

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

133047

FARKLI BUĞDAY GENOTİPLERİNİN *IN VITRO* REJENERASYON ve GENETİK
TRANSFORMASYON ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

AYŞE GÜL NASIRCILAR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

133047

2003

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

**FARKLI BUĞDAY GENOTİPLERİNİN *IN VITRO* REJENERASYON ve GENETİK
TRANSFORMASYON ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYŞE GÜL NASIRCILAR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Bu tez 20.01.0121.03 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2003

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI BUĞDAY GENOTİPLERİNİN *İN VİTRO* REJENERASYON ve GENETİK
TRANSFORMASYON ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

AYŞE GÜL NASIRCILAR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu teztarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN (Danışman)



Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU



Prof. Dr. Kenan TURGUT



Doç. Dr. Sibel SÜMER



Doç. Dr. Naci ONUS



ÖNSÖZ

Son 15 yıl içinde hızla gelişen bitki biyoteknolojisi, biyoteknolojinin en önemli alanlarından birisidir. Başta hastalık ve zararlılara dayanıklılık olmak üzere, kültür bitkilerinin besin kalitesinin artırılması ve çevresel streslere karşı direnç kazanma gibi birçok tarımsal özelliğin iyileştirilmesinde klasik ıslah yöntemleri çoğu kez yetersiz kalmaktadır. Oysa, bitki biyoteknolojisinde kullanılan doku kültürü ve bitkilere gen aktarım yöntemleri sayesinde çoğu bitkinin ıslahında tarımsal açıdan önemli sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda amacımız, ülkemiz ve dünya nüfusunun beslenmesinde en önemli besin kaynaklarından birisi olan buğday bitkisinin ülkemizde yetiştirilen farklı çeşitlerinin doku kültüründeki rejenerasyon kapasitesini ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile genetik transformasyonunun gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini *in vitro* ortamda araştırmaktır. Ayrıca verilerimizin, buğday ıslahına yönelik olarak yapılmakta olan çalışmalara bir katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren danışmanım Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN' a teşekkür ederim. Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve desteğinden yararlandığım Prof. Dr. Kenan TURGUT' a, emeğini ve bilgisini benimle paylaşan arkadaşım Arş. Gör. K. Melih TAŞKIN' a, tezimde yer alan fotoğrafların çekilmesinde büyük emeği olan Arş. Gör. Deniz ŞİRİN' e, istatistiklerin yapılmasında yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Ercan ÖZKAYNAK' a, tezimin yapılması sırasında maddi ve manevi desteklerini gördüğüm tüm arkadaşlarıma ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Ayrıca tezimde kullandığım buğday çeşitlerini sağlayan Yenimahalle Tarım Kampüsü bünyesinde bulunan Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü' ne, bana çalışma ortamı sağlayan Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne ve Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü' ne, araştırmaya maddi destek sağlayan (Proje No: 20.01.0121.03) Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi' ne de teşekkür ederim.

Tüm eğitimim süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme ve eşime de ayrıca teşekkür ederim.

ÖZET

FARKLI BUĞDAY GENOTİPLERİNİN *IN VITRO* REJENERASYON ve GENETİK TRANSFORMASYON ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe Gül NASIRCILAR

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Aralık 2003, 77+x sayfa

Bu çalışmada, buğdayın *in vitro* rejenerasyon yeteneği ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile genetik transformasyonu araştırılmıştır. Olgunlaşmış embriyo kültüründen kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonuna yönelik etkili bir yöntem geliştirmek için, iki kışlık buğday türünden (*Triticum aestivum*, *Triticum durum*) 10 farklı genotipin olgunlaşmış embriyoları, içlerine değişik bitki büyüme düzenleyiciler eklenmiş Murashige & Skoog (MS) besin ortamında kültüre alınmışlardır. Farklı indüksiyon ortamlarında, kültür cevabına genotipin etkisi yüksek bulunmuştur. *T. aestivum* çeşitleri arasında Yakar en iyi rejenerasyon kapasitesine sahipken, *T. durum* çeşitleri arasında Kızıltan ve Yılmaz en iyi rejenerasyon kapasitesine sahip çeşitlerdir. Kallus oluşum oranı ve kallusun rejenerasyon kapasitesi birbirinden bağımsız olmuştur. Olgunlaşmış embriyolar, yıl boyunca kullanıma hazır olmalarından dolayı, buğday doku kültüründe etkili bir kaynak olarak kullanılabilir.

Transformasyon çalışmalarında iki farklı *Agrobacterium tumefaciens* suşu kullanılmıştır. Olgun embriyo ve olgun embriyodan oluşan kalluslar *gus* ve *nptII* genlerini taşıyan *Agrobacterium* suşları ile enfekte edildi. Transformasyon çalışmaları sonucunda, herhangi bir aday transgenik bitki elde edilememiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Somatik embriyogenez, organogenez, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Agrobacterium tumefaciens*, buğday transformasyonu

JÜRİ: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Doç. Dr. Sibel SÜMER

Doç. Dr. Naci ONUS

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *IN VITRO* REGENERATION AND GENETIC TRANSFORMATION PROPERTIES OF DIFFERENT WHEAT GENOTYPES

Ayşe Gül NASIRCILAR

PhD in Biology

Advisor: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

December 2003, 77+x pages

In this work, *in vitro* regeneration ability and genetic transformation of wheat via *Agrobacterium tumefaciens* were investigated. Mature embryos of ten winter wheat genotypes from two species of wheat (*T. aestivum*, *T. durum*) were cultured in MS medium supplemented with different plant growth regulators to develop an efficient method of callus formation and plant regeneration from mature embryo culture. A strong genotypic effect on the culture responses was found in different media. While Yakar had the highest regeneration capacity among the *T. aestivum* cultivars, Yılmaz and Kızıltan had an excellent regeneration capacity among the *T. durum* cultivars. Callus induction rate and regeneration capacity of callus were found independent of each other. Mature embryos being available throughout the year, can be used an effective explant source in wheat tissue culture.

In transformation works, two different *Agrobacterium tumefaciens* strains was used. Mature embryo and mature embryo derived calli were transformed using disarmed *Agrobacterium* strains carrying both *gus* and *nptII* genes. In results of transformation experiments, no putative transgenic plants were obtained by histochemical GUS assay.

KEYWORDS: Somatic embryogenesis, organogenesis, *T.aestivum*, *T.durum*, *Agrobacterium tumefaciens*, wheat transformation

COMMITTEE: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Assoc. Prof. Dr. Sibel SÜMER

Assoc. Prof. Dr. Naci ONUS

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>In Vitro</i> Rejenerasyon Çalışmaları.....	1
1.1.1. Buğdayın önemi ve kullanım alanları.....	1
1.1.2. Bitki doku kültürleri.....	2
1.1.3. Organogenezis.....	5
1.1.4. Somatik embriyogenezis.....	7
1.2. Genetik Transformasyon.....	10
1.2.1. Gen aktarım yöntemleri	10
1.2.2. <i>Agrobacterium</i> aracılığıyla gen aktarımının mekanizması.....	11
1.2.3. Tahıllara gen aktarımı.....	15
2. MATERYAL ve METOD.....	19
2.1. Materyal.....	19
2.1.1. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemelerinde kullanılan çeşitler.....	19
2.1.2. Transformasyon denemelerinde kullanılan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> suşları.....	19
2.2. Metod.....	20
2.2.1. Genel doku kültürü koşulları.....	20
2.2.2. Eksplantların sterilizasyonu.....	20
2.2.3. Doku kültüründe kullanılan ortamlar.....	20
2.2.4. Bitki büyüme düzenleyiciler.....	22
2.2.5. Olgun tohumlardan kallus kültürünün kurulması	22
2.2.6. Kallus yaş ağırlığının hesaplanması.....	22
2.2.7. Kalluslardan bitki rejenerasyonu.....	22
2.2.8. Bakteri kültürlerinin üretilmesi.....	23

2.2.9. Bakteri kültürlerinin saklanması.....	23
2.2.10. Transformasyonda kullanılan antibiyotikler.....	23
2.2.11. Transformasyon çalışmaları.....	23
2.2.11.1.pGV2260 35S GUS INT suşu ile transformasyon.....	24
2.2.11.2. pWP 127 suşu ile transformasyon.....	24
2.2.12. Histokimyasal GUS analizi.....	25
2.2.13. Denemelerde kullanılan istatistiksel analizler	25
3. BULGULAR.....	26
3.1. <i>In vitro</i> rejenerasyon çalışmaları.....	26
3.1.1. IAA'in olgun buğday embriyolarından kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkileri	26
3.1.2. NAA' in olgun buğday embriyolarından kallus indüksiyonu ve organogenezis üzerine etkileri.....	26
3.1.2.1. <i>Triticum aestivum</i> L. çeşitlerinden kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna ait sonuçlar	26
3.1.2.2. <i>Triticum durum</i> çeşitlerinden kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon sonuçları.....	34
3.1.3. 2,4-D' nin olgun buğday embriyolarından kallus oluşumu ve somatik embriyogenez üzerine etkileri.....	39
3.1.3.1. <i>Triticum aestivum</i> L. çeşitlerinden kallus oluşum ve somatik embriyogenez sonuçları	39
3.1.3.2. <i>Triticum durum</i> çeşitlerinde kallus oluşum ve somatik embriyogenez sonuçları.....	45
3.1.4. Genotip-ortam etkileşiminin kallus indüksiyonu ve rejenerasyon üzerine olan etkileri	54
3.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> bakterisi ile transformasyon	55
3.2.1. pGV 2260 35S GUS INT suşu ile transformasyon	55
3.2.2. p WP 127 suşu ile transformasyon.....	57
4. TARTIŞMA.....	59
5. SONUÇ.....	67
6.KAYNAKLAR.....	69
7. ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

mg	Miligram
L	Litre
μ M	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Santigrad Derece
cm	Santimetre
g	Gram
NaOH	Sodyum Hidroksit
N	Normal
HCl	Hidroklorik Asit
pH	Hidrojen Potansiyeli
mL	Mililitre
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
mM	Milimolar
NaPO ₄	Sodyum Fosfat
M	Molar
NaH ₂ PO ₄	Sodyum Fosfat Monobazik
Na ₂ HPO ₄	Sodyum Fosfat Dibazik

Kısaltmalar

MÖ	Milattan Önce
2,4-D	2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit
MS	Murashige Skoog
NAA	Naftalen Asetik Asit
IAA	İndol Asetik Asit
IBA	İndol Bütirik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
T-DNA	Transfer DNA
T _i Plazmid	Tümör İndükleyici Plazmit
Vir Bölgesi	Virü lent Bölge

kb	Kilobaz
Npt II	Neomisin Fosfotransferaz
GUS	β- Glukronidaz
NOS	Napolin Sentetaz
CaMV	Karnabahar Mozaik Virusu
LSD	Least Significant Difference



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Agrobacterium</i> ' dan bitki hücrelerine T-DNA aktarımı için gerekli olan öğeler.....	12
Şekil 1.2. Yaralanmış bitki hücreleri tarafından salgılanan fenolik bileşiklerin vir genlerini uyarması ve bitki hücrelerine T-DNA transferi.....	14
Şekil 1.3. <i>Agrobacterium</i> ' dan bitki hücrelerine T-DNA aktarımının moleküler mekanizması	15
Şekil 3.1. Başlangıç eksplantı olarak kullanılan olgun bir embriyonun genel görünümü.....	27
Şekil 3.2. Yakar çeşidinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kallusun genel görünümü.....	28
Şekil 3.3. Gün 91 çeşidinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kalluslar.....	28
Şekil 3.4. İkizce çeşidinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kallusun genel görünümü.....	29
Şekil 3.5. Yakar çeşidinin ½ MS ortamında oluşturduğu bitkiciğin genel görünümü.....	31
Şekil 3.6. Toprağa aktarıldıktan sonra başak bağlayan olgun buğday bitkisi.....	31
Şekil 3.7. İkizce çeşidinin ½ MS ortamında oluşturduğu sürgün ve kök yapıları.	32
Şekil 3.8. Gün 91 çeşidine ait farklı derecelerde rejenere olmuş kalluslar.....	32
Şekil 3.9. Gün 91 çeşidinin oluşturduğu kallus ve kallustan rejenere olan bitkiler....	33
Şekil 3.10. Altın çeşidinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kallus.....	35
Şekil 3.11. Kızıltan çeşidinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kallus.....	36
Şekil 3.12. Yılmaz çeşidinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kallus.....	36
Şekil 3.13. MS +NAA ortamında rejenere olan bir kallusun yakından görünümü.....	37
Şekil 3.14. MS+NAA ortamında Altın çeşidinin oluşturduğu kök ve sürgünler.....	38
Şekil 3.15. Kızıltan çeşidinden rejenere olan olgun bitki.....	38
Şekil 3.16. İkizce çeşidinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kalluslar.....	41
Şekil 3.17. İkizce çeşidinde somatik embriyogenezin başlangıcı.....	42
Şekil 3.18. Yakar çeşidinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kallus.....	42
Şekil 3.19. Mızrak çeşidinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kalluslar.....	43
Şekil 3.20. Gün 91 çeşidinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kallus ve somatik	

embriyogenez başlangıcı olan yeşil noktacıklar.....	43
Şekil 3.21. Uzunyayla çeşidinde somatik embriyogenez.....	44
Şekil 3.22. Mızrak çeşidinde rejenerasyon başlangıcı.....	44
Şekil 3.23. Ç-1252 çeşidinin kallus indüksiyon ortamında oluşturduğu kalluslar.....	46
Şekil 3.24. Yılmaz çeşidinde bir kallus üzerinden somatik embriyogenezle oluşan sürgünler.....	47
Şekil 3.25. Yılmaz çeşidinde somatik embriyogenezis.....	47
Şekil 3.26. Altın çeşidinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kalluslar.....	49
Şekil 3.27. Ankara 98 çeşidinin oluşturduğu embriyogenik kallusun yakından görünümü.....	49
Şekil 3.28. Ankara 98 çeşidinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kalluslar.....	50
Şekil 3.29. Kızıltan çeşidinde somatik embriyogenez başlangıcı.....	51
Şekil 3.30. Somatik embriyogenezin daha sonraki bir aşaması.....	51
Şekil 3.31. Somatik embriyogenezle oluşan sürgünler.....	52
Şekil 3.32. Yılmaz çeşidinin oluşturduğu kallustan rejenere olan bitkicik.....	52
Şekil 3.33. Ankara 98 çeşidinde somatik embriyogenezle rejenerasyon.....	53
Şekil 3.34. <i>Agrobacterium</i> ile transformasyondan sonra antibiyotikli seçim ortamında oluşan kallusların yakından görünümü.....	56
Şekil 3.35. Transformasyon sonrasında antibiyotikli seçim ortamında oluşan kallusların yakından görünümü.....	58
Şekil 3.36. Transgenik tütün bitkisinde histokimyasal GUS analizi sonucunda oluşan mavi noktacıklar.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Vir genleri tarafından kodlanan proteinlerin <i>Agrobacterium</i> ve bitki hücrelerindeki fonksiyonları.....	13
Çizelge 2.1. Murashige ve Skoog besin ortamının içeriği.....	21
Çizelge 3.1. Beş farklı kışlık ekmeklik buğday genotipinin MS+NAA ortamında oluşturduğu embriyo kültür yanıtı.....	29
Çizelge 3.2. MS+NAA ortamında <i>T.aestivum</i> L. çeşitleri için farklı karakterler arasında oluşturulan korelasyon katsayısı tablosu.....	33
Çizelge 3.3. Beş farklı kışlık makarnalık buğday genotipinin MS+NAA ortamında oluşturduğu embriyo kültür yanıtı.....	34
Çizelge 3.4. MS+NAA ortamında <i>T.durum</i> çeşitleri için farklı karakterler arasında oluşturulan korelasyon katsayısı tablosu.....	39
Çizelge 3.5. Beş farklı kışlık ekmeklik buğday genotipinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu embriyo kültür yanıtı.....	40
Çizelge 3.6. MS+2,4-D ortamında <i>T.aestivum</i> L. çeşitleri için farklı karakterler arasında oluşturulan korelasyon katsayısı tablosu.....	45
Çizelge 3.7. Beş farklı kışlık makarnalık buğday genotipinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu embriyo kültür yanıtı.....	48
Çizelge 3.8. MS+2,4-D ortamında <i>T. durum</i> çeşitleri için farklı karakterler arasında oluşturulan korelasyon katsayısı tablosu.....	54
Çizelge 3.9. <i>T. aestivum</i> L. çeşitleri için Duncan Testi ile elde edilen genotip x ortam etkileşim çizelgesi.....	55
Çizelge 3.10. <i>T.durum</i> çeşitleri için Duncan Testi ile elde edilen genotip x ortam etkileşim çizelgesi.....	57

1. GİRİŞ

1.1. *In Vitro* Rejenerasyon Çalışmaları

1.1.1. Buğdayın önemi ve kullanım alanları

Bütün dünyada en önemli besin kaynağını oluşturan tahıllardan yaklaşık olarak M.Ö. 10000 yıllarında yararlanmaya başlanmıştır (Çınar 2003). 785 cins ve 10000' den fazla türü kapsayan *Gramineae (Poaceae)* familyası *Angiospermae* (kapalı tohumlu bitkiler)' nin en kalabalık familyalarından birisi ve en önemlisidir. İnsan beslenmesinde önemli yeri olan ve hayvancılıkta yem kaynağı olarak kullanılan birçok bitki türü bu familyanın üyesidir (Bürün 1996).

Buğday da mısır ve çeltik gibi, dünyadaki belli başlı tahıl ürünlerini içeren *Poaceae* familyasının bir üyesidir (Patnaik ve Khurana 2001). Buğday, M.Ö. 10000-15000 yıllarında Orta Doğu' da yetiştirilmiş ve tarih öncesi dönemde besin kaynağı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Quisenberry ve Reitz 1967). Yenilebilir tahıllar arasında buğday, dünya popülasyonunun beslenmesi için en fazla protein ve enerji sağlayan kaynaklardan birisidir (Patnaik ve Khurana 2001, Quisenberry ve Reitz 1967, Ahmad vd 2002b). Buğday, diğer tahıl ürünleri gibi, besin maddesi olarak bazı doğal avantajlara sahiptir. Bunlar arasında besleyici olması, depolanma ve taşınmasının kolay olması ve kolayca işlenebilme özelliği sayılabilir (Quisenberry ve Reitz 1967). Buğday diğer tahıllardan farklı olarak, mayalı ekmek yapımında kullanılabilen tek tahıldır (Barro vd 1997). Ayrıca çok farklı iklim koşullarına uyum yeteneğine sahip olup, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklıdır. Ekmek, makarna, bulgur ve diğer bazı besin maddelerinin yapımında ve hayvan beslenmesinde çok büyük öneme sahiptir. Sap, tane ve kök kalıntıları toprağın organik maddesine katkıda bulunur (Çınar 2003).

FAO 2001 yılı istatistiklerine bakıldığında, dünya tahıl üretimindeki sıralama; mısır, pirinç, buğday, arpa, sorghum, darı, yulaf ve çavdar şeklinde gerçekleşmiş olup bu sıralama ülkemiz için buğday, arpa, mısır, pirinç, yulaf, çavdar ve darı şeklindedir (Çınar 2003).

Günümüzde, üretilen buğdayın % 95' i ekmek ve diğer hamurlu ürünlerin hazırlanmasında kullanılan hexaploid tiptir (Patnaik ve Khurana 2001). *Triticum aestivum* L. olarak adlandırılan bu tip, ekmek yapımında kullanılması nedeniyle ekmeklik buğday olarak da bilinir (Quisenberry ve Reitz 1967). Geri kalan % 5' lik kısım ise genel olarak makarna ve bisküvi yapımında kullanılan tetraploid durum buğdaydır (Patnaik ve Khurana 2001). *Triticum durum*, makarna yapımında kullanılması nedeniyle makarnalık buğday olarak da isimlendirilir (Quisenberry ve Reitz 1967). Bazı ülke ve bölgelerde çok küçük alanlarda diğer bazı türler de yetiştirilir. Bunlar kaplıca (*Triticum monococcum*), gernik (*Triticum dicoccum*) ve topbaş (*Triticum compactum*) olarak isimlendirilen buğdaylardır (Çınar 2003).

1.1.2. Bitki doku kültürleri

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları = eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitlilik oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetik iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır.

Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur (Purnhauser vd 1987). *In vitro* bitki rejenerasyon yöntemlerinin amacı, kallusta meristematik bölgelerin ve meristematik sürgünlerin oluşumunu arttırmaktır (Vnuchkova vd 1993). Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibarıyla üç kısımda incelenebilir: 1) Organize olmuş meristematik hücreleri içeren somatik dokulardan rejenerasyon, 2) meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon ve 3) mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon. Birinci tip rejenerasyonda uç ve yan meristemlerden bitkiler çoğaltılır. Buna meristem kültürü yoluyla klonal çoğaltım denir. Elde edilen hücreler tamamen verici bitkiye benzerler.

İkinci tip rejenerasyon; doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının, genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin (özellikle oksin ve sitokininler) etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları ve daha sonra da bitkiyi (doğrudan organogenesis) veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması (doğrudan somatik embriyogenesis) şeklinde olabilir. Ayrıca her iki durum belirli bir kallus, proto-kallus veya hücre süspansiyonu oluşumu devresinden sonra da ortaya çıkabilir (dolaylı rejenerasyon) (Babaoğlu vd 2001).

Gramineae familyası içerisinde yer alan tahıl ve buğdaygil yem bitkilerinde uygulanan doku kültürü teknikleri; kallus kültürü, embriyo kültürü, anter kültürü, hücre süspansiyon kültürü ve protoplast kültürü olarak sayılabilir (Bürün 1996).

Kallus kültürü, bitkilerin değişik organ dokularının kallus (farklılaşmamış hücre yığını) oluşturmaya teşvik edilmesidir. Kallus elde etmek için kök, kotiledon, hipokotil, yaprak ayası, damar, çiçek durumu, embriyo (olgun ve olgunlaşmamış), gövde segmentleri vb. bitki kısımları eksplant olarak kullanılmaktadır. Kallus embriyogenik olabilir veya olmayabilir. Ancak, kallus dokusundan bitki rejenerasyonu için embriyogenik kallus önem taşımaktadır (Bürün 1996). Kallus türleri, *in vitro* çoğaltımda, kültürde ortaya çıkan somaklonal varyasyondan yararlanmada, hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve gen transferlerinin uygulanabilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Bürün 1996).

Kültüre alınmış hücre ve dokulardan yeni bir bitkinin etkili bir şekilde rejenerasyonu, ürün ıslahında biyoteknolojik yöntemlerin başarıyla uygulanması için gereklidir (Özgen vd 1998, Redway vd 1990). Kallus kültürlerinden bitki rejenerasyonu, bitki üretim programları için oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Bu nedenle kallustan bitki rejenerasyonu için etkili bir sistem kurulması, hücre ve doku kültür araştırmalarının başarısı için gereklidir (Özgen vd 1998, Özgen vd 1996). Etkili bir doku kültür tekniğinin kurulması, monokotiledonlarda özellikle de *Gramineae* familyasında, dikotiledonlara göre daha zordur. *In vitro* doku kültürlerinde kallus oluşumu ve oluşan kalluslardan bitki rejenerasyonunun düzeyi, temel olarak genotip (Purnhauser vd 1987,

Vnuchkova vd 1993) coğrafik orijin, donör bitkinin fizyolojik şartları, eksplant olarak kullanılan bitki organları, kültür ortamı ve bunlar arasındaki etkileşimden etkilenmektedir (Özgen vd 1996).

Buğday, en önemli besin maddelerinden biri olması nedeniyle, *in vitro* kültürlerde rejenerasyonu çok çalışılan bir bitkidir (Delporte vd 2001). Buğdayın doku kültüründe kallus oluşturması ve oluşan kalluslardan bitki rejenerasyonu genellikle eksplant kaynağı, genotip ve kültür ortamına bağlıdır (Özgen vd 1998). Genotipin etkisi nuklear veya sitoplazmik bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Buğdayda doku kültürü yanıtı tek veya birkaç kromozomla kontrol edilir (Özgen vd 2001).

Buğdayda farklı eksplant kaynakları somatik kallus kültürü için kullanılmaktadır. Bu eksplantlar arasında olgunlaşmamış embriyo, olgunlaşmamış yaprak ve çiçek durumu, olgun embriyo, mezokotil, tohum, apikal meristem (Özgen vd 1996), anter ve izole edilmiş mikrosporlar (Delporte vd 2001) bulunmaktadır. Bu dokuların bütün bir bitkiye rejenere olabilme kabiliyeti birbirinden farklıdır (Delporte vd 2001). Kültüre alınan eksplantlarda hücre bölünmeleri ve DNA sentezi kültürün üç günü içerisinde başlamakta ve hücre proliferasyonu bir hafta içerisinde fark edilmektedir. Hücre bölünmeleri prokambiyal / vasküler dokulardan meydana gelmektedir (Bürün 1996). Olgunlaşmamış embriyo, *in vitro* koşullarda rejenere olabilen en etkili doku olarak bulunmuştur (Delporte vd 2001, Özgen vd 1998). Olgunlaşmamış embriyolar buğday doku kültüründe en sık kullanılan eksplant kaynağı olmasına rağmen, sadece yılın belli bir dönemi kullanıma uygun durumdadır (Özgen 1996). Genellikle olgunlaşmamış embriyoların rejenerasyon ve transformasyon yeteneği, alındığı bitkinin büyüme şartlarından etkilenmektedir. Bu bitkinin kültürasyonu da bazen çok zor olabilmektedir (Delporte vd 2001). Bu nedenle *in vitro* kültür oluşumu için kullanımı oldukça sınırlıdır. Olgun embriyoların kullanılması için böyle bir zaman kısıtlaması yoktur (Özgen vd 1998). Olgun embriyoların fizyolojik durumu olgunlaşmamış embriyonun aksine pek farklılık göstermez. Üstelik embriyonun alındığı bitkinin sera, iklim dolabı gibi bazı ek ihtiyaçları bulunan ortamlarda yetiştirilmesine de gerek yoktur. Tohumlar tarladan toplanıp gelecekte kullanılmak üzere depo edilmektedir. Böylece yeterli miktarda materyal elde edilmekte ve çalışma da kolaylaşmaktadır (Delporte vd 2001). Yılın her

dönemi kullanıma hazır olmasına rağmen olgun embriyolar kallus oluşum sıklığının daha az olması nedeniyle eksplant kaynağı olarak pek tercih edilmemektedir (Özgen vd 1998). Ancak geliştirilen bazı yeni tekniklerle, olgun embriyolar da kallus oluşumu için başlangıç materyali olarak başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Özgen vd 1996). Yapılan çalışmalarda embriyonun tercih edilmesinin nedeni, embriyogenik kallus üretim oranının embriyogenik olmayan dokulara göre daha fazla olmasıdır (Delporte vd 2001). Kültüre alınan embriyo, kallus oluşturmaya teşvik edilir ve kallustan rejenerasyonla bitkiler elde edilir. Buğdaygillerde hem somatik embriyogenesis hem de organogenesis beraber veya sırasıyla meydana gelebilirken bazen de organogenesis esas rejenerasyon yöntemi olmaktadır (Bürün 1996).

Özgen vd (1996), buğdayda yüksek oranda kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu elde etmek amacıyla yedi farklı makarnalık kışlık buğday çeşidinin olgun ve olgunlaşmamış embriyolarını kültüre almışlardır. Çalışmada olgunlaşmamış embriyolar için 2 mg/L 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) içeren Murashige Skoog (MS) besin ortamı kullanılırken, olgun embriyolar şişirilmiş tohum üzerinde hafifçe oynatıldıktan sonra 8 mg/L 2,4-D içeren ortama yerleştirilmiştir.

Özgen vd (1998), olgunlaşmış embriyo kültürlerinden kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonuna yönelik etkili bir yöntem geliştirmek için 12 farklı kışlık buğday (*Triticum aestivum*) genotipinin olgunlaşmamış ve olgun embriyolarının *in vitro* kültürünü yapmışlardır.

Karaca ve Bürün (1999), Doğu 88 buğday çeşidinin olgun ve olgun olmayan embriyolarını 2,4-D, kinetin, naftalen asetik asit (NAA) veya asparajin katılmış MS ortamında kültüre almışlardır.

1.1.3. Organogenezis

Organogenesis, hücre ve dokulara baskı uygulanıp bazı değişikliklere sebep olunarak sürgün ve kök primordiumu (taslağı) diye isimlendirilen tek kutuplu ve

vasküler sistemi, kökenini aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesine yol açan bir işlemdir.

Organogenesisde başarı elde etmenin en önemli koşullarından birisi, uygun bir eksplant kaynağının seçilmesidir. Normal şartlarda herhangi bir bitki parçası organogenesis çalışmalarında eksplant olarak kullanılabilir, fakat yaygın olarak kullanılanlar; gövde, kök, yaprak, çiçek durumu, yumurtalık veya yumurta hücresi, kotiledon ve hipokotil gibi fide organları ve tohum embriyosudur. Bu tür eksplantlar doğrudan veya kallus üzerinden dolaylı olarak organ ve embriyoyu oluştururlar.

Oksin ve sitokin *in vitro* kültürlerde en sık ihtiyaç duyulan iki bitki büyüme düzenleyicisidir (Gürel vd 2001). Bitki büyüme düzenleyicileri hücre bölünmesini uyarmaktadır (Francis ve Sorrell 2001). Ortamda bulunan sitokin ve oksinin yoğunluk ve oranı *in vitro* büyümenin miktar ve çeşidini düzenler. En fazla kullanılan oksinler 2,4-D, NAA, indol asetik asit (IAA) ve indol bütirik asit (IBA)' dir. Oksinler 0,06-27 μM (0,01-5,0 mg/L) arasında değişen yoğunluklarda kullanılmıştır. Dışarıdan verilen oksin veya sitokininin bir tanesi bazı durumlarda organogenesis için yeterli olabilir (Babaoğlu vd 2001).

Buğdaygil türleri ile yapılan denemelerde, en yaygın olarak yapay bir oksin olan 2,4-D 1,0-5,0 mg/L oranında kullanılmaktadır. Daha yüksek yoğunlukları bitki rejenerasyonunu engellemektedir. Kallus kültürlerinde kinetin eklenimine gereksinim olmadığı, hatta 2,4-D ve IAA içeren kinetinsiz ortamlarda embriyoların tamamının kallus ürettiği belirtilmektedir. Ortama prolin, gümüş nitrat, absisik asit, hindistan cevizi sütü eklenmesine gerek bulunmamaktadır (Bürün 1996).

Armstrong vd (1987), yapmış oldukları çalışmada haploid buğday bitkisinin üretimi için anter kültürü yapmışlardır. İlk aşamada 1,5 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L kinetin ve % 10 Ficol 400 içeren sıvı ortamda kültüre alınan anterler 28 °C' de 3-7 hafta bekletilmiştir. Daha sonra dokular 1,5 mg/L kinetin, 1 mg/L IAA ve % 0,7 agar içeren MS ortamına aktarılmış ve sonuçta kallus üzerinde yeşil büyüme noktacıkları oluşarak organogenesis yoluyla sürgün oluşumu gerçekleşmiştir.

1.1.4. Somatik embriyogenezis

Bitki hücrelerinden embriyo elde edilmesi döllenmiş yumurta hücresiyle sınırlı değildir. *In vitro* kültür şartlarını ve özellikle de bitki büyüme düzenleyicilerini ayarlayarak bir bitkinin herhangi bir somatik hücre, doku veya organından embriyo elde etmek mümkün olabilmektedir. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır. Somatik doku hücreleri öncelikle yüksek oranda oksin (genellikle 2,4-D) içeren ortamda kültüre alınır, daha sonra da oksin içermeyen yeni ortama aktarılırsa embriyo üretme yeteneği kazanmaktadır. Oksinlerin somatik bitki hücrelerine embriyo üretimi için yeniden zigotik bir kapasite kazandırdığı belirtilmektedir (Özcan vd 2001a). Somatik embriyolar tek bir hücreden doğrudan veya dolaylı yoldan oluşur. Aktif büyüme sırasında 2,4-D hızla metabolize olur. Sonuçta hücre duvarı inceler, hücreler genişler, vakuol oluşumu artar ve embriyogenik hücreler embriyogenik olmayan bir hale dönüşür. Bu nedenle kültürasyon boyunca embriyogenik yapının korunması için 2,4-D düzeyi çok iyi korunmalıdır (Vasil 1988).

Somatik embriyolar organogenesis yoluyla gelişen sürgünlerden farklılık gösterirler. Gövde-kök eksenine aynı zamanda sahip olup, asıl doku ile vaskular bağlantıları olmadığı için dokudan kolaylıkla ayrılabilirler. Günümüzde buğday, mısır, çeltik, soya, bezelye ve yonca gibi birçok önemli kültür bitkisinde yüksek oranda somatik embriyo üreten yöntemler geliştirilmektedir (Özcan vd 2001a). *Gramineae* familyasında daha az görüldüğü düşünülen somatik embriyogenesis günümüzde *in vitro* bitki rejenerasyonu için en yaygın yöntem olarak kullanılmaktadır (Vasil 1988). Ekmeklik ve makarnalık buğdaylar, çeltik, arpa ve mısır somatik embriyogenesisin olduğu tahıllar arasında yer almaktadır (Benkirane vd 2000).

Somatik embriyogenesis hızlı çoğaltımda, sentetik tohum üretiminde ve gen aktarımında önemli bir potansiyele sahiptir (Özcan vd 2001a).

Bitki rejenerasyon denemelerinde genellikle, protoplast kültürlerinde olduğu gibi, tek bir hücrel orijinden köken alan yöntemler kullanılmaktadır. Protoplast kültürü yoluyla verimli bitki oluşturulması bitkilerde, özellikle de tahıllarda genetik

mühendisliği tekniklerinin başarılı bir şekilde uygulanması için gereklidir. Tahıllarda, embriyogenik hücre süspansiyonlarından elde edilen protoplastların kültüre alınması sonucu bitki rejenerasyonu, uygulanan bir yöntemdir. Fakat buğdayda protoplast kültüründen rejenerasyon oldukça azdır. Ayrıca rejeneren bitkiler de canlılıklarını uzun süre koruyamazlar ve tohum oluşturamazlar (Ahmed ve Sagi 1993). Protoplast kültüründen daha başarılı olan bir diğer yöntem ise somatik embriyogenezistir (Hunsinger ve Schanz 1987).

Buğdayda kültüre alınmış eksplantların rejenerasyonu farklı çeşitlerde yapılmıştır (Papenfus ve Carman 1987). Fakat buğdaydan bitki rejenerasyonu kararsız, seyrek ve fazla üretken olmayan bir olaydır (Ahmad vd 2002b). Bazı buğday çeşitlerinden az sayıda sürgün elde edilirken, bazılarının olgunlaşmamış embriyolarından kallus indüksiyonu başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Çeşitler arasındaki bu farklılıklar rejenerasyon şekline de bağlıdır. Buğdayda bu rejenerasyon yöntemleri somatik embriyogenezis veya adventif sürgün oluşumu yoluyla olabilmektedir (Papenfus ve Carman 1987).

Buğday doku kültürünün başarısı, aynı zamanda çeşitli morfolojik olaylar için gerekli olan en uygun besin ortamının ve hormonların seçilmesine de bağlıdır. Oksin kaynağı olarak 2,4-D kullanıldığında çoğu çeşitte sürgün oluşumu gözlenir (Papenfus ve Carman 1987). Mısırın olgunlaşmamış embriyoları çıkarılıp kültür ortamına yerleştirildiğinde skutellum hücreleri aktif hale gelir, organel sayısında artış olur ve vakuol oluşumu ile birlikte nuklear morfoloji değişir. Bu reaksiyon şok cevabı olarak adlandırılır. Bu olay 24 saat içinde gerçekleşir ve 2,4-D varlığına bağlı değildir. Şok cevabının ardından oluşan ikinci olay ise kallus oluşumunun başlamasıdır. Bu olay büyüme yanıtı olarak adlandırılıp 2,4-D varlığına bağlıdır. Hücrelerdeki mitotik aktivite ile karakterize edilen bu olay, hücrelerin 2,4-D 'ye hassas olması sonucunda oluşur (Bronsema vd 1997).

Hunsinger ve Schanz (1987), kışlık buğday çeşitlerinin somatik embriyogenezine dicamba'nın etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında gelişimin farklı aşamalarındaki

embriyoların skutellasını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda 4 - 6 hafta içinde, oldukça yüksek oranda rejenerere olan kallus ve embriyoidler üretmişlerdir.

Papenfus ve Carman (1987), iki farklı buğday çeşitinin olgunlaşmamış embriyolarını kültüre alarak, kallus ve sürgün oluşumuna dicamba ve 2,4-D' nin etkilerini karşılaştırmışlardır. Dicamba' nın sürgün oluşturma oranının 2,4-D' ye göre daha fazla olduğunu çalışma sonucunda bulmuşlardır.

Redway vd (1990), *Triticum aestivum*' un sekiz ticari çeşitinin anter, çiçek durumu ve olgunlaşmamış embriyolarını kullanarak embriyogenik kallus oluşturmuşlardır. Kallus oluşumu ve rejenerasyon sıklığı açısından farklı ortamlarda kültüre alınan olgunlaşmamış embriyo ve çiçek durumu arasında bir fark gözlememişlerdir.

Pauk vd (1994), somatik embriyogenik kalluslardan, embriyogenik süspansiyon kültürleri oluşturmuşlardır. Bu süspansiyonlardan elde ettikleri protoplastlardan, somatik embriyogenezis yoluyla % 9 oranında verimli bitki elde etmeyi başarmışlardır.

Maes vd (1996), izole edilmiş skutellum kullanarak yaptıkları çalışmada; genotip, kültür ortamı, eksplant boyutu ve soğuk ön uygulaması gibi faktörlerin somatik embriyogenezis ve rejenerasyon üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, diğer faktörlerle kıyaslandığında genotipin etkisi tüm diğer faktörlerden üstün bulunmuştur.

Benkirane vd (2000), 10 farklı durum buğday çeşitinin olgunlaşmamış infloresens ve koleoptil fragmentlerini kültüre alarak somatik embriyogenezis yoluyla bitki elde etmişlerdir. Hem koleoptil hem de infloresens eksplantlarında kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu için genotip önemli bir faktör olarak bulunmuştur.

Delporte vd (2001), olgun embriyo kullanarak bir buğday rejenerasyon sistemi geliştirmişlerdir. Embriyolar, steril naylon bir süzgeç kullanarak parçalara ayrılmış ve 10 µM 2,4-D ile desteklenmiş katı ortamda embriyogenik kallus oluşumu için başlangıç eksplantı olarak kullanılmıştır.

1.2. Genetik Transformasyon

1.2.1. Gen aktarım yöntemleri

Bitkilere gen aktarımının başlamasıyla, günümüzde bitki biyoteknolojisi, çok çeşitli organizmalardan elde edilen genlerin bitkilere aktarılmasını sağlamıştır. Biyoteknolojik yaklaşımlarla gelişmiş özelliklere sahip olan çeşitlerin üretilmesi için geleneksel ıslah yöntemlerine göre çok daha az zaman harcanmaktadır (Patnaik ve Khurana 2001). Bazı önemli tarım ürünlerini de içeren pek çok bitki türü için, günümüzde, transformasyon rutin bir teknik haline gelmiştir. Sonuçta, hastalıklara, böcek ve herbisitlere direnç sağlayan genlerle, bitkisel ürünlerin yapısını değiştirecek genlerin aktarılmasıyla, daha dayanıklı ve kaliteli ürünler elde edilmiştir.

Herhangi bir gen aktarım sisteminin esasını, tam bir bitki oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerin kromozomlarına, istenilen genleri taşıyan bir DNA parçasının kalıcı olarak yerleştirilmesi ve o hücrelerden yeni bitki elde edilmesi oluşturmaktadır (Özcan vd 2001b). Bugün uygulanan ve gelişmekte olan pek çok bitki gen aktarım sistemi bulunmaktadır. Bunlar, protoplastlar aracılığı ile gen transferi, sağlam dokuların elektroporasyonu, mikroinjeksiyon (Cocking ve Davey 1987), mikroprojeksiyon bombardıman tekniği, silikon-karbid fibriller aracılığı ve *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarım teknikleri (Taşkın 1997) olarak sıralanabilir. Günümüzde, bitkilere gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan canlı vektör, *Agrobacterium tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri sayesinde hemen hemen tüm kültür bitkilerinde transgenik bitki elde edilebilmiştir. Başlangıçta buğdaygilleri de içeren tek çenekli bitkilere *Agrobacterium* aracılığıyla yapılan gen aktarım çalışmalarında istenilen başarıya ulaşılamamıştır. Ancak son yıllarda mısır, çeltik, arpa ve buğday gibi tek çenekli bitkilere de gen aktarımı yapılabilmektedir. Doğrudan gen aktarım yöntemlerine göre, *A. tumefaciens* ile gen aktarımının daha kolay ve ekonomik olması bu yöntemi popüler kılmıştır (Özcan vd 2001b).

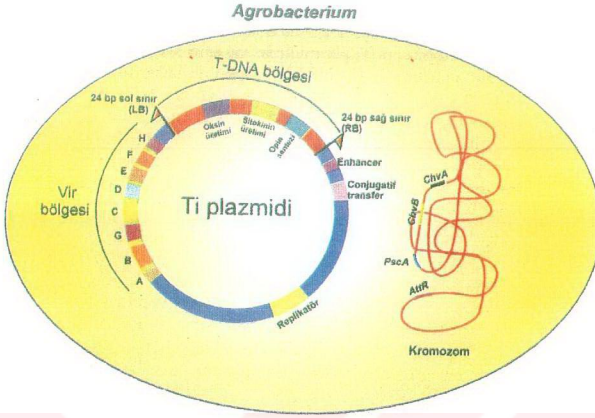
1.2.2. *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımının mekanizması

Agrobacterium, *Rhizobiaceae* familyasından toprakta yaşayan gram negatif bir bakteridir (Özcan vd 2001b). Dikotiledon bitkilerde kök boğazı uruna neden olmaktadır (Marks vd 1989).

Oksin ve sitokin grubu bitki hormonları, bitki hücrelerinin *in vitro* koşullarda çoğalarak kallus oluşturabilmeleri için mutlaka gereklidir. Oysa, *Agrobacterium* tarafından bir kez tümör oluşumu başlatıldıktan sonra, tümör izole edilerek steril kültür koşullarında, bakteri olmadan ve yardımcı hormonlara ihtiyaç duymadan büyütülebilmektedir (Özcan vd 2001b, Hooykaas ve Schilperoort 1992). Yapılan araştırmalarda, enfeksiyon sonucu oluşan dokuların, normal bitki hücreleri tarafından üretilmeyen bazı amino asit ve şeker türevlerini sentezlediği görülmüştür. Bu bileşikler genel olarak opin olarak adlandırılmaktadır (Hiei vd 1997). Tümörlü dokunun sentezlediği opinlerin türleri (octopin, nopalin, leucinopin gibi) enfekte eden bakteri suşu tarafından belirlenir (Hooykaas ve Schilperoot 1992). Bu bileşikler bakteri tarafından karbon ve azot kaynağı olarak kullanılır (Özcan vd 2001b).

Tümör oluşturan (virulent) *Agrobacterium* hatları ile yapılan ayrıntılı çalışmalar, tümör oluşumu ile opin sentezinin, bakteride bulunan 200 kb' den daha büyük bir megaplazmid üzerinde bulunan hareketli bir DNA parçası (T-DNA) ile ilişkili olduğunu göstermiştir. *Agrobacterium* enfeksiyonu sonucunda T-DNA bölgesi bitki hücresine aktarılmakta ve kromozomlarla stabil olarak bütünleşmektedir. T-DNA bölgesinde bulunan genlerin transkripsiyonu sonucunda tümör ve saçak kök oluşumu ile opin sentezi gerçekleşmektedir (Özcan vd 2001b). T-DNA bölgesini taşıyan bu plazmit, bitki tümör indüksiyonundaki rolü nedeniyle T_i (tümör indükleyici) plazmit olarak adlandırılır (Hooykaas ve Schilperoort 1992).

Agrobacterium bakterisi, bitki hücrelerine T-DNA aktarımı için gerekli olan üç bölgeyi taşımaktadır. Bunlar, T-DNA bölgesi, virülens (vir) bölgesi ve bakteri kromozomlarında bulunan *chvA*, *chvB*, *pscA* ve *attR* genleridir (Şekil 1.1) (Özcan vd 2001b).



Şekil 1.1. *Agrobacterium*'dan bitki hücrelerine T-DNA aktarımı için gerekli olan öğeler (Özcan vd 2001b)

Agrobacterium' un bitki hücrelerine tutunması ve koloni oluşturması tümör oluşumu için gerekli olan ilk aşamadır. *Agrobacterium* enfeksiyonu düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşikler salgılayan, yaralanmış veya hızlı bölünen süspansiyon hücrelerinin varlığında gerçekleşmektedir (Özcan vd 2001b). Yaralanmış bitki hücrelerinin varlığı, tümör indükleyici virülens (vir) bölgesi aracılığıyla bir seri moleküler mekanizmanın oluşumunu başlatır (Walden ve Schell 1990, Zachwieja ve Minocha 1991). Kromozomal *chvA*, *chvB* ve *pscA* virülens genlerinin β -1,2 glukan ve diğer şekerlerin sentezlenmesinde ve dolaylı olarak bakterinin tutunmasında rol aldığı bilinmektedir. Bakteri, bitki hücre duvarına tutunduktan sonra, yaralanmış bitki hücrelerinden salgılanan fenolik bileşikler, *Agrobacterium*'un algılamasıyla T-DNA aktarım işlemi başlamıştır (Şekil 1.2).

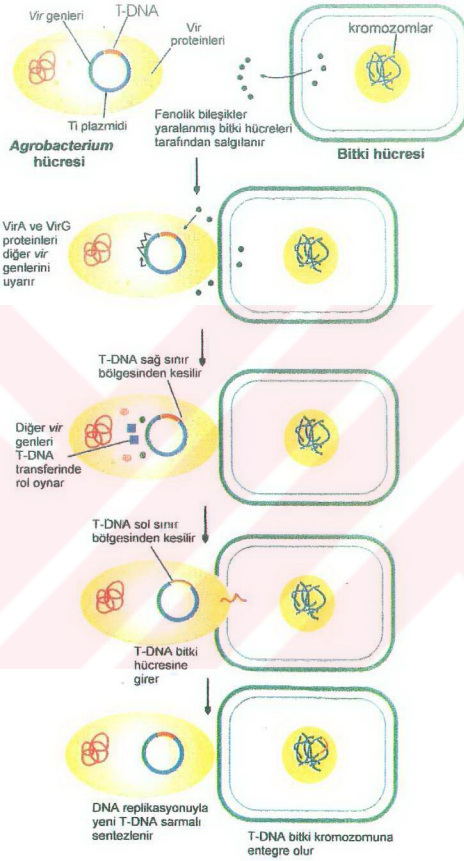
Normalde bitkilerde fitoaleksinin ve lignin biyosentezinde rol aldığı tahmin edilen asetoşiringon gibi fenolik bileşikler, bakteri hücresine girerek vir genlerini uyarmaktadır (Özcan vd 2001b). T₁ plazmidinin 40 kb'lık vir bölgesi virülensten sorumlu 24 geni içerir. Bu genler vir A'dan vir H'ye kadar 8 operondan oluşur ve birlikte regüle edilir (Hooykaas ve Schilperoot 1992). Bu genlerin bazıları sürekli ifade edilirken bir kısmı

ise sadece, bakteri yaralanmış bitki dokularından salgılanan sinyal moleküllerine maruz kaldığında üretilir (Zachwieja ve Minocha 1991). Virü lens bölgesi tarafından kodlanan VirA ve VirG proteinleri, fenolik indükleyicilerin varlığında diğer vir genlerinin aktivasyonuna aracılık eder (Hooykaas ve Schilperoort 1992). Vir A proteinini, bir periplazmik ve iki transmembran (TM₁ ve TM₂) olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır. Periplazmik kısmı monosakaritlerin yakalanmasında rol oynarken, TM₁ ve TM₂, algılama ve sinyal verme görevini üstlenmektedir. Kinaz TM₂ bölgesi, yaralanmış bitki hücrelerinden salgılanan sinyal proteinlerini algulayarak fosforilasyonla Vir A' nın uyarılmasında önemli rol oynamaktadır. Uyarılan Vir A, kendi fosfatını sitoplazmik bir DNA bağlanma proteini olan Vir G proteinine aktarma kapasitesine sahiptir. Vir A tarafından fosforilasyona uğrayan Vir G, daha sonra diğer vir genlerinin ifadelerinin düzenlenmesinde transkripsiyonel faktör olarak görev yapar. Vir G proteini tarafından uyarılan vir genlerine ait proteinlerin önemli bir kısmı T_i plazmidinden bitki hücresine T-DNA aktarımında doğrudan görev almaktadır (Çizelge 1.1) (Özcan vd 2001b).

Çizelge 1.1 Vir genleri tarafından kodlanan proteinlerin *Agrobacterium* ve bitki hücrelerindeki fonksiyonları (Özcan vd 2001b)

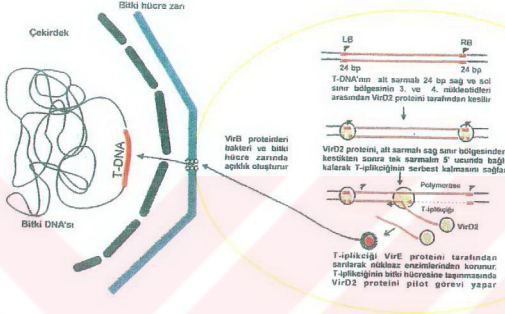
Vir proteini	<i>Agrobacterium</i> 'daki fonksiyonu	Bitkideki fonksiyonu
Vir A	Fenolik algılayıcı	-----
Vir G	Fenolik tepki regülatörü	-----
Vir B ₁₋₁₁	T-pilusunun sentezi ve oluşumu	-----
Vir C ₁	Muhtemel bağlanma proteini; T-DNA transferinin artırılması	-----
Vir D ₁	<i>In vivo</i> T-DNA prosesi ve çift sarmal T-DNA' nın sınırlarında <i>in vitro</i> çentik açılması	-----
Vir D ₂	T-DNA sınır spesifik endonükleaz; muhtemelen T iplikçliğini bitkiye taşıyan pilot proteini	T iplikçığının 5' ekzonükleolitik degradasyondan korunması ve bitki genomuna entegrasyonu
Vir E ₁	Vir E ₂ ' nin <i>Agrobacterium</i> ' dan taşınması ve korunması	-----
Vir E ₂	<i>Agrobacterium</i> ' da muhtemel T kompleksinin oluşumu	Btkide muhtemel T kompleksinin oluşumu; T iplikçığının nükleolitik degradasyondan korunması, nükleer hedeflenmesi ve oluşan nükleer açıklık kompleksinden geçişi
Vir F	?	Konukçu duyarlılık faktörü; bitki hücresinin bölünme çemberinin düzenlenmesi için Skp 1 proteinleriyle muhtemel etkileşim
Vir H	Muhtemel sitokrom p450 enzimi	-----

Agrobacterium Aracılığıyla Gen Transferi



Şekil 1.2. Yaralanmış bitki hücreleri tarafından salgılanan fenolik bileşiklerin vir genlerini uyarması ve bitki hücresine T-DNA transferi (Özcan vd 2001b)

Vir genlerinin uyarılmasının sonucunda T-DNA'nın alt sarmalına homolog, tek sarmal bir DNA molekülü (T-iplikçığı) üretilir. T-DNA sınırları içerisinde yerleştirilen herhangi bir DNA parçası tek sarmal olarak bitki hücrelerine aktarılır ve bitki genomuna entegre olur (Şekil 1.3) (Özcan vd 2001b).



Şekil 1.3. *Agrobacterium*'dan bitki hücreğine T-DNA aktarımının moleküler mekanizması (Özcan vd 2001b)

1.2.3. Tahıllara gen aktarımı

Agrobacterium tumefaciens çoğu yüksek yapılı bitki için etkili bir transformasyon vektörü olarak kullanılmakta (Zachwieja ve Minocha 1991) ve çoğu dikotiledon tür *Agrobacterium*'la transforme edilebilmektedir (Dale vd 1989, Hiei vd 1997).

1976 yılında, *Agrobacterium* aracılığı ile monokotiledonların transformasyonu için genel bir durum değerlendirmesi yapılmış ve monokotiledon bitkilerin *Agrobacterium* enfeksiyonuna hassas olmadığına dair genel bir görüş benimsenmiştir. Tahıllar *Agrobacterium* ile transforme edildiklerinde, yaralanmanın olduğu hücreler ve komşu

hücrelerin öldüğü, bu nedenle transformasyonun gerçekleşmediği fikri kabul edilmiştir (Mooney vd 1991). Diğer bir görüş ise monokotiledon bitkilere bakteri atağının az olduğu, bunun nedeninin bitki hücre duvarındaki bağlanma bölgelerinde kısmi metilasyonun olabileceği düşüncesidir (Mooney ve Goodwin 1991). Bu nedenlerden dolayı monokotiledon bitkilerin transformasyonu için embriyogenik kallus veya süspansiyon hücrelerine doğrudan DNA transfer yöntemleri geliştirilmiştir (Rashid vd 1996).

Tahılların transformasyonu için kullanılan çeşitli yöntemler arasında osmotik şok veya elektrik şoku uygulanarak protoplastlara DNA' nın doğrudan aktarılması veya bütün bir hücreye mikroprojeksiyon bombardımanı ile DNA' nın aktarılması bulunmaktadır (Vasil vd 1992). Çeltik, transformasyonu yapılmış ilk önemli tahıl bitkisidir. Toriyama vd (1988), Zhang ve Wu (1988) ile Shimamoto vd (1989), protoplastlara doğrudan gen aktarımı ile transgenik çeltik bitkisi elde etmeyi başarmışlardır. Christou vd (1991) ise yine çeltikte olgunlaşmamış embriyolara elektroporasyonla gen aktarım yöntemini uygulamıştır. Protoplastlara, elektroporasyon veya polietilen glikol aracılığı ile doğrudan gen transferi yapılarak transgenik çeltik ve mısır üretilmiştir. Fakat, bu yöntemle transformasyonla rejenere olan bitkiler genellikle anormal fenotipik özellikler göstermiş ve verimli bireyler oluşturamamışlardır (Klôti vd 1993).

Stanford ve arkadaşlarının genetik transformasyon için biolistik yöntemi geliştirmelerinden sonra bu yöntem çoğu laboratuvar ve çok sayıda bitki türünde genetik transformasyon için kullanılmaya başlanmıştır (Perl vd 1992). Partikül bombardımanı ile çeşitli eksplantlardan rejenere olabilen transforme hücre elde etmek mümkündür. Çeltik dışındaki diğer tahılların protoplastlarından bitki rejenerasyonunun zor olması nedeniyle mısır ve yulafıta kallus kültürü veya embriyogenik süspansiyon kültürlerine partikül bombardımanı ile gen aktarımı yapılmıştır (Weeks vd 1993).

Buğday, dünyada en fazla üretilen tahıl grubu olmasına rağmen transformasyonu en geç yapılan tahıldır (Weeks vd 1993). Olgunlaşmamış buğday skutellumundan oluşan kalluslara bombardıman yöntemi ile gen aktarımı yapılmış ve aktarılan genlerin geçici

ifadesi oldukça yüksek oranda bulunmuştur (Peri vd 1992). Buğdayın hücre süspansiyon kültürleri (Vasil vd 1991), olgunlaşmamış embriyoları (Vasil vd 1993, Zhou vd 1995, Altpeter vd 1996), rejenerere olabilen embriyonik kallusları (Vasil vd 1992, Weeks vd 1993, Iser vd 1999), olgunlaşmamış skutellası (Barro vd 1997, Demeko vd 1999) ve arpanın meristematik sürgünlerine (Zhang vd 1999) bombardıman yöntemi ile gen aktarımı yapılarak verimli transgenik bitkiler elde edilmiştir.

Agrobacterium aracılığı ile transformasyon basit, düşük maliyetli ve oldukça etkili bir sistem olması nedeniyle doğrudan gen aktarım yöntemlerine bir alternatif oluşturmuştur (Patnaik ve Khurana 2001). *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyonun diğer avantajları arasında aktarım etkinliğinin daha fazla olması, daha büyük bir DNA parçacığının aktarılabilmesi (Brisibe vd 2000), transfer edilen DNA'nın daha az sayıda kopyasının bitki genomuna girişi (Uze vd 1997) sayılabilir.

Monokotiledon bitkilere *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımına dair ilk çalışmalar, bu toprak bakterisinin monokotiledon bitki hücreleriyle sınırlı miktarda ilişkiye girebileceği ve DNA transferinin olabileceğini göstermektedir (Patnaik ve Khurana 2001). İlk olarak 1984 yılında *Chlorophytum capense* ve *Narcissus*'ta *Agrobacterium* aracılığı ile transformasyon denemeleri yapılmıştır (Hooykaas-van Slogteren vd 1984). Daha sonra ise 1987 yılında T-DNA'nın bitki genomuna entegre olduğu *Asparagus officinalis* (Bytebier vd 1987) ve *Dioscorea bulbifera* (Schafer vd 1987)'da moleküler kanıtlarla gösterilmiştir.

Agrobacterim aracılığı ile transformasyon çalışmalarının çoğu, uygun eksplantlar *Agrobacterium*' un inokülasyonu ile ilgilidir. İlk olarak Mooney ve arkadaşları 1991 yılında buğday eksplantlarına bakterinin tutunması için yaralanmanın gerekli olmadığını göstermişlerdir (Patnaik ve Khurana 2001). Diğer tahıllarla karşılaştırıldığında buğdayın transformasyon denemeleri oldukça yenidir. Bu nedenle aktarılan genlerin kalıtımı ve stabilitesi ile ilgili yayınlar da oldukça azdır (Cannell vd 1999). Geçtiğimiz altı yıl içinde *Gramineae* familyasına ait bitkilerde *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarım çalışmalarında bir artış olmuş ve bu yöntemle DNA aktarımının gerçekleştirildiği çeltik (Hiei vd 1994, Ahmad vd 2002a, Rashid vd 1996), mısır (Ishida vd 1996), arpa (Tingay

vd 1997) ve buğdayda (Cheng vd 1997, Hess vd 1990, Khanna ve Daggard 2003) gösterilmiştir.

Araştırmamızda, ülkemiz ve dünyada en önemli besin kaynaklarından birisi olan buğdayın, ülkemizde yetiştirilen farklı çeşitlerinin rejenerasyon ve genetik transformasyon yetenekleri araştırılmıştır. Çalışmamızın, buğdayın tarımsal özellikleri ve kalitesinin iyileştirilmesine yönelik olarak yapılan gen mühendisliği çalışmalarına bir katkı oluşturacağını beklemekteyiz.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. *In vitro* rejenerasyon denemelerinde kullanılan çeşitler

Bu çalışmada kışlık ekmeklik buğday türü olan *Triticum aestivum* L.'nin Gün 91, İkizce, Yakar, Mızrak ve Uzunyayla çeşitlerinin olgun embriyoları ile, kışlık makarnalık buğday türü olan *Triticum durum*'un Kızıltan, Altın, Yılmaz, Ç-1252 ve Ankara 98 çeşitlerinin olgun embriyoları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Denemede kullanılan bütün çeşitler Ankara Yenimahalle Tarım Kampüsü bünyesinde bulunan Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden sağlanmıştır.

2.1.2. Transformasyon denemelerinde kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* suşları

Çalışma boyunca iki farklı *Agrobacterium tumefaciens* suşu kullanılmıştır. Bunlar pGV2260 35S GUS INT ve pWP 127 suşlarıdır. İçerisinde kanamisin direnç sağlayan seçici *nptII* (neomisin fosfotransferaz) ve rapörtör *gus* (β -glukuronidaz) işaret genleri taşıyan disarmed *Agrobacterium tumefaciens* suşları Prof. Dr. Kenan Turgut' dan (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü) elde edilmiştir. *NptII* geni NOS (napolin sentezi) promotör ve terminatör dizileri tarafından kontrol edilirken, *gus* geni ise CaMV (karnabahar mozaik virüsü) 35 S promotör ve terminatör dizileri tarafından kontrol edilmektedir. *Agrobacterium* içerisindeki gen ifadesinin engellenmesi için de *gus* geninin kodlama bölgesine bitkisel bir intron yerleştirilmiştir (Özcan vd 2001). Ayrıca p2260 35S GUS INT suşunun kromozomu üzerinde rifampisin, pWP127 suşunun kromozomu üzerinde ise rifampisin, karbenisillin ve gentamisin antibiyotiklerine dayanıklılık kodlayan bakteriyel genler bulunmaktadır.

2.2. Metod

2.2.1. Genel doku kültürü koşulları

Bütün doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde (Prosit, Horizontal Laminair Flow Cabinet) yürütülmüş olup, diseksiyonda kullanılan aletler (pens, bistüri vd) % 99' luk etil alkole batırıldıktan sonra alevden geçirilerek kullanılmıştır. Tohumlardan embriyo çıkarılması, % 99' luk etil alkolle silindikten sonra steril kabin içine yerleştirilen diseksiyon mikroskobu yardımıyla yapılmıştır. Eksplantlardan kallus oluşumu için 9 cm' lik steril cam petri kapları, sürgün oluşum aşaması için 6 cm çap ve 9 cm boyundaki metal kapaklı, otoklavlanabilen cam kavanozlar kullanılmıştır. Petri kapları ve kavanoz kapaklarının etrafı streç filmle sarılmıştır. Murashige ve Skoog besin ortamı (Murashige ve Skoog 1962) (Çizelge 2.1) bütün çalışmalarda basal ortam olarak kullanılmıştır. Kültürler, sıcaklığı 25 °C, fotoperiyodu 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık 4000 lüks ışık şiddeti olan kültür odalarında gelişmeye bırakılmıştır.

2.2.2. Eksplantların sterilizasyonu

Eksplantların yüzey sterilizasyonu için, olgun tohumlar önce % 20' lik sodyum hipoklorit içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla sürekli karıştırılarak 20 dakika bekletildi. İki kez steril distile sudan geçirildikten sonra % 70 etanolde 3 dakika bekletilmiştir. Ardından 3 kez steril distile su ile yıkanarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

2.2.3. Doku kültüründe kullanılan ortamlar

Doku kültürü çalışmalarında temel ortam olarak Murashige ve Skoog (MS) besin ortamı kullanılmıştır. MS ortamına 20 g/L sukroz ilave edildikten sonra 1 N NaOH veya 1 N HCl kullanılarak pH= 5,7' ye ayarlanmıştır. Ortamın katılaştırılması için pH ayarı yapıldıktan sonra ortama 7 g/L agar ilave edilmiştir. Ortamlar 121°C' de 20 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Büyüme düzenleyici hormonlar ortamlara otoklav öncesinde eklenmiştir.

Çizelge 2.1 Murashige ve Skoog besin ortamının içeriği (Murashige ve Skoog 1962)

Maddeler	mg/L
Makro Elementler	
NH ₄ NO ₃	1650.000
KNO ₃	1900.000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.000
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370.000
KH ₂ PO ₄	170.000
Mikro Elementler	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	620.00
MnSO ₄ . 4H ₂ O	2230.00
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	860.00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25.00
CuSO ₄ . 5H ₂ O	2.50
CoCl ₂ . 6H ₂ O	2.50
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2870.00
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3730.00
Vitaminler	
Myo-Inositol	10.00
Nikotinic asit	50.00
Pridoksin-HCl	50.00
Tiamin-HCl	50.00
Glisin	200.00

2.2.4. Bitki büyüme düzenleyiciler

Deneylerde kullanılacak bitki büyüme düzenleyicilerinin belirlenmesi aşamasında, kallus kültürünün kurulması için 2,4-D, NAA ve IAA kullanılmıştır. 2,4-D % 96'lık etil alkolde çözülerek hazırlanmış olup 2 mg/L' lik konsantrasyonu kullanılmıştır. NAA, 1 ml 1 N NaOH ile çözüldükten sonra toplam hacim 49 ml su ile 50 ml' ye tamamlanmıştır. Denemede NAA' nın 1 mg/L' lik konsantrasyonu kullanılmıştır. IAA 1 ml 1 N NaOH ile çözüldükten sonra 49 ml su ile 50 ml'ye tamamlanmış ve 2 mg/L ve 4 mg/L' lik konsantrasyonları denenmiştir.

2.2.5. Olgun tohumlardan kallus kültürünün kurulması

Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumların, oda sıcaklığında steril distile su içinde bir gece bekletilerek su alarak şişmeleri sağlanmıştır. Şişen tohumların embriyoları, steril şartlarda, diseksiyon mikroskobu altında çıkarılmıştır. Olgun tohumlar, skutelum üstüne gelecek şekilde, farklı konsantrasyonlarda hormon, 20 g/L sukroz içeren ve 7 g/L agar ile katılaştırılmış MS ortamına alınmıştır (Özgen vd 1996).

2.2.6. Kallus yaş ağırlığının hesaplanması

Kallus induksiyon ortamında oluşan kallusların yaş ağırlığı, her bir çeşit için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Her çeşit için 20 adet kallus hassas terazide tartılarak ortalama kallus yaş ağırlığı hesaplanmıştır. Taze ağırlık verileri, kalluslar sürgün oluşum ortamına transfer edilmeden alınmıştır.

2.2.7. Kalluslardan bitki rejenerasyonu

Kallus induksiyon ortamında oluşturulan kallusların rejenerasyonu için, hormonsuz yarıya indirgenmiş MS ortamı kullanılmıştır. Embriyolar kallus induksiyon ortamında 3 hafta boyunca bekletildikten sonra oluşan kalluslar ½ MS ortamına aktarılmıştır. Sürgün oluşumunun ardından rejenere olan bitkicikler, aynı ortamı içeren cam kavanozlara

aktarılmıştır. Belirli bir büyüklüğe erişen bitkiler toprak ve torf karışımı içeren saksılara ekilmiştir.

2.2.8. Bakteri kültürlerinin üretilmesi

Bakteri kültürleri Luria-Bertani (LB) sıvı besin ortamı içerisinde $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmış gliserol stoklarından veya $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmış bakteri kolonilerinden çoğaltılmıştır. Sıvı LB besin ortamındaki kültürler, 48 saat süre ile $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de orbital çalkalayıcıda üretilmiştir. Seleksiyonda kullanılan antibiyotikler, ortamlar soğutulduktan sonra eklenmiştir. p GV2260 35S GUS INT suşu, içerisinde $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ rifampisin ve $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ kanamisin bulunan LB ortamı, pWP 127 suşu içinde $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ kanamisin, $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ rifampisin, $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ karbenisillin ve $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ gentamisin bulunan sıvı LB ortamında üretilmiştir.

2.2.9. Bakteri kültürlerinin saklanması

Kültürler 2 ml ' lik ependorf tüpleri içerisinde, % 40 gliserol içeren LB ile bakteri kültürlerini birleştiren bir ortamla karıştırılmasıyla hazırlanmış gliserol stoklarında $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

2.2.10. Transformasyonda kullanılan antibiyotikler

Antibiyotikler direnç genlerini taşıyan bitki ve bakteri hücrelerinin seçiminde ve kokültivasyon sonrası *Agrobacterium*' un gelişiminin engellenmesinde kullanılmıştır. Rifampisin metanolde, kanamisin, gentamisin, karbenisillin ve augmentin distile suda çözülmüştür. Bütün antibiyotikler filtrasyonla (por çapı $0,20\text{ }\mu\text{m}$ Corning marka) steril edilip, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

2.2.11. Transformasyon çalışmaları

Transformasyon çalışmalarında iki farklı *Agrobacterium tumefaciens* suşu ve iki farklı yöntem denenmiştir.

2.2.11.1. pGV2260 35 S GUS INT suşu ile transformasyon

p GV 2260 35 S GUS INT suşu ile transformasyon denemelerinde, başlangıç materyali olarak tohumlardan çıkarılan olgun embriyolar kullanılmıştır. Olgun embriyolar bir gece MS+2,4-D (2 mg/L) ortamında bekletilmiştir. Bakteri 48 saat süreyle, içerisinde 50 µg/ml rifampisin ve 50 µg/ml kanamisin bulunan sıvı LB ortamında 28 °C sıcaklıkta orbital çalkalayıcı yardımıyla üretilmiştir. 48 saat sonunda bakteriler çöktürülerek bir araya toplandı. Son hacim 500 µL olacak şekilde sıvı MS'de çözüldü. Bir gecelik ön kültüre tabi tutulan embriyolar steril bir petri içerisinde bakteri süspansiyonu ile muamele edildi. 3 dakika sonra bakteriler steril bir pipet yardımıyla ortamdaki uzaklaştırıldı. Embriyolar, skutelum dokusu besiyeri ile temas edecek şekilde MS+2,4-D (2 mg/L) ortamına aktarıldı. Bakteri ile 2 günlük bir kokültivasyonun ardından embriyolar 400 mg/L augmentin ve 25 mg/L kanamisin içeren MS+2,4-D (2 mg/L) ortamına alındı (Tingay vd 1997). Augmentin, kokültivasyon sonrasında ortamda bulunan bakterilerin gelişimini engellemek, kanamisin ise transgenik bitkilerin seçimi için ortama eklendi. 20 gün sonra ortamda oluşan kallusların transgenik olup olmadıkları histokimyasal GUS analizi ile test edilmiştir.

2.2.11.2. pWP 127 suşu ile transformasyon

Transformasyon için başlangıç materyali olarak 3 hafta süre ile MS+2,4-D (2 mg/L) ortamında oluşturulan kalluslar kullanılmıştır. Bakteri 48 saat süre ile, içinde 100 µg/ml rifampisin, 100 µg/ml kanamisin, 100 µg/ml karbenisillin, 25 µg/ml gentamisin bulunan sıvı LB ortamında 28 °C sıcaklıkta orbital çalkalayıcı yardımıyla üretilmiştir. 48 saat sonunda bakteriler çöktürülerek bir araya toplandı. Son hacim 5 ml olacak şekilde sıvı MS'de çözüldü. Kalluslar steril bir kavanoz içinde 15 dakika bakteri süspansiyonu ile muamele edildi. MS+2,4-D (2 mg/L) ortamına alınan kalluslar 2 gün süre ile bakteri ile kokültive edildi. Ardından 400 mg/L augmentin ve 25 mg/L kanamisin içeren MS+2,4-D (2 mg/L) ortamına alındı (Khanna ve Daggard 2003). 2 günün sonunda transgenik olup olmadıkları histokimyasal GUS analizi ile belirlenmiştir.

2.2.12. Histokimyasal GUS analizi

Histokimyasal GUS analizi için 5 mg X-Gluc 100 µL dimetilformamid içerisinde çözülmüş ve toplam hacim 50 mM NaPO₄, pH=7 tamponuyla 10 ml' ye tamamlanmıştır. Ardından, transformasyon işlemine tabi tutulmuş eksplantlardan oluşan kalluslar, bu solüsyonda 37 °C' ye ayarlı inkübatörde 72 saat boyunca bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda kalluslar, % 70' lik etil alkolle yıkanmış ve binoküler altında incelenmiştir.

50 mM Sodyumfosfat tamponunun (pH: 7) hazırlanışı

Stok A: 0,2 M NaH₂PO₄ (31,2 g/L)

Stok B: 0,2 M Na₂HPO₄ (28,39 g/L)

Stok A+B: 39 ml Stok A+ 61 ml Stok B alındığında 50 mM pH:7 Na fosfat tamponu hazırlanır.

2.2.13. Denemelerde kullanılan istatistiksel analizler

Denemeler, " tesadüf blokları deneme desenine " göre 3 tekrarlı ve her tekrarda 100 eksplant olacak şekilde planlanmıştır. Genotipin ve ortamın kültür oluşumuna etkisi MSTATC istatistik programı kullanılarak varyans analizi ve Duncan testi ile belirlenmiştir (Freed vd 1989). İki farklı ortamda, kallus indüksiyonu, rejenerasyon ve kallus ağırlığı arasındaki korelasyon katsayısı da yine MSTATC istatistik programı yardımıyla hesaplanmıştır (Freed vd 1989).

3. BULGULAR

3.1. *In Vitro* Rejenerasyon Çalışmaları

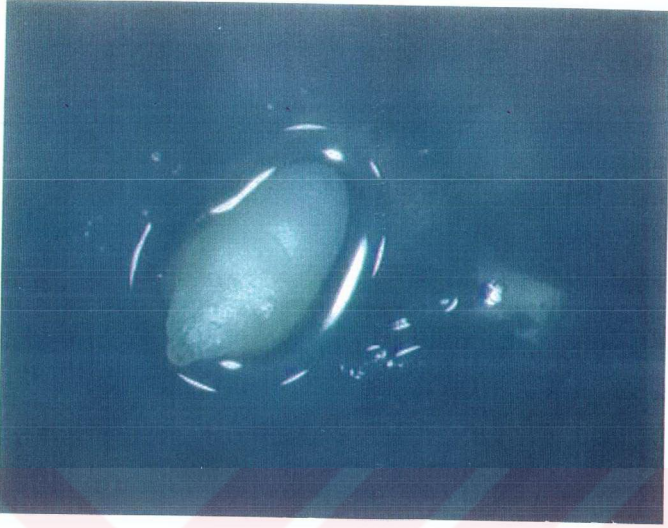
3.1.1. IAA' in olgun buğday embriolarından kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkileri

T.aestivum L.' nin Gün 91, İkizce, Yakar, Mızrak ve Uzunyayla çeşitleri ile *T.durum*' un Kızıltan, Altın, Yılmaz, Ç-1252 ve Ankara 98 çeşitleri ile yapılan *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında 2 veya 4 mg/L IAA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Test edilen bütün çeşitler, 2 veya 4 mg/L IAA içeren MS besin ortamında kallus oluşumu göstermemiş, embriyodan doğrudan kök ve sürgün oluşumu gözlenmiştir. Bu nedenle IAA' nın bu iki konsantrasyonunun, olgun buğday embriolarından kallus indüksiyonu için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

3.1.2. NAA' in olgun buğday embriolarından kallus indüksiyonu ve organogenezis üzerine etkileri

3.1.2.1. *Triticum aestivum* L. çeşitlerinden kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna ait sonuçlar

T.aestivum L. Gün 91, İkizce, Yakar, Mızrak ve Uzunyayla çeşitlerinin olgun embrioları (Şekil 3.1) kallus indüksiyonu için, içerisinde 1 mg/L NAA bulunan MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Deneyler her bir çeşit için 3 tekrarlı olarak yapılmış ve her tekrar için 100 embriyo kullanılmıştır. Deney sonucunda sayımlar üç farklı kriter göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Bu kriterler 1) iki hafta sonunda kallus indüksiyon ortamında oluşan kallus sayısı, 2) rejenerasyon olan kallus sayısı, 3) ortalama kallus yaş ağırlığıdır. Her tekrar için bu kriterlere göre sayım yapılmış ve üç tekrarın ortalaması alınarak varyans analizi ve Duncan Testi uygulanmıştır.

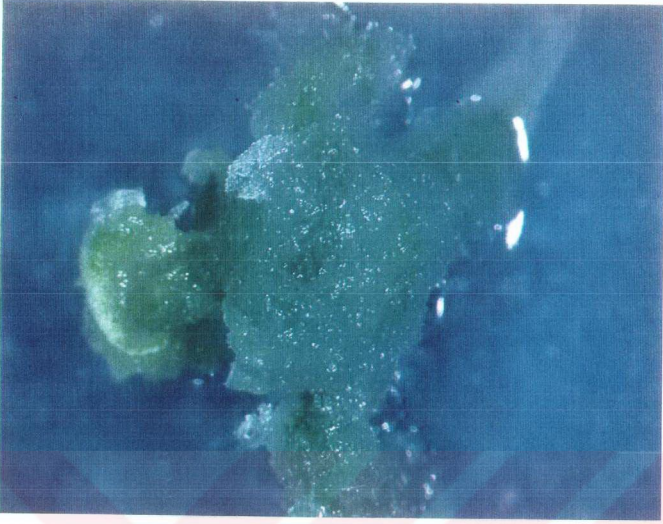


Şekil 3.1. Başlangıç eksplantı olarak kullanılan olgun bir embriyonun genel görünümü. 16 büyütme.

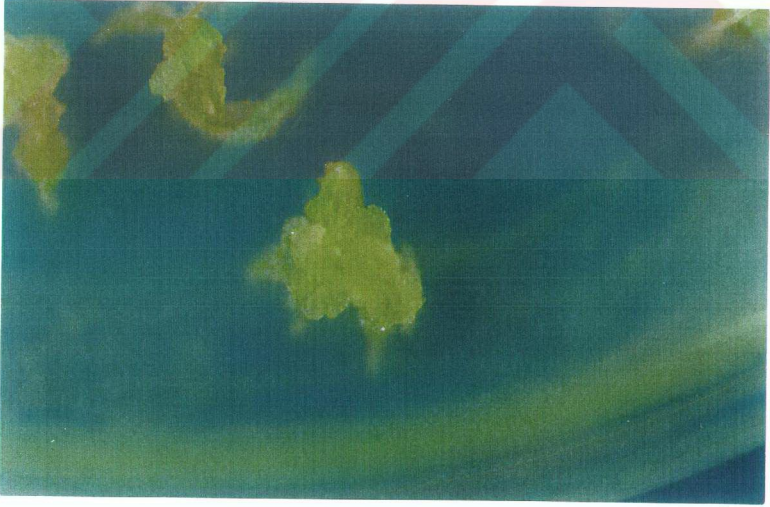
Kallus oluşumu kullanılan çeşitlere bağlı olarak, kültür başlangıcından itibaren en erken 3. günde başlamıştır. Yakar (Şekil 3.2) ve Mızrak çeşitleri 3. günde kallus oluşumu gösterirken, Gün 91 (Şekil 3.3) ve Uzunyayla çeşitlerinde kallus oluşumu 4. günde gözle görülür bir hale gelmiştir. İkizce ise (Şekil 3.4) 5. günde kallus oluşumu göstermiştir.

Kışlık ekmeklik buğdaylarda, denemelerde kullanılan çeşitler için, kallus yaş ağırlığı, kallus indüksiyonu ve rejenerasyon kapasitesinin büyük ölçüde genotipe bağlı olduğu görüldü (Çizelge 3.1).

T.C. YÖKSEKÖĞRETİM KURULU
DOĞUMANTASYON MERKEZİ



Şekil 3.2.Yakar çeşitinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kallusun genel görünümü. 8 büyütme.



Şekil 3.3.Gün 91 çeşitinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kalluslar. 4 büyütme



Şekil 3.4. İkizce çeşitinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kallusun genel görünümü. 2 büyütme

Çizelge 3.1. Beş farklı kışlık ekmeklik buğday genotipinin MS+NAA ortamında oluşturduğu embriyo kültür yanıtı

Genotip	Kallus indüksiyonu (%)	Kallusların rejenerasyon kapasitesi (%)	Kallus yaş ağırlığı (g)
Gün 91	43.67 ^a	55.00 ^{bc}	0.0512 ^a
Yakar	48.33 ^a	100.00 ^a	0.0577 ^a
İkizce	48.00 ^a	76.00 ^{ab}	0.0167 ^c
Mızrak	46.66 ^a	37.67 ^c	0.0272 ^{bc}
Uzunyayla	36.00 ^a	58.00 ^{bc}	0.0444 ^{ab}
LSD	15.02	24.08	0.0188

Kallus indüksiyon oranı çeşite bağlı olarak % 36.00'dan % 48.33' e kadar farklılık göstermiştir (LSD=15,02 P< 0,05). Kallus oluşum sıklığı en fazla % 48,33 oranı ile Yakar çeşitinde elde edilirken, en düşük oran % 36.00 ile Uzunyayla çeşitinde elde edilmiştir.

Kallus indüksiyon ortamında oluşan kalluslar rejenerasyon için hormonsuz yarım kuvvetli MS ortamına aktarılmadan önce kallus yaş ağırlığı tartılmıştır. Bazı kalluslar MS+NAA ortamında sürgün oluşturmaya başladığı için taze ağırlık alınmadan önce oluşan bu sürgünler kesilmiştir. Kallus yaş ağırlığı ortalaması en fazla olan çeşit Yakar olup, ortalama kallus ağırlığı 0,0577 g olarak bulunmuştur. En düşük kallus yaş ağırlığı 0,0167 g' la İkizce çeşiti olup, bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi, kallus yaş ağırlığı için de genotip önemli bir faktör olarak bulunmuştur (LSD = 0, 0188 P<0,05).

Kallus indüksiyon ortamında oluşan kalluslar, rejenerasyon için ½ MS ortamına aktarılmıştır. MS+NAA ortamında organogenezis olayı gerçekleşmiştir. Embriyo, bu ortamda kallus oluşturmuş, ½ MS ortamın aktarıldıktan sonra, kallus üzerinden dolaylı olarak organ oluşumu gözlenmiştir. Rejenerasyon kapasitesi de büyük ölçüde genotipe bağlı olarak bulunmuştur (LSD = 24,08 P<0,05).

En yüksek kallus indüksiyon oranına sahip olan Yakar, aynı zamanda en fazla rejenerere olabilen çeşit olarak bulunmuştur (Şekil 3.5, Şekil 3.6).

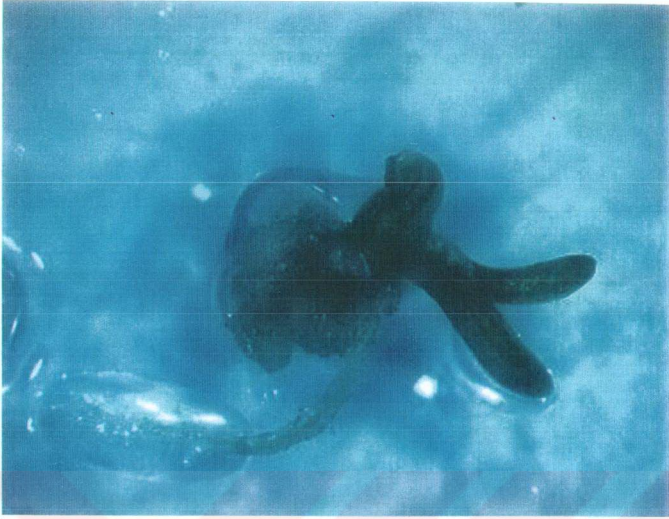
İkizce, Yakar' dan sonra en fazla (% 76.00) rejenerere olabilen çeşit olarak bulunmuştur (Şekil 3.7). Uzunyayla, en düşük kallus indüksiyon sıklığına sahip olan çeşit olmasına rağmen, rejenerasyon sıklığı açısından % 58.00 oranı ile 3. sırada yer almıştır. Onu % 55.00 oranı ile Gün 91 takip etmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.9). En düşük rejenerasyon sıklığına sahip olan çeşit % 37.67 oranı ile Mızrak çeşiti olarak bulunmuştur.



Şekil 3.5. Yakar çeşitinin ½ MS ortamında oluşturduğu bitkiciğin genel görünümü



Şekil 3.6. Toprağa aktarıldıktan sonra başak bağlayan olgun buğday bitkisi



Şekil 3.7. İkizce çeşitinin 1/2 MS ortamında oluşturduğu sürgün ve kök yapıları. 8 büyütme.



Şekil 3.8. Gün 91 çeşitine ait farklı derecelerde rejener olmuş kalluslar. 0.5 büyütme



Şekil 3.9. Gün 91 çeşitinin oluşturduğu kallus ve kallustan rejenerasyon olan bitkiler. 2 büyütme

MS+NAA ortamında kallus indüksiyonu, kallus yaş ağırlığı ve rejenerasyon sıklığı genotipe bağlı olarak bulunmasına rağmen, bu üç veri arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. MS+NAA ortamında *T.aestivum* L. çeşitleri için farklı karakterler arasında oluşturulan korelasyon katsayısı tablosu

Karakterler	Karakterler arasındaki korelasyon katsayısı		
	1	2	3
(1) Kallus indüksiyonu (%)	-	0,246	0,356
(2) Kallusların rejenerasyon kapasitesi (%)	-	-	0,225
(3) Kallus yaş ağırlığı (g)	-	-	-

3.1.2.2. *Triticum durum* çeşitlerinden kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon sonuçları

Triticum durum Kızıltan, Altın, Yılmaz, Ç-1252 ve Ankara 98 çeşitlerinin olgun embriyoları, kallus indüksiyonu için, içerisinde 1mg/L NAA bulunan MS besin ortamına alındı. Deneyler, her bir çeşit için 3 tekrarlı ve her tekrar için 100 embriyo olacak şekilde hazırlandı. Deney sonucunda sayımlar, *T. aestivum* çeşitleri için kullanılan kriterlere göre yapıldı. Üç tekrarın ortalaması alınarak varyans analizi ve Duncan Testi yapıldı.

Kallus oluşumu, kullanılan çeşite bağlı olarak en erken dördüncü günde en geç ise onuncu günde görülmüştür.

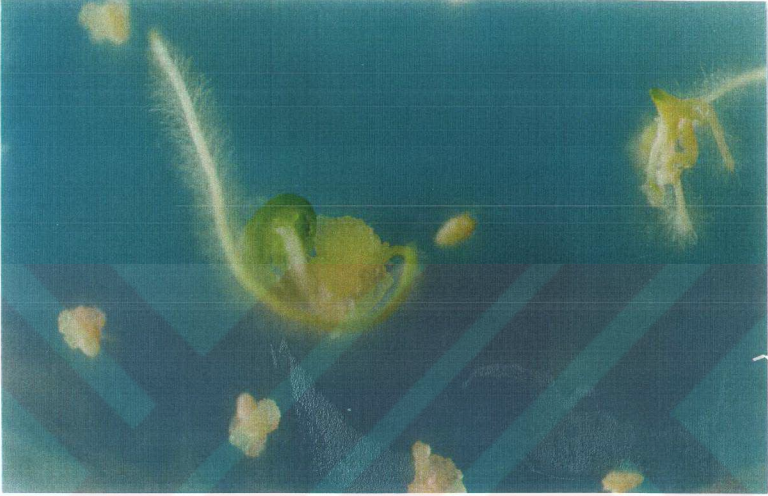
Kışlık makarnalık buğdaylarda, denemede kullanılan çeşitler için kallus indüksiyonu, kallus yaş ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesinin genotipe bağlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Beş farklı kışlık makarnalık buğday genotipinin MS+ NAA ortamında oluşturduğu embriyo kültür yanıtı

Genotip	Kallus indüksiyonu (%)	Kallusların rejenerasyon kapasitesi (%)	Kallus yaş ağırlığı (g)
Kızıltan	44.67 ^{ab}	63.33 ^b	0.0120 ^a
Altın	49.33 ^a	74.33 ^{ab}	0.0289 ^a
Yılmaz	44.67 ^{ab}	82.33 ^a	0.0254 ^a
Ç-1252	42.33 ^{ab}	73.67 ^{ab}	0.0305 ^a
Ankara 98	39.67 ^b	81.67 ^a	0.0274 ^a
LSD	8.325	14.22	0.0188

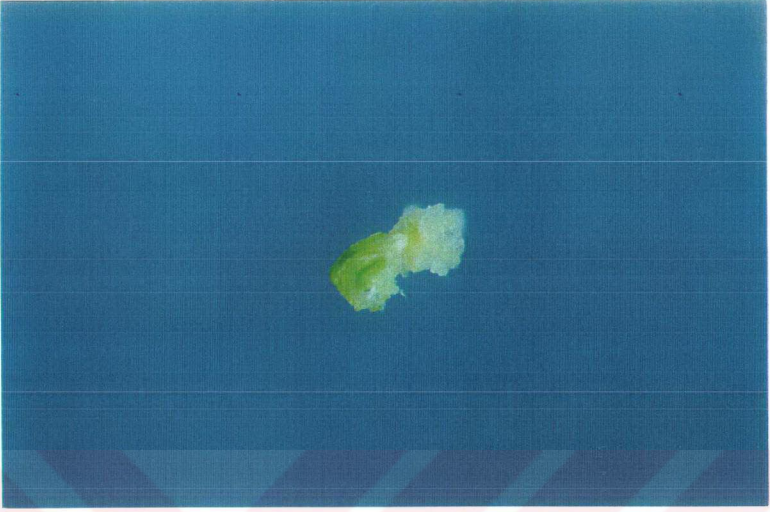
Kallus indüksiyon oranı, denemelerde kullanılan çeşite bağlı olarak % 39.67'den % 49.33'e kadar değişiklik göstermiştir (LSD = 8.325 P < 0.05). Kallus oluşum sıklığı en fazla % 49.33 oranı ile Altın çeşitinde (Şekil 3.10) elde edilirken, bunu sırasıyla %

44.67' lik bir oranla Kızıltan (Şekil 3.11) ve Yılmaz (Şekil 3.12) izlemiştir. Kallus indüksiyon sıklığı, en düşük olan çeşit ise % 39.67 ile Ankara 98 çeşiti olmuştur.

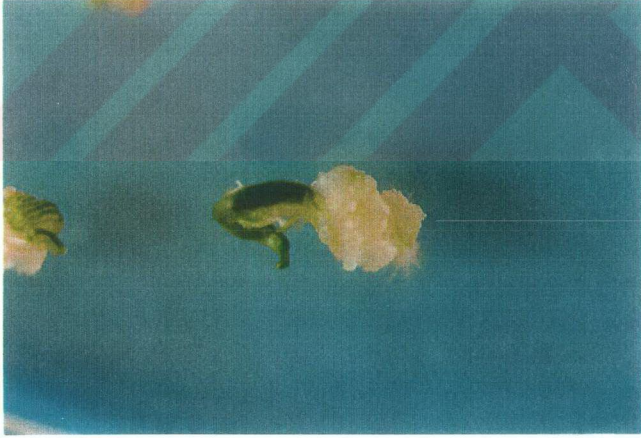


Şekil 3.10. Altın çeşitinin MS+ NAA ortamında oluşturduğu kallus. 2 büyütme

Kallus yaş ağırlığı 0.0305 g ile 0.0120 g arasında çeşitlilik göstermiştir (LSD = 0.0188 P< 0.05). Rejenerasyon kapasitesi büyük ölçüde genotipe bağlı olup, % 82.33 ile % 63.33 arasında değişmektedir (LSD= 14.22 P< 0.05) (Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15).

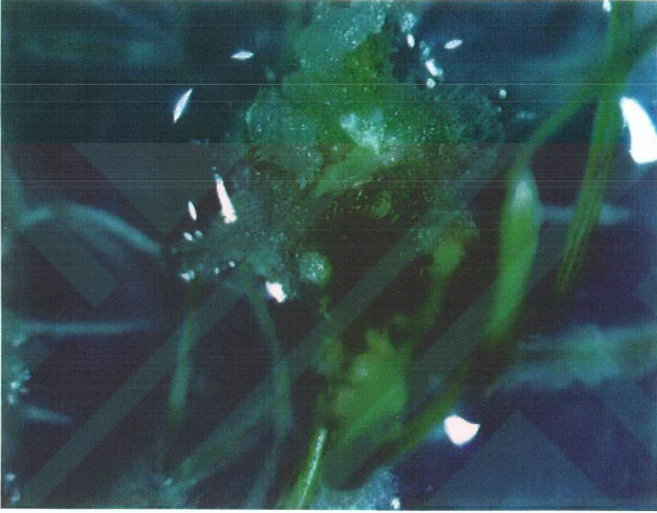


Şekil 3.11. Kızıltan çeşitinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kallus. 2 büyütme



Şekil 3.12. Yılmaz çeşitinin MS+NAA ortamında oluşturduğu kallus. 2 büyütme

MS+NAA ortamında kallus indüksiyonu, kallus yaş ağırlığı ve rejerasyon sıklığı genotipe bağlı olarak bulunmasına rağmen, bu üç veri arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır (Çizelge 3.4).



Şekil 3.13. MS+NAA ortamında rejeneren bir kallusun yakından görünümü.
8 büyütme.



Şekil 3.14. MS+NAA ortamında Altın çeşitinin oluşturduğu kök ve sürgünler. 2 büyütme



Şekil 3.15. Kızıltan çeşitinden rejenere olan olgun bitki. 0.1 büyütme.

Çizelge 3.4 MS+NAA ortamında *T. durum* çeşitleri için farklı karakterler arasında oluşturulan korelasyon katsayısı tablosu

Karakterler	Karakterler arasındaki korelasyon katsayısı		
	1	2	3
(1) Kallus indüksiyonu (%)	-	0.047	0.251
(2) Kallusların rejenerasyon kapasitesi (%)	-	-	0.215
(3) Kallus yaş ağırlığı (g)	-	-	-

3.1.3. 2,4-D' nin olgun buğday embriyolarından kallus oluşumu ve somatik embriyogenez üzerine etkileri

3.1.3.1. *Triticum aestivum* L. çeşitlerinden kallus oluşum ve somatik embriyogenez sonuçları

Triticum aestivum Gün 91, İkizce, Yakar, Mızrak ve Uzunayla çeşitlerinin olgun embriyoları, kallus indüksiyonu için, içerisinde 2 mg/L 2,4-D bulunan MS besin ortamına alındı. Deneyler herbir çeşit için 3 tekrarlı olarak yapıldı ve her tekrar için 100 embriyo kullanıldı. Deney sonucunda sayımlar 5 farklı kriter göz önünde bulundurularak yapıldı. Bu kriterler 1) kallus indüksiyon ortamında oluşan kallus sayısı, 2) rejenerasyon ortamında oluşan somatik embriyo sayısı, 3) eksplant başına düşen somatik embriyo sayısı, 4) embriyogenik kallus sayısı, 5) ortalama kallus yaş ağırlığı. Her tekrar için bu kriterlere göre sayım yapıldı ve üç tekrarın ortalaması alınarak varyans analizi ve Duncan Testi yapıldı.

Eksplantların etrafında, gözle görülebilir haldeki en erken kallus oluşumu yaklaşık olarak kültür başlangıcından itibaren 2 gün sonra görülmüştür. Bütün çeşitlerde en geç 4. günün sonunda kallus oluşumu görülmüştür. Oluşan kalluslar, kallus indüksiyon ortamından ½ MS ortamına aktarıldıktan sonra, somatik embriyo oluşumu en erken 20. günde, ortalama olarak da kültürün 25-30. günlerinde gerçekleşmiştir. MS+2,4-D ortamında, MS+NAA ortamından farklı olarak organogenezis yerine somatik embriyogenezis olayı gerçekleşmiştir. Somatik embriyolar, organogenezis yoluyla gelişen sürgünlerden farklı yapıda elde edilmişlerdir. Bunların asıl doku ile vaskular bir bağlantıları olmadığı için dokudan kolayca ayrılabilmişlerdir.

MS+NAA ortamında olduğu gibi, MS+2,4-D ortamında da kallus indüksiyonu, rejenerasyon ve kallus yaş ağırlığı, büyük ölçüde genotipe bağlı olarak bulunmuştur. Bu ortamda ayrıca, oluşan somatik embriyo sayısı ve eksplant başına düşen embriyo sayısında da genotip önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmıştır (Çizelge 3.5).

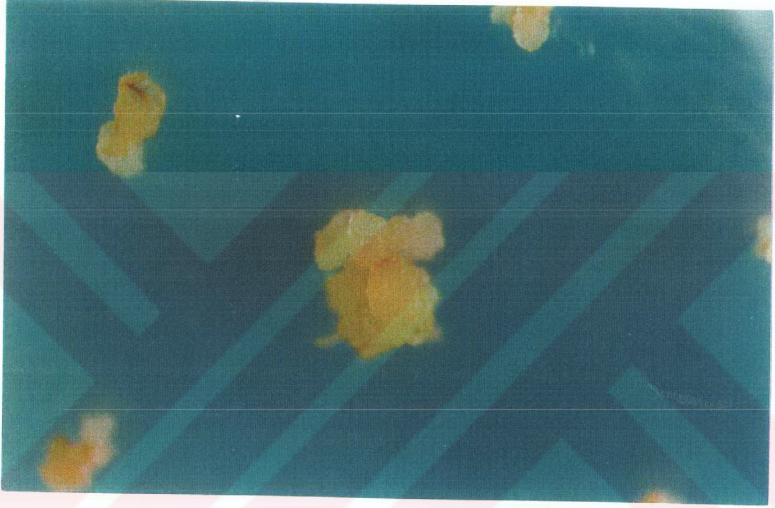
Çizelge 3.5 Beş farklı kışlık ekmeklik buğday genotipinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu embriyo kültür yanıtı

Genotip	Kallus indüksiyonu (%)	Kallusların rejenerasyon kapasitesi (%)	Oluşan somatik embriyo sayısı	Eksplant başına düşen embriyo sayısı	Kallus Yaş ağırlığı (g)
Gün 91	41.67 ^{ab}	44.00 ^{abc}	27.3 ^{bc}	1.8 ^{ab}	0.0201 ^a
Yakar	53.00 ^a	63.67 ^a	53.3 ^a	1.5 ^{ab}	0.0206 ^a
İkizce	57.67 ^a	21.67 ^{bc}	20.6 ^{bc}	1.6 ^{ab}	0.0155 ^a
Mızrak	45.33 ^{ab}	12.00 ^c	10.0 ^c	1.0 ^b	0.0178 ^a
Uzunyayla	25.67 ^b	51.67 ^{ab}	32.0 ^b	2.4 ^a	0.0222 ^a
LSD	20.48	35.60	19.26	1.087	0.0188

Kallus indüksiyon oranı, denemelerde kullanılan çeşitlere bağlı olarak % 25.67'den % 57.67'ye kadar çeşitlilik göstermiştir (LSD = 20.48 P< 0.05). Kallus oluşum sıklığı en fazla % 57.67 oranı ile İkizce çeşidine (Şekil 3.16, Şekil 3.17) ait olup, bunu % 53.00' lük bir oranla Yakar (Şekil 3.18) izlemiştir. Mızrak, % 45.33' lük bir oranla (Şekil 3.19) üçüncü sırada yer alırken, Gün 91 % 41.67' lik (Şekil 3.20) bir kallus indüksiyon oranı göstermiştir. Kallus oluşum sıklığı açısından en düşük oran % 25.67 ile Uzunyayla çeşidine aittir (Şekil 3.21).

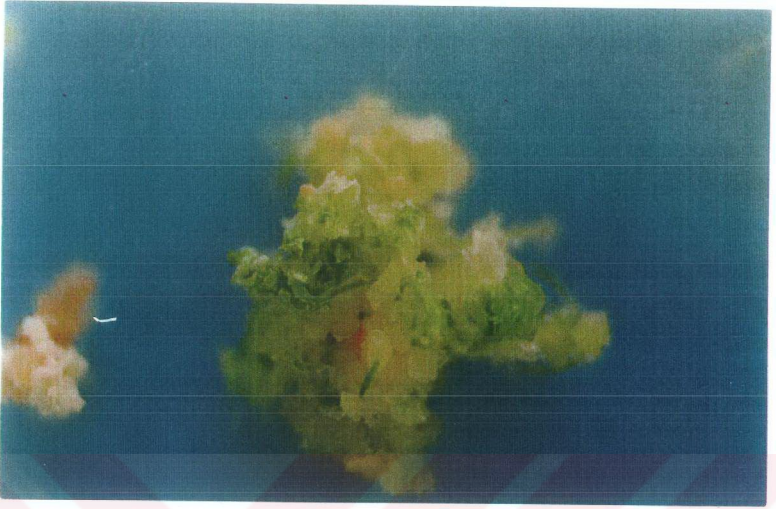
MS+2,4-D ortamında oluşan kalluslar, ½ MS ortamına aktarıldıktan sonra bir kısmı somatik embriyo verirken, bir kısmında herhangi bir değişiklik olmamış ve bir süre sonra bu kalluslar ölmüştür. Somatik embriyogenezis yoluyla rejeneren olan kallus sayısı genotipe bağlı olarak, % 63,67' den % 12,00' a kadar çeşitlilik göstermiştir (LSD = 35.60 P<0.05). Oluşturulan somatik embriyo sayısı da genotipe bağlı olarak bulunmuştur (LSD = 19.26 P<0.05). Yakar % 63,67' lik bir oranla en fazla rejeneren olan

çeşit olup, oluşturduğu somatik embriyo sayısı da en fazladır (% 53.3). Benzer şekilde, en az rejenere olan çeşit olan Mızrak tarafından oluşturulan somatik embriyo sayısı da % 10.0 ile en düşüktür (Şekil 3.22).

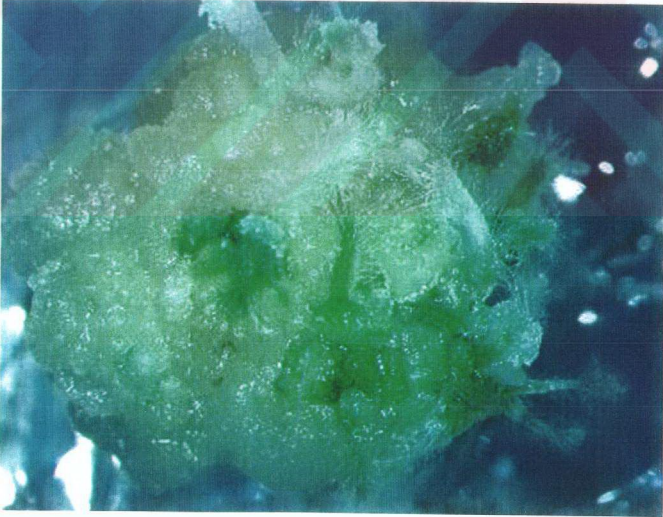


Şekil 3.16. İkizce çeşitinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kalluslar. 4 büyütme

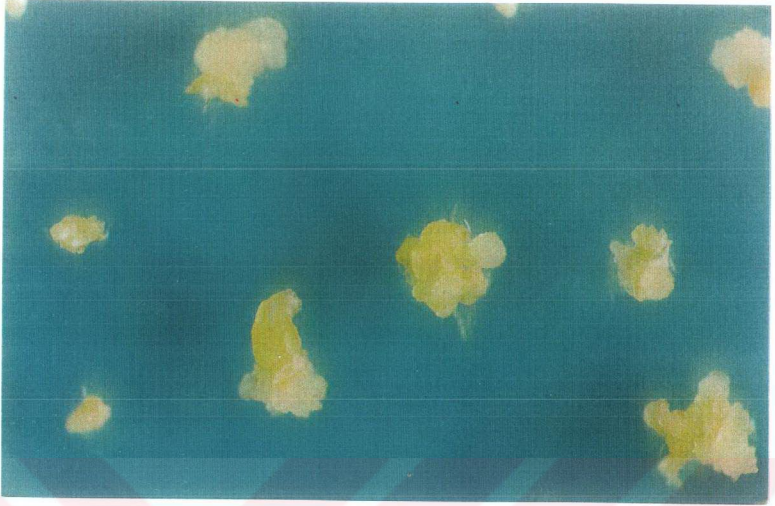
T.C. YÖRSEKÖRRETİM KURULU
KURUMU



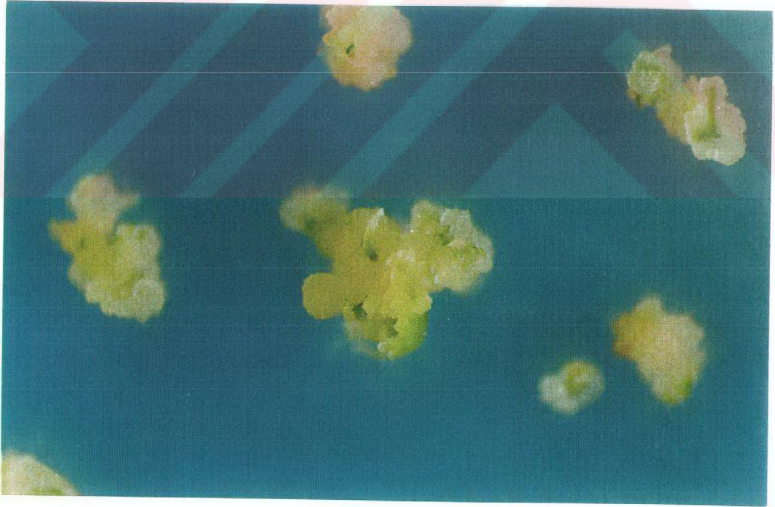
Şekil 3.17. İkizce çeşitinde somatik embriyogenezisin başlangıcı. 4 büyütme



Şekil 3.18. Yakar çeşitinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kallus. 16 büyütme



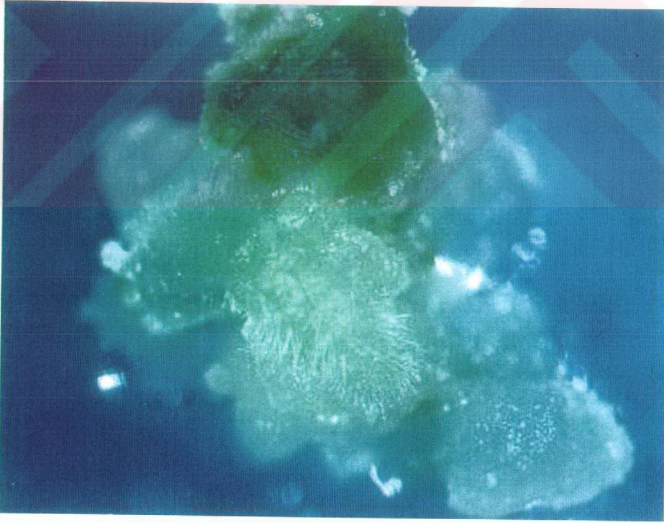
Şekil 3.19. Mızrak çeşitinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kalluslar. 2 büyütme



Şekil 3.20. Gün 91 çeşitinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kallus ve somatik embriyogenez başlangıcı olan yeşil noktacıklar. 2 büyütme



Şekil 3.21 Uzunyayla çeşitinde somatik embriyogenez. 0.5 büyütme



Şekil 3.22 Mızrak çeşitinde rejenerasyon başlangıcı. 16 büyütme

Rejenerasyon ortamında kalluslar, bazen hiç somatik embriyo oluşturmazken bazen de bir kallus üzerinde birden fazla somatik embriyo oluşumu görülmüştür. Eksplant başına düşen embriyo sayısı 1.0 ile 2.4 arasında olup, genotipe bağlı olarak değişmektedir (LSD = 1.087 P<0.05). Kallus yaş ağırlığı da yine genotipe bağlı olup, 0.0155 ile 0.0222 arasında değişim göstermektedir (LSD = 0.0188 P<0.05).

MS+2,4-D ortamında kallus indüksiyonu, rejenerasyon, somatik embriyo sayısı, eksplant başına düşen embriyo sayısı ve kallus yaş ağırlığı genotipe bağlı olup aynı zamanda rejenerasyon ve somatik embriyo sayısı arasında önemli bir pozitif ilişki gözlenmiştir (r = 0,848) (Çizelge 3.6).

3.1.3.2. *Triticum durum* çeşitlerinde kallus oluşum ve somatik embriyogenez sonuçları

Triticum durum Kızıltan, Altın, Yılmaz, Ç-1252 ve Ankara 98 çeşitlerinin olgun embriyoları, kallus indüksiyonu için, içerisinde 2 mg/L 2,4-D bulunan MS besin ortamına alındı. Deneyler her bir çeşit için 3 tekrarlı olarak yapıldı ve her tekrar için 100 embriyo kullanıldı. Deney sonucunda sayımlar *T. aestivum* çeşitleri için kullanılan kriterlere göre yapıldı. Üç tekrarın ortalaması alınarak varyans analizi ve Duncan Testi yapıldı.

Çizelge 3.6 MS+2,4-D ortamında *T. aestivum* L. çeşitleri için farklı karakterler arasında oluşturulan korelasyon katsayısı tablosu

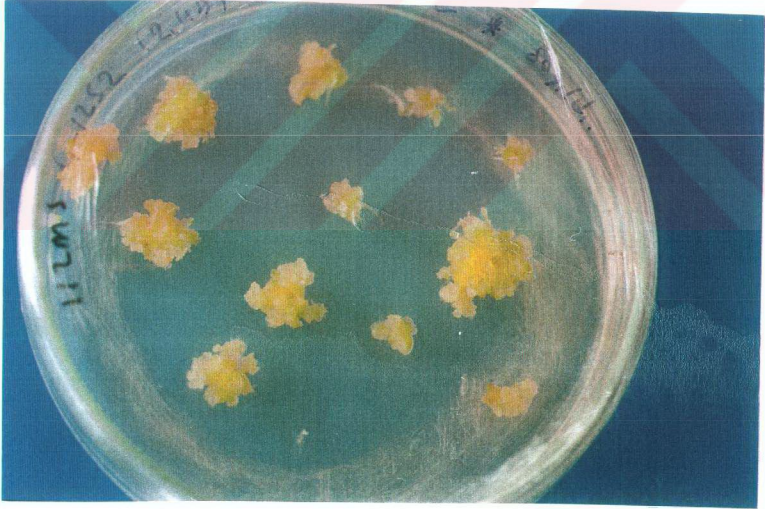
Karakterler	Karakterler arasındaki korelasyon katsayısı				
	1	2	3	4	5
(1) Kallus indüksiyonu (%)	-	-0,343	0,086	-0,269	0,127
(2) Kallusların rejenerasyon kapasitesi (%)	-	-	0,848 ^{xx}	0,364	0,027
(3) Somatik embriyo sayısı	-	-	-	0,333	0,079
(4) Eksplant başına düşen embriyo sayısı	-	-	-	-	0,062
(5) Kallus yaş ağırlığı (g)	-	-	-	-	-

P^{xx} = 0.01

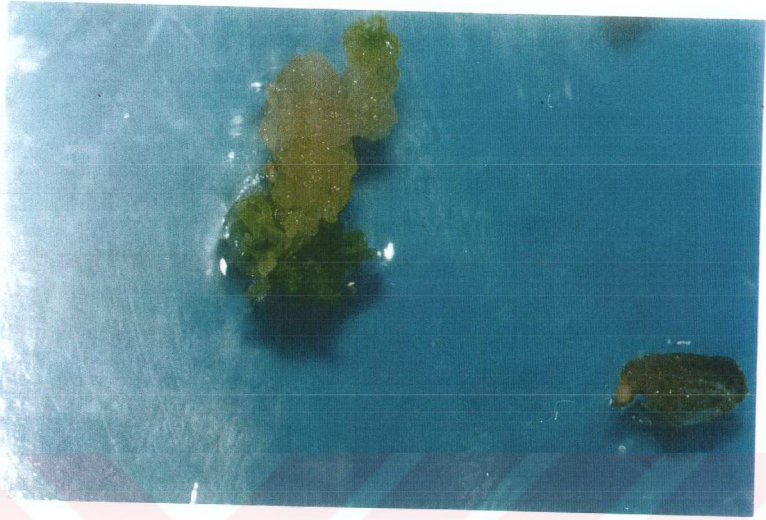
Eksplantların etrafında gözle görülebilir haldeki en erken kallus oluşumu kültür başlangıcından itibaren yaklaşık olarak 3. günde görülmüştür. En geç kallus oluşumu gözlenen çeşit Ç-1252 olup (Şekil 3.23), 8. günde kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Oluşan kalluslar, kallus indüksiyon ortamından ½ MS ortamına aktarıldıktan sonra, somatik embriyo oluşumu en erken 14. günde Yılmaz çeşitinde görülmüştür (Şekil 3.24, Şekil 3.25). Ortalama olarak 20-25. günlerde tüm çeşitlerde somatik embriyo oluşumu gerçekleşmiştir.

MS+2,4-D ortamında, makarnalık buğdaylar için kallus indüksiyonu, rejenerasyon kapasitesi, somatik embriyo sayısı ve eksplant başına düşen embriyo sayısı büyük ölçüde genotipe bağlıdır (Çizelge 3.7).

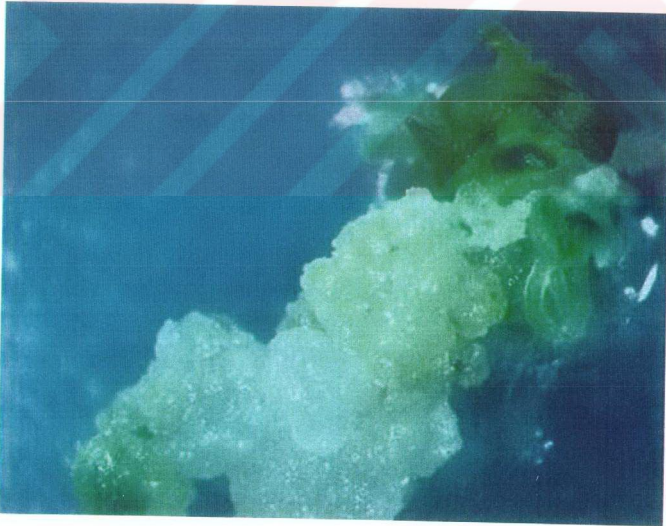
Kallus indüksiyon oranı, kullanılan çeşite bağlı olarak % 37.33' den % 48.67'ye kadar değişiklik göstermiştir (LSD = 9.2 P<0.05).



Şekil 3.23.Ç-1252 çeşitinin kallus indüksiyon ortamında oluşturduğu kalluslar



Şekil 3.24. Yılmaz çeşitinde bir kallus üzerinden somatik embriyogenezele oluşan sürgünler. 2 büyütme

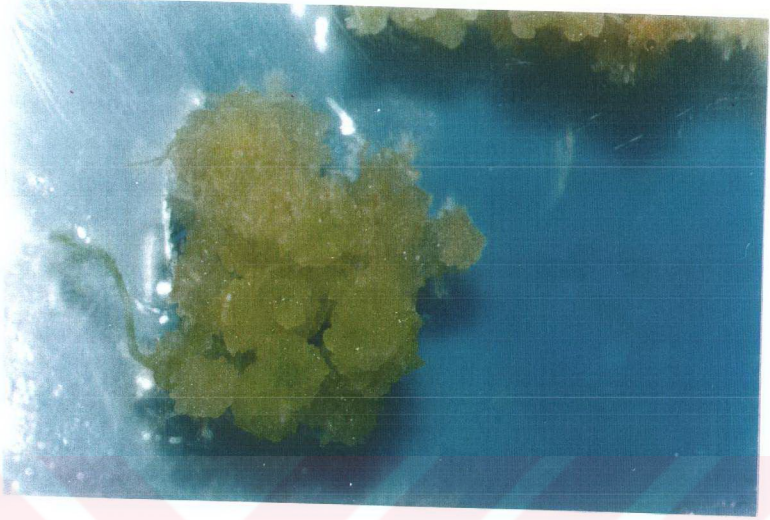


Şekil 3.25. Yılmaz çeşitinde somatik embriyogenezis. 8 büyütme

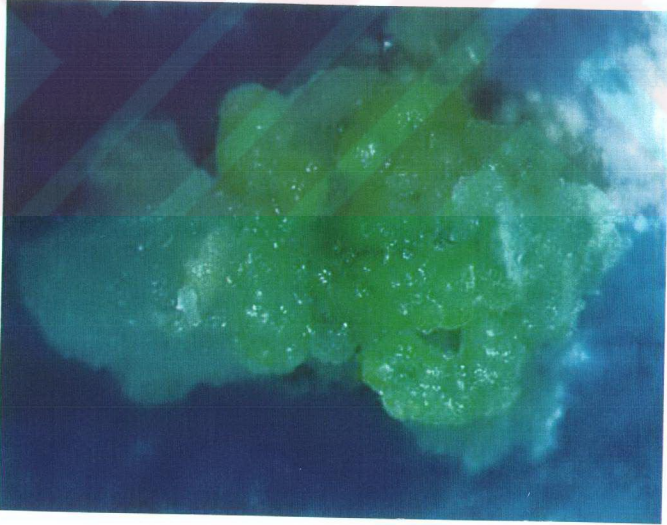
Çizelge 3.7 Beş farklı kışlık makarnalık buğday genotipinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu embriyo kültür cevabı

Genotip	Kallus indüksiyonu (%)	Kallusların rejenerasyon Kapasitesi (%)	Oluşan somatik embriyo sayısı	Eksplant başına düşen embriyo sayısı	Kallus Yaş ağırlığı (g)
Kızıltan	37.33 ^b	62.00 ^a	34.3 ^a	1.4 ^b	0.0267 ^a
Altın	48.67 ^a	27.67 ^b	29.6 ^a	2.2 ^a	0.0430 ^a
Yılmaz	41.00 ^{ab}	52.33 ^a	32.6 ^a	1.5 ^b	0.0266 ^a
Ç-1252	43.33 ^{ab}	55.33 ^a	34.6 ^a	1.4 ^b	0.0254 ^a
Ankara 98	37.33 ^b	24.67 ^b	13.0 ^b	1.2 ^b	0.0311 ^a
LSD	9.2	14.97	12.88	0.6576	0.0188

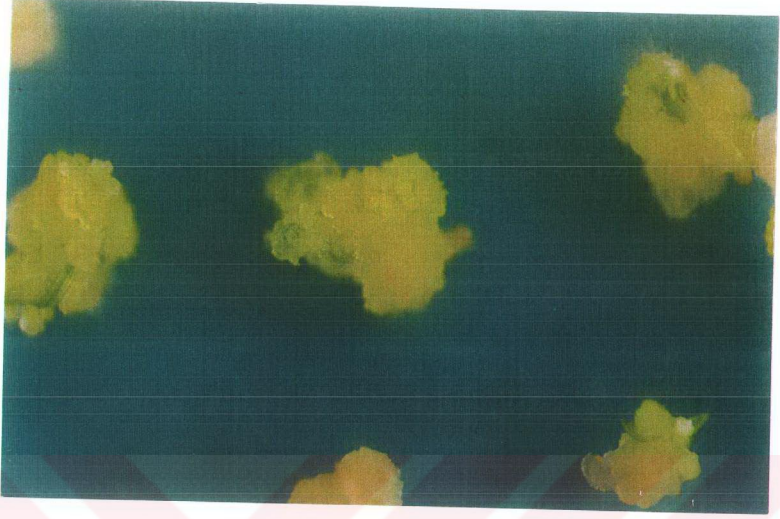
Kallus indüksiyon oranı, denemelerde kullanılan çeşite bağlı olarak % 37.33'den % 48.67' ye kadar değişiklik göstermiştir (LSD = 9.2 P< 0.05). Kallus oluşum sıklığı en fazla % 48.67 oranı ile Altın çeşidine (Şekil 3.26) ait olup, bunu % 43.33' lük bir oranla Ç-1252 izlemiştir. Yılmaz, % 41.00' lük bir oranla üçüncü sırada yer alırken, Kızıltan ve Ankara 98 % 37.33' lük bir oranla Yılmaz' ı takip etmiştir (Şekil 3.27, Şekil 3.28).



Şekil 3.26. Altın çeşitinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kalluslar. 4 büyütme



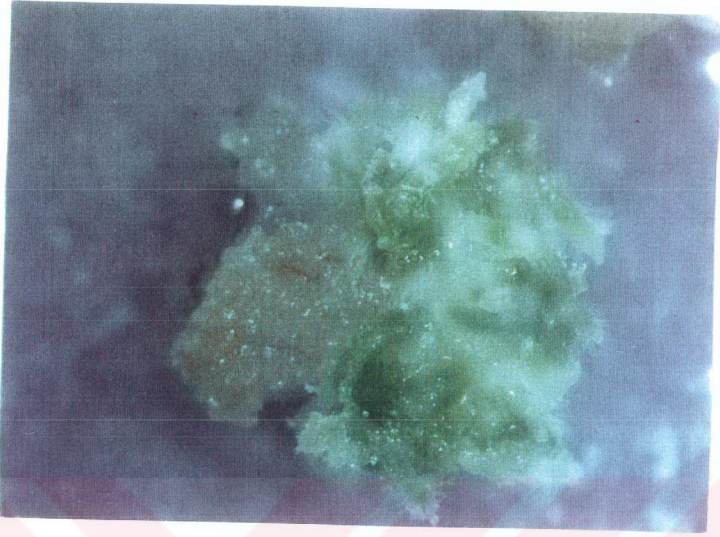
Şekil 3.27. Ankara 98 çeşitinin oluşturduğu embriyogenik kallusun yakından görünümü. 8 büyütme



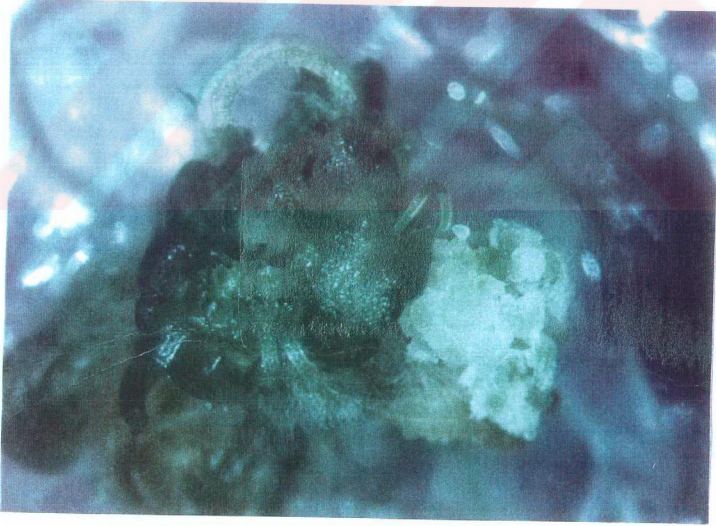
Şekil 3.28. Ankara 98 çeşitinin MS+2,4-D ortamında oluşturduğu kalluslar. 2 büyütme

Somatik embriyogenezisle rejenere olan kallus sayısı genotipe bağlı olarak % 62.00' dan % 24.67' ye kadar çeşitlilik göstermiştir (LSD = 14.97 $P < 0.05$). Oluşturulan somatik embriyo sayısı da genotipe bağlı olarak bulunmuştur. (LSD = 12.88 $P < 0.05$). Kızıltan % 62.00' lük bir oranla en fazla rejenere olan çeşittir (Şekil 3.29, Şekil 3.30, Şekil 3.31).

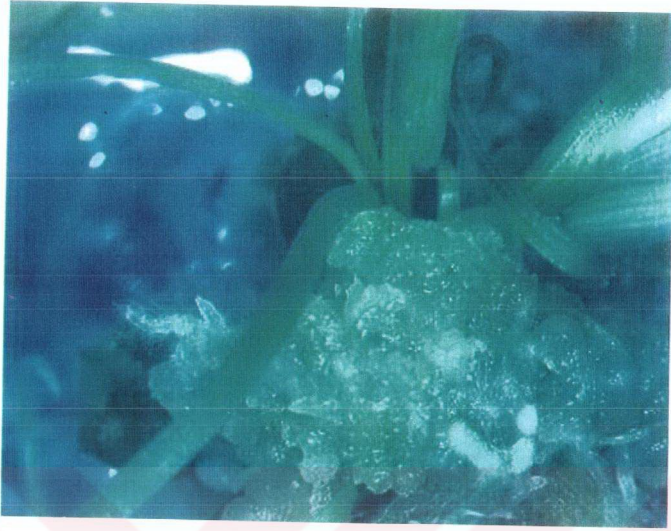
Ç-1252 çeşiti % 55.33' le ikinci sırada yer alırken, bunu % 52.33' lük bir oranla Yılmaz çeşiti takip etmektedir (Şekil 3.32).



Şekil 3.29.Kızıltan çeşitinde somatik embriyogenez başlangıcı. 8 büyütme



Şekil 3.30.Somatik embriyogenezin daha sonraki bir aşaması. 8 büyütme



Şekil 3.31. Somatik embriyogenezle oluşan sürgünler. 8 büyütme



Şekil 3.32. Yılmaz çeşitinin oluşturduğu kallustan rejenerasyon bitkisi. 2 büyütme

Altın çeşiti % 27.6 oranında rejenerer olurken, en az rejenerer olan çeşit % 24.6 ile Ankara 98' dir (Şekil 3.33).

MS+2,4-D ortamında oluşturulan somatik embriyo sayısı ve eksplant başına düşen embriyo sayısı da genotipe bağlı olarak bulunmuştur (LSD = 12.88 $P < 0.05$, LSD = 0,6576 $P < 0.05$). Aynı şekilde kallus yaş ağırlığı da genotipe bağlı olup, LSD değeri 0.0188 olarak bulunmuştur ($P < 0.05$).

Makarnalık buğdaylar için MS+2,4-D ortamında rejenerasyon ve somatik embriyo sayısı arasında ($r = 0.825$), ayrıca eksplant başına düşen embriyo sayısı ve kallus yaş ağırlığı arasında ($r = 0,627$) önemli bir pozitif ilişki gözlenmiştir (Çizelge 3.8).



Şekil 3.33. Ankara 98 çeşitinde somatik embriyogenezle rejenerasyon. 2 büyütme

Çizelge 3.8 MS+2,4-D ortamında *T. durum* çeşitleri için farklı karakterler arasında oluşturulan korelasyon katsayısı tablosu

Karakterler	Karakterler arasındaki korelasyon katsayısı				
	1	2	3	4	5
(1) Kallus indüksiyonu (%)	-	-0,074	0,409	0,246	0,196
(2) Kallusların rejenerasyon kapasitesi (%)	-	-	0,815 ^{xx}	-0,311	-0,462
(5) Somatik embriyo sayısı	-	-	-	0,106	-0,206
(6) Eksplant başına düşen embriyo sayısı	-	-	-	-	0,627 ^x
(5) Kallus yaş ağırlığı (g)	-	-	-	-	-

P^{xx} = 0.01

P^x = 0.05

3.1.4. Genotip- ortam etkileşiminin kallus indüksiyonu ve rejenerasyon üzerine olan etkileri

Denemelerde *T. aestivum* ve *T. durum*' a ait 5'er farklı çeşitin iki farklı kallus indüksiyon ortamında kallus indüksiyon ve rejenerasyon oranları birbiri ile karşılaştırılmıştır. *T. aestivum*' a ait farklı çeşitlerden her birinin MS + NAA ve MS + 2,4-D ortamında oluşturduğu kallus indüksiyon sıklığı (LSD = 16.51 P< 0.05), rejenerasyon oranı (LSD = 27.97 P< 0.05) ve kallus yaş ağırlıkları (LSD = 0.0173 P< 0.05) birbirinden farklı olarak bulunmuştur. Farklı *T. aestivum* çeşitlerinin *in vitro* kültür ortamında oluşturduğu kültür yanıtı, genotipe bağlı olduğu kadar, denemelerde kullanılan kültür ortamına da büyük ölçüde bağlıdır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. *T. aestivum* L. çeşitleri için Duncan Testi ile elde edilen genotip x ortam etkileşim çizelgesi

Ortam	Genotip	Kallus indüksiyonu (%)	Kallusların Rejenerasyon Kapasitesi (%)	Kallus yaş ağırlığı (g)
2,4D	Gün 91	41.67 ^{abc}	44.00 ^{cd}	0.0201 ^c
	Yakar	53.00 ^{ab}	63.67 ^{bc}	0.0206 ^c
	İkizce	57.67 ^a	21.67 ^{de}	0.0155 ^c
	Mızrak	45.33 ^{ab}	12.00 ^c	0.0178 ^c
	Uzunyayla	25.67 ^c	51.67 ^{bcd}	0.0222 ^c
NAA	Gün 91	43.67 ^{ab}	55.00 ^{bc}	0.0512 ^a
	Yakar	48.33 ^{ab}	100.00 ^a	0.0577 ^a
	İkizce	48.00 ^{ab}	76.00 ^{ab}	0.0167 ^c
	Mızrak	46.66 ^{ab}	37.67 ^{ode}	0.0272 ^{bc}
	Uzunyayla	36.00 ^{bc}	58.00 ^{bc}	0.0444 ^{ab}

Benzer şekilde *T. durum*' a ait farklı çeşitlerden her birinin MS+NAA ve MS + 2,4-D ortamında oluşturduğu kallus indüksiyon sıklığı (LSD = 8.08 P< 0.05), rejenerasyon oranı (LSD = 13.42 P< 0.05) ve kallus yaş ağırlıkları (LSD = 0.0173 P< 0.05) birbirinden farklı olarak bulunmuştur. *T. durum* buğdaylarının *in vitro* kültür ortamında oluşturduğu kültür yanıtı da genotip ortam etkileşimi ile ilişkili olarak bulunmuştur (Çizelge 3.10).

3.2. *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi ile transformasyon

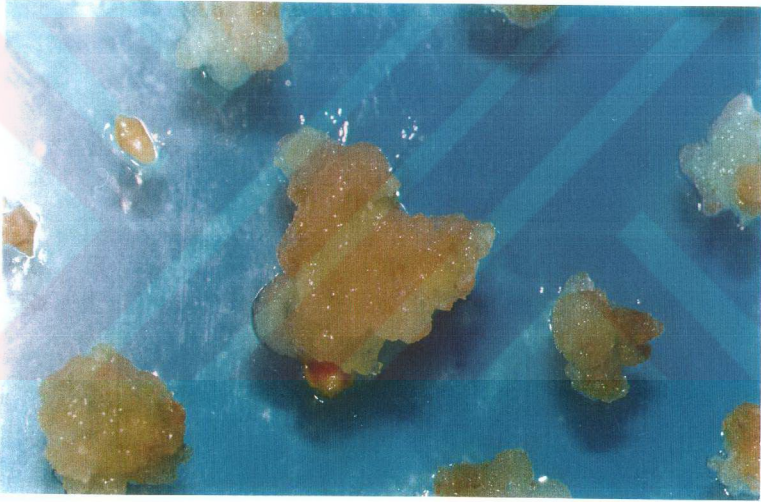
Olgun buğday embriyolarının transformasyonu için iki farklı *Agrobacterium tumefaciens* suşu ve iki farklı yöntem kullanılmıştır.

3.2.1. pGV 2260 35 S GUS INT suşu ile transformasyon

p GV 2260 35 S GUS INT suşu ile transformasyon denemelerinde, başlangıç materyali olarak olgun embriyolar kullanılmıştır. Bakteri ile muamele edilen olgun

embriyolar, kallus oluşumu ve transgenik bitkilerin seçilimi için antibiyotik içeren MS+2,4-D ortamında kültüre alınmışlardır. Hem *T. aestivum* hem de *T. durum* çeşitleri, antibiyotikli seçilim ortamında birkaç gün içinde kallus oluşturmuşlardır (Şekil 3.34, Şekil 3.35)

Transformasyon sonrasında, antibiyotikli seçilim ortamında oluşan kallusların transgenik olup olmadığı histokimyasal GUS analizi ile araştırılmıştır. Transgenik bitkiler, histokimyasal GUS analizi sonucunda mavi rengin oluşumu ile belirlenmektedir (Şekil 3.36).



Şekil 3.34. *Agrobacterium* ile transformasyondan sonra antibiyotikli seçilim ortamında oluşan kallusların yakından görünümü. 2 büyütme

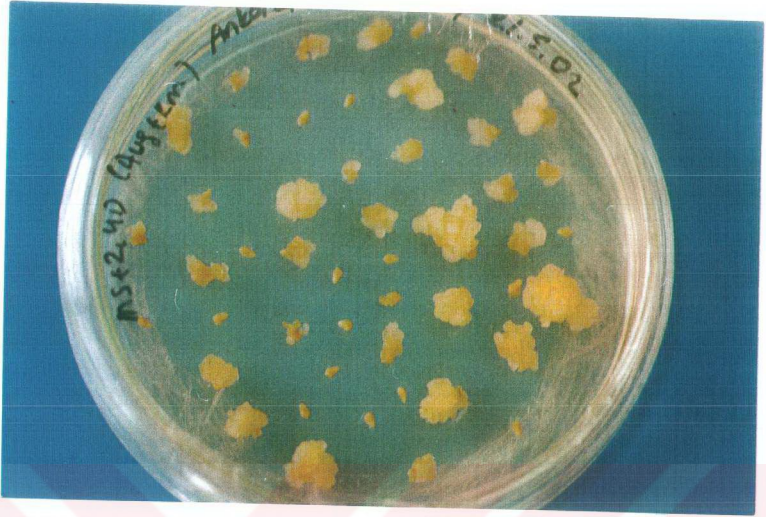
İçerisinde *gus* ve *nptII* genleri olan disarmed *Agrobacterium* ile transgenik buğday bitkisi elde etmek için *in vitro* ortamda yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda aday transgenik buğday bitkisi elde edilememiştir.

Çizelge 3.10 *T.durum* çeşitleri için Duncan Testi ile elde edilen genotip x ortam etkileşim çizelgesi

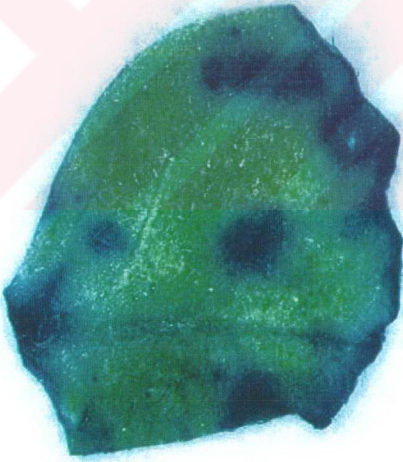
Ortam	Genotip	Kallus indüksiyonu (%)	Kallusların Rejenerasyon Kapasitesi (%)	Kallus yaş ağırlığı (g)
2,4D	Kızıltan	37.33 ^c	62.00 ^{bc}	0.0267 ^{ab}
	Altın	48.67 ^{ab}	27.67 ^d	0.0430 ^a
	Yılmaz	41.00 ^{abc}	52.33 ^c	0.0266 ^{ab}
	Ç-1252	43.33 ^{abc}	55.33 ^c	0.0254 ^{ab}
	Ankara 98	37.33 ^c	24.67 ^d	0.0311 ^{ab}
NAA	Kızıltan	44.67 ^{abc}	63.33 ^{bc}	0.0120 ^b
	Altın	49.33 ^a	74.33 ^{ab}	0.0289 ^b
	Yılmaz	44.67 ^{abc}	82.33 ^a	0.0254 ^{ab}
	Ç-1252	42.33 ^{abc}	73.67 ^{ab}	0.0305 ^{ab}
	Ankara 98	39.67 ^c	81.67 ^a	0.0274 ^{ab}

3.2.2. pWP127 suşu ile transformasyon

Bu suş ile transformasyon çalışmalarında, başlangıç materyali olarak MS+2,4-D (2 mg/L) ortamında oluşturulan kalluslar kullanıldı. Bakteri ile iki gün kokültive edildikten sonra, antibiyotikli seçilim ortamına alınan kalluslara 2 gün sonra histokimyasal GUS analizi uygulandı. *In vitro* ortamda bu suş ile yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda transgenik buğday bitkisi elde edilememiştir.



Şekil 3.35. Transformasyon sonrasında antibiyotikli seçilim ortamında oluşan farklı büyüklükteki kalluslar



Şekil 3.36. Transjenik tütün bitkisinde histokimyasal GUS analizi sonucunda oluşan mavi noktacıklar. 8 büyütmeye

4. TARTIŞMA

Biyoteknolojik yöntemlerin ürün ıslahı amacıyla kullanılabilmesinin ilk şartı, *in vitro* kültür ortamında kültürasyonu yapılan bitkinin etkili bir şekilde rejenerere olabilesidir.

Buğday gerek dünya gerekse ülkemiz için en önemli besin kaynaklarından birisidir. Bu nedenle *in vitro* kültürlerde rejenerasyonu çok sayıda araştırmacı tarafından çalışılmaktadır. Buğdayın doku kültüründe kallus oluşturması ve oluşan kallusların bitkiye rejenerere olması genel olarak eksplant kaynağı, genotip ve kültür ortamı ile ilişkilidir (Özgen vd 1998). Buğdayda kallus kültürünün kurulması için en yaygın olarak kullanılan eksplant kaynakları arasında olgunlaşmamış embriyo, olgun embriyo, apikal meristem (Özgen vd 1996) ve anter bulunmaktadır (Delporte vd 2001). 2,4-D, kullanılan hemen hemen bütün eksplant çeşitlerinde kallus oluşumu ve saklanması için en yaygın olarak kullanılan hormondur. Somatik embriyo oluşumu 2,4-D içeriği azaltılmış besin ortamında kültürasyon sonucunda veya aynı ortamda uzun bir kültür periyodu sonucunda elde edilir. Ortamda oksin veya oksin benzeri bileşenlerin yokluğunda da kallustan somatik embriyo farklılaşması ve sürgün oluşumunun indüklenmesi olayı görülür (Delporte vd 2001). Yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda da 2 mg/L 2,4-D içeren kallus indüksiyon ortamında oluşan kalluslar, iki haftalık bir kültürasyonun ardından 2,4-D içermeyen ortama aktarıldıktan sonra, önce somatik embriyo farklılaşması, ardından da sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Buğday doku kültüründe bitki rejenerasyonu, kullanılan eksplanttan büyük ölçüde etkilenmektedir. Olgunlaşmamış embriyolar, buğday doku kültüründe en fazla kullanılan eksplant kaynağıdır. Machii vd (1998), 107 farklı buğday çeşitinin olgunlaşmamış embriyolarını eksplant kaynağı olarak kullandıkları çalışmalarında ortalama % 17' lik bir rejenerasyon oranı elde ederken, Fennell vd (1996), 48 çeşitin olgunlaşmamış embriyoları ile yaptıkları çalışmada ortalama % 19' luk bir rejenerasyon oranı elde etmişlerdir. Bu sonuçlardan da görüleceği gibi, test edilen genotiplerin çoğu (% 75) % 30' dan daha az bir oranda rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Sadece birkaç genotip % 60' ın üzerinde bir rejenerasyon oranına sahiptir. Özgen vd (1996) tarafından

yapılan bir çalışmada hem olgun, hem de olgunlaşmamış embriyolardan kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu üzerine genotipin gerçekten büyük etkisinin olduğu görülmüştür. Bu çalışma yedi farklı makarnalık buğday çeşiti ile yapılmıştır. Olgunlaşmamış embriyo kültürü için kallus indüksiyon oranı ortalama olarak % 96.0, rejenerasyon kapasitesi ise % 49.7 olarak elde edilmiştir. Olgun embriyo kültürü için bulunan sonuçlar, kallus indüksiyonu için % 81.4, rejenerasyon kapasitesi içinse % 70.4' tür. Yapmış olduğumuz çalışmada makarnalık buğday çeşitleri için NAA' li ortamda bulunan kallus indüksiyon oranı % 39.67 - % 49.33 arasında değişmekte olup, ortalama olarak % 44.1' dir. Bu tür için rejenerasyon sıklığı % 63.33 den % 82.33' e kadar değişim göstermekte olup ortalama olarak % 75' dir. 2,4-D' li ortamda makarnalık buğdaylar için bu ortamda elde edilen sonuçlar, kallus indüksiyon sıklığı açısından % 37.33 ile % 48.67 arasında değişmekte olup ortalama % 41.5' dir. Rejenerasyon % 24.67 ile % 62.00 arasında, ortalama % 44.4' dür. 2,4-D' li ortamda bulunan sonuçlar, Özgen vd (1996) tarafından elde edilen sonuçlara göre düşük, NAA' li ortamda elde ettiğimiz sonuçlar ise uyumludur. Lazar vd (1983) ile Chowdhury vd (1991), yapmış oldukları çalışmada kallus indüksiyon oranı ve kallustan rejenerasyon kapasitesi arasında önemli bir ilişki bulamamışlardır. Bu nedenle düşük kallus indüksiyonu gösteren genotiplerin aynı zamanda düşük rejenerasyon kapasitesine sahip olacağı düşünülmemelidir. Özgen vd (1996) tarafından yapılan çalışmada olgun embriyo kültürünün olgunlaşmamış embriyo kültüründen daha iyi rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Kallus yaş ağırlığı, kallus indüksiyon sıklığı ve kallusların rejenerasyon kapasitesi arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır. Olgun ve olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşumunun başlangıcından itibaren 38-60 gün sonra bitki rejenerasyonu elde etmişlerdir (Özgen vd 1996). Yapmış olduğumuz çalışmada da NAA' li ortamda yaklaşık olarak bir ay, 2,4-D' li ortamda ise iki ay sonra bitki rejenerasyonu elde edilmiştir.

Yine Özgen vd (1998) tarafından yapılan çalışmada 12 farklı *Triticum aestivum* çeşiti MS+2,4-D ortamında kültüre alınmıştır. Bu çalışmada da kültür yanıtının büyük ölçüde genotipten etkilendiği görülmüştür. Genel olarak olgun embriyo kültürünün yanıtı olgunlaşmamış embriyo kültüründen daha yüksek bulunmuştur. Olgunlaşmamış embriyo kültürü için kallus indüksiyonu ortalama % 80.4, rejenerasyon kapasitesi ise

% 70.9 olarak elde edilirken, olgun embriyo kültüründe kallus indüksiyonu % 90.6' ya, rejenerasyon kapasitesi ise % 96.1' e kadar yükselmiştir. Çalışmamızda beş farklı *T. aestivum* çeşiti üç farklı ortamda kültüre alınmıştır. Denemelerde, NAA' li kallus indüksiyon ortamında ekmeçlik buğday çeşitleri için kallus indüksiyonu % 36.00 ile % 48.33 arasında değişmekte olup ortalama kallus indüksiyon oranı % 44.5 olarak bulunmuştur. Rejenerasyon kapasitesi ise % 37.67' le % 100.00 arasında olup, ortalama olarak % 65.0' lik bir rejenerasyon sıklığı elde edilmiştir. 2,4-D' li ortamda ekmeçlik buğdaylar için elde ettiğimiz kallus indüksiyon sıklığı % 25.67 ile % 57.67 arasında değişmiş, ortalama kallus indüksiyon sıklığı % 44.6 olarak bulunmuştur. Rejenerasyon % 12.00 ile % 63.67 arasında olup ortalama % 38.0'dır. Özellikle 2,4-D' li ortamda elde edilen sonuçlar, Özgen vd (1998) tarafından elde edilen sonuçlara göre düşük olmasına rağmen, gerek kallus indüksiyonu, gerekse rejenerasyon kapasitesinin büyük ölçüde genotipe bağlı olduğu göz önünde bulundurulduğunda, biyoteknolojik çalışmalar için bu çeşitlerin seçilmesinin önemi ortaya çıkmış olmaktadır. Özgen vd (1998) bu çalışmada, iki eksplant tipinden kallus oluşumunu, kültür başlangıcından itibaren 2-3. günlerde görmüşlerdir. Bu çalışmalarında da her bir embriyo kültürü için kallus yaş ağırlığı ve diğer kültür yanıtları arasında önemli bir ilişki elde edememişlerdir. Kallus indüksiyon sıklığı ve kallus rejenerasyon sıklığı arasında da önemli bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızda, NAA ortamında ekmeçlik ve makarnalık buğday çeşitleri için kallus indüksiyonu, kallus yaş ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır. 2,4-D ortamında ise, ekmeçlik buğdaylar için rejenerasyon ve somatik embriyo sayısı arasında önemli bir pozitif korelasyon elde edilmiştir. Makarnalık buğdaylarda hem rejenerasyon ve somatik embriyo sayısı, hem de eksplant başına düşen embriyo sayısı ve kallus yaş ağırlığı arasında önemli bir pozitif korelasyon gözlenmiştir, fakat Özgen vd (1998) tarafından elde edilen sonuçlara benzer şekilde kallus indüksiyonu ve rejenerasyon arasında, her iki ortamda gerek ekmeçlik, gerekse makarnalık buğdaylar için, bir korelasyon elde edilememesi, bu karakterlerin genetik açıdan bağımsız olduğu fikrini desteklemektedir.

Delporte vd (2001) yapmış oldukları çalışmada iki farklı kışlık ekmeçlik buğday genotipiyle çalışmışlardır. Çalışmalarında olgun embriyo fragmentlerini eksplant kaynağı olarak kullanmış ve ortalama olarak embriyonik kallusların % 11' inin rejenera-

olduğunu görmüşlerdir. Bu çalışmada kallus başına ya hiç bitki oluşmamış ya da birkaç bitki oluşmuştur. Bizim olgun embriyo kullanarak, iki farklı ortamda elde ettiğimiz % 38.0 ve % 65.0' lık rejenerasyon oranları, bu çalışmada elde edilen sonuçlardan oldukça yüksektir. Çalışmamızda da 2,4-D ' li ortamda kallus başına ya hiç bitki oluşmamış ya da birkaç bitki oluşmuştur. Bu sonuç Delporte vd (2001) tarafından elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

Benkirane vd (2000) yapmış oldukları çalışmada on farklı makarnalık buğday çeşitinin olgunlaşmamış infloresens ve koleoptil eksplantlarını kullanmışlardır. Olgunlaşmamış infloresens eksplant kaynağı olarak kullanıldığında kallus induksiyon sıklığının % 44' den % 61'e, rejenerasyon kapasitesinin de % 21.5' den % 55.4' e kadar değiştiğini bulmuşlardır. Kallus induksiyonu ve rejenerasyon arasındaki fark genotibe bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu çalışmada da tek bir kallus üzerinden tek veya çoklu somatik embriyo elde edilmiştir. Koleoptil eksplantları kullanıldığında ise kallus induksiyon oranı % 27.32 olarak bulunmuştur. Rejenerasyon, ortamda bulunan 2,4-D konsantrasyonuna bağlı olarak % 1.6 ile % 11.3' e kadar değişmektedir. Ayrıca koleoptil eksplantlarında kallus induksiyonu genotipten çok fazla etkilenmezken, rejenerasyon için genotipin önemli olduğu da bulunmuştur. Bizim hem ekmeçlik hem de makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyolarını kullanarak yaptığımız çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu sonuçlardan daha yüksektir. Dolayısı ile kallus induksiyonu ve rejenerasyon kapasitesi üzerinde genotip kadar eksplant kaynağının da önemli olduğu bu sonuçlarla daha iyi anlaşılmaktadır.

Maes vd (1996) tarafından yapılan çalışmada da hem genotip hem de ortam, rejenerasyon sıklığı üzerine önemli ölçüde etkili olarak bulunmuştur. *T.aestivum* çeşitleri için 2.2 mg/L 2,4-D içeren ve kasamino asitle desteklenen MS ortamında kallus induksiyonu % 30.3 ile % 96.0 arasında değişmektedir. Rejenerasyon % 2.3' le % 79.8 arasında olup, kullanılan çeşitlerin sadece birisinde yüksek rejenerasyon oranı elde edilmiş, diğerlerinde % 2.3, % 12.6, % 4.0 ve % 7.2' lik bir rejenerasyon oranı görülmüştür. *T.durum* türü için kallus induksiyonu % 57.5' le % 80.7 arasında olup, rejenerasyon sıklığı % 26.3 ile % 49.1 arasında değişmektedir. Bu çalışmada olduğu

gibi, bizim çalışmamız sonunda da, genotipin gerek kallus indüksiyonu, gerekse rejenerasyon kapasitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Karaca ve Bürün (1999) tarafından bildirildiğine göre; Schaeffer, olgunlaşmış embriyo kültüründe 2,4-D, NAA ve glutamin eklenmiş temel MS ortamının uygun olduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda, üç farklı ortam kullanılmıştır. Kullanılan ortamlar; 1mg/L NAA, 2mg/L 2,4-D ve 2 veya 4 mg/L IAA ile desteklenmiş katı MS ortamıdır. Bitki büyüme düzenleyici olarak farklı konsantrasyonlarda (2-4 mg/L) IAA kullanılan kallus indüksiyon ortamında kallus oluşumu gerçekleşmemiş, embriyo çimlenerek bitkiyi oluşturmuştur. Tarafımızdan şimdiye kadar IAA' nın tek başına kullanıldığı bir kallus indüksiyon ortamına rastlanılmamış olup, çalışmamızda da IAA' nın tek başına kullanımının, buğday bitkisinden kallus kültürü kurulması için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Hormon olarak NAA kullanılan ortamda adventif sürgün oluşumu, bir başka deyişle organogenesis gözlenmiştir. 2,4-D kullanılan ortamda ise kallus oluşumunu takiben somatik embriyogenez yoluyla dolaylı bitki rejenerasyonu olmuştur. Daha önce yapılmış olan çalışmaların çoğunda somatik embriyogenezis yoluyla rejenerasyon elde edilirken, NAA' in tek başına kallus kültürü kurulması için kullanımına rastlanılmamıştır. Karaca ve Bürün (1999) yapmış oldukları çalışmada kallus kültürü kurulması için NAA' i bir sitokin olan kinetinle birlikte kullanmışlar fakat, ortamı kallus kültürü kurulması için çok uygun bulmamışlardır.

Partikül bombardımanı için kullanılan diğer sistemlerle kıyaslandığında, olgun embriyolardan oluşturulan kallus sayısının diğer sistemlerde elde edilen kallus sayısından daha fazla olduğu görülmüştür (Delporte vd 2001).

Genotip çeşitlerin embriyogenik potansiyeli üzerinde etkili faktörlerden birisidir. Bu nedenle genetik transformasyon çalışmalarında yüksek embriyogenik potansiyele sahip bireylerin seçilmesine dikkat edilmelidir. Yüksek embriyogenik potansiyele sahip çeşitlerin tanımlanması, buğdayın genetik transformasyonu için en önemli faktörlerden birisidir (Maes vd 1996).

Bu çalışma sonucunda kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu için, genotipin oldukça önemli olduğu, bir kez daha kanıtlanmış oldu. Hem makarnalık hem de ekmeklik buğdayın olgun embriyo eksplantları, kullanılan tüm çeşitlerde, hem embriyogenik kallus oluşturabilme, hem de rejenerere olabilme yeteneğindedir. Olgun embriyo kullanılarak oluşturulan etkili bir rejenerasyon sistemi, genetik mühendisliği teknikleriyle buğdaya farklı genlerin transferi için kullanışlı bir sistemdir. Yıl boyunca kullanıma hazır bir halde kolayca elde edilen olgun embriyolar, olgunlaşmamış embriyolar gibi buğday doku kültürlerinde etkili bir eksplant kaynağı olarak kullanılabilir.

Biyoteknolojik yollarla buğday ıslahı, etkili ve güvenilir bir transformasyon sisteminin yokluğu nedeniyle sınırlı miktarda olmaktadır. Transformasyon için en sık kullanılan yöntem, mikroprojeksiyon bombardımanı olup, Weeks vd (1993), bu yöntemi kullanarak tek bir buğday çeşidine ait 6248 adet embriyoyu transforme etmişlerdir. Çalışmalarında markör gen olarak fosfinotrisin dayanıklılık geni olan *bar* genini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda kallus ve köklenme aşamasındaki bitkiciklerden 13 tanesinde geçici PAT enzim aktivitesi gözlemlenmiştir. Daha sonraki aşamada ise 10 adet transgenik bitki elde etmeyi başarmışlardır. Transformasyon sıklığı 1000 embriyo başına 1-2 adet bulunmuştur .

Hess vd (1990) buğday başaklarına *Agrobacterium tumefaciens* pipetlenmesi ile birkaç adet kanamisine dirençli bitki elde etmişlerdir.

Tingay vd (1997), arpanın olgunlaşmamış embriyo eksplantlarını biolaphos direnç geni olan *bar* ve *gus* içeren binary vektörle transforme edip, transformasyon etkinliğini, % 4.2 olarak bulmuşlardır.

Khanna ve Daggard (2003) binary vektör pHK22 veya super binary vektör pHK21 taşıyan LBA4404 *Agrobacterium* suşu ile buğdayın embriyogenik kalluslarını transforme etmişlerdir. Super binary vektörlerin özelliği, bunların ekstra vir B, C, G genlerini taşımasıdır. LBA4404/pHK22 ile transforme ettikleri 578 kallustan tek stabil

transforme bitki elde ederken, LBA4404/ pHK21 ile transforme ettikleri 658 kallustan 17 stabil transforme bitki elde etmişlerdir.

Cheng vd (1997), olgunlaşmamış embriyo, ön kültürasyona maruz bırakılmış embriyo ve bu embriyoların kültüre alınması ile oluşan embriyogenik kallusları, β -glukuronidaz (*gus*) ve neomisin fosfotransferaz (*nptII*) taşıyan binary vektör içeren *A. tumefaciens* ile transforme etmişlerdir. Transformasyon etkinliği, taze olarak izole edilmiş olgunlaşmamış embriyoda $\%1.2 \pm 0.79$, bir ön kültürasyona tabi tutulan olgunlaşmamış embriyoda $\%1.56 \pm 1.11$ ve embriyogenik kallusta ise $\%1.55 \pm 1.08$ olarak bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında ise olgun embriyo ve olgun embriyodan oluşturulan embriyogenik kalluslar eksplant olarak kullanılarak, *gus* ve *nptII* taşıyan p GV35 S GUS INT ve p WP 127 *Agrobacterium* suşları ile enfekte edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda genellikle tek bir çeşit enfekte edilirken, bizim yaptığımız çalışmada on farklı çeşit test edilmiştir. Farklı çeşitlere ait yaklaşık 1000 embriyo ve 500 kallus enfekte edilmiş, fakat transgenik bitki elde edilememiştir.

Buğdaya T-DNA aktarımını etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bunlar arasında, farklı eksplant tipleri, inokülasyonda kullanılan *A. tumefaciens* yoğunluğu, inokülasyon ve kokültivasyon zaman periyodu, inokülasyon ve kokültivasyon ortamında bulunan indükleyici ajan varlığı sayılabilir. Şimdiye kadar genç fideciklerin yaprak dokuları, olgunlaşmamış infloresens, taze olarak izole edilmiş olgunlaşmamış embriyo, olgunlaşmamış embriyodan oluşan embriyogenik kalluslar ve süspansiyon hücreleri *A. tumefaciens* ile inoküle edilmiştir (Cheng vd 1997). Olgun embriyo ve bundan oluşturulan embriyogenik kallusların *A. tumefaciens* ile transformasyonuna dair bir çalışmaya tarafımızdan rastlanılmamıştır. Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen transformasyon etkinliklerinin oldukça düşük olduğu göz önünde bulundurulacak olursa kullanılan eksplant sayısı artırılarak ve transformasyon şartları değiştirilerek transformasyon denemelerine devam edilebilir. Ayrıca geçici GUS aktivitesinin elde edilememesi göz önüne alınırsa, olgun embriyo ve bunlardan oluşturulan embriyogenik

kallusların, çalışmamızda kullandığımız *A. tumefaciens* suşları ile transformasyon için uygun eksplantlar olmadığı da düşünülebilir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, buğday bitkisinin *in vitro* rejenerasyon yeteneği ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile genetik transformasyonu araştırılmıştır. Çalışmada *T. aestivum* ve *T. durum*' a ait toplam on farklı genotip kullanılmıştır. On farklı genotipe ait olgun embriyolardan kallus kültürünün kurulması ve rejenerasyon için üç farklı ortam denenmiştir. Bu ortamlardan MS+NAA ortamında ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin tümü organogenesis göstermiş, bir başka deyişle adventif sürgün oluşturmak yoluyla rejenere olmuşlardır. *T. aestivum* çeşitleri, kallus indüksiyon ortamında 3-5 günde kallus oluşturmuştur. Kallus indüksiyon sıklığı genotibe bağlı olarak % 36.00 ile % 48.33 arasında değişmiştir. Oluşan kalluslar, rejenerasyon ortamı olan hormonsuz ½ MS ortamına aktarıldıktan sonra rejenerasyon oranı genotipe bağlı olarak % 37.67 ile % 100.00 arasında bulunmuştur. *T.durum* çeşitleri ise aynı kallus indüksiyon ortamında 4-10 gün içinde kallus oluşumu göstermiş olup, kallus indüksiyonu % 39.67 ile % 49.33 arasında değişmektedir. Rejenerasyon ortamı olan ½ MS ortamında oluşan rejenerasyon oranı % 63.33 ile % 82.33 arasında bulunmuştur. MS+IAA (2mg/L) ve MS+IAA (4mg/L) ortamlarında kalus oluşumu gerçekleşmemiş, embriyo çimlenerek bitkiyi oluşturmuştur. Bu nedenle IAA' nın tek başına kullanıldığında, buğday bitkisinden kallus kültürü kurulması için çok uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

MS+2,4-D ortamı kallus indüksiyon ortamı olarak kullanıldığında somatik embriyogenez yoluyla dolaylı bitki rejenerasyonu olmuştur. *T. aestivum* çeşitleri için bu ortamda oluşan kallus indüksiyon sıklığı % 25.67 ile % 57.67 arasında değişmektedir. Bu ortamda kallus oluşumu 2-4 günde gerçekleşmiştir. Rejenerasyon ortamı olarak hormonsuz, ½ MS ortamı kullanıldığında somatik embriyogenez başlangıcı kullanılan çeşite bağlı olarak 25-30. günlerde görülmüştür. Rejenerasyon sıklığı ise % 12.00 ile % 63.67 arasında değişmiştir. *T.durum* çeşitleri, bu kallus indüksiyon ortamında 3 - 8 günde kallus oluşumu göstermiş olup, kallus indüksiyonu % 37.33 ile % 48.67 arasında değişmektedir. ½ MS ortamında rejenerasyon sıklığı, % 24.67 ile % 62.00 arasında bulunmuştur. Bu ortamda somatik embriyogenez başlangıcı 20-30. günlerde görülmüştür.

MS+2,4-D ortamında ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde kallus başına ortalama olarak 1-2 bitki oluşmuştur.

Bu çalışmada varılan sonuçlardan birisi, iki farklı ortamda olgun embriyolar eksplant kaynağı olarak kullanıldığında, kallus indüksiyonu ve rejenerasyon kapasitesi için genotip önemli bir faktördür. Yıl boyunca kullanıma hazır bir halde kolayca elde edilen olgun embriyolar, buğday doku kültüründe etkili bir eksplant kaynağı olarak kullanılabilir.

Transformasyon çalışmalarında olgun embriyo ve olgun embriyoların kültüre alınmasıyla elde edilen embriyogenik kalluslar, *gus* ve *npt II* genlerini taşıyan iki farklı disarmed *A. tumefaciens* suşu ile transforme edilmiştir. İki eksplant türü ve iki farklı suşla *in vitro* transformasyon sonucunda histokimyasal GUS analizi yapılmış, fakat aday transgenik bitki elde edilememiştir. Bulduğumuz diğer bir sonuç, buğday bitkisinde kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* suşları ile transformasyon işleminde, olgun embriyo ve bundan oluşan kallusların uygun bir eksplant kaynağı olamayabileceği veya eksplant sayısının artırılarak ve deney koşulları değiştirilerek denemelere devam edilmesi gerektiğidir. Bununla birlikte, *in vitro* rejenerasyon çalışmalarında elde edilen verilerin, bitkinin ıslahı ile ilgili çalışmalara katkısı olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- AHMAD, A., MAQBOOL, S.B., RIAZUDDIN, S. and STICKLEN, M.B. 2002a. Expression of synthetic *cryIab* and *cryIac* genes in basmati rice (*Oryza sativa* L.) variety 370 via *Agrobacterium*-mediated transformation for the control of the european corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *In Vitro Cell Dev Biol- Plant*, 38: 213-220.
- AHMAD, A., ZHONG, H., WANG, W. and STICKLEN, M.B. 2002b. Shoot apical meristem: *in vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38: 163-167.
- AHMED, K.Z. and SAGI, F. 1993. Culture of fertile plant regeneration from regenerable embryogenic suspension cell-derived protoplast of wheat. *Plant Cell Rep.*, 12: 175-179.
- ALTPETER, F., VASIL, V., SRIVASTAVA, V., STÖGER, E. and VASİL, I.K. 1996. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Rep.*, 16: 12-17.
- ARMSTRONG, T. A., METZ, S.G. and MASCIA, P. N. 1987. Two regeneration system for the production of haploid plants from wheat anther culture. *Plant Sci.*, 51: 231-237.
- BABAOĞLU, M., YORGANCILAR, M. ve AKBUDAK, M.A. 2001. Doku kültürü temel laboratuvar teknikleri. BABAOĞLU, M., GÜRELE, E. ve ÖZCAN, S. (editörler). Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, ss 37-88, Konya.
- BARRO, F., ROOKE, L., BEKES, F., GRAS, P., TATHAM, A.S., FIDO, R., LAZZERI, P.A., SHEWRY, P.R. and BARCELO P. 1997. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat. Biotech.*, 15: 1295-1299.
- BENKIRANE, H., SABOUNJI, S., CHLYAH, A. and CHLYAH, H. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 61: 107-113.

- BRISIBE, E. A., GAJDOSOVA, A., OLESEN, A. and ANDERSEN, S.B. 2000. Cytodifferentiation and transformation of embryogenic callus lines derived from anther culture of wheat. *J. of Exp. Bot.*, 51 (343): 187-196.
- BRONSEMA, F. B. F., OOSTEVEEN, W. J. F. and LAMMEREN, A. A. M. 1997. Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A188 and A632. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 50: 57-65.
- BÜRÜN, B. 1996. Buğdaygillerde İn vitro Kùltürler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6 (4): 81-95.
- BYTEBIER, B., DEBOECK, F., DE GREVE, H., VAN MONTAGU, M. and HERNALSTEENS, J.P. 1987. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 5345-5348.
- CANNELL, M.E., DOHERTY, A., LAZZERI, P.A. and BARCELO, P. 1999. A population of wheat and tritordeum transformants showing a high degree of marker gene stability and heritability. *Theor Appl Genet*, 99: 772- 784.
- CHENG, M., FRY, J.E., PANG, S., ZHOU, H., HIRONAKA, C.M., DUNCAN, D.R., CONNER, T.W. and WAN, Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 115: 971-980.
- CHOWDHURY, S. H., KATO, K., YAMAMATO, Y. and HAYASHI, K. 1991. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryo among common wheat cultivars. *Japan J. Breed*, 41: 443-450.
- CHRISTOU, P., FORD, T.L. and KOFRON, M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, 9: 957-962.
- COCKING, E.C. and DAVEY, M. R. 1987. Gene transfer in cereals. *Science*, 236 (4806): 1259-1262.
- ÇINAR, A. 2003. Seçilmiş Arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve Buğday (*Triticum spp.*) Genotiplerinde Bazı Özelliklerin Antalya Ova Koşullarında Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 100 ss. Antalya.

- DALE, P.J., MARKS, M.S., BROWN, M.M., WOOLSTON, C.J., GUNN, H.V., MULLINEAUX, P.M., LEWIS, D.M., KEMP, J.M., CHEN, D.F., GILMOUR, D.M. and FLAVELL, R.B. 1989. Agroinfection of wheat: inoculation of in vitro grown seedlings and embryos. *Plant Sci*, 63: 237-245.
- DELPORTE, F., MOSTADE, O. and JACQUEMIN J. M. 2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 67: 73-80.
- DEMEKE, T., HUCL, P., BAGA, M., CASWELL, K. and LEUNG, N. 1999. Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 947-953.
- FENNELL, S., BOHOROVA, N., VAN GINKEL, M., CROSSA, J. and HOISINGTON, D. 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 163-169.
- FRANCIS, D. and SORRELL, D.A. 2001. The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Grow. Reg.*, 33: 1-12.
- FREED, E., EINENSMITH, S.R., GUETZ, D., REICOKSY, D., SMAIL, V.W. and WOLBERG, P. 1989. User's Guide to MSTAT-C, An Analysis of Agronomic Research Experiments. Michigan State University, USA.
- GÜREL, E. ve UÇAR, A. 2001. Organogenezis. BABAOĞLU, M., GÜREL, E. ve ÖZCAN, S. (editörler). Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, ss 36-70, Konya.
- HEIE, Y., OHTA, S., KOMARI, T. and KUMASHIRO, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant J.*, 6(2): 271-282.
- HIEI, Y., KOMARI, T. and KUBO, T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Bio.*, 35: 205-218.
- HESS, D., DRESSLER, K. and NIMMRICTER, R. 1990. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.*, 72: 233-244.
- HOOYKAAS, P.J.J. and SCHILPEROORT, R.A. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Bio.*, 19: 15-38.

- HOOYKAAS-VAN SLOGTEREN, G.M.S., HOOYKAAS, P.J.J. and SCHILPEROORT, R.A. 1984. Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 11: 763-764.
- HUNSINGER, H. and 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 Breed.*, 98:119-123.
- ISER, M., FETTIG, S., SCHEYHING, F., VIERTTEL, K. and HESS, D. 1999. Genotype dependent stable genetic transformation in German spring wheat varieties selected for high regeneration potential. *J Plant Physiol*, 154: 509-516.
- ISHIDA, Y., SAITO, H., OHTA, S., HIEI, Y., KOMARI, T. and KUMASHIRO, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotech.*, 14: 745-750.
- KARACA, K. ve BÜRÜN, B. 1999. Buğdayda embriyo kültüründen kallus oluşumu. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, Ek Sayı 2: 269-274.
- KHANNA, H.K. and DAGGARD, G.E. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using asuperbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Rep*, 21: 429-436.
- KLOTI, A., IGLESIAS, V.A., WUNN, J., BURKHARDT, P.K., DATTA, S. K. and POTRYKUS, I. 1993. Gene transfer by electroporation into intact scutellum cells of wheat embryos. *Plant Cell Rep.*, 12: 671-675.
- LAZAR, M. D., COLLINS, G. B. and WIAN, W. E. 1983. Genetic and environmental effects of on the growth and differentiation of wheat somatic cell cultures. *J. Hered.*, 74: 353-357.
- MACHII, H., MIZUNO, H., HIRABAYASHI, T., LI, H. and HAGIO, T. 1998. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from antherand immature embryo cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 53: 67-74.
- MAES, O.C., CHIBBAR, R.N., CASWELL, K., LEUNG, N. and KARTHA, K.K. 1996. Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. *Plant Sci.*, 121: 75-84

- MARKS, M.S., KEMP, J.M., WOOLSTON, C.J. and DALE, P.J. 1989. Agroinfection of wheat: a comparison of *Agrobacterium* strains. *Plant Sci.*, 63: 247-256.
- MOONEY, P.A. and GOODWIN, P.B. 1991. Adherence of *Agrobacterium tumefaciens* to the cells of immature wheat embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 25: 199-208.
- MOONEY, P.A., GOODWIN, P.B., DENNIS, E.S. and LLEWELLYN, D.J. 1991. *Agrobacterium tumefaciens*-gene transfer into wheat tissues. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 25: 209-218.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-479.
- ÖZCAN, S., BABAOĞLU, M. ve SANCAK, C. 2001a. Somatik embriyogenezis. BABAOĞLU, M., GÜREL, E. ve ÖZCAN, S. (editörler). Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, ss 71-88, Konya.
- ÖZCAN, S., URANBEY, S., SANCAK, C., PARMAKSIZ, İ., GÜREL, E. ve BABAOĞLU, M. 2001b. *Agrobacterium* aracılığı ile gen aktarımı. ÖZCAN, S., GÜREL, E. ve BABAOĞLU, M. (editörler). Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, ss 112 -159, Konya.
- ÖZGEN, M., TÜRET, M., ÖZCAN, S. and SANCAK, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter wheat genotypes. *Plant Breed.*, 115: 455-458.
- ÖZGEN, M., TÜRET, M., ALTINOK, S. and SANCAK, C. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Rep.*, 18: 331-335.
- ÖZGEN, M., TÜRET, M. and AVCI, M. 2001. Cytoplasmic effects on the tissue culture response of callus from winter wheat mature embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 64: 81- 84.
- PAPENFUS, J.M. and CARMAN, J.G. 1987. Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin. *Crop Sci.*, 27: 588-593.
- PATNAIK, D. and KHURANA, P. 2001. Wheat biotechnology: A minireview. *Elect. J. of Biotech.*, 4 (2): 1-29.

- PAUK, J., KERTESZ, Z., JENES, B., PURNHAUSER, L., MANNINEN, O., PULLI, S., BARABAS, Z. and DUDITS, D. 1994. Fertile wheat (*Triticum aestivum* L.) regenerants from protoplast of embryogenic suspension culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 38: 1-10.
- PERL, A., KLESS, H., BLUMENTHAL, A., GALILI, G. and GALUN, E. 1992. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization of culture conditions and DNA-microprojectile delivery procedures. *Mol Gen Genet*, 235: 279-284.
- PURNHAUSER, L., MEDGYESY, P., CZAKO, M., DIX, P.J. and MARTON, L. 1987. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep.*, 6: 1-4.
- QUISENBERRY, K.S. and REITZ, L.P. 1967. Wheat and Wheat Improvement. American Society of Agronomy, Inc., Publisher Madison, pp. 551, Wisconsin USA.
- RASHID, YOKOI, S., TORIYAMA, K. and HINATA, K. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Rep.*, 15: 727-730.
- REDWAY, F.A., VASIL, V., LU, D. and VASIL, I.K. 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 79: 609-617.
- SCHAFFER, W., GORZ, A. and KAHL, G. 1987. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. *Nature*, 327: 529-531.
- SHIMAMOTO, K., TERADA, R., IZAWA, T. and FUJIMOTO, H. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplast. *Nature*, 338: 274-276.
- TAŞKIN, K.M. 1997. Susam (*Sesamum indicum* L.) Bitkisinin *In Vitro* Rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığı ile Genetik Transformasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 47 ss, Antalya.
- TINGAY, S., MCELROY, D., KALLA, R., FIEG, S., WANG, M., THORNTON, S. and BRETTELL, R. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant J.*, 11 (6): 1369-1376.

- TORIYAMA, K., ARIMOTO, Y., UCHIMIYA, H. and HINATA, K. 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology*, 6: 1072-1074.
- UZE, M., WÜNN, J., PUONTI- KAERLAS, J., POTRYKUS, I. and SAUTTER, C. 1997. Plasmolysis of precultured immature embryos improves *Agrobacterium* mediated gene transfer to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.*, 130: 87-95.
- VASIL, I.K. 1988. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Biotechnology*, 6: 397-401.
- VASIL, V., BROWN, S. M., RE, D., FROMM, M.E. and VASIL, I.K. 1991. Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Biotechnology*, 9: 743-746.
- VASIL, V., CASTILLO, A.M., FROMM, M. E. and VASIL, I.K. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Biotechnology*, 10: 667- 674.
- VASIL, V., SRIVASTAVA, V., CASTILLO, A.M., FROMM, M. E. and VASIL, K. 1993. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Biotechnology*, 11: 1553-1558.
- VNUCHKOVA, V.A., MARYAKINA, I.I. and EISNER, G.I. 1993. Effect of acetone in the culture medium on the regeneration efficiency and on the resistance to root rot of regenerants of various plant species. *Plant Cell Rep.*, 12: 577-580.
- WALDEN, R. and SCHELL, J. 1990. Techniques in plant molecular biology-progress and problems. *Eur. J. Biochem*, 192: 563-576.
- WEEKS, J.T., ANDERSON, O.D. and BLECHL, A.E. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol*, 102: 1077-1084.
- ZACHWIEJA, S.P. and MINOCHA, S.C. 1991. Induction of virulence response in *Agrobacterium tumefaciens* by tissue explants of various plant species. *Plant Cell Rep.*, 10: 545-549.
- ZHANG, S., CHO, M.J., KOPREK, T., YUN, R., BREGITZER, P. and LEMAUX, P.G. 1999. Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. *Plant Cell Rep.*, 18: 959-966.

- ZHANG, W. and Wu, R. 1988. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 835-840.
- ZHOU, H., ARROWSMITH, J.W., FROMM, M.E., HIRONAKA, C.M., TAYLOR, M.L., RODRIGUEZ, D., PAJEAU, M.E., BROWN, S.M., SANTINO, C.G. and FRY, J.E. 1995. Glyphosate-tolerant CP₄ and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Rep.*, 15: 159-163.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Gül Nasırcılar 1972 yılında Ankara’ da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Eskişehir’ de tamamladı. 1989 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nden 1993 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’ nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Kasım 1994 yılından itibaren Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı’ nda yüksek lisans öğrenimine devam etti. 1997 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’ nda doktora öğrenimine başladı. 1994 yılından beri aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.