

50303

**BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) PROTOPLAST İZOLASYONU,
KÜLTÜRÜ VE BİTKİ REGENERASYONU**

AKİF ESKALEN

**Ç.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİMDALI
DOKTORA TEZİ**

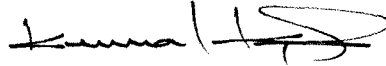
50303

**ADANA
Eylül, 1996**

Bu Tez Ç.Ü. ile K.S.Ü. Araştırma Fonları Tarafından Desteklenmiştir.

Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma jürimiz tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalında
DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı : Prof.Dr. N.Kemal KOÇ



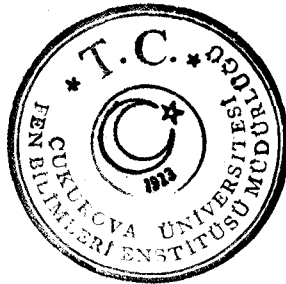
Jüri Üyesi : Prof.Dr. M.Asil YILMAZ



Jüri Üyesi : Doç.Dr. Kadriye (ÇAĞLAYAN) YILDIZGÖRDÜ

Kod No: 355

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu
onaylarım.



Prof.Dr. Ural DİNÇ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÇİZELGE LİSTESİ.....	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
RESİM LİSTESİ.....	VIII
ÖZ.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Kallus Oluşumu İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	3
2.1. Protoplast İzolasyonu İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	28
3. MATERYAL VE METOD.....	43
3.1. Materyal.....	43
3.1.1. Bitki Materyali.....	43
3.2. Metod.....	43
3.2.1. Olgunlaşmamış Buğday Embriyolarının Kültürü ve Kallusların Elde Edilmesi.....	43
3.2.2. Olgun Buğday Embriyolarının Kültürü ve Kallusların Elde Edilmesi.....	44
3.2.3. Buğday Nişastası Ortamının Hazırlanması.....	45
3.2.4. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması.....	46
3.2.5. Hücre Süspansiyon Kültürlerinden Protoplast İzolasyonu.....	47

3.2.6. Hücre Süspansiyon Kùltürlerinden İzole Edilen Protoplastların Kùltüre Alınması.....	48
3.2.7. Hücre Süspansiyon Kùltürlerinden İzole Edilen Protoplastlardan Bitki Regenerasyonu.....	48
3.2.8. Yaprak Mezofil Protoplastlarının İzolasyonu.....	49
3.2.9. Yaprak Mezofil Dokularından İzole Edilen Protoplastların Kùltürü.....	50
3.2.10. Hücre Süspansiyon Kùltürü Hücrelerinde ve Protoplastlardan Regene Edilen Bitkilerde Kromozom Sayımı.....	51
3.2.10.1. Feulgen Boyama Solusyonunun Hazırlanması.....	51
3.2.10.2. Hücre Süspansiyon Kùltürü Hücrelerinde Kromozom Boyaması.....	51
3.2.10.3. Protoplastlardan Regene Edilen Bitkilerde Kromozom Sayımı.....	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	54
4.1. Olgunlaşmamış Buğday Embriolarının Kùltürü ve Kallusların Elde Edilmesi.....	54
4.2. Olgun Buğday Embriolarının Kùltürü ve Kallusların Elde Edilmesi.....	65
4.3. Hücre Süspansiyon Kùltürlerinin Kurulması.....	70
4.4. Hücre Süspansiyon Kùltürlerinden Protoplast İzolasyonu.....	72
4.5. Hücre Süspansiyon Kùltürlerinden İzole Edilen Protoplastların Kùltürü.....	73
4.7. Hücre Süspansiyon Kùltürlerinden İzole Edilen Protoplastlardan Bitki Regenerasyonu.....	86
4.8. Yaprak Mezofil Dokularından Protoplast İzolasyonu.....	90
4.9. Yapraklardan İzole Edilen Mezofil Protoplastlarının Kùltürü.....	92

4.10. Protoplastlardan Regenere Edilen Bitkilerde Kromozom Sayımı..	92
4.11. Hücre Süspansiyon Kültürü Hücrelerinde Kromozom Sayımı.....	95
5 TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	98
6 ÖZET.....	118
7 SUMMARY.....	121
8 EKLER.....	124
9 KAYNAKLAR.....	128
10 TEŞEKKÜR.....	142
11 ÖZGEÇMİŞ.....	143



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge.1. Hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonunda kullanılan dört farklı enzim solusyonunun(V,P,Q,D) değişik zamanlarda protoplast verimliliği üzerine olan etkileri.....	72
Çizelge 2. 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ve B5 ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan protoplastların (%) bölünme oranları.....	74
Çizelge 3. 1.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan protoplastların (%) bölünme oranları.....	78
Çizelge 4. 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan protoplastların (%) kaplama etkinlikleri.....	81
Çizelge 5. 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan protoplastların (%) kaplama etkinlikleri.....	83
Çizelge 6. Yaprak mezofil dokularından protoplast izolasyonunda kullanılan enzim solusyonunun (W), farklı vakum uygulama zamanlarında protoplast verimliliğine olan etkileri.....	90
Çizelge 7. Hücre süspansiyon kültürü hücrelerinide kromozom sayımı..	95

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1. Değişik konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınan beş buğday çeşitinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranları (%). 54
- Şekil 2. Döllenmenin gerçekleşmesinden sonraki farklı zamanlarda kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranları (%). 56
- Şekil 3. MS, LS, N6 ve B5 ortamları üzerinde, döllenmenin gerçekleşmesinden yaklaşık 14-18 gün sonra kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranları (%) 58
- Şekil 4. Modifiye Edilmiş MS ortamları üzerinde, döllenmenin gerçekleşmesinden yaklaşık 14-18 gün sonra kültüre alınan beş buğday çeşitinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranları (%) 60
- Şekil 5. Modifiye edilmiş MS ortamları üzerinde kültüre alınan olgunlaşmamış buğday embriyoları kalluslarının büyüme oranları (mg). 62
- Şekil 6. 16 saat ışık-8 saat karaklık koşullarda, modifiye edilmiş MS ortamları üzerinde kültüre alınan Seri 82 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyo kalluslarının büyüme oranları (mg) 64
- Şekil 7. Değişik konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgun embriyolarının kallus oluşum oranları (%). 65

Şekil 8.	MS, LS, N6 ve B5 ortamları üzerinde kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgun embriyolarının kallus oluşum oranları (%).....	67
Şekil 9.	Modifiye edilmiş MS ortamları üzerinde kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgun embriyolarının kallus oluşum oranları (%).....	68
Şekil 10.	Farklı organik maddeler içeren sıvı MS ortamlarında kültüre alınan hücre süspansiyon kültürlerinin 3, 5, 7, ve 9. günlerdeki (%) hücre hacimi artışı (% PCV).....	70
Şekil 11.	Protoplastların bölünmeleri sonucu oluşan mikrokallusların modifiye edilmiş MS ortamlarında kallus gelişimleri (%)	85
Şekil 12.	Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D, IAA, BAP, kinetin ve NAA içeren MS ortamlarında, embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastların kültüre alınmaları sonucu oluşan mikrokalluslardan bitki regenerasyonu oranı (%).....	87

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1.	Embriyogenik kallus oluşturmak üzere kültüre alınan olgunlaşmamış buğday taneleri.....	55
Resim 2.	Modifiye edilmiş farklı ortamlarda kültüre alınan olgunlaşmamış buğday embriyolarında kallus oluşumu.....	57
Resim 3.	Olgunlaşmamış buğday embriyolarından oluşan kallusların tanelerden ayrılarak kültüre alınmaları.....	59
Resim 4.	Hızlı gelişen, kırılğan, beyaza yakın renkteki embriyogenik kalluslar.....	63
Resim 5.	Buğday nişastası ilave edilen ortamlarda kallus gelişimi.....	69
Resim 6.	Seri 82 buğday çeşidinin embriyogenik kalluslarından oluşturulan hücre süspansiyon kültürü.....	71
Resim 7.	Embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen Seri 82 buğday çeşidi protoplastları.....	76
Resim 8.	Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarının kültüre alınmalarından iki gün sonra hücre duvarı oluşumu ve bölünme.....	77
Resim 9.	Modifiye edilmiş MS ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarının ilk (a) ve ikinci bölünmeleri (b).....	79
Resim 10.	Modifiye edilmiş MS ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarının bölünmelerinin devam etmesi sonucu oluşan mikrokoloniler.....	80

Resim 11. Modifiye edilmiş MS ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarının bölünmelerinin devam etmesi sonucu oluşan mikrokalluslar.....	84
Resim 12. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarından gelişen mikrokallusların, regenerasyon ortamında oluşturdukları embrioidler.....	88
Resim 13. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarından gelişen mikrokallusların, regenerasyon ortamında oluşturdukları bitkiciklerler.....	89
Resim 14. Buğday yaprak mezofil dokularından izole edilen protoplastlar.....	91
Resim 15. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarından regenere edilen morfolojik olarak normal görünümlü bitkiler a,b) <i>in vitro</i> 'da gelişen sürgünler, c,d) toprağa aktarılmış bitkiler.....	93
Resim 16. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarından regenere edilen morfolojik olarak anormal görünümlü bitkiler a)albino bitki, b)aşırı kardeşlenme, c) geniş yaprak ayası, d)erken dönemde içi boş başakçık.....	94
Resim 17. Protoplastlardan regenere edilen bitkilerin kromozomları.....	96
Resim 18. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü hücreleri kromozomları, a,b) kromozom eksikliği, c)kromozom fazlalığı.....	97

ÖZ

Bu araştırmada, yeni buğday çeşitlerinin geliştirilmesinde gen transferi yöntemlerinin uygulanabilmesi için gerekli olan kallus, hücre süspansiyon kültürü, protoplast ve bitki regenerasyonu sistemlerinin kurulması amaçlanmıştır. Beş hexaploid buğday çeşidinin (*Triticum aestivum* L.) olgunlaşmamış ve olgun embriyoları kültüre alındıkları MS ve B5 ortamları üzerinde kallus oluşturmışlardır. Ortama ilave edilen organik maddelerden kazein hidrolizat ve glutamin kültüre alınan bütün çeşitlerde kallus oluşumunu artırmışlardır. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri, Seri 82 buğday çeşidinin kolay dağılabilen, hızlı gelişen, beyaza yakın renkteki, embriyogenik kalluslarından oluşturulmuştur. Protoplastlar, oluşturulan bu embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilmiştir. Bir gram hücre süspansiyon kültüründen enzimler kullanılarak 2×10^7 protoplast izole edilmiştir. Kültüre alınan protoplastlar yüksek oranda hücre bölünmesi ve kaplama etkinliği göstermişlerdir. Mikrokalluslar IAA, BAP ve kinetin içeren MS ortamlarına aktarılmışlar ve 16-20 hafta sonunda bitki regenerere edilmiştir. Sitolojik çalışmalarda, hücre süspansiyon kültürlerinde yüksek oranda kromozom kayıpları gözlenmiştir. Regenerere edilen bitkilerde ise $2n=42$ normal kromozom sayısı görülmüş fakat bazı bitkilerde morfolojik anormalliklere rastlanmıştır. Mezofil protoplastlarının izolasyonunda 1 gram yapraktan 6×10^5 protoplast izole edilmiştir. Farklı ortamlarda kültüre alınan mezofil protoplastlarında hücre bölünmesine rastlanmamıştır.

ABSTRACT

The regeneration of plants from protoplasts of wheat is a useful technology for new wheat cultivars improvement using genetic manipulation techniques. Immature and mature embryos of five cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) formed callus on MS and B5 media. Most cultivars formed calli on media augmented with organic substrates (casein hydrolysate, glutamin). The embryogenic cell suspension cultures were established from embryogenic callus of Seri 82 wheat cultivar which friable, rapid growing, off-white. Protoplasts isolated from embryogenic cell suspension cultures. Enzymatically 2×10^7 purified protoplasts were isolated per one gram initial fresh weight of cell suspension culture. Cultured protoplasts showed high rate cell division and plating efficiency. Microcallus were transferred on MS media supplemented with IAA, BAP and kinetin, and regenerated plant after 16-20 weeks.

In cytological study, It was observed chromosomes lost at the rate of 52 percent in cell suspension cultures. The regenerated plants from protoplasts observed normal chromosome number ($2n=42$), but some plants coincided abnormal seems.

Seedling leaves were used mesophyll protoplasts isolation. Enzymatically 6×10^5 purified protoplasts were isolated per one gram leaf tissue. Mesophyll protoplasts were cultured on different media, but It wasn't coincide with the cell division.

1. GİRİŞ

Tahıllar içerisinde buğday, dünyada en yaygın yetiştirilen kültür bitkisidir. Dünya nüfusunun yaklaşık %35'inin temel besini olan buğday, besinlerden alınan kalorisinin %20'sini karşılamaktadır (VASIL ve ark., 1991). Kültür bitkileri içerisinde en fazla yetiştiriciliği yapılan buğdayın dünya ekim alanı yaklaşık 226 milyon hektar, üretimi 550 milyon ton, verimi ise 2562 kg/ha kadardır (KÜN, 1983; AKKAYA, 1994).

Az gelişmiş ülkelerde bitki ıslahının temel amacını mutlak verim artışı oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde bu durum tarımsal özellikler ve teknikler açısından değişerek, aşırı üretimin neden olduğu sorunlara yönelik çalışmalara dönüşmüştür. Çevre faktörü gözönüne alındığında ürün artışı amacıyla yapılan bitki ıslahı teknikleri de buna paralel olarak değişmektedir (REXEN ve MUNCK, 1984). Günümüzde bu amaca yönelik olarak uygulanan ve aynı zamanda geliştirilen teknolojilerin başında biyoteknoloji gelmektedir. Yakın zamana kadar hayal olan genlerle oynamak suretiyle hastalık ve zararlılara dayanıklı, soğuğa ve tuza tolerant bitki tür ve çeşitleri üretilebilmiş, bozulmadan uzun süre depolanan, besin değeri yüksek ürünlerin elde edilmesi mümkün olabilmıştır. Bitki ıslahında, bitkisel biyoteknolojinin uygulanmasındaki başarı, bitki doku ve hücre kültürlerinden bitki regenerasyonunun gerçekleştirilmesine bağlıdır. Bu tür araştırmalar dünyanın önemli ticari tür ve çeşitlerinde uygulanmaktadır (MADDOCK, 1987; VASIL ve VASIL, 1992). Bugüne kadar dikotiledon bitkilerde totipotent bitki materyali olarak yaprak, sürgün, gövde, kök vb. organları kullanılabilen iken monokotiledonlarda kullanılacak bitki materyalinin çok sınırlı olduğu belirtilmiştir (GREEN ve PHILLIPS, 1975).

Kendine döllen bir bitki olan buğdayda doğal koşullarda kendiliğinden genetik varyasyonların ortaya çıkması çok zordur (LÖRZ ve ark., 1988). 1980 yılının başında ilk olarak dikotiledon bitkilere bir toprak bakterisi olan

Agrobacterium aracılığı ile transformasyon gerçekleştirilmiş ve bu alanda hızlı bir gelişme sağlanmıştır. Dikotiledon bitkilerde önemli aşamalar kaydedilmesine rağmen, monokotiledon bitkilerden olan tahıllarda transformasyon çok gerilerde kalmıştır. Bunun başlıca nedeni *Agrobacterium*'un monokotiledon bitkileri infekte etmemesinden kaynaklanmaktadır (DE CLEENE ve DE LEY, 1976; LEE, 1989). Bu nedenle tahıllarda transformasyonu sınırlayan faktörlerin üstesinden gelmek, yüksek verimlilik, hastalık, zararlı ve stres faktörlerine dayanıklılık gibi yabancı genetik materyalleri aktarmak için alternatif metodlar geliştirilmiştir. Bu metodlar; kimyasal (polyetilenglikol) ve fiziksel (elektrofüzyon) yöntemlerle iki protoplastın birleştirilerek (Protoplast füzyonu) somatik hibridizasyonun gerçekleştirilmesi, yabancı DNA'ların yine fiziksel ve kimyasal yöntemlerle protoplastlara aktarılması, mikroinjeksiyonla protoplastlara DNA'nın aktarılması (DNA-uptake), partikül bombardımanı yoluyla bitki hücre ve dokularına DNA'nın aktarılması şeklinde uygulanmaktadır (LÖRZ ve ark., 1988; LEE, 1989; VASIL, 1990; KARADIMOVA ve NEDKOUSKA, 1992).

İnsanlığın beslenmesinde önemli bir konuma sahip, monokotiledon bir bitki olan ve tarımsal açıdan üstün özelliklere sahip yeni çeşitler geliştirmek için *Agrobacterium* aracılığı ile gen transferinin mümkün olamadığı buğdayda yukarıda belirtilen protoplast füzyonu ile somatik hibridizasyon ve direk gen transferi yöntemlerinin (elektroporasyon, mikroinjeksiyon) uygulanabilmesinde gerekli olan embriyogenik kallus-protoplast-bitkiye geçiş sisteminin kurulup işlerlik kazandırılması bu araştırmanın başlıca amacını oluşturmuştur.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bitki ıslahında doku kültürlerinden yararlanmak için öncelikle her tür için uygun kallus, protoplast ve bitki regenerasyonu sistemlerinin geliştirilmesine bağlıdır. Buğdaygiller familyasına ait değişik türlerde çeşitli bitki dokularından (explant) yararlanılarak kallus ve protoplast kültürleri yapılabilmekte ve bunlardan bitki regene edilebilmektedir. Monokotiledon bitkilerin en önemlisi olan buğdaydan kallus kültürlerinin elde edilmesinde, **olgunlaşmamış embriyo** (OHNOUTKOVA ve NOVAK, 1985; KOBAYASHI ve ark., 1988; BARABANOVA ve ark., 1988; MOROZOVA, 1988; YU ve ark., 1990; YANG ve ark., 1991) **olgun embriyo** (KIM ve KIM, 1989; BARABANOVA ve BANNIKOVA, 1990), **olgunlaşmamış başakçık** (OHNOUTKOVA ve NOVAK, 1985; REN ve ark., 1989; PAUK ve SZARKA, 1991) gibi bitki dokuları kullanılmaktadır. Olgunlaşmamış embriyolar genellikle en iyi sonucu vermektedirler (VASIL ve VASIL, 1992).

Tahıllarda genetik varyasyonlar meydana getirebilmek için alternatif metodlar geliştirilmiştir (LEE, 1989). Bu tekniklerin uygulanmaya başlandığı kültür bitkilerinden biri de tüm dünya için ekonomik öneme sahip olan buğdaydır. Protoplast izolasyonu, kültürü ve bitki regenerasyonu çalışmalarının diğer bitki türlerine göre daha zor olduğu bildirilen tahıllarda, embriyogenik kallus, hücre süspansiyon kültürü, protoplast ve bitki sisteminin kurulması amacıyla yoğun çalışmalar yapılmıştır.

2.1. Kallus Oluşumu ile İlgili Yapılan Çalışmalar

SEARS ve DECKARD (1982), 39 kışlık buğday genotipinin doku kültürlerine tepkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 12 günlük olgunlaşmamış embriyolar 1.0 mg/l 2,4-D içeren MURASHIGE ve SKOOG (1962) ortamında kültüre alınmış ve elde edilen kalluslar 0.5 mg/l 2,4-D içeren

ortamda uzun süre muhafaza edilmiştir. Elde edilen kalluslar 40 günlük inkübasyon süresi sonunda 1300 mg'a kadar değişen miktarda kallus ağırlık artışı meydana getirmişlerdir. Kalluslar 0.1 mg/l 2,4-D içeren ortama transfer edildiğinde sürgün, 2,4-D içermeyen ortama transfer edildiklerinde ise bitki regenere edilmiştir. Kùltüre alınan genotipler kallus oluşumu, regenere olabilir kallus oluşumu, kallusların altkùltürlere gösterdikleri tepki ve bitki regenerasyonu potansiyelleri yönünde karşılaştırıldığında önemli ölçüde varyasyonların bulunduğunu bildirmişlerdir. Regenerasyon ortamına aktarılan 18 genotipten 90-125 gün, 5 genotipten de 240 gün sonra bitki regenere edilmiştir. Doku kùltürlerinden elde edilen ND7532 ve Roughider çeşidlerinden 420 gün sonra bitki regenere edilebilmiştir. Bunun yanında ND7532 çeşidinin kallus oluşumu, embriyogenik kallus oluşumu ve *in vitro* 'da gelişme durumu yönünden diğer genotiplere göre daha iyi performans göstermişlerdir. Bu çalışmada 532 bitki regenere edildiğini, bunlardan 510 bitkinin olgunlaşarak tohum verdiğini, çeşidlerin doku kùltürlerine gösterdikleri tepkilerin genotipe bağılı olarak değiştiğini bildirmişlerdir.

OZIAS-AKINS ve VASIL (1982), (*Triticum aestivum* L) buğdayın olgunlaşmamış embriyo ve başakçıklarından elde edilen kallus kùltürlerinden bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Olgunlaşmamış embriyo ve başakçıkları 2 mg/l 2,4-D içeren MURASHIGE ve SKOOG (1962) ortamında kùltüre alarak, kırılğan ve kompakt olmak üzere iki tip kallus elde etmişlerdir. Regenerasyon ortamına aktarılan kırılğan kalluslardan bitki regenere edilirken, kompakt kalluslardan sadece kök regenere edilebilmiştir. Sonuç olarak her iki materyalden elde edilen kalluslardan bitki regenere edilerek toprağı aktarıldığını, bu bitkilerin $2n=6x=42$ normal kromozom sayısına sahip olduklarını bildirmişlerdir.

EAPEN VE RAO (1982), (*Triticum aestivum* L.) hexaploid buğday çeşidlerinin farklı dokularının kültüre alınmasıyla elde ettikleri kallus kültürlerinden embriyo ve bitkicik regenere etmişlerdir. Altı buğday varyetesinin yaprak, mezokotil, kök, olgun ve olgunlaşmamış emriyolarını kallus elde etmek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda hormon içeren basal ortamlar üzerinde kültüre almışlardır. En iyi kallus gelişimini 2,4,5-Cl₃ FOP (fenoprop) içeren ortamda elde etmişlerdir. Elde edilen bu kalluslar hormon içermeyen ortama transfer edildiklerinde nodlar, küçük sürgünler ve yapraklar oluşturmuşlardır. Bunun yanında regenerasyon oranı da çeşidlere göre farklılık göstermiştir. Olgun embriyolardan elde edilen kallusların yaklaşık %10'unun klorofil oluşturduğunu, sürgünlerden elde edilen kallusların ise oksin içeren ortamlarda kültüre alındıklarında bitkicik oluşturduklarını ve bu bitkiciklerin olgunlaşmaları için toprağa aktarıldıklarını bildirmişlerdir.

AHLOOWALIA (1982), Maris Huntsman buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını 2,4-D, IAA ve kinetin içeren (veya içermeyen) 1/2 MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Kinetin içeren ortamda kültüre alınan embriyoların %77'sinin, kinetin içermeyen ortamdaki embriyoların ise tamamının iki hafta içinde kallus oluşturdukları gözlenmiştir. Elde edilen kallusların 2,4-D ve zeatin içeren 1/2MS ortamında 120 gün sürede organogenesis gösterdiklerini, ayrıca NAA'nın kök gelişimini hızlandırdığını saptamışlardır. Sonuç olarak regenere edilen bitkilerin bitki boyu, sap kalınlığı, yaprak ayası alanı, başak boyu, polen canlılığı, ve tane büyüklüğü bakımından varyasyon gösterdiklerini kanıtlamışlardır.

ZAMORA ve SCOTT (1983), buğday yapraklarını kültüre alarak kallus elde etmişler ve bu kalluslardan bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 1-7 yapraklı bitkiciklerin genç yapraklarından 2-6 cm büyüklüğünde parçalar kesilerek 2,4-D, arginin, maya ekstraktı ve sakkaroz içeren katı MS ortamında

kültüre alınmıştır. Kallus oluşumu yönünden diğer yapraklarla karşılaştırıldığında 6. ve 7. yaprakların basal bölgelerinden alınan segmentlerden daha yüksek oranda kallus elde edilmiştir. Yapraklardan elde edilen kallusların 1 μ M 2,4-D, 5 μ M sitokinin içeren ortamda kültüre alındığında sürgün oluşturdıklarını, elde edilen sürgünlerin köklenmeleri için hormon içermeyen 1/2 MS ortamında kültüre alındığını ve sonuçta bitki regenerasyonunun gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir.

MCHUGHEN (1983), buğdayın koleoptil segmentlerinden oluşturulan kalluslardan bitki regenere etmiştir. Buğday tohumlarının 29 °C'de, 3-4 gün süre ile çimlendirilmesi ile elde edilen koleoptil segmentlerinin kültüre alınması sonucu embriyogenik kallusların elde edildiğini ve bunlardan da bitki regenerasyonunun gerçekleştirildiğini, ayrıca kültürlerde somaklonal varyasyonların meydana geldiğini bildirmiştir.

MADDOCK ve ark. (1983), (*Triticum aestivum* L.) 25 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyo ve başakçıklarından elde edilen kalluslardan bitki regenere etmişlerdir. Highbury ve Maris Butler buğday çeşidlerinden elde edilen kalluslar 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda yüksek oranda sürgün oluşturmışlardır. Bu çalışmada kullanılan 25 buğday çeşidini morfogenez kapasiteleri yönünden karşılaştırılmış ve sonuçta embriyoid ve sürgün oluşumu yönünden farklılıklar bulunmuştur. Oluşan sürgünlerden regenere edilen 1000'den fazla bitkide morfolojik görünüm, çiçeklenme zamanı, fertil tane oluşumu bakımından önemli ölçüde varyasyonların meydana geldiğini bu varyasyonların aynı çeşidin farklı bitkilerinde dahi görüldüğünü rapor etmişlerdir.

LAZAR ve ark. (1983), buğdayın embriyo kültürlerinden elde ettikleri hücre kültürlerinden bitki regenerasyonu oranına genotip ve çevrenin etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. 25 buğday çeşidinin ve 5 *Triticum* türünün olgun ve olgunlaşmamış embriyoların *in vitro*'da farklı çevre koşullarında kültüre

almışlardır. Kallus oluşum oranına genotipin, ortama ilave edilen hormon türü ve miktarının ve farklı in vitro koşullarının önemli ölçüde etkili olduğunu kanıtlamışlardır. Kallus oluşumu için 0.5-1.0 mg/l 2,4,5-T ve 0.1 mg/l kinetin içeren ortamın en iyi sonuç verdiğini, bunun yanında elde edilen kallusların genotipe göre değişmekle birlikte sürgün oluşturma oranlarının düşük olduğunu bildirmişlerdir.

SCHAEFFER ve ark., (1984), buğdayın (*Triticum aestivum* L.) olgunlaşmamış embriyo, olgunlaşmamış başakçık, anter ve çeşitli gövde segmentlerini farklı konsantrasyonlarda hormon içeren ortamlarda kültüre almışlardır. Kültüre aldıkları bütün eksplanstlardan da yüksek oranda kallus elde etmişlerdir. 21 farklı genotipin olgun embriyolarından elde ettikleri kallusları farklı ortamlarda kültüre almışlar ve 1800 mg'a kadar değişen miktarlarda kallus ağırlığı elde etmişlerdir. Elde edilen kallusların regenerasyon ortamına aktarıldığını ve 4-8 hafta sonra yeşil sürgünler meydana geldiğini bildirmişlerdir.

HEYSER ve ark. (1985), buğdaydan (*Triticum aestivum* L.) elde edilen kallus kültürlerinden somatik embriyo ve bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bitki ıslahında kullanılan doku kültürlerinde başlangıç materyalinin oldukça önemli olduğunu, buğdaydan elde edilen kallus kültürlerinin genellikle olgun ve olgunlaşmamış embriyolardan elde edildiğini belirtmişlerdir. Embriyogenik kallusların küçük yuvarlak hücreli ve kırılğan olduklarını, embriyogenik olmayan kallusların ise uzun hücreli ve kompakt olduklarını gözlemişlerdir. Embriyogenik bölgelerden alınan hücrelerin regenerasyon oranının yüksek olduğunu, embriyogenik olmayan bölgeden alınan hücrelerin ise regenerasyon oranının çok düşük olduğunu bildirmişlerdir. Olgunlaşmamış embriyoların ortama yerleştirildikleri yüzey durumuna göre embriyogenik ve embriyogenik olmayan kallusların oluştuğunu, olgunlaşmamış embriyoların sürgün bölgesinden oluşan kallusların embriyogenik, kök

bölgesinden oluşan kallusların ise embriyogenik olmadıklarını tesbit etmişlerdir. Olgunlaşmamış embriyo tanesinin parçalanması durumunda sürgün apikal bölgesinden embriyogenik, kök apikal bölgesinden ise embriyogenik olmayan kallusların geliştiğini, olgun embriyoların sürgün apikal bölgesinden embriyogenik, kök apikal bölgesinden ise embriyogenik olmayan kallusların oluştuğunu, sonuçta olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolardan embriyogenik ve embriyogenik olmayan kallusların elde edilmesinin yüksek oranda ortama ilave edilen 2,4-D konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

OHNOUTKOVA ve NOVAK (1985), buğday ve arpanın olgunlaşmamış embriyo ve başakçıklarının kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu oranlarına *in vitro* koşulların etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, yazlık Rena, kışlık Vala buğday çeşidlerinin, yeni seleksiyon yapılmış HE417 buğday çeşidinin ve yazlık Koral arpa çeşidinin (0.5-1 mm) büyüklüğündeki olgunlaşmamış embriyolarını ve (2-4 mm) uzunluğundaki olgunlaşmamış başakçıklarını 5, 20 ve 50 μM 2,4-D içeren MURASHIGE ve SKOOG (1962) ortamında kültüre almışlardır. Olgunlaşmamış başakçıkların 20 μM 2,4-D içeren ortamda 10-20 gün sonra, olgunlaşmamış embriyoların ise 5 μM 2,4-D içeren ortamda 30-40 gün sonra yüksek oranda bitkicik oluşturmuşlardır. En hızlı kallus oluşumuna Vala çeşidinde rastlanmıştır. Rena çeşidinde kültüre alındıktan 20 gün sonra, diğer çeşidlerde ise 40 gün sonra kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Kallus oluşumu için en uygun 2,4-D konsantrasyonunun Rena ve Vala çeşidleri için 20 μM , HE417 çeşidi için 50 μM ve Koral çeşidi için 5 μM olduğunu tesbit etmişlerdir. Regenerasyon oranı yönünden en yüksek Rena çeşidinin (%20-30), en düşük Vala çeşidinin (% 5-15) bulunduğunu, Koral çeşidinin ise regenerasyon yeteneğinin bulunmadığını rapor etmişlerdir.

ZHANG ve SEILLEUR (1985) *In vitro*'da (*Triticum aestivum* L.) buğday çeşidlerinin farklı dokularından elde edilen kalluslardan bitki regenerere

etmişlerdir. Sekiz buğday çeşidinin olgun ve olgunlaşmamış embriyolarını ve çeşitli gövde segmentlerini farklı ortamlarda kültüre alarak kallus oluşum oranlarını tesbit etmişlerdir. Buna göre olgun embriyo, epikotil ve mezokotil eksplantlardan embriyogenik kapasiteye sahip kallusların elde edildiğini, bunun yanında döllemenin gerçekleşmesinden yaklaşık 16-22 gün sonra alınan olgunlaşmamış embriyoların genotipe göre değişmekle birlikte daha yüksek oranda kallus oluşumu meydana getirdiklerini bildirmişlerdir. Bu eksplantlardan elde edilen kallusların regenerasyon oranının ortama bağlı olarak değişim gösterdiğini belirtmişlerdir.

EAPEN ve RAO (1985), buğday, çavdar ve tritcale'nin olgunlaşmamış başakçıklarının kültüre alınması sonucu elde ettikleri kalluslardan bitki regeneretmişlerdir. Buğday (*Triticum aestivum* L. cv Kalyan Sona), çavdar ve tritcale cv. 6T209'nin 1 cm uzunluğundaki olgunlaşmamış başakçıklarını 2,4-D, hindistan cevizi sütü ve BAP içeren MURASHIGE ve SKOOG (1962) ortamında kültüre alarak kallus oluşumunu teşvik etmişlerdir. Elde edilen bu kallusların NAA ve IAA içeren ortama transfer edilmesiyle embriyoidlerin ve yeşil sürgünlerin oluştuğunu, bunlardan regeneret edilen bitkilerin ise toprağa aktarıldığını bildirmişlerdir.

INAGAKI (1986), buğday (*Triticum aestivum* L. cv. Norin 61, $2n=6x=42$) çeşidinin olgunlaşmamış haploid embriyolarından kallus elde etmiştir. 9 adet olgunlaşmamış buğday embriyosunun 0.5 mm büyüklüğündeki parçalarını 2 ppm 2,4-D içeren B5 ortamında kültüre alarak 15 gün süre ile inkübe etmiştir. Elde edilen kalluslar hormonsuz B5 ortamında kültüre alınarak toplam 63 bitki regeneret edildiğini regeneret edilen bitkilerin 21 kromozoma sahip olduklarını bildirmiştir.

KARADIMOVA ve ERIKSON, (1986), buğdayın (*Triticum aestivum* L.) olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen kalluslardan somatik embriyo ve

organogenesis teşvik etmişlerdir. Kışlık ve yazlık olmak üzere 11 buğday varyetesinin olgunlaşmamış embriyolarının hormon ilave edilmiş MURASHIGE ve SKOOG, (1962) ortamında kültüre alındığını, kallus oluşturma oranının genotipe bağlı olarak %58 ile 100 arasında değişim gösterdiğini belirtmişlerdir. Kültüre alınan varyetelerden embriyogenik kallus oluşum oranının ise %1.5 ile %17.7 arasında bulunduğunu bildirmişlerdir. Yazlık varyetelerden elde edilen kallusların kışlık varyetelere oranla daha iyi performans gösterdiklerini, ortalama regenere olan bitki / kallus oranının 2-10 arasında bulunduğunu bildirmişlerdir. Kültüre alınan 22773 ve 24373 yazlık varyetelerinin çok yüksek bitki regenerasyonu kapasitesine sahip olduklarını gözlemişlerdir.

GALIBA ve ark. (1986), buğday kallus kültürlerinden bitki regenerasyonunda, kallusların regenerasyon yeteneklerini etkileyen faktörleri belirlemeye çalışmışlardır. Cheyenne buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen kalluslardan regenere edilen bitkilerde kromozom analizleri yapıldığını ve kalluslardan bitki regenerasyonun birçok gen tarafından kontrol edildiğini ileri sürmüşlerdir.

BUTENKO ve ark. (1986), 5 kışlık buğday çeşidinin olgun ve olgunlaşmamış embriyo, kök ucu, olgunlaşmamış başakçıklarının kültüre alınması ile elde edilen kallus dokularının morfogenez ve bitki regenerasyonu kapasitelerini belirlemişlerdir. Bu explantlar 4 farklı şekilde modifiye edilmiş katı MS (MURASHIGE ve SKOOG, 1962) ortamında kültüre alınmışlardır. Modifiye edilen ortamları a) kallus oluşumunun teşvik edildiği, b) embriyogenik kallusların altkültüre alınarak muhafaza edildiği, c) morfogenezin teşvik edildiği, d) bitkiciklerin köklendirildiği ve toprağa aktarılmadan önce gelişmelerinin sağlandığı ortamlar olarak 4 gruba ayırmışlardır. Bu çalışma sonucunda olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslardan yüksek oranda bitki regenerasyonunun gerçekleştirildiğini, diğer orijinlerden elde edilen kalluslardan

ise nadiren bitki regenere edilebildiğini, regenere edilen bitkilerin bir kısmında kök gelişimi, yaprak ayası genişliği ve bitki boyu yönünden genotiplerden kaynaklanan varyasyonların bulunduğunu tesbit etmişlerdir.

HUNSINGER ve SCHAUZ (1987), buğday (*Triticum aestivum* L.)'ın olgunlaşmamış embriyolarından oluşturulan kalluslardan somatik embriyo ve bitki regenerasyonu oranına dicamba'nın etkisini araştırmışlardır. 3 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyoları 1 mg/l dicamba içeren modifiye edilmiş N6 ortamında kültüre alınarak, 7-10 gün içinde kallus ve embriyoid oluşturmuşlardır. 4-6 hafta sonra ise bu kalluslardan %70 oranında embriyoid meydana gelmiştir. Her embriyoidden 1-30 arasında bitki elde edildiğini, kültüre alınan Caribo ve Kanzler çeşidlerinden Sage çeşidine göre daha iyi sonuçlar alındığını bildirmişlerdir.

PAPENFUSS ve CARMAN (1987), dicamba ve kinetinin buğday kallus kültürlerinde bitki regenerasyonu oranına olan etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, PCYT10 ve Fremont çeşidlerinin 14-21 günlük olgunlaşmamış embriyolarını dicamba içeren MURASHIGE ve SKOOG (1962) ve SCHENG ve HILDEPRAND (1972) ortamlarında kültüre almışlardır. Kallus oluşturmak amacıyla kültüre alınan embriyolarda doğrudan sürgün oluşumu 2,4-D içeren ortama nazaran engellediği tesbit edilmiştir. Bunun yanında embriyoların MS ortamında ve karanlık koşullarda inkübe edildiğinde dicamba'nın kallus ve sürgün oluşumunu teşvik ettiğini gözlemişlerdir. 2,4-D yada dicamba içeren ortamlarda gelişen kalluslar kinetin içeren ortamda kültüre alındıklarında ise bu kez sürgün oluşumunun önemli ölçüde arttığını saptamışlardır. Kültürler karanlık koşullarda inkübe edildiğinde kallus gelişiminde meydana gelen olumlu artışın 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullarda inkübe edildiğinde olumsuz yönde değiştiğini tesbit etmişlerdir. Embriyolardan

elde ettikleri kallusların 4 haftalık inkübasyon süresi sonunda yüksek oranda kallus ağırlık artışı meydana getirdiklerini bildirmişlerdir.

ORSHINSKY ve MCHUGHEN (1987), Neepawa buğday çeşidinden elde edilen kalluslardan bitki regenere etmişlerdir. 0.5 mg/l 2,4-D içeren temel besin ortamında kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşumu başlatılmıştır. En uygun kalluslar sera şartlarında yetiştirilen birkilerden ve döllenmenin gerçekleşmesinden 12-15 gün sonra alınan olgunlaşmamış embriyolardan elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar düzenli bir şekilde altkültürlere alınarak stabil hale getirilmiştir. Bu şekilde elde edilen embriyogenik kalluslardan embriyo oluşum oranlarının %40-45 olduğunu, regenere edilen 600'den fazla bitkinin sera koşullarında toprağa aktarıldığını, bunlardan yaklaşık %85'ini olgunlaşarak tane oluşturdıklarını belirtmişlerdir. Ayrıca somaklonal varyasyonun genotipe bağlı olarak nadiren de olsa meydana geldiğini bildirmişlerdir.

OVESNA ve LHOTOVA (1987), buğday (*Triticum aestivum* L.) doku kültürlerinden kallus ve bitki regenerasyonunu gerçekleştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, kültüre alınan 4 buğday çeşidinde en uygun materyalin 14 günlük olgunlaşmamış embriyoların olduğunu saptamışlardır. Olgun embriyolardan elde edilen kallusların 2,4-D yada 2,4,5-T içeren ortamlarda scutellar dokulardan değil de apikal dokulardan oluştuklarını dolayısıyla bitki regenere edilmediklerini ileri sürmüşlerdir. Olgunlaşmamış başakçıkların kültüre alınmasıyla elde edilen kalluslardan bitki regenere edilerek toprağa aktarıldığını, bunun yanında gövde nodlarından elde edilen kalluslarda regenerasyon oranının çok düşük olduğunu bildirmişlerdir.

KARABAEV ve ark. (1988), *in vitro*'da buğday doku kültürleri üzerine yaptıkları çalışmada, diploid, tetraploid, hexaploid buğday ve *Aegilops* türlerinden elde ettikleri kalluslardan morfogenez teşvik edildiğini,

regenerasyon oranına kültür şartlarının etkili olduğunu, buğday yapraklarından elde edilen kallusların regenerasyon oranının yaklaşık %60 olarak bulunduğunu, ayrıca olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslardan albino sürgünlerin elde edildiğini bildirmişlerdir. Kışlık buğday varyetelerinde somaklonal varyasyonların bulunduğunu, bu varyasyonların kallus kültürlerinden veya buğdayın farklı organlarından direk kurulan hücre süspansiyon kültürlerinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Azot ve sakkaroz konsantrasyonları ile ışık koşullarının hücre kültürlerinden embriyoid oluşumunu doğrudan etkilediğini, ayrıca bu çalışmada hücre süspansiyon kültürlerinden ve farklı dokulardan protoplast izolasyonu metodlarının uygulandığını ve elde edilen protoplastlarda bölünme meydana geldiğini bildirmişlerdir.

MOROZOVA (1988), buğday kalluslarının altkültürleri boyunca regenerasyon yeteneklerinin devamlılıklarını belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada, Zarva kışlık ve Moskovskaya 35 yazlık buğday çeşidlerinin 14-16 günlük olgunlaşmamış embriyolarının 2,4-D, kinetin ve sakkaroz içeren MURASHIGE ve SKOOG (1962) ortamında kültüre alındığında kallus oluşumu teşvik edilmiştir. Sulu, kırılğan, uzun hücrelere sahip embriyogenik olmayan ve kompakt, küçük hücrelere sahip embriyogenik kalluslar olmak üzere iki tip kallus elde edilmiştir. Embriyogenik tip kalluslar 1-5 mg/l 2,4-D, %3-5 sakkaroz ve 0,1 mg/l kinetin içeren besin ortamında daha yüksek oranda oluşmuştur. Elde edilen kalluslar 40-50 günde bir 24 °C'de aynı ortamda altkültüre alınarak stabil hale getirilmiş, daha sonra bu kalluslar 1 mg/l BAP, 1 mg/l zeatin yada 1 mg/l kinetin içeren MS regenerasyon ortamında, 24 °C'de, 16 saat ışık (3000 lüks) 8 saat karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Kallusların altkültüre alındıkları ortamın içeriğine bağlı olarak bitki regenerasyonu oranının değiştiğini, her iki varyetede de en yüksek bitki regenerasyonu oranına 2-3 mg/l 2,4-D, %5 sakkaroz, 0.1 mg/l kinetin içeren (veya içermeyen) kallus gelişme ortamında altkültüre alınan

kalluslarda rastlandığını bildirmiştir. Zarda çeşidinin kültüre alındıktan 40-60 gün sonra %17-31, Moskovskaya çeşidinin 80-90 gün sonra %11-33 regenerasyon oranına sahip olduğu belirlenmiştir.

KOBA ve ark. (1988), (*Triticum aestivum*) buğday ve (*Hordeum vulgare*) arpadan elde edilen intergenerik hibritlerin olgunlaşmamış embriyolarının ve başakçıklarının kültüre alınmasıyla oluşturulan kalluslarda ve regenere edilen bitkilerde kromozomal ve morfolojik varyasyonları incelemişlerdir. Elde edilen 12-18 aylık kallus kültürlerinde ve bunlardan regenere edilen bitkilerde sitolojik ve morfolojik karakterleri incelemişlerdir. Kallus hücrelerinin kromozom sayıları 23 ile 29 arasında değişim göstermiş, yaklaşık %60'ı 28 kromozoma sahip bulunmuştur. Ayrıca amfidiploid hücreler ve kromozomlarda meydana gelen değişiklikler de incelenerek, olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen hücrelerin kromozomlarında meydana gelen değişiklikler olgunlaşmamış başakçıklardan elde edilen hücrelere göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca regenere edilen bitkilerin yaklaşık %12'sinde kromozomal anormallikler tesbit etmişlerdir. Fenotipik varyasyonlar olarak kulakçık ve yapraklardaki anormalliklerin ve klorofil eksikliklerinin, gen seviyesinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklandığını, kromozomların yapısında meydana gelen varyasyon derecesinin hücrelerin altkültürlerde kaldıkları süreye bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

BARABANOVA ve ark. (1988), kışlık buğdayın embriyo kültürlerinden bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 15 melezden elde edilen varyeteler arası hibritlerin ve 5 varyetenin 14 günlük olgunlaşmamış embriyoları 1.5 mg/l 2,4-D içeren MURASHIGE ve SKOOG (1962) ortamında kültüre alınmış ve bütün varyeteler %100 oranında kallus oluşturmuşlardır. Elde edilen kalluslar 0.2 mg/l IAA ve 1 mg/l BAP içeren MS regenerasyon ortamına transfer edildiğinde kök ve yeşil sürgünler elde edilmiştir. Sonuç olarak, Mironovskaya 808'in %90,

Donskaya Polukarlikovaya'nın %71.4, Buchany'nin %87.8, Balkan'ın %57.5, Yuzhnaya Zarya'nın %17.4 regenerasyon oranına sahip olduklarını, ayrıca bitki regenerasyonu oranının kallus verimine ve kapasitesine bağlı olmadığını bildirmişlerdir.

ELENA ve GINZO (1988), (*Triticum aestivum* L.) buğdayın hibrit ve hibrit olmayan çeşidlerinin kültüre alınmasıyla elde edilen kalluslardan bitki regenerasyonuna ortama ilave edilen oksin konsantrasyonlarının etkilerini saptamışlardır. Elde edilen kallus kültürlerinin ilk altkültüründe 2,4-D miktarının azaltılması ile sürgün oluşumunun gerçekleştirildiğini, materyal olarak kullanılan hibrit çeşidin oksin seviyesine olan tepkisinin ticari çeşide göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

HE ve ark. (1988), tesadüfe bağlı olarak seçtikleri 35 (*Triticum aestivum* L.) buğday varyetesinin olgunlaşmamış embriyolarını kültüre almışlardır. Bu embriyolardan epiblast ve scutellar kaynaklı olmak üzere iki tip kallus elde etmişlerdir. Kallus oluşumu bakımından çeşidler arasında önemli düzeyde farklılıklar bulunduğunu, kültüre alınan çeşidlerin %28-96 oranında scutellar, %18-94 oranında ise epiblast kallus oluşturduklarını saptamışlardır. Bunun yanında kültüre alınan *T. durum* buğdayının 6 varyetesinin ise sadece scutellar kallus oluşturduklarını gözlemişlerdir. Yapılan çalışmada embriyoların kültüre alındığı MS ortamının makroelement konsantrasyonunun embriyogenik kallus oluşturma oranını etkilediğini tesbit etmişlerdir. Sonuçta her iki tip kallustan da düşük oranda da olsa embriyoidlerin elde edildiğini, genel olarak scutellar kalluslardan epiblast kalluslara göre daha fazla bitki regenerere edildiğini rapor etmişlerdir.

LIU (1988), kültüre alınan buğday embriyolarından kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu kapasiteleri arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yaptığı bu araştırmada, buğday embriyosu için en yüksek kallus oluşumunun meydana

geldiği ortamın 2 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l NAA ve 200 mg/l kazein hidrolizat içeren MS ortamı olduğunu belirlemiştir. *In vitro*'da 10 buğday çeşidi ile yaptığı çalışmada, kallus oluşumu ve bitki regeregenerasyonu oranları yönünden çeşidler arasında önemli düzeyde farklılıklar bulunduğunu, ayrıca en yüksek bitki regeregenerasyonunun kallus oluşum oranı yüksek olan çeşidlerde meydana geldiğini bildirmişlerdir.

TUBEROSA ve ark. (1988), İtalyan ekmeklik buğday çeşidlerinden kallus oluşumu ve bitki regeregenerasyonun gerçekleştirildiğini rapor etmişlerdir. 8 İtalyan ekmeklik buğday çeşidinin yaprak ayası, olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarını L-Prolin içeren (veya içermeyen) MS (MURASHIGE ve SKOOG, 1962) ve B5 (GAMBORG B5, 1968) ortamlarında kültüre almışlardır. Bu kültürlerden iki tip kallus elde edildiğini, bunlardan birinin yumuşak yapıda ve sadece kök regeneere olabilen kallus, diğerinin ise kompakt, nodular ve yüksek oranda morfogenez kapasiteye sahip olduğunu, ayrıca L-prolin içeren ortamda gelişen kallusların regeregenerasyon kapasitelerinin azaldığını tesbit etmişlerdir. Bunun yanında B5 ortamında kültüre alınan kallusların totipotensi özelliklerinde azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Sonuçta olgunlaşmamış embriyolardan ve yaprak ayasından elde edilen kalluslardan 112 adet bitki regeneere edildiğini, çeşidler arasında totipotensi ve regeregenerasyon kapasiteleri yönünden önemli ölçüde farklılıklar bulunduğunu bildirmişlerdir.

SIDOROVA ve ark. (1988) kışlık buğday çeşidlerinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus ve morfogenez oluşturma oranlarını belirlemiştir. 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınan 10 kışlık buğday genotipinden, en hızlı ve kolay kallus oluşturma kapasitesine Polesskaya70 çeşidinin sahip olduğunu, Karibo çeşidinin ise 1 mg/l BAP, 0.5 mg/l NAA içeren ortamda yüksek regeregenerasyon kapasitesine sahip olduğunu belirlemiştir. Bunun yanında kalluslardan regeneere edilen bitkiciklerde somaklonal varyasyonun daha

fazla olduğunu, bu bitkilerin fertilitelerinin ise genotiplere göre farklılık gösterdiklerini bildirmişlerdir.

AVENIDO ve ark. (1988), (*Triticum aestivum* L.) buğdayın olgun embriyolarından elde ettikleri kalluslardan sürgün regenere etmişlerdir. Olgun tanelerin embriyoları scutellumlarından ayrılarak 10 μ M 2,4-D içeren LINSMAIER ve SKOOG (1965) (LS) ortamında, 25 °C’de, 12 saat fotoperiyot koşullarda kültüre alınmış ve kallus elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar MURASHIGE ve SKOOG (1962) (MS) ortamına aktarıldığında sürgün ve bitki regenere edildiğini bildirmişlerdir.

PRILYUK (1988), dört buğday türünün kallus kültürlerinden organogenesis teşvik etmiştir *Triticum persicum*, *T. timopheevii*, *T. militinae* ve *T. aestivum* buğday türlerinin in vitro’da çimlendirilmesiyle elde edilen üç yapraklı fidelerinin yaprak segmentleri eksplant olarak kullanılmıştır. 20 gr/l sakkaroz, 0,5 mg/l thiamine, 100 mg/l myo-inositol, 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınan bu eksplantlardan kallus elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar 150 mg/l asparagin, (0,5 yada 0,1) mg/l 2,4-D içeren MS regenerasyon ortamına aktararak sürgün oluşumu teşvik edilmiştir. Oluşan bu sürgünler WHITE (1963) ortamına aktararak bitkicik regenere edilmiş ve toprağa aktarılmıştır. *T. militinae*’nin dışında bütün türlerin kallus oluşturma oranları yüksek bulunmuştur. *T. persicum* ve *T. militinae*’nin kallusları 0.5 mg/l 2,4-D içeren ortama aktarıldıklarında sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. 2,4-D miktarı 0.1 mg/l’ye düşürüldüğünde ise bu oranın daha da arttığı gözlenmiştir. Bitki regenerasyonu oranı yönünden en yüksek *T. persicum* türünün bulunduğunu, *T. timopheevi* ve *T. aestivum* ’un regenerasyon oranının ise diğer türlere nazaran daha düşük bulunduğunu rapor etmiştir.

PRILYUK (1988), dört buğday türünün kallus kültürlerinden bitki regenere etmiştir. *Triticum persicum*, *T. timopheevii*, *T. militinae* ve *T. aestivum*

türlerinin tohumlarının in vitro'da çimlendirilmesiyle elde edilen fidelerin üç yapraklı dönemdeki yaprak parçalarını kültüre alarak kallus oluşturmuşlardır. Bütün genotipler 2 mg/l 2,4-D içeren agar ile katılaştırılmış MS ortamında kallus oluşturmuş, bu kalluslar ilk altkültüre alındıklarında ise sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. Serada yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantlardan oluşturulan kallusların regenerasyon yeteneklerinin, in vitro'da yetiştirilen bitki eksplantlarından oluşturulan kalluslara oranla daha yüksek bulunmuştur. Bitki regenerasyonu oranının türler arasında farklılık gösterdiğini, en yüksek sürgün oluşturma kapasitesine *T. persicum*'un sahip olduğunu, regene edilen bitkilerde morfolojik görünüm olarak kontrol bitkilerine göre farklılık bulunmadığını bildirmiştir.

RAJYALAKSHMI ve ark. (1988), (*Triticum aestivum* L.) Sonalika buğday çeşidinden elde edilen kalluslardan somatik embriyo ve bitki regenerasyonu oranına genotipin etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Sonalika buğday çeşidinin olgunlaşmamış başakçıklarını 2,4-D, kazein hidrolizat ve hindistan cevizi sütü içeren MURASHIGE ve SKOOG (1962) ortamında kültüre alarak kallus oluşumunu teşvik etmişlerdir. Oluşan bu kalluslardan önce somatik embriyo daha sonra da bitki regene edilmiştir. Somatik embriyo ve bitki regenerasyonu düşük konsantrasyonda 2,4-D içeren ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bitkicikler doğal koşullar altında toprağa aktarılmıştır. Yapılan histolojik çalışmalar sonucunda bu bitkilerin $2n=42$ normal kromozom sayısına sahip olduklarını kanıtlamışlardır. Daha önce yapılan çalışmalarda 19 buğday varyetesinin kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu oranları üzerine genotipin etkilerinin belirlendiğini ve Sonalika çeşidinin bunlarla karşılaştırıldığında bu çeşidin 12 aylık süre boyunca altkültürde muhafaza edildiğinde dahi regenerasyon yeteneğini kaybetmediğini, fakat morfogenezis

potansiyelinin azaldığını, bunun da kısa süreli altkültüre alınarak önlenenebileceğini belirtmişlerdir.

LU ve ark. (1989), farklı buğday türlerinin embriyo kültürlerinden kallus oluşumu ve bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 15 buğday türünün embriyolarını modifiye edilmiş MS ortamında kültüre almışlar ve en yüksek kallus oluşturma oranı ortalama %81.3 ile hexaploid türlerden elde edilmiştir. Bunu %76.6 ile tetraploid türler, %41.1 ile diploid türler izlemiştir. Bu türlerin regenerasyon yeteneklerinin de aynı oranda ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Kallus oluşumu ve regenerasyon oranları yönünden aynı ploidi seviyesindeki türler arasında da önemli düzeyde farklılıkların bulunduğunu, hexaploid türlerdeki bitki regenerasyonu oranlarının *T. spelta* 'da %14.3, *T. aestivum* subsp.yumnenese'de %57.5 arasında değişim gösterdiğini belirlemişlerdir.

BROWN ve ark. (1989), buğdayın (*Triticum aestivum* L.) olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen kallusların gelişimi, embriyogenesis ve organogenesis oluşumu üzerine şekerlerin, şeker alkollerinin ve PEG (Polietilen glikol)'in etkilerini araştırmışlardır. Yüksek osmotik basınca sahip ortamlarda kallus gelişiminin yavaşladığı, birim kallustan regenere olan sürgün ve bitki sayısının ortamın osmotik basıncına ve karbon kaynağına bağlı olduğunu saptamışlardır. En iyi sürgün oluşumu %3 sakkaroz konsantrasyonunda meydana gelmiştir. Ayrıca ortama %3 manitol, yada %5 polietilen glikol (PEG) ilave edildiğinde bu oranın daha da arttığı gözlenmiştir. Bunun yanısıra düşük konsantrasyondaki absisik asitin (ABA) embriyogenesisi artırdığını belirlemişlerdir. Sonuç olarak buğdayın kallus kültürlerinden bitki regenerasyonu üzerine osmotik basıncın, karbon kaynağının ve absisik asit'in önemli ölçüde etkili bulunduğunu rapor etmişlerdir.

FEKETE ve PAUK (1989), buğday kallus kültürlerinden bitki regenerasyonuna, ortama ilave edilen 2,4-D ve kinetin miktarının etkilerini

belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, GK Othalom çeşidinin kallus kültürlerinin (1-1.5) mg/l 2,4-D ve (0,5-4) mg/l kinetin içeren ortamlarda kültüre almışlardır. Bu kültürlerde en yüksek bitki regenerasyonun 1 mg/l kinetin içeren ortamda gerçekleştirildiğini, kalluslardan bitki regenerasyonu oranının ise %86 olarak belirlendiğini bildirmişlerdir.

CHAWLA (1989), buğdayın farklı dokularından alınan eksplantların kültüre alınması ile elde edilen kalluslardan bitki regenerasyonu olanaklarını belirlemek amacıyla yaptığı araştırmada, olgunlaşmamış embriyo ve kök meristemleri modifiye edilmiş MS (MURASHIGE ve SKOOG, 1962) ve B5 (GAMBORG B5, 1968) ortamları üzerinde kültüre alınmış ve her iki tip eksplanttan da embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslarda sürgün oluşum oranı %22-48 arasında bulunurken, kök meristemlerinden elde edilen kalluslarda ise sadece kök gelişimi olmuştur. Esteraz, peroksidaz ve pfosfataz asit izoenzimleri analizleri yapılmış ve kalluslardan sürgün yada kök gelişimi üzerine bazı izoenzimlerin etkili bulunduğunu rapor etmiştir.

HE ve ark. (1989), kültüre alınan olgunlaşmamış buğday (*Triticum aestivum* L.) embriyolarından embriyogenik kallus oluşum kapasitelerine makroelementlerin etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. Ortama ilave edilen (10-20 mM) NH_4NO_3 , (0-40mM) KNO_3 , (0.31-10mM) KH_2PO_4 , (0-24mM) CaCl_2 ve (0-48mM) MgSO_4 tuzlarının yüksek oranda epiblast kallus oluşumunu teşvik ettiğini, ortama ilave edilen (0-20mM) KNO_3 , (0-24mM) CaCl_2 ve (0.19-12mM) MgSO_4 tuzlarının ise yüksek oranda skutellar kallus oluşumunu teşvik ettiğini gözlemişlerdir. Epiblast ve scutellar bölgeden oluşturulan embriyogenik kallusların altkültüre alınarak çoğaltılmaları için ortamda en azından (10mM) NH_4NO_3 'ün bulunması gerektiğini kanıtlamışlardır. Sonuç olarak CaCl_2 , MgSO_4 ve KH_2PO_4 'ün epiblast kallus oluşumu için mutlak gerekli olmadığını fakat bitki

regenerasyonu için ortamda mutlaka bulunması gerektiğini, ayrıca fosfat elementinin kallustan sürgün oluşumunu teşvik ettiğini saptamışlardır. Ayrıca ortama ilave edilen 4 makroelementin beyaz kallus oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir.

GAPONENKO VE GOLUBEVA. (1989), buğdayın kallus kültürlerinin regenerasyon kapasitelerini belirlemişlerdir. Kallus elde etmek amacıyla döllenmenin gerçekleşmesinden 10 ile 14 gün sonra alınan olgunlaşmamış buğday embriyolarını kültüre almışlardır. Kültüre alındıktan 3,7,14,30,90 ve 180 gün sonra yapılan gözlemler sonucunda embriyogenik kapasiteye sahip kallusların 2 mg/l 2,4-D içeren LS (LINSMAIER ve SKOOG, 1965) ortamında elde edildiğini, bitki regenerasyonunun 2,4-D içermeyen fakat IAA içeren ortamda gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir.

ZHENG ve ark. (1989), *in vitro*'da olgunlaşmamış buğday başakçıklarından elde edilen kallus kültürlerinden regenere edilen bitkilerde meydana gelen varyasyonları belirlemeye çalışmışlardır. 11 adet kışlık buğday genotipinin olgunlaşmamış başakçıklarını 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alarak kallus oluşumunu teşvik etmişlerdir. Kültüre alınan 11 genotipten %100 oranında kallus oluşumu, %73.7-100 oranında ise bitki regenerasyonu gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. Bitki regenere edilen bütün genotiplerden sadece Dabaimang'nın fertilitesi düşük bulunmuştur. Regenere edilen bitkilerde bitki boyu, başaklanma zamanı, bayrak yaprağı, tane karakterleri, alfa-amilaz ve prolamin içerikleri yönünden varyasyonların bulunduğunu tesbit etmişlerdir.

KIM ve KIM (1989), buğday (*Triticum aestivum* L. cv. Jang Kwang) çeşidinin olgun embriyolarından oluşturulan kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurarak tek hücre kültürleri elde edilmiş ve bu hücre kültürlerinden bitki regenere edilmiştir. Ayrıca hücrelerin 10 μ M 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alındıklarında embriyogenik kallus gelişiminin olumlu yönde arttığı

saptanmıştır. Embriyogenik kallusların 10 mg/l gümüş nitrat (AgNO_3) içeren hormonsuz MS ortamına transfer edildiklerinde somatik embriyo ve sürgün oluşumunun gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

YU ve ark. (1990), buğdayın olgunlaşmamış embriyo kültürlerinden regenere edilen bitkilerde meydana gelen varyasyonları belirlemişlerdir. Chunyanghongmai x Een1 buğday çeşitlerinin çarpazlanmasıyla elde edilen bitkilerin 14 günlük olgunlaşmamış embriyolarından regenere edilen R2 bitkilerinde 8 özellik yönünden meydana gelen varyasyonlar incelenmiştir. Normal koşullarda elde edilen F2 bitkileriyle karşılaştırıldıklarında, başaklanma zamanı, bitki boyu, 5. yaprak uzunluğu, bayrak yaprak uzunluğu, başakçık/kulakçık oranı yönünden varyasyon görülmüştür. En düşük varyasyon oranına bayrak yaprak alanı, kulakçık uzunluğu ve kulakçık adedi gibi özelliklerde rastlanmıştır. İncelenen bütün özellikler yönünden karşılaştırıldığında, başaklanma zamanı yönünden F2 bitkilerinde %47.25, R2 bitkilerinde %76.70, bitki boyu yönünden F2 bitkilerinde %41.66, R2 bitkilerinde %77.32, bayrak yaprak uzunluğu yönünden F2 bitkilerinde %31.84, R2 bitkilerinde 66.98, bayrak yaprak genişliği yönünden F2 bitkilerinde %58.38, R2 bitkilerinde %55.77, kulakçık uzunluğu yönünden F2 bitkilerinde %24.37, R2 bitkilerinde 31.74, başakçık/kulakçık oranı yönünden F2 bitkilerinde %8.28, R2 bitkilerinde %43.97 oranında varyasyon bulunduğu tesbit edilmiştir.

BANNIKOVA ve BARABANOVA (1990), buğdaygillerin doku kültürlerinden elde edilen somatik embriyoların histolojik karakterlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, tahıl ve çayır-mer'a bitkilerinde kallus ve somatik embriyo oluşumuna, donör bitkinin genotipinin, eksplantın yaşının, kültür ortamının fiziksel özelliklerinin, kültür ortamına ilave edilen (2,4-D, absisik asit, amino asit ve sakkaroz) bileşiklerin konsantrasyonlarının etkili bulunduğunu saptamışlardır.

BARABANOVA ve BANNIKOVA (1990), *in vitro*'da kültüre alınan kışlık buğdayın olgun embriyolarının histolojik karakterlerini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, kültüre alınan olgun embriyolarda değişikliklerin meydana geldiğini, materyallerin kültüre alındıktan 2 gün sonra scutellum bölgesinde mitotik bölünmelerin başladığını fakat somatik embriyoların oluşmadığını, bunun yanında bazı koleoptillerin ve ikincil köklerin oluştuğunu gözlemişlerdir. Ayrıca olgun embriyolardan elde edilen kallusların regenerasyon yeteneklerinin çok düşük olduklarını tesbit etmişlerdir.

ITO VE ABE (1990), olgunlaşmamış buğday embriyolarından kallus oluşumu ve bu kalluslardan bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada 122 buğday çeşidinin 10 günlük olgunlaşmamış embriyolarının 2 mg/l 2,4-D içeren MS (MURASHIGE ve SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG B5, 1968) ve N6 (MOROCZ ve ark., 1990) ortamlarında kültüre alındığını ve bunlardan kompakt kallusların elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu kallusların regenerasyon ortamına transfer edildiklerinde en yüksek bitki regenerasyonu oranının MS ortamında meydana geldiğini ve regenerasyon oranının genotipe bağlı olarak %0 ile 87 arasında değişim gösterdiğini bildirmişlerdir.

MOHMAND ve NABORS (1990), buğdayın 3 genotipinin kültüre alınmasıyla oluşturulan kalluslardan regenere edilen bitkilerde meydana gelen varyasyonları belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, Glennson, Pavon ve PAK16171 çeşitlerinden regenere edilen bitkilerde 4 morfolojik ve agronomik karakterler yönünden meydana gelebilecek varyasyonlar incelenmiştir. Kallus kültürleri 2 mg/l 2,4-D, %2 sakkaroz ve %1 agar içeren LINSMAIER ve SKOOG (1965) ortamında elde edilmiştir. Elde edilen bu kalluslardan 0.1 mg/l IAA ve 0.5 mg/l benzilaminopurin (BAP) içeren ortamda bitki regenere edilmiştir. Sonuç olarak kalluslardan elde edilen bitkiler ile ebeveynleri arasında

bitki boyu, başak uzunluğu, başaktaki tane sayısı ve 100 tane ağırlıkları yönünden farklılıklar bulunduğunu tesbit etmişlerdir.

LHOTOVA ve KUCERA (1990), kültüre aldıkları olgunlaşmamış buğday embriyolarının embriyogenik kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu kapasitelerini belirlemeye çalışmışlardır. 5 kışlık, 4 yazlık buğday varyetesinin olgunlaşmamış embriyolarının modifiye edilmiş MS ortamında kültüre alındığını ve elde edilen bu kallusların regenerasyon ortamına aktarıldıklarında sadece 7 varyeteden somatik embriyoların ve bitkilerin regenere edilebildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca somatik embriyo oluşum oranına ortamın içeriğinin ve genotipin doğrudan etkili olduklarını bildirmişlerdir.

REDWAY ve ark. (1990), 8 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyo, başakçık ve anterlerini farklı ortamlar üzerinde kültüre alarak kallus oluşumunu teşvik etmişlerdir. En yüksek kallus oluşumu 1-1.5 mm uzunluğundaki olgunlaşmamış embriyolardan elde edilmiştir. Test edilen 12 ortamdan 11'inde olgunlaşmamış embriyoların kallus oluşum oranının yüksek bulunduğunu, bu kültürlerden hızlı gelişen beyaza yakın kompakt nodular ve beyaz kompakt olmak üzere iki tip embriyogenik kallus elde edildiğini bildirmişlerdir. Elde edilen kallusların beş ay boyunca altkültüre alınarak stabil hale getirildiğini, her iki tip kallus kültürlerinin de 19 ay boyunca embriyo oluşturma kapasitelerini koruduklarını belirlemişlerdir. Bütün embriyogenik kallusların regenerasyon ortamına aktarıldıklarında bir ay gibi kısa bir sürede çok sayıda sürgün oluşturdıklarını, anterlerden elde edilen kalluslardan ise çok daha az sayıda sürgün elde edildiğini bildirmişlerdir.

D'YACHUK ve ark. (1990), ekmeklik ve makarnalık buğday varyetelerinin somatik doku kültürlerinden kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu kapasitelerini belirlemeye çalışmışlardır. Ershovskaya 32, Saratovskaya 46 ve Saratovskaya 55 ekmeklik buğday çeşitlerinin ve

Saratovskaya 40 makarnalık buğday çeşidinin LINSMAIER ve SKOOG (1965) ortamında en iyi kallus gelişimi gösterdiklerini, yine aynı çeşidlerin Blaydes ortamında daha yüksek regenerasyon özelliği gösterdiklerini gözlemişlerdir. En yüksek embriyogenik kallus oluşum kapasitesine Saratovskaya 40 çeşidinin sahip olduğunu, bunun da genotipik farklılıktan kaynaklanmış olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu tip kalluslardan oluşan somatik embriyoların scutellumlarının yukarıya dönük bir şekilde gelişme gösterdiklerini tesbit etmişlerdir. Ekmeklik buğday çeşidlerinin regenerasyon kapasitelerinin, makarnalık buğday çeşidlerine göre daha yüksek bulunduğunu, Ershovskaya 32 çeşidinin ise bütün çeşidlerden daha yüksek regenerasyon kapasitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

CHEVRIER ve ark. (1990), buğdayın (*Triticum aestivum* L.) embriyo kültürlerinden elde edilen kallusların bitki regenerasyonu kapasitelerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, HY912 x HY320 çeşidlerinin çarpazlamasından elde edilen 28 adet F₂ dölünün olgunlaşmamış embriyolarını kültüre almışlardır. Kültürü yapılan bütün çeşidlerin embriyodan sürgün oluşumu, kallus oluşumu, embriyogenik kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu yönünden genotipler arasında önemli düzeyde farklılıklar bulunduğunu rapor etmişlerdir.

TABAEIZADEH ve ark. (1990), *Triticum aestivum* x *Leymus angustus* 'un F₁ hibritlerinin ve ebeveyn hatlarının embriyo kültürlerinden elde edilen kallusların somatik embriyo ve bitki regenerasyonu kapasitelerini belirlemişlerdir. F₁ hibritlerin ve ebeveyn hatların yaprak segmentlerinden ve olgunlaşmamış başakçıklarından elde edilen kalluslardan önce somatik embriyo daha sonra da bitki regenere etmişlerdir. Olgunlaşmamış başakçıklardan elde edilen kalluslar yapraklardan elde edilen kalluslara oranla daha yüksek oranda somatik embriyo ve bitki regenerasyonu göstermişlerdir. *L. angustus* ve *T. aestivum* 'un embriyogenik kallus oluşum kapasitesinin oldukça yüksek

bulunduğunu, kallus gelişim ortamına beş aminoasit (glutamin, prolin, asparagin, aspartik asit ve glutamik asit) ilave edildiğini fakat etkilerinin önemli bulunmadığını, regenere edilen bitkilerin morfolojik olarak ebeveyn bitkilerden farksız olduğunu kanıtlamışlardır.

GIRKO ve VOLOSHCHUK (1990), buğday hücre süspansiyon kültürlerinin hücre artışlarını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, biri hibrit olmak üzere üç buğday varyetesinin çeşitli eksplantlarından kallus oluşturmuşlardır. Bu kallusları modifiye edilmiş MS ortamında kültüre alarak hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlar ve yüksek oranda hücre artışının meydana geldiğini saptamışlardır. Sonuç olarak hücre artışının ortamın hacimine bağlı olarak artan miktarda değiştiğini, ayrıca her 7-14 günde bir hücre süspansiyon kültürü ortamının yenilenmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

ILCHEVA ve ZAGORSKA (1991), buğdayın (*Triticum aestivum* L.) doku kültürlerinden elde edilen kalluslardan bitki regene etmişlerdir. Yapılan çalışmada kallus oluşumuna, oluşan kallusun tipine, morfogenezis, organogenezis, embriyogenezis oluşumuna, bu doku ve organlarda meydana gelen somaklonal varyasyonlara, bitkinin genotipinin, eksplantın alındığı bölgenin, kültür ortamı içeriğinin ve ortama ilave edilen hormonların doğrudan etkili olduklarını ileri sürmüşlerdir.

MOHMAND ve NABORS (1991), (*Triticum aestivum* L.) buğdayın olgunlaşmamış embriyolarından kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu oranının artırılmasına yönelik yeni metodların geliştirilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, Glenson çeşidinden elde edilen kalluslardan bitki regenere edebilmek için sıvı ortamda kağıt filitre köprüsü üzerinde kültüre alındığını ve regenerasyon kapasitelerinin agarlı ortama göre daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

CHOWDHURY ve ark. (1991), yaygın olarak ekimi yapılan ticari buğday çeşidlerinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen kallusların bitki

regenerasyonu kapasitelerine genotipten kaynaklanan varyasyonları belirlemeye çalışmışlardır. 1986-87 yıllarında, doğu, batı ve merkez olarak belirlenen üç ayrı bölgeden toplam 102 yerel çeşid toplamışlardır. Döllenmenin gerçekleşmesinden 14 gün sonra alınan olgunlaşmamış embriyolar karyopsislerinden ayrılarak 0,22 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. Batı bölgesinden alınan çeşidlerin ortalama kallus oluşturma oranı yönünden %75.5, bitki regenerasyonu yönünden %65.8 ve çeşidlerin kültür ortamlarına tepkisi yönünden %50.0'lık değerlerle en iyi sonucu verdiğini, merkez bölgeden alınan çeşidlerin başaklanma zamanının geç olması nedeniyle kallus oluşumunun (%60.7)'lik değerle düşük bulunduğunu bildirmişlerdir.

WHELAN ve SCHAALJE (1992), kışlık buğdayın vernalizasyon isteğinin kallus döneminde karşılanması amacıyla yaptıkları çalışmada, olgunlaşmamış embriyo kültürlerinden elde edilen kalluslar vernalize edilmişlerdir. Tohumlar 6 °C'de 12 saat fotoperiyot koşullarda 8 hafta süre ile bekletilmiş ve 20 °C'de 8 saat karanlık- 18 saat aydınlık koşullara alınmışlardır. Bu tohumlar yaklaşık 42 gün sonra başak oluşturmuşlardır. Embriyogenik kalluslar ise 6 °C'de 8-12 hafta süre ile vernalize edilmiştir. Bu kalluslardan regenere edilen bitkiler toprağa aktarıldıktan 8-9 hafta sonra başak oluşturmuşlardır. Sonuç olarak kışlık buğdayın vernalizasyon isteğinin kallus döneminde de karşılanabileceğini bildirmişlerdir.

CHOWDHURY ve VASIL (1994), buğdayın (*Triticum aestivum* L.) olgunlaşmamış embriyo kültürlerinden regenere edilen bitkilerde moleküler analizler yapmışlardır. Florida 302, Chris, Pavon, RH770019 buğday çeşidlerinin olgunlaşmamış embriyolarından oluşturulan embriyogenik kalluslarından regenere edilen bitkilerin total DNA'ları ile, 6 mısır mitokondrial geni (atpA, atp6, atp9, coxI, coxII, rrn18, rrn5), 3 buğday mitokondrial klonu (K, K3, X2), 5 pearl millet mitokondrial klonu (4A9, 4D1, 4D12, 4E1, 4E11), buğdayın çok sık

kullanılan (PTA71) problemleri in vitro'da moleküler varyasyonların belirlenmesi için materyal olarak kullanılmıştır. Buna ilave olarak Florida 302 çeşidinin protoplastlarından elde edilen bitkiler ile 24 aylık embriyogenik olan ve embriyogenik olmayan kalluslar ve hücre süspansiyon kültürleri analiz edilmiştir. Buğday ve millet'in mitokondrial klonlarında varyasyona rastlanmamıştır. Mısırın üç mitokondrial geni ile (coxI, rrn8-rrn5, atp6) embriyogenik olmayan hücre süspansiyon kültürleri arasında kalitatif varyasyonlar ortaya çıkmıştır.

2.2. Protoplast İzolasyonu İle İlgili Yapılan Çalışmalar

KARP ve ark. (1987), buğdayın (*Triticum aestivum* L.) hücre süspansiyon kültürlerinde ve bu kültürlerden izole edilen protoplastlarda sitolojik çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada incelenen bütün hatlarda yapısal ve sayısal kromozom değişikliklerine rastlamışlardır. Kromozom sayısı yönünden en çok $2n=32$ kromozom sayısı tesbit edilmiştir. Hücre süspansiyon kültürleri ve protoplast kültürleri sırasında normalde $2n=6x=42$ kromozoma sahip hexaploid buğdayın kromozom kayıplarına uğradığı tesbit edilmiştir. Kromozom sayısı değişikliklerinin yanında kromozom segmentlerinde ve kollarında da kayıplara rastlanmıştır. Bu durumun hexaploid buğdaydan izole edilen protoplastlardan bitki regenerasyonun etkilenebileceğini bildirmişlerdir.

KIM ve LEE (1987), (*Triticum aestivum* L.) buğday ve (*Hordeum bulbosum* L.) arpadan protoplast izolasyonu ve fuzyonu amacıyla yaptıkları çalışmada, buğday ve arpa yapraklarından alınan mezofil dokuları 0.7 M mannitol içeren solusyonda 2 saat süre ile bekletilmiş, daha sonra %3 cellulase, %0.8 maserozyme ve %0.03 pectolyase (pH 5.8) enzim solusyonunda 4 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu çalışmada buğday ve arpanın mezofil dokularından elde edilen protoplastların fuzyonu için %30 ve %40'lık polietilen glikol (PEG)

solusyonunun uygun olduğunu, fuzyon için protoplast yoğunluğunun $2,5 \times 10^5/\text{ml}$ olması gerektiğini bildirmişlerdir.

PEMOV ve DMITRIEVA (1988), buğday yaprağının farklı bölgelerinden alınan mezofil dokularından izole edilen protoplastların verimi üzerine yaptıkları çalışmada, Zarya buğday varyetesinin 7 günlük fide yapraklarının mezofil dokularından protoplast izole ederek optimum enzim konsantrasyonunu belirlemişlerdir. İzole edilen protoplastlarda ozmotik basınç ayarlayıcı olarak mannitol kullanılmıştır. Sonuç olarak en uygun protoplastların yaprağın merkez ve uç bölgelerinden alınan mezofil dokularından izole edildiğini belirtmişlerdir.

WATANABE ve ark. (1988), buğday fide yapraklarından izole edilen mezofil protoplastlarında oksijenli fotosentez sistemine D genomunun etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları bu çalışmada, protoplast kültürü tekniği ile hücre seviyesinde oksijenli fotosenteze *Aegilops squarrosa*'nın D genomunun etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Test edilen diploid, tetraploid ve hexaploid türlerde oksijenli fotosentezin ve klorofilin kloroplast sayısına bağlı olarak değiştiğini, aynı zamanda ploidi seviyesiyle de aralarında bir orantı olduğunu tesbit etmişlerdir.

BATYRGOZHIN (1988), buğday hücre süspansiyon kültürlerinden morfogenezis teşvik etmiştir. Tselinnaya 21 buğday varyetesinin olgunlaşmamış embriyoları 1 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l kinetin içeren MURASHIGE ve SKOOG (1962) ortamında kültüre alınarak kallus elde edilmiştir. Ortamın 2,4-D konsantrasyonu daha sonra 5 mg/l'ye kadar arttırılmıştır. Hücre süspansiyon kültürleri oluşturmak için kalluslar aynı konsantrasyonda hazırlanan sıvı MS ortamında 7 gün ara ile altkültüre alınmış ve bu kültürlerden tek hücreler elde edilmiştir. Optimum hücre konsantrasyonunun 150.000 ile 200.000 hücre/ml olarak bulunmuştur. Hücre

süspansiyon kültürleri agregat oluşturmaya başladıklarında, bölünmenin en yüksek olduğu zamanda, yaklaşık iki haftada bir altkültüre alınmıştır. Süspansiyon kültürü hücrelerinin 50 mg/l miyo-inositol, 16 gr/l sakkaroz, 4.5 mg/l kinetin ve 1.5 mg/l IAA içeren 1/2 MS katı ortamında, 16 saat ışık, 8 saat karanlık koşullarda kültüre alındığında yeşil sürgünlerin regenere edildiğini rapor etmiştir.

HARRIS ve ark. (1988), buğdayın embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlardan bitki regenerasyonu amacıyla yaptıkları çalışmada, Chris buğday çeşidinin embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastların sıvı ortamda ve karanlık koşullarda kültüre alındığını, bunlardan bir kısmının mikrokallus oluşturduğunu bir kısmının da globular embriyoya dönüştüğünü gözlemişlerdir. Globular embriyoların katı ortama transfer edildikten sonra bitkicik oluşturdıklarını ve bunların steril koşullarda toprağa transfer edildiklerini bildirmişlerdir.

HAYASHI ve SHIMAMOTO. (1988), Chinese yazlık buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen embriyogenik kalluslarından ve ayrıca olgunlaşmamış embriyolarından doğrudan protoplast izole etmişlerdir. 3-4 haftalık embriyogenik kalluslardan izole edilen protoplastların kültüre alındıktan 3-5 gün içinde %2 oranında koloni oluşturdıklarını, fakat olgunlaşmamış embriyolardan doğrudan izole edilen protoplastların %0.1'den daha düşük oranda koloni oluşturdıklarını gözlemişlerdir. Aynı zamanda kalluslardan izole edilen protoplastlardan oluşan kolonilerin embriyogenik kapasitelerinin daha yüksek olduğunu, fakat sonuçta köklerin ve albino sürgünlerin regenere edildiğini bildirmişlerdir.

NIKIFOROVA ve BASHARKINA (1988), *Triticum timophei*'nin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlar ve bu hücrelerden protoplast izole etmişlerdir. İzole edilen

protoplastları KAO (1975) ortamında kültüre almışlar ve 2 gün sonra hücre duvarı oluşumunun, 6 gün sonra da bölünmenin başladığını gözlemişlerdir. Bir ay sonra elde edilen mikrokalluslar agar ile katılaştırılmış MURASHIGE ve SKOOG (1962) ortamına aktarılmıştır. Sonuç olarak buğdayda uygulanan protoplast-bitki sistemin ileride yapılabilecek somatik hibridizasyon çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

WATANABE ve NISHIKAWA (1989), *Triticum* ve *Avena* türlerinin mezofil protoplastlarının fotosentez oranlarını belirlemişlerdir. Protoplastlarda oksijen ölçümü sırasında hücre büyüklüğünün fotosentez oranına olan etkisinden ve ploidy seviyesinin etkisinden yararlanmışlardır. *Triticum* ve *Avena* türlerinin hem diploid ve tetraploid döllere sahip olması aynı zamanda tetraploid ve hexaploid türlere sahip olmasından dolayı kullanıldıklarını belirtmişlerdir. Poliploid türlerin diploid türlere oranla daha büyük protoplastlara sahip olduklarını, her protoplastın oksijen kullanım oranının ploidi seviyesindeki artış ile doğru orantılı olduğunu, fakat protoplastların büyüklükleri ile ters orantılı olduğunu kanıtlamışlardır. Hexaploidlerde olduğu gibi gelişmiş varyetelerin protoplastlarının ilkel varyeteler oranla daha yüksek fotosentez oranına sahip olduklarını bildirmişlerdir.

REN ve ark. (1989), (*Triticum aestivum* L. cv Gan-Mai 8) buğday çeşidinin olgulaşmamış başakçıklarını kültüre alarak elde ettikleri kalluslardan protoplast izolasyonu, kültürü ve bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. En yüksek protoplast verimi 7-10 günlük hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilmiş, izole edilen protoplastlar N6 (MOROCZ ve ark., 1990) ortamında kültüre alınmış ve 2 hafta sonra %20 ile 50 arasında değişen oranda hücre kolonisi oluşturmuşlardır. Protokalluslar 1-2 mm büyüklüğe ulaştıklarında %3 sakkaroz, 1000mg/l kazein hidrolizat ve %0.2 aktif karbon içeren N6 ortamına transfer edilmişler ve embriyoid oluşturmuşlardır. Bunun yanında (1) 2 mg/l

kinetin, 0.5 mg/l BAP, 0.1 mg/l 2,4-D ve (2) 1 mg/l kinetin, 0.5 mg/l BAP, 0.1 mg/l 2,4-D ortamlarında embriyoid oluşumunun arttığını, kalluslardan oluşan embriyoidlerin yaklaşık %20-30'unun bitkicik oluşturduğunu bildirmişlerdir.

REDWAY ve ark. (1990), embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinin özelliklerinin belirlemek ve bu kültürlerden bitki regene edebilmek amacıyla yaptıkları çalışmada, FLA302 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyo kültürlerinden kompakt ve kırılğan olmak üzere iki tip embriyogenik kallus elde edilmiş ve hücre süspansiyon kültürleri bu kalluslardan kurulmuştur. 5-8 aylık altkültürler sırasında kalluslar stabil hale getirilmiş ve bu hücrelerin küçük ve sıkı stoplazmik yapıda olduklarını belirtmişlerdir. Embriyogenik süspansiyon kültürlerinden elde edilen kompakt ve nodular kallusların IAA ve zeatin içeren regenerasyon ortamına aktarıldıklarında farklı yapıda somatik embriyo oluşturduklarını ve bunlardan 200 tane bitki regene edildiğini bildirmişlerdir.

VASIL ve ark. (1990), buğdayın (*Triticum aestivum* L.) olgunlaşmamış embriyolarından oluşturdukları kompakt kalluslardan embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlar ve izole ettikleri protoplastlardan da bitki regene etmişlerdir. Protoplast izolasyonunda %1 cellulasu onozuka RS, %1 pectinase, %0.1 pectolyase içeren enzim solusyonu kullanmışlardır. Hızlı gelişen, kırılğan fakat embriyogenik olmayan kalluslardan kurulan hücre süspansiyon kültürlerinden izole ettikleri protoplastlardan bitki regene edilememiştir. Bunun yanında embriyogenik hücre hatlarından izole edilen protoplastlar KAO ve MICHAYLUK, (1975) (KM) ve MURASHIGE ve SKOOG, (1962) (MS) ortamlarında kültüre alınmış ve kaplama etkinlikleri yaklaşık %20'den fazla bulunmuştur. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlar regenerasyon ortamına aktarıldıklarında somatik embriyo ve sürgün oluşturmuşlardır. Elde edilen bitkiciklerin aktif karbon içeren (ve içermeyen) MS

ve 1/2MS ortamına aktarılan morfolojik olarak normal görünümlü bitkilerin elde edildiğini ve bunların başarılı bir şekilde toprağa aktarıldığını bildirmişlerdir.

SUN ve ark. (1990), buğdaydan (*Triticum aestivum* L.) izole ettikleri protoplastlardan bitki regenere etmişlerdir. Xu Zhou 211 buğday çeşidinin hücre süspansiyon kültürlerinden izole ettikleri protoplastları %0.8 agaroz içeren, modifiye edilmiş MS ortamında kültüre almışlar ve oluşan mikrokalluslardan da bitki regenere etmişlerdir. Mikrokolonilerin kültüre alındıktan iki hafta sonra düşük osmotik basınçlı ortamda bekletildiğini, mikrokallus oluşturdıklarında ortamın sakkaroz konsantrasyonunun düşürülerek regenerasyon artışının hızlandırıldığını, ayrıca sürgün oluşumu için ortama yüksek konsantrasyonda sitokinin ilave edildiğini bildirmişlerdir.

YANG ve ark. (1991), (*Triticum aestivum* L. cv. Hartog) Avustralya buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen embriyogenik kallusların sıvı ortamlarda kültüre alınarak 2-8 mm çapında hücrelerden oluşan hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlardır. Bu hücre süspansiyon kültürleri 20 ay boyunca embriyogenesis kapasitelerini korumuşlardır. Kallusların düşük konsantrasyonlarda 2,4-D içeren ortamda kültüre alınması embriyogenik hücre kümelerinin seçimini kolaylaştırmış, 1 yıllık hücre süspansiyon kültürleri ise regenerasyon ortamına aktarıldıklarında %37 oranında embriyoid, daha sonra da bitkicik oluşturmuşlardır. 5 µM 2,4-D içeren altkültür ortamına gümüş nitrat (AgNO_3) ilave edilerek kallusların embriyo oluşturma oranları arttırılmıştır. Farklı buğday çeşidlerinden elde edilen embriyogenik kallusların sıvı kültür ortamlarında embriyogenik kapasitelerini muhafaza etmelerinin genotipe bağlı olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada uygun hücre süspansiyon kültürleri Hartog buğday çeşidinin hızlı gelişen, küçük agregatlara sahip hücrelerinden oluşturulmuştur. Hücre süspansiyon kültürlerinde yapılan sitolojik çalışmalar sonucunda, hücrelerin ($2n=42$) kromozoma sahip oldukları, regenerasyon

ortamına transfer edilen hücrelerin hem yumuşak hem de sert kalluslar oluşturdukları, bunlardan da embriyoidlerin ve bitkiciklerin regenere edildiklerini belirtmişlerdir. Aynı zamanda bu hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlardan morfolojik olarak normal kök ve sürgüne sahip yeşil bitkilerin elde edildiğini rapor etmişlerdir.

YANG ve ark. (1991), protoplast izolasyonunda negatif basınç (vakum) uygulamasının protoplast verimliliğine olan etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, Mangbai buğday çeşidinin enzim-hücre solusyonuna 30-180 dakika süre ile 7-700 mm Hg negatif basınç uygulamış ve protoplast veriminin 2-3 kat arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak negatif basınç uygulamasının, kullanılacak enzim konsantrasyonunu azalttığını fakat bunun yanında protoplast canlılığını ve bölünmesini olumsuz yönde etkilediğini belirtmişlerdir.

CHANG ve ark. (1991), buğdayın (*Triticum aestivum* L.) hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonu, kültürü ve bitki regenerasyonunu başarmışlardır. Buğdayın olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen hızlı gelişen ve kırılgan kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlardır. Hızlı gelişen, küçük stoplazmik hücrelerden oluşan bu kültürler düşük regenerasyon yeteneğine sahip bulunmuştur. 1 ml hücre hacimi (% PCV) hücre süspansiyon kültürü hücreden $2-3 \times 10^7$ protoplast izole etmişlerdir. Protoplastlar sıvı ve agaroz ile katılaştırılmış KM8p (modifiye edilmiş KAO ve MICHAYLUK, 1975) ortamında kültüre almışlar ve %20-50 oranında bölünme meydana geldiğini saptamışlardır. Bölünen protoplastların %0.21'inin mikrokallus oluşturduğunu, bu mikrokalluslardan sadece 68 bitki regenere edildiğini ancak 30 tanesinin toprağa aktarılabildiğini rapor etmişlerdir.

CHANG ve ark. (1991), (*Triticum aestivum* L. cv. Mustang) buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen kalluslardan embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlar ve izole edilen protoplastlara gen transferi

yapılarak bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kırılgan ve hızlı gelişen kallus kültürlerinden kurulan hücre süspansiyon kültürlerinin regenerasyon yetenekleri düşük bulunmuştur. Enzim solusyonunda inkübe edilen hücrelerden yüksek oranda protoplast izole edilmiş ve bu protoplastlar sıvı ve agaroz ile katılaştırılmış KM8p ortamında kültüre alınmıştır. Protoplastların bölünme oranları %20-50 arasında olmuştur. Bölünen protoplastların mikrokallus oluşturma oranı %0.21 bulunmuş, bu mikrokalluslardan daha sonra fertil bitkiler regenere edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada izole edilen protoplastlara polietilenglikol (PEG) vasıtasıyla DHFR geni kodlanmış plazmid DNA (pSOG19)'lar aktarılmış, elde edilen koloniler 1 mg/l methotrexate içeren ortamda kültüre alınarak selekte edilmiştir. Mikrokalluslar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda transformasyon oranının %0.2 oranında gerçekleştiğini, plazmid DNA'nın buğday genomuna stabil olarak integre olduğunun PCR ve Southern analizlerle ispatlandığını bildirmişlerdir.

RAKOSY-TICAN ve ark. (1991), elektrofüzyon ürünü protoplastların canlılıklarının korunması için yeni metodlar geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, buğdayın mezofil protoplastları ile *Fescuta arundinacea*'nın hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastların elektrofüzyon ürünlerini, elektrik şoku uygulamasından hemen sonra alginate çözeltisine gömerek canlılıklarının korunmalarının sağlandığını bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda, alginate çözeltisinin diffüzyon yoluyla protoplastlara giriş yaptığını ve protoplastları hareketsiz hale getirerek mekanik şoka karşı dayanıklılık sağladığını, ayrıca bu metodun diğer metodlardan daha kolay ve uygun olduğunu kanıtlamışlardır.

PAUK ve SZARKA (1991), Buğdaydan protoplast izolasyonu, kültürü ve bitki regenerasyonu amacıyla yaptıkları araştırmada, olgunlaşmamış embriyo ve başakçıkları kültüre alınmış ve sonuçta farklı hücre hatları elde edilmiştir. Uzun

süre altkültüre alınan hücre süspansiyon kültürlerine farklı enzim solusyonları uygulanarak protoplast izole edilmiştir. %1 cellulase onozuka RS, %0.5 pectinase, %0.1 pectolyase içeren enzim solusyonunda en yüksek oranda protoplast izole edilmiştir. İzole edilen protoplastlar modifiye edilmiş, sıvı ve agaroz ile katılaştırılmış KM ortamında kültüre alınmış ve %5-10 oranında hücre bölünmesi meydana gelmiştir. farklı tipteki hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlar regenerasyon ortamına transfer edilmiş ve sonuçta yeşil kalluslar ve somatik embriyo benzeri yapılar oluşturmuşlardır. Yapraklardan, olgunlaşmamış embriyo ve başakçıklardan doğrudan izole edilen protoplastlar ise farklı ortamlarda kültüre alındıkları halde hücre bölünmesinin meydana gelmediğini belirtmişlerdir.

QIAO ve ark. (1991), hekzaploid buğdaylarda embriyogenik kallus, hücre süspansiyon kültürü ve protoplast sistemlerinin kurulması amacıyla yaptıkları bu çalışmada, ekmeklik buğdayın olgunlaşmamış embriyolarını hormon ilave edilmiş MS ortamında kültüre alarak kallus oluşumunu teşvik etmişlerdir. Hızlı gelişen, kırılğan hücre hatları agarla katılaştırılmış ortamlar üzerinde yapılan altkültürler sırasında seleksiyon yapılmıştır. Seleksiyon yapılan çabuk dağılabilir, yarı kırılğan embriyogenik kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurulmuştur. Sonuçta hücre süspansiyon kültürü hücrelerinin altkültürler sırasında regenerasyon yeteneklerini koruduklarını ve bu hücrelerden izole edilen protoplastların veriminin oldukça yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir. Protoplast izolasyonunun %1 cellulase onozuka RS, %0.1 pectolyase içeren enzim solusyonunda gerçekleştirildiğini belirtmişlerdir.

VASIL ve VASIL (1992), tahıllardan protoplast izolasyonun avantajlarını belirten bir rapor sunmuşlardır. 1986 yılından bugüne kadar buğday, çeltik, mısır, arpa, çayır-mer'a ve şeker kamışı gibi önemli tahıl türlerinin protoplastlarından bitki regenerasyonunun gerçekleştirildiğini ve birçok

agronomik karakterler yönünden transgenik bitkilerin, somatik hibrit ve sibritlerin elde edildiğini belirtmişlerdir. Son 10 yılda tahıllarda genetik manipulasyonların başlaması yönünde önemli aşamalar kaydedildiğini, bunların en önemlilerinin embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden protoplastların izole edilmesi ve bu protoplastlara direk DNA transferlerinin yapılabilmesi olduğunu bildirmişlerdir.

HE ve ark. (1992) (*Triticum aestivum* L. cv. Hartog) Avurturalya buğday çeşidinden izole ettikleri protoplastlardan morfolojik olarak normal görünümlü bitkiler regenerere etmişlerdir. İzole edilen protoplastlar 1/2 MS makroelement, 5 μ M 2,4-D ve 0.6 M glikoz içeren ortamda kültüre alınmış ve %0.1 ile %5 arasında değişen sıklıkta koloni oluşturmuşlardır. Kolonilerden bitki regenerasyonu oranı %1 ile %25 arasında değişmiş ve morfolojik olarak normal görünümlü sürgün ve kök oluşturan 80 bitki toprağa aktarılmıştır. Yapılan araştırmada sitolojik çalışmaların tesadüfen seçilmiş birkaç bitkiden alınan örneklerden yapıldığını ve bunların $2n=6x=42$ kromozom sayısına sahip olduklarını kanıtlamışlardır.

LI ve ark. (1992), (*Triticum aestivum* L. cv. Kehong) buğday çeşidinin embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole ettikleri protoplastlardan somatik embriyolar regenerere etmişlerdir. Olgunlaşmamış başakçıklardan elde edilen embriyogenik kalluslar 2 mg/l 2,4-D içeren sıvı ortamda kültüre alarak embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlardır. Birkaç kez altkültürü yapılan hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izole edilmiş ve kültüre alınmıştır. Kültüre alınan protoplastların bölünme oranları %11-16 arasında bulunmuş, bitki regenerasyonu oranı ise (regenerere olan bitki sayısının toplam protoplast sayısına bölünmesiyle elde edilmiş) %0.001 olarak tesbit edilmiştir. Ayrıca protoplastlardan elde edilen mikrokolonilerin regenerasyon ortamında

kültüre alındıktan 15 gün sonra %20 oranında somatik embriyo oluşturdıklarını tesbit etmişlerdir.

DZHARDEMALIEV ve ark. (1992), hekzaploid buğdayın (*Triticum aestivum* L.) hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastların bölünme kapasitelerini saptamışlardır. Olgunlaşmamış buğday embriyolarından ve anterlerden oluşturdıkları kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurarak protoplast izole etmişlerdir. Protoplast izolasyonunu %2 cellulase onozuka RS, %0.5 driselase içeren enzim solusyonunda gerçekleştirmişlerdir. Protoplastların verim ve canlılıkları üzerine hücre süspansiyon kültürü ortamı içeriğinin ve ozmotik basınç ayarlayıcılarının konsantrasyonlarının önemli ölçüde etkili olduğunu belirtmişlerdir. İzole edilen protoplastlar B5 ortamında kültüre alındığında bölünme oranının yaklaşık %41 olduğunu, 7-8 hafta sonra oluşan mikrokolonilerin agarlı ortam üzerine transfer edildiklerinde ise embriyoların meydana geldiğini gözlemişlerdir. Protoplast bölünmesine kültür ortamının, protoplast izole edilen bitki materyalinin ve genotipin önemli ölçüde etkili olduğunu kanıtlamışlardır.

QIAO ve ark. (1992), hexaploid buğdayların (*Triticum aestivum* L.) embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlardan bitki regenere etmişlerdir. Oderzo buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını kültüre alarak kırılğan, hızlı gelişen, yüksek regenerasyon yeteneğine sahip kalluslar elde etmişlerdir. Çok kırılğan kallus hatlarından kurulan ve 30 ile 1000 μ m çapında bulunan hücre süspansiyon kültür hücreleri hormonsuz MS ortamında kültüre almışlar ve 10 aylık bir sürede yeşil bitkiler regenere etmişlerdir. Hücre süspansiyon kültürü ortamlarına ilave edilen organik maddeler hücre gelişimini olumlu yönde etkilemiştir. Ayrıca 7-8 günlük hücre süspansiyon kültürü hücrelerinden protoplast izole etmişler ve protoplast verimini $4-6 \times 10^6$ protoplast/gr bulmuşlardır. İzole edilen protoplastlar sıvı ve katı (agaroza

gömölerek) ortamlarda kültüre alınmış ve ilk bölünme kültüre alındıktan sonra 5. günde görülmüştür. 14 gün sonra oluşan kolonilerin kaplama etkinliği %2-8 arasında bulunmuştur. Protoplastlardan elde ettikleri kallusları 1mg/l IAA ve 0.5 mg/l zeatin içeren ortamlarda kültüre almışlar ve yeni süspansiyon kültürleri oluşturmak için kullanmışlardır. Hormonsuz 0.1 mg/l GA3 içeren (veya içermeyen) MS ortamında kültüre alınan kalluslardan 2 ay içinde normal kök ve sürgüne sahip bitkilerin regenere edildiğini ve bunların steril koşullarda toprağa aktarıldığını bildirmişlerdir.

AHMED ve SAGI (1993), (*Triticum aestivum* L.) buğdayın embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlardan fertil bitkiler regenere etmişlerdir. G.K.Sagvari buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde ettikleri kırılğan, hızlı gelişen, embriyogenik kalluslarından embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlar ve bu kültürlerden protoplast izole etmişlerdir. Farklı sıvı ve agaroz içeren katı ortamlarda kültüre aldıkları protoplastlardan en yüksek protokallus oranının KM8p (KAO ve MICHAYLUK, 1975) ve GM (LI ve MURAI, 1990) ortamları ile normal kallus gelişme ortamı olan MS üzerinde oluştuğunu gözlemişlerdir. Protokallusların MS regenerasyon ortamına transfer edildikten sonra yeşil sürgün ve bitkiciklerin elde edildiğini, bu bitkiciklerin daha sonra hormonsuz MS (MURASHIGE ve SKOOG, 1962) yada N6 (MOROCZ ve ark., 1990) ortamlarında köklendirildiğini bildirmişlerdir. Protokalluslardan morfogenezinin yaklaşık 4 ay sürdüğünü ve regenere edilen 1000 bitkiden yaklaşık 500 tanesinin sera koşullarında toprağa aktarıldığını, bu bitkilerin %93'ünün $2n=6x=42$ normal kromozom sayısına sahip ve fertil olduklarını tesbit etmişlerdir.

YANG ve ark. (1993), D6962 buğday çeşidinin embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole ettikleri protoplastlardan bitki regenere etmişlerdir. 30 aylık embriyogenik kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri

kurulmuş ve bu hücrelerden protoplast izole edilmiştir. Protoplast verimi 3.0×10^7 protoplast/gr hücre olarak bulunmuştur. İzole edilen protoplastlar 5 μ M 2,4-D, 0.6 M glukoz içeren 1/2 MS ortamında kültüre alınmış, bölünme oranı % 1.4 ile 10 arasında bulunmuştur. Oluşan mikrokalluslar katı ortama transfer edilerek yeşil bitkicikler regenere edilmiştir.

SIMMONDS ve GRAINGER (1993), *Triticum aestivum* L. buğday protoplast kültürlerine antibiyotiklerin toksik etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. Fundela buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde ettikleri kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurmuşlar ve bu hücrelerden yüksek verimli $2.5-5 \times 10^4$ protoplast/gr fakat düşük kaplama etkinliğine sahip protoplastlar izole edilmiştir. Bu durumun ortama ilave edilen antibiyotiklerin fitotoksik etkisinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Aminoglycoside grubu antibiyotiklerden, hygromycin, G418, bekanamycin ve kanamycin'in 15 μ g/ml miktarının buğday hücrelerinin gelişimini %50 oranında engelleyerek toksik etkide bulunduklarını, bunun yanında en az toksik etkiye sahip antibiyotiklerin ise vancomycin, spectinomycin ve cefotaxime olduklarını belirlemişlerdir. Protoplast izolasyonu ve kültürlerinde iyi sonuç alınamayan türlerde ise Vancomycin antibiyotiğinin 1000-2000 μ g/ml miktarının hücre bölünmesini ve kaplama etkinliğini önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir.

WATANABE (1993), *Lolium perenne* ve *L. multiflorum* türlerinin fide yapraklarından izole edilen mezofil protoplastlarında fotosentez sisteminde meydana gelen varyasyonları belirlemiştir. Küçük çaplı mezofil protoplastlarının fotosentez oranı (P_N) yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda *L. rigidum* ve *L. sublatum* türlerinin fotosentez oranları da (P_N) yüksek bulunmuş ve bunun *L. perenne* ve *L. multiflorum* türlerine göre her yapraktaki fotosentez alanının, klorofil oranının ve klorofil içeriğinin fazla oluşundan kaynaklandığını ileri sürmüştür.

YANG ve ark. (1994), buğday hücre süspansiyon kültürleri sırasında oluşan hücre agregatlarının protoplast izolasyonu ve kültürüne olan etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. *Triticum aestivum*'un Hartog ve Timmo çeşidleri ile *T. durum*'un D6962 çeşidinin hücre süspansiyon kültürlerinin 2,5 yıl süre ile altkültüre alındığını, bu hücre süspansiyon kültürlerinde (1-3mm) çapında hücre kümelerinin oluştuğunu bildirmişlerdir. Hücre kümelerinin çaplarına göre ayrılarak gelişme oranları, embriyogenik potansiyelleri ve protoplast kültürüne olan etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 310 μm 'den küçük çaplı hücrelerin gelişme oranları yüksek fakat embriyogenik kapasiteleri 310-2000 μm çapına sahip hücrelere oranla düşük bulunmuştur. En iyi sonuçların 1100 μm çapındaki hücrelerden alındığını, en yüksek protoplast veriminin bu büyüklükteki hücrelerden elde edildiğini, farklı büyüklükteki hücre agregatlarından izole edilen protoplastların bölünme ve regenerasyon oranları yönünden aynı performansı gösterdiklerini bildirmişlerdir.

PAUK ve ark. (1994), (*Triticum aestivum* L. cv. Aura) buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından embriyogenik kallus oluşturmuşlardır. Bu kalluslardan kurdukları hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izole etmişler, bu protoplastlardan da yeşil, fertil bitkiler regenerere etmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca genotipin regenerasyon oranına olan etkisini belirleyebilmek için protoplast kültürü ortamı ve şartları da dikkate alınmıştır. Kültür ortamının etkisinin yanında, hücre ağırlığı artışı ve farklı genotiplerden elde edilen kallusların regenerasyon yetenekleri de test edilmiştir. Protoplast izolasyonu amacıyla kurulan embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinde, ortama ilave edilen organik maddelerin yanında ortamdaki hücre miktarı ile sıvı kültür ortamının hacmi arasında olumlu bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca hücre bölünmesine kültür ortamının içeriğinin yanında genotipin de etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Aura çeşidi için saptanan protoplast kültür ortamında

yaklaşık % 9 oranında hücre bölünmesi tesbit edilmiştir. Protoplastlardan elde edilen mikrokoloniler regenerasyon ortamına transfer edildiklerinde somatik embriyo ve fertil yeşil bitkiler regenere edilmiştir. Yapılan birçok deneme sonucunda Aura çeşidinin protoplast kültürlerinden bitki regenere edilebildiğini ve hücre süspansiyon kültürlerinin 9 ay boyunca regenerasyon yeteneklerini koruduklarını bildirmişlerdir.



3. MATERYAL VE METOD

Araştırma 1991-96 yılları arasında ÇÜ. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü ile KSÜ. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünde yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Araştırmada bitki materyali olarak Seri 82, Panda, Shafir, Gemini ve Çukurova 86 buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidlerinin olgun ve döllendikten yaklaşık 15 gün sonra alınan olgunlaşmamış embriyoları kullanılmıştır. Embriyogenik kallus elde etmek amacıyla kültüre alınan bu çeşidlerden, Seri 82 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen embriyogenik kallusları, hücre süspansiyon kültürlerinin kurulmasında ve protoplast izolasyonunda materyal olarak kullanılmıştır.

Yaprak mezofil dokularından protoplast izolasyonunda Seri 82 buğday çeşidinin tohumlarının *in vitro*'da çimlendirilmesiyle elde edilen bitkiciklerin yaprakları materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Olgunlaşmamış Buğday Embriyolarının Kültürü ve Kallusların Elde Edilmesi

Anter kavuzlarının başaktaki tane kavuzları üzerinde görüldükleri zaman döllenmenin gerçekleştiği gün olarak kabul edilmiş ve döllenmenin gerçekleşmesinden yaklaşık 15 gün sonra alınan olgunlaşmamış buğday embriyoları kavuzlarından soyularak %70'lik etil alkol içerisinde 60 saniye bekletildikten sonra %15'lik ticari sodyum hipoklorit (NaOCl) solusyonu içerisinde 15 dakika bekletilmiş ve daha sonra üç kez steril destile su ile yıkanmıştır. Daha sonra olgunlaşmamış buğday taneleri petri kutuları içerisindeki

steril kurutma kağıtları üzerinde bir süre kurutularak kültüre alınmaya hazır hale getirilmiştir. Bu şekilde sterilizasyon işlemi tamamlanmış olan olgunlaşmamış buğday tanelerinin embriyoları steril koşullarda bir pens ve bistüri yardımıyla sadece tohum kabuğu ile bağlantısı kalacak şekilde kesildikten sonra değişik konsantrasyonlarda (1mg/l, 2mg/l, 3mg/l, 5mg/l) diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) içeren modifiye edilmiş MS (MURASHIGE ve SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG B5, 1968), LS (LINSMAIER ve SKOOG, 1965) ve N6 (MOROCZ ve ark., 1990) ortamlarında, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de ve karanlık koşullara sahip iklim odalarında, içlerinde 25'er ml ortam bulunan 100x25 mm'lik petri kutularında, her petri kutusuna 5 adet buğday tanesi olmak üzere ve tanelerin karın çizgileri ortam yüzeyi ile temas edecek şekilde yerleştirilerek kültüre alınmıştır. Ortamlara %3 sakkaroz ve %0.75 agar (Sigma A-9915) ilave edilmiştir. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra olgunlaşmamış buğday tanelerinin kallus oluşum oranı tesbit edilmiştir. Olgunlaşmamış buğday embriyolarının % kallus oluşum oranı, her petri kutusundaki kallus oluşturan tanelerin petri kutusundaki toplam tane sayısına oranlanıp 100 ile çarpılmasıyla elde edilmiştir. Buğday taneleri üzerinde olgunlaşmamış embriyolardan gelişen embriyogenik kalluslar, bir pens yardımıyla tanelerden ayrılarak 2 mg/l 2,4-D + 100 mg/l kazein hidrolizat + 500 mg/l glutamin içeren MS ortamında (pH 5.7) altkültüre alınmıştır. Kalluslar sürekli olarak $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de, karanlık koşullarda muhafaza edilmiş ve her ay aynı ortam üzerinde altkültüre alınmışlardır.

3.2.2. Olgun Buğday Embriyolarının Kültürü ve Kallusların Elde Edilmesi

Olgun buğday taneleri %70'lik etil alkol içerisinde 2 dakika bekletildikten sonra %25'lik ticari sodyum hipoklorit (NaOCl) solusyonu içerisinde 25 dakika bekletilmiş ve daha sonra üç kez steril destile su ile

yıkanmıştır. Bu şekilde yüzeysel sterilizasyonu yapılan buğday taneleri steril su içerisinde oda sıcaklığında 10 saat süreyle şişirilmeye bırakılmıştır. Şişirilmiş taneler petri kutuları içerisindeki steril kurutma kağıtları üzerinde bir süre kurutulmuştur. Bu şekilde hazırlanan taneler, steril koşullarda bir pens ve bistüri yardımıyla sadece tohum kabuğu ile taneye bağlantısı kalacak şekilde kesildikten sonra değişik konsantrasyonlarda (1mg/l, 3mg/l, 5mg/l, 8mg/l) diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) içeren modifiye edilmiş MS, B5, LS ve N6 ortamlarında, 25 ± 1 °C'de karanlık koşullara sahip iklim odalarında, içlerinde 25'er ml ortam bulunan 100x25 mm'lik petri kutularında, her petri kutusuna 5 adet buğday tanesi olmak üzere, tanelerin karın çizgileri ortam yüzeyi ile temas edecek şekilde yerleştirilerek kültüre alınmıştır. Ortamlara %3 sakkaroz ve %0.75 agar (Sigma A-9915)) ilave edilmiştir. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra olgun buğday tanelerinden kallus oluşum oranları tesbit edilmiştir. Olgun buğday embriyolarının % kallus oluşum oranı, her petri kutusundaki kallus oluşturan tanelerin petri kutusundaki toplam tane sayısına oranlanıp 100 ile çarpılmasıyla elde edilmiştir. Buğday tanelerindeki olgun embriyolardan gelişen kalluslar, bir pens yardımıyla tanelerden ayrılarak 2 mg/l 2,4-D + 100 mg/l kazein hidrolizat + 500 mg/l glutamin içeren MS ortamında (pH 5.7) altkültüre alınmıştır. Kalluslar sürekli olarak 25 ± 1 °C'de, karanlık koşullarda muhafaza edilmiş ve her ay aynı ortam üzerinde altkültüre alınmışlardır. Her iki tip embriyoların kültüre alındıkları ortamlar, içerdikleri kimyasallar ve kullanılan miktarları Ek.1'de verilmiştir.

3.2.3. Buğday Nişastası Ortamının Hazırlanması

Olgunlaşmamış ve olgun buğday embriyolarından kallus eldesi ve kallus ağırlığı artışı sağlamak için farklı organik maddeler (patates ekstraktı, buğday nişastası, kazein hidrolizat, glutamin, asparigin) içeren ortamlarda kültüre

alınmışlardır. MS5 olarak isimlendirilen buğday nişastası ortamında katılaştırıcı olarak agar kullanılmamış, buğday nişastasının katılaştırıcı özelliğinden yararlanılmıştır.

Hazırlanan sıvı MS5 ortamına %7 oranında buğday nişastası (Başak Tük. ve Gıda San. A.Ş.) ilave edilerek yaklaşık 10 dakika süre ile karıştırılmış ve pH'sı 5.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra 1 dakika süre ile mikrodalga fırında (1500W) bekletilmiştir. Bu işlem 20 saniye süre ile 3 kez tekrar edilip ortam jelatinimsi bir görünüm aldıktan sonra 120 °C'de 1 atm basınç altında 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

3.2.4. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması

Seri 82 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen beyaza yakın renkte, kırılgan ve hızlı gelişen embriyogenik kalluslar 7-8 ay boyunca altkültüre alınarak stabil hale getirilmiş ve hücre süspansiyon kültürlerinin kurulmasında bitki materyali olarak kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen embriyogenik kalluslar farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda organik maddeler içeren sıvı MS ortamında, içerisine 30 ml ortam bulunan 100 ml'lik erlenler içerisinde kültüre alınmıştır. Bu şekilde hazırlanan hücre süspansiyon kültürleri karanlık koşullarda, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, 150 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde inkübe edilmiştir. Kültürler haftada bir 10 ml hücre süspansiyon kültürü + 20 ml sıvı kültür ortamı olacak şekilde altkültüre alınmıştır. Bu şekilde altkültüre alınan hücre süspansiyon kültürlerinde hücrelerin agregatlaşmasını önlemek için 6-8 haftada bir 500 μm por genişliğine sahip filitreden geçirilmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerinin 3, 5, 7 ve 9. günlerinde alınan 5 ml'lik hücre süspansiyonları, 250xg'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre hacim artışları (%HHA) belirlenmiştir.

3.2.5. Hücre Süspansiyon Kültürlerinden Protoplast İzolasyonu

Hücre süspansiyon kültürlerinin 3, 5 ve 7. günlerinde alınan hücre örnekleri 100x25 mm'lik petri kutularına 1/10 (hücre/enzim solusyonu) oranında olacak şekilde 20 ml enzim solusyonu 2 gr hücre süspansiyon kültürü koyulmuştur. Petri kutuları parafilm ile kapatıldıktan sonra 50 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde, 27°C'de, 6 saat süre ile inkübe edilmiştir. Enzim solusyonu içerisinde inkübe edilen hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini, gerçekleşti ise hangi oranda gerçekleştiğini takip etmek için 3, 4, 5 ve 6. saatlerde örnekler alınmıştır. 6 saat süre ile inkübe edildikten sonra izole edilen protoplastlardan enzim solusyonunu ve hücre artıklarını uzaklaştırmak için protoplast-enzim solusyonu 30 µm por genişliğine sahip filtrelerden geçirilmiştir. Filtreden geçen protoplast-enzim solusyonu bir streil pipet yardımıyla her tüpe 2 ml olacak şekilde steril santrifuj tüplerine aktararak 800 rpm'de 3-4 dakika santrifuj edilmiştir. Santrifujden sonra protoplastlar santrifuj tüpünün dibinde toplanmışlardır. Tüpün üst kısmındaki sıvı kısım alındıktan sonra santrifuj tüpünün dibinde toplanan protoplast pelleti 3ml yıkama solusyonu (7mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0.7mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 3mM MES ve 0.6M mannitol) ile yavaşça sulandırılarak tekrar 800 rpm'de 3 dakika santrifuj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edildikten sonra santrifuj tüpünün dibinde toplanan protoplast pelleti 1 ml protoplast kültür ortamı (MS + 0.6 M glikoz + 600 mg/l MES) ile sulandırılmış ve hemositometre kullanarak 1 ml'de kaç tane protoplast olduğu saptanmıştır. Daha sonra protoplast yoğunlukları 0.5×10^6 ve 1.0×10^6 protoplast/ml olacak şekilde ayarlanarak 0.6 M glikoz + (0.5-1.0 mg/l) 2.4-D + 600 mg/l MES içeren katı ve sıvı MS ve B5 ortamlarında kültüre alınmıştır. Hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonunda kullanılan enzim solusyonları ve içerdikleri kimyasallar Ek.2 ve Ek.3'de verilmiştir.

3.2.6. Hücre Süspansiyon Kültürlerinden İzole Edilen Protoplastların Kültüre Alınması

İzolasyonu yapılarak yoğunlukları 0.5×10^6 ve 1.0×10^6 protoplast/ml olacak şekilde ayarlanmış olan protoplastlar, A)sıvı, B)%0.3 agaroz, C)%0.6 agaroz, D)%1.2 agaroz + (0.5ve1.0) mg/l 2,4-D + 0.6 M glukoz + 600 mg/l MES içeren MS ve B5 ortamlarında kültüre alınarak karanlık koşullarda, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Protoplastları kültüre almada kullanılan ortamlara katılaştırıcı olarak Agaroz (Seaplaque) kullanılmıştır. Protoplastlar 50x15 mm'lik petri kutularının tabanını kaplayacak şekilde (2 ml kültür ortamı) kültüre alınarak, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de karanlık koşullarda inkübe edilmişlerdir. Protoplastlar kültüre alındıktan iki gün sonra ve bunu takip eden her iki günde bir bölünen protoplastlar sayılarak değerlendirilmiştir. Katı kültür ortamları kurudukça ortam üzerine sıvı ortam (MS+0.6 M glukoz+600 mg/l MES) ilave edilmiştir. Yaklaşık 2 hafta sonra oluşan mikrokoloniler sayılarak % kaplama etkinliği saptanmıştır. Katı ortamlarda kültüre alınan protoplastlardan gelişen mikrokallusların gelişimini hızlandırmak için katı ortam baklava dilimleri şeklinde kesilerek içinde 2 ml sıvı ortam bulunduran yeni petrilere aktarılmıştır. Petrilere etrafı parafilm ile kapatılarak karanlık koşullarda, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ koşullara sahip iklim odalarında inkübe edilmişlerdir.

3.2.7. Hücre Süspansiyon Kültürlerinden İzole Edilen Protoplastlardan Bitki Regenerasyonu

Hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlarından elde edilen mikrokalluslar bitki regenerasyonu için farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) (0.1-0.5 mg/l), indol-3 asetik asit (IAA) (0.1 mg/l), benzil amino purin (BAP) (1.0 mg/l), kinetin (1.0

mg/l) ve naftelen asetik asit (NAA) (0.1 mg/l) içeren MS ortamına aktarılmışlardır. Her petri kutusuna yaklaşık 16 kallus parçası koyulmuş ve inkübasyon süresi sonunda bu kallus parçaları üzerinde oluşan bitkicikler sayılarak bitki regenerasyonu oranı tesbit edilmiştir. Kültürler $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de yaklaşık 4 hafta süre ile karanlık koşullarda inkübe edildikten sonra, 16 saat ışık - 8 saat karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. İlk kültüre alındıktan yaklaşık 14-16 hafta sonra oluşan yeşil embriyoidler, 16-20 hafta sonra da 0.5-1.0 cm'lik sürgün oluşturmuşlardır. Oluşan bu sürgünler hormonsuz MS ortamına aktararak hem sürgünlerin gelişmeleri hemde köklenmeleri teşvik edilmiştir.

3.2.8. Yaprak Mezofil Protoplastlarının İzolasyonu

Buğday yapraklarından mezofil protoplastlarının izole edilmesi amacıyla *in vitro*'da 3-4 yapraklı genç fideler elde etmek için Seri 82 buğday çeşidinin tohumları %70'lik etil alkol içerisinde 2 dakika bekletildikten sonra %25'lik ticari sodyum hipoklorit (NaOCl) solusyonu içerisinde 25 dakika bekletilmiş ve üç kez steril destile su ile yıkanmıştır. Daha sonra buğday taneleri petri kutuları içerisindeki steril kurutma kağıtları üzerinde kurutularak kültüre alınmaya hazır hale getirilmiştir. Bu şekilde sterilizasyon işlemi tamamlanmış olan buğday taneleri %3 sakkaroz içeren MS ortamında (pH 5.7), $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de, 16 saat ışık, 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odalarında, içlerinde 10'ar ml ortam bulunan, 150x20 mm'lik cam tüplerde, her tüpe 1-2 adet buğday tanesi olmak üzere yerleştirilerek kültüre alınmıştır. Kullanılan kültür ortamı %0.75 agar (Sigma A-9915) ile katılaştırılmıştır. Kültüre alındıktan 7-10 gün sonra oluşan genç fidelerin yaprakları protoplast izolasyonunda materyal olarak kullanılmıştır. Elde edilen bitkiciklerin yaprakları steril keskin bir bistüri ile enine ince şeritler halinde (1-2 mm kalınlığında) kesilerek içerisinde soğuk steril edilmiş (W) enzim solusyonu (bakınız Ek.4) bulunan steril bir tüpe koyulmuştur. Bu tüp içerisinde

3-4 dakika vakum edilerek enzimlerin doku ve hücreler arasına girişi sağlandıktan sonra, yaprak parçaları enzim solusyonu ile birlikte 50x15 mm'lik steril petri kutularına aktarılmıştır. Petri kutuları parafilm ile kapatılarak $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 1500 lüks ışık altında 5-7 saat süre ile inkübe edilmiştir. İzole edilen protoplastlardan enzim solusyonu ve bitki kalıntılarını uzaklaştırmak için protoplast enzim solusyonu önce 1 mm'lik daha sonra 100 μm por genişliğine sahip filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçen protoplast-enzim solusyonu bir steril pipet yardımıyla her tüpe 2 ml olacak şekilde steril santrifuj tüplerine aktararak 700 rpm'de 7 dakika santrifuj edilmiştir. Santrifujden sonra sağlam protoplastlar santrifuj tüpünün dibinde toplanmışlardır. Tüpün üst kısmındaki sıvı kısım alındıktan sonra santrifuj tüpünün dibinde toplanan protoplast pelleti yıkama solusyonu (0.5M sorbitol + 1mM CaCl_2 pH 5.5) ile yavaşça sulandırılarak tekrar 700 rpm'de 7 dakika santrifuj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edildikten sonra santrifuj tüpünün dibinde toplanan protoplast pelleti 1 ml protoplast kültür ortamı ile sulandırılmış ve hemositometre kullanarak 1 ml'de kaç tane protoplast olduğu saptanmıştır. Daha sonra protoplast yoğunlukları 0.5×10^5 ve 1.0×10^5 protoplast/ml olacak şekilde kültüre alınmıştır.

3.2.9. Yaprak Mezofil Dokularından İzole Edilen Protoplastların Kültürü

İzolasyonu yapılarak yoğunlukları 0.5×10^4 ve 1.0×10^4 protoplast/ml olacak şekilde ayarlanmış olan mezofil protoplastları, A)sıvı, B)%0.3 agaroz, C)%0.6 agaroz, D)%1.2 agaroz + (0.5ve1.0) mg/l 2,4-D + 0.5 M sorbitol içeren MS ve B5 ortamlarında kültüre alınarak $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Protoplastları kültüre almada kullanılan ortamlara katılaştırıcı olarak Agaroz (Seaplaque) kullanılmıştır. Protoplastlar 50x15 mm'lik petri kutularının tabanını kaplayacak şekilde (2 ml kültür ortamı)

ve katı damlalar şeklinde kültüre alınmışlardır. Protoplastlar kültüre alındıktan iki gün sonra ve bunu takip eden her iki günde bir gözlemlenerek hücre duvarı oluşumu ve hücre bölünmeleri tesbit edilmeye çalışılmıştır. Kültür ortamlarının kurummasını önlemek için her 3 günde bir sıvı ortam ilave edilmiştir.

Araştırmada kullanılan tüm ortamlar (enzimler hariç) 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Enzimler ise 0.22µm por genişliğine sahip filtrelerden geçirilerek soğuk sterilizasyona tabi tutulmuştur.

3.2.10. Hücre Süspansiyon Kültürü Hücrelerinde ve Regenere Edilen Bitkilerde Kromozom Sayımı

3.2.10.1. Feulgen Boyama Solusyonunun Hazırlanması

Kromozom boyamada kullanılan feulgen solusyonu, 1 gr fuchsin (Pulver, Merck's 4041) üzerine 200 ml kaynamış destile su yavaşça dökülerek karıştırılmıştır. Bu şekilde 50 °C'ye kadar soğuması beklenmiştir. Bu sıcaklıkta sıvıya 20ml 1N HCl ilave edilmiş ve filtre kağıdında süzölmüştür. Daha sonra 2gr Potasyum metabisülfid ilave edilmiştir ve 4°C'de bir gece bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözeltiye 0.5 gr aktif karbon ilave edilip bir süre karıştırıldıktan sonra kağıt filtre ile süzölmüştür. Bu şekilde renksiz bir hale gelen feulgen solusyonu +4 °C'de kullanılmak üzere depolanmıştır. Kromozom boyamasında kullanılan feulgen solusyonunun içerdiği kimyasallar ve kullanıldıkları miktarlar Ek.6'da verilmiştir.

3.2.10.2. Hücre Süspansiyon Kültürü Hücrelerinde Kromozom Boyaması

Hücre süspansiyonu altkültürünün 5. gününde alınan yaklaşık 50 ml hücre süspansiyonu 500 rpm'de 2 dakika süre ile santrifuj edilmiş ve üstteki süspansiyon ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücre süspansiyon kültürü hücrelerine

monobromonaftalin'in sudaki doymuş çözeltisinden (100 ml destile su + 3-4 damla monobromonaftalin) hücre hacimi miktarında ilave edilmiştir. Hücreler bu çözelti içerisinde +4 °C'de 1 gece süre ile bekletilmiştir. Bu süre sonunda santrifuj edilerek 3 kez destile su ile yıkanmıştır. Daha sonra hücre hacimi miktarında 3 hacim etil alkol (%96) + 1 hacim glasiel asetik asit solusyonu ilave edilmiş ve +4 °C'de bir gece süre ile fikse edilmiştir. Fikse edilen hücreler santrifuj edilerek üç kez destile su ile yıkandıktan sonra hücre hacimi miktarında 1N HCl (hidroklorik asit) ilave edilmiş ve 60 °C'de 12 dakika süre ile hidroliz edilmiştir. Hidrolize edilen hücreler santrifuj edilerek 3 kez destile su ile yıkanmış ve ELÇİ, (1994)'e göre hazırlanan feulgen solusyonu içerisinde, oda sıcaklığında 1 saat süre ile bekletilerek boyanmaları sağlanmıştır. Boyama işleminden sonra hücreler santrifuj edilerek 3 kez destile su ile yıkanmış ve 10 dakika destile suda bekletilmiştir. Daha sonra bu hücrelerden preparatlar hazırlanarak kromozom sayımları yapılmıştır. Preparat hazırlamada ortam sıvısı olarak %45'lik asetik asit kullanılmıştır.

3.2.10.3. Protoplastlardan Regenere Edilen Bitkilerde Kromozom Sayımı

Hücre süspansiyon kültürü hücrelerinden izole edilen protoplastlardan regenere edilen bitkilerin yaklaşık 1 cm uzunluğundaki kökleri kromozom sayımlarında kullanılmıştır. Kökler monobromonaftalin'in sudaki doymuş çözeltisi bulunan küçük tüplere konmuş ve bu çözelti içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler içerisindeki çözelti boşaltılarak 3 kez destile su ile yıkanmıştır. Daha sonra 3 hacim etil alkol (%96) + 1 hacim glasiel asetik asit solusyonuna konulmuş ve +4 °C'de 1 gece bekletilerek fikse edilmiştir. Fikse edilen kök uçları 3 kez destile su ile yıkandıktan sonra 1 N HCl içerisinde 60 °C'de 12 dakika süre ile hidroliz edilmiş ve 3 kez destile su ile

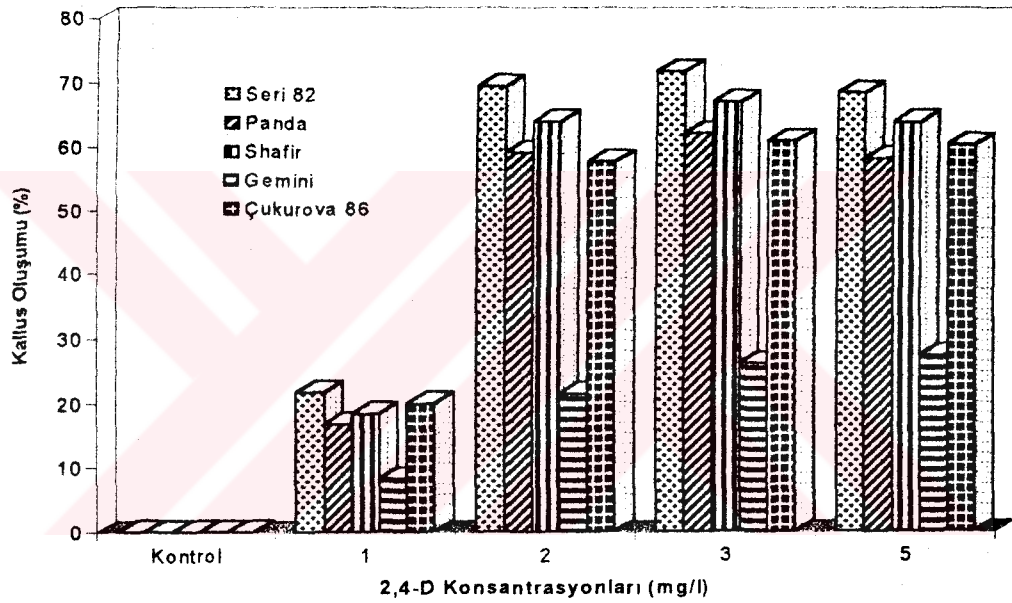
yıkanmıştır. Yıkanan kök uçları, ELÇİ (1994)'e göre hazırlanan feulgen solusyonunda, oda sıcaklığında, 1 saat süre bekletilerek boyanmaları sağlanmıştır. Boyama işleminden sonra kök uçları 10 dakika süre ile destile suda bekletilmiş ve ezme yöntemine göre preparatlar hazırlanmıştır. Preparatların hazırlanmasında ortam sıvısı olarak %45'lik asetik asit kullanılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Olgunlaşmamış Buğday Embriyolarının Kültürü ve Kallusların Elde Edilmesi

Embriyoları henüz olgunlaşmamış beş hexaploid buğday çeşidinin taneleri (Resim 1) embriyogenik kalluslar elde etmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS ortamlarında kültüre alınmış ve kallus oluşum oranları ile ilgili sonuçlar Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1.Değişik konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranları

Şekil 1’e göre 2,4-D ilave edilmeyen kontrol olarak alınan MS ortamında kallus oluşumu meydana gelmezken, diğer ortamlarda ortama ilave edilen 2,4-D miktarlarına göre farklı oranlarda kallus oluşumu meydana gelmiştir (Resim 2). Kültüre alınan buğday çeşidlerinin kallus oluşturma oranları %8.2 ile %71.8 oranında değişim göstermiştir. Kültüre alınan bütün çeşidlerde en yüksek kallus oluşumu 3.0 mg/l 2,4-D içeren ortamda %71.8 ile Seri 82, %67.1 ile Şafir,

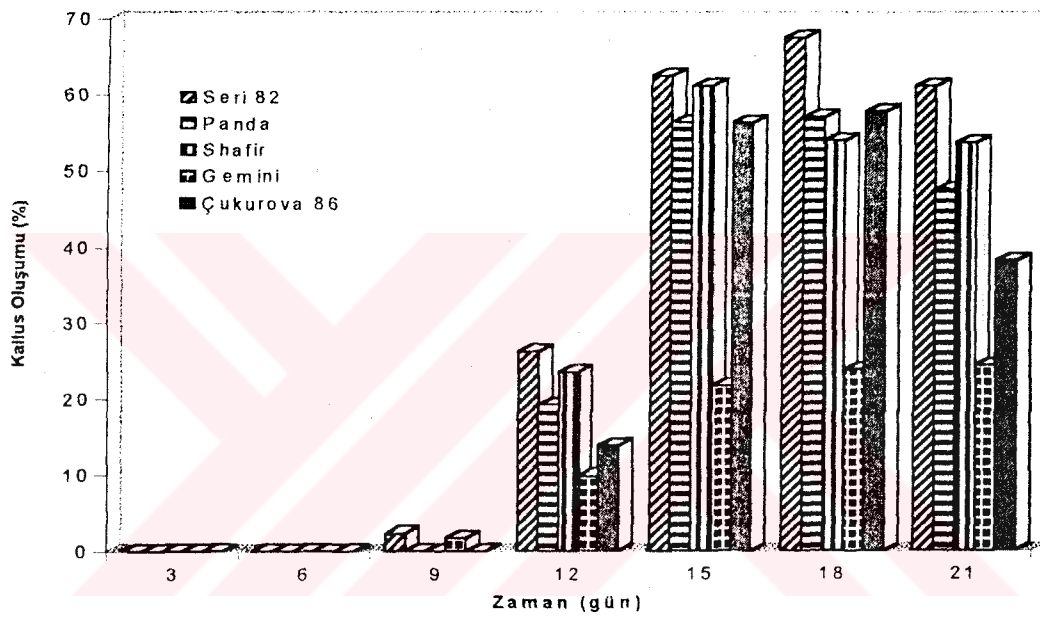
%62.2 ile Panda, %61.0 ile Çukurova 86 ve %26.2 ile Gemini çeşidlerinde meydana gelmiştir. Ortalama kallus oluşum oranı %54 olarak bulunmuştur. Gözlem yapılan süre içinde kallus oluşturmeyen taneler aynı ortamlar üzerinde tekrar kültüre alındıkları halde herhangi bir kallus oluşumuna rastlanmamıştır.

Özellikle 2,4-D konsantrasyonunun düşük olduğu ortamlarda bazı embriyolar sürgün oluşturmuşlardır. 2,4-D konsantrasyonu arttıkça bu oran azalmıştır. Bu sonuçlara göre 2 mg/l 2,4-D içeren ortam ile 3 mg/l 2,4-D içeren ortamlar arasında kallus oluşum oranları yönünden önemli bir farklılık bulunmadığından, kallusların altkültüre alındıkları ortamlarda 2.0 mg/l 2,4-D konsantrasyonları kullanılmıştır.



Resim 1. Embriyogenik kallus oluşturmak üzere kültüre alınan olgunlaşmamış buğday taneleri

Embriyogenik kallus elde etmek amacıyla kültüre alınan olgunlaşmamış buğday embriyolarının döllenmenin gerçekleşmesinden sonraki kültüre alındıkları gün, embriyogenik kallus oluşumunda önemli bir kriterdir. Bu nedenle döllenmenin gerçekleşmesinden itibaren 3, 6, 9, 12, 15, 18 ve 21. günlerde alınan 5 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyoları 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşumu oranları ile ilgili sonuçlar Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2. Döllenmenin gerçekleşmesinden sonraki farklı zamanlarda kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranları (%)

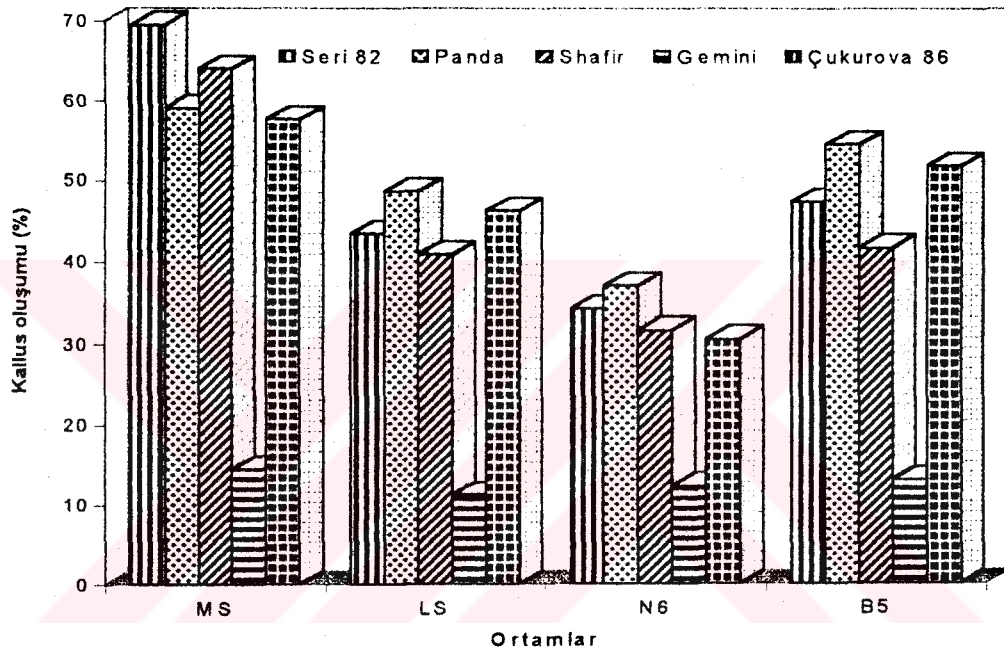
Şekil 2’ye göre, 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında, döllenmenin gerçekleşmesinden sonraki farklı zamanlarda kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının, kültüre alındıktan dört hafta sonra yapılan gözlemler sonucunda kallus oluşum oranları % 1.7 ile % 67.5 arasında değişim göstermiştir. Buna göre Seri 82 ve Gemini çeşidlerinin döllendikten sonraki 9. günde, Panda, Shafir ve Çukurova 86 çeşidlerinin ise döllendikten sonraki 12.

günde kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşturmaya başladıkları tesbit edilmiştir. En yüksek kallus oluşumu döllendikten sonraki 18. günde kültüre alınan Seri 82 (%67.5) ve Çukurova 86 (%57.8) çeşidleri ile 15. günde kültüre alınan Shafir (%61.2) çeşidinde rastlanmıştır. Genel olarak bütün çeşidlerde en yüksek kallus oluşumu döllenmeden sonraki 15. ve 18. günlerde kültüre alınan embriyolarda meydana gelmiştir. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra taneler üzerinde embriyolardan oluşan kalluslar, tanelerden ayrılarak kültüre alınmışlardır (Resim 3.). Kallus oluşturmeyan embriyolar yine aynı ortamlarda kültüre alındıkları halde herhangi bir kallus oluşumu gözlenmemiş, zaman içerisinde kahverengileşerek canlılıklarını kaybetmişlerdir.



Resim 2. Modifiye edilmiş farklı ortamlarda kültüre alınan olgunlaşmamış buğday embriyolarında kallus oluşumu

Döllenmenin gerçekleşmesinden yaklaşık 15 gün sonra alınan beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranları üzerine farklı ortamların etkisini belirleyebilmek amacıyla 2 mg/l 2,4-D içeren MS, B5, LS ve N6 ortamları (bakınız Ek.1.) üzerinde kültüre alınmıştır. Dört farklı ortam üzerinde kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranlarına ilişkin sonuçlar Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. MS, LS, N6 ve B5 ortamları üzerinde, döllenmenin gerçekleşmesinden yaklaşık 14-18 gün sonra kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranları (%)

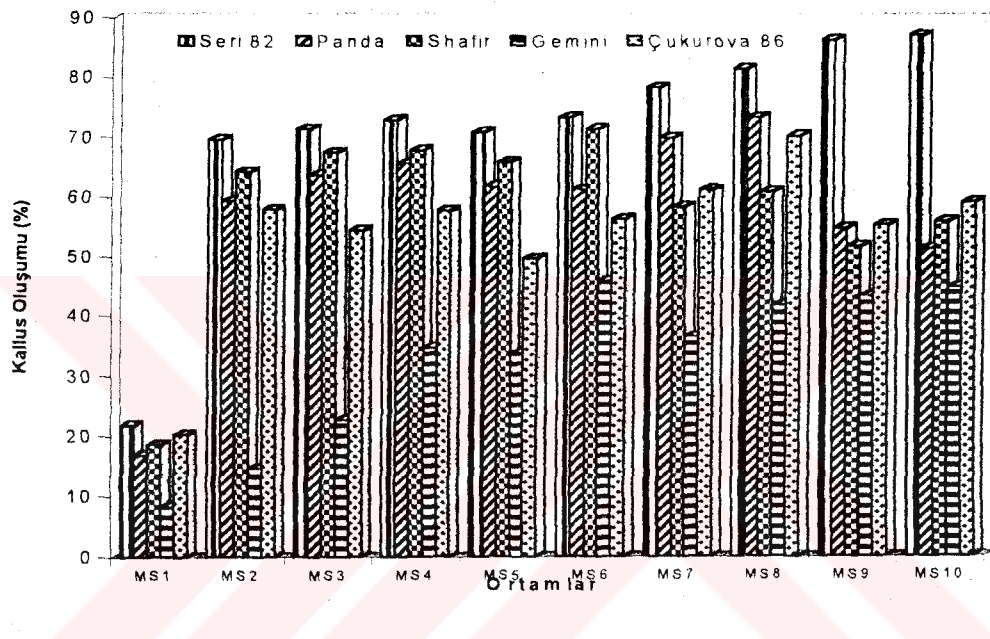
Beş buğday çeşidi, 2mg/l 2,4-D içeren MS, LS, N6, B5 ortamları üzerinde kültüre alınmış ve 4 hafta sonra yapılan gözlemler sonucunda tesbit edilen kallus oluşum oranlarına ilişkin sonuçlar Şekil 3'te verilmiştir. Çeşidlerin kültüre alındıkları bütün ortamlarda kallus oluşum oranları %11.2 ile %69.5 arasında değişim göstermiştir. Dört farklı ortam üzerinde de kallus oluşumu

meydana gelmiş fakat en yüksek kallus oluşumu MS ortamında olmuştur. Bunu sırasıyla B5, LS ve N6 ortamları izlemiştir. En yüksek kallus oluşumu MS ortamında %69.5 ile Seri 82, %64.0 ile Shafir, %59.1 ile Panda, %57.7 ile Çukurova 86 ve %14.5 ile Gemini çeşidlerinde gözlenmiştir. Kültüre alınan beş çeşidin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranına, ortama ilave edilen 2,4-D miktarının yanında kültüre alındıkları ortamın makro ve mikro element konsantrasyonlarının da etkili olduğu sonucuna varılmıştır.



Resim 3. Olgunlaşmamış buğday embriyolarından oluşan kallusların tanelerden ayrılarak kültüre alınmaları

Beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranlarına, kültüre alındıkları ortamlara ilave edilen organik maddelerin (patates ekstraktı, buğday nişastası, kazein hidrolizat, glutamin, asparagin) etkilerini belirlemek amacıyla, modifiye edilmiş MS (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS9 ve MS10) ortamlarında kültüre alınmış ve kallus oluşum oranlarına ilişkin sonuçlar Şekil 4'te verilmiştir.

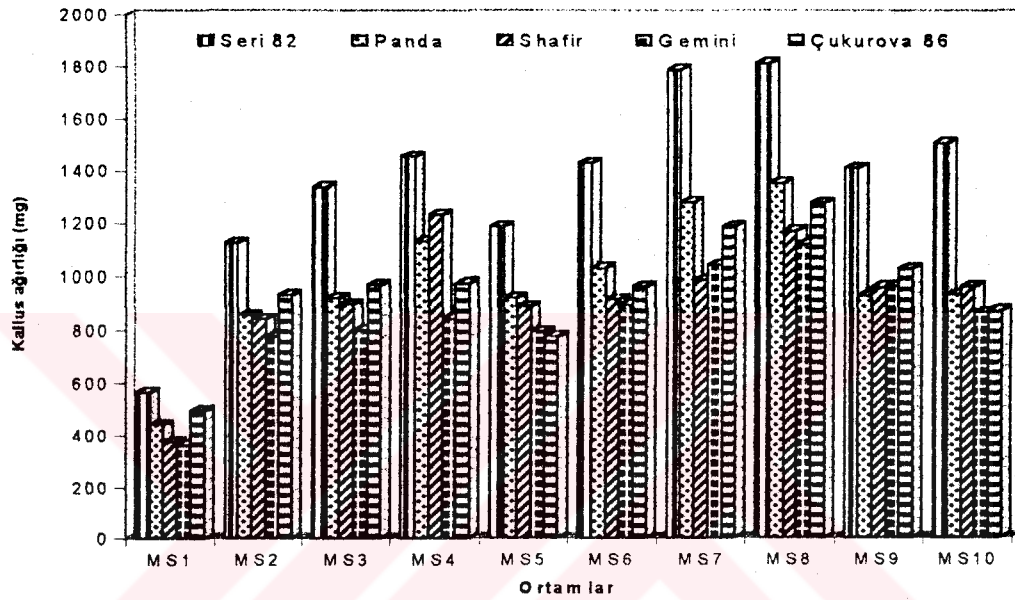


Şekil 4. Modifiye Edilmiş MS ortamları üzerinde, döllenmenin gerçekleşmesinden yaklaşık 15 gün sonra kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranları (%)

MS1= MS + 1mg/l 2,4-D. **MS2**= MS + 2mg/l 2,4-D. **MS3**=MS + 2mg/l 2,4-D + %5 patates ekstraktı. **MS4**=MS (çift konsantrasyon) + 2mg/l 2,4-D. **MS5**= MS + 2mg/l 2,4-D+%7 buğday nişastası (agar yok). **MS6**= MS+2mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat. **MS7**= MS + 2mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat + 500mg/l glutamin. **MS8**= MS (çift konsantrasyon) + 2mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat + 500mg/l glutamin. **MS9**=MS + 2mg/l 2,4-D + 150mg/l asparajin. **MS10**= MS (çift konsantrasyon) + 2mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat + 150mg/l asparajin

Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D (1mg/l - 2mg/l) ve organik maddeler (%5 patates ekstraktı, %7 buğday nişastası, 100 mg/l kazein hidrolizat, 500 mg/l glutamin, 150 mg/l asparagin) içeren modifiye edilmiş MS (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS9 ve MS10) ortamlarında, döllenmenin gerçekleşmesinden yaklaşık 15 gün sonra kültüre alınan 5 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşum oranlarının %8.2 ile %87.1 arasında değişim gösterdiği Şekil 4'te görülmektedir. Kültüre alınan çeşitlerden Seri 82 (%86.3) Panda (% 73.2), Shafir (60.8) ve Çukurova 86 (%70.2) çeşitleri MS (çift konsantrasyon) + 2 mg/l 2,4-D+100 mg/l kazein hidrolizat+500mg/l glutamin içeren MS8 ortamında yüksek oranda kallus oluşturmuşlardır. Bunun yanında Gemini (%44.7) çeşidi ise MS (çift konsantrasyon) + 2mg/l 2,4-D+100mg/l kazein hidrolizat+150mg/l asparagin içeren MS10 ortamında yüksek oranda kallus oluşturmuştur. Kültüre alınan ortamlardan 1 mg/l 2,4-D içeren MS1 ortamı hariç diğer modifiye edilmiş bütün ortamlarda kallus oluşum oranı oldukça yüksek bulunmuştur.

Olgunlaşmamış buğday embriyolarından elde edilen hızlı gelişen, kırılğan embriyogenik kallusların modifiye edilmiş MS (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS9 ve MS10) ortamlarında, kültüre alındıktan yaklaşık 4 hafta sonra meydana gelen kallus gelişimlerine ilişkin sonuçlar Şekil 5’de verilmiştir.

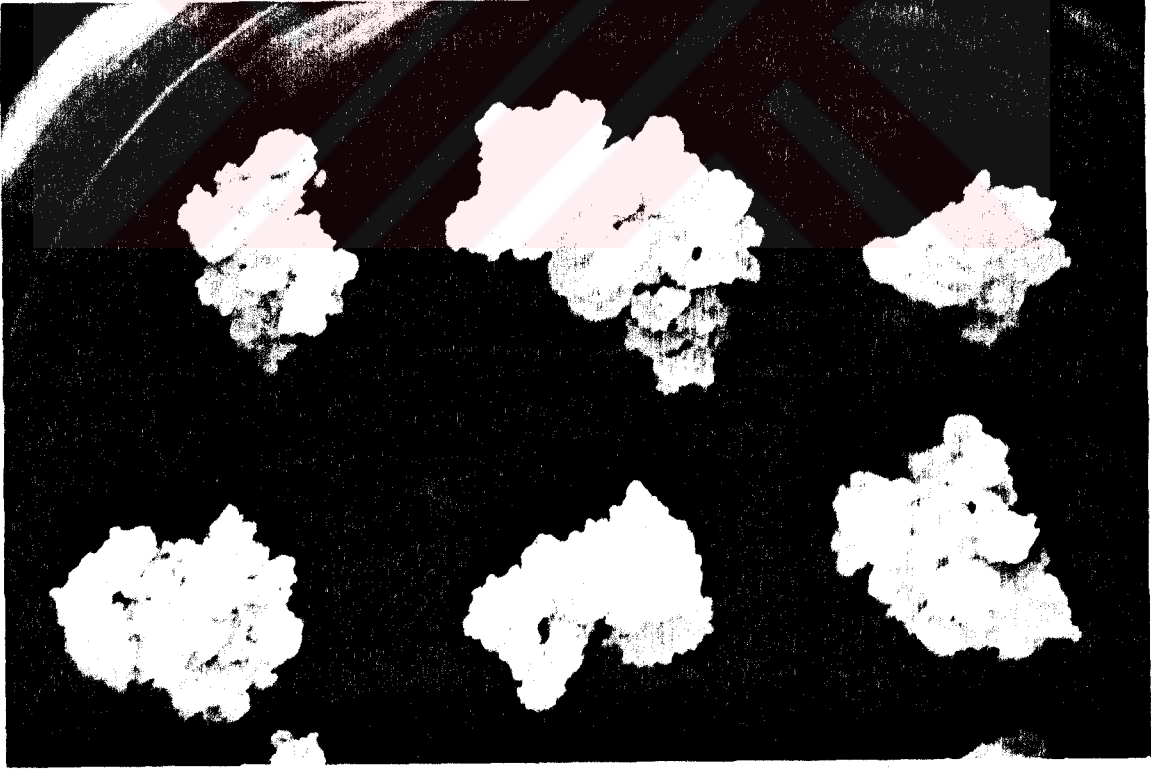


Şekil 5. Modifiye edilmiş MS ortamları üzerinde kültüre alınan olgunlaşmamış buğday embriyoları kalluslarının büyüme oranları (mg)

MS1= MS + 1mg/l 2,4-D, **MS2**= MS + 2mg/l 2,4-D, **MS3**=MS + 2mg/l 2,4-D + %5 patates ekstraktı, **MS4**=MS (çift konsantrasyon) + 2mg/l 2,4-D, **MS5**= MS + 2mg/l 2,4-D+%7 buğday nişastası (agar yok), **MS6**= MS+2mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat, **MS7**= MS + 2mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat + 500mg/l glutamin, **MS8**= MS (çift konsantrasyon) + 2mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat + 500mg/l glutamin, **MS9**=MS + 2mg/l 2,4-D + 150mg/l asparajin, **MS10**= MS (çift konsantrasyon) + 2mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat + 150mg/l asparajin

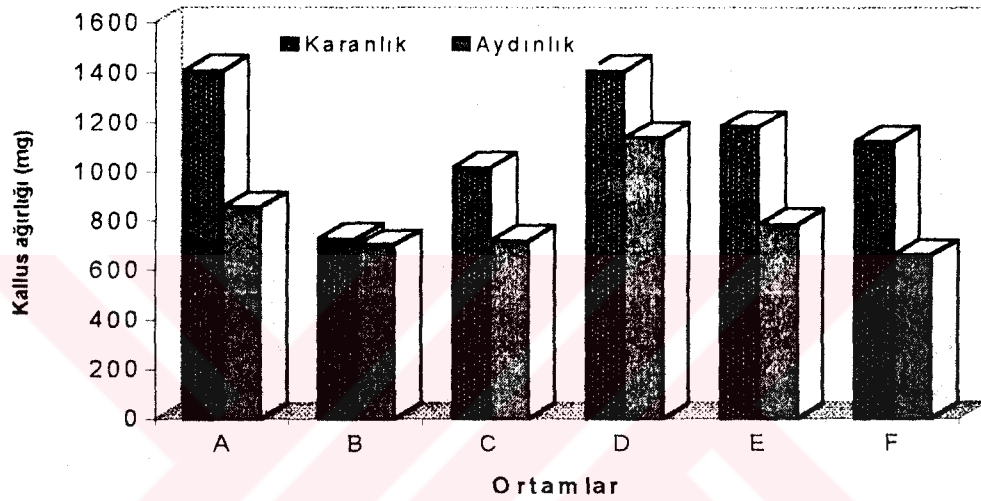
Beş buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen kallusların, kültüre alındıkları modifiye edilmiş MS ortamlarında 373mg ile 1812mg arasında kallus gelişimi meydana getirdikleri Şekil 5’de görülmektedir. En fazla kallus gelişimi Seri 82 (1812 mg), Panda (1351 mg), Şafir (1168 mg) Gemini (1120 mg) ve Çukurova 86 (1276 mg) çeşidlerinde, MS (çift

konsantrasyon) + 2 mg/l 2,4-D + 100 mg/l kazein hidrolizat + 500 mg/l glutamin içeren MS8 ortamından elde edilmiştir. Aynı oranda 2,4-D ve organik madde konsantrasyonu içeren MS7 ortamı ile kallus gelişimi yönünden önemli bir farklılık bulunmamasından dolayı bu ortamda meydana gelen kallus gelişiminin daha ekonomik olduğu sonucuna varılmıştır. Kültüre alınan çeşitler 794mg ile 1184mg arasında değişen miktarlarda kallus gelişimi göstermişlerdir. Buğday nişastası ilave edilmiş MS5 ortamında nişastanın katılaştırıcı özelliğinden yararlanılıp agar kullanılmaması nedeniyle kallus gelişiminin diğer ortamlara göre az olmasına rağmen agar kullanılmaması nedeniyle daha ekonomik olduğu sonucuna varılmıştır Olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslar 6-8 ay boyunca altkültüre alınmıştır. Alt kültürler sırasında hızlı gelişen, kırılgan, beyaza yakın renkteki embriyogenik kalluslar seçilerek stabil hale getirilmiştir (Resim 4)



Resim 4. Hızlı gelişen, kırılgan, beyaza yakın renkteki embriyogenik kalluslar

Karanlık ve 16 saat aydınlık-8 saat karanlık inkübasyon koşullarının embriyogenik kallusların gelişimine olan etkisini belirlemek amacıyla Seri 82 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen embriyogenik kallusları 25 ± 1 °C'de karanlık ve 16 saat aydınlık-8 saat karanlık koşullarda yaklaşık 4 hafta süre ile inkübe edilmiş ve bu süre sonundaki kallus gelişimlerine ilişkin sonuçlar Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Karanlık ve 16 saat aydınlık-8 saat karanlık koşullarda inkübe edilen embriyogenik kallusların modifiye edilmiş MS ortamları üzerindeki büyüme oranları (mg)

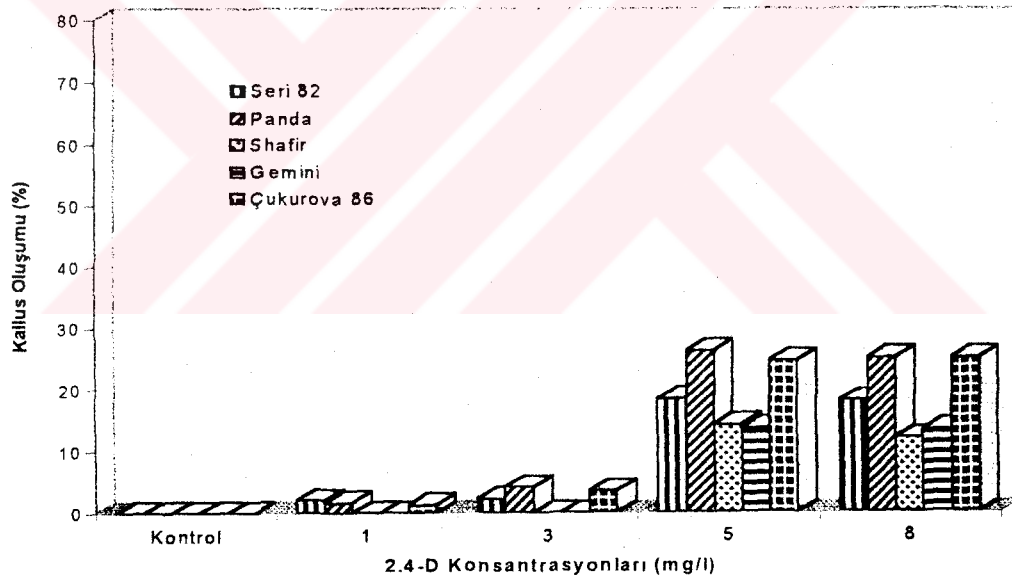
A=MS + 2 mg/l 2,4-D + 150mg/l asparajin; **B**=MS + 1 mg/l 2,4-D+150mg/l asparajin; **C**=MS (makro elementler) + 2 mg/l 2,4-D; **D**=MS + 2 mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat + 500mg/l glutamin; **E**=MS + 2 mg/l 2,4-D + %7 buğday nişastası (agar yok); **F**=MS + 2 mg/l 2,4-D

Şekil 6'da görüldüğü gibi karanlık koşullarda inkübe edilen kalluslar, modifiye edilmiş bütün ortamlarda daha fazla kallus gelişimi göstermiştir. Karanlık koşulların yanında ortama ilave edilen organik maddelerin de etkisi farklı olmuştur. MS + 2 mg/l 2,4-D içeren A ve MS + 2 mg/l 2,4-D + 100 mg/l kazein hidrolizat + 500 mg/l glutamin içeren D ortamlarındaki kallus gelişimi B, C, E ve F ortamlarına göre daha yüksek olmuştur. 16 saat aydınlık-8 saat karanlık

koşullarda ise kallus gelişimi karanlık koşullara göre daha az olmuş fakat ortamların etkisi karanlık koşullarda inkübe edilen kalluslara paralel olmuştur. Yapılan bu çalışmada kallus gelişimi üzerine ortama ilave edilen organik maddelerin yanında inkübasyon koşullarında etkili olduğu, karanlık koşullarda kallus gelişiminin daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.

4.2. Olgun Buğday Embriyolarının Kültürü ve Kallusların Elde Edilmesi

Beş hexaploid buğday çeşidinin olgun embriyolarından kallus elde etmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS ortamlarında kültüre alınmış ve kallus oluşum oranları ile ilgili sonuçlar Şekil 7’de verilmiştir.

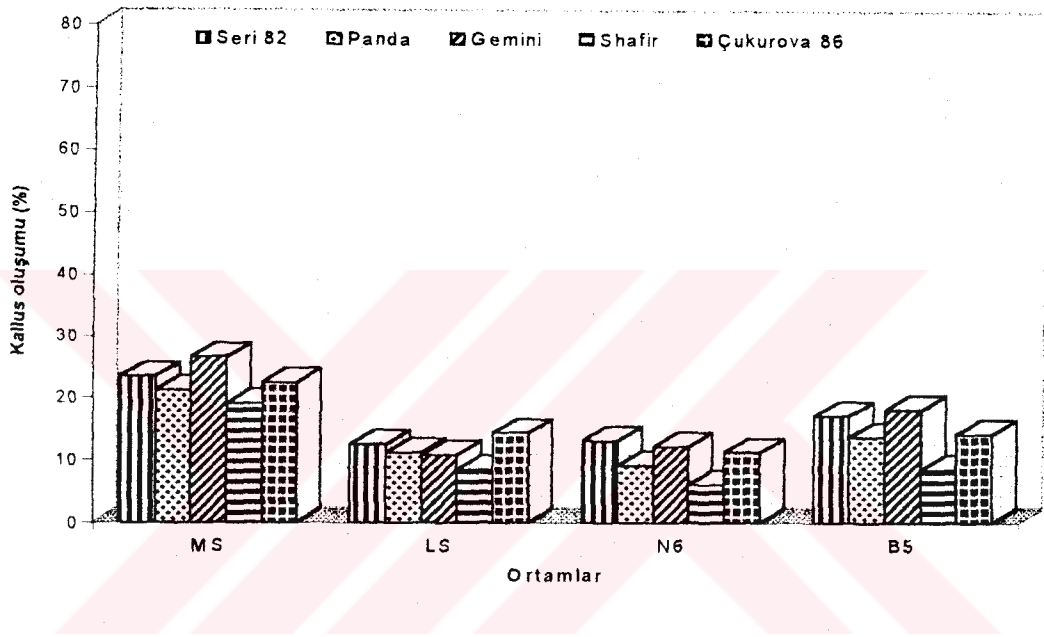


Şekil 7. Değişik konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgun embriyolarının kallus oluşum oranları (%)

Şekil 7’ye göre farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren MS ortamlarında kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgun embriyoları, ortama ilave edilen 2,4-D

konsantrasyonlarına göre farklı oranda kallus oluşturmuşlardır. Olgun embriyoları kültüre alınan bütün çeşidler en yüksek 5 ve 8 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda kallus oluşturmuşlardır. Olgun embriyolardan kallus oluşum oranları %0 ile %26.2 arasında değişim göstermiştir. Bunlardan 5 mg/l 2,4-D içeren ortamda %26.2 ile Panda, %24.6 ile Çukurova 86, %18.4 ile Gemini çeşidleri diğer 2,4-D konsantrasyonlarına göre daha yüksek oranda kallus oluşturmuşlardır. Kallus oluşturmayan olgun embriyoların bir çoğu sürgün oluşturmuşlardır. Embriyolardan sürgün oluşumu tanenin ortam yüzeyine temas etme şekline göre değişim göstermiş, ortam yüzeyine karın çizgileri temas edecek şekilde yerleştirilen tanelerde daha az sürgün oluşumu gözlenmiştir. Kültüre alınan çeşidlerin ortalama kallus oluşum oranları %16 olarak bulunmuştur. 2,4-D ilave edilmeyen kontrol ortamında ise kallus gelişimine rastlanmamıştır. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra kallus oluşturmayan taneler aynı ortamlarda kültüre alındıkları halde kallus oluşumunda herhangi bir gelişme gözlenmemiştir.

Olgun buğday embriyolarının kallus oluşum oranları üzerine farklı ortamların etkisini belirleyebilmek amacıyla 5 mg/l 2,4-D içeren MS, B5, LS ve N6 ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır. Bu dört farklı ortam üzerinde kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgun embriyolarından kallus oluşum oranlarına ilişkin sonuçlar Şekil 8’de verilmiştir.

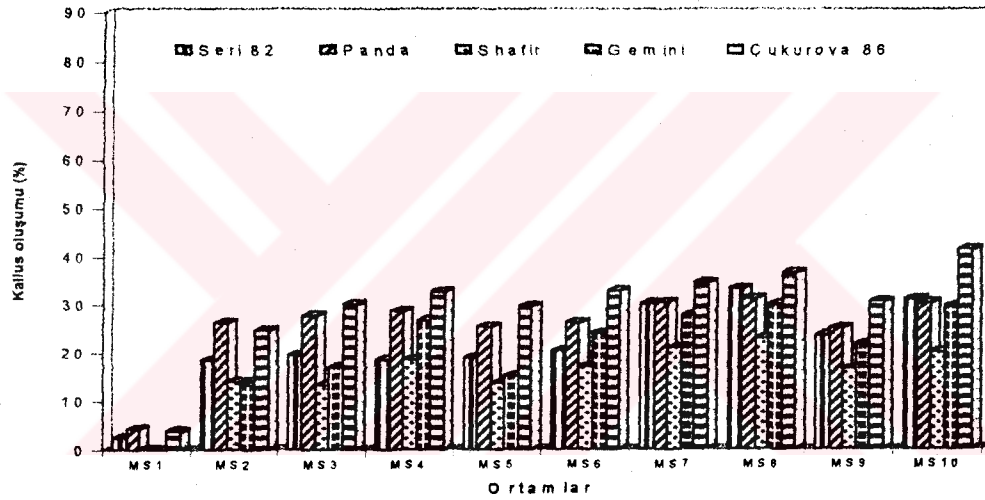


Şekil 8. MS, LS, N6 ve B5 ortamları üzerinde kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgun embriyolarının kallus oluşum oranları (%)

Şekil 8’e göre, kültüre alındıktan 4 hafta sonra yapılan gözlemler sonucunda 5 mg/l 2,4-D içeren MS, LS, N6 ve B5 ortamlarında kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgun embriyolarının kallus oluşum oranları %6.1 ile %26.5 arasında değişim göstermiştir. Kültüre alınan bütün çeşidlerde en yüksek kallus oluşumu MS ortamında meydana gelmiş, bunu sırasıyla B5, LS ve N6 ortamları izlemiştir. Olgun embriyolardan kallus oluşum oranlarına kültüre alındıkları ortamın etkisi olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşum oranına olan etkisiyle

benzerlik göstermiş fakat olgun embriyoların kallus oluşum oranı oldukça düşük oranda olmuştur. Kültüre alınan çeşitlerden en yüksek kallus oluşumu MS ortamında %26.5 ile Shafir çeşidinden elde edilmiş, bunu %23.4 ile Seri 82, %22.5 ile Çukurova 86, %21.2 ile Panda, %19.1 ile Gemini çeşitleri izlemiştir.

Olgun buğday embriyolarının kallus oluşum oranları üzerine kültüre alındıkları ortamlara ilave edilen organik maddelerin etkilerini belirlemek amacıyla, 5 buğday çeşidinin olgun embriyoları modifiye edilmiş MS (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS9 ve MS10) ortamlarında kültüre alınmış ve kallus oluşum oranlarına ilişkin sonuçlar Şekil 9'da verilmiştir.

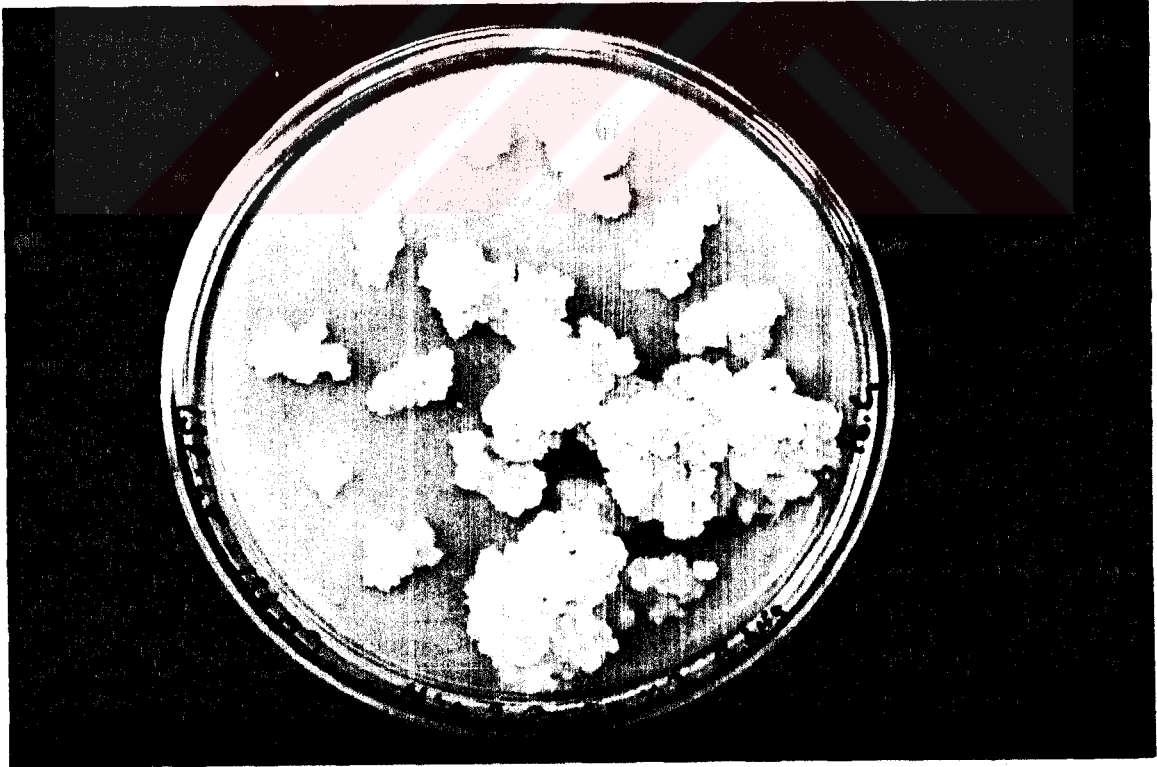


Şekil 9. Modifiye Edilmiş MS ortamları üzerinde kültüre alınan beş buğday çeşidinin olgun embriyolarının kallus oluşum oranları (%)

MS1= MS + 3mg/l 2,4-D, **MS2**= MS + 5mg/l 2,4-D, **MS3**=MS + 5mg/l 2,4-D + %5 patates ekstraktı, **MS4**=MS (çift konsantrasyon) + 5mg/l 2,4-D, **MS5**= MS +5mg/l 2,4-D+%7 buğday nişastası (agar yok), **MS6**= MS+5mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat, **MS7**= MS + 5mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat + 500mg/l glutamin, **MS8**= MS (çift konsantrasyon) + 5mg/l 2,4-D100mg/l kazein hidrolizat + 500mg/l glutamin, **MS9**=MS +5mg/l 2,4-D + 150mg/l asparajin, **MS10**= MS (çift konsantrasyon) + 5mg/l 2,4-D + 100mg/l kazein hidrolizat + 150mg/l asparajin

Şekil 9'da farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda 2,4-D (3mg/l - 5 mg/l) ve organik maddeler (%5 patates ekstraktı, %7 buğday nişastası, 100 mg/l kazein hidrolizat, 500 mg/l glutamin, 150 mg/l asparajin) içeren modifiye

edilmiş MS (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS9 ve MS10) ortamlarında kültüre alınan 5 buğday çeşidinin olgun emriyolarının kallus oluşum oranlarının %0 ile %41.2 arasında değişim gösterdiği görülmektedir. Kültüre alınan çeşidlerden Seri 82 (%33.2), Panda (%31.2), Shafir (%23.0), Gemini (%30.0) çeşidleri MS (çift konsantrasyon) + 2 mg/l 2,4-D + 100 mg/l kazein hidrolizat + 500mg/l glutamin içeren MS8 ortamında yüksek oranda kallus oluşturmuşlardır. Gemini (%44.7) çeşidi ise MS (çift konsantrasyon) + 2mg/l 2,4-D+100mg/l kazein hidrolizat+150mg/l asparagin içeren MS10 ortamında yüksek oranda kallus oluşturmuştur. Buğday nişastası içeren MS5 ortamında ise kallus oluşumu oldukça yüksek olmuştur (Resim 5). Kültüre alınan bütün çeşidlerde en düşük kallus oluşumu MS + 3 mg/l 2,4-D içeren MS1 ortamlarında meydana gelmiştir. Kültüre alınan genotiplerin olgun embriyolarından kallus oluşum oranının ortamın içeriğine bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir.

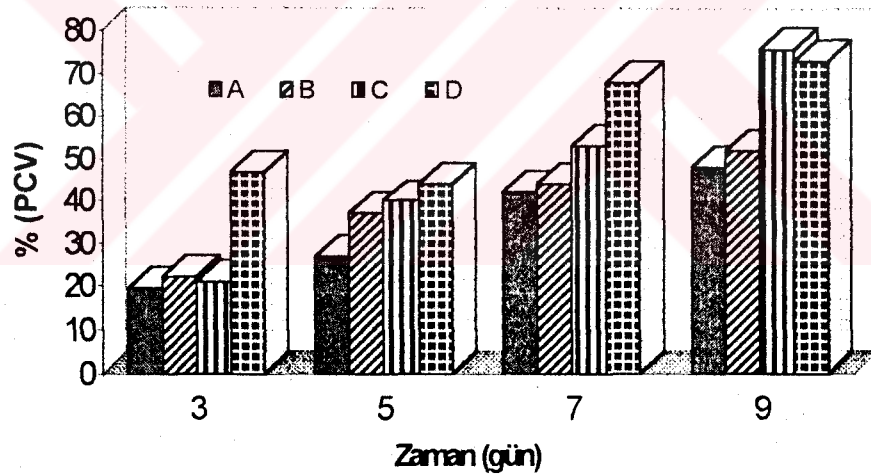


Resim 5. Buğday nişastası ilave edilen ortamlarda kallus gelişimi

4.3. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması

Farklı organik maddeler içeren MS (A, B, C, D) ortamlarında kültüre alınan Seri 82 buğday çeşidinin hücre süspansiyon kültürlerinin % hücre hacimi artışları (%HHA) Şekil 10'da verilmiştir.

Embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinin kurulmasında kullanılacak kallusların embriyogenik kapasitesi, kültür ortamındaki gelişme durumu gibi özellikleri hücre kültürlerindeki stabilitenin korunmasında en önemli faktördür. Şekil 10'da görüldüğü gibi, farklı organik maddeler (100 mg/l kazein hidrolizat, 500 mg/l glutamin, 150 mg/l asparagin) içeren sıvı MS ortamında kültüre alınan hücre süspansiyon kültürlerinin 3, 5, 7 ve 9. günlerinde tesbit edilen % hücre hacmi (%HHA) artışı en fazla hücre süspansiyon kültürünün 3, 5 ve 7. günlerinde kazein hidrolizat ve glutamin içeren ortamlarda oluşmuştur.



Şekil 10. Farklı organik maddeler içeren sıvı MS ortamlarında kültüre alınan hücre süspansiyon kültürlerinin 3, 5, 7 ve 9. günlerdeki % hücre hacimi artışı (%HHA)

A=MS+2mg/l 2,4-D; B=MS+2 mg/l 2,4-D+100mg/l kazein hidrolizat; C=MS+2 mg/l 2,4-D+100mg/l kazein hidrolizat+150 mg/l asparagin; D=MS+2 mg/l 2,4-D+100mg/l kazein hidrolizat+500 mg/l glutamin

Hücre süspansiyon kültürünün 9. gününde ise asparagin içeren C ve glutamin içeren D ortamlarında en fazla hücre artışının meydana geldiği görülmüştür. Hiçbir organik madde ilavesi yapılmayan A ortamındaki hücre artışının organik madde içeren ortamlara göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Hücre süspansiyon kültürü ortamlarında kullanılan organik maddelerin hücre artışını olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır (Resim 6).



Resim 6. Seri 82 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen embriyogenik kalluslarından oluşturulmuş hücre süspansiyon kültürü

4.4. Hücre Süspansiyon Kültürlerinden Protoplast İzolasyonu

Enzim solusyonu içerisinde 50 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde 27 ± 1 °C'de karanlık koşullarda inkübe edilen Seri 82 buğday çeşidine ait hücre süspansiyon kültürü hücrelerinden protoplast izolasyonunun 3, 4, 5 ve 6. saatlerinde örnekler alınarak izolasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, gerçekleşti ise hangi oranlarda gerçekleştiği takip edilmiş ve alınan sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonunda kullanılan dört farklı enzim solusyonlarının (V, P, Q, D) (Ek 2,3) değişik zamanlarda protoplast verimliliği üzerine olan etkileri.

Zaman (saat)	Enzim Solusyonu	Bir Görüş Alanında Görülen Protoplast Sayısı (x40)
3	V	24
	P	21
	Q	16
	D	0
4	V	41
	P	36
	Q	30
	D	11
5	V	71
	P	42
	Q	38
	D	15
6	V	89
	P	58
	Q	43
	D	18

Seri 82 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen embriyogenik kalluslardan kurulan ve yedi günde bir altkültüre alınan hücre süspansiyon kültürü hücrelerinden protoplast izole edebilmek için 4 farklı enzim solusyonu kullanılmıştır.

Çizelge 1'de görüldüğü gibi hücre süspansiyon kültürü hücrelerinden V, P, Q ve D enzim solusyonlarında zamana bağlı olarak izole edilen protoplast miktarında da değişim meydana gelmiştir. Bütün zamanlarda D enzim solusyonunda izole edilen protoplast oranı düşük bulunurken P ve Q enzim solusyonlarında normal sayılabilecek oranda, V enzim solusyonunda ise yüksek oranda protoplast izolasyonu gerçekleşmiştir. En yüksek protoplast izolasyonunun bütün zamanlarda V enzim solusyonunda meydana geldiği görülmüştür. V enzim solusyonunda, 6 saat süre ile inkübe edilen 1gr hücre süspansiyon kültürü hücreden yaklaşık 2×10^7 protoplast izole edilmiştir (Resim 7)

4.5. Hücre Süspansiyon Kültürlerinden İzole Edilen Protoplastların Kültürü

Hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilerek kültüre alınan protoplastların bölünme oranları üzerine kültüre alındıkları ortamların MS, B5, oratama ilave edilen 2,4-D (0.5 mg/l - 1.0 mg/l) miktarlarının, kültüre alındıkları protoplast yoğunluklarının (0.5×10^6 - 1.0×10^6 protoplast/ml), hücre süspansiyon kültürlerinden alındıkları günün (3.gün, 5.gün, 7.gün), kültüre alındıkları ortamın sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarının etkilerini belirlemek amacıyla bu değişkenler doğrultusunda kültüre alınmışlardır.

0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında, hücre süspansiyon kültürlerinin 3, 5 ve 7. günlerinde alınan hücrelerden izole edilen protoplastlar, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınmışlardır. Protoplastlar kültüre alındıktan iki gün sonra ve bunu takip eden her iki günde bir bölünen protoplastlar sayılmış ve alınan sonuçlar Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ve B5 ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan protoplastların % bölünme oranları

Protoplast Yoğunluğu Protoplast/ml	Hücre Süspansiyon Kültürü (gün)	Agaroz konsantrasyonları ve ortamlar							
		Sıvı		%0.3		%0.6		%1.2	
		MS	B5	MS	B5	MS	B5	MS	B5
0.5x10 ⁶	3	13.95	7.2	14.75	9.3	16.32	12.7	17.20	12.5
	5	13.43	8.3	12.69	10.8	15.25	12.2	16.60	12.3
	7	10.75	4.7	9.24	6.0	11.20	8.1	10.27	9.4
1.0x10 ⁶	3	19.22	11.2	23.62	10.8	26.50	14.3	36.60	12.8
	5	19.30	12.6	24.65	9.1	27.20	15.5	25.80	11.2
	7	16.50	7.7	9.66	4.1	11.60	8.0	11.40	9.8

İzole edilen protoplastlar kültüre alındıktan iki gün sonra hücre duvarı oluşturmaya (Resim 8) ve bölünmeye (Resim 9) başlamışlardır. Bu bakımdan kültür ortamları arasında farklılıklar gözlenmiştir.

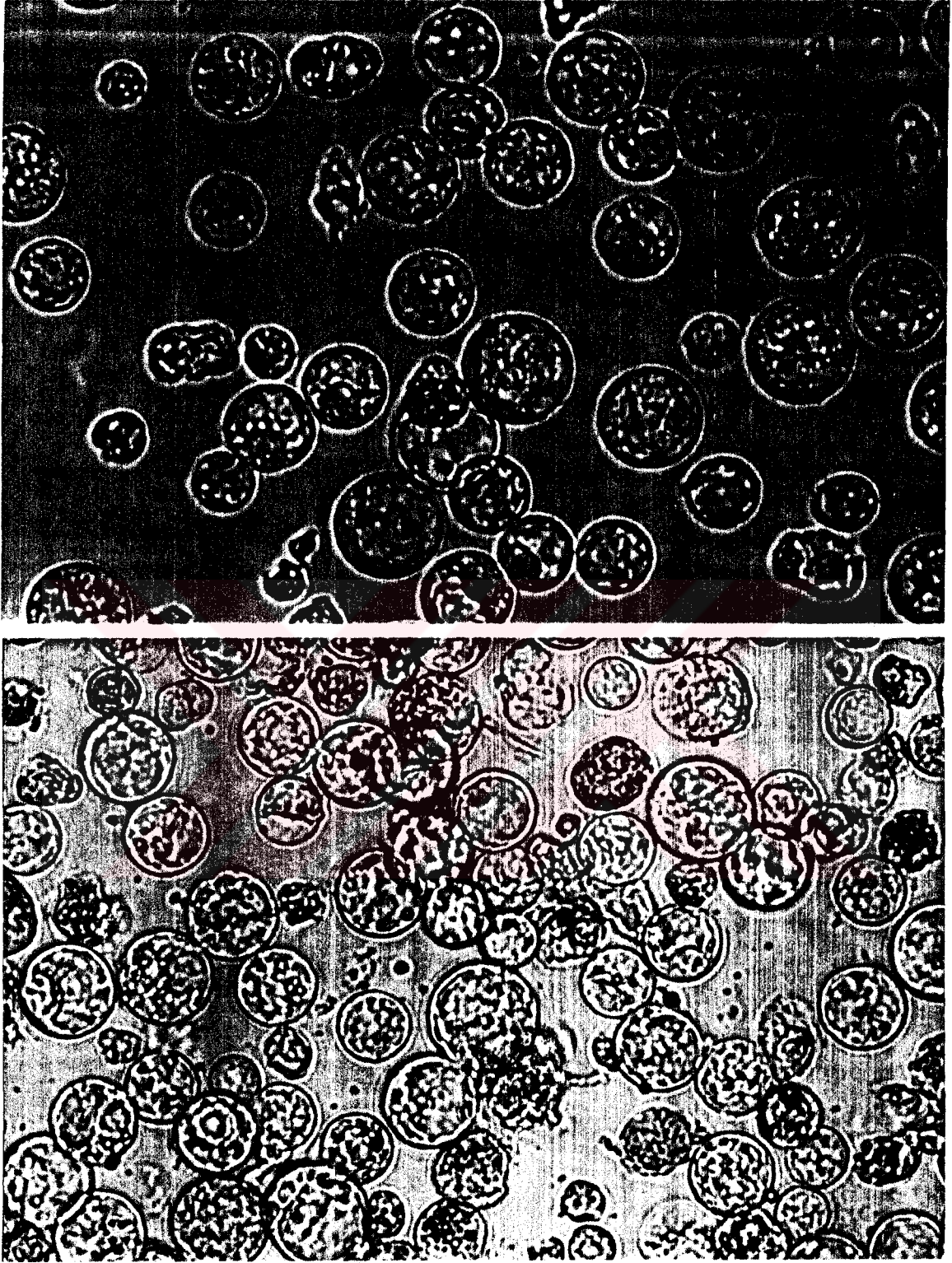
Çizelge 2’de görüldüğü gibi 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınan protoplastlarda en yüksek protoplast bölünmesi %36.6 ile hücre süspansiyon kültürünün 3. gününde, 1x10⁶ protoplasts/ml yoğunluğunda ve %1.2 agaroz içeren ortamda meydana gelmiştir.

Bunu %26.5 protoplast bölünmesi ile %0.6 agaroz ve %23.62 protoplast bölünmesi ile %0.3 agaroz içeren ortamlar izlemiştir. 1.0x10⁶ protoplast yoğunluğunda ve %1.2 agaroz konsantrasyonunda en yüksek hücre bölünmesi hücre süspansiyon kültürünün 3. ve 5. gününde izole edilen protoplastlarda meydana gelmiştir. 0.5x10⁶ protoplast/ml yoğunluğunda kültüre alınan

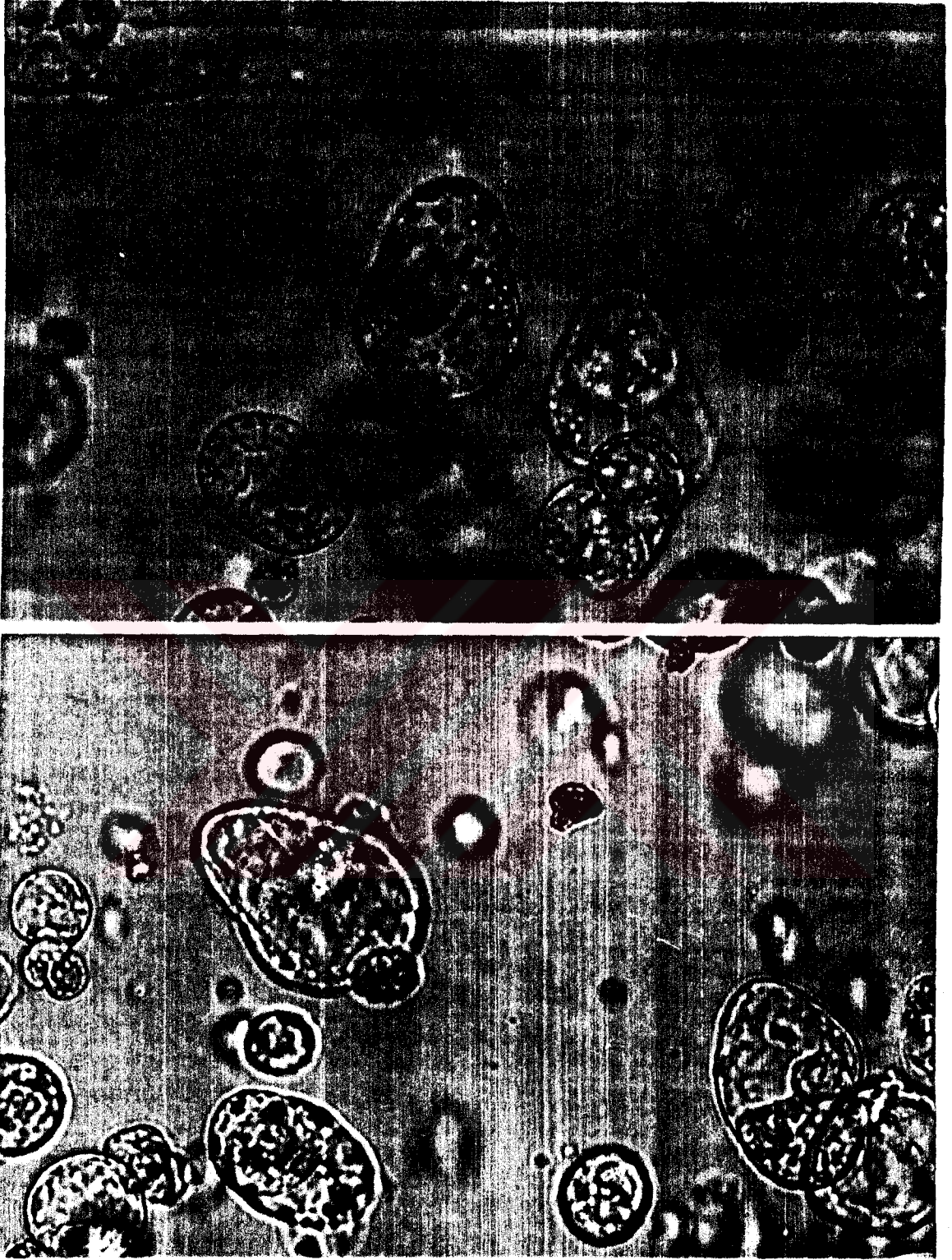
protoplastlarda ise en yüksek hücre bölünmesi yine %1.2 ve %0.6 agaroz konsantrasyonunda ve hücre süspansiyon kültürünün 3. ve 5. gününde izole edilen protoplastlarda meydana gelmiştir. Protoplast yoğunluğu ve agaroz konsantrasyonu arttıkça protoplast bölünmesinde de bir artış olduğu gözlenmiştir.

Protoplastların bölünme oranları üzerine, kültüre alındıkları ortamların ve ortama ilave edilen 0.5 mg/l 2,4-D miktarının etkisini belirleyebilmek amacıyla, B5 ortamlarında, hücre süspansiyon kültürünün farklı altkültür zamanlarında izole edilen protoplastlar, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınmışlardır. Kültüre alınan protoplastların % bölünme oranlarına ilişkin sonuçlar Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2’ye göre 0.5 mg/l 2,4-D içeren B5 ortamlarında kültüre alınan protoplastlarda en yüksek hücre bölünmesi %15.5 ile hücre süspansiyon kültürünün 5. gününde izole edilen, 1.0×10^6 protoplast/ml yoğunluğunda kültüre alınan ve %0.6 konsantrasyonda agaroz ile katılaştırılmış ortamlarda meydana gelmiştir. Bunu %14.3 hücre bölünmesi ile aynı yoğunlukta kültüre alınan, aynı konsantrasyonda agaroz ile katılaştırılan ve hücre süspansiyon kültürünün 3. gününde izole edilip kültüre alınan protoplastlar izlemiştir. En düşük hücre bölünmesi ise kültüre alınan bütün yoğunluklarda ve agaroz konsantrasyonlarında, hücre süspansiyon kültürünün 7. gününde izole edilen protoplastlarda meydana gelmiştir. Buna göre B5 ortamında kültüre alınan protoplastlar hücre bölünme oranı yönünden MS ortamlarında kültüre alınan protoplastlara oranla daha düşük bulunmuştur.



Resim 7. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen Seri 82 buğday çeşidi protoplastları



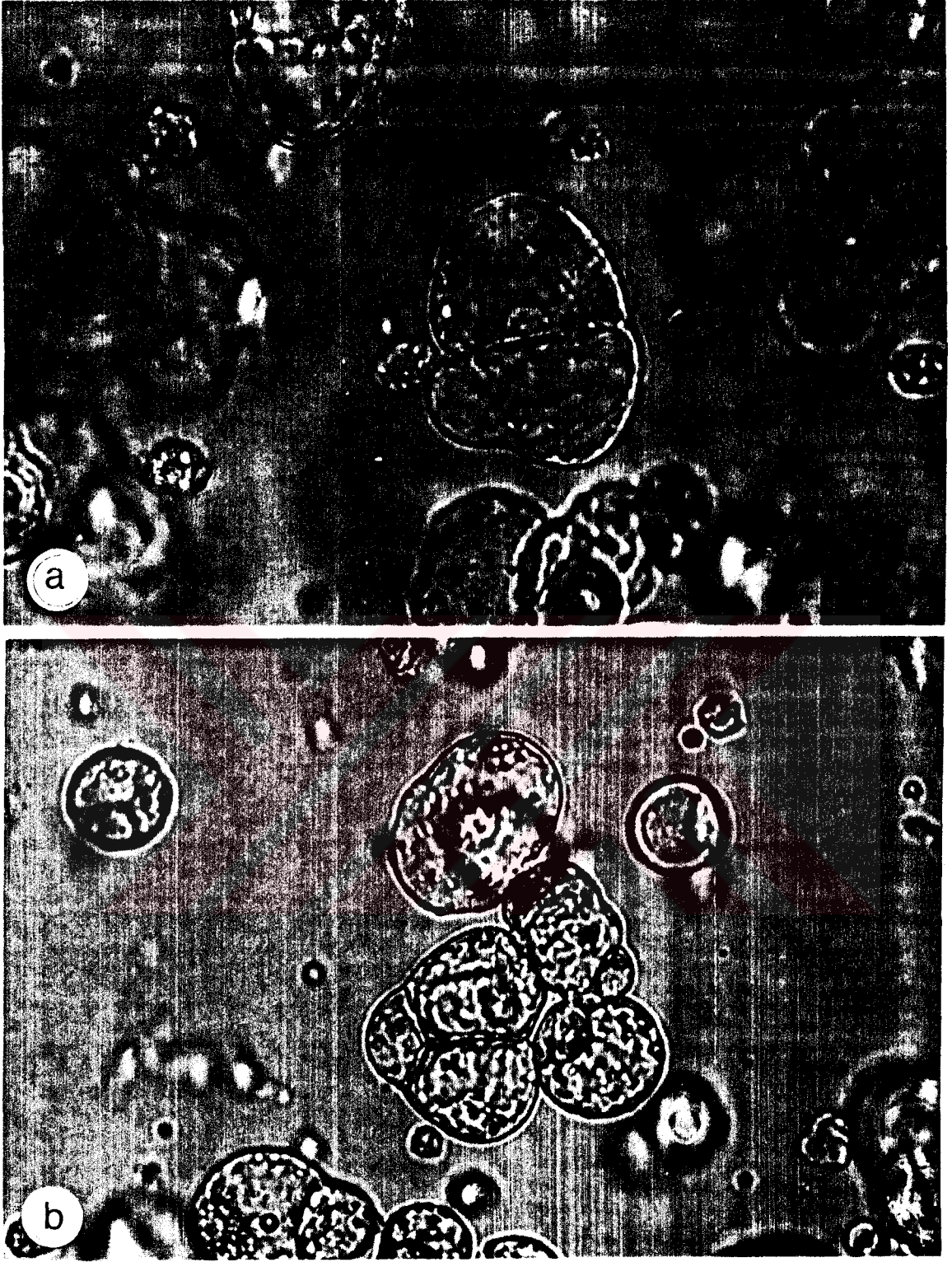
Resim 8. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarının kültüre alınmasından iki gün sonra hücre duvarı oluşumu ve bölünme

1.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında, hücre süspansiyon kültürlerinin 3, 5 ve 7. günlerinde alınan hücrelerden izole edilen protoplastlar, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarda kültüre alınmışlardır. Kültüre alındıktan sonra bölünen protoplastlar sayılmış ve alınan sonuçlar Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. 1.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan protoplastların % bölünme oranları

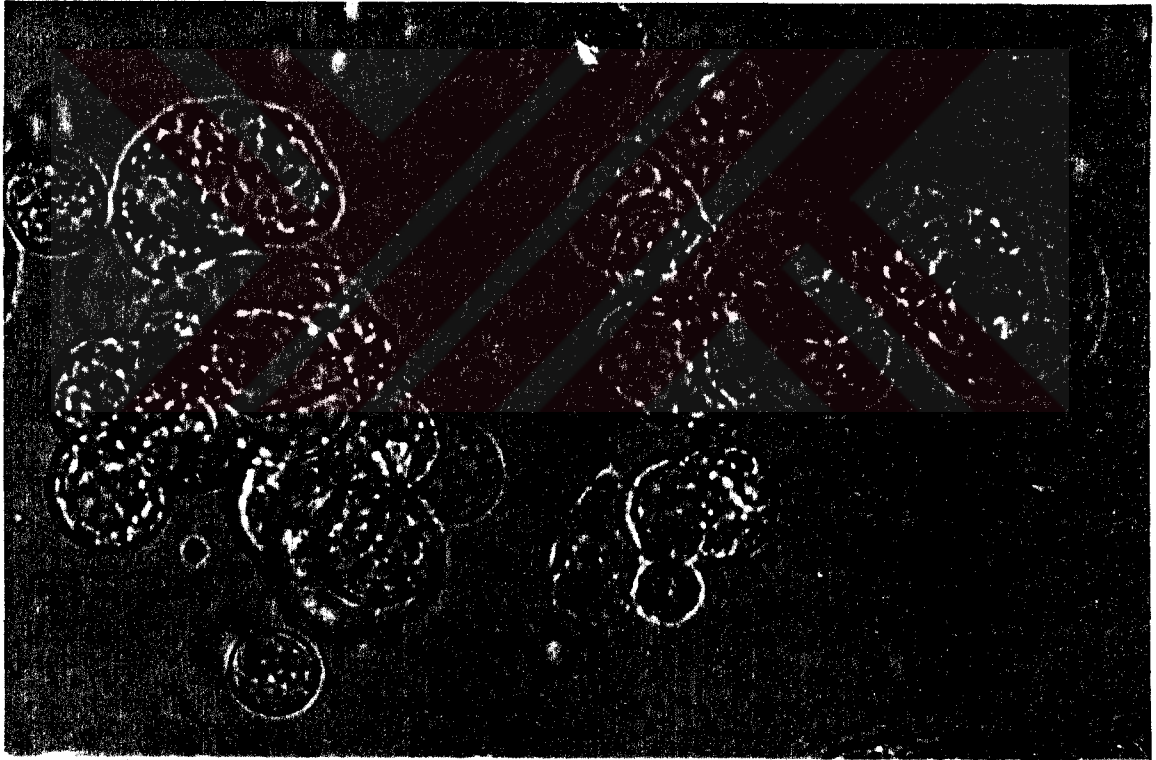
Protoplast Yoğunluğu (Protoplast/ml)	Hücre Süspansiyon Kültürü (gün)	Agaroz Konsantrasyonları			
		Sıvı	%0.3	%0.6	%1.2
0.5x10 ⁶	3	7.92	8.98	12.80	14.14
	5	1.05	7.93	11.75	13.78
	7	5.08	5.63	6.70	7.12
1.0x10 ⁶	3	9.40	12.43	21.21	25.40
	5	10.65	13.62	22.48	23.23
	7	6.81	7.62	8.90	9.87

Çizelge 3'e göre 1.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında kültüre alınan protoplastlarda en yüksek hücre bölünmesi %25.4 ile hücre süspansiyon kültürünün 3. gününde izole edilen, 1.0x10⁶ protoplast/ml yoğunluğunda kültüre alınan ve %1.2 konsantrasyonda agaroz içeren ortamda meydana gelmiştir. Bunu hücre süspansiyon kültürünün 5. gününde izole edilen, 1.0x10⁶ protoplast/ml yoğunluğunda kültüre alınan ve %1.2 ve %0.6 konsantrasyonda agaroz içeren ortamlar izlemiştir. En düşük hücre bölünmesi ise hücre süspansiyon kültürünün 7. gününde izole edilen protoplastlarda meydana gelmiştir. Kültüre alınan protoplast yoğunluğu ve agaroz konsantrasyonları arttıkça ve hücre süspansiyon kültürlerinden alınan hücrelerin altkültür süreleri kısaldıkça hücre bölünmesinde de bir artış meydana geldiği sonucu ortaya çıkmıştır.



Resim 9. Modifiye edilmiş MS ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarının ilk (a) ve ikinci bölünmeleri (b)

Farklı 2,4-D konsantrasyonlarında ve ortamlarında, farklı hücre süspansiyon kültürü altkültür zamanlarında, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan protoplastlarda hücre bölünmeleri bazı yönlerden karakteristik özellik göstermişlerdir. İki, üç ve dört hücreden oluşan koloniler ilk haftanın sonuna kadar tanımlanabilmişlerdir. 8-10 hücreden oluşan kolonilerden sonra tanımlamada güçlük çekilmeye başlanmıştır. İki haftadan sonra oluşan hücre kolonileri süspansiyon kültürü hücrelerine benzerlik göstermeye başlamışlardır (Resim 10).



Resim 10. Modifiye edilmiş MS ortamlarında farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan hücre süspansiyon kültürü protoplastlarının bölünmelerinin devam etmesi sonucu oluşan mikrokoloniler.

Embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilerek farklı 2,4-D konsantrasyonlarında ve ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan protoplastlar kültüre alınmalarında yaklaşık 15-20 gün sonra protoplast bölünmesi sonucunda oluşan mikrokallusların sayımı yapılarak % kaplama etkinlikleri belirlenmiştir.

Farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı konsantrasyonlarda agaroz ile katılaştırılmış ve 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınan protoplastların % kaplama etkinlikleri belirlenmiş ve alınan sonuçlar çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ve B5 ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan protoplastların (%) kaplama etkinlikleri

Protoplast Yoğunluğu (Protoplast/ml)	Hücre Süspansiyon Kültürü (gün)	Agaroz Konsantrasyonları ve ortamlar							
		Sıvı		%0.3		%0.6		%1.2	
		MS	B5	MS	B5	MS	B5	MS	B5
0.5x10 ⁶	3	0	0	0	0	2.3	1.6	5.6	3.1
	5	0	0	2.1	1.2	3.8	0	5.8	1.3
	7	0	0	0	0	2.4	1.0	3.7	1.8
1.0x10 ⁶	3	0	0	1.0	0.4	3.6	2.2	6.2	2.3
	5	0	0	1.8	1.9	2.6	1.7	5.1	2.1
	7	0	0	1.7	0.6	1.2	0	2.3	1.1

Çizelge 4'te görüldüğü gibi 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında kültüre alınan protoplastlardan mikrokallus gelişimi en yüksek %6.2 ile hücre süspansiyon kültürünün 3. gününde izole edilen, 1.0x10⁶ protoplast/ml yoğunlukta ve %1.2 konsantrasyonda agaroz içeren ortamlarda meydana gelmiştir (Resim 11). Bunu %5.8 kaplama etkinliği ile hücre süspansiyon kültürünün 5. gününde izole edilen, 0.5x10⁶ protoplast/ml yoğunluğunda ve %1.2 konsantrasyonda agaroz içeren ortamlar izlemiştir). Hücre süspansiyon

kültürünün farklı altkültür sürelerinde izole edilen ve farklı yoğunluklarda, sıvı ortamlarda kültüre alınan protoplastlarda hücre bölünmesi meydana gelmesine rağmen mikrokallus gelişimi gözlenmemiştir.

Farklı Yoğunluklarda, sıvı ve farklı konsantrasyonlarda agaroz ile katılaştırılmış, 0.5 mg/l 2,4-D içeren B5 ortamlarında kültüre alınan protoplastların % kaplama etkinlikleri çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4'e göre 0.5 mg/l 2,4-D içeren B5 ortamlarında kültüre alınan protoplastlardan en fazla mikrokallus gelişimi %1.3 ile hücre süspansiyon kültürünün 3. gününde izole edilen, 0.5×10^6 protoplast/ml yoğunlukta kültüre alınan ve %1.2 konsantrasyonlarda agaroz içeren ortamlarda meydana gelmiştir. Bunu %2.2 ve %2.1 kaplama etkinliği ile hücre süspansiyon kültürünün 5. gününde izole edilen, 1.0×10^6 protoplast/ml yoğunlukta kültüre alınan ve %0.6 ile %1.2 konsantrasyonlarda agaroz içeren ortamlar izlemiştir. Hücre süspansiyon kültürünün farklı altkültür sürelerinde alınıp izole edilen, farklı yoğunluklarda, sıvı ortamlarda kültüre alınan protoplastlar ile hücre süspansiyon kültürünün 3. ve 5. günlerinde alınıp izole edilen, 0.5×10^6 protoplast/ml yoğunlukta, %0.3 konsantrasyonda agaroz içeren ortamlarda kültüre alınan protoplastlarda mikrokallus gelişimi olmamıştır. Aynı yoğunlukta, hücre süspansiyon kültürünün 5. gününde, %0.6 konsantrasyonda agaroz içeren ortam ile 1.0×10^6 protoplast/ml yoğunlukta, hücre süspansiyon kültürünün 7. gününde, %0.6 konsantrasyonda agaroz içeren ortamlarda hücre bölünmesi meydana gelmesine rağmen mikrokallus oluşumu gözlenmemiştir.

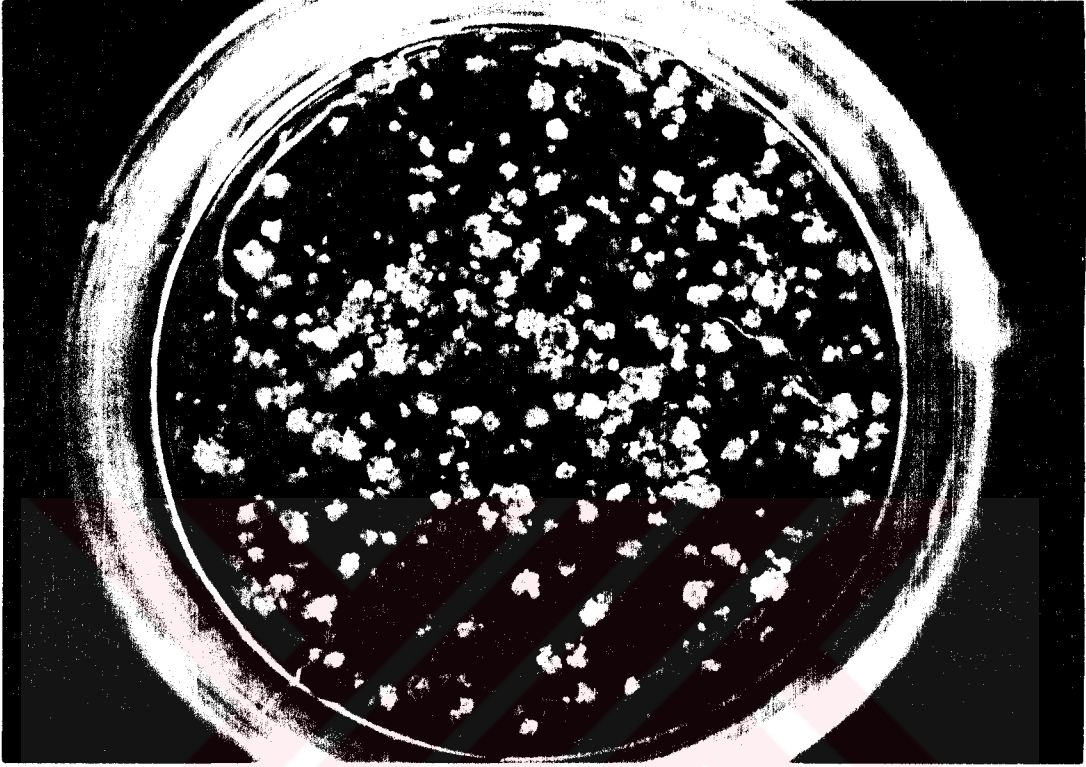
B5 ortamında kültüre alınan protoplastlardan mikrokallus gelişimi MS ortamında kültüre alınan protoplastlara göre daha düşük oranda gerçekleşmiştir. Buna göre protoplastların kültüre alındıkları ortamın mikrokallus gelişimi üzerine etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı konsantrasyonlarda agaroz ile katılaştırılmış, 1.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında kültüre alınan protoplastların % kaplama etkinlikleri çizelge 5’de verilmiştir.

Çizelge 5. 1.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında, farklı yoğunluklarda, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarda kültüre alınan protoplastların % kaplama etkinlikleri

Protoplast Yoğunluğu (Protoplast/ml)	Hücre Süspansiyon Kültürü (gün)	Agaroz Konsantrasyonları			
		Sıvı	%0.3	%0.6	%1.2
0.5x10 ⁶	3	0	1.2	1.8	4.2
	5	0	0	3.1	5.1
	7	0	0	2.0	3.0
1.0x10 ⁶	3	0	0.8	0.6	1.9
	5	0	1.1	1.9	4.8
	7	0	0.9	1.6	4.5

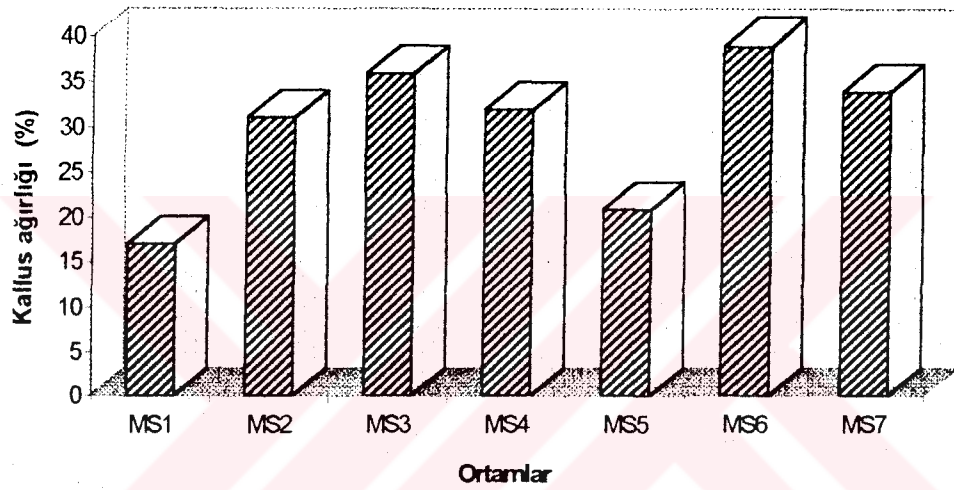
Çizelge 5’e göre 1.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınan protoplastlardan mikrokallus gelişimi en fazla %5.1 ile hücre süspansiyon kültürünün 5. gününde izole edilen, 0.5x10⁶ protoplast/ml yoğunlukta ve %1.2 konsantrasyonda agaroz içeren ortamında meydana gelmiştir. Bunu %4.8 kaplama etkinliği ile hücre süspansiyon kültürünün 5. gününde izole edilen, 1.0x10⁶ protoplast/ml yoğunlukta ve %1.2 konsantrasyonda agaroz içeren ortam izlemiştir. Hücre süspansiyon kültürlerinin farklı altkültür sürelerinde alınıp izole edilen ve farklı yoğunluklarda, sıvı ortamlarda kültüre alınan protoplastlar ile hücre süspansiyon kültürünün 5. ve 7. günlerinde izole edilen, 0.5x10⁶ protoplast/ml yoğunlukta ve %0.3 agaroz konsantrasyonunda kültüre alınan protoplastlarda hücre bölünmesi meydana gelmesine rağmen mikrokallus gelişimi gözlenmemiştir. Buna göre agaroz konsantrasyonlarının mikrokallus oluşumunu olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır.



Resim 11. Modifiye edilmiş MS ortamlarında, farklı yoğunluklarda ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarının bölünmelerinin devam etmesi sonucu oluşan mikrokalluslar.

Protoplastlar 60x10 mm'lik petri kutularında ince bir tabaka halinde kültüre alındıklarında zamanla ortamda bulunan su buharlaşarak ortamın kurumasına neden olmaktadır. Kuruyan ortamda protoplastlar bölünerek mikrokallus oluşturmamaktadır. Ortamın kurumasını önlemek ve protoplastların bölünmesini teşvik etmek için protoplastlar kültüre alındıktan 7 gün sonra mikrokallus meydana gelinceye kadar her 3 günde bir sıvı kültür ortamı ile sulandırmanın hücre bölünmesini teşvik ettiği gözlenmiştir.

Kültüre alındıkları ortamlarda gelişen mikrokalluslar farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda oksin (1mg/l-2mg/l 2,4-D; 0.5mg/l IAA) ve organik maddeler (%7 buğday nişastası; 100 mg/l kazein hidrolizat; 500 mg/l glutamin; 150 mg/l asparagin) içeren MS ortamlarına aktarılmışlardır. Bu ortamlarda kültüre alınan mikrokalluslardan yaklaşık 4 hafta sonra gelişen kallusların % ağırlık artışları Şekil 11’de verilmiştir.



Şekil 11. Protoplastların bölünmeleri sonucu oluşan mikrokallusların modifiye edilmiş MS ortamlarında kallus gelişimleri (%)

MS1= MS+1 mg/l 2,4-D; **MS2** = MS+2 mg/l 2,4-D; **MS3** = MS+2 mg/l 2,4-D+0.5mg/l IAA; **MS4** = MS+2 mg/l 2,4-D+1mg/l IAA; **MS5** = MS+2mg/l 2,4-D+%7 buğday nişastası (agar yok); **MS6** = MS+2mg/l 2,4-D+100mg/l kazein hidrolizat+500mg/l glutamin; **MS7** = MS+2mg/l 2,4-D+100mg/l kazein hidrolizat+150mg/l asparagin

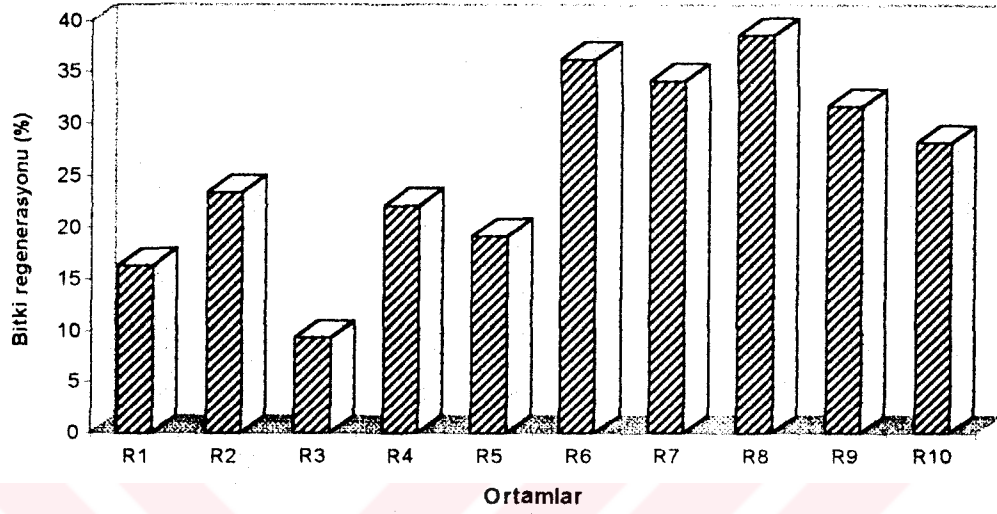
Şekil 11’e göre farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda oksin ve organik maddeler içeren MS ortamlarında kültüre alınan mikrokalluslarda en fazla gelişme MS + 2 mg/l 2,4-D+100 mg/l kazein hidrolizat ve 500 mg/l glutamin içeren MS6 ortamında meydana gelmiştir. Bunu MS + 2 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l IAA içeren MS3 ortamı izlemiştir. Bunun yanında MS + 2 mg/l 2,4-D

içeren MS2, MS + 2 mg/l 2.4-D +1 mg/l IAA içeren MS4 ve MS + 2 mg/l 2.4-D +100 mg/l kazein hidrolizat +150 mg/l asparagin içeren MS7 ortamlarında daha az kallus gelişimi olmasına rağmen MS3 ve MS7 ortamlarına göre önemli bir farklılık görülmemiştir. En düşük kallus gelişimi 1 mg/l 2.4-D içeren MS1 ve 2 mg/l 2.4-D + buğday nişastası içeren agarsız MS5 ortamlarında meydana gelmiştir. Buna göre ortama ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki oksinlerin ve organik maddelerin mikrokallusların gelişimini olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır.

4.7. Hücre Süspansiyon Kültürlerinden İzole Edilen Protoplastlardan Bitki Regenerasyonu

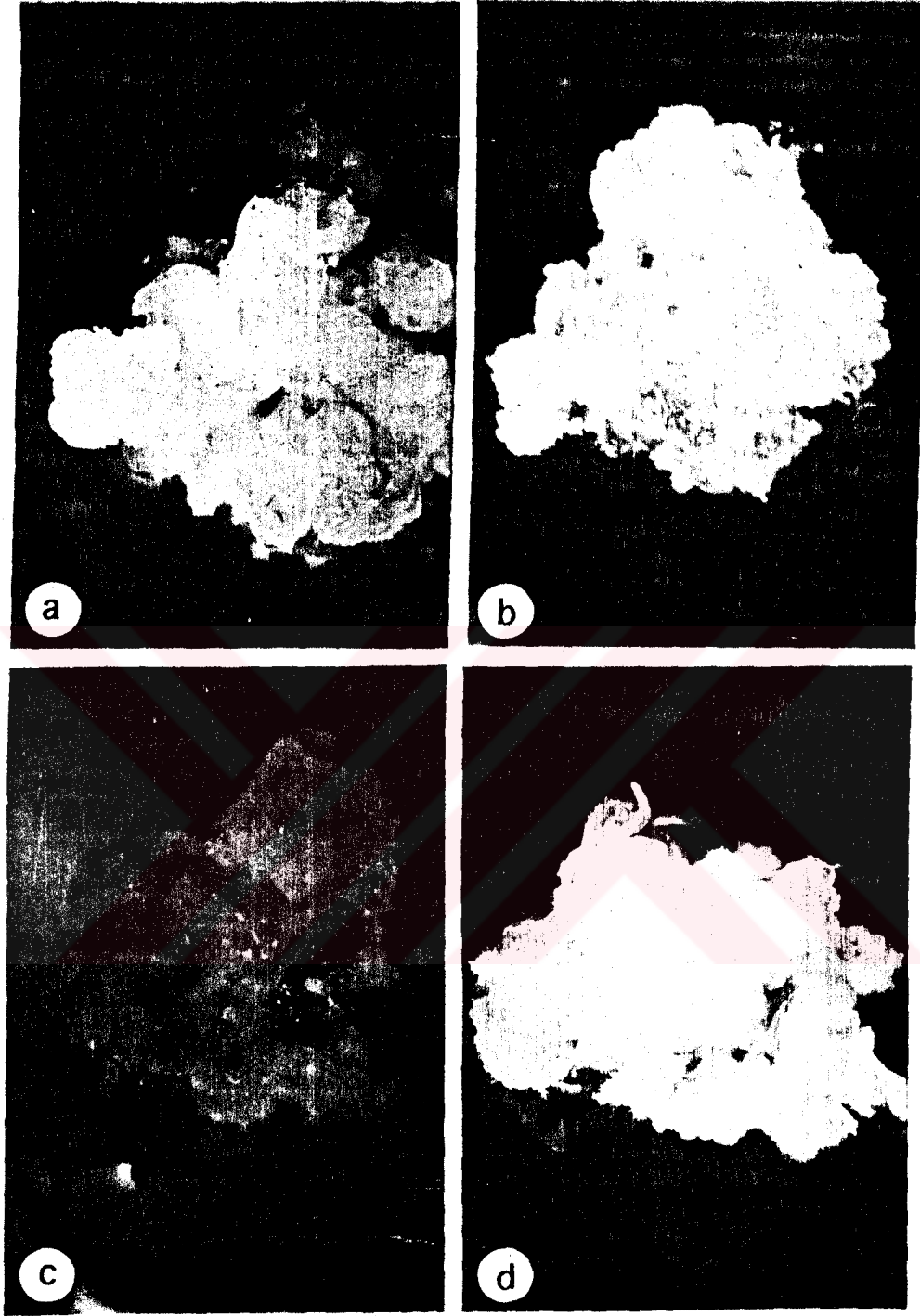
Hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilerek kültüre alınan protoplastlardan gelişen mikrokalluslar farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda IAA, BAP, kinetin ve NAA içeren MS ortamına aktarılmışlardır. Mikrokalluslardan oluşan % bitki regenerasyonu ile ilgili sonuçlar Şekil 12’de verilmiştir.

Şekil 12’de görüldüğü gibi en yüksek bitki regenerasyonu oranı %38.7 ile MS + 0.1 mg/l IAA + 1 mg/l BAP + 1 mg/l kinetin içeren R8 ortamında meydana gelmiştir. Bunu sırasıyla %36.3 ile MS + 0.1 mg/l 2.4-D + 1 mg/l BAP içeren R6; %34.2 ile MS + 0.1 mg/l IAA + 1.0 mg/l BAP içeren R7 ortamları izlemiştir. En düşük regenerasyon oranı %9.6 ile MS + 0.5 mg/l 2.4-D içeren R2 ortamında meydana gelmiştir. Mikrokalluslardan yaklaşık 14-16 hafta sonra yeşil embriyoidler (Resim 12) 16-20 hafta sonra da 0.5-1.0 cm uzunluğunda bitkicikler oluşmuştur (Resim 13). Ortama ilave edilen düşük konsantrasyonlardaki oksin miktarlarının bitki regenerasyonu oranını olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır.

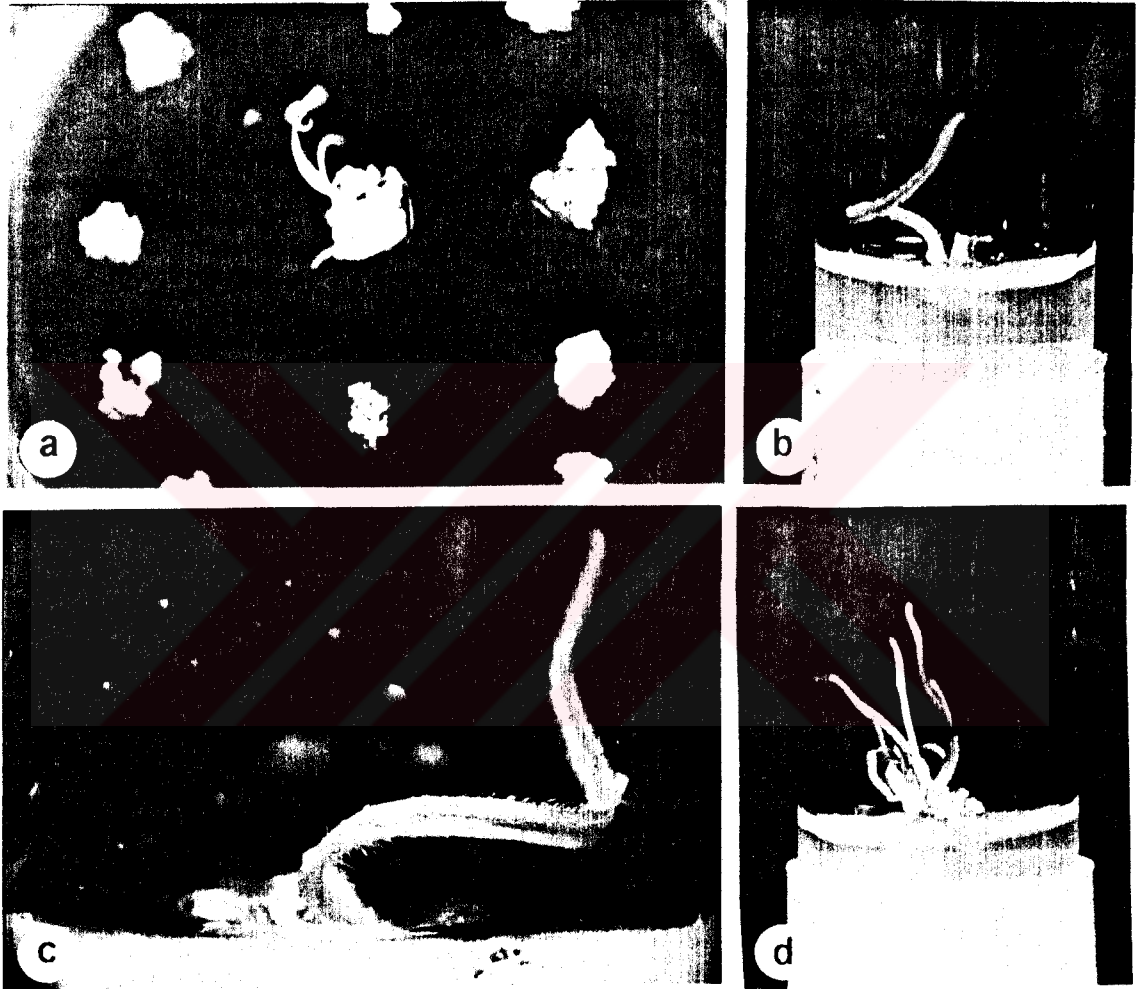


Şekil 12. Farklı konsantrasyonlarda 2,4-D, IAA, BAP, kinetin ve NAA içeren MS ortamlarında, embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlardan gelişen mikrokalluslardan % bitki regenerasyonu

R1= MS (hormonsuz); **R2** =MS + 0.1mg/l 2.4-D; **R3**=MS+0.5mg/l 2.4-D; **R4**=MS+0.1mg/l IAA; **R5**=MS + 0.1mg/l 2.4-D + 0.1mg/l IAA; **R6**=MS + 0.1mg/l 2.4-D+1.0 mg/l BAP; **R7**= MS + 0.1mg/l IAA + 1.0 mg/l BAP; **R8**= MS + 0.1mg/l IAA + 1.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l kinetin; **R9**= MS + 0.1mg/l IAA + 0.1mg/l NAA + 1.0 mg/l kinetin; **R10**= MS + 0.1mg/l NAA + 1.0mg/l kinetin + 1.0 mg/l BAP



Resim 12. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarından gelişen mikrokallusların, regenerasyon ortamında oluşturdukları embriyoidler.



Resim 13. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarından gelişen mikrokallusların regenerasyon ortamında oluşturdukları bitkicikler

4.8 Yaprak Mezofil Dokularından Protoplast İzolasyonu

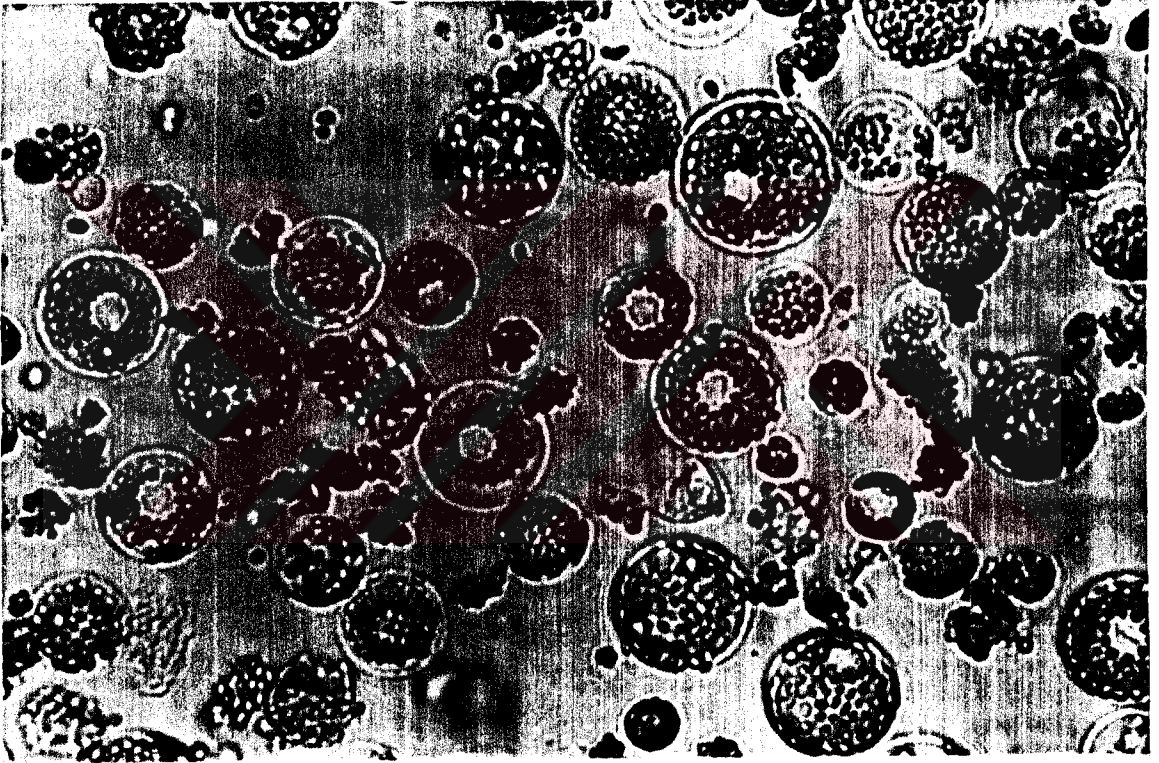
Enzim solusyonu içerisinde 1, 3 ve 5 dakika süre ile vakum uygulandıktan sonra 25 ± 1 °C'de, 1500 lüks ışık altında inkübe edilen yapraklardan, 3, 5 ve 7. saatlerde örnekler alınarak izolasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, gerçekleşti ise hangi oranlarda gerçekleştiği takip edilmiş ve alınan sonuçlar Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6. Yaprak mezofil dokularından protoplast izolasyonunda kullanılan enzim solusyonunun (W), farklı vakum uygulama zamanlarında protoplast verimliliğine olan etkileri.

Zaman (saat)	Vakum uygulama süresi (dakika)	Bir görüş alanında görülen protoplast sayısı (x40)
3	1	13
	3	18
	5	21
5	1	24
	3	38
	5	32
7	1	47
	3	63
	5	43

Çizelge 6'da görüldüğü gibi inkübasyonun 3, 5 ve 7. saatlerinde alınan örneklere göre en yüksek protoplast izolasyonunu 3 dakika süre ile vakum uygulanan ve 7 saat süre ile inkübe edilen enzim solusyonundan elde edilmiştir (Resim 14). Bunu 1 dakika süre ile vakum uygulanan ve 7 saat süre ile inkübe edilen enzim solusyonu izlemiştir. 3 ve 5 dakika süre ile vakum uygulanan ve 5 ve 7 saat süre ile inkübe edilen enzim solusyonlarında daha düşük protoplast izolasyonu gerçekleşmesine rağmen uygulamalar arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. En düşük protoplast izolasyonu 1 dakika süre ile vakum

uygulanan ve 3 saat süre ile inkübe edilen enzim solusyonunda meydana gelmiştir. 1 gram yapraktan bitkinin fiyolojik durumuna bağı olarak $6-7 \times 10^5$ protoplast izole edilebilmiştir. Enzim çözeltisinde yaprak parçalarına vakum uygulama süresinin ve inkübasyon süresinin protoplast izolasyon oranını etkilediğı sonucuna varılmıştır.



Resim 14. Buğday yaprak mezofil dokularından izole edilen protoplastlar.

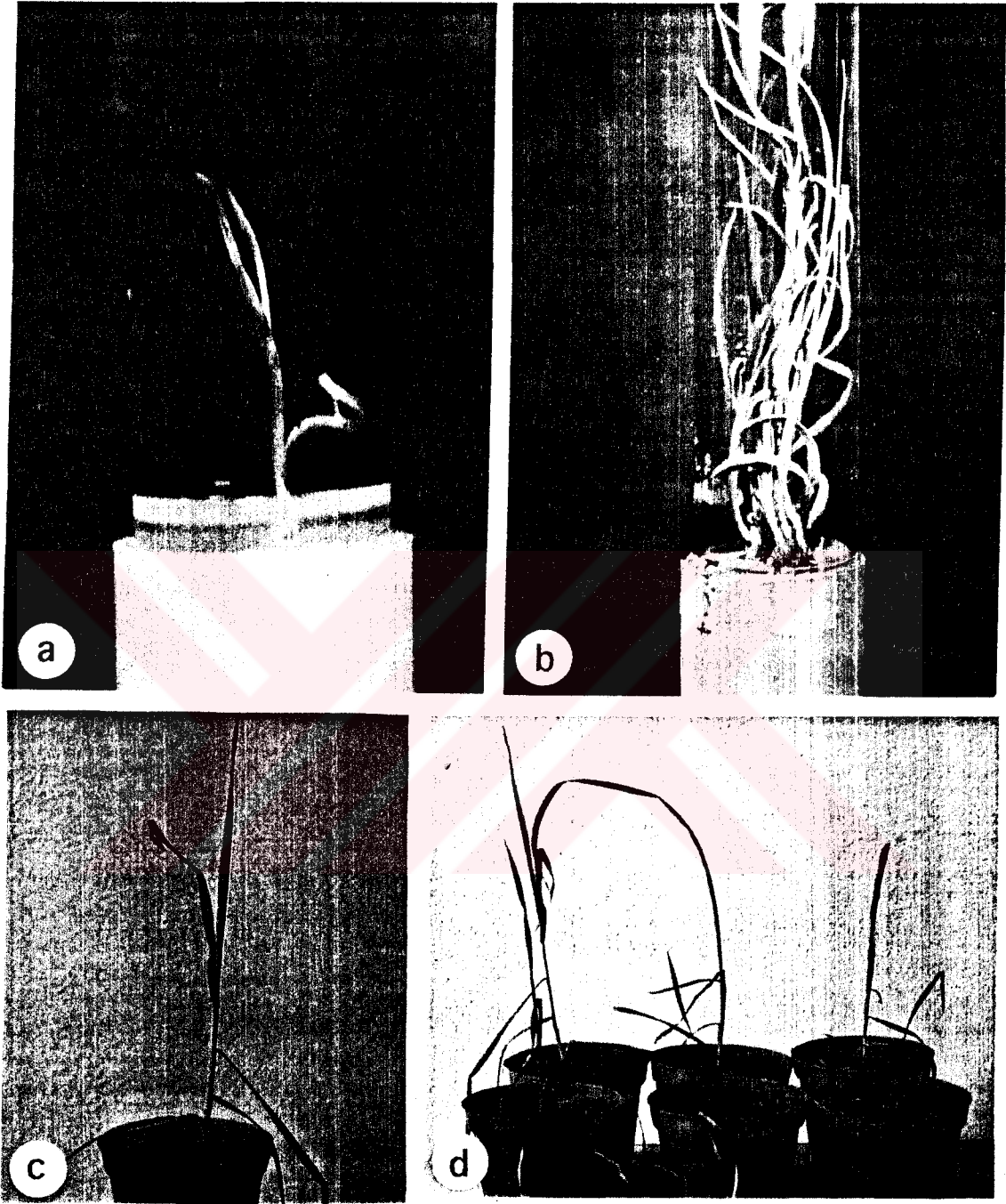
4.9. Yapraklardan İzole Edilen Mezofil Protoplastlarının Kültürü

İzolasyonu yapılarak yoğunlukları 0.5×10^4 ve 1.0×10^4 protoplast/ml olacak şekilde ayarlanmış olan mezofil protoplastları sıvı, %0.3, %0.6 ve %1.2 konsantasyonlarda agaroz + (0.5 ve 1.0) mg/l 2.4-D + 0.5 M sorbitol içeren MS ve B5 ortamlarında kültüre alınarak 25 ± 1 °C'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Bu şekilde kültüre alınan mezofil protoplastlarında hücre duvarı oluşumu ve bölünme meydana gelmemiş, kültüre alındıktan 7-10 gün sonra kahverengileşerek canlılıklarını kaybetmişlerdir.

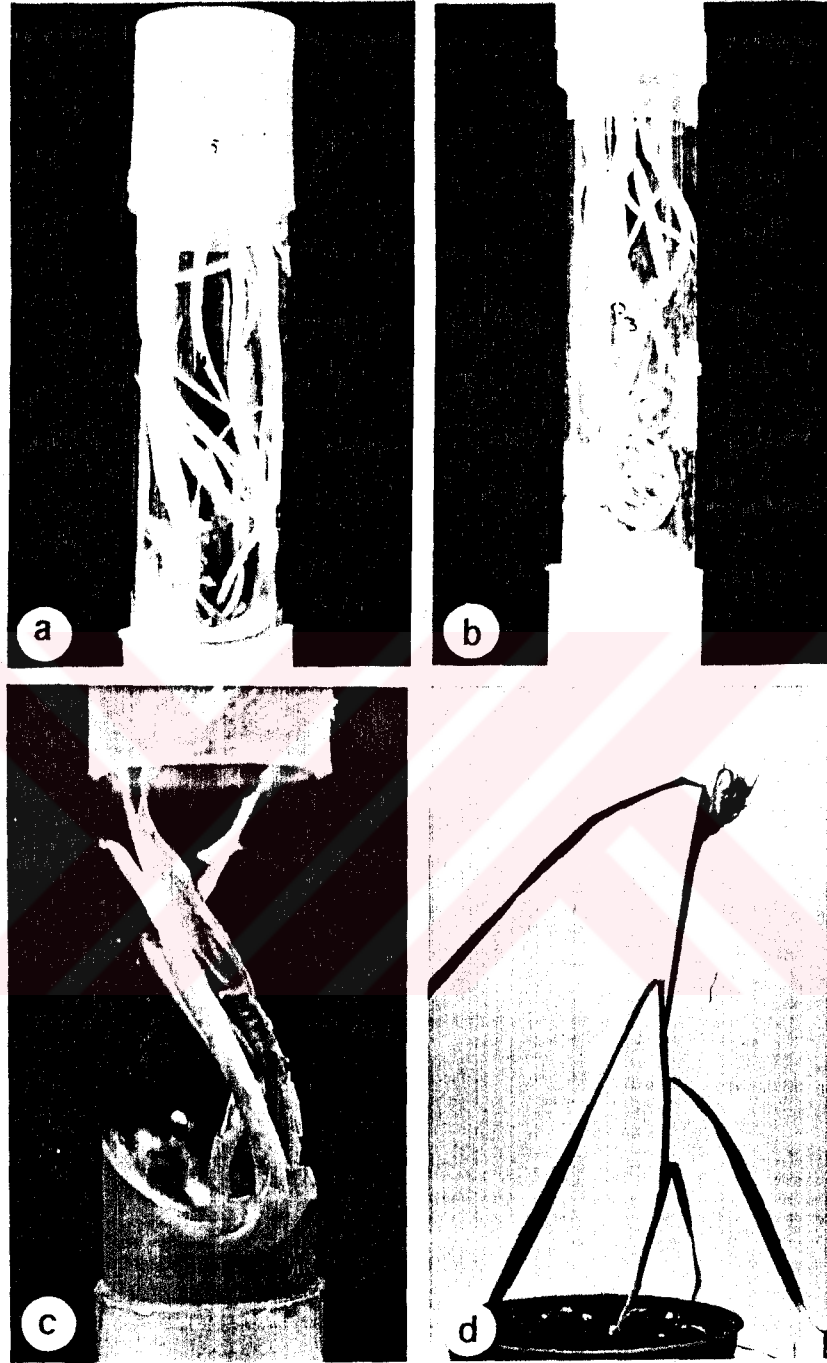
4.10. Protoplastlardan Regenere Edilen Bitkilerde Kromozom Sayımı

Hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlardan regenere edilen, morfolojik olarak normal (Resim 15) ve anormal (Resim 16) görünümlü toplam 20 bitkinin kök uçlarından preparatlar hazırlanmış ve kromozom sayıları tesbit edilmiştir.

Metafaz safhasında tesbit edilen her bitkiye ait 10 hücrenin kromozomları sayılmıştır. Kromozom sayımı yapılan bütün örneklerin $2n=42$ kromozom sayısına sahip oldukları tesbit edilmiştir (Resim 17). Buna göre hücre süspansiyon kültürü hücrelerinden izole edilen protoplastlardan regenere edilen bitkilerde kromozom sayısı yönünden varyasyonların bulunmadığı sonucuna varılmıştır.



Resim 15. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarından regenere edilen morfolojik olarak normal görünümlü bitkiler. a,b)*in vitro*'da gelişen sürgünler, c,d) toprağa aktarılmış bitkiler



Resim 16. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarından regene edilen morfolojik olarak anormal görünümlü bitkiler. a) albino bitki, b) aşırı kardeşlenme, c) yaprak ayası genişliği, d) erken dönemde içi boş başakçık.

4.11. Hücre Süspansiyon Kültürü Hücrelerinde Kromozom Sayımı

Hücre süspansiyonu altkültürünün 5. gününde alınıp preparatlar hazırlanan hücrelerde kromozom sayımları yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 7’de verilmiştir.

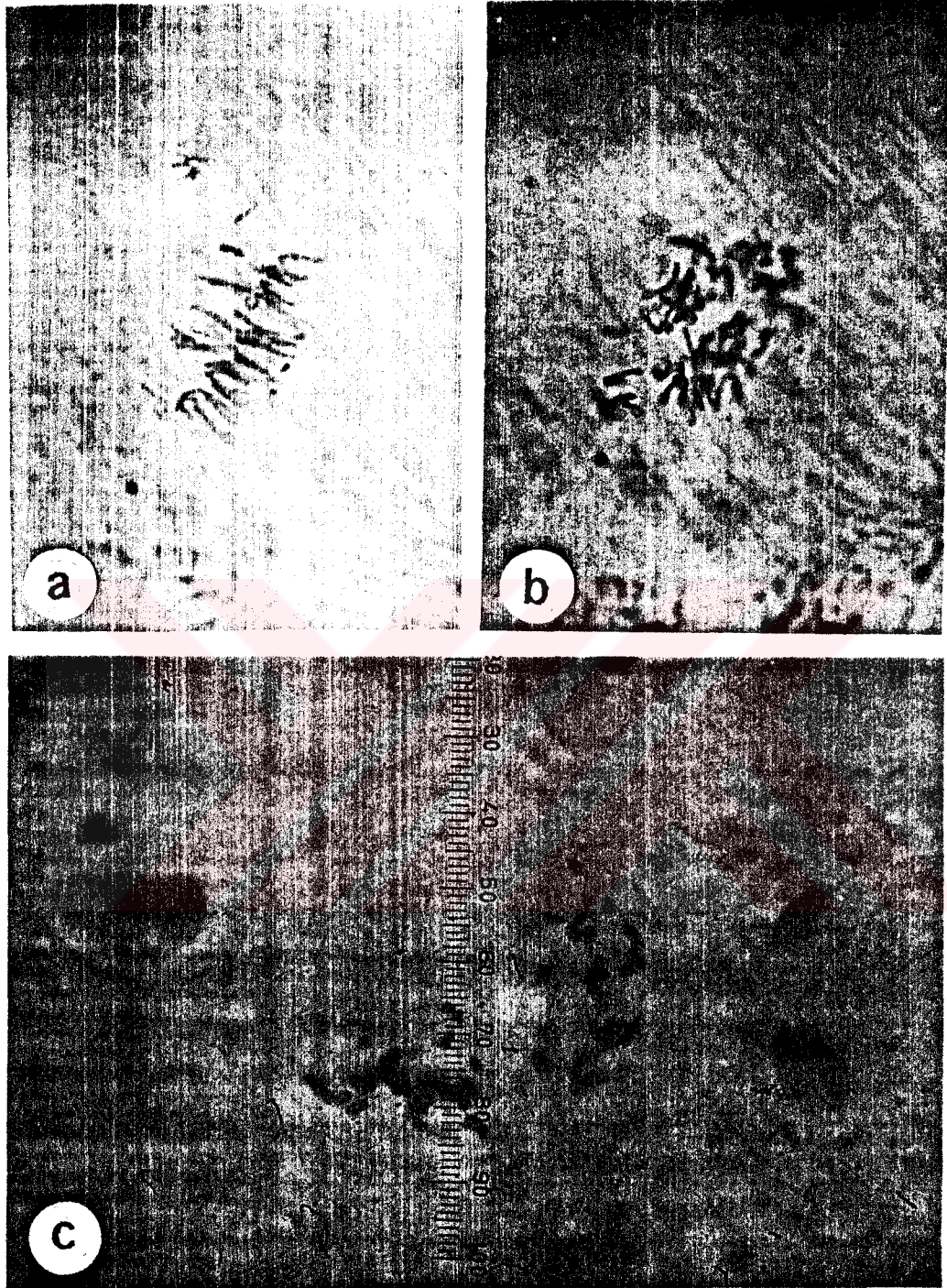
Çizelge 7. Hücre süspansiyon kültürü hücrelerinin kromozom sayıları

Hücre Sayısı (adet)	Kromozom Sayısı (adet)
6	11
9	21
7	33
4	35
23	42
1	84

Çizelge 7’de görüldüğü gibi hücre süspansiyon kültürü hücrelerinden hazırlanan preparatlarda metafaz safhasında tesbit edilen 50 hücrede yapılan kromozom sayımlarında 6 hücrede 11 kromozom, 9 hücrede 21 kromozom, 7 hücrede 33 kromozom, 4 hücrede 35 kromozom, 23 hücrede 42 normal kromozom (Resim 18) , 1 hücrede ise 84 kromozom sayısı tesbit edilmiştir. Buna göre kromozom sayımları yapılan hücrelerin yaklaşık %52’sinde kromozom sayısı eksiklikleri, %46’sında $2n=42$ normal kromozom sayısı, %2’sinde ise kromozom sayısı fazlalığı bulunmaktadır. Elde edilen bu değerlere göre hücre süspansiyon kültürü hücrelerinde kromozom sayısı yönünden oldukça yüksek oranda varyasyonların bulunduğu sonucuna varılmıştır.



Resim 17. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü protoplastlarından regenere edilen bitkilerin kromozomları



Resim 18. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürü hücreleri kromozomları, a,b) kromozom eksiklikleri, c) kromozom fazlalığı

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Geçmiş yıllarda tahıllarda (buğday, mısır, çeltik) ve diğer bitkilerde tarımsal açıdan önemli karakterlerin iyileştirilmesi açısından önemli aşamalar kaydedilmiştir (LÖRZ ve ark., 1988). Hızla artan dünya nüfusu karşısında ortaya çıkan gıda ihtiyacı bitki ıslahçıları yeni teknolojiler geliştirmeye yöneltmiştir. Günümüzde bitki ıslahında uygulanmaya başlayan teknolojilerin başında biyoteknoloji gelmektedir. Bitki ıslahında biyoteknolojik yöntemlerin uygulanabilmesindeki başarı doku ve hücre kültürlerinden bitki regenerasyonuna bağlıdır (REDWAY ve ark., 1990).

Doğal genetik mühendis olarak da adlandırılan *Agrobacterium* aracılığı ile tahıllara gen transferinin sınırlı olması nedeniyle, üstün özelliklere sahip transgenik tahıllar elde edebilmek için alternatif metodlar geliştirilmiştir. Farklı özelliklere sahip iki bitkiden izole edilen iki protoplastın fiziksel ve kimyasal yöntemlerle birleştirilmesi (somatik hibridizasyon), protoplastlara elektroporasyon ve mikroinjeksiyonla genlerin aktarılması, partikül bombardımanı ile genlerin bitki hücre ve dokularına sokulması gibi son yılların en güncel biyoteknolojik yöntemlerinin uygulanabilmesi tahıllarda kallus-protoplast-bitki sisteminin kurulmasına bağlıdır (LEE, 1990).

Bu tür uygulamaları yapabilmek için embriyogenik kallus kültürlerinin elde edilmesi gerekmektedir. Monokotiledon bitkilerin en önemlisi olan buğdayda embriyogenik kallus kültürlerinin elde edilmesinde, olgunlaşmamış embriyo, olgun embriyo ve olgunlaşmamış başakçık gibi bitki dokuları kullanılmaktadır. Olgunlaşmamış embriyolar ve başakçıklar embriyogenik kallus kültürleri elde edilmesinde olumlu sonuçlar vermektedir. (VASIL ve ark., 1990).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada embriyogenik kalluslar elde etmek için değişik konsantrasyonlarda 2,4-D (1mg/l, 2mg/l, 3mg/l, 5mg/l) içeren MS ortamları kullanılmış ve en iyi sonucu 2mg/l ve 3mg/l 2,4-D içeren MS ortamları

vermiştir. Olgunlaşmamış embriyolardan embriyogenik kallus elde edilmesi konusunda çalışma yapan bir çok araştırmacı 2mg/l 2,4-D içeren MS ortamı kullanarak bu konuda etkin sonuçlar almışlardır (MOROZOVA ve ark.,1988; LIU,1988; ZHENG ve ark.,1989; VASIL ve ark., 1990; ITO ve ABE,1990; LI ve ark.,1992). Bunun yanında SEARS ve DECKARD,(1982), MADDOCK ve ark.,(1983) 1 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda, OHNOUTKOVA ve NOVAK,(1985) 5mg/l 2,4-D içeren ortamlarda yüksek oranda kallus oluşumu elde ettiklerini belirtmişlerdir. *In vitro* doku kültürlerinde ortama ilave edilen hormonlarla bitki dokusu içerisinde oluşan endojen hormonlar arasında sıkı bir ilişkinin olduğu bilinmektedir. Buğday embriyolarından embriyogenik kallus oluşumunda ortama ilave edilen 2,4-D miktarının da etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır (LAZAR ve ark., 1983; HEYSER ve ark., 1985; BARABANOVA ve BANNIKOVA, 1990). Birçok araştırmacı tarafından farklı 2,4-D konsantrasyonları kullanılarak, farklı sonuçlar elde edilmesi, bitki materyalinin genotipine, eksplantın endojen ve eksojen hormon içeriğine göre değişim göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Embriyogenik kallus oluşturmak amacıyla kültüre alınan olgunlaşmamış embriyoların, döllenmenin gerçekleşmesinden sonra kültüre alma zamanı embriyogenik kallus oluşumu bakımından önemli bir kriterdir. Bu nedenle döllenmenin gerçekleşmesinden itibaren farklı zamanlarda kültüre alınan olgunlaşmamış buğday embriyolarından embriyogenik en üst düzeyde kallus oluşumu döllenmeyi takip eden 15 ve 18. günlerde kültüre alınan embriyolardan elde edilmiştir. Bu konuda daha önce çalışma yapan araştırmacılar (ZHENK ve SEILLEUR,1985; PAPENFUE ve CARMAN, 1987; ORSHINSKI ve MCHUGHEN, 1987; MOROZOVA, 1988; BARABANOVA ve ark., 1988; CHOWDHURY ve ark.,1991) döllenmeyi takiben 14. ve 22. günlerde alınıp kültüre alınan olgunlaşmamış buğday embriyolarından uygun embriyogenik

kalluslar elde etmişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz bu çalışmada döllenen sonraki 14. ile 18. günlerde kültüre alınan olgunlaşmamış embriyoların embriyogenik kallus oluşumu bakımından iyi sonuç vermesi adı geçen araştırmacıların sonuçları ile uyum içerisinde olduğunun bir göstergesidir.

Farklı ortamların olgunlaşmamış embriyolardan embriyogenik kallus oluşumuna etkisini saptamak için MS, LS, B5, N6 ortamları denenmiş ve dört haftalık inkübasyon süresi sonunda en yüksek kallus oluşumunun MS ortamında meydana geldiği gözlenmiştir. Araştırmada kullanılan MS ve LS ortamları diğer ortamlardan farklı olarak amonyum nitrat (NH_4NO_3), B5 ve N6 ortamları ise diğer ortamlardan yaklaşık 1.5 kat daha fazla potasyum nitrat (KNO_3) içermektedirler. Ayrıca B5 ve N6 ortamlarının kalsiyum klorür (CaCl_2) içerikleri MS ve LS ortamlarının yaklaşık yarısı kadardır. B5 ortamı hiç potasyum fosfat (KP_2O_5) içermezken N6 ortamı, MS ve LS ortamlarının yaklaşık iki katı potasyum fosfat içermektedir. Kültür ortamlarının makro element konsantrasyonunun olgunlaşmamış embriyodan embriyogenik kallus eldesinde oldukça etkili olduğu bilinmektedir (HE ve ark., 1989). Bu nedenle kullanılan dört değişik ortamın kallus oluşumu bakımından farklı sonuçlar vermesi beklenen bir sonuç olarak algılanması gerekir. Buna benzer daha önce yapılan çalışmalarda (OZIAS-AKINS ve VASIL, 1982; SIDOROVA ve ark., 1988; ITO ve ABE, 1990) olgunlaşmamış embriyolardan embriyogenik kallus elde edilmesinde kültüre aldıkları ortamlardan en iyi sonucu MS ortamında almışlardır. Adı geçen araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar bu çalışmada MS ortamlarında kültüre alarak elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. MS ortamı üzerinde diğer ortamlara oranla daha fazla embriyogenik kallus oluşumunun meydana gelmesi içerdiği makro element konsantrasyonlarından kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Olgunlaşmamış buğday embriyolarından embriyogenik kallus oluşumuna kültür ortamına ilave edilen organik maddelerin etkilerini belirleyebilmek

amacıyla embriyolar farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda organik maddeler içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlar, sonuçta bütün çeşitler farklı oranlarda kallus oluşturmuşlardır. En düşük kallus oluşumu MS + 1mg/l 2,4-D içeren MS1 ortamında gerçekleşmiştir. Olgunlaşmamış embriyoların kültüre alındıkları diğer ortamlarda hem 2,4-D miktarının hem de ilave edilen organik maddelerin embriyogenik kallus oluşumunu olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Beş çeşid arasında kallus oluşumu yönünden tüm ortamlarda da en iyi sonucu Seri 82 çeşidi vermiştir. Aynı ortamlar üzerinde kültüre alınan farklı çeşidlerin farklı oranlarda embriyogenik kallus oluşturmalarının genotipik özelliklerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda çalışma yapan SEARS ve DECKARD,(1982); LAZAR ve ark.,(1982) KARADIMOVA ve ERIKSON, (1986); LIU, (1988); REDWAY ve ark., (1990); CHEVRIER ve ark.,(1990) embriyogenik kallus oluşumunda genotipten kaynaklanan farklılıkları bulunabileceğini belirtmişlerdir. Ortamlara ilave edilen organik maddeler arasında kazein hidrolizat ve glutamin özellikle MS ortamında olumlu sonuçlar vermiştir. Bu konuda RAJYALAKSMI ve ark., (1988); REDWAY ve ark. (1990); tarafından ortama ilave edilen farklı organik maddelerin kallus oluşumuna olan etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, kazein hidrolizat ve glutaminin embriyogenik kallus oluşumunu olumlu yönde artırdığını belirtmektedirler.

Çeşitli uygulamalar sonucu elde edilen beyaza yakın renkte, kırılkan ve hızlı gelişen embriyogenik kalluslar farklı organik maddeler içeren MS ortamlarında kültüre alınarak kallus ağırlık artışları belirlenmiştir. Kültüre alınan 5 buğday çeşidinin embriyogenik kallusları kültüre alındıkları bütün ortamlarda farklı oranlarda kallus gelişimi göstermişlerdir. En üst düzeyde kallus gelişimi MS7 ortamında Seri 82 çeşidinde görülmüştür. Buğday embriyolarından elde edilen kallusların embriyogenik kapasiteye sahip olmalarının en önemli

göstergelerinden birinin kültüre alındıkları ortamlarda hızlı gelişmeleri olduğu ileri sürülmektedir (MOROZOVA, 1988; REDWAY ve ark., 1990; YANG ve ark., 1991). Yapılan bu çalışmada farklı genotiplerden elde edilen kallusların farklı ortamlarda kültüre alınması ile hızlı gelişen embriyogenik kallusların seçimi de bu suretle kolaylaşmıştır. Kültüre alınan ortamlar içerisinde en fazla kallus gelişimi kazein hidrolizat, glutamin ve asparagin içeren ortamda meydana gelmiştir. Ortama ilave edilen organik maddeler ve ortamın içerdiği elementlerin konsantrasyonları kallus gelişimini olumlu yönde etkilemiştir. Kültüre alınan kalluslar 10x2.5 cm'lik deney tüplerinde altkültürleri yapılarak kallus ağırlıkları alınmıştır. Petri kutularında kültüre alınan kalluslar ile tüplerde kültüre alınan kallusların gelişimleri de farklı olmaktadır. Bu nedenle kallusların kültüre alındıkları kapların özellikleri de kallus gelişiminde doğrudan etkili olabilmektedir. SEARS ve DECKARD,(1982), SHAEFFER ve ark. (1984), PAPENFUS ve CARMAN, (1987) olgunlaşmamış embriyolardan elde ettikleri kallusları farklı ortamlarda kültüre almışlar ve 240 mg ile 2000 mg arasında değişen oranlarda kallus ağırlık artışı elde etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada farklı organik maddeler içeren ortamlar üzerinde ve tüplerde kültüre alınan embriyogenik kalluslardan 1800 mg'a kadar değişen miktarda kallus ağırlık artışı elde edilmiştir. Bazı farklılıklarla birlikte almış olduğumuz sonuçlar bu konuda önceden yapılmış olan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyum içerisinde.

Elde edilen embriyogenik kallusların kallus ağırlığı artışına ortam şartlarının etkisini belirlemek amacıyla farklı organik maddeler içere MS ortamlarında kültüre alınan kalluslar, karanlık ve 16 saat aydınlık-8 saat karanlık koşullarda inkübe edilmişlerdir. Sonuçta karanlık koşullarda inkübe edilen kalluslar daha fazla kallus ağırlığı artışı meydana getirdikleri gözlenmiştir. Işık koşullarında inkübe edilen kallus hücrelerinde klorofil oluşumu teşvik edilmekte, bu da kallus gelişimini yavaşlatmaktadır. PAPENFUS ve CARMAN, (1987)

tarafından yapılan çalışmada karanlık koşulların kallus gelişimini ve bitki regenerasyonu oranının arttığını, aydınlık koşulların ise bitki regenerasyon oranını azalttığını bildirmişlerdir. Bunun yanında LAZAR ve ark.,(1983) ve OHNOUTKOVA ve NOVAK, (1985) kallus gelişimine genotipin ve ortama ilave edilen hormon miktarlarının yanında değişik *in vitro* koşullarının da etkili olduğunu bildirmişlerdir. Adı geçen araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar ile, bu konuda elde ettiğimiz sonuçlar benzer bulunmuştur.

Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda olgun buğday embriyolarından embriyogenik kallus elde edilmesinde pek başarı sağlanamamıştır. Embriyogenik kallus elde etmek amacıyla birçok araştırmacı tarafından olgunlaşmamış embriyo ve başakçıklar eksplant olarak kullanılmıştır (OHNOUTKOVA ve NOVAK, 1985; MOROZOVA, 1988; REN ve ark., 1989; YANG ve ark., 1991; PAUK ve SZARKA, 1991).

ZAHANG ve SEILLEUR, (1985) sekiz buğday çeşidinin olgun embriyo, olgunlaşmamış embriyo ve çeşitli gövde parçalarının kallus oluşturmak amacıyla kültüre alındığını ve genotipe göre değişmekle birlikte olgunlaşmamış embriyolardan daha yüksek oranda embriyogenik kallus elde edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda olgun buğday embriyolarından embriyogenik kallus elde etmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda 2,4-D (1mg/l, 3mg/l, 5mg/l, 8mg/l) içeren MS ortamı kullanılmış ve inkübasyon süresi sonunda 5mg/l ve 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarında düşük oranda da olsa kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre olgun embriyolardan kallus oluşumu çeşitlere göre %0 ile %26.6 arasında değişim gösterirken, olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşum oranı %0 ile %71.8 arasında olmuştur. Olgun embriyolar ile olgunlaşmamış embriyoların kültüre alındıkları genotipler, ortamlar ve kültür koşulları aynı olduğu halde kallus oluşumu yönünden meydana gelen bu farklılıkların eksplantın (embriyonun) yaşından

kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. EAPEN ve RAO, (1982); LAZAR ve ark., (1985); BUTENKO ve ark., (1986); TUBEROSA ve ark., (1988); AVENIDO ve ark., (1988) olgun buğday embriyolarından düşük oranda da olsa kallus elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu konuda çalışma yapan OVESNA ve LHOTOVA, (1987) ise olgun embriyolardan elde ettikleri kallusların embriyogenik olmadıklarını belirtmişlerdir. Olgun embriyolardan kallus oluşumunun diğer bitki materyallerine oranla daha düşük olmasının olgun embriyolarda metabolik aktivitelerin minimum seviyede olmasından kaynaklandığı düşünülerek yaptığımız çalışmada hem 2,4-D konsantrasyonu artırılmış hemde embriyolar danelerden sadece tohum kabuğu ile bağlantısı kalacak şekilde kesilerek kültüre alınmıştır. Bu konuda çalışma yapan diğer araştırmacılar farklı olarak uygulanan bu işlem olgun embriyolardan kallus elde etmemizi sağlamıştır.

Olgun embriyolardan kallus oluşumuna kültüre alındıkları farklı ortamların etkilerini belirleyebilmek amacıyla 5 mg/l 2,4-D içeren MS, LS, B5, N6 ortamlarında kültüre alınmışlar ve kültüre alındıkları bütün ortamlar içerisinde en iyi sonucu MS ve B5 ortamları vermiştir. OHNOUTKOVA ve NOVAK, (1985); HEYSER ve ark. (1985) 5mg/l ve 10 mg/l 2,4-D içeren ortamlar üzerinde olgun buğday embriyolarını kültüre aldıklarını ve kallus oluşumu yönünden en iyi sonucu MS ortamında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre olgun buğday embriyolarından embriyogenik kallus oluşumunda 2,4-D konsantrasyonun ve embriyonun yaralanmasının yanında kültüre alındıkları ortamın makro ve mikro element içeriğinin de etkili olduğu ortaya çıkmıştır.

Kültüre alındıkları ortama ilave edilen organik maddelerin olgun buğday embriyolarından kallus oluşumuna olan etkilerini belirlemek amacıyla farklı organik maddeler içeren MS ortamları üzerinde beş buğday çeşidinin olgun

embriyoları kültüre alınmış ve en fazla kallus oluşumu kazein hidrolizat ve glutamin içeren özellikle MS (çift konsantrasyon) ortamlarında meydana gelmiştir. RAJYALAKSMI ve ark.,(1988); REDWAY ve ark., (1990) olgunlaşmamış buğday embriyolarını farklı organik maddeler içeren ortamlarda kültüre almışlar ve ortama ilave edilen organik maddelerin kallus oluşumunu olumlu yönde etkilediklerini bildirmişlerdir. Bu konuda elde ettiğimiz sonuçlara göre ortama ilave edilen organik maddelerin olgunlaşmamış embriyolarda olduğu gibi olgun embriyolarda da kallus oluşumunu artırmıştır. Olgun embriyolardan kallus oluşumu üzerine ortamın makro ve mikro element konsantrasyonlarının yanında organik madde içeriğinin de oldukça etkili olduğu ortaya çıkmıştır.

Olgun ve olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kallusların embriyogenik kapasitede olması gerekmektedir. Her iki tip embriyodan da embriyogenik kallus oluşumu üzerine birçok faktörün yanında kültüre alınmaları sırasında tanenin ortam yüzeyine temas etme şekline göre de değişim göstermektedir. Embriyogenik kallus elde etmek amacıyla kültüre alınan tanenin karın çizgisi ortam yüzeyine temas edecek şekilde yerleştirildiğinde skutellar bölgeden kallus teşvik edilmektedir. Skutellar bölgeden oluşan kalluslar ise beyaza yakın renkte, kırılgan, hızlı gelişen ve embriyogenik kapasiteleri yüksek kalluslardır. Kültüre alınan tanenin karın çizgisi yukarıya gelecek şekilde ortam yüzeyine yerleştirildiğinde ise epiblast bölgeden kallus gelişimi teşvik edilmekte, epiblast bölgeden oluşan kalluslar ise sarıya yakın renkte, kompakt, yavaş gelişen ve sadece kök regene olabilen kalluslar olmaktadır.

Monokotiledon kültür bitkilerinde protoplast izolasyonu, embriyogenik kalluslardan kurulan hücre süspansiyon kültürlerinden yapılmaktadır. Hücre süspansiyon kültürleri kallus kültürlerine göre protoplast verimliliği açısından daha olumlu sonuçlar vermektedir. Bunun başlıca nedenleri arasında süspansiyon kültürü içerisindeki hücrelerin küçük agregatlar şeklinde bulunması, bu nedenle

de daha büyük hücre agregatları halinde bulunan kalluslara göre enzim solusyonu içerisinde küçük agregatlar şeklinde olan hücrelerin hücre duvarının enzimlerden daha kolay etkilenmesi söz konusudur. Ayrıca kallus kültürlerinde hücrelerin ortamdan yararlanması homojen olmadığı için kallusu oluşturan hücreler arasında gelişim farklılıkları ortaya çıkarken hücre süspansiyon kültürlerinde hücrelerin ortamdan yararlanması eşit olacağı için hücre duvarı yapısı bakımından farklılıklar olmayabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı monokotiledonlarda protoplast izolasyonu ile çalışan bütün araştırmacılar hücre süspansiyon kültürlerinden yararlanarak protoplast izolasyonunu yeğlemektedirler.

Protoplast izolasyonunda bitki materyali olarak kullanılmak üzere Seri 82 buğday çeşidinin olgunlaşmamış ebriyolarından elde edilen beyaza yakın renkte, kırılğan, hızlı gelişen embriyogenik kalluslardan kurulan hücre süspansiyon kültürlerinde hücre hacimi artışları (% PCV) belirlenmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerinin sıvı kültür ortamlarına ilave edilen farklı organik maddelerin hücre hacimi artışına olan etkisini belirlemek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda organik maddeler içeren sıvı MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Hücre süspansiyon kültürünün 3,5,7 ve 9. günlerinde alınan örnekler hacim hesabına göre değerlendirilmiş ve en fazla hücre artışının kazein hidrolizat, glutamin ve asparagin içeren sıvı MS ortamlarında meydana geldiği belirlenmiştir. Bu çalışmada ortama ilave edilen organik maddeler kallus gelişiminde meydana getirdikleri artışlara paralel olarak hücre süspansiyon kültürü hücrelerinde de artış meydana getirmişlerdir. Bu konuda benzer çalışmalar yapan QIAO ve ark. (1992); PAUK ve ark.,(1994) hücre süspansiyon kültürü ortamlarına ilave edilen organik maddelerin hücre gelişimini olumlu yönde etkilediklerini bildirmişlerdir. Hücre süspansiyon kültürlerine ilave edilen organik maddelerin hücre gelişimlerine olan etkileri kültüre alındıktan sonraki farklı zamanlarda görülmeye başlamıştır. Organik maddelerin hücre kültürlerindeki etki süreleri organik

maddenin türüne göre de değişim göstermiştir. Örneğin glutamin hücre süspansiyon kültürüne ilave edilip inkübe edildikten sonraki 3. günden itibaren hücre artışını olumlu yönde etkilemesine karşın asparaginin bu etkisi daha çok 7. günden itibaren görülmeye başlamıştır. Bu da hücre süspansiyon kültürü hücrelerinin gelişimleri üzerine ortama ilave edilen farklı organik maddelerin farklı zamanlarda etkili oldukları sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Hücre süspansiyon kültürü hücrelerinin gelişimlerine inkübe edildikleri çalkalayıcının hızı da önemli bir etkindir. Hücre süspansiyon kültürlerinin inkübe edildikleri çalkalayıcının hızları bitki türüne göre değişebilmektedir. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar 150 rpm’de dairesel çalışan çalkalayıcılar üzerinde inkübe edilen hücre süspansiyonlarında elde edilmiştir. Bununla birlikte hücre süspansiyon kültürlerinin hücre gelişimleri üzerine kültür kaplarının da oldukça etkili oldukları bilinmektedir. Hücre süspansiyon kültürleri 100 ml’lik erlenler içerisinde kültüre alınmış ve her altkültür sırasında kültür kapları yenilenmiştir. Aynı kültür kabında altkültüre alındıklarında ise hücre gelişiminde gözle görülür bir azalmanın meydana geldiği gözlenmiştir.

Buğdayın embriyogenik kalluslarından kurulan hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonunda birçok araştırmacı tarafından farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarla enzim solusyonları kullanmışlardır (VASIL ve ark., 1990; PAUK ve SZARKA, 1991; QIAO ve ark., 1991; DZHARDEMALIEV ve ark., 1992). Bu çalışmada embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonunda V,P,Q ve D olmak üzere dört farklı enzim solusyonu kullanılmıştır. Kullanılan enzim çözeltilerinden DZHARDEMALIEV ve ark.(1992) tarafından kullanılan (D) enzim çözeltisi hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonunda iyi sonuç vermemiştir. En yüksek protoplast izolasyonu VASIL ve ark., (1990) tarafından kullanılan (V) enzim çözeltisinden elde edilmiştir. Protoplast izole etmek amacıyla hücre

süspansiyon kültürlerinden alınan hücrelerin, alındıkları zaman protoplast veriminde oldukça önemlidir. Hücre bölünme fazının en yüksek ve hücre agregatlarının en az olduğu, hücre süspansiyon kültürünün 3. ve 5. günlerinde alınıp izole edilen hücrelerde protoplast verimi daha yüksek olmaktadır. Hücre süspansiyon kültürünün 7. ve daha sonraki günlerinde alınan hücrelerde hücre agregatları daha büyük olduğundan enzim solusyonunun bu hücre agregatlarının iç kısımlarındaki hücre duvarına etki etmesi güçleşmekte dolayısı ile protoplast verimi de düşmektedir. Bu konuda REDWAY ve ark., (1990) tarafından yapılan çalışmada, hücre agregatları büyüdükçe protoplast verimini azalttığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada hücre süspansiyon kültürü hücrelerinin agregat büyüklüklerini sabit tutabilmek için hücre süspansiyon kültürleri her 6-8 haftada bir kez 500 µm por genişliğine sahip filtreden geçirilmiştir.

Hücre süspansiyon kültürünün 3. ve 5. günlerinde alınan ve V enzim solusyonunda, karanlık koşullarda, 27°C'de, 50 rpm'de çalışan çalkalayıcılar üzerinde 6 saat süre ile inkübe edilen 1 gram hücre süspansiyon kültürü hücrelerinden 2×10^7 protoplast izole edilmiştir. Bu konuda VASIL ve ark., (1990) $2,5 \times 10^7$ protoplast/gr hücre; HE ve ark (1991) 5×10^7 protoplast/gr hücre; CHANG ve ark. (1991) $2-3 \times 10^7$ protoplast/gr hücre, QIAO ve ark. (1992) $4-6 \times 10^6$ protoplast/gr hücre, YANG ve ark., (1993) 3×10^7 protoplast/gr hücre, SIMMOND ve GRAINGER, (1993) $2,4-5 \times 10^4$ protoplast/gr hücre, protoplast izole ettiklerini bildirmişlerdir. Hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonunda birçok araştırmacı tarafından bir gram süspansiyon kültürü hücreden farklı miktarlarda protoplast izole edilmesi kullanılan bitki materyalinin çeşit özelliklerine, izolasyon için hücrelerin süspansiyon kültürlerinden alındıkları zamana ve enzim solusyonunun kombinasyon ve konsantrasyonuna bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.

Protoplast kültürü ile ilgili araştırmalarda kültüre alma aşamasında en önemli etkenlerden biri de protoplast kültür ortamının içeriğidir. Bu konuda yapılan çalışmalarda protoplast kültürlerinde farklı ortamlar kullanılmıştır. VASIL ve ark., (1990) MS ve KM; HE ve ark., (1992) 1/2 MS; QIAO ve ark., (1992) MS; ZHOUNG-YI ve ark., (1992) N6; DZHARDEMALIEV ve ark., (1992) MS ve B5; YANG ve ark., (1993) 1/2 MS; AHMED ve SAGI, (1993) GM, MS ve KM; ZAGHMOUNT ve TROLINDER, (1993) MS tuzları + KM vitaminleri; PAUK ve ark., (1994) MS ortamları kullanarak protoplast kültürlerinden iyi sonuç almışlardır. Protoplast kültürlerinde kullanılan temel ortamların yanında bu ortamlara ilave edilen hormonların konsantrasyonlarının da hücre bölünmesi üzerine oldukça etkili oldukları birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (VASIL ve ark., 1990; PAUK ve SZARKA, 1991; LÖRZ ve ark., 1988). Bu çalışmamızda MS ve B5 ortamları ve bu ortamlara ilave olarak 0.5mg/l ve 1.0 mg/l 2,4-D konsantrasyonlarının hücre bölünmesine olan etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlar kültüre alındıkları 0.5mg/l 2,4-D içeren MS ortamında, aynı konsantrasyonda 2,4-D içeren B5 ortamından daha fazla miktarda hücre bölünmesi ve kaplama etkinliği meydana getirmişlerdir. VASIL ve ark., (1990) tarafından farklı ortamların protoplast bölünmesine ve kaplama etkinliğine olan etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, MS ortamının KM ortamına nazaran daha fazla hücre bölünmesi ve kaplama etkinliği meydana geldiğini fakat aralarındaki farkın çok fazla olmadığını bildirmişlerdir. Adı geçen araştırmacıların izole edilen protoplastları kültüre alarak hücre bölünmesi ve kaplama etkinliğine ilişkin elde ettikleri sonuçlar bizim bu konuda elde ettiğimiz sonuçları kısmen desteklemektedir.

Ayrıca hücre bölünmesi ve kaplama etkinliği üzerine protoplastların izole edildikleri hücre süspansiyon kültürlerinin altkültür zamanlarına ve

protoplastların kültüre alındıkları ortamın sıvı veya katı olmasının da etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. VASIL ve ark. (1990), ve AHMED ve SAGI (1993) tarafından yapılan çalışmada sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan protoplastlarda hücre bölünmesi üzerine agaroz yoğunluğunun da etkili olduklarını bildirmişlerdir. Bu konuda elde ettiğimiz sonuçlara göre protoplastların kültüre alındıkları ortamın agaroz konsantrasyonları arttıkça bölünme oranlarında da bir artış meydana geldiği görülmüştür. Hücre bölünmesi üzerine protoplastların kültüre alındıkları ortamların da etkileri farklı olmuş, MS ortamında kültüre alınan protoplastlarda bölünme oranı ve kaplama etkinliği yönünden B5 ortamına göre daha yüksek olmuştur. Bu da hücre bölünmesi ve kaplama etkinliği üzerine protoplastların kültüre alındıkları ortamın içeriğinin etkili olduğunun bir göstergesidir.

Sıvı ortamda kültüre alınan protoplastların bölünme oranları agaroz içeren ortamlara göre daha düşük bulunmuştur. Bunun yanında sıvı ortamda düşük oranda da olsa hücre bölünmesi meydana gelmesine karşın mikrokallus gelişimi gerçekleşmemiştir. Kültüre alınan protoplastlarda en yüksek hücre bölünmesi ve mikrokallus gelişimi ise %1.2 agaroz içeren ortamda meydana gelmiştir. VASIL ve ark., (1990) tarafından yapılan çalışmada agaroz konsantrasyonlarının, hücre bölünmesini ve mikrokallus gelişimini artırdığı bildirmişlerdir. AHMED ve SAGI (1993) protoplast kültürlerinde %1.2 agaroz konsantrasyonu kullandıklarını ve yüksek oranda hücre bölünmesi ve mikrokallus elde ettiklerini belirtmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre agaroz konsantrasyonlarının hücre bölünmesi ve mikrokallus oluşumuna olan etkisi bariz farklılıklarla ortaya çıkmıştır. Bunun protoplastların izole edildikleri hücre süspansiyon kültürü hücrelerinin özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlar 0.5×10^6 ve 1.0×10^6 protoplast/ml yoğunluğunda kültüre alınmış ve hücre bölünmesi ve

mikrokallus oluşumu yönünden çok önemli bir farklılık bulunmamıştır. Buna rağmen en uygun yoğunluğun 1.0×10^6 protoplast/ml olduğu gözlenmiştir. Protoplastlar bütün ortamlarda kültüre alındıkları 2 gün sonra hücre duvarı oluşturmaya ve bölünmeye başlamışlardır. Kültüre alındıktan 10 gün sonra hücreler tanımlanamaz duruma gelmiş ve hücre süspansiyon kültürü hücrelerine benzerlik göstermeye başlamışlardır.

Hücre süspansiyon kültürlerinden protoplast izolasyonunda hücre süspansiyon kültürünün 3, 5 ve 7. günlerinde alınan hücrelerden protoplast izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bu protoplastlarda kültüre alındıkları MS ve B5 ortamlarında hücre bölünmesi ve mikrokallus oluşumu yönünden en iyi sonucu hücre süspansiyon kültürünün 3 ve 5. günlerinde alınıp izole edilen protoplastlar vermişlerdir. Monokotiledonların embriyogenik kallus kültürlerinden kurulan hücre süspansiyon kültürleri 7 günde bir sıvı ortamları yenilenerek altkültüre alınmaları gerekmektedir VASIL,(1990); AHMED ve SAGI, (1993); HE ve ark.,(1992). Bu altkültür süresinin uzaması durumunda hücreler agregatlaşmakta, ortamda bulunan besin maddelerinin azalması nedeniyle hücreler strese girmekte ve fiziksel olarak kendilerini buna hazırlamaktadırlar. Bu nedenle hücre süspansiyon kültürlerinin bölünme hızının en yüksek olduğu, kültüre alındıktan sonraki 3. ve 5. günlerde alınan hücrelerden izole edilen protoplast miktarı, hücre bölünme oranı ve mikrokallus oluşumu oldukça artmaktadır. Hücre süspansiyon kültürünün farklı günlerinde izole edilen, sıvı ve farklı konsantrasyonlarda agaroz ile katılaştırılmış, farklı ortamlarda ve farklı yoğunluklarda kültüre alınan protoplastların hücre bölünmeleri ile mikrokallus oluşum oranları arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. VASIL ve ark., (1990) tarafında yapılan çalışmada agaroz konsantrasyonlarının artmasının hücre bölünmesi ve mikrokallus gelişiminde artış meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada sıvı

ortamlarda kültüre alınan protoplastlarda bölünme meydana gelmesine karşın mikrokallus oluşumu gerçekleşmemiştir. Bu durumda protoplast kültür ortamına katılaştırıcı olarak ilave edilen agaroz konsantrasyonunun mikrokallus gelişiminde de doğrudan etkili olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilerek kültüre alınan protoplastlarda hücre bölünmesine 2.4-D konsantrasyonlarının etkisini belirlemek amacıyla 0.5mg/l ve 1.0 mg/l 2.4-D konsantrasyonları da denenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kültür ortamına ilave edilen 2.4-D miktarı protoplast bölünme oranına ve mikrokallus oluşumuna doğrudan etkili bulunmuş ve en iyi sonucu 0.5 mg/l 2.4-D içeren ortamlar vermiştir. VASIL ve ark., (1990) tarafından yapılan çalışmada 0.5 mg/l ve 1.0 mg/l 2.4-D içeren ortamlarda kültüre alınan protoplastlarda hücre bölünmesi ve mikrokallus oluşumu yönünden 0.5 mg/l 2,4-D içeren ortamların hücre bölünmesi ve mikrokallus gelişimini artırdığını bunun da protoplastların izole edildiği hücre kaynağının çeşit özelliklerinden kaynaklandığını vurgulamışlardır.

Protoplastların kültüre alındıktan sonra bölünmelerinin devam etmesi sonucu mikrokallus gelişimi meydana gelmektedir. Yapılan bu çalışmada Protoplastlardan mikrokallus gelişimine, kültüre alındıkları ortamların, ilave edilen hormon türü ve konsantrasyonunun, protoplastların kültüre alındıkları yoğunluğun, kültüre alındıkları ortamın sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarının ve izole edilen protoplastların hücre süspansiyon kültürü altkültürü zamanının oldukça etkili oldukları görülmüştür. Mikrokallus gelişimleri üzerine kültüre alındıkları ortamın içeriğinin etkilerini belirleyebilmek amacıyla farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda hormon ve organik maddeler içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Dört haftalık inkübasyon süresi sonunda en fazla mikrokallus gelişimi kazein hidrolizat ve glutamin içeren ortamda meydana gelmiştir. VASIL ve ark., (1990), AHMED ve SAGI, (1993) ve YANG ve ark.,

(1993) tarafından yapılan çalışmalarda protoplastların bölünmelerin devam etmesi sonucu oluşan mikrokallusların gelişimleri üzerine ortamın içeriğinin, ortama ilave edilen hormon türü ve miktarının etkili olduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmamızda ortama ilave edilen oksinlerin (2,4-D, IAA) ve organik maddelerin (kazein hidrolizat, glutamin, asparagin) mikrokallus gelişimini olumlu yönde etkiledikleri gözlenmiştir. Mikrokallus gelişimi üzerine birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmada farklı oksin türlerinin ve miktarlarının farklı sonuçlar vermesi protoplastların izole edildikleri hücre kaynağının farklı olmasından kaynaklandığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

In vitro doku kültürlerinde hücreden bitkiye geçiş süreci bu sistemin en önemli aşamalarından birisidir. Bugüne kadar monokotiledonlarda yapılan çalışmalarda, protoplast kültürlerinden bitki regenerasyonunun oldukça zor olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (VASIL ve ark.,1990; PAUK ve SZARKA,1991; HE ve ark.,1992; AHMED ve SAGI, 1993).

Embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilerek kültüre alınan protoplastlardan gelişen mikrokalluslar bitki regenerasyonu amacıyla farklı konsantrasyonlarda IAA, BAP, kinetin ve NAA içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Mikrokalluslardan bitki regenerasyonunda klorofil oluşumu mikrokalluslardan embriyo oluşumunu engellemektedir. Bu nedenle kültüre alındıktan sonra embriyo oluşumunu teşvik etmek için yaklaşık 4 hafta süre ile karanlık koşullarda inkübe edilmiş daha sonra 16 saat aydınlık-8 saat karanlık koşullarda inkübasyona devam edildiğinde embriyo oluşumunda artış meydana geldiği gözlenmiştir. KARABAEV ve ark.,(1988) buğday kalluslarından farklılaşımı teşvik etmek amacıyla yaptıkları çalışmada, bitki regenerasyonuna kültür şartlarının etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. KIM ve KIM (1989), VASIL ve ark.,(1990), REDWAY ve ark.,(1990), SUN ve ark.,(1990), QIAO ve ark., (1991), PAUK ve ark., (1994) tarafından yapılan çalışmalarda hormon içermeyen

basal ortamlar üzerinde veya düşük konsantrasyonlarda oksin içeren ortamlarda kültüre alınan proplastlardan bitki regenerasyonunun gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. Bu konuda yaptığımız çalışmada hormonsuz basal ortamda bitki regenerasyonu oranı oldukça düşük olmuştur. Bunun yanında MS ortamına ilave edilen düşük konsantrasyonlardaki 2,4-D, IAA, BAP ve kinetin bitki regenerasyonunu oldukça artırmıştır. Bunun protoplastların izole edildiği hücre kaynağının altkültürde kaldıkları süreye bağlı olarak embriyogenik kapasitesinin değişebilmesinden kaynaklanmaktadır.

Buğday yapraklarından protoplast izolasyonunda birçok araştırmacı farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarla enzim solusyonları kullanmışlardır. WATANABE ve ark., (1988) tarafından kullanılan (W) enzim solusyonu yaptığımız çalışmada çok iyi sonuç vermiştir. Buğday yapraklarından protoplast izolasyonunda farklı enzim kombinasyonlarının ve vakum uygulamalarının iyi sonuç vermesi, bu amaç için kullanılan bitkinin çeşidine ve yetiştirme koşullarına bağlı olmasından kaynaklanmaktadır. Buğday yapraklarından protoplast izolasyonunda, yaprakların enzim solusyonu ile inkübasyonu sırasında petri kaplarının sabit bir yerde veya bir çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmesinin etkili olduğu bilinmektedir. Yaptığımız çalışmada inkübasyon sırasında sabit bir yerde duran petri kaplarında en yüksek protoplast izolasyonu 7. saatte gerçekleşmiştir. Çalkalayıcılar üzerinde inkübe edilen protoplastlarda bu süre kısalmakta fakat izole olan protoplastlar petrinin kenarına veya henüz tam olarak parçalanmamış yaprak dokularına çarparak parçalanmakta ve protoplast verimliliği düşmektedir. Bu nedenle sabit bir yerde protoplast izolasyonu tercih edilmiştir. İzole edilen protoplastlardan enzim solusyonu ve bitki artıklarını uzaklaştırmak için (W1) yıkama solusyonu (bakınız Ek.5) kullanılmıştır. İzolasyonu yapılarak yoğunlukları 0.5×10^4 ve 1.0×10^4 protoplast/ml olacak şekilde ayarlanmış olan mezofil protoplastları, A)sıvı, B)%0.3 agaroz, C)%0.6 agaroz, D)%1.2 agaroz +

(0.5ve1.0) mg/l 2,4-D + 0.5 M sorbitol içeren MS ve B5 ortamlarında kültüre alınarak $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Protoplastlar kültüre alındıktan iki gün sonra ve bunu takip eden her iki günde bir gözlemlenerek hücre duvarı oluşumu ve hücre bölünmeleri tesbit edilmeye çalışılmış fakat herhangi bir hücre bölünmesine rastlanmamıştır. Bu konuda çalışma yapan araştırmacılar monokotiledonların yaprak dokularından izole edilen mezofil protoplastlarında hücre duvarı oluşumu ve protoplast bölünmesinin meydana gelmediğini, bu hücrelerin totipotent olmadığını bildirmişlerdir (VASIL,1987, KIM ve LEE,1987, WATANABE ve NISHIKIVA,1989, VASIL ve VASIL,1992, WATANABE,1993).

Hücre süspansiyon kültürlerinden izole edilen protoplastlardan regenere edilen morfolojik olarak normal görünümlü bitkilerin yanında geniş yaprak ayasına sahip, aşırı kardeşlenme gösteren, klorofil eksiklikleri bulunan erken dönemde içi boş başakçık oluşturan anormal görünümlü bitkilere de rastlanmıştır. Normal ve anormal görünümlü bitkilerden alınan kök uçlarında yapılan kromozom sayımları sonucunda regenere edilen bütün bitkilerin $2n=6x=42$ normal kromozom sayısına sahip oldukları belirlenmiştir. Morfolojik olarak geniş yaprak ayasına sahip, aşırı kardeşlenme gösteren, klorofil eksiklikleri bulunan, erken dönemde içi boş başakçık oluşturan anormal görünümlü bitkiler tesbit edilmiştir. Bu sonuçlara göre protoplastlardan regenere edilen bitkilerde morfolojik olarak meydana gelen anormalliklerin kromozomlarda gen düzeyinde meydana gelen varyasyonlardan kaynaklanabileceği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Bu konuda KÖBA ve ark., (1988) tarafından yapılan çalışmada 12-18 aylık kallus kültürlerinden regenere edilen bitkilerin %12'sinin kromozom yapılarında değişikliklerin bulunduğunu tesbit etmişlerdir. Bunun yanında morfolojik olarak klorofil eksikliklerinin, kulakçık ve yaprakçıklarda anormalliklerin de bulunduğunu bildirmişlerdir. HE ve ark., (1992), AHMED ve

SAGI (1993) tarafından yapılan çalışmalarda protoplastlardan regenere edilen bitkilerin $2n=42$ normal kromozom sayısına sahip olduklarını tesbit etmişlerdir. OZIAS-AKINS ve VASIL, (1982) olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslardan regenere edilen bitkilerin $2n=42$ kromozom sayısına sahip olduklarını bildirmişlerdir. YANG ve ark., (1991) hücre süspansiyon kültürü hücrelerinden regenere edilen bitkilerde $2n=42$ normal kromozom sayısı saptamışlardır. AHLOOWALIA, (1982), MADDOCK ve ark., (1983), ORSHINSKY ve MCHUGHEN (1987), ZHENG ve ark., (1989) embriyogenik kalluslardan regenere ettikleri bitkilerde morfolojik olarak bitki boyu, sap kalınlığı, başak boyu, bayrak yaprağı, albino sürgün oluşumu gibi somaklonal varyasyonların meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada protoplastlardan regenere edilen bitkilerde kromozom sayılarının normal seviyede olmasına rağmen birtakım morfolojik varyasyonların bulunması bu konuda daha önce çalışma yapan araştırmacıların regenere ettikleri bitkilerde morfolojik olarak meydana gelen değişikliklerin gen düzeyinde meydana gelen varyasyonlardan kaynaklanmış olabileceği hipotezi ile bağdaşmaktadır.

Hücre süspansiyon kültürü hücrelerinden hazırlanan pereparatlarda mitoz bölünmenin metafaz safhasında tesbit edilen ve kromozom sayımları yapılan hücrelerin yüksek oranda kromozom kayıplarına uğradıkları tesbit edilmiştir. Hücre süspansiyon kültürü hücrelerinde meydana gelen kromozom sayısı değişiklikleri, hücre süspansiyon kültürlerinin altkültürde kaldıkları süreye, hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında kaynak olarak kullanılan kallusların altkültürde kaldıkları süreye bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Bu konuda KARP ve ark., (1987), hücre süspansiyon kültürlerinde ve bölünen protoplast kültürlerinde yaptıkları sitolojik çalışmalarda incelen birçok hücrede sayısal ve yapısal kromozom varyasyonlarının bulunduğunu ve birçok hücrenin kromozom sayısının $2n=32$ olarak tesbit edildiğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde $2n=42$

normal kromozom sayısına sahip hücrelerde ise kromozom segmentlerinde ve kollarında kopmalar meydana geldiğini bildirmişlerdir. KOBA ve ark., (1988) tarafından yapılan bir çalışmada ise 12-18 aylık kallus kültürlerinde ve bunlardan regenere edilen bitkilerde yaptıkları sitolojik çalışmalarda, incelenen hücrelerdeki kromozom sayılarının $2n=23$ ile $2n=29$ arasında değişim gösterdiklerini, bu hücrelerin yaklaşık %60'ının 28 kromozoma sahip olduklarını tesbit etmişlerdir. YU ve ark., (1990), olgunlaşmamış embriyolardan doğrudanregenere edilen bitkilerde morfolojik olarak başaklanma zamanı, bitki boyu, bayrak yaprak uzunluğu, başakçık/kulakçık oranı yönünden varyasyonların meydana geldiğini saptamışlardır. Bu konuda yaptığımız çalışmada hücre süspansiyon kültürü hücrelerinde hazırlanan preparatlarda mitoz bölünmenin metafaz safhasında tesbit edilen hücrelerde %52 oranında kromozom sayısı eksikliği, %2 oranında kromozom sayısı fazlalığı, %46 oranında da $2n=6x=42$ normal kromozom sayısı tesbit edilmiştir. İncelenen hücrelerdeki varyasyonların varyasyonların daha çok kromozom kayıpları şeklinde olduğu gözlenmiştir. Bu konuda çalışma yapan birçok araştırmacı hücre süspansiyon kültürlerindeki bu varyasyonların bitki regenerasyonunu doğrudan etkilediğini bildirmişlerdir (KARP ve ark., 1987; KOBA ve ark., 1988).

Monokotiledon bitkilerin en önemlisi olan buğdayda günümüzün biyoteknolojik yöntemlerinden olan protoplast füzyonu ve direk gen transferi yöntemlerini uygulayabilmek için, kısa zamanda ve yüksek oranda embriyogenik kallus eldesi, stabil embriyogenik hücre süspansiyon kültürlerinin kurulması, bu hücre süspansiyon kültürlerinden yüksek oranda protoplastların izolasyonu, kültürü ve mikrokallus oluşumu, protoplast kültürlerinden yüksek oranda bitki regenerasyonunun gerçekleştirilmesi ile mümkün olabilecektir. Yapılan bu çalışmada bu sistemlerin kısa zamanda ve yüksek verimlilikte kurulmasına çalışılmıştır.

ÖZET

Yeni buğday çeşitlerinin geliştirilmesinde biyoteknolojik yöntemlerin uygulanabilmesindeki başarı öncelikle en uygun kallus, hücre süspansiyon kültürü, protoplast ve bitki regenerasyonunun gerçekleştirilmesine bağlıdır.

Bu çalışmada, beş hexaploid buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidinin (Seri 82, Panda, Shafir, Gemini, Çukurova 86) olgunlaşmamış ve olgun embriyolarının embriyogenik kallus, hücre süspansiyon kültürü, protoplast ve bitki regenerasyonu kapasiteleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Öncelikle, döllenmenin gerçekleşmesinden yaklaşık 15 gün sonra alınan olgunlaşmamış buğday embriyoları değişik 2,4-D (1mg/l, 2mg/l, 3mg/l, 5mg/l) konsantrasyonları içeren MS (MURASHIGE ve SKOOG, 1962); LS (LINSMAIER ve SKOOG, 1965), B5 (GAMBORG B5, 1975), N6 (MOROCZ ve ark., 1990) ortamları üzerinde, olgun embriyolar ise yine değişik 2,4-D (1mg/l, 3mg/l, 5mg/l, 8mg/l) konsantrasyonları içeren MS, LS, B5, N6 ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır. Olgunlaşmamış ve olgun buğday embriyoları kültüre alındıkları bütün ortamlarda farklı oranlarda kallus oluşturmuşlardır. Döllenmenin gerçekleşmesinden yaklaşık 15 gün sonra alınan olgunlaşmamış embriyolar yüksek oranda embriyogenik kallus oluşturlarken, olgun embriyolarda bu oran oldukça düşük olmuştur. Bununla birlikte kallus oluşumu yönünden olgunlaşmamış embriyolar 2mg/l 2,4-D, olgun embriyolar ise 5mg/l 2,4-D içeren MS ve B5 ortamlarında diğer ortamlara göre daha iyi sonuç vermişlerdir.

Olgunlaşmamış ve olgun embriyolardan kallus oluşumuna ortama ilave edilen organik maddelerin etkilerini belirleyebilmek için patates ekstraktı, buğday nişastası, kazein hidrolizat ve glutamin içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Kültüre alındıkları ortamlara ilave edilen organik maddeler bütün çeşitlerde kallus oluşumunu önemli ölçüde artırmıştır. Bu nedenle elde edilen

kallusların altkültürleri 2mg/l 2,4-D, 100mg/l kazein hidrolizat, 500mg/l glutamin içeren MS ortamları üzerinde yapılmıştır.

Embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri, Seri 82 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen beyaza yakın renkteki, kolay dağılabilen, hızlı gelişen embriyogenik kalluslarından oluşturulmuştur. Hücre hacimi artışlarını (%HHA) belirleyebilmek için Seri 82 çeşidinin embriyogenik hücre süspansiyon kültürleri kazein hidrolizat, glutamin ve asparagin içeren sıvı MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Bu hücreler 100mg/l kazein hidrolizat, 500mg/l glutamin ve 150mg/l asparagin içeren ortamlarda yüksek oranda hücre hacimi artışı (%HHA) göstermişlerdir.

Protoplast izolasyonunda Seri 82 buğday çeşidinin hızlı gelişen hücre süspansiyon kültürleri kullanılmıştır. VASIL ve ark., (1990) tarafından kullanılan enzim solusyonunda, 6 saatlik inkübasyon sonunda, 1 gram hücre kültüründen 2×10^7 protoplast izole edilmiştir. Hücre bölünmesi ve kaplama etkinliği üzerine hücre kültürünün farklı altkültür sürelerinin, farklı protoplast yoğunluğunun, sıvı ve farklı agaroz konsantrasyonlarının etkileri karşılaştırılmış ve hücre altkültürünün 3. ve 5. günlerinde alınan, 1×10^6 protoplast/ml yoğunlukta, 0.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınan protoplastların yüksek oranda bölünme ve kaplama etkinliğine sahip oldukları görülmüştür.

Kültüre alındıktan 4-5 hafta sonra oluşan mikrokalluslar somatik embriyo ve bitki regenerasyonu için değişik konsantrasyonlarda oksin (0.1-0.5mg/l 2,4-D; 0.1mg/l IAA; 0.1mg/l NAA) ve sitokinin (1mg/l BAP; 1mg/l kinetin) içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. Kültüre alındıktan yaklaşık 16-20 hafta sonra, mikrokalluslardan 0.1mg/l IAA, 1mg/l BAP, 1mg/l kinetin içeren MS ortamında %38.7 oranında bitki regenere edilmiştir.

Hücre süspansiyon kültürlerinde ve regenere edilen bitkilerde yapılan sitolojik çalışmalarda, hücre süspansiyon kültürlerinde %52 oranında kromozom

kayıpları, %2 oranında kromozom fazlalıkları, %46 oranında $2n=42$ normal kromozom sayısı gözlenmiştir. Protoplastlardan regenere edilen bitkilerde ise $2n=42$ normal kromozom sayısı gözlenmiş, fakat bazı bitkilerde geniş yaprak ayası, aşırı kardeşlenme, albino bitki ve erken dönemde içi boş başakçık oluşumu gibi anormalliklere rastlanmıştır.

Mezofil protoplastlarının izolasyonunda Seri 82 buğday çeşidi *in vitro* bitkilerinin yaprakları kullanılmıştır. Fide elde etmek için buğday tohumları yüzelsel sterilizasyona tabi tutulduktan sonra *in vitro* 'da kültüre alınmıştır. 7-8 günlük buğday fidelerinin yaprakları 1-2 mm kalınlığında kesilerek WATANABE ve ark., (1988) tarafından kullanılan enzim solusyonuna konulmuş ve 3 dakika süre ile vakum altında tutulmuştur. Daha sonra 25°C'de, 1500 lux ışık altında enzim solusyonu içerisinde inkübe edilmiştir. 7 saatlik inkübasyon sonunda 1 gram yapraktan 6×10^5 protoplast izole edilmiştir. İzole edilen mezofil protoplastları farklı ortamlarda kültüre alınmışlardır. Dört haftalık inkübasyon sonunda, hücre bölünmesi ve dolayısıyla da bitki regenerasyonunun ilk aşamalarından olan mikrokallus oluşumu gözlenmemiştir.

SUMMARY

Successful application of biotechnology in new wheat cultivars improvement is depend on most suitable cultured callus, cell suspension, protoplast and plant regeneration capacity.

In this investigation we have assessed the capacity of immature and mature embryos of five wheat cultivars (Seri 82, Panda, Shafir, Gemini, Çukurova 86) to form embryogenic callus, cell suspension, protoplast isolation and plant regeneration on a range of media.

Initially, immature embryos (15 days after pollination) were cultured on MS (MURASHIGE and SKOOG, 1962); LS (LINSMAIER and SKOOG, 1965), B5 (GAMBORG B5, 1975), N6 (MOROCZ et al., 1990) with different concentration 2,4-D (1mg/l, 2mg/l, 3mg/l, 5mg/l) and mature embryos were cultured on MS, LS, B5, N6 with different concentration of 2,4-D (1mg/l, 3mg/l, 5mg/l, 8mg/l). Immature and mature embryos formed callus on all media but immature embryos of various cultivars showed significant differences in callus formation in response to all media tested. However, callus formation from immature embryos with 2mg/l 2,4-D and mature embryos on MS and B5 media with 5mg/l 2,4-D concentrations were higher than on other media and concentrations.

Callus was initiated from immature and mature embryos on MS medium with potato extract, wheat starch, casein hidrolisate and asparagine. Most cultivars formed calli on media augmented with organic substrates. Consequently, MS medium containing 2mg/l 2,4-D, 100mg/l casein hydrolisate, 500mg/l glutamine was used as the maintenance medium for callus subcultures.

The embryogenic cell suspension cultures were established from immature embryos derived embryogenic callus of Seri 82 wheat cultivars which well dispersed, off-white, rapid growing. Embryogenic cell suspension of Seri 82

were cultured in liquid MS media with casein hidrolisate, glutamine and asparagine. Increases in PCV% were highest in MS media supplemented with 100mg/l casein hidrolisate, 500mg/l glutamine, 150mg/l asparagine.

Fast growing cell suspension of Seri 82 cultivar were used for the protoplast isolation. 2×10^7 purified protoplast per one gram initial fresh weight could be obtained in average at the end of a 6 h incubation period, using the enzyme solution of VASIL et. al., (1990). A comparison of the division and plating efficiency on different days following subculture, and different density, and in in different liquid or agarose media. Indeed, protoplasts from isolated on the third of fifth days of subculture, and 1×10^6 protoplast/ml density, and 1.2% agarose concentrations in MS media supplemented with 0.5mg/l 2,4-D highest division and plating efficiency.

For further somatic embryo and plant regeneration containing 4-5 week old microcalli transferred on MS regeneration media supplemented with various auxins (0.1-0.5mg/l 2,4-D; 0.1mg/l IAA; 0.1mg/l NAA) and cytokinins (1mg/l BAP; 1mg/l kinetin). Plant regeneration was obtained from microcallus after 16-20 weeks at the rate of 38.7 percent on MS media supplemented with 0.1mg/l IAA, 1mg/l BAP, 1mg/l kinetin.

In cytological studies with cell suspension cultures and regenerated plants from protoplasts. To observe the chromosomes lost at the rate of 52 percent, extra chromosomes at the rate of 2 percent in cell suspension cultures, normal chromosomes number ($2n=42$) at the rate of 46 percent. Regenerated plants from protoplasts observed normal chromosomes number ($2n=42$), but some plants coincided abnormal seems such as large leaf lamina, extreme tillering, and albino plants.

Seedling leaves were used for mesophyll protoplast isolation. To obtain seedlings, seeds of Seri 82 wheat cultivar were surface sterilized and cultured *in vitro*. The leaves were cut with razor blades at 1-2 mm from the base of the leaf blade from 7-8 days old seedlings. The leaf segments were transferred to enzyme solution using of WATANABE et.al.,(1988). The leaf pieces were immersed for 3 min under partial vacuum. They were incubated at 25 °C and a protoplast were isolated per one gram leaf tissue. Mesophyll protoplasts were cultured at the different culture medium, but it wasn't coincide with the cell division in four weeks.



Ek1. Embriyo, Kallus, Hücre Süspansiyon ve Protoplast Kültürlerinde Kullanılan Temel Ortamlar ve İçerdikleri Kimyasallar

ORTAMLAR	MS	LS	B5	N6
MAKRO ELEMENTLER				
NH ₄ NO ₃	1650	1650	--	--
KNO ₃	1900	1900	2527.5	2813
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	150	166
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	246.5	185
KH ₂ PO ₄	170	170	--	400
(NH ₄) ₂ .SO ₄	--	--	134	463
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	--	--	150	--
MİKRO ELEMENTLER				
KI	0.83	0.83	0.75	0.83
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	3	1.6
MnSO ₄ .H ₂ O	22.3	22.3	--	4.4
MnSO ₄ .H ₂ O	--	--	10	--
Na ₂ Mo.O ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	--
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	--
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	--
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	27.85	--	27.85
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37.25	37.25	37.25	37.25
VİTAMİNLER				
İnositol	100	100	100	--
Nikotinik asit	0.5	--	1.0	0.5
Piyridoksin HCl	0.5	--	1.0	0.5
Tiamin HCl	0.1	1.0	10	1.0
Glisin	2.0	--	--	2.0
DİĞERLERİ				
Sakkaroz	%3	%3	%2	%8
Agar (Sigma)	%0.75	%0.75	%0.75	%0.75
pH	5.7	5.7	5.7	5.7

MS= Murashige ve Skoog, (1962) ; LS= Linsmaier veSkoog, (1965) ; B5= Gamborg B5, (1968) ; N6= Morocz ve ark., (1990)

Ek2. Hücre Süspansiyon Kùltürlerinden Protplast İzolasyonunda

Kullanılan Enzim Solusyonları

Enzim Solusyonları	V	P	Q	D
Kimyasallar				
Cellulase Onozoka RS	%1	%1	%1	%2
Pectinase	%1	%0.5	--	--
Driselase	--	--	--	%0.5
Pectolyase	%0.1	%0.1	%0.1	--
CaCl ₂ .2H ₂ O	7mM	--	7mM	%1
KH ₂ PO ₄	--	--	--	%0.05
NaH ₂ .PO ₄ .2H ₂ O	0.7mM	--	0.7mM	--
MgSO ₄ .7H ₂ O	--	--	--	%0.1
MES (morfolinoethanesulfonik asit)	3mM	--	3mM	--
Mannitol	0.65M	0.6M	0.65M	--
Kazein hidrolizat	--	%0.1	--	--
Gliserol	--	--	--	%6.5
pH	5.6	5.8	5.6	5.7

V=VASIL ve ark.,(1990)

P=PAUK ve SZARKA (1991)

Q=QIAO ve ark., (1992)

D=DZHARDEMALIEV ve ark.,(1992)

Ek 3. İzole Edilen Hücre Süspansiyon Kültürü Protoplastlarından Enzim Solusyonunu Uzaklaştırmak İçin Kullanılan V1 Yıkama Solusyonu ve İçerdiği Kimyasallar

Kimyasallar	Miktarı
CaCl ₂ .2H ₂ O	7 mM
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0.7 mM
MES (morfolinoethanesulfonik asit)	0.6 M
pH	5.6

Ek.4 Yaprak Mezofil Protoplastlarının İzolasyonunda Kullanılan Enzim Solusyonu

Kimyasallar	W
Cellulase Onozuka R10	%4
Pectinase	%0.3
Sorbitol	0.5 M
CaCl ₂	1.0 mM
pH.	5.5

Ek.5 İzole Edilen Yaprak Mezofil Protoplastlarından Enzim Solusyonunu Uzaklaştırmak İçin Kullanılan Yıkama Solusyonu ve İçerdiği Kimyasallar

Kiyasallar	W1
Sorbitol	0.5 M
CaCl ₂	1.0 mM
pH.	5.5

Ek.6. Kromozom Boyamasında Kullanılan Feulgen Boyama Solusyonu ve İçerdiği Kimyasallar.

Kimyasallar	Miktarları
Fuchsin	1 gr.
HCl	20 ml (1 N)
Potasyum metabisülfid	2 gr
Aktif karbon	0.5 gr
monobromonaftalin	0.5ml
Glasiel asetik asit	90 ml
ETOH (%96)	30 ml
Destile su	200 ml

KAYNAKLAR

- AHLOOWALIA, B.S.; (1982). Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Science*. 22(2) 405-410.
- AHMED, K.Z., SAGI, F.; (1993). Culture of and fertile plant regeneration from regenerable embryogenic suspension cell-derived protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. 12(3) 175-179.
- AKKAYA, A.; (1994). Buğday yetiştiriciliği, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Genel yayın no:1. Ziraat Fakültesi Genel yayın no:1, Ders kitapları yayın no:1.
- AVENIDO, R. A., COTTON, J. L., AMANTE, A. A., MONSALUD, M. J.R., ZAMORA, A.B.; (1988). Callus establishment from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) and subsequent shoot regeneration. *Philippine Journal of Crop Science*. 13.
- BANNIKOVA, V.P., BARABANOVA, E.A.; (1990). Induction and histological features of somatic embryogenesis in the tissue culture of Gramineae. *Sitologiya Genetika*. 24(2) 61-68.
- BARABANOVA, E.A., BANNIKOVA, V.P., GIRKO, V.S.; (1988). Plant regeneration from cultured embryos of winter wheat. In *Biologiya kul'tiviruemykh kletok biotekhnologiya*, 1. Novosibirsk, USSR. 110.
- , E.A., -----, V.P.; (1990). Histological characteristics of *in vitro* cultured winter wheat embryos. In *Tsitogenetika zernovykh kul'tur*. Tallinn. Estonian SSR. 22-26.
- BATYRGOZHIN, B.A.; (1988). Morphogenesis in cell suspension culture of wheat. In *Biologiya kul'tiviruemykh kletok biotekhnologiya*, 1. Novosibirsk, USSR. 152-153.

- BROWN,C., BROOKS,F.J., PEARSON,D., MATHIAS,R.J.; (1989). Control of Embriyogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and absisic acid. J.Plant Physiol, 133:727-733.
- BUTENKO,R.G., DZHARDEMALIEV,ZH.K., GAVRILOVA,N.F.; (1986). Plant regeneration from callus tissue obtained from different organs of winter wheat. Fiziologiya Rastenii. 33(5)837-842.
- CHANG,Y.F., WANG,W.C.; WARFIELD,C., NGUYEN,H.T., WONG,J.R.; (1991). Plant regeneration from protoplasts isolated from long-term cell cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports. 9(11)611-614.
- ,Y.F., WACH,M., ULRICH,T., NGUYEN,T., WARFIELD,C., WANG,W.C., WONG,J.R.; (1991). Protoplast regeneration and transformation of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Mustang). Physiologia Plantarum. 82(1)A31.
- CHAWLA,H.S.; (1989). Regeneration responses of callus from different explants and changes in izozymes during morphogenesis in wheat. Biologia Plantarum. 31(2)121-125.
- CHEVRIER,N., QURESHI,J.A., HUCL,P., KARTHA,K.K.; (1990). Heritability, of *in vitro* regereration in wheat (*Triticum aestivum* L.). Canadian Journal of Plant Sciences. 70(20)547-550.
- CHOWDHURY,S.H., KATO,K., YAMAMOTO,Y., HAYASHI,K.; (1991). Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryo among common wheat cultivars. Japanese Journal of Breeding. 41(3)443-450.
- CHOWDHURY,M.K.U., VASIL,I.K.; (1994). Molecular analysis of plants regenerated from embriyogenic cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 87:821-828.

- DE CLEENE M., DE LEY J.; (1976). The host range of crown gall. Bot.Rev.42:389-466.
- D'YACHUK,P.A., NOSOVA,N.N., TUCHIN,S.V., IVANOVA,YU.E.; (1990). Features of callus formation and plant regeneration in the culture of somatic tissues of spring varieties of bread and durum wheat. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya. No.3, 56-59.
- DZHARDEMALIEV,Z.H.K.,KARABAEV,M.K., MUKHAMETKALIEV, M.T., BUTENKO,R.G.; (1992). Division of protoplasts isolated from cells of suspension culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). Soviet Plant Physiology. 39 (I,II) 93-97.
- EAPEN,S., RAO,P.S.; (1982). Organogenesis and plantlet formation from callus cultures of different cultivars of bread wheat (*Triticum aestivum*L.). Proceedings, Indian National Science Academy, (Biological Sciences). 48(3) 371-377.
- ,S., -----,P.S.; (1985). Plant regeneration from immature inflorescence callus culture of wheat, rye ve triticale. Euphytica. 34(1)153-159.
- ELÇİ,Ş., (1994). Sitogenetikte Araştırma Yöntemleri ve Gözlemler. 100. Yıl Üniversitesi Yayınları, N:18. VAN.
- ELENA,E.B., 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.). Journal of Plant Physiology. 132(5) 600-603.
- FEKETE,S., PAUK,J.; (1989). Study of the effect of 2,4-D and kinetin on plant regeneration in wheat: two-step efficient plant regeneration. Cereal Research Communications. 17(3-4)237-244.

- GALIBA,G., KOVACS,G., SUTKA,J.; (1986). Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breeding*. 97(3) 261-263.
- GAMBORG,O.L., MILLER, R.A., OJIMA,K.; (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
- GAPONENKO,A.K., GOLUBEVA,O.N.; (1989). Morphogenetic processes in the culture of somatic cells of wheat. *Plant Breeding Abstracts*. Vol.59 No.7.
- GIRKO,V.S., VOLOSHCHUK,A.D.; (1990). Induction and growth of a wheat cell culture in liquid medium. *Doklady Vsesoyuznoi Ordena Lenina I Ordena Trudovogo Krasnogo Znamei Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk im. V.I. Lenina*. No.9, 6-10.
- GREEN,C.E., PHILLIPS,R.L.; (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maine. *Crop Science*. 15:417-421.
- HARRIS,R., WRIGHT,M., BYRNE,M., VARNUM,J., BRIGHTWELL,B., SCHUBERT,K.; (1988). Callus formation and plantlet (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. 7(5)337-340.
- HAYASHI,Y., SHIMAMOTO,K.; (1988). Wheat protoplast culture: embryogenic colony formation from protoplasts. *Plant Cell Reports*. 7(6) 414-417.
- HE,D.G., YANG,Y.M., SKOTT,K.J.; (1988). A comparison of scutellum callus and epiblast callus induction in wheat: the effect of genotype embryo age and medium. *Plant Science, Irish Republic* 57(3)225-233.
- ,D.G., -----,Y.M., -----,K.J.; (1992). Plant regeneration from protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* cv. Hartog). *Plant Cell Reports*. Berlin, W.Germany. Vol.11(1). 16-19.

- ,D.G., -----,Y.M., -----,K.J.; (1989). The effect of macroelements in the induction of embryogenic callus from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) Plant Science 64(2)251-258.
- HEYSER,J.W., NABORS,M.W., MACKINNON,C., DYKES,T.A., DEMOTT, K.J., KAUTZMAN,D.C., 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. Pflanzenzüchtg. 94:218-233.
- HUNSINGER,H., SCHAUZ,K.; (1987). The influence of dicamba on somatic embryogenesis and frequency of plant regeneration from cultured immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Breeding. 8 (2) 119-123.
- ILCHEVA,V., ZAGORSKA,N.; (1991). Induction of callus and regeneration in tissue cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). Genetika I Seleksya. 4(5)368-375.
- INAGAKI,M.; (1986). Callus induction and plant regeneration from immature haploid embryos of wheat. Japan. J.Breed. 36:49-53.
- ITO,S., ABE,J.; (1990). Callus formation and plant regeneration from immature wheat embryos. Bulletin of the Tohoku National Agricultural Experiment Station. No.81,33-40.
- KAO,K.N., MICHAYLUK,M.R.; (1975). Nutritional requirements for growth of *Vicia hasajtana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. Planta 126:105-110.
- KARABAEV, M.K., DZHARDEMALIEV, Z.H.K., BEGALIEV, M.K., KURBAKOV, O.I., AITKHOZHIN, M.A.; (1988). *In vitro* culture of wheat. In Biologiya kul'tiviruemykh kletoki biotekhnologiya.1. Novosibirsk, USSR. 151-152.

- KARADIMOVA,M., ERIKSON,T.; (1986). Somatic embryogenesis and organogenesis in the callus culture of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetikai Selektsiya*. 19(5)451-455.
- ,M., NEDKOUSKA,M.; (1992). Progress in protoplast regeneration system and genetic manipulation of cereals (rice and wheat). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 6 (2) 11-15.
- KARP,A., WU,Q.S., STEELE, S.H., JONES,M.G.K. (1987) Chromosome variation in dividing protoplasts and cell suspension of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 74:140-146.
- KIM,S.C., KIM,S.G.; (1989). Plant regeneration from single cell culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *The Korean Journal of Botany* (Korean Republic). 32(4)227-233.
- KIM,H.B., LEE,J.H.; (1987). Studies on the isolation and fusion of protoplasts from *Triticum aestivum* L. and *Hordeum bulbosum* L. *Korean Journal of Breeding*. 19(1)64-69.
- KOBA,T., SHIMADA,T., OTANI,M., NIIZEKI,H.; (1988). Chromosomal and morphological variation in plants regenerated from calli of immature embryos and inflorescences of a barley-wheat hybrid. *Institute of Plant Science Research*. 757-762.
- KÜN.E., (1983). Serin iklim tahılları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları:875, Ders Kitabı:240. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara.
- LARKIN,P.J., RYAN,S.A., BRETTELL,R.I.S., SCOWCROFT,W.R; (1983). Heritable somaclonal variation in wheat. *TAG*, 67:443-455.
- LAZAR,M.D., COLLINS,G.B., VIAN,W.E.; (1983). Genetic and environmental effects on the growth and differentiation of wheat and somatic cell cultures. *The Journal of Heredity*, 74:353-357.

- LEE,B.; (1989). Cereal transformation. *Plants Today*, Jan-Feb. 9-11.
- LHOTOVA,M., KUCERA,L.; (1990). Embryogenic callus induction and plant regeneration from cultured immature embryos of wheat. *Sbornik uvtiz, Genetika a Slechteni*. 26(4)257-264.
- LINSMAIER,E.M.; SKOOG,E.; (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 8:100-127.
- LI,Z.Y., XIA,G.M., CHEN,H.M., (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic cell suspension of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28(1) 79-85.
- LIU,B.; (1988). A preliminary study on the relationship between callus growth rate and plantlet regeneration capacity of wheat. *Acta Agriculturae Universitatis Jilinensis* 10(2)16-20,103-104.
- LÖRZ,H., GOBEL,E., BROWN,P.; (1988). Advances in tissue culture and progress toward genetic engineering in cereals. *Plant Breeding Abstracts*. Vol.100. 1-25.
- LU,W.Z., SHE,J.M., WU,H.M. ZHOU,H.Y., GE,M.R., WEN,K.; (1989). Callus induction and differentiation in embryo culture of *Triticum* species. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*. 5(4)9-13.
- MADDOCK,S.E.; (1987). Suspension and protoplast culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. 6,23-26.
- ,S.E., LANCASTER,V.A., RISIOTT,R., FRANKLIN,J.; (1983). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Journal of Experimental Botany*. 34(144)915-926.

- MALIGA,P., LORZ,H., LAZAR,G., NAGY,F.; (1982). Cytoplasm-protoplast fusion for interspecific chloroplast transfer in *Nicotiana*. *Mol.Gen.Genet.* 185,211-215.
- MCHUGHEN,A., (1983). Rapid regeneration of wheat *in vitro*. *Annals of Botany*. 51(6)851-853.
- MOHMAND,A.S., NABORS,M.W.; (1991). Comparison of two methods for callus culture and plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 26(3)185-187.
- ,A.S., -----,M.W.; (1990). Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes. *Plant Cell Reports*. 8(9)558-560.
- MOROCZ, S., DONN, G., NEMETH,J., DUDITS,D. (1990). Nutrient medium *Ther. Appl. Genet.* 70:721-726
- MOROZOVA,S.E.; (1988). Duration of regenerative ability in wheat callus. In *Biologiya kul'tiviruemykh kletok biotekhnologiya*.1.Novosibirsk, USSR. 135-136.
- MURASHIGE,T., SKOOG,F.; (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- NIKIFOROVA,I.D., BASHARKINA,N.V.; (1988). Protoplasts from suspension culture of *Triticum timopheevii*. In *Biologiya kul'tiviruemykh kletok biotekhnologiya*,1.Novosibirsk, USSR.27-28.
- OHNOUTKOVA,L., NOVAK,F.J.; (1985). Effect of *in vitro* culture conditions on callus formation and regeneration from immature embryos and inflorescences of wheat and barley. *Acta Universitatis Agriculturae Brno. A(Facultas Agronomica)*. 33(3)323-326.

- ORSHINSKY, B.R., MCHUGHEN, A.; (1987). Callus culture and plant regeneration in Neepawa wheat. *Canadian Journal of Plant Science*. 67(1)284.
- OVESNA, J., LHOTOVA, M.; (1987). Study of callus growth and plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) tissue culture. *Scientia-agriculturae-Bohemoslovaca*. 19(4)243-252.
- OZIAS-AKINS, P., VASIL, I.K.; (1982). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*. 110(2)95-105.
- PAPENFUSS, J.M., CARMAN, J.G.; (1987). Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin. *Crop Science*. 27(3)588-593.
- PAUK, J., KERTESZ, Z., JENES, B., PURNHAUSER, L., MANNIEN, O., PULLI, S., BARABAS, Z., DUDITS, D.; (1994). Fertile wheat (*Triticum aestivum* L.) regenerants from protoplasts of embryogenic suspension culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 38:1-10.
- , J., SZARKA, B.; (1991). Protoplast isolation and culture investigations in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiologia Plantarum*. 82(1)A5 (En, also Eighth international protoplast symposium.). Cereal Research Institute, Szeged, Hungary.
- PEMOV, A.YU., DMITRIEVA, N.; (1988). Aspects of extracting protoplasts from the mesophyll of wheat and cytofluorimetry of the nuclear DNA in protoplasts from different areas of the leaf. In *Biologiya kul'tiviruemykh kletok biotekhnologii*, 1. Novosibirsk, USSR. 33.
- PRILYUK, L.V.; (1988). Organogenesis in callus culture of four wheat species. *Nauchno-Tekhnicheskii Byulleten' Vsesoyuznogo Ordena Leninai*

- Ordena Druzhby Narodov Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Rasteniievodstva Imeni N.I.Vavilova. N0:177,58-62.
- , L.V.; (1988). Plant regeneration in callus culture of four wheat species. In *Biologiya kul'tiviruemykh kletoki biotekhnologiya*, 1. Novosibirsk, USSR. 113.
- QIAO, Y.M., CATTANEO, M., LOCATELLI, F., LUPOTTO, E.; (1991). Embryogenic callus cultures, cell suspension, and protoplast system in hexaploid wheat. *Physiologia Plantarum* 82(1)A6
- , Y.M., -----, M., -----, F., -----, E.; (1992). Plant regeneration from long term suspension culture-derived protoplasts of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. 11:262-265.
- RAJYALAKSHMI, K., DHIR, S.K., MAHESHWARI, N., MAHESHWARI, S.C.; (1988). Callusing and regeneration of plantlets via somatic embryogenesis from inflorescence cultures of *Triticum aestivum* L.; role of genotype and long-term retention of morphogenic potential. *Plant Breeding*. 101(1)80-85.
- RAKOSY-TICAN, L., CRACIUN, C., TURCU, I., CRACIUN, V.; (1991). Improved method for ultrastructural studies of elektrofused plant protoplasts. *Physiologia Plantarum* 82(1)A22.
- REDWAY, F.A., VASIL, V., LU, D., VASIL, I.K.; (1990). Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. and Appl. Genet.* 79 (5) 609-617.
- , F.A., -----, V., VASIL, I.K.; (1990). Characterization and regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*. 8:714-717.

- REN, Y.G., JIA, J.F., LI, M.Y., ZHENG, G.C.; (1989). Plantlet regeneration from protoplasts isolated from callus cultures of immature inflorescences of wheat (*Triticum aestivum* L.), Chinese Science Bulletin. 34(19)1648-1652.
- REXEN, F., MUNCK, L.; (1984). Cereal crops for industrial use in Europe. The Commission of the European Communities and Carlsberg Research Laboratory. Copenhagen.
- SCHAEFFER, G.W., LAZAR, M.D., BAENZIGER, P.S. (1984) Wheat, Handbook of plant Cell Culture Crop Species. Vol.2:106-136.
- SEARS, R.G., DECKARD, E.L.; (1982). Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. Crop Science, 22:(May-Jun).546-550.
- SIDOROVA, N.V., MORGUN, V.V., LOYVIHENKO, V.F.; (1988). Peculiarities of callus and morphogenesis in immature embryo culture of different winter wheat genotypes. Fiziologiya i Biokhimiya Kul'turnykh Rastenii. 20(4)349-353.
- SIMMONDS, J.A., GRAINGER, J.L.; (1993). The toxicity of antibiotics to protoplast cultures of *Triticum aestivum* L. Plant Science, 89:209-214.
- SUN, B., SUN, Y.R., ZHU, Z., LI, X.H.; (1990). Enhancement of the frequency of regenerated plants from protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). Chinese Journal of Biotechnology 6(2)116-119.
- TABAEIZADEH, Z., PLOURDE, A., COMEAU, A.; (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Triticum aestivum* X *Leymus angustus* F₁ hybrids and the parental lines. Plant Cell Reports, 9(4)204-206.

- TUBEROSA,R., RAVAGLIA,S., LUCCHESI,C.; (1988). Callus induction and plant regeneration in Italian cultivars of bread wheat. *Agricoltura Mediterranea*. 118(4)361-365.
- VASIL,I.K.; (1987) Developing Cell and Tissue Culture Systems for the Improvement of Cereal and Grass Crops. *J. Plant Physiol* Vol.128:193-218.
- ,I.K.; (1990). Transgenic cereals becoming a reality. *Bio/Technology*. Vol.8. September. p.787.
- ,I.K., VASIL,V.; (1992). Advances in cereal protoplast research. *Physiologia Plantarum*. 85:279-283.
- VASIL,V., BROWN,S.M., RE,D., FROMM,M.E., VASIL,I.K.; (1991). Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Biotechnology*. Vol.9. August. p.743-747.
- ,V., CASTILLO, A.M., FROMM,M.A., VASIL,I.K.; (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology*. Vol.10. June. p.667-675.
- ,V., REDWAY,F., VASIL,I.K.; (1990). Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bio/Technology*. 8(5)429-434.
- ,V., VASIL,I.K.; (1986). Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays*. *J. Plant Physiol*. 15,417-421.
- WATANABE,N., KAWAJIRI,T., NISHIKAWA,K.; (1988). Contribution of D genome to the photosynthetic oxygen evolution in mesophyll

- protoplast isolated from leaves of wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry. France.* 26(4)421-425.
- , N., NISHIKAWA, K.; (1989); Photosynthetic rates mesophyll protoplasts of *Triticum* and *Avena*. *Proc. of the 6th Internati. Congr. of SABRAO.* 373-376.
- , N.; (1993). Photosynthetic variation in mesophyll protoplasts seedling leaves in *Lolium* species. *Photosynhetica.* 29(1)151-155.
- WHELAN, E.D.P., SCHAALJE, G.B.; (1992). Vernalization of embryogenic callus from immature embryos of winter wheat. *Crop Science* 32(1)78-80.
- YANG, Y.M., HE, D.G., SCOTT, K.J.; (1994). Cell aggregates in wheat suspension cultures and their effects on isolation and culture of protoplasts. *Plant Cell Reports.* 13(3-4)176-179.
- , Y.M., ————, D.G., ————, K.J.; (1991). Establishment of embriyogenic suspension cultures of wheat by continuous callus selection. *Aust.J. Plant Physiol.*, 18:445-452.
- , Y.M., ————, D.G., ————, K.J.; (1993). Plant regeneration from protoplasts of durum wheat (*Triticum durum* Desf. cv.D6962). *Plant Cell Reports.* 12(6)320-323.
- YANG, X.H., LI, H.C., HU, D.F.; (1991). Enhancing wheat protoplast isolation by negative pressure treatment. *Acta Agric. Boreali-Sinica* 6:2-57-61.
- YU, Y.J., PU, Z., LIAO, P.A., YU, F.Q.; (1990). Variability of some traits in the plants regenerated from culture of immature wheat embryos. *Hereditas Beijing*. 12(3)4-6.
- ZAGHMOUT, O.M.F., TROLINDER, N.L., (1993). Factors affecting transient expression in protoplasts isolated from very slowly growing

- embryogenic callus cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Apply. Genet. 86:721-730.
- ZAMORA, A.B., SCOTT, K.J.; (1983). Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. Plant Science Letters, 29:(2/3)183-189.
- ZHANG, L.J., SEILLEUR, P.; (1987). A simple fast method to obtain high frequency of plant regeneration from mature and immature wheat embryos. Bull. Rech. Agron. Gembloux, 3:187-197.
- , L.J., -----, P.; (1985). In vitro regeneration of plants from calluses of *Triticum aestivum* cultivars. In somaclonal variations and crop improvement. Proceedings of a seminar. Gembloux, Belgium, 3-5 September. 1985. Dordrecht, Netherlands; Martinus Nijhoff. 182-187.
- ZHENG, Q.C., ZHU, Y.L., CHEN, W.H.; (1989). Plantlet regeneration from *in vitro* culture of young spikes of wheat and its variation. Acta horticulturae Nucleatae Sinica. 3(3) 129-136.
- ZHONG-YI, L., GUANG-MIN, X., HUI-MIN, C.; (1992). Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast isolated from embryogenic cell suspensions of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 28(1)79-85.

TEŞEKKÜR

Bana bu araştırma konusunu veren, çalışmalarım sırasında her türlü yardımlarını esirgemeyen ve çok değerli fikirleriyle bilim hayatıma yön veren sayın hocam Prof.Dr. N.Kemal KOÇ'a en derin saygılarımla teşekkür ederim.

Bu araştırmanın büyük bir kısmını yürüttüğüm, KSÜ Ziraat Fakültesi, Biyoteknoloji laboratuvarının kurulmasına vesile olan ve biyoteknoloji ile tanışmamı sağlayan sayın hocam Doç.Dr. Kadriye (ÇAĞLAYAN) YILDIZGÖRDÜ'ye teşekkür ederim.

Bu araştırmanın yürütülmesi sırasında rutin laboratuvar ihtiyaçlarımızı karşılayan ve her türlü yardımlarını esirgemeyen KSÜ Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölüm Başkanı sayın hocam Prof.Dr. Aydın AKKAYA' ya teşekkür ederim.

Sitolojik çalışmalarım sırasında engin bilgi ve tecrübeleriyle yardımlarından dolayı KSÜ Rektör Yardımcısı sayın hocam Prof.Dr. Şehabettin ELÇİ'ye teşekkürler ederim

Ayrıca çalışmalarım sırasında yardımlarından dolayı Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Araştırma Görevlisi Mukadder KAYIM'a, KSÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğrencileri Leyla DANIŞTI ve Gül ÇİTİL'e teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1965 yılında Kahramanmaraş'ta doğdum. İlk orta ve lise öğrenimimi aynı şehirde tamamladım. 1988 yılında Ç.Ü Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümünden mezun oldum. 1989 yılında Gaziantep Üniversitesine bağlı Kahramanmaraş Ziraat Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. 1991 yılında G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilimdalında yüksek lisansımı tamamladım ve aynı yıl Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilimdalında doktora öğrenimime başladım. Halen Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

