieties. *J. Agric. Sci.*, 13(3), 285–292.
- Ahuja, PS., Pental, D., Cocking, EC., 1982 Plant regeneration from leaf base callus and cell suspensions of *Triticum aestivum*. *Z Pflanzenzücht*, (89),139–144.
- Anonim, 2012. <http://www.datae.gov.tr/?x=5&id=3>
- Awad, O.,1974. Steroidal estrogens of *Prunus armeniaca* seeds. *Phytochemistry*, (13), 678-679.
- Aydın, M., 2006. Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Olgun embriyo kaynaklı kallus oluşumunu ve rejenerasyon kapasitesini etkileyen faktörlerin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi 84s.
- Aydın, M., 2010. Bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi 109s.
- Aydın, M., Haliloğlu, K., Tosun, M., 2009. Buğday doku kültüründe alternatif eksplant kaynağı: olgun embriyo. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 4 (2), 34-45.
- Aydın, M., Tosun, M., Haliloğlu, K., 2011. Plant regeneration in wheat mature embryo culture. *African Journal of Biotechnology* 10 (70), 15749-15755.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2000. Bitki Biyoteknolojisi doku kültürü ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi yayınları, No:22, 374, Konya.
- Bajguz, A., and Czerpak, R., 1996. Metabolic activity of estradiol in *Chlorella vulgaris* Beijerinck (*Chlorophytaceae*) Part 1. Content of photosynthetic pigments. *Pol Arch Hydrobiol*, (43), 421-426.
- Bajguz, A., and Czerpak, R., 2000. Metabolic activity of estradiol in *Chlorella vulgaris* Beijerinck (*Chlorophytaceae*) Part 2. Content of the cellular sugar and protein accumulation. *Pol Arch Hydrobiol*, (43), 427-430.
- Bhardwaj, R., and Thukral, AK., 2000. Effects of steroids on growth and biochemical parameters of maize plants. Conference materials of the 12th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology. 21-25 August 2000, Budapest, Hungary, p 82.
- Bhaskaran, S., and Smith, R. H., 1990. Regeneration in cereal tissue culture:a review. *Crop science*, (20), 1328-1336.
- Bhattacharya, B., and Gupta, K., 1981. Steroid hormone effects on growth and apical dominance of sunflower. *Phytochemistry*,(20), 989-991.
- Bi, RM., Kou, M., Chen, LG., Mao, SR., Wang, HG., 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. *Plant Breeding*, 126 (9), 9-12.
- Biswas, PK., Paul, KB., Henderson, JHM., 1967. Effects of steroids on *Chrysanthemum* in relation to growth and flowering *Nature*, (213), 917-918.

- Bohorova, N. E., Pfeiffer, W. H., Mergoum, M., Crossa, J., Pacheco, M., and Estanol, P., 2001. Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos. *Plant Breeding*, (120), 291-295.
- Bohorova, NE., Ginkel, M., Rajaram, S., Hoisington, DA., 1995. Tissue culture response of CIMMYT elit bread wheat cultivars and evaluation of regenerated plants. *Cereal Res Commun*, (23), 243–249.
- Bonner, J., and Axtman, G., 1937. The growth of plant embryos in vitro. Preliminary experiments on the role of accessory substances. *Proc Natl Acad Sci USA*, (23), 453-457.
- Bonner, J., Heftman, E., Zeevaart, J.A.D., 1963. Suppression of floral induction by inhibitors of steroid biosynthesis. *Plant Physiol*, (38), 81-87.
- Bregitzer, P., 1992. Plant regeneration and callus type in barley: Effect of genotype and culture medium. *Crop Sci.*, (32), 1108-1112.
- Buchala, A. J., and Schmid A., 1979. Vitamin D and its analogues as a new class of plant growth substances affecting rhizogenesis. *Nature*, (280), 230–231.
- Butenandt, A., and Jacobi, H., 1933. Über die Darstellung eines krystallisierten pflanzlichen Tokokinins (Thelykinins) und seine Identifizierung mit dem  $\alpha$ -Follikelhormon. Untersuchungen über das weibliche Sexualhormon. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem*, (218), 104-112.
- Carman, J. G., 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In vitro Cell Dev. Biol*, (26), 746-753.
- Chen, JY., Yue, RQ., Xu, HX., Chen, Xj., 2006. Study on plant regeneration of wheat mature embryo under endosperm- supported culture. *Agric. Sci. China*, (5), 572-578.
- Chowdhury, SH., Kato, K., Yamamoto, Y., Hayashi, K., 1991. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryo among common wheat cultivars. *Jpn J Breed*, (41), 442–450.
- Czerpak, R., 1993. The occurrence and biological activity of animal hormones and selected compounds in plants. *Kosmos*, (42), 613.
- Czerpak, R., and Szamrej, I.K., 2000. Metabolic activity of 11-deoxycorticosterone and prednisolone in the alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 69, 25.
- Czerpak, R., and Szamrej, I.K., 2003. The Effect of  $\beta$ -estradiol and Corticosteroids on Chlorophylls and Carotenoids Content in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. (*Lemnaceae*) Growing in Municipal Bialystok Tap Water. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12 (6), 677-684.
- Czerpak, R., Bajguz, A., Kalnowska, J., 2001. The stimulative effect of hydrocortisone photosynthetic pigments in the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Ecohydrol. Hydrobiol.*, 1, 465.
- Czygan, JC., 1962. Blütenbildung bei *Lemna minor* nach Zusatz von Oestrogen. *Naturwissenschaften*, (49), 285-286.
- Dohrn, M., Faure, W., Poll, H., Blotvogel, W., 1926. Tokokinine, Stoff mit sexualhormonartiger Wirkung aus Pflanzenzellen. *Med Klin*, (22), 1417-1419.
- Elena, B.E., and Ginzo, H.D., 1988. Effect of auxin levels on shoot formation with different embryo tissues from a cultivar and a commercial hybrid of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiol.*, (132), 600-603.

- Erdal, S., 2010. Memeli cinsiyet hormonlarının arpa ve nohut bitkilerinin büyüme ve gelişmeleri üzerine etkileri. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi 127s.
- Erdal, S., ve Taşkın, M., 2010. Çimlenen fasulye tohumlarında  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitesi ve erken büyüme parametreleri üzerine memeli cinsiyet hormonlarının etkileri. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Dergisi, 3 (1), 61-71.
- FAO, 2012. www.fao.org (05.04.2012).
- Felfoldi, K., and Purnhauser, L., 1992. Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. Cereal Res Commun, (20), 273–277.
- Fennel, S., Bohorova, N., Ginkel, M., Crossa, J., and Hoisington, D.A., 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. Theor Appl Genet., (92), 163–169.
- Filippov, M., Miroshnichenko, D., Vernikovskaya, D., and Dolgov, S., 2006. The effect of auxin and exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84, 213-222.
- Galiba, G., Kovacs, G., and Sutka, J., 1986. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. Plant Breeding, (97), 261–263.
- Gawienowski, M., Cheney, R.W., Marsh, H.V., 1971. Alteration of sex expression in the cucumber by testosterone and estradiol. Phytochemistry (10), 2033-2034.
- Geuns, J. M. C., 1974. Physiological activity of corticosteroids in etiolated mung bean plants. Z. Pflanzenphysiol., 74, 42.
- Geuns, J. M. C., 1977. Structure requirements of corticosteroids for physiological activity in etiolated mung bean seedlings. Z. Pflanzenphysiol., 81,1.
- Geuns, J.M.C., 1978a. Steroid hormones and plant growth and development. *Phytochem.*, (17), 1–14.
- Geuns, J.M.C., 1978b. Structural hormones and plant growth and development. *Phytochemistry*, 17, 1.
- Geuns, J.M.C., 1983. Structural requirements of corticosteroids in etiolated mung bean seedlings. Z. Pflanzenphysiol., 111,141-154.
- Gosch-Wackerle, G., Avivi, L., Galun, E., 1979. Induction, culture and differentiation of callus from immature rachis, seeds and embryos of *Triticum*. Z Pflanzenphysiol, (91), 267–278.
- Gross, D., and Parthier, B., 1994. Novel natural substances acting in plant growth regulation. J. Plant Growth Regul. 13, 93.
- Guan, M., and Roddick, J.G., 1988a. Epibrassinolide - inhibition of development of excised, adventitious and intact root of tomato (*Lycopersicon esculentum*): comparison with the effects of steroidal estrogens. *Physiol Plant* (74), 720-726.
- Guan, M., and Roddick, J.G., 1988b. Comparison of the effects of epibrassinolide and steroidal estrogens on adventitious root growth and early shoot development in mung bean cuttings. *Physiol Plant* (73), 426-431.
- Hacıbektaşoğlu, Y.E., 2011. Memeli Cinsiyet Hormonları (östron ve testesteron)'nın Farklı Hıyar (*Cucumis sativus* L.) Genotiplerinde Çimlenme Karakterleri, Bitki Gelişimi, Cinsiyet Oluşumu ve Antioksidan Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi. Atatürk Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi 60s.

- Haliloğlu, K., and Baenzinger, P.S., 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated wheat transformation. *Cereal Research Communications*, 31 (1-2), 9-16.
- Haliloğlu, K., and Baenzinger, P.S., 2005. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from immature embryos cultures. *J. Plant Biochemistry and Biotechnology*, (14), 77–82.
- Heftmann, E., 1975. Function of steroids in plants. *Phytochemistry*, (14), 891.
- Helmkamp, G., and Bonner, J., 1952. Some relationships of sterols to plant growth. *Plant Physiol* (28), 428-436.
- Hess, J. R., and Carman, J.G., 1998. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment and endogenous hormone levels. *Crop Science*, (38), 249–253.
- Hewitt, S., Hillman, J. R., Knights, B.A., 1980. Steroidal estrogens and plant growth and developments *New Phytol.*, 85, 329.
- Heyser, JW., Nabors, MW., MacKinnon, C., Dykes, TA., Demott, KJ., Kautzman, DC., Mujeeb-Kazi, A., 1985. Long-term, high-frequency plant regeneration and the induction of somatic embryogenesis in callus cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Z Pflanzenzücht*, (94), 218–233.
- Higgins, P., and Mathias, R. J., 1987. The effect of the 4B chromosomes of hexaploid wheat on the growth and regeneration of callus cultures. *Theor. Appl. Genet.*, (74), 439–444.
- Jacob, S.T., Sajdel, E.M., Munro, H. N., 1969. Regulation of nucleolar RNA metabolism by hydrocortisone. *Europ. J. Bioch.*, 7, 449.
- Janeczko, A. and Skoczowski, A., 2005. Mammalian sex hormones in plants. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 43, No.2, 71-79.
- Janeczko, A., 2000. Influence of selected steroids on plant physiological processes - specially flowering induction (in Polish). PhD Dissertation, Agricultural University, Krakow, Poland.
- Janeczko, A., Filek, W., Biesaga-Koscielniak, J., Marcinska, I., Janeczko, Z., 2003a. The influence of animal sex hormones on the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison with the effect of 24-epibrassinolide. *Plant Cell Tissue Organ Culture* (72), 147-151.
- Janeczko, A., Filek, W., Janeczko, Z., 2003b. Proliferation of *Arabidopsis thaliana* callus on medium containing 4-androstene-3, 17-dione, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benzylaminopurine (in Polish). Materials of conference "Biotechnology in biology, pharmacy and agriculture" 15-17 September 2003, Bydgoszcz, Poland, p 121.
- Janeczko, A., Filek, W., Skoczowski, A., 2002. Influence of human sex hormones on the growth response of winter wheat immature embryos and callus (in Polish). *Zesz Probl Post Nauk Roln*, (488), 667-673.
- Janeczko, Z., and Szybka, P., 2001. Induction and proliferation of callus of *Polygonatum verticillatum* L (in Polish). Conference materials of the 18th Meeting of the Polish Pharmaceutical Society "Pharmacy in the 21st century", 19-22 September 2001, Poznan, Poland, 536.
- Janik, J.R., and Adler, J.H., 1984. Estrogen receptors in *Gladiolus ovulus*. *Plant Physiol.*, 75, 135.

- Jia, H., Yi, D., Yu, J., Xue, S., Xiang, Y., Zhang, C., Zhang, Z. Zhang L. and Ma, Z. 2007. Mapping QTLs for tissue culture response of mature wheat embryos. *Mol. Cell.*, 23 (3), 323-330.
- Johnson, L.K., and Baxter, J.D., 1978. Regulation of gene expression by glucocorticoid hormones. *J. Biol. Chem.* 253, 1991.
- Jones, J. L., and Roddick, J.G., 1988. Steroidal estrogens and androgens in relation to reproductive development in higher plant. *J. Plant Physiol.*, 133, 510.
- Kato, K., Chowdhury, S.H., Harada, S., 1991. Effect of culture condition on plant regeneration capacity of mature embryo derived callus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Wheat Inf Serv*, (72),95–97.
- Kopcewicz, J., 1969. Effect of estrone on the content of endogenous gibberellins in the dwarf pea. *Naturwissenschaften*, 56, 334.
- Kopcewicz, J., 1970. Influence of estrogens on the flower formation in *Cichorium intybus* L. *Naturwissenschaften*, (57), 136.
- Kopcewicz, J., 1971. Influence of steroidal hormones on flower sex expression in *Ecballium elaterium* (L.). *Z Pflanzenphysiol*, (65), 92-94.
- Kopcewicz, J., and Porazinski, Z., 1974. Effect of growth regulators, steroids and estrogen fraction from sage plants on flowering of a long-day plant, *Salvia splendens*, grown under non-inductive light conditions. *Biol Plant (Praha)*, (16), 132-135.
- Kopcewicz, J., and Rogozinska, J. H., 1972. Effect of estrogens and gibberellic acid on cytokinin and abscisic acid like compound contents in pea. *Experientia*, 28, 1516.
- Kögl, F., and Haagen-Smit, A.J., 1936. Biotin und aneurin als phytohormone. *Z Physiol Chem*, (243), 209-227.
- Lazar, M.D., Cokkins, G.B., Wian, W.E., 1983. Genetic and environmental effects on the growth and differentiation of wheat somatic cell cultures, *J. Hered.*, (74), 353-357.
- Li, W., Ding, C. H., Hu, Z., Lu, W., and Guo, G. Q., 2003. Relationship between tissue culture and agronomic traits of spring wheat. *Plant science*, (164), 1079-1085.
- Loeys, M. E. J., and Geuns, J.M.C., 1978. Cortisol and the adventitious root formation in mung bean seedlings. *Z. Pflanzenphysiol.*, 87, 211.
- Löve, A., and Löve, D., 1945. Experiments on the effects of animal sex hormones on dioecious plants. *Ark Botanik*, (15), 1-60.
- Maddock, S.E., Lanchester, V.A., Risiott R., Franklin, J., 1983. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot*, (34), 915–926.
- Mandava, N. B., Sasse, J. M., and Yop, J. H., 1982. Brassinolide, a growth-promoting steroidal lactone. II. Activity in selected gibberellin and cytokinin bioassays. *Physiol. Plant.* (53), 453–461.
- Mathias, R. J., and Simpson, E. S., 1986. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. (thell) callus. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, (7), 31–37.
- Mathias, R.J., 1990. Factors affecting the establishment of callus culture in wheat, in: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 13, Springer, Berlin, 24-45.
- McHugen, A., 1983. Rapid regeneration of wheat in vitro. *Ann Bot*, (51), 851–853.

- Mendoza, M. G., and Kaeppler, H.F., 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). *In vitro Cell. Dev. Biol.*, (38), 39-45.
- Milanesi, L., Monje P., Boland, R., 2001. Presence of estrogens and estrogen receptor-like proteins in *Solanum glaucophyllum*. *Biochem Biophys Res Commun*, (289), 1175-1179.
- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
- Ozias-Akins, P., and Vasil, I.K., 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, (110), 95-105.
- Ozias-Akins, P., and Vasil, I.K., 1983. Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat). *Protoplasma*, (117), 40-44.
- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S., Sancak, C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat genotypes. *Plant Cell Reports*, (18), 331-335.
- Özgen, M., Türet, M., and Avcı, M., 2001. Cytoplasmic effects on the tissue culture response of callus from winter wheat mature embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, (64), 81-84.
- 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 Breed.*, (115), 455-458.
- Patnaik, D., and Khurana, P., 2003. Genetic transformation of indian bread (*Triticum aestivum*) and pasta (*Triticum durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli. *BMC plant biology*, 3(5), 1-11.
- Patnaik, D., Vishnudason, D., and Khurana, P., 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current Science*, 91(3), 307-317.
- Peng, J., and Hodges, T. K., 1989. Genetic analysis of plant regeneration in rice. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 25, 91-94.
- Pekşen, A., 2011. Memeli cinsiyet hormonları (Östron ve Testesteron)'nın domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tohum çimlenmesi, fide gelişimi, çiçeklenme, cinsiyet oluşumu ve antioksidan enzim aktivitesi üzerine etkisi. Atatürk Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi 83s.
- 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.
- Pyler, E.J., 1988. *Baking Science and Technology*. Sosland Publishing Company, U.S.A.
- Rashid, H., Ghani, R. A., and Chaudhry, Z., 2002. Effect of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). *Biotechnology*, 1 (1), 49-54.
- Redway, F. A., Vasil, V., Lu D., and Vasil, I.K., 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet.*, (79), 609-617.

- Rode, A., Hartman, C., De Buyser, J., and Henry, Y., 1998. Evidence for a direct relationship between mitochondrial genome organization and regeneration ability in hexaploid wheat somatic tissue cultures. *Curr. Genet.*, (14), 387-394.
- Sarker, R.H., and Biswas, A., 2002. *In vitro* plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Cult.*, 12 (2), 155-165.
- Schena, M., and Yamamoto, K. R., 1988. Mammalian glucocorticoid receptor derivatives enhance transcription in yeast. *Science*, 241, 965.
- Sears, R.G., and Deckard, E.L., 1982. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Sci.*, (22), 546-550.
- Sharma, V.K., Rao, A., Varshney, A., Kothari, S.L., 1995. Comparison of developmental stages of inflorescence for high frequency plant regeneration in *Triticum aestivum* L. and *Triticum durum* L. *Desf. Plant Cell Rep.*, (15), 227-231.
- Shewry, P.R., Tahtam, A.S., Lazzeri P., 1997. Biotechnology of wheat quality. *Journal Science Food Agriculture*, (73), 397-406.
- Simons, R.G., and Grinwich, D.L., 1989. Immunoreactive detection of four mammalian steroids in plants. *Can J Bot.*, (67), 288-296.
- Skarzynski, B., 1933. An oestrogenic substance from plant material. *Nature*, 131, 766.
- Skliar, M., Curino, A., Milanesi, L., Benassati, S., and Boland, R., 2000. *Nicotiana glauca*: Another plant species containing vitamin D3 metabolites. *Plant Sci.*, (156), 193-199.
- Slama, K., 1980. Animal hormones and antihormones in plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 175, 177.
- Szybka-Hryniewicz, P., and Janeczko, Z., 2004. Densitometric analysis of diosgenin in extracts from callus tissue of *Polygonatum verticillatum* (L.) All (in Polish). *Biotechnologia*, (2), 93-99.
- Şehirli, S., ve Özgen, M., 1998. Bitki ıslahı, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi yayınları:1059; Ders kitabı:310. Ankara Üniv. Basımevi, Ankara, s261.
- Tuberosa, R., Ravaglia, S., Lucchese, C., 1988. Callus induction and plant regeneration in Italian cultivars of bread wheat. *Agric Med.*, (118), 361-365.
- TÜİK, 2012. <http://www.tuik.gov.tr> (05.04.2012).
- Van Rompuy, L.L., and Zeevaert, J.A.D., 1979. Are steroidal estrogens natural plant constituents? *Phytochemistry*, (18), 863-865.
- Vasil, I.K., 1994. Molecular improvement of cereals, *Plant Mol. Biol.*, (25), 925-937.
- Yu, X.H., Zhu Z., Fu Z.M., An L.J., Li X.H., 1999. Improvement in plant regeneration from callus in wheat, *Acta Phytophysiol. Sin.*, (25) 388-394.
- Yurkova, G.N., Levenko, B.A., Novozhilov O.V., 1982. Plant regeneration in wheat tissue culture. *Biochem Physiol*, (177), 337-344.
- Zale, M. J., Borchardt-Wier, H., Kidwell, K. K., and Steber, C. M., 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant cell, Tissue organ culture*, (76), 227-281.
- Zamora, A.B., and Scott, K.J., 1983. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. *Plant Sci Lett*, (29), 183-189.
- Zhang, J.S., Yang, Z.H., Tsao, T.H., 1991. The occurrence of estrogens in relation to reproductive processes in flowering plants. *Sex Plant Reprod*, (4), 193-196.

- Zhang, L.J., and Seilleur, P., 1987. A simple and fast method to obtain high frequency of plant regeneration from mature and immature wheat embryos. *Bull Rech Agron Gembloux*, (22),187–189.
- Zhong-han, Y., Yin, T., Zong-xun, C., Tsao, TH., 1994. The changes of steroidal sex hormone - testosterone contents in reproductive organs of *Lilium davidii* Duch. *Acta Bot Sin.*, (36), 215-220.



## ÖZGEÇMİŞ

04.08.1983 tarihinde Erzurum ilinde dünyaya geldi. İlköğrenimini Kazım Karabekir ilköğretim okulunda, orta öğrenimini Atatürk Ortaokulunda yapıp, ardından Atatürk Lisesinde okudu. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden 2006 yılında mezun oldu. 2007 yılında Atatürk Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Tarla Bitkileri Yetiştiriciliği ve Islahı Bilim Dalı Yüksek Lisans programına yerleştirildi.