

**BAZI EKMEKLİK VE MAKARNALIK BUĞDAY  
ÇEŞİTLERİNİN OLGUN EMBRİYO KÜLTÜRÜNE  
TEPKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Murat AYDIN**

**Doktora Tezi  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Metin TOSUN**

**2010**

**Her hakkı saklıdır.**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**BAZI EKMEKLİK VE MAKARNALIK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN  
OLGUN EMBRİYO KÜLTÜRÜNE TEPKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Murat AYDIN**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ERZURUM  
2010**

**Her hakkı saklıdır**

Prof. Dr. Metin TOSUN'un danışmanlığında, Murat AYDIN tarafından hazırlanan bu çalışma 20/10/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Metin TOSUN

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Ali ÖZTÜRK

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Kamil HALİLOĞLU

İmza: 

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Doktora Tezi

### BAZI EKMEKLİK VE MAKARNALIK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN OLGUN EMBRİYO KÜLTÜRÜNE TEPKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Murat AYDIN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Metin TOSUN

Tahıllarda genetik mühendisliği çalışmaları iyi bir bitki rejenerasyon sistemine bağlıdır. Buğday olgun embriyolarının eksplant olarak kullanıldığı bu çalışma üç aşamada (olgun embriyo kültürü için uygun yöntemin, sitokininlerin bitki rejenerasyonu üzerine olan etkisinin ve farklı buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlenmesi) yürütülmüştür.

On iki yöntemin denendiği birinci aşamada yalnızca iki yöntemde (2 ve 9 nolu yöntemler) bitki rejenerasyonu meydana gelmiş ve en yüksek bitki rejenerasyonu (0,7 adet bitki/eksplant) endosperm destekli olgun embriyoların 12 mg/l dikamba + 0,5 mg/l IAA içeren ortamda kültüre alındığı 9 nolu yöntemde meydana gelmiştir.

İkinci aşamada endosperm destekli olgun embriyolar kallus oluşumu için 12 mg/l dikamba ve 0,5 mg/l IAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar 3 farklı sitokinin tipinin (TDZ, kinetin ve BAP) 3 değişik miktarını (0,5; 1,0 ve 1,5 mg/l) içeren biri kontrol olmak üzere toplam 10 farklı rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. En yüksek bitki rejenerasyonu (1,8 adet bitki/eksplant) 0,5 mg/l TDZ'nin kullanıldığı 1 nolu yöntemden elde edilmiştir.

Birinci ve ikinci aşama sonuçları doğrultusunda farklı buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlendiği son aşamada kallus oluşumu, embriyogenik kallus oluşumu, cevap veren embriyogenik kallus oluşumu ve rejenerasyon etkinliği üzerine çeşidin etkisi çok önemli olmuştur. En yüksek bitki rejenerasyonu sırasıyla Kırık (2,9 adet bitki/eksplant), Nenehatun (2,4 adet bitki/eksplant) ve Kaşif Bey 95 (1,8 adet/ eksplant) çeşitlerinden elde edilmiştir. Makarnalık çeşitlerin hiçbirinde bitki rejenerasyonu meydana gelmemiştir.

Bu araştırmada buğday olgun embriyo kültüründe etkili bir rejenerasyon sistemi geliştirilmiş ve buğday doku kültüründe olgun embriyoların, olgunlaşmamış embriyolara alternatif eksplant kaynağı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

**2010, 109 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Buğday, olgun embriyo kültürü, sitokinin, bitki rejenerasyonu

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### EFFECTS OF SOME BREAD AND DURUM WHEAT CULTIVARS ON MATURE EMBRYO CULTURE

Murat AYDIN

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

Supervisor: Prof. Dr. Metin TOSUN

Success in genetic engineering of wheat depends upon the reliable plant regeneration system. This study which mature embryos were used as an explant were carried out in three stages (identification of suitable method for wheat mature embryo culture, determination of effects of cytokine on plant regeneration, and effect of different wheat cultivars on mature embryo culture.

Twelve different methods were investigated in the first stage. Plant regeneration was observed in two out twelve methods (methods 2 and 9) and the highest plant regeneration (0,7 plant/explant) was observed in medium 9 containing 12 mg/l dicamba and 0,5 mg/l IAA with endosperm supported mature embryos.

In the second stage, endosperm supported mature embryos were cultured in MS medium containing 12 mg/l dicamba and 0,5 mg/l IAA for callus initiation. Calli were cultured in 10 different media containing 3 different cytokines (TDZ, kinetin, BAP) and their three different doses (0,5; 1,0 and 1,5 mg/l) and one control. The highest plant regeneration (1,8 plant/explant) was obtained from medium 1 containing 0,5 mg/l TDZ.

Based on results of first and second stages, in the third stage that effects of different wheat cultivars on mature embryo culture were determined, embryogenic callus formation, responded embryogenic callus formation and effect of cultivars on regeneration efficiency were highly significant. The highest plant regenerations were observed in Kırık (2,9 plant/explant), Nenehatun (2,4 plant/explant) and Kaşif Bey 95 (1,8 adet/explant) cultivars, respectively. Plant regeneration was not observed in all durum wheat cultivars

In this study, efficient plant regeneration system was developed by using mature embryo culture and wheat mature embryo culture has been showed that it can be alternative regeneration system to immature embryo culture in wheat.

**2010, 109 pages**

**Keywords:** Wheat, mature embryo culture, cytokine, plant regeneration.

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışmanın ilk iki aşaması Atatürk Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiş olup, Atatürk üniversitesi Ziraat Fakóltesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Moleküler Genetiđi Laboratuvarında yürütölmüştür.

Çalışmalarımda her türlü desteği sağlayan, çok değerli hocalarımda, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Sevim SAĞSÖZ'e, Sayın Prof. Dr. Metin TOSUN'a ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmanın planlanmasından yürütölmesine ve sonuçların değerlendirilmesine kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında izole özefagus atrezisi tanısıyla dünyaya gelen oğlum Orhan Arif AYDIN'ın tedavisini büyük fedakârlık göstererek üstlenen ve çalışmalarım konusunda beni teşvik eden başta eřim Alev AYDIN olmak üzere Aydın, Gümüş ve Köse ailelerine, Ankara Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi ocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Mehmet Emin ŐENOCAK'a ve Sayın Doç. Dr. Saniye EKİNCİ'ye, ayrıca, asistan doktor ve hemşirelerine teşekkürlerimi sunarım.

Murat AYDIN

Eylöl, 2010

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLERDİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>5</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>24</b>
3.1. Materyal .....	24
3.1.1. Bitki materyali .....	24
3.1.2. Sterilizasyonda kullanılan kimyasallar .....	26
3.1.3. Birinci aşamada kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar .....	26
3.1.3.a Kallus kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar .....	26
3.1.3.b. Bitki rejenerasyonu ortamlarında kullanılan kimyasallar .....	27
3.1.4. İkinci aşamada kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar .....	30
3.1.5. Üçüncü aşamada kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar .....	30
3.2. Yöntem .....	30
3.2.1. Aşamaların uygulanışı .....	30
3.2.1.a. Birinci aşamanın uygulanışı .....	30
3.2.1.b. İkinci aşamanın uygulanışı .....	34
3.2.1.c. Üçüncü aşamanın uygulanışı .....	36
3.2.2. Sterilizasyon teknikleri .....	36
3.2.2.a. Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu .....	36
3.2.2.b. Tohumların yüzey sterilizasyonu .....	37
3.2.2.c. Besi ortamının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu .....	37
3.2.2.d. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı .....	37
3.2.3. Kültür ortamlarının hazırlanışı .....	38
3.2.3.a. Kallus ve bitki rejenerasyon ortamlarının hazırlanışı .....	38
3.2.4. Araştırmada incelenen karakterler .....	39
3.2.5. Verilerin istatistiksel analizi .....	41
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>43</b>
4.1. Birinci aşama .....	43
4.1.1. Kallus oluşum oranı .....	43
4.1.2. Embriyogenik kallus oluşum oranı .....	46
4.1.2.a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (ESEKO) oranı .....	46
4.1.2.b. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (KSEKO) oranı .....	49
4.1.3. Cevap veren embriyogenik kallus oranı .....	51
4.1.3.a. Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı .....	52
4.1.3.b. Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (KSCEK) oranı .....	54
4.1.3.c. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCEK) oranı .....	55
4.1.3. Rejenerasyon etkinliği .....	57
4.2. İkinci aşama .....	63

4.2.1. Cevap veren embriyogenik kallus oranı.....	64
4.2.1.a Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı..	64
4.2.2.b. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCEK) oranı.....	67
4.2.2. Rejenerasyon etkinliği.....	69
4.3. Üçüncü aşama.....	73
4.3.1. Kallus oluşum oranı.....	73
4.3.2. Embriyogenik kallus oluşum oranı.....	76
4.3.2.a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (ESEKO) oranı.....	76
4.3.2.b. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (KSEKO) oranı.....	78
4.3.3. Cevap veren embriyogenik kallus oranı.....	81
4.3.3.a Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı..	81
4.3.3.b. Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (KSCEK) oranı...	84
4.3.3.c Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCEK) oranı.....	86
4.3.4. Rejenerasyon etkinliği.....	88
4.4. Araştırmada incelenen karakterler arasındaki korelasyon analizi.....	91
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>93</b>
5.1. Tartışma.....	93
5.2. Sonuç ve Öneriler.....	101
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>103</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

cm	Santimetre
g	Gram
kb	Kilobaz çifti
kg	Kilogram
kPa	Kilo paskal
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
N	Normal
°C	Santigrat derece

### Kısaltmalar

2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
IAA	İndol-3-asetik asit
NAA	Naftalen asetik asit
Dikamba	3,6-Diklorobenzoik asit
Pikloram	4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit
2-MCPP	2-(2-Metil-4-klorofenoksi) propionik asit
2,4,5-T	2,4,5-Triklorofenoksi asetik asit
IBA	İndol-3-butirik asit
TDZ	1- Fenil-3-(1,2,3-thidiazol-5yl) üre (Thidiazuron)
BAP	6- Benzil amino pürin
ABA	Absisik asit
MS	Temel besi ortamı, Murashige and Skoog (1962)
N6	Temel besi ortamı, Chu <i>et al.</i> (1975)
LS	Temel besi ortamı, Linsmaier and Skoog (1965)
B5	Temel besi ortamı, Gamborg <i>et al.</i> (1968)
P	Temel besi ortamı, Delporte <i>et al.</i> (2001)
MES	2-(N-morpholino) ethansülfonik asit
UV	Ultraviyole
KO	Kallus oluşumu
ESEKO oranı	Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı
KSEKO oranı	Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı
ESCEK oranı	Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranı
KSCEK oranı	Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranı
EKSCEK oranı	Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranı
RE	Rejenerasyon etkinliği

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Su emdirilmiş tohumun embriyosunun kesim bölgelerinin gösterimi (Filippov <i>et al.</i> 2006).....	35
Şekil 4.1. Çeşitlerin kallus oluşum ortamında meydana gelen kallusların 15. gündeki görünümü. ....	45
Şekil 4.2. 9 nolu yöntemde çeşitlerin kallus oluşum ortamındaki kallusların 14. gündeki görünümleri. ....	46
Şekil 4.3. Kate A-1 çeşidinde 9 nolu (A) ve 7 nolu (B) yöntemlerde kallus oluşum ortamında 21. gündeki embriyogenik kallusların görünümü.....	47
Şekil 4.4. Kırık buğday çeşidinin 8 nolu yöntemde (A, B) kallus oluşum ortamında 21. gündeki ve 9 (C, D) nolu yöntemde rejenerasyon ortamında 4. gündeki embriyogenik kalluslarının görünümleri. ....	47
Şekil 4.5. Çeşitlerin farklı yöntemlerde meydana gelen embriyogenik kallusların ve somatik embriyoların görünümü. ....	51
Şekil 4.6. Kırık buğday çeşidinin 9 (A, B) ve 2 nolu (C, D) yöntemlerde rejenerasyon ortamında 7. gündeki embriyogenik kalluslarından sürgünlerin oluşumu. ....	53
Şekil 4.7. Rejenerasyon ortamında 15. gündeki embriyogenik kalluslarda sürgünlerin oluşumu. ....	55
Şekil 4.8. Embriyogenik kalluslarda sürgünlerin oluşumu. ....	57
Şekil 4.9. 9 nolu yöntemde çeşitlere ait rejenerasyon bitkilerinin meganta kutularında büyütülmesi. ....	59
Şekil 4.10. Rejenerasyon ortamınının 30. gününde ana embriyodan meydana gelen sürgünlerin görünümü. ....	60
Şekil 4.11. Kate A-1 çeşidinde 9 nolu yöntemlerde meydana gelen rejenerasyon bitkilerinin görünümü. ....	61
Şekil 4.12. Kırık genotipinde 2 nolu yöntemde meydana gelen rejenerasyon bitkilerinin görünümü. ....	62
Şekil 4.13. Rejenerasyon ortamında 21. gündeki embriyogenik kalluslarda sürgünlerin oluşumu. ....	64
Şekil 4.14. 1 nolu yöntemde çeşitlere ait rejenerasyon ortamında 17. gündeki embriyogenik kalluslarda sürgünlerin oluşumu. ....	66
Şekil 4.15. Rejenerasyon ortamında 18. gündeki embriyogenik kalluslarda sürgünlerin oluşumu. ....	68
Şekil 4.16. 4 nolu yöntemde genotiplere ait rejenerasyon bitkilerinin meganta kutularında büyütülmesi. ....	70
Şekil 4.17. 1 nolu yöntemde meydana gelen rejenerasyon bitkilerinin meganta kutularında büyütülmesi. ....	71
Şekil 4.18. Rejenerasyon bitkilerinin büyütülmesi. A) Bitkilerin saksılara aktarılması ve aklimasyona alınması. ....	72
Şekil 4.19. Bazı ekmeklik ve makarnalık çeşitlerde kallus oluşum ortamında 15. gündeki kallusların görünümü. ....	75

Şekil 4.20. Bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde embriyogenik ve embriyogenik olmayan kallus oluşumu. ....	78
Şekil 4.21. Bazı ekmeklik ve makarnalık genotiplerde embriyogenik kallus oluşumu. ....	79
Şekil 4.22. Bazı çeşitlerin embriyogenik kalluslarından sürgünlerin oluşumu. ....	83
Şekil 4.23. Bazı çeşitlerin rejenerasyon ortamında 15. gündeki embriyogenik kalluslarından sürgünlerin oluşumu. ....	84
Şekil 4.24. Bazı çeşitlerin rejenerasyon ortamında 15. gündeki embriyogenik kalluslarından sürgünlerin oluşumu. ....	86
Şekil 4.25. Bazı çeşitlerin ayrılmış embriyogenik kalluslarından bitkiciklerin oluşumu. ....	88
Şekil 4.26. Meydana gelen rejener bitkilerin meganta kutularında ve toprakta büyütülmesi. ....	90
Şekil 4.27. Palandöken 97 çeşidinde meydana gelen albino bitkinin görünümü. ....	90

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Olgun embriyo kültürüne tepkilerin belirlenmesi aşamasında kullanılan ekmeklik buğday çeşitleri.....	25
Çizelge 3.2. Olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlenmesi aşamasında kullanılan makarnalık buğday çeşitleri.....	26
Çizelge 3.3. MS tuzlarının kimyasal bileşimleri ve miktarları.....	27
Çizelge 3.4. B5 vitaminin kimyasal bileşimleri ve miktarları.....	27
Çizelge 3.5. MS vitaminin kimyasal bileşimleri ve miktarları.....	27
Çizelge 3.6. Kallus oluşum aşamasında (birinci aşama) kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	28
Çizelge 3.7. Bitki rejenerasyonu aşamasında (birinci aşama) kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	29
Çizelge 3.8. Araştırmanın ikinci aşamasında kullanılan yöntemler.....	35
Çizelge 3.9. Oksinlerin ve sitokininlerin stok solusyonlarının hazırlanmasında çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasallar ile saklama sıcaklıkları ve çalışma konsantrasyonları.....	38
Çizelge 4.1. Kallus oluşum oranına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	44
Çizelge 4.2. Yöntemlere ve çeşitlere göre kallus oluşum oranları (%).....	44
Çizelge 4.3. ESEKO oranına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	48
Çizelge 4.4. Yöntemlere ve çeşitlere göre ESEKO oranları (%).....	49
Çizelge 4.5. KSEKO oranına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	50
Çizelge 4.6. Yöntemlere ve çeşitlere göre KSEKO oranları (%).....	50
Çizelge 4.7. ESCEK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	52
Çizelge 4.8. Yöntemlere ve çeşitlere göre ESCEK oranları (%).....	53
Çizelge 4.9. KSCEK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	54
Çizelge 4.10. Yöntemlere ve çeşitlere göre KSCEK oranları (%).....	54
Çizelge 4.11. EKSEK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	56
Çizelge 4.12. Yöntemlere ve çeşitlere göre EKSEK oranları (%).....	56
Çizelge 4.13. Rejenerasyon etkinliğine ilişkin varyans analizi sonuçları.....	58
Çizelge 4.14. Yöntemlere ve çeşitlere göre rejenerasyon etkinlikleri (adet).....	58
Çizelge 4.15. Farklı sitokinin tipleri ve dozlarını içeren rejenerasyon ortamına aktarılmadan önce belirlenen çeşitlere ait ESEKO oranları (%).....	63
Çizelge 4.16. ESCEK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	65
Çizelge 4.17. Farklı sitokinin tipleri ve dozlarında çeşitlerin ESCEK oranları (%)...	65
Çizelge 4.18. EKSEK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	67
Çizelge 4.19. Farklı sitokinin tipleri ve dozlarında çeşitlerin EKSEK oranları (%)	67
Çizelge 4.20. Rejenerasyon etkinliğine ilişkin varyans analizi sonuçları.....	69
Çizelge 4.21. Farklı sitokinin tipleri ve dozlarında çeşitlerin rejnerasyon etkinliği (adet).....	70
Çizelge 4.22. Buğday çeşitlerinin kallus oluşum oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	73
Çizelge 4.23. Buğday çeşitlerinin kallus oluşum oranları (%).....	74

Çizelge 4.24. Buğday çeşitlerinin ESEKO oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	76
Çizelge 4.25. Buğday çeşitlerinin ESEKO oranları (%).....	77
Çizelge 4.26. Buğday çeşitlerinin KSEKO oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	79
Çizelge 4.27. Buğday çeşitlerinin KSEKO oranları (%).....	80
Çizelge 4.28. Buğday çeşitlerinin ESCEK oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	81
Çizelge 4.29. Buğday çeşitlerinin ESCEK oranları (%).....	82
Çizelge 4.30. Buğday çeşitlerinin KSCEK oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	84
Çizelge 4.31. Buğday çeşitlerinin KSCEK oranları (%).....	85
Çizelge 4.32. Buğday çeşitlerinin EKSEK oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları.....	86
Çizelge 4.33. Buğday çeşitlerinin EKSEK oranları (%).....	87
Çizelge 4.34. Buğday çeşitlerinin rejenerasyon etkinliğine ilişkin varyans analizi sonuçları.....	88
Çizelge 4.35. Buğday çeşitlerinin rejenerasyon etkinliği (adet).....	89
Çizelge 4.36. Birinci aşamada incelenen karakterler arasındaki Pearson korelasyon analizi sonuçları.....	91
Çizelge 4.37. İkinci aşamada incelenen karakterler arasındaki Pearson korelasyon analizi sonuçları.....	91
Çizelge 4.38. Üçüncü aşamada incelenen karakterler arasındaki Pearson korelasyon analizi sonuçları.....	92

## 1. GİRİŞ

Dünyada ve Türkiye’de tarım yapılabilecek alanların son sınırlarına ulaşmış olması, çalışmaların birim alandan elde edilen verimi artırmak üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. Dünya nüfusunun hızla artışı karşısında, birim alandan elde edilen verimin artırılması için bölge koşullarına uygun çeşitlerin elde edilmesi, bu çeşitlerin üretime alınması, tarımsal uygulamaların zamanında ve yeterli ölçüde yerine getirilmesi kaçınılmazdır.

Yeryüzündeki 3000 bitki türünden besin maddesi olarak yararlanan insanoğlu, gereksinim duyduğu protein ve kalorinin %50’sini tahıllardan sağlamaktadır. Bu nedenle, insan nüfusunun gereksinim duyduğu miktar ve kalitede tahıl üretimi günümüzde olduğu gibi gelecekte de dünya uluslarının en önemli gündem maddesini oluşturacaktır (Altıntaş vd 2005). Dünyada ekilebilir alanların %17’sinde yetiştiriciliği yapılan buğday (Jones 2005), birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de insanların en önemli besin kaynaklarından birisidir. Nitekim, 2007 yılı verilerine göre ülkemizde kişi başına yılda 206,6 kg buğday tüketilmektedir (TÜİK 2010). Diğer taraftan, 2008 yılı verilerine göre, ülkemizde 8,9 milyon hektar alanda buğday tarımı yapılmış ve 17,8 milyon ton buğday üretilmiş olup, dekara verim 220 kg’dır (TÜİK 2010).

Bitkisel üretimde birim alandan elde edilen ürünün miktarını; kültürü yapılan bitkinin genotipik üretim potansiyeli (genotip) ve üretim yapılan alandaki çevre faktörleri (iklim, toprak yapısı, toprak verimliliği, hastalık ve zararlılar) belirler.

Tarımın başlangıcından 19. yüzyıla kadar insanoğlunun verimi artırma çabaları daha çok üstün verimli genotiplerin doğal popülasyonlardan seçilmesi ve yetiştirme koşullarının olabildiğince iyileştirilmesi şeklinde olmuştur. On dokuzuncu yüzyılda ise bitkilerde beslenme esaslarının ortaya konması ve kalıtım prensiplerinin yeniden keşfi sonucu, bitkisel üretim daha bilinçli olarak yapılmaya başlanmıştır ve birim alandan elde edilen verimde büyük artışlar sağlanmıştır. Yirminci yüzyılda modern tarım

tekniklerinin ve bitki ıslahı yöntemlerinin uygulanması ile bitkisel üretimde önemli verim artışı gerçekleşmiştir. 1900'lü yılların başında dekara 66 kg olan dünya ortalama buğday verimi, 1999 yılında 230 kg'a ulaşmıştır. Ancak, mevcut verim yine de dekara yaklaşık 1500 kg olduğu tahmin edilen potansiyel verimin oldukça altında bulunmaktadır (Altıntaş vd 2005). Belirtilen bu potansiyel verim düzeylerine erişilebilmesi için bitkilerin genetik yapılarının ve çevrelerinin daha iyi bir şekilde kombine edilmesi gerekir. Bu amaçla klasik bitki ıslahı çalışmalarından yararlanılarak üstün verimli ve kaliteli birçok çeşit geliştirilip, insanoğlunun hizmetine sunulmasına karşın, başta hastalık ve zararlı olmak üzere bazı biyotik ve abiyotik çevresel baskılara karşı dayanıklılıkta henüz istenilen sonuç tam olarak alınamamıştır. Bu sorunlar değişen ekolojik koşullar altında giderek büyümekte ve tür içi melezleme, varyasyon oluşturmada yetersiz kalmaktadır.

Yeni bir çeşit geliştirmenin çok uzun bir zaman alması ve daha fazla maddi kaynağa gereksinim duyulması geleneksel ıslah yöntemlerinin en önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır. Hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere, bitkilerin diğer tarımsal özelliklerini iyileştirmede birçok sorunla karşılaşmaktadır. Aralarında melezleme yapılabilen tür sayısının azlığı, yapılan melezlemelerde istenen karakterlerle birlikte istenmeyen özelliklerin de birlikte geçişinin önlenememesi, arzu edilmeyen karakterlerin geri melezleme yoluyla elemine edilmesinin çok uzun zaman alması ve daha fazla işgücü gerektirmesi geleneksel bitki ıslahının diğer dezavantajlarıdır (Özcan ve Özgen 1996). Modern ıslah yöntemleri olarak da adlandırılacak biyoteknolojik yöntemler veya bitki genetik mühendisliği uygulamaları sayesinde, geleneksel yöntemlerin olumsuzlukları ortadan kaldırılabilen, ıslah süresi kısaltılarak para ve zamandan tasarruf sağlanmakta ve ayrıca melezlemede karşılaşılan, genetik bağlantı (linkage) sorunlarının ve gen havuzundan yararlanmadaki sınırlamaların kolayca üstesinden gelinebilmektedir.

Biyoteknolojik yöntemlerin ilk uygulaması olan doku kültürü yöntemleriyle kültüre alınan bitki hücrelerine ya da dokularına gen aktarımı yapılabilen, daha sonra gen aktarılmış bitki kısımları uygun besin ortamında olgun bitki haline getirilerek, aktarılan

geni taşıyan transgenik bitkiler elde edilebilmektedir. Yine, doku kültürü sırasında meydana gelen kalluslardan farklılaşan bitkiler arasında görülen somaklonal varyasyondan ıslah programlarında yararlanılabilmektedir. Ayrıca, *in vitro* ortamda kimyasal ve fiziksel mutagen uygulamaları ile hastalıklara, antibiyotiklere, herbisitlere, tuza, düşük sıcaklığa ve kuraklığa toleranslı veya dayanıklı mutant hücre seçimleri yapılabilmektedir (Karaca ve Bürün 1999).

Buğdayda, genetik mühendisliği çalışmalarından yararlanılarak gen aktarımında önemli bir aşama olan somatik kallus kültürü için eksplant kaynağı olarak **olgunlaşmamış embriyolar** (Ozias-Akins and Vasil 1982; Ozias-Akins and Vasil 1983a; Galiba *et al.* 1986; Hunsinger and Schauz 1987; Ahloowalia 1982; Sears and Deckard 1982; Redway *et al.* 1990; Papanfuss and Carman 1987; Özgen *et al.* 1996; Fennel *et al.* 1996; Hess and Carman 1998; Özgen *et al.* 1998; Karaca ve Bürün 1999; Bahieldin *et al.* 2000 ; Bohorova 2001; Li *et al.* 2003; Haliloğlu and Baenziger 2003a; Haliloğlu and Baenziger 2005 ve Haliloğlu *et al.* 2005), **olgunlaşmamış yapraklar** (Haliloğlu 2006), **olgunlaşmamış çiçek durumu** (Ozias- Akins and Vasil 1982; Redway *et al.* 1990), **olgun embriyolar** (Ozias-Akins and Vasil 1983b; Kato *et al.* 1991; Kintzios *et al.* 1996; Özgen *et al.* 1996; Karaca ve Bürün 1999; Özgen *et al.* 1998; Öktem *et al.* 1999; Varshney *et al.* 1999; Delporte *et al.* 2001; Mendoza and Kaepler 2002; Patnaik and Khurana 2003; Li *et al.* 2003; Zale *et al.* 2004), **mezokotil** (Yurkova *et al.* 1982), **tohumlar** ( Shah *et al.* 2003), **apikal meristemler** (McHughen 1983), **sürgün ucu** (Viertel and Hess 1996) ve **anterler** (Redway *et al.* 1990; Machii *et al.* 1998; Ingram *et al.* 2000, Haliloğlu and Baenziger 2003b) kullanılmıştır.

Yukarıda belirtilen eksplant kaynakları içerisinde en yüksek kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu olgunlaşmamış embriyo kültürlerinde görülmüştür. Bu nedenle, buğdayda olgunlaşmamış embriyolar kallus kültüründe etkili bir rejenerasyon için en iyi eksplant kaynağını oluşturmaktadır (Redway *et al.* 1990; Özgen *et al.* 1996; Özgen *et al.* 1998; Mendoza and Kaepler 2002; Patnaik and Khurana 2003; Zale *et al.* 2004).

Tahıllardaki genetik mühendisliği çalışmaları kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon sistemine bağlıdır. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla (Haliloğlu and Baenzinger 2003a) veya partikül bombardımanı ile (Patnaik and Khurana 2003) buğdayda ve tahıllarda transgenik bitki elde edilebilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda en fazla buğday transformasyonu üzerinde durulmuş ve olgunlaşmamış embriyolar bu amaçla en yaygın olarak kullanılan eksplant kaynağını oluşturmuştur. Ancak, olgunlaşmamış embriyoların elde edilmeleri için bazı koşulların sağlanması gerekmekte ve kullanımı belli dönemlerle sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle olgun embriyolar genetik transformasyon çalışmalarında kullanılacak kallusların üretimi için alternatif eksplant kaynağını oluştururlar.

Olgunlaşmamış embriyoların eksplant kaynağı olarak kullanılabilmesi için donör bitkiden belli dönemlerde eksplant kaynağı temin edilmesi ve kışlık çeşitlerde vernalizasyon ihtiyacının karşılanması için seralara ve kontrollü koşullara gereksinim duyulmaktadır. Bu durumda daha uzun bir süre ve daha fazla finansman gerekmektedir. Buna karşın, olgun embriyoların kaynağı olan tohumlar kolaylıkla temin edilebildikleri ve depolanabildikleri için yılın her döneminde çalışma olanağı sağlamaktadırlar.

Günümüzde, aynı türe giren çeşitler arasında genetik farklılığın oldukça azalması nedeniyle, özellikle çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı bitki geliştirmek amacıyla geleneksel bitki ıslahı yöntemlerinden yararlanma olanakları sınırlıdır. Çeşit geliştirme programlarında biyoteknolojik ve geleneksel ıslah yöntemlerinin birlikte kullanılmaları durumunda, gen kaynakları çeşitlendirilmiş olduğundan başarı şansının yüksek olması beklenmektedir. Biyoteknolojik uygulamaların önemli aşamalarından birisi etkili bir rejenerasyon sisteminin sağlanmasıdır. Bu nedenle bu çalışmada (1) buğdayda olgun embriyodan etkili bir rejenerasyon sistemi geliştirerek bitki rejenerasyon etkinliğinin artırılması, (2) kültür etkinliği yönünden en iyi rejenerasyon ortamı belirlendikten sonra ülkemizde tescil edilmiş bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyoları kullanılarak doku kültürüne tepkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Günümüzde buğday ıslahında birçok yöntemden yararlanılmakta olup, her geçen gün yeni özellikler taşıyan çeşitlerle verim ve kalite artışına katkıda bulunmaktadır. Tahılların klasik ıslahındaki mevcut sorunları aşabilmek için biyoteknolojik yöntemlerden yararlanabileceği, böylece istenilen sonuçların elde edileceği bildirilmiştir (Ahmet ve Adak 2007).

Doku kültürü, bitkilerin kök, gövde, yaprak, üreme organları ve hücreler gibi değişik kısımlarının kimyasal (besin maddeleri, hormonlar ve vitaminler) ve fiziksel (ışık, sıcaklık ve nem) gereksinimler sağlanarak *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıdır (Arı 2001). Kültüre alınan bitki hücrelerine ya da dokularına genetik mühendisliği yöntemleriyle gen aktarımı yapılabilmekte, daha sonra gen aktarılmış bitki kısımları uygun besin ortamında olgun bitki haline getirilerek, aktarılan geni taşıyan transgenik bitkiler elde edilebilmektedir.

Tahıllardaki genetik mühendisliği çalışmaları kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon sistemine bağlıdır. Etkili bir doku kültürü sistemi monokotiledonlarda, özellikle *Gramineae* familyasında, dikotiledonlardan daha zor olmasına rağmen (Hanzel *et al.* 1984; Özgen *et al.* 1996; Shah *et al.* 2003) günümüzde buğday, mısır, çeltik ve arpa gibi tahıl türlerinden bitki rejenerasyonu sağlanmıştır (Shah *et al.* 2003).

Buğdayda kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon etkinliği; genotipe (Sears and Deckard 1982; Mathies and Simpson 1986; Fennel *et al.* 1996), eksplant kaynağına (Ozias-Akins and Vasil 1982; Redway *et al.* 1990), donör bitkinin yetiştirme koşullarına (Hess and Carman 1998) ve kültür ortamına (Fennel *et al.* 1996; Mathias and Simpson 1986, Elena and Ginzo 1988) bağlıdır.

Buğdayda, genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılarak gen aktarmada önemli bir adım olan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında başarının büyük ölçüde

genotipe bağılı olduğu bilinmektedir (Şehirali ve Özgen 1998). Nitekim, Bregitzer (1992) ve Li *et al.* (2003), buğdayda kallus oluşumuna ve bitki rejenerasyonuna etki eden en önemli faktörün genotip olduğunu bildirmişlerdir. Yine, Mathias and Simpson (1986), doku kültüründe genotipin ortamdaki daha önemli olduğunu kaydetmişlerdir.

Elena and Ginzo (1988), Buck Naposta ve hibrit H81199 buğday genotiplerini kullanarak olgun embriyo kaynaklı kalluslardan sürgün rejenerasyonu üzerine oksin seviyesinin, doku çeşidinin ve genotipin etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda rejenere kallus oranı ve sürgün rejenerasyonu bakımından H81199 genotipinin daha iyi olduğunu belirlemişlerdir.

Yedi durum buğday genotipinde (Çakmak 79, Kırmızı 5132, S. Bursa 7113, Kunduru 414/44, Berkmen 469, T-104, T-105) olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolar kullanılarak yapılan bir çalışmada (Özgen *et al.* 1996), en yüksek kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonun, olgunlaşmamış embriyoda Kunduru 414/44 ve Kırmızı 5132 çeşitlerinde, olgunlaşmış embriyoda ise Berkmen 469 çeşidinde meydana geldiği ve ayrıca her iki eksplant kültüründe de kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda genotipin etkili olduğu tespit edilmiştir. Yine Özgen *et al.* (1998), on iki kışlık buğday genotipinin (Gerek 79, Haymana 79, Bezostaja 1, Bolal 2973, Başak 95, Sadova 1, Tosun 21, Yayla 305, Yektay 406, Sivas 111/33, Kırış 66, T-115) olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarını kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda olgunlaşmamış embriyo kültüründe en yüksek kallus oluşumu (%93,3) ve rejenerasyon kapasitesinin (%96,6) Yayla 305 çeşidinde, olgunlaşmış embriyoda ise en yüksek kallus oluşumu (%98,3) ve rejenerasyon kapasitesinin (%96,6) T-115 genotipinde meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca, araştırmacılar her iki embriyo kültüründe kallus oluşum oranı, kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi arasındaki korelasyonun önemsiz olduğunu, kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin farklı genler tarafından idare edildiğini, ca kallus oluşum oranı ve bitki rejenerasyonun genotipe ve eksplant kaynağına bağılı olduğunu kaydetmişlerdir.

Chen *et al.* (2006), sekiz ekmeklik buğday genotipinin (Jimai 1, Guomai 1, Guoyou 1,

Yumai 18, Yumai 34, Yumai 36, Xinmai 13 ve Neixiang 188) olgun embriyolarını endosperm destekli ve endosperm desteksiz olmak üzere iki farklı tipte kültüre almışlardır. Endosperm destekli olgun embriyoları 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında, endosperm desteksiz olgun embriyoları ise 2 mg/l veya 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonu için hormonsuz MS ortamını kullanmışlardır. Araştırma sonucunda her iki eksplant kaynağında da genotipler arasında hem kallus oluşumunda hem de bitki rejenerasyonunda farklılık olduğu saptanmıştır. Yine aynı çalışmada, endosperm destekli olgun embriyolardan ortalama kallus oluşum oranı (%52,3) endosperm desteksiz göre (2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında %82,7; 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında %82,1) daha az olmasının rağmen, rejenere bitki oranı endosperm destekli olgun embriyo kültüründe (%43,7) endosperm desteksiz göre (2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında %19,1; 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında %11,2) daha yüksek olmuştur.

Sarker and Biswas (2002), dört ekmeçlik buğday genotipinin (Sourav, Gourav, Kanchan ve Protiva) olgun embriyolarını, olgunlaşmamış embriyolarını, tohumlarını, endospermelerini ve kök uçlarını farklı ortamlarda kültüre almışlardır. Olgun embriyodan kallus oluşumu için en iyi cevabın 6 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında, bitki rejenerasyonu için ise 0,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l IAA ve 40 mg/l tirozin içeren MS ortamında meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yine, aynı çalışmada kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu bakımından en iyi eksplant kaynağının olgunlaşmamış embriyo olduğu, eksplant kaynağının yanı sıra kallus oluşumu ve rejenerasyon bakımından genotipler arasında farklılık bulunduğu belirlenmiştir.

Buğdayda 'Chakwal 86' ve 'Rawal 87' çeşitlerinin olgun embriyolarında kallus oluşumu ve rejenerasyon için ortamın, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve genotipin etkisi araştırılmıştır (Rashid *et al.* 2002). Bu amaçla kallus oluşumu için MS ve N6 ortamları kullanılmıştır. Her iki ortamda 2 mg/l 2,4-D'yi tek başına veya BAP'ın 3 farklı miktarıyla (0,1; 0,5 ve 1,0 mg/l) birlikte denenmiştir. Kallus oluşumunda N6 ortamının (%73,50) MS ortamından (%61,9) daha iyi olduğu belirlenmiştir. Kallus oluşum oranı Rawal 87 çeşidinde MS ortamında %58,64 iken, N6 ortamında %79,9;

Chakwall 86 çeşidinde ise MS ortamında %63,4 iken N6 ortamında %67,11 olmuştur. Büyüme düzenleyicisi olan BAP'ın kallus oluşum oranına etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonu için MS + 1 mg/l IAA ortamına ilave olarak BAP'ın 4 farklı miktarı (0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0 mg/l) test edilmiştir. Rejenerasyon oranı Rawaal 87 genotipinde 0,5 mg/l BAP içeren ortamda en yüksek (%31,9) olurken, Chakwall 86 genotipinde 2,5 mg/l BAP içeren ortamda en yüksek (%15,27) olmuştur.

Yu *et al.* (2008), Yangmai 158 buğday genotipini olgun embriyolarını birinci aşamada 2 mg/l 2,4-D içeren 5 farklı temel besi ortamında (MS, LS, N6, B5 ve P) kültüre almışlardır. Bu aşama sonucunda buğdayda olgun embriyo kültürü için en iyi temel besi ortamının MS ortamı olduğu saptanmıştır. İkinci aşamada, aynı çeşidin olgun embriyolarını birincil kallus oluşumu için 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarında (1, 2, 3 ve 4 mg/l), birincil kalluslardan embriyogenik kallus oluşumu için ise 2 mg/l 2,4-D ile BAP ve/veya NAA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren MS ortamında kültüre almışlardır. İkinci aşama sonucunda birincil kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D'nin, embriyogenik kallus oluşumu için ise alt kültür ortamında 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA içeren ortamı önermişlerdir. Üçüncü aşamada, meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonu için rejenerasyon ortamında metal iyonlarının ( $Ag^+$  ve  $Cu^+$ ) etkisini araştırmışlardır. Gümüş ( $Ag^+$ ) kaynağı olarak gümüş nitratın ( $AgNO_3$ ) 4 farklı konsantrasyonunu (2,5; 5,0; 10,0 ve 15 mg/l), bakır ( $Cu^+$ ) kaynağı olarak ise bakır sülfatın ( $CuSO_4$ ) 4 farklı konsantrasyonlarını (1,0; 2,0; 3,0 ve 4,0 mg/l) kullanmışlardır. Bu aşama sonucunda en iyi bitki rejenerasyonun 10 mg/l  $AgNO_3$  içeren rejenerasyon ortamında meydana geldiğini,  $CuSO_4$  ise kök oluşumunu uyardığını tespit etmişlerdir. Çalışmanın son aşamasında 8 farklı buğday genotipinin (Yangmai 5, Yangmai 10, Yangmai 11, Yangmai 158, Yumai 13 ve Yumai 46) olgun embriyolarını optime etmiş oldukları ortamlarda kültüre almışlar ve bitki rejenerasyonu bakımından çeşitler arasında farklılık olduğunu kaydetmişlerdir.

Li *et al.* (2003), on yazlık buğday genotipinin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarını kültüre almışlardır. Olgunlaşmış embriyo kültürü için yüzey

sterilizasyonu yaptıkları tohumları  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 1/2 MB ortamında (MS tuzları + B5 vitamini + 2 mg/l glisin, 300 mg/l glutamin + 500 mg/l kazein hidrolizat + %3 sakkaroz + %0,7 agar ) 20-24 saat su emmeye bıraktıktan sonra aseptik koşullarda olgunlaşmış embriyoları elde etmişlerdir. Olgunlaşmış buğday embriyolarını olgunlaşmamış embriyolar için kullandıkları 2 mg/l 2,4-D içeren MB ortamında kültüre almışlardır. Daha sonra meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için TDZ içeren MB ortamına aktarılmıştır. Araştırmacılar, kallus oluşum oranına ve bitki rejenerasyonuna genotipin etkisinin çok önemli ve bitki rejenerasyonu için TDZ'nin 1 mg/l dozunun uygun değer olduğunu bildirmişlerdir.

Kışlık ve yazlık buğday çeşit ve hatlarının kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu yeteneğini belirlemek ve buğdayın progenitörleri olan *T. monococcum*, *T. tauschii* ve *Aegilops speltoides*'in doku kültürüne tepkilerini araştırmak amacıyla bir çalışma yapan Zale *et al.* (2004), eksplant kaynağı olarak endospermsiz olgun embriyoları iki eşit parçaya bölerek kullanmışlardır. Embriyolar kallus oluşumu için 30 g/l maltoz, 0,25 g/l *myo*-inositol, 1 mg/l tiamin-HCl, 1 g/l kazein hidrolizat, 2,5 mg/l dikamba ve 0,69 g/l L-prolin ve 3,5 g/l phytigel içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Kallus oluşum ortamında 54 gün süreyle karanlıkta tutularak her 15 günde bir yeni benzer ortama aktarılmıştır. Elli dördüncü günün sonunda meydana gelen kalluslar 0,1 mg/l BAP içeren kallus oluşum ortamına aktarılarak 16 saat ışık koşullarında 14 gün süreyle bekletildikten sonra sürgün gelişimi için 62 g/l maltoz, 0,1 g/l *myo*-inositol, 0,4 g/l tiamin-HCl, 1 g/l kazein hidrolizat, 1 mg/l BAP, 0,75 g/l L-glutamin ve 3,5 g/l phytigel içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Araştırmacılar kallus oluşumu, rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkinliği bakımından genotipler arasında farklılık olduğunu ve buğdayın progenitörleri içerisinde en iyi bitki rejenerasyonunun *Aegilops speltoides*'te meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Patnaik *et al.* (2006), üç ekmeklik (HD2329, CPAN1676 ve PBW343) ve üç makarnalık (PDW215, PDW233 ve WH896) buğday genotipinin olgun embriyolarını kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D, 200 mg/l kazein hidrolizat ve 100 mg/l *myo*-inositol içeren MS ortamında 3 hafta süreyle karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de kültüre almışlardır. Bu ortamda

oluşan kallusları ise bitki rejenerasyonu için 2,22 µM (0,5mg/l) BAP ve 0,1 µM (yaklaşık 0,02 mg/l) NAA içeren 2,4-D'siz kallus ortamına aktarmışlardır. Denemede en yüksek kallus oluşumunun %92,0 ile HD2329 genotipinde, en yüksek rejenerasyon oranının ise CPAN1676 (%68,5) genotipinde meydana geldiği saptanmıştır.

Irak orjinli beş ekmeklik buğday genotipinde (Irak, Temmuz 2, Eliz 66, İba 99 musaddak ve İba 99 Müseccel) bir çalışma yapan Ahmet ve Adak (2007), olgun embriyoları 8 mg/l 2,4-D, 20 g/l sakkaroz, 7 g/l agar içeren MS ortamında 14 gün süreyle karanlıkta ve 25±1°C'de kültüre almışlardır. Rejenerasyon için hormonsuz MS ortamında 30 gün süreyle 16 saatlik fotoperyotta ve 25±1°C'de tutularak sürgün gelişimi incelenmiştir. Araştırmacılar en iyi kallus oluşumu ve rejenerasyonun İba 99 musaddak genotipinde meydana geldiğini, en düşük kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonun ise Eliz 66 genotipinde elde edildiğini bildirmişlerdir.

Bi *et al.* (2007), otuz bir buğday genotipinin olgun embriyolarını kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l NAA, 500 mg/l kazein hidrolizat, 200 mg/l glutamin, 150 mg/l asparajin ve 30 g/l sakkaroz içeren MS ortamında kültüre almışlar, daha sonra bu ortamda oluşan kallusları rejenerasyon için 5 mg/l kinetin içeren MS ortamına, kök oluşumu için ise hormonsuz ½ MS ortamına aktarmışlardır. Kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu bakımından genotipler arasında farklılık bulunduğunu ve genotipin etkisinin önemli olduğunu bildirmişlerdir.

İki buğday genotipinin (İnkılab 91 ve Pavon 76) tohumlarının eksplant olarak kullandıkları bir çalışmada, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu bakımından çeşitler arasında farklılık bulunduğu tespit edilmiştir (Malik *et al.* 2004).

Dört ekmeklik buğday genotipinin (Maris Huntsman, Kleiber, Sicco ve Siete cerros) olgunlaşmamış embriyolarını eksplant olarak kullanan Ahloowalia (1982), kallus oluşum oranının, Maris Huntsman genotipinde kinetin içeren ortamda %77, kinetin içermeyen ortamda ise %100 olarak tespit edilmiştir. Denemede kullanılan diğer

genotiplerde kinetin içermeyen ortamda kallus oluşum oranı %28 (Sicco) ile %100 (Siete cerros) arasında değişmiştir. Araştırmacılar kallus oluşumu ve rejenerasyon bakımından çeşitler arasındaki bu farklılığın, tohum olgunlaşma sırasındaki içsel oksin ve sitokin hormonlarının miktarıyla ilgili olabileceğini bildirmişlerdir.

Sears and Deckard (1982), otuz dokuz kışlık buğday genotipinin olgunlaşmamış embriyo kültüründe, kallus oluşum oranının genotiplere göre %0-97 arasında değiştiğini ve rejenerasyon bakımından genotipler arasında farklılıklar olduğunu belirlemişlerdir.

Beş farklı kışlık ekmeçlik buğday genotipinin (Arthur 71, Coker 747, Coker 76-22, McNair 3069 ve Oasis) olgunlaşmamış embriyonalarında yapılan bir çalışmada, yalnızca bazı genotiplerde (McNair 3069, Arthur 71 ve Oasis) somatik embriyoların oluştuğu tespit edilmiştir (Ozias-Akins and Vasil 1983a).

Hunsinger and Schauz (1987), Sage, Caribo ve Kanzler kışlık buğday genotiplerinin olgunlaşmamış embriyo kültüründe, somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu bakımından Caribo ve Kanzler genotiplerinin daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Koyu kırmızı renkli iki yazlık buğday genotipinin (Fremont ve PCYT 10) olgunlaşmamış embriyo kültürüne tepkisinin araştırıldığı bir çalışmada PCYT 10 genotipinin gerek kallus oluşumu ve gerekse sürgün oluşturma bakımından daha iyi olduğu saptanmıştır (Papenfuss and Carmen 1987).

Sekiz ekmeçlik buğday genotipinin (Anza, Chris, Coker983, FLA301, FLA302, Fremont, Hunter ve Pavon) olgunlaşmamış embriyolarını farklı ortamlarda kültüre alan Redway *et al.* (1990), kallus oluşumu bakımından genotipler arasında farklılık olduğunu, en yüksek kallus oluşum oranının Chris genotipinde, en düşük kallus oluşum oranının ise Coker 983 genotipinde meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Linacero *et al.* (1996), Thatcher, Chris ve Dollar ekmeklik buğday genotiplerinin başaklarına çiçeklenmeden bir gün sonra 2,4-D enjekte etmişler ve meydana gelen olgunlaşmamış embriyoları kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda, Thatcher ve Chris genotiplerinin embriyogenik kallus oluşturma bakımından Dollar genotipinden daha iyi olduğu belirlenmiştir.

Yüz yedi buğday genotipinin anterleri ve olgunlaşmamış embriyoları kullanarak yapılan bir çalışmada, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon kapasitesi bakımından genotipler arasında farklılık bulunduğu, genetik transformasyon sistemlerinde ve hücre seçiminde genotipin önemli bir faktör olduğu tespit edilmiştir (Machii *et al.* 1998).

Kırk sekiz ekmeklik buğday genotipinin olgunlaşmamış embriyolarını 3 farklı ortamda kültüre alan Fennel *et al.* (1996), kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu oranının genotip ve ortama göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda da buğdayda gerek kallus oluşumuna ve gerekse bitki rejenerasyonuna genotipin ve ortamın etkisinin önemli olduğu saptanmıştır (Bohorova *et al.* 2001; Przetakiewicz *et al.* 2003 ve Haliloğlu and Baenziger 2005).

HiLine, Bobwhite ve Giza 163 ekmeklik buğday genotiplerinin olgunlaşmamış embriyo kültüründe meydana gelen kallusları 3 farklı dikamba dozunun bulunduğu rejenerasyon ortamında kültüre alan Bahieldin *et al.* (2000), kallus başına en yüksek sürgün sayısının HiLine (2,22 adet) genotipinde elde edildiğini bunu sırasıyla Bobwhite (1,62 adet) ve Giza 163 (0,62 adet) genotiplerinin izlediğini belirlemişlerdir.

Haliloğlu vd. (2003), üç kışlık buğday genotipinin (Alliance, 2137 ve NE92456) olgunlaşmamış embriyolarını 3 farklı besin ortamında kültüre almışlardır. NE92456 genotipinin kallus oluşturma, somatik embriyo sayısı ve bitki rejenerasyonu bakımından diğer genotiplere göre daha üstün olduğunu bulmuşlardır.

Haliloğlu and Baenziger (2005), beş kışlık (Pronghorn, Alliance, 2137, NE92458 ve

Culver) ve iki yazlık (Bobwhite ve Fielder) buğday genotipinin olgunlaşmamış embriyolarını 3 farklı ortamda kültüre almışlardır. Kallus oluşum oranının %5,7–100 arasında değiştiğini en yüksek kallus oluşumunun Bobwhite (%100) genotipinde, en düşük kallus oluşumunun ise Alliance (%5,7) buğday genotipinde meydana geldiğini saptamışlardır. Denemede en yüksek rejenerasyon etkinliği (bitki/eksplant) Bob White (1,8) genotipinde elde edilmiş, bunu azalan sıra ile NE92458 (1,6) ve Fielder (1,4) genotipleri izlemiştir. Araştırmacılar kallus ve somatik embriyo oluşumunda genotipin ve ortamın etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Genotiplerin doku kültürüne tepkileri çekirdekdeki veya sitoplazmadaki genler tarafından kontrol edilmektedir (Peng and Hodges 1989). Buğdayda doku kültürüne tepkinin bir ya da birkaç kromozom tarafından yönetildiği (Özgen *et al.* 2001), rejenerasyonunun ise çoklu gen sistemi tarafından kontrol edildiği kaydedilmiştir (Galiba *et al.* 1986).

Jia *et al.* (2007), buğdayın doku kültürüne cevabını belirleyen kantitatif özellik lokuslarını tespit etmek amacıyla doku kültürüne cevabı iyi olan Nanda 2419 genotipi ile Wangshuibai melezlerinden oluşan rekombinant kendilenmiş hatlarının tüm genomlarının taranması sonucunda, embriyodan kallus oluşumuna 5, kallustan rejenerasyon bitki oluşumuna 4 ve kallus başına meydana gelen bitki sayısına ise 4 kromozom bölgesinin etki ettiğini bildirmişlerdir. Bu özelliklerden en az ikisinin 2A, 2D, 5A, 5B ve 5D kromozomlarında bulunan genler tarafından yönetildiğini göstermişlerdir.

Buğdayda translokasyon hatları ve kromozom yedeklenmiş hatlar kullanılarak yapılan çalışmalarda doku kültürüne cevabın lokusların yapısına ve yerlerine bağlı olduğu belirlenmiştir (Henry and Buyser 1985; Galiba *et al.* 1986; Mathias and Fukui 1986; Felsenburg *et al.* 1987; Higgins and Mathias 1987; Kaleikau *et al.* 1989; Langridge *et al.* 1991). Henry and De Buyser (1985), buğdayın B genomunun 1 nolu kromozomunun uzun kolunun yerine, çavdarın 1 nolu kromozomunun kısa kolu yerleştirildiğinde, 1 nolu çavdar kromozomundan aktarılan bu kısa kolun, buğday anter kültüründe bitki rejenerasyon kapasitesini etkileyen genleri içerdiğini bildirilmişlerdir. Langridge *et al.*

(1991) ve Fennell *et al.* (1996) 1 nolu çavdar kromozomunun kısa kolunun olgunlaşmamış embriyo kültüründe rejenerasyondan sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Farklı buğday genotipleri ile yapılan çalışmalarda 4B kromozomu üzerinde bulunan genlerin rejenerasyonda önemli etkiye sahip olmaları yanında (Higgins and Mathias 1987), sitoplazmanın (Ou *et al.* 1989) ve mitokondriyal genomun da (Rode *et al.* 1988) etkili olabileceği bildirilmiştir. Willman *et al.* (1989), mısırdaki somatik embriyogenesis oluşumunda en az bir genin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan Rode *et al.* (1988), embriyogenik olmayan hücrelerde 8 kb'lık mitokondriyal DNA segmentinin kaybolduğunu ve bu segmentin tersine farklılaşan (de-differentiation) hücrelerin rejenerasyon yeteneğinde özel bir role sahip olabileceğini ifade etmişlerdir.

Özgen *et al.* (2001), genotiplerin doku kültürüne tepkilerinde sitoplazmanın etkili olup olmadığını araştırmak amacıyla dört buğday genotipinde (111, 113, Bezostaja 1 ve Gerek 79) resiprokal melezlemeler yapmışlardır. Bu melezlerden 113 x 111 kombinasyonunun kallus oluşum oranının (%98,3) 111 x 113 kombinasyonunun kallus oluşum oranından (%75,0) önemli derecede yüksek olduğunu, buna karşın rejenerasyon kapasiteleri arasındaki farkın düşük olduğunu belirlemişlerdir. Diğer taraftan, 111 x 113, 113 x 111, 113 x Bezostaja 1 ve Bezostaja 1 x 113 resiprokal melezlemelerinde kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi üzerine sitoplazmanın oldukça önemli etkisinin bulunduğunu, 113 x Gerek 79 resiprokal melezlerinde ise kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi üzerine sitoplazmanın etkisinin olmadığını, ancak rejenerasyon bitki sayısında farklılık ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, sitoplazmanın kallus oluşumuna, rejenerasyon kapasitesine, kültür etkinliğine ve rejenerasyon bitki sayısına olumlu yönde etki ettiğini ve sitoplazmik etkinin genotipe bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Carman (1990) ve Bhaskaran and Smith (1990), kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda genotipler arasındaki farklılığın içsel (bitki bünyesindeki) hormon seviyesindeki farklılıkla ilgili olabileceğini bildirmişlerdir.

Eksplantların alınacağı bitkilerin yetiştirme koşulları kallus oluşumunda ve bitki rejenerasyonunda önemli rol oynamaktadır. Örneğin ışık, nem, toprağın besin durumu ve mevsimsel faktörler etkili olabilmektedir. Buğdayda donör bitkiler yüksek sıcaklık, kuraklık, düşük ışık yoğunluğu ve besin noksanlığı gibi olumsuz çevre koşullarında yetiştirildiklerinde ve fungal veya bakteriyel hastalıklarla enfekte olduklarında ya da böcekler tarafından istila edildiklerinde eksplanttaki ve dokulardaki içsel hormon seviyeleri değişmektedir (Hess and Carman 1998).

Bitki doku kültüründe, bitki büyüme düzenleyicileri önemli bir yere sahiptir. Kültür ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinden hücre bölünmesini ve gelişimini uyarıcı etkiye sahip olan oksinler, somatik embriyo oluşumunu en fazla etkileyen bileşiklerdir. Embriyogenesis oluşumunu teşvik etmek için en fazla kullanılan oksin 2,4-D olmakla birlikte NAA, pikloram ve dikamba gibi oksinler de tek başlarına veya 2,4-D ile birlikte kullanılmaktadırlar. Öte yandan oksinler embriyogenesisi teşvik etmek için kullanılmalarına karşın, ortamda oksinin sürekli bulunması somatik embriyoların gelişimini engellemektedir. Sitokininlerin ise besin ortamına ilave edilmesi genellikle somatik embriyo oluşumunu engellemektedir. Ancak, tam bir embriyo olgunlaşması ve bitki gelişimi için içsel hormon seviyesine bağlı olarak çok düşük oranlarda sitokinin ve özellikle de BAP gerekli olmaktadır (Anonymous 2003).

Kültür ortamında bulunan bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşidinin yanında miktarı da morfogenez ve büyüme için önemli bir etkiye sahiptir. Genellikle oksinlerin yüksek, sitokinin ise düşük konsantrasyonu kallus oluşumunu ve hücre çoğalmasını artırmaktadır. Buğdayda kallus oluşumu ve devamlılığı için en yaygın olarak kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi 2,4-D'dir (Ozias-Akins and Vasil 1982,1983a; Mc Kinnon *et al.* 1987; Elena and Ginzo 1988; Viertel and Hess 1996).

Ozias-Akins and Vasil (1983b), Gamborg B5 ortamında 2,4-D'nin farklı miktarlarının (0; 0,4; 1,0; 4,0 ve 8,0 mg/l) kallus oluşumu ve gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar 2,4-D miktarındaki artışla birlikte eksplant başına kallus taze ağırlığının ve hücre sayısının arttığını, 2,4-D'nin 2 mg/l ve daha yüksek

miktarlarında hücrelerin düzensiz büyüdüklarini, ancak hücre bölünmesinin arttığını, kallus oluşumu ve gelişimi için 2 mg/l 2,4-D miktarının optimum olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde Mc Kinon *et al.* (1987), olgun embriyo kültüründe 9 µM (Yaklaşık 2 mg/l) 2,4-D miktarının optimum olduğunu belirlemişlerdir.

Buğday hücre kültüründe 2,4-D yerine dikambanın kullanılabileceği ilk olarak Dutis *et al.* (1975) tarafından bildirilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda kallus oluşumunda dikambanın 2,4-D'den üstün olduğu kaydedilmiştir (Bhaieldin *et al.* 2000). Papenfuss and Carmen (1987), olgunlaşmamış embriyodan kallus oluşturmak için ortamda dikamba kullanıldığında meydana gelen kalluslardan rejenere olan bitki sayısının 2,4-D'den fazla olduğunu ve dikambanın, metabolizma tarafından daha hızlı kullanıldığı için sürgün oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan Moore (1989) 2,4-D'nin enzimatik parçalanmaya ve birleşmeye direnç gösterdiğini ve bu nedenle bitki hücrelerinde yüksek oranda kararlı bir şekilde kaldığını bildirmişlerdir. Buna karşın, Redway *et al.* (1990), buğday doku kültüründe yapmış oldukları çalışmada dikamba ve 2,4-D arasında herhangi bir fark olmadığını kaydetmişlerdir.

Zhou and Lee (1983), "Chinese spring" ve "Frederick" buğday çeşitlerinde 2,4-D ve diğer 12 oksin tipinin olgun embriyodan kallus oluşum oranına etkisini araştırmışlardır. Yazlık "Chinese spring" buğday çeşidinde kallus gelişimi üzerine 2,4-D ve dikambanın pikloramdan daha üstün olduğu, buna karşın kışlık "Frederick" buğday çeşidinde dikambanın ve pikloramın kallus gelişimi üzerine etkisinin 2,4-D'ye eşit olduğu belirlenmiştir.

Mendoza and Kaepler (2002), Bobwhite buğday çeşidinin olgun embriyolarında 4 oksin tipinin (2,4-D, dikamba, pikloram, ve 2-MCPP) 4,5; 9,0 ve 18,0 µM miktarlarını ve iki farklı şekerin (maltoz ve sakkaroz) farklı sterilizasyonlarının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine olan etkilerini araştırmıştır. Kallus oluşumu için 25±1°C'de 48 saat karanlıkta çimlendirilen tohumların embriyolarını kullanmışlardır. Kallus oluşum ortamında MS besinlerine ilave olarak 5 mg/l glutamin, 2 mg/l glisin , 1 mg/l myo-inositol, 1mg/l kazein hidrolizat 0,5 mg/l nikotonik asit, 0,5 mg/l piridoksin ve 0,1 mg/l

tiamin içeren ortamı kullanmışlardır. Bitki rejenerasyonu ortamında yarı dozda MS inorganik tuzlarına ilave olarak kallus oluşumunda kullanılan benzer organik bileşikler, bitki büyüme düzenleyicileri olarak ise 0,1 mg/l oksin (kallus oluşumunda kullanılan oksin tipine göre) ve 0,5 mg/l BAP kullanılmıştır. Çalışma sonucunda kallus oluşumuna oksin tipinin ve dozunun etkisinin çok önemli olduğu belirlenmiştir. 2-MCPP hariç, diğer oksinlerde kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Pikloram ve dikamba konsantrasyonunun artması kallus taze ağırlığını artırmış, buna karşın 2,4-D konsantrasyonunun artması azaltmıştır. Yine, aynı çalışmada en yüksek rejenerasyon oranı 18 µM (4 mg/l) dikamba içeren ve filtre sterilizasyonu yapılan sakkaroz içeren ortamda gerçekleşmiştir.

Yazlık ve kışlık buğday genotiplerinin olgun embriyolarından embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu üzerine farklı faktörlerin etkilerini araştıran Filippov *et al.* (2006), olgun embriyoları üç farklı oksin tipini (2,4-D, 2,4,5-T ve dikamba) ve bunlara ait beş farklı dozu (6, 8, 10, 12 ve 14 mg/l) içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda, embriyogenik kallus oluşumu bakımından dikambanın en iyi olduğu ve en yüksek bitki rejenerasyonunun 12 mg/l dikamba içeren MS ortamında meydana geldiği saptanmıştır. Aynı çalışmanın devamında kallus oluşum ortamında 12 mg/l dikambaya ilave olarak IAA, IBA ve NAA'nın dört farklı dozunun (0; 0,1; 0,5 ve 1,0 mg/l) kallus, embriyogenik kallus, ve sürgün rejenerasyonuna olan etkileri araştırılmıştır. Deneme sonucunda ilave oksinin kallus oluşumunu ve embriyogenik kallus oluşumunu artırdığı, ancak embriyogenik kallus başına bitki sayısında her hangi bir değişme olmadığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar en iyi somatik embriyogenesisin 12 mg/l dikamba + 0,5 mg/l IAA içeren ortamda meydana geldiğini kaydetmişlerdir.

Buğdayda olgunlaşmamış embriyo kültürü konusunda yapılan bir çalışmada embriyogenik kallus oluşturma ve rejenere bitki meydana getirme bakımından dikambanın 2,4-D ve piklorama göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir (Satyavathi *et al.* 2004). Yine, çavdarda yapılan bir denemede embriyogenesisde dikambanın 2,4-D ve NAA'ya göre daha etkili olduğu saptanmıştır (Ma and Pulli 2004).

Arpada olgun embriyo kültüründe çalışan Gurel *et al.* (2009), dikambanın ve 2,4-D'nin kallus oluşumu üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Denemede en yüksek kallus oluşumunun 4 mg/l dikamba içeren MS ortamında meydana geldiği sonucuna varılmıştır.

Ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde çalışan Kintzios *et al.* (1996), en yüksek kallus oluşumunu 2,4-D ve kinetin içeren MS ortamında elde etmişlerdir. Yine, ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin kullanıldığı bir denemede (Varshney *et al.* 1999), olgun embriyolar 2,4-D'nin farklı dozlarına (0,5; 2,5 ve 5,0 mg/l) sahip MS ortamında kültüre alınmış ve 2,5 mg/l 2,4-D'nin optimum olduğu belirlenmiştir. Doğu 88 buğday çeşidinin kullanıldığı başka bir çalışmada (Karaca ve Bürün 1999) olgun embriyoların kültüründe kallus oluşumu için dört farklı ortam denenmiştir. Bu ortamlar MS tuzlarına ilave olarak, 2 mg/l 2,4-D; 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin; 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin + 1 mg/l NAA; 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin + 1 mg/l NAA + 150mg/l asparajin içermiştir. En yüksek kallus oluşumunun 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında gözlemlendiği kaydedilmiştir. Araştırmacılar, kallus ağırlığı bakımından olgun embriyoların daha iyi sonuç verdiğini ve en yüksek kallus ağırlığının 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin içeren MS ortamında meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Buğday, arpa ve tritikale üzerinde çalışan Przetakiewicz *et al.* (2003), buğday olgunlaşmamış embriyoları MS tuzları + B5 vitamini + %3 sakkaroz içeren besi ortamında üç farklı oksin tipinin (2,4-D, dikamba, pikloram) 3 mg/l dozlarını ve kombinasyonlarını (1 mg/l pikloram + 1 mg/l 2,4-D; 1,5 mg/l pikloram + 1,5 mg/l dikamba; 1,5 mg/l pikloram + 1,5 mg/l 2,4-D; 1,5 mg/l dikamba + 1,5 mg/l 2,4-D) kullanarak kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Buğdayda, dikambanın tek başına ya da 2,4-D ile pikloramın düşük doz kombinasyonunun embriyogenik kallus oluşturma bakımından en iyi olduğunu bildirmişlerdir. Yine, araştırma sonucunda, 1 mg/l BAP ve 0,2 mg/l IAA içeren ortamın hormonsuz ortama göre bitki oluşturma bakımından önemli bir şekilde etkili olduğu tespit edilmiştir.

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

Turhan and Baser (2004) endosperm destekli ve endospermsiz olgun embriyoları MS (kontrol), 8 mg/l 2,4-D, 2 mg/l NAA, 4 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA ve 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l NAA içeren 5 farklı MS ortamında kültüre almışlardır. En yüksek kallus oluşumunun 4 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA içeren ortamda endosperm desteksiz olgun embriyoda gerçekleştiğini saptamışlardır. Yine, aynı çalışmada en yüksek embriyogenik kallus oluşumunun endospermsiz olgun embriyoda meydana geldiği tespit edilmiştir.

Beş buğday genotipinin (Tabasi, Bolani, Shiraz, Shoaleh ve Azar) ve ABA'nın farklı dozlarının embriyo kültürüne etkisini araştıran Fazelienasab *et al.* (2004), olgun embriyoları MS ortamında 10 mg/l 2,4-D'ye ilave olarak 0, 2, 4, 6 ve 8 mg/l ABA ve 30 g/l sakkaroz içeren ortama yerleştirmişlerdir. Bu embriyolardan oluşan kallusları bitki rejenerasyonu için 0,5 mg/l IAA ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamına aktarmışlardır. Kallus gelişimi bakımından kültür çeşitleri arasında farklılıklar bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ABA ilavesinin kallus oluşumu üzerine olumsuz bir etkiye sahip olduğunu ve en yüksek kallus oluşumunun ABA içermeyen ortamda, en az ise 8 mg/l ABA içeren ortamda gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak ABA ilavesinin oksin aktivitesini azaltığı için kallus oluşumunu ve bitki rejenerasyonunu azaltıcı etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Kallus oluşumu için kullanılan 2,4-D, NAA ve IAA gibi oksinler ile zeatin, kinetin ve BAP gibi sitokininler kalluslardan bitki rejenere edilmesinde kullanılmaktadırlar (Bhaskaran and Smith 1990). En yaygın kullanılan sitokininler BAP, kinetin, zeatin ve TDZ'dir (Bhojwani and Razdan 1996). Bitki doku kültüründe ve çeşitli büyüme olaylarında hücre bölünmesini artırıcı bir faktör olan sitokinin (Marcinska *et al.* 2001)

proembriyogenik kitlenin gelişim oranını artırmaktadır (Ge *et al.* 2006). Embriyogenik kallus oluşumu için genellikle yüksek oksin/sitokinin oranı kullanılırken, bitki rejenerasyonu için düşük oksin/sitokinin oranı kullanılmaktadır (Ge *et al.* 2006).

Buğdayda sürgün rejenerasyonunda sitokinin yüksek seviyeleri düşük seviyedeki oksin ile ya da oksinsiz olarak kullanılmaktadır (Jones 2005). Elena and Ginzo (1988), biri hibrit olmak üzere 10 buğday genotipinin skutellumlarından ayrılan olgun embriyolarından kallus oluşturmuşlardır. Meydana gelen kallusları oksin miktarı düşük ortama aktardıklarında kalluslardan sadece sürgünlerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Yine, Elena and Ginzo (1988) oksin miktarının azaltılmasının sürgün rejenerasyonunda etkili olduğunu belirlemişlerdir.

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

Varshney *et al.* (1999), 17 ekmeçlik ve 3 makarnalık buğday genotipinin olgun embriyo kültüründe kalluslardan bitki rejenerasyonu için 0,2 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamını kullanmışlardır.

Ekmeçlik (CPAN1676) ve makarnalık (PDW215) buğday genotiplerinin kullanıldığı bir çalışmada (Patnaik and Khurana 2003), kallus oluşumu için olgun embriyolar 2 mg/l 2,4-D, 200 mg/l kazein hidrolizat ve 100 mg/l myo-inositol içeren MS ortamında 3 hafta süreyle karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de kültüre almışlar, embriyolardan oluşan kalluslar bitki rejenerasyonu için 2,22  $\mu\text{M}$  (0,5 mg/l) BAP ve 0,1  $\mu\text{M}$  (yaklaşık 0,02 mg/l) NAA içeren 2,4-D'siz kallus oluşum ortamına aktarılmıştır.

Bazı araştırmacılar (İvanov *et al.* 1998) buğdayda olgunlaşmamış embriyo kültüründe meydana gelen kalluslardan sürgün oluşumu için 0,1 mg/l IAA ve 0,5 mg/l BAP içeren MS ortamını kullanırken, diğerleri (Fennel *et al.* 1996; Bhorova *et al.* 2001) 0,5 mg/l

IAA ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamını kullanmışlardır. Diğer taraftan, *Paspalum scrobiculatum* bitkisinde çalışan Kaur and Kathari (2004), olgunlaşmamış çiçek kültüründe meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonu için 0,5 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamını denemişlerdir.

Arpada yapılan bir çalışmada (Chang *et al.* 2003) olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşumu için dikambanın ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarını (0; 1,5; 3,0; 4,5 ya da 6 mg/l), bitki rejenerasyonu için ise BAP ve kinetinin farklı konsantrasyonlarını (0; 0,1; 0,5 ya da 1 mg/l) içeren modifiye MS ortamı kullanılmıştır. Araştırmacılar, embriyogenik kallus oluşumu için 3 mg/l 2,4-D ya da dikamba, rejenerasyon için ise 0,5-1 mg/l BAP içeren modifiye MS ortamını önermişlerdir.

Sharma *et al.* (2005a), sekiz arpa genotipinin olgunlaşmış embriyolarını kullanarak, kallus oluşumu, somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu için farklı ortamları denemişlerdir. Çalışmada kallus oluşumu için %6 maltoz + 6 mg/l 2,4-D ve 0,001 mg/l BAP içeren MS ortamının, embriyogenesis için %3 maltoz + 6 mg/l 2,4-D ve 0,01 mg/l BAP içeren MS ortamının ve bitki rejenerasyonu için ise %3 maltoz + 1 mg/l 2,4-D ve 0,1 mg/l BAP içeren MS ortamının en iyi ortamlar oldukları belirlenmiştir.

Buğdayda direk sürgün rejenerasyonu üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini araştıran Alizadeh *et al.* (2003), 4 farklı eksplanttan direkt sürgün rejenerasyonu için 2,4-D, IAA, NAA ve BAP'ın farklı kombinasyonlarını test etmişlerdir. Embriyo kültüründe en yüksek rejenerasyonun 0,2 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l IAA ve 1 mg/l BAP içeren ortamda meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

İki kışlık buğday genotipinde yapılan bir çalışmada (Sharma *et al.* 2005b) meristematik sürgün segmentleri kullanılarak çoklu sürgün oluşturmak amacıyla 2,4-D ya da Pikloram ile TDZ ve BAP'ın farklı konsantrasyonları denenmiştir. Çoklu sürgün tomurcuğu oluşumu için 2 mg/l pikloram + 3 mg/l TDZ, bu tomurculardan sürgün oluşumu için ise 0,1 mg/l pikloram + 1 mg/l TDZ içeren MS ortamları önerilmiştir.

Olgun tahıl embriyolarının (kışlık ve yazlık ekmeklik buğdaylar, durum buğdayları, yulaf, arpa ve tritikale) *in vitro* çoklu sürgün oluşturma yeteneklerini belirlemek için yapılan bir denemede (Ganeshan *et al.* 2006), farklı seviyelerde TDZ ve/veya BAP içeren kültür ortamları denenmiştir. Buğday genotipleri arasında durum buğdayının 4,5  $\mu\text{M}$  (1 mg/l) TDZ ve 4,4  $\mu\text{M}$  (1mg/l) BAP içeren kültür ortamında eksplant başına 35 adet sürgün ile en yüksek sürgün sayısına sahip olduğunu, TDZ'nin tek başına kullanıldığı ortamlarda ise rejenerasyon sürgün sayısının eksplant başına 27-32 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar üç kışlık buğday genotipinin rejenerasyon frekansının 11-25 arasında olduğunu ve en yüksek ortalama rejenerasyon frekansının 9,1  $\mu\text{M}$  (2 mg/l) TDZ ve 4,4  $\mu\text{M}$  (1 mg/l) BAP içeren ortamda meydana geldiğini belirtmişlerdir. Denemede olgun embriyolardan doğrudan çoklu sürgün oluşumu için TDZ'nin tek başına ya da BAP ile kombinasyonun kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Yine Shan *et al.* (2000), TDZ'nin buğday ve arpanın *in vitro* rejenerasyonu için tek başına yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Gairi and Rashid (2004), çeltikte karyopsisten elde edilen kalluslardan sürgün rejenerasyonu için TDZ'nin BAP'tan daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Rashid (2002) ise monokotiledonlarda embriyogenik kallus kültüründen sürgün rejenerasyonu için TDZ'nin dikotilidenlere göre daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Shan *et al.* (2000), buğdayda yazlık Bobwhite ve Hi-Line genotiplerinin olgunlaşmamış embriyolarından elde ettikleri kallusları TDZ'nin 6 farklı konsantrasyonunu (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0 ve 10,0 mg/l) içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Her iki genotip için de en yüksek bitki rejenerasyonunun 0,2 mg/l TDZ içeren MS ortamında meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmanın devamında, bitki rejenerasyon ortamında en iyi olarak belirlenen 0,2 mg/l TDZ içeren bitki rejenerasyon ortamı, olgunlaşmamış embriyo kültüründe yağın olarak kullanılan 3 farklı rejenerasyon ortamıyla (0,01mg/l 2,4-D; 0,5 mg/l dikamba ve 1mg/l kinetin + 1mg/l IAA) karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucunda en yüksek bitki rejenerasyonu 0,2 mg/l TDZ içeren rejenerasyon ortamında kaydedilmiştir.

Birçok çalışmada eksplantın önce kısa süre oksin içeren ortamda kültüre alınması daha

sonra hormonsuz ortama aktarılmasıyla rejenerasyon sağlanmıştır. Nitekim Özgen *et al.* (1996, 1998) tarafından buğdayda endosperm destekli olgun embriyo kültüründe yapılan bir çalışmada meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonu için hormonsuz MS ortamı kullanılmıştır. Yine, Krysiak *et al.* (1999), partikül bombardımanı aracılığıyla gen aktarımı çalışmasında Chinese sprin buğday genotiplerinin olgun embriyolarını kullanmışlardır. Olgun embriyoları kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D ve 20 g/l sakkaroz içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Kalluslardan bitki rejenerasyonu için ise hormonsuz MS ortamını kullanmışlardır.

Buğdayın ‘Minaret’ genotipine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı için olgun embriyodan elde ettikleri parçaları kullanan Delporte *et al.* (2005), kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D, 100 mg/l kazein hidrolizat, 20 g/l sakkaroz içeren MS ortamını, bitki rejenerasyonu için ise hormonsuz 1/2 MS ortamını kullanmışlardır.

Sekiz buğday genotipinin kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon kapasitesini belirlemek amacıyla eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış embriyoları kullanan Haliloğlu and Baenzinger (2005) kalluslardan bitki rejenerasyonu için hormonsuz MS ortamını denemişlerdir. Aynı şekilde, buğdayda olgunlaşmamış embriyo kültüründe çalışan Satyavathi *et al.* (2004) rejenerasyon için kallusları hormonsuz MS ortamında kültüre almışlardır.

Abumhadi *et al.* (2005) kışlık ve yazlık arpa genotiplerinin (PV101, Ruen, Emon ve Panagon) olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarının kültüründe, olgunlaşmış embriyodan kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D, kallus oluşumunun devamlılığı için 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP ve bitki rejenerasyonu için ise hormonsuz MS ortamlarını kullanmışlardır.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

Bu çalışma üç aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada (olgun embriyo kültürü için uygun yöntemin belirlenmesi aşaması) Doğu Anadolu Bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen Kırık ve Doğu 88 buğday çeşitleri ile olgun embriyo kültürüne tepkisi iyi olan (Koyuncu 2008) Bezostaja-1 ve Kate A-1 buğday çeşitlerinin olgun embriyoları kullanılmış ve 12 farklı yöntem karşılaştırılmıştır. İkinci aşamada (sitokinlerin bitki rejenerasyonu üzerine olan etkisinin belirlenmesi aşaması), birinci aşamada kullandığımız buğday çeşitleri birinci aşama sonunda bitki rejenerasyonu bakımından en iyi olarak belirlenen 9 nolu yöntemdeki kallus ortamında kültüre alınmış ve meydana gelen kalluslar 3 farklı sitokin tipinin (TDZ, kinetin ve BAP) 3 değişik miktarını (0,5; 1,0 ve 1,5 mg/l) içeren biri kontrol olmak üzere toplam 10 farklı rejenerasyon ortamında kültüre alınmış ve bitki rejenerasyonu için en uygun sitokin tipi ve dozu belirlenmiştir. Üçüncü aşamada (farklı buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlenmesi aşaması) ise ülkemizde tescil edilmiş 78 ekmeklik ve 13 makarnalık buğday çeşidinin, olgun embriyoları birinci ve ikinci aşama sonunda belirlenen ortamlarda kültüre alınmış ve bu çeşitlerin olgun embriyo kültürüne tepkileri belirlenmiştir.

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Bitki materyali**

Araştırmada, birinci ve ikinci aşamada Doğu Anadolu Bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen Kırık ve Doğu 88 buğday çeşitleri ile olgun embriyo kültürüne tepkisi iyi olan (Koyuncu 2008) Bezostaja-1 ve Kate A-1 buğday çeşitleri, üçüncü aşamada ise Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de verilen ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitleri kullanılmıştır. Çeşitler, Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Bahri Dağdaş Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi

Tarla Bitkileri Bölümü ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü stoklarından temin edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Olgun embriyo kültürüne tepkilerin belirlenmesi aşamasında kullanılan ekmeklik buğday çeşitleri

Sıra No	Çeşit Adı	Sıra No	Çeşit Adı
1	Adana 99	40	Kınacı 97
2	Aksel 2000	41	Kırgız 95
3	Alparslan	42	Kırkpınar 79
4	Atay 85	43	Konya 2002
5	Atlı 2002	44	Kutluk 94
6	Bağcı 2002	45	Lancer
7	Bandırma 97	46	Mızrak
8	Basri Bey 95	47	Momthcl
9	Bayraktar 2000	48	Negev
10	Bolal 2973	49	Nurkent
11	Ceyhan 99	50	Nenehatun
12	Colfiorito	51	Osmaniyem
13	Cumhuriyet 75	52	Palandöken 97
14	Dağdaş 94	53	Pamukova 97
15	Daphan	54	Panda
16	Dariel	55	Pehlivan
17	Demir 2000	56	Sagittario
18	Doğankent 1	57	Selimiye
19	Eser	58	Seri 82
20	Esperia	59	Seyhan 95
21	Flamura-85	60	Sivas 111/33
22	Galil	61	Sultan 95
23	Gelibolu	62	Sürak M. 1593/51
24	Genç 99	63	Tahirova 2000
25	Gerek 79	64	Tekirdağ
26	Golia	65	Türkmen
27	Göksu 99	66	Uzunyayla
28	Gönen 98	67	Yakar 99
29	Guadalupe	68	Yayla 305
30	Gün 91	69	Yıldırım
31	Hawk	70	Yıldız 98
32	Haymana 79	71	Yunak
33	İkizce 96	72	Yüreğir 89
34	İzmir 85	73	Zencirci 2002
35	Karacabey 97	74	Ziyabey 98
36	Karacadağ 98	75	Kirik
37	Karahan 99	76	Doğu 88
38	Karasu 90	77	Bezostaja-1
39	Kaşif Bey 95	78	Kate A-1

**Çizelge 3.2.** Olgun embriyo kültürüne tepkilerin belirlenmesi aşamasında kullanılan makarnalık buğday çeşitleri

Sıra No	Çeşit Adı	Sıra No	Çeşit Adı
1	Altın 40/98	8	Kızıltan 91
2	Altıntaç 95	9	Kunduru 1149
3	Ankara 98	10	Mirzabey 2000
4	Çakmak 79	11	Salihli 92
5	Çeşit 1252	12	Selçuklu 97
6	Ege 88	13	Yılmaz 98
7	Gediz 75		

### 3.1.2. Sterilizasyonda kullanılan kimyasallar

Sterilizasyon için %70'lik etil alkol ve %1'lik sodyum hipoklorit kullanılmıştır.

### 3.1.3. Birinci aşamada kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar

Bu aşamada buğdayda olgun embriyo kültürü için kullanılabilen en uygun yöntem belirlenmiştir. Bu amaçla kallus oluşum ortamında ve bitki rejenerasyon ortamında kullanılan kimyasallar ayrı ayrı belirlenmiştir.

#### 3.1.3.a Kallus kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar

Kallus kültür ortamlarında temel besi ortamı olarak tüm yöntemlerde Murashige ve Skoog (1962) tuzları [Sigma M5524] (Çizelge 3.3), vitamin olarak 11 nolu yöntemde B5 vitamini [Sigma G1019] (Çizelge 3.4), diğer yöntemlerde ise MS vitamini [Sigma M3900] (Çizelge 3.5) kullanılmıştır. Tüm yöntemlerin kallus oluşum ortamlarında kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

### 3.1.3.b. Bitki rejenerasyonu ortamlarında kullanılan kimyasallar

Rejenerasyon aşamasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.7'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** MS tuzlarının kimyasal bileşimleri ve miktarları

<b>KİMYASAL BİLEŞİMİ</b>	<b>Miktarı (mg/l)</b>
<b>Makro elementler</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub>	332,2
MgSO <sub>4</sub>	180,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Mikro elementler</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	37,26
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O	27,8
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025

**Çizelge 3.4.** B5 vitaminin kimyasal bileşimleri ve miktarları

<b>KİMYASAL BİLEŞİMİ</b>	<b>Miktarı (mg/l)</b>
<i>Myo</i> -inositol	100
Nikotonik asit	1,0
Pridoksin-HCl	1,0
Tiamin-HCl	10

**Çizelge 3.5.** MS vitaminin kimyasal bileşimleri ve miktarları

<b>KİMYASAL BİLEŞİMİ</b>	<b>Miktarı (mg/l)</b>
Glisin	2
<i>Myo</i> -inositol	100
Nikotonik asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Tiamin-HCl	0,1

**Çizelge 3.6.** Kallus oluşum aşamasında (birinci aşama) kullanılan kimyasallar ve miktarları

KİMYASALLAR	YÖNTEMLER											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MS Tuzları <sup>1</sup>	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l
MS Vitamin (1000x) <sup>2</sup>	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	-	1 ml/l
B5 Vitamin (1000x) <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1ml/l	-
Agar <sup>1</sup>	-	7 g/l	-	-	-	-	-	-	7 g/l	-	7 g/l	7 g/l
Phytigel <sup>1</sup>	2 g/l	-	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	-	2,5 g/l	-	-
Sakkkaroz <sup>1</sup>	20 g/l	20 g/l	-	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	30 g/l	20 g/l
Maltoz <sup>1</sup>	-	-	40 g/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-D	2,5 mg/l	8 mg/l	0,5 mg/l	-	-	-	-	2 mg/l	-	-	-	-
Dikamba	-	-	-	4 mg/l	4 mg/l	4 mg/l	4 mg/l	-	12 mg/l	4 mg/l	4 mg/l	8 mg/l
Pikloram	-	-	2,2mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IAA	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5 mg/l	-	-	-
L-Glutamin <sup>2</sup>	-	-	0,5 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l	0,5 g/l	-	-	5 mg/l	0,3 g/l	-
Kazein hidrolizat <sup>2</sup>	-	-	0,1 g/l	0,1 g/l	0,1 g/l	0,1 g/l	0,1 g/l	0,2 mg/l	-	1 mg/l	0,5 g/l	-
Magnezyum klorür <sup>1</sup>	-	-	0,75 g/l	0,75 g/l	0,75 g/l	0,75 g/l	0,75 g/l	-	-	-	-	-
MES <sup>1</sup>	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l
Askorbik Asit (50 mg/l) <sup>2</sup>	-	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	-	-	-	-	-
Myo-inositol <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	0,2 mg/l	-	-	-	-
Glisin <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 mg/l	-

<sup>1</sup>:Isı ile bozulmayan maddeler

<sup>2</sup>: Isı ile bozulan maddeler

**Çizelge 3.7.** Bitki rejenerasyonu aşamasında (birinci aşama) kullanılan kimyasallar ve miktarları

KİMYASALLAR	YÖNTEMLER											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MS Tuzları <sup>1</sup>	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l	4,43 g/l
MS Vitamin (1000X) <sup>2</sup>	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l	-	1 ml/l
B5 Vitamin (1000X) <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 ml/l	-
Agar <sup>1</sup>	-	7 g/l	-	-	-	-	-	-	7 g/l	-	7 g/l	7 g/l
Phytigel <sup>1</sup>	2 g/l	-	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	-	2,5 g/l	-	-
Sakkkaroz <sup>1</sup>	20 g/l	20 g/l	-	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	20 g/l	30 g/l	20 g/l
Maltoz <sup>1</sup>	-	-	40 g/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dikamba	-	-	-	0,01 mg/l	0,01 mg/l	-	-	-	-	0,01 mg/l	-	-
L-Glutamin <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 mg/l	0,3 g/l	-
Kazein hidrolizat <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	0,2 g/l	-	1 mg/l	0,5 g/l	-
MES <sup>1</sup>	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l	1,95 g/l
Askorbik Asit (50 mg/l) <sup>2</sup>	-	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	-	-	-	-	-
Myo-inositol <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	0,1 g/l	-	-	-	-
Glisin <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 mg/l	-
BAP	-	-	-	0,5 mg/l	0,5 mg/l	-	-	0,5 mg/l	-	0,5 mg/l	-	-
TDZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 mg/l	-
NAA	-	-	-	-	-	-	-	0,02 mg/l	-	-	-	-

<sup>1</sup>:Isı ile bozulmayan maddeler

<sup>2</sup>: Isı ile bozulan maddeler

### **3.1.4. İkinci aşamada kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar**

İkinci aşamada çeşitli sitokinin tiplerinin bitki rejenerasyonu üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Bu aşamada kallus oluşum ortamı olarak, birinci aşama sonucunda bitki rejenerasyonu bakımından en iyi olduğu belirlenen 9 nolu yöntemin (Çizelge 3.6) ve bitki rejenerasyon ortamı olarak ise aynı yöntemin bitki rejenerasyon ortamında kullanılan kimyasalları (Çizelge 3. 7) ve ilave olarak TDZ, kinetin ve BAP sitokininleri kullanılmıştır.

### **3.1.5. Üçüncü aşamada kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar**

Kallus oluşum ortamı olarak 9 nolu yöntemin kallus oluşum ortamı, bitki rejenerasyon ortamı olarak ise ikinci aşama sonucunda rejenerasyon bakımından en iyi olduğu belirlenen 1 nolu yönteme ait ortam kullanılmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Aşamaların uygulanışı**

Bu çalışma üç aşamada yürütülmüştür. Bu aşamaların uygulanışı aşağıda verilmiştir.

#### **3.2.1.a. Birinci aşamanın uygulanışı**

Bu aşamada Doğu Anadolu Bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen Kırık ve Doğu 88 buğday çeşitleri ile daha önce olgun embriyo kültürüne tepkisi iyi olduğu saptanan (Koyuncu 2008) Bezostaja-1 ve Kate A-1 buğday çeşitlerinin olgun embriyoları yöntemlere göre endosperm destekli ve endosperm desteksiz olmak üzere iki farklı şekilde kullanılmıştır. Bu genotiplerden alınan embriyolar kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu bakımından 12 farklı yöntem uygulanarak karşılaştırılmış ve daha sonra

rejenerasyon etkinliği bakımından en iyi olan yöntem belirlenmiştir. Bu aşamada her petri bir tekerrür olarak kabul edilmiş ve her petri kutusuna 9 ve 10 nolu yöntemde 10 adet, diğer yöntemler için 20 adet olgun embriyo bırakılmıştır. Bu yöntemlerde kullanılan eksplant sayısındaki farklılıklar, referans alınan araştırıcıların uyguladıkları yöntemlerde kullandıkları eksplant sayısının farklı olmasından kaynaklanmıştır. Çalışma tam şansa bağlı deneme planına göre 4 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Aydınlatma kaynağı olarak floresan lambası kullanılmış ve ışık yoğunluğu  $62 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  olarak ayarlanmıştır. Tüm yöntemler için rejenerasyon sonunda meydana gelen bitkiler yaklaşık 10-12 cm oluncaya kadar MS tuzlarına ve vitaminlerine ilave olarak 20 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar içeren meganta kutularında büyütülmüştür. Bu çalışmada uygulanan yöntemler çeşitli araştırıcılar tarafından kullanılan yöntemlerin (Varshney *et al.* 1999; Li *et al.* 2003; Mendoza and Kaepler 2002; Patnaik and Khurana 2003; Haliloğlu and Baenzinger 2005; Aydın 2006; Filippov *et al.* 2006; Ahmet ve Adak 2007) modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur. Bu yöntemlerin uygulanışı aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

**1. Yöntem** : Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılmış ve MS ortamına ilave olarak 2,5 mg/l 2,4-D, 2 g/l phytigel, 20 g/l sakkaroz ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için hormonsuz kallus oluşum ortamında  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

**2. Yöntem** : Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılmış ve MS ortamına ilave olarak 8 mg/l 2,4-D, 7 g/l agar, 20 g/l sakkaroz ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için hormonsuz kallus oluşum ortamında  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

**3. Yöntem** : Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılmış ve MS ortamına ilave olarak 0,5 mg/l 2,4-D, 2,2 mg/l pikloram, 0,75 g/l magnezyum klorür, 2 g/l phytigel, 40g/l maltoz, 0,5 g/l L-glutamin, 0,1 g/l

kazein hidrolizat, 2 ml askorbik asit (50 mg/ml) ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için MS ortamına ilave olarak 2 g/l phytigel, 40 g/l maltoz, 2 ml askorbik asit (50 mg/ml) ve 1,95 g/l MES içeren ortamda  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

**4. Yöntem** : Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılmış ve MS ortamına ilave olarak 4 mg/l dikamba, 0,75 g/l magnezyum klorür, 2 g/l phytigel, 20 g/l sakkaroz, 0,5 g/l L-glutamin, 0,1 g/l kazein hidrolizat, 2 ml askorbik asit (50 mg/ml) ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 14 gün süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için MS ortamına ilave olarak 0,01 mg/l dikamba, 0,5 mg/l BAP, 2 g/l phytigel, 20 g/l maltoz, 2 ml askorbik asit (50 mg/ml) ve 1,95 g/l MES içeren ortamda  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

**5. Yöntem** : Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılmış ve MS ortamına ilave olarak 4 mg/l dikamba, 0,75 g/l magnezyum klorür, 2 g/l phytigel, 20 g/l sakkaroz, 0,5 g/l L-glutamin, 0,1 g/l kazein hidrolizat, 2 ml askorbik asit (50 mg/ml) ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 21 gün süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için MS ortamına ilave olarak 0,01 mg/l dikamba, 0,5 mg/l BAP, 2 g/l phytigel, 20 g/l maltoz, 2 ml askorbik asit (50 mg/ml) ve 1,95 g/l MES içeren ortamda  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

**6. Yöntem** : Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılmış ve MS ortamına ilave olarak 4 mg/l dikamba, 0,75 g/l magnezyum klorür, 2 g/l phytigel, 20 g/l sakkaroz, 0,5 g/l L-glutamin, 0,1 g/l kazein hidrolizat, 2 ml askorbik asit (50 mg/ml) ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 14 gün süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için hormonsuz MS ortamına ilave olarak 2 g/l phytigel, 20 g/l maltoz, 2 ml askorbik asit (50 mg/ml) ve 1,95 g/l MES içeren ortamda  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

**7. Yöntem** : Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılmış ve MS ortamına ilave olarak 4 mg/l dikamba, 0,75 g/l magnezyum klorür, 2 g/l phytigel, 20 g/l sakkaroz, 0,5 g/l L-glutamin, 0,1 g/l kazein hidrolizat, 2 ml askorbik asit (50 mg/ml) ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 21 gün süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için hormonsuz MS ortamına ilave olarak 2 g/l phytigel, 20 g/l maltoz, 2 ml askorbik asit (50 mg/ml) ve 1,95 g/l MES içeren ortamda  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

**8. Yöntem** : Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılmış ve MS ortamına ilave olarak 2 mg/l 2,4-D, 2 g/l phytigel, 20 g/l sakkaroz, 0,2 g/l kazein hidrolizat, 100 mg/l myo-inositol ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 21 gün süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için 0,5 mg/l BAP ve 0,02 mg/l NAA içeren kallus oluşum ortamında (2 mg/l 2,4-D yok)  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

**9. Yöntem** : Embriyolar tohum üzerinden ayrılmadan 6 parçaya bölünerek kallus oluşumu için MS ortamına ilave olarak 12 mg/l dikamba, 0,5 mg/l IAA, 20 /l sakkaroz, 7 g/l agar ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 21 gün süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için hormonsuz kallus oluşum ortamında  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

**10. Yöntem:** Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılmış ve MS ortamına ilave olarak 4 mg/l dikamba, 2,5 g/l phytigel, 20 g/l sakkaroz, 5 mg/l L-glutamin, 1 mg/l kazein hidrolizat, ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için  $\frac{1}{2}$  MS tuz, MS vitamin, 0,5 mg/l BAP, 0,01 mg/l dikamba, 2,5 g/l phytigel, 20 g/l maltoz, ve 1,95 g/l MES içeren ortamda  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

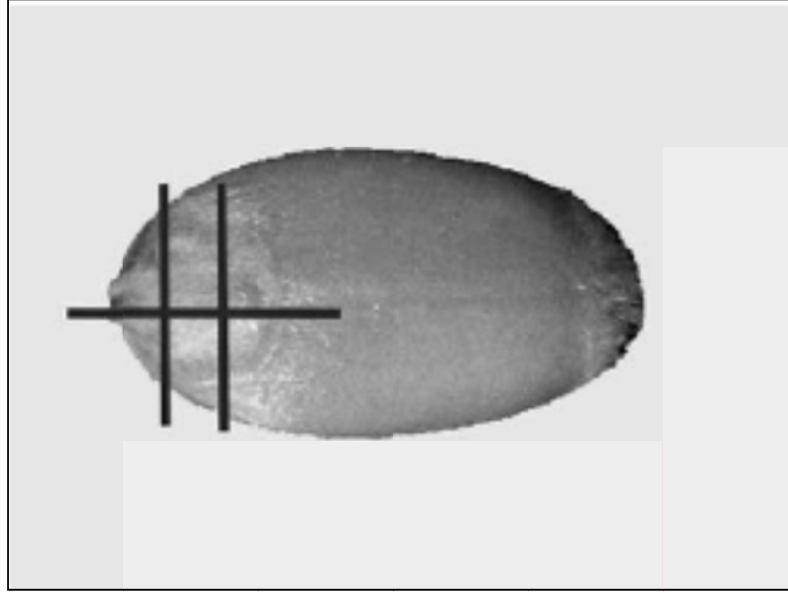
**11. Yöntem:** Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılarak MS tuz ve B5 vitaminlerine ilave olarak 4 mg/l dikamba, 7 g/l

agar, 30 g/l sakkaroz, 300 mg/l L-glutamin, 500 mg/l kazein hidrolizat, 2 mg/l glisin ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Bitki rejenerasyonu için meydana gelen kalluslar oksinsiz kallus oluşum ortamına ilave olarak 1 mg/l TDZ içeren ortamda  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

**12. Yöntem:** Kallus oluşumu için yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlardan olgun embriyolar çıkartılmış ve MS ortamına ilave olarak 8 mg/l dikamba, 7 g/l agar, 20 g/l sakkaroz ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için hormonsuz kallus oluşum ortamında  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 30 gün süreyle tutulmuştur.

### 3.2.1.b. İkinci aşamanın uygulanışı

Bu aşamada birinci aşamada kullandığımız buğday çeşitlerinin tohumları steril edildikten sonra embriyolar tohum üzerinden ayrılmadan 6 parçaya bölünerek (Şekil 3.1) kallus oluşumu için 12 mg/l dikamba ve 0,5 mg/l IAA içeren MS ortamında  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve karanlıkta 21 gün süreyle kültüre alınmış ve meydana gelen kalluslar 3 farklı sitokinin tipinin (TDZ, kinetin ve BAP) 3 değişik miktarını (0,5; 1,0 ve 1,5 mg/l) içeren biri kontrol olmak üzere toplam 10 farklı rejenerasyon ortamında  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 30 gün süreyle tutularak kültüre alınmış ve bitki rejenerasyonu için en uygun sitokinin tipi ve dozu belirlenmiştir. Bu yöntemler ve bu yöntemlerde kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.8'de verilmiştir. Bu aşamada her petri bir tekerrür olarak kabul edilmiş ve her petri kutusuna 10 adet olgun embriyo bırakılmış ve çalışma tam şansa bağlı deneme planına göre 4 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Aydınlatma kaynağı olarak floresan lambası kullanılmış ve yoğunluğu  $62 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  olarak ayarlanmıştır. Rejenerasyon sonunda meydana gelen bitkiler yaklaşık 10-12 cm oluncaya kadar MS tuzlarına ve vitaminlerine ilave olarak 20 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar içeren meganta kutularında büyütülmüştür.



**Şekil 3.1.** Su emdirilmiş tohumun embriyosunun kesim bölgelerinin gösterimi (Filippov *et al.* 2006).

**Çizelge 3.8.** Araştırmanın ikinci aşamasında kullanılan yöntemler

Yöntem	Açıklama
<b>Kontrol :</b>	MS tuzları ve vitaminleri + 20 g/l sakaroz + 7 g/l agar + 1,95 g/l MES
<b>1. Yöntem :</b>	0,5 mg/l TDZ + MS tuzları ve vitaminleri + 20 g/l sakaroz + 7 g/l agar + 1,95 g/l MES
<b>2. Yöntem :</b>	1,0 mg/l TDZ + MS tuzları ve vitaminleri + 20 g/l sakaroz + 7 g/l agar + 1,95 g/l MES
<b>3. Yöntem :</b>	1,5 mg/l TDZ + MS tuzları ve vitaminleri + 20 g/l sakaroz + 7 g/l agar + 1,95 g/l MES
<b>4. Yöntem :</b>	0,5 mg/l BAP + MS tuzları ve vitaminleri + 20 g/l sakaroz + 7 g/l agar + 1,95 g/l MES
<b>5. Yöntem :</b>	1,0 mg/l BAP + MS tuzları ve vitaminleri + 20 g/l sakaroz + 7 g/l agar + 1,95 g/l MES
<b>6. Yöntem :</b>	1,5 mg/l BAP + MS tuzları ve vitaminleri + 20 g/l sakaroz + 7 g/l agar + 1,95 g/l MES
<b>7. Yöntem :</b>	0,5 mg/l Kinetin + MS tuzları ve vitaminleri + 20 g/l sakaroz + 7 g/l agar + 1,95 g/l MES
<b>8. Yöntem :</b>	1,0 mg/l Kinetin + MS tuzları ve vitaminleri + 20 g/l sakaroz + 7 g/l agar + 1,95 g/l MES
<b>9. Yöntem :</b>	1,5 mg/l Kinetin + MS tuzları ve vitaminleri + 20 g/l sakaroz + 7 g/l agar + 1,95 g/l MES

### 3.2.1.c. Üçüncü aşamanın uygulanışı

Bu aşamada birinci ve ikinci aşama sonuçları doğrultusunda ülkemizde tescil edilmiş 78 ekmeklik ve 13 makarnalık buğday çeşidinin olgun embriyoları kültüre alınarak bu çeşitlerin olgun embriyo kültürüne tepkileri belirlenmiştir. Bu aşamada kallus oluşum ortamı olarak birinci aşamadaki 9 nolu yöntemin kallus oluşum ortamı, bitki rejenerasyon ortamı olarak ise ikinci aşama sonucunda rejenerasyon bakımından en iyi olduğu belirlenen ve Çizelge 3.8’de verilen 1 nolu yönteme ait ortam kullanılmıştır. Bu amaçla, tohumlar steril edildikten sonra embriyolar tohum üzerinden ayrılmadan 6 parçaya bölünerek kallus oluşumu için MS ortamına ilave olarak 12 mg/l dikamba, 0,5 mg/l IAA, 20 g/l sakaroz, 7 g/l agar ve 1,95 g/l MES içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de 21 gün süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için 0,5 mg/l TDZ, 20 g/l sakaroz, 7 g/l agar ve 1,95 g/l MES içeren MS ortamında  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 30 gün süreyle tutulmuştur. Bu aşamada her petri bir tekerrür olarak kabul edilmiş ve her petri kutusuna 10 adet olgun embriyo bırakılmış ve çalışma tam şansa bağlı deneme planına göre 4 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Aydınlatma kaynağı olarak floresan lambası kullanılmış ve ışık yoğunluğu  $62 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  olarak ayarlanmıştır. Rejenerasyon sonunda meydana gelen bitkiler yaklaşık 10-12 cm oluncaya kadar MS tuzlarına ve vitaminlerine ilave olarak 20 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar içeren meganta kutularında büyütülmüştür.

### 3.2.2. Sterilizasyon teknikleri

#### 3.2.2.a. Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu

Steril çalışma alanında kullanılan yüzeyler (steril kabin içi) kullanımdan en az 10–15 dakika önce %70’lik etil alkolle silinmiş ve UV lambası açılmıştır. Kültüre alma işlemi başlamadan önce UV lambası kapatılmıştır. Kullanılan aletler (bisturi, pens vb.) kullanımdan önce etil alkol içine batırıldıktan sonra alev lambasında alevle yüzey

sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Eksplantların kesimi alüminyum folyo içine sarılarak otoklav edilmiş 10 x 15 cm boyutlarındaki kurutma kâğıtları üzerinde yapılmıştır.

### **3.2.2.b. Tohumların yüzey sterilizasyonu**

Tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik etil alkolde 5 dakika karıştırılarak steril kabin içersinde 3 defa steril saf suyla yıkanmıştır. Daha sonra birkaç damla Tween 20 (Sigma) içeren %1'lik sodyum hipokloritte 25 dakika karıştırılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar steril saf suyla yıkandıktan sonra bir gece (yaklaşık 16-17 saat) steril su içersinde 4°C'de karanlıkta bekletilmiş ve ardından olgun embriyolar kültüre alınmıştır.

### **3.2.2.c. Besi ortamının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu**

Besi ortamları sterilizasyon için otoklavda 20 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de tutulmuştur. Sıcakta bozulan vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicilerinin tamamı için 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreler (milipor) kullanılmıştır.

### **3.2.2.d. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı**

**%70'lik Etil alkolün hazırlanışı:** %96'lık etil alkolden 729 ml alınarak hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

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

### 3.2.3. Kùltür ortamlarının hazırlanışı

Kùltür ortamları için öncelikle kullanılan oksinlerin ve sitokininlerin stok solusyonu hazırlanmıştır. Oksinlerin ve sitokininlerin stok solüsyonlarının hazırlanmasında çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasallar ile saklama sıcaklıkları ve çalışma konsantrasyonları Çizelge 3.9'da verilmiştir.

**Çizelge 3.9.** Oksinlerin ve sitokininlerin stok solusyonlarının hazırlanmasında çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasallar ile saklama sıcaklıkları ve çalışma konsantrasyonları

Bitki Büyüme Düzenleyicisi	Çözücü	Seyreltici	Saklama koşulu	Çalışma konsantrasyonu
<b>Oksin</b>				
2,4-D	Etil alkol	Su	+4°C	1 mg/ml
Dikamba	Su / Etil alkol	Su	+4°C	1 mg/ml
Pikloram	Dimetil sülfoksit	Su	+4°C	1 mg/ml
IAA	Etil alkol	Su	-0°C	1 mg/ml
NAA	1N NaOH	Su	+4°C	1 mg/ml
<b>Sitokinin</b>				
BAP	1N NaOH	Su	+4°C	1 mg/ml
Kinetin	1N NaOH	Su	-0°C	1 mg/ml
TDZ	Dimetil sülfoksit	Su	+4°C	1 mg/ml

#### 3.2.3.a. Kallus ve bitki rejenerasyon ortamlarının hazırlanışı

Kallus oluşum ve bitki rejenerasyon ortamını hazırlamak için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. 2 litrelik bir behere 500 ml bidistile su konulmuştur.
2. Uygulanan yönteme ve ortama göre kullanılan ve ısıda bozulmayan kimyasallardan Çizelge 3.6 veya Çizelge 3.7'de verilen miktarlarda tartılıp eriyinceye kadar karıştırılmıştır.
3. Dereceli silindire aktarılmış ve hacmi bidistile su ile 985 ml'ye tamamlanmıştır.
4. Beherdeki kimyasallar tamamen çözününce manyetik karıştırıcı üzerinde 1N NaOH solüsyonu kullanılarak pH=5,8'e ayarlanmıştır.
5. Uygulanan yönteme ve ortama göre kullanılan jel yapıcı madde [phytagel veya agar

(Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’de verilen miktarlarda)] içeren erlene boşaltılıp otoklavda 20 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C’de sterilizasyona tabi tutulmuştur.

6. Isı ile bozulabilen maddeler otoklavdan sonra ilave edilmiştir. Bunun için 50 ml beher içerisine uygulanan yönteme ve ortama göre kullanılan kimyasallardan Çizelge 3.6 veya Çizelge 3.7’de verilen miktarlarda tartılıp eklenmiş ve hacim bidistile su ile 15 ml’ye tamamlanarak karıştırılmıştır. Daha sonra 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtrelerden geçirilerek otoklavlanmış ve 50°C’ye kadar soğutulan ortama eklenmiştir.

7. Bitki büyüme düzenleyicilerinin tamamı milipordan geçirilip, sterilize edildikten sonra ısı ile bozulan maddelerle birlikte eklenmiştir.

### 3.2.4. Araştırmada incelenen karakterler

Araştırmanın birinci ve üçüncü aşamasında kallus oluşum oranı (%), embriyogenik kallus oluşum oranı (%) (eksplant ve kallus sayısına göre), cevap veren embriyogenik kallus oranı (%) (eksplant, kallus ve embriyogenik kallus sayısına göre) ve rejenerasyon etkinliğine (adet) ait karakterler incelenmiştir. İkinci aşamada ise kallus oluşum ortamında standart ortam kullanıldığı için bu aşamada sadece cevap veren embriyogenik kallus oranı (%) ile rejenerasyon etkinliğine (adet) ait karakterler incelenmiştir. Kallus oluşum oranı (%) ve embriyogenik kallus oluşum oranı kallusların bitki rejenerasyon ortamına aktarılmadan önce, cevap veren embriyogenik kallus oranı ve rejenerasyon etkinliği rejenerasyon ortamında 1 ay süreyle bekletildikten sonra belirlenmiştir.

**1. Kallus oluşum oranı (%):** Kallus oluşum oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Kallus oluşum oranı (\%)} = (\text{Oluşan kallus sayısı} / \text{Kültüre alınan eksplant sayısı}) \times 100$$

**2. Embriyogenik kallus oluşum oranı (%):** Embriyogenik kallus, sert dokulu, dağılabilir özellikte, sıkı (pütürlü) yapılı ve embriyo oluşturma kapasitesine sahip kalluslardır. Eksplant ve kallus sayısına göre hesaplanmıştır.

**2.a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (ESEKO) oranı (%):**

ESEKO oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{ESEKO oranı (\%)} = (\text{Embriyogenik kallus sayısı} / \text{Eksplant sayısı}) \times 100$$

**2.b. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (KSEKO) oranı (%):**

KSEKO oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

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

**3. Cevap veren embriyogenik kallus oranı (%):** Eksplant sayısına, eksplantlardan meydana gelen kallus sayısına ve meydana gelen embriyogenik kallus sayısına göre aşağıdaki belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

**3.1. Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı (%):**

ESCEK oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{ESCEK oranı (\%)} = (\text{Cevap veren embriyogenik kallus sayısı}^* / \text{Eksplant sayısı}) \times 100$$

**3.2. Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (KSCEK) oranı (%):**

KSCEK oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{KSCEK oranı (\%)} = (\text{Cevap veren embriyogenik kallus sayısı}^* / \text{Kallus sayısı}) \times 100$$

**3.3. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCEK) oranı (%):** EKSCEK oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

EKSCEK oranı (%) = (Cevap veren embriyogenik kallus sayısı\* / Embriyogenik kallus sayısı) x 100

**4. Rejenerasyon etkinliği (Adet):** Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

RE= Rejenere bitki sayısı / Cevap veren embriyogenik kallus sayısı\*

\*: Kök ve sürgüne sahip bitkicik meydana getiren embriyogenik kallus sayısı

### 3.2.5. Verilerin istatistiksel analizi

Bu araştırma kapsamında birinci aşamada (olgun embriyo kültürü için uygun yöntemin belirlenmesi aşaması) çeşidin (Kirik, Bezostaja-1, Kate A-1 ve Doğu 88) ve yöntemlerin (12 farklı yöntem) kallus oluşumuna, embriyogenik kallus oluşumuna, cevap veren embriyogenik kallus oranına ve rejenerasyon etkinliğine olan etkileri araştırılmıştır. Bu karakterlere ait veriler 4x12 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. İkinci aşamada (sitokinlerin bitki rejenerasyonu üzerine olan etkisinin belirlenmesi aşaması) çeşidin (Kirik, Bezostaja-1, Kate A-1 ve Doğu 88), farklı sitokinin tipleri (TDZ, kinetin ve BAP) ve dozlarını (0,5; 1,0 ve 1,5 mg/l) içeren biri kontrol olmak üzere 10 farklı yöntemin cevap veren embriyogenik kallus oranı ve rejenerasyon etkinliğine ait etkileri araştırılmıştır. Karakterlere ait veriler 4x10 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Üçüncü aşamada (farklı buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlenmesi aşaması) genotiplerin kallus oluşum oranına, embriyogenik kallus oluşum oranına, cevap veren embriyogenik kallus oranına ve rejenerasyon etkinliğine olan etkileri tam şansa bağlı deneme planına göre Genel Linear modelde varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Birinci ve ikinci aşamadaki karakterlerde çeşit ve yöntemlere ait ortalamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile, üçüncü aşamadaki karakterlerde çeşitlere ait ortalamalar arasındaki farklar ise %5 önem seviyesinde Fisher's Protected

LSD (Least Significant Difference) çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Her üç aşamada da incelenen karakterler arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon katsayısı ile ifade edilmiştir. İstatistik analizler SAS System for Windows 9.0 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır.

#### **4. ARAŞTIRMA BULGULARI**

Bu araştırma üç aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada (olgun embriyo kültürü için uygun yöntemin belirlenmesi aşaması) 12 farklı yöntem karşılaştırılmıştır. İkinci aşamada (sitokininlerin bitki rejenerasyonu üzerine olan etkisinin belirlenmesi aşaması), buğday genotiplerinin olgun embriyoları birinci aşama sonunda bitki rejenerasyonu bakımından en iyi olarak belirlenen 9 nolu yöntemdeki kallus ortamında kültüre alınmış ve meydana gelen kalluslar 3 farklı sitokinin tipinin (TDZ, Kinetin ve BAP) 3 değişik miktarını (0,5; 1,0 ve 1,5 mg/l) içeren biri kontrol olmak üzere toplam 10 farklı rejenerasyon ortamında kültüre alınmış ve bitki rejenerasyonu için en uygun sitokinin tipi ve dozu belirlenmiştir. Üçüncü aşamada (farklı buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlenmesi aşaması) ise ülkemizde tescil edilmiş 78 ekmeklik ve 13 makarnalık buğday çeşidinin, olgun embriyoları birinci ve ikinci aşama sonunda belirlenen ortamlarda kültüre alınmış ve bu çeşitlerin olgun embriyo kültürüne tepkileri belirlenmiştir. Bu aşamalarda incelenen karakterlere ait araştırma bulguları aşağıda verilmiştir.

##### **4.1. Birinci aşama**

###### **4.1.1. Kallus oluşum oranı**

Kallus oluşum oranı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda çok önemli ( $p<0,01$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.1). Kallus oluşum oranı bakımından ilk sırayı ortalama %98,5 ile Bezostaja-1 çeşidi alırken, bu özellik bakımından son sırada %96,7 ile Kate A-1 çeşidi yer almıştır. Bu oran, Kırık ve Doğu 88 çeşitlerinde %98,4 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1). Ancak Kırık, Doğu 88 ve Bezostaja -1 çeşitleri arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur.

**Çizelge 4.1.** Kallus oluşum oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Yöntem	11	79,356	10,388	0,000 **
Çeşit	3	39,236	5,136	0,002 **
Yöntem x Çeşit	33	59,312	7,764	0,000 **
Hata	144	7,639		
Genel Toplam	191			

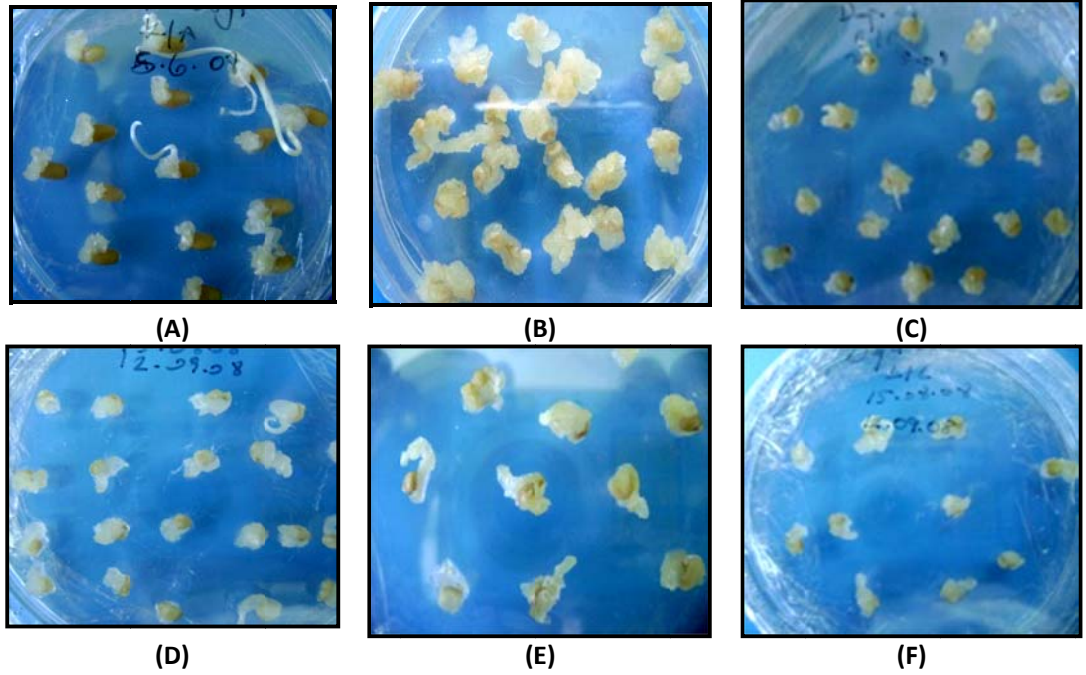
\*\* : Çok önemli (p<0,01)

Diğer taraftan ortalama kallus oluşum oranı bakımından yöntemler arasındaki farklılıklar (p<0,01) çok önemli olmuştur (Çizelge 4.1). En yüksek ortalama kallus oluşum oranı (%100) 6, 7, 9 ve 10 nolu yöntemlerden, en düşük (%91,9) ise 8 nolu yöntemden elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Yöntemlere ve çeşitlere göre kallus oluşum oranları (%)<sup>1</sup>

Yöntemler	Çeşitler ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )				Ortalama
	Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
1	98,8±1,3 <sup>ns</sup> AB	96,3±1,3 <sup>ns</sup>	98,8±1,3AB	97,5±2,5AB	<b>97,8±0,8 AB</b>
2	100±0,0 aA	100±0,0 a	97,5±1,4 abAB	95,0±2,0 bB	<b>98,1±0,8 AB</b>
3	96,3±1,3 <sup>ns</sup> AB	97,5±1,4	98,8±1,3 AB	97,5±2,5AB	<b>97,5±0,8 B</b>
4	91,3±3,2 bC	100±0,0 a	100±0,0 aA	100±0,0 aA	<b>97,8±1,2 AB</b>
5	95,0±2,9 <sup>ns</sup> BC	97,5±1,4	100±0,0 A	100±0,0 A	<b>98,1±0,9 AB</b>
6	100±0,0 <sup>ns</sup> A	100±0,0	100±0,0 A	100±0,0 A	<b>100±0,0 A</b>
7	100±0,0 <sup>ns</sup> A	100±0,0	100±0,0 A	100±0,0 A	<b>100±0,0 A</b>
8	100±0,0 a A	97,5±2,5 a	95,0±2,0 a A	75,0±0,0 bC	<b>91,9±2,7 C</b>
9	100±0,0 <sup>ns</sup> A	100±0,0	100±0,0 A	100±0,0 A	<b>100±0,0 A</b>
10	100±0,0 <sup>ns</sup> A	100±0,0	100±0,0 A	100±0,0 A	<b>100±0,0 A</b>
11	100±0,0 <sup>ns</sup> A	95,0±2,9	95,0±2,9 B	98,8±1,3 AB	<b>97,2±1,1 B</b>
12	100±0,0 <sup>ns</sup> A	97,5±2,5	97,5±1,4 AB	96,3±2,4 AB	<b>97,8±0,9 AB</b>
<b>Ortalama</b>	<b>98,4±0,5 a</b>	<b>98,4±0,5 a</b>	<b>98,5±0,4 a</b>	<b>96,7±1,0 b</b>	

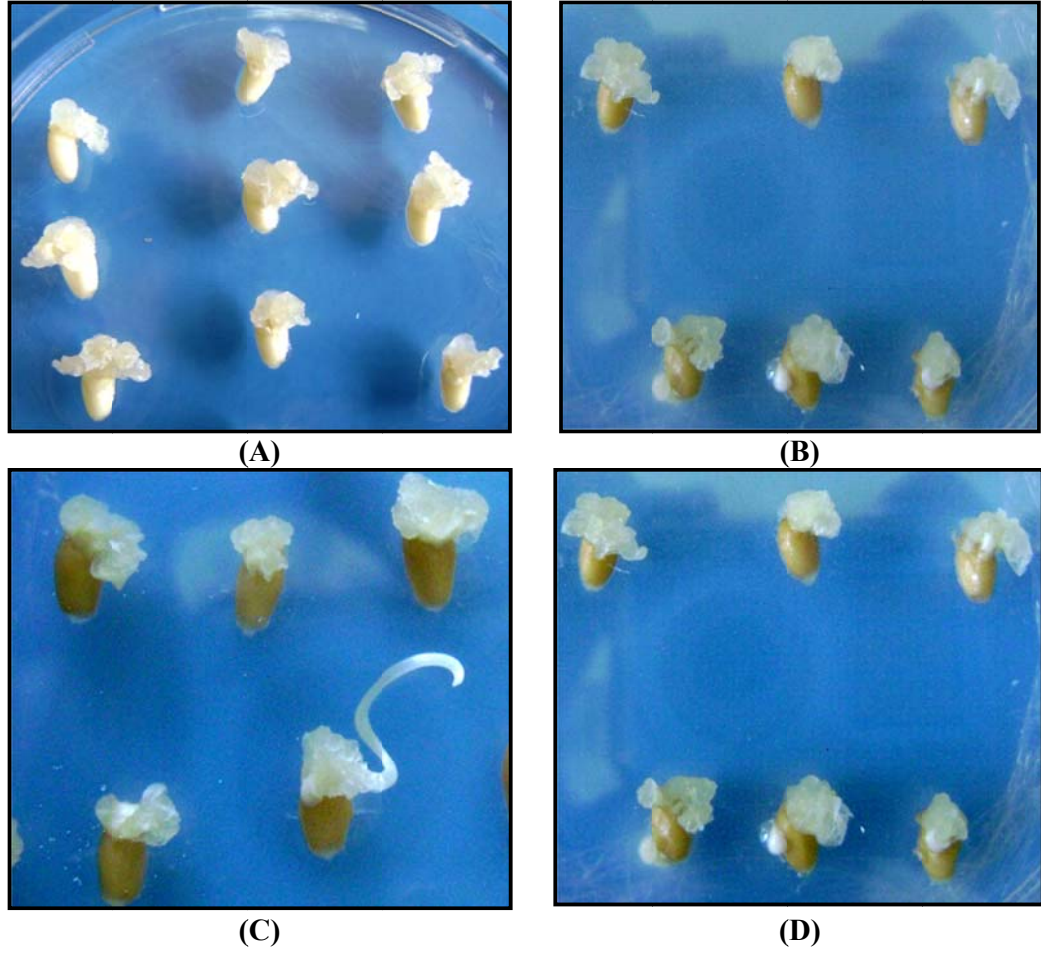
1) Aynı sütunda aynı büyük harfle ve aynı satırda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. Aynı satırda “ns” ve aynı sütunda “NS” ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.



**Şekil 4.1.** Çeşitlerin kallus oluşum ortamında meydana gelen kallusların 15. gündeki görünümü. A) Bezostaja 1 çeşidinin 9 nolu yöntemde kallus oluşumu. B) Kırık çeşidinin 2 nolu yöntemde kallus oluşumu. C) Doğu 88 çeşidinin 2 nolu yöntemde kallus oluşumu. D) Kate A-1 çeşidinin 3 nolu yöntemde kallus oluşumu. E) Bezostaja 1 çeşidinin 4 nolu yöntemde kallus oluşumu. F) Doğu 88 buğday çeşidinin 10 nolu yöntemde kallus oluşumu

Çeşitlerin kallus oluşum oranlarının yöntemlere göre farklılık göstermesi, yöntem x çeşit etkileşiminin çok önemli ( $p < 0,01$ ) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.1). Her yönteme ait ortalama kallus oluşum oranı bakımından çeşitler karşılaştırıldığında 2, 4 ve 8 yöntemlerde çeşitler arasındaki farklılığın önemli ( $p < 0,05$ ) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Kallus oluşum oranı, 6, 7, 9 ve 10 nolu yöntemlerde çeşitlerin tamamında %100 olmuştur (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2).

Kallus oluşum oranı bakımından çeşitlere göre yöntemler karşılaştırıldığında Doğu 88 çeşidi dışındaki çeşitlerde yöntemler arasındaki farklar önemli bulunmuştur. En yüksek kallus oluşumu (%100), Kırık çeşidinde 2, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11 nolu yöntemlerde, Doğu 88 çeşidinde 2, 4, 6, 7, 9 ve 10 nolu yöntemlerde, Bezostaja-1 ve Kate A-1 çeşitlerinde ise 4, 5, 6, 7, 9 ve 10 nolu yöntemlerde meydana gelmiştir.



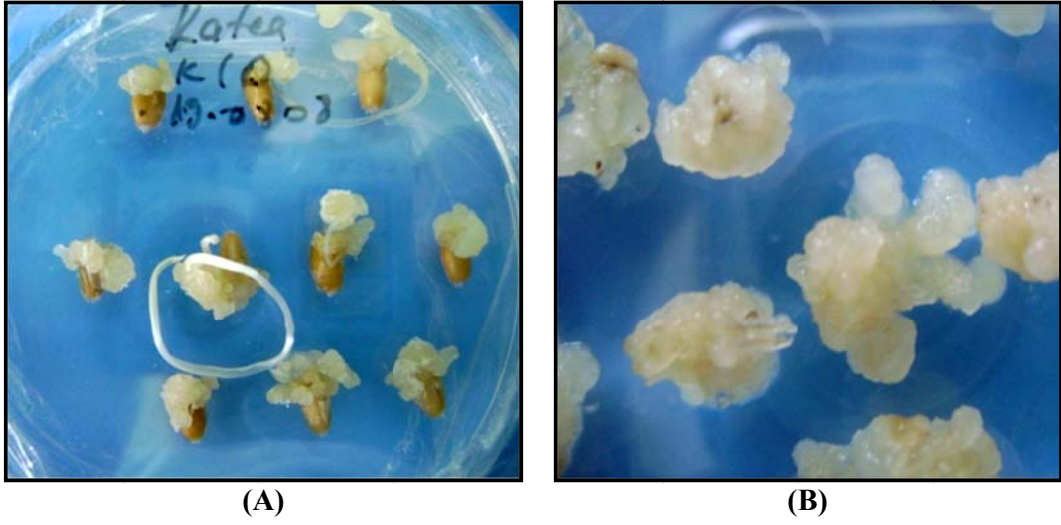
**Şekil 4.2.** 9 nolu yöntemde çeşitlerin kallus oluşum ortamındaki kallusların 14. gündeki görünüşleri A) Kırık, B) Kate A-1, C) Bezostaja-1 ve D) Doğu 88.

#### 4.1.2. Embriyogenik kallus oluşum oranı

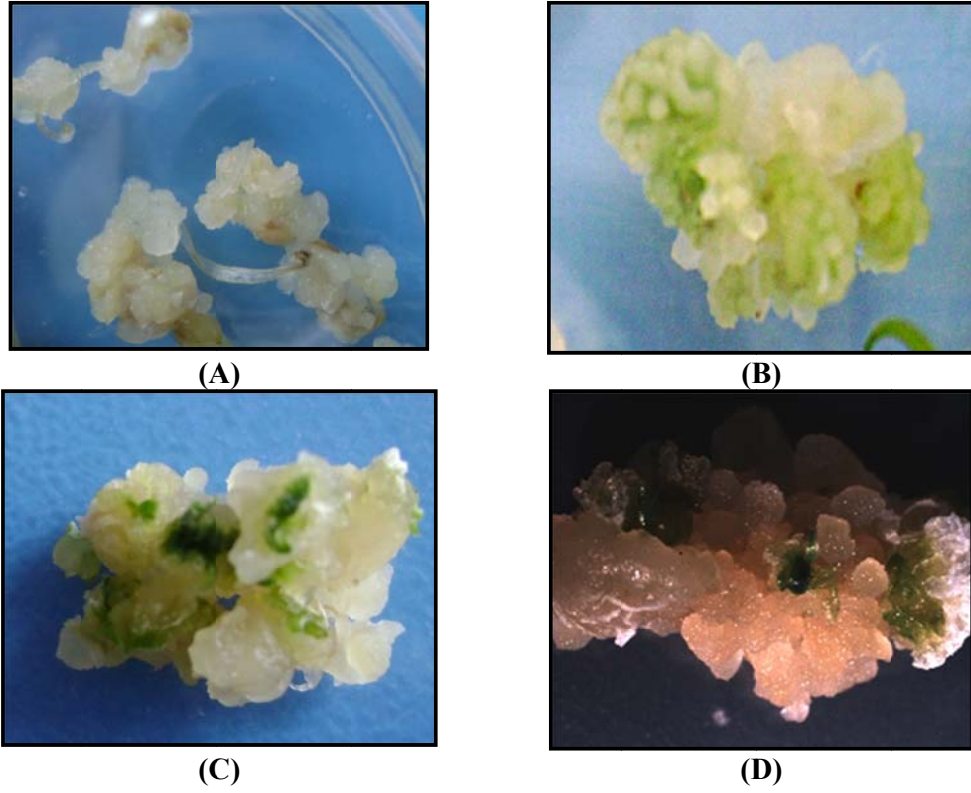
Embriyogenik kallus oluşum oranı kültüre alınan eksplant sayısına göre ve kallus sayısına göre olmak üzere iki şekilde değerlendirilmiştir.

##### 4.1.2.a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (ESEKO) oranı

Sert dokulu, dağılabilir özellikte, sıkı yapılı ve krem renkli kalluslar embriyogenik kallus, beyaz ve sulu yapılı kalluslar ise embriyogenik olmayan kallus olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4).



**Şekil 4.3.** Kate A-1 çeşidinde 9 nolu (A) ve 7 nolu (B) yöntemlerde kallus oluşum ortamında 21. gündeki embriyogenik kallusların görünümü.



**Şekil 4.4.** Kırık buğday çeşidinin 8 nolu yöntemde (A, B) kallus oluşum ortamında 21. gündeki ve 9 (C, D) nolu yöntemde rejenerasyon ortamında 4. gündeki embriyogenik kalluslarının görünüşleri.

ESEKO oranına ilişkin varyans analizi sonuçları ve faktörlere ait ortalama değerler Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’de verilmiştir. Çizelge 4.3 incelendiğinde ESEKO oranına çeşidin etkisinin çok önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0,01$ ). Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranları yönünden çeşitler karşılaştırıldıklarında, Kate A-1 %92,2’lik ortalama ESEKO oranı ile ilk sırada yer almış, bunu sırasıyla Bezostaja-1 (%91,8), Kırık (%88,9) ve Doğu 88 (%88,0) çeşitleri izlemiştir (Çizelge 4.4). Ancak, ortalama ESEKO oranı bakımından Kate A-1 ile Bezostaja-1 ve Kırık ile Doğu 88 aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.3.** ESEKO oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Yöntem	11	742,4	25,7	0,000 **
Çeşit	3	207,6	7,2	0,000 **
Yöntem x Çeşit	33	240,6	8,3	0,000 **
Hata	144	28,9		
Genel Toplam	191			

\*\* : Çok önemli ( $p<0,01$ )

Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranına ilişkin varyans analizi sonuçlarının sunulduğu Çizelge 4.3’ten görüleceği gibi, ESEKO oranı bakımından yöntemler arasındaki farklılıklar çok önemli ( $p<0,01$ ) olmuştur. En yüksek ortalama ESEKO oranı 7 nolu yöntemde (%97,8), en düşük ise 11 nolu yöntemde (%77,5) belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Ayrıca, çeşitlerin ESEKO oranı bakımından yöntemlere tepkileri farklılık gösterdiği için yöntem x çeşit interaksyonu çok önemli ( $p<0,01$ ) çıkmıştır (Çizelge 4.3). Her yöntem için çeşitler ortalama ESEKO oranı bakımından %5 önem düzeyinde karşılaştırıldıklarında 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 ve 12 nolu yöntemlerde çeşitler arasındaki farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Diğer taraftan çeşitlere göre yöntemler karşılaştırıldığında en yüksek ESEKO oranı (%100), Kırık çeşidinde 9 nolu yöntemde, Doğu 88 çeşidinde 4 ve 6 nolu yöntemlerde, Bezostaja-1 çeşidinde 4 ve 5 nolu yöntemlerde, Kate A-1 çeşidinde ise 4, 5, 6 ve 7 nolu yöntemlerde meydana gelmiştir (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** Yöntemlere ve çeşitlere göre ESEKO oranları (%)<sup>1</sup>

Yöntemler	Çeşitler ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ )				Ortalama
	Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
1	97,5±1,4 <sup>ns</sup> AB	90,0±4,6BC	96,3±2,4A	97,5±2,5A	95,3±1,6 B
2	96,3±1,3 aAB	85,0±4,1 bC	96,3±2,4 aA	95,0±2,0 aA	93,1±1,7 B
3	90,0±2,0 aBC	90,0±2,0aBC	87,5±2,5abBC	81,3±2,4bB	87,2±1,4 C
4	85,0±5,4 bCD	100±0,0 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA	96,3±2,1 AB
5	77,5±2,5 bDE	97,5±1,4 aAB	100±0,0 aA	100±0,0 aA	93,8±2,5 AB
6	90,0±3,5 Bbc	100±0,0 aA	95,0±2,0 abAB	100±0,0 aA	96,3±1,4 AB
7	95,0±2,9 <sup>ns</sup> AB	98,8±1,3AB	97,5±1,4A	100±0,0A	97,8±0,9 A
8	91,3±1,3 aBC	91,3±4,3 aBC	85,0±4,6 aCD	67,5±1,4 bC	83,8±2,9 CD
9	100±0,0 aA	90,0±0,0bBC	95,0±2,9abAB	95,0±2,9abA	95,0±1,3 AB
10	90,0±4,1 aBC	67,5±2,5 bD	77,5±4,8 bD	95,0±2,9 aA	82,5±3,2 D
11	80,0±0,0 <sup>ns</sup> DE	72,5±4,3D	77,5±1,4D	80,0±4,3B	77,5±2,0 E
12	73,8±1,3 bE	73,8±1,3 bD	93,8±2,4 aAB	95,0±2,0 aA	84,1±2,8 CD
<b>Ortalama</b>	<b>88,9±1,3 b</b>	<b>88,0±1,7 b</b>	<b>91,8±1,3 a</b>	<b>92,2±1,6 a</b>	

1) Aynı sütunda aynı büyük harfle ve aynı satırda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. Aynı satırda “ns” ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).

#### 4.1.2.b. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (KSEKO) oranı

Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumunda olduğu gibi, kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı bakımından da çeşidin ve yöntemin etkisi çok önemli (p<0,01) olmuştur (Çizelge 4.5). Ortalama kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı en yüksek Kate A-1 (%95,3) çeşidinde belirlenmiş, bunu azalan sıra ile Bezostaja-1 (%93,1), Kırık (%90,3) ve Doğu 88 (%89,4) çeşitleri izlemiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5). Ancak, Kırık ile Doğu 88 çeşitleri arasındaki farklılık önemli olmamıştır.

Ortalama KSEKO oranı bakımından yöntemler karşılaştırıldığında en yüksek KSEKO oranı 4 nolu yöntemden (%98,2) elde edilmiş, ancak 1, 2, 5, 6, 7 nolu yöntemlerle arasındaki farklılık önemsiz olmuş ve Duncan çoklu karşılaştırma testinde aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.6). En düşük ortalama KSEKO oranı, %80,0 ile 11 nolu yöntemden elde edilmiştir (Şekil 4.5). Ancak, 10 ve 11 nolu yöntemler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

**Çizelge 4.5** KSEKO oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Yöntem	11	620,7	23,6	0,000 **
Çeşit	3	347,8	13,2	0,000 **
Yöntem x Çeşit	33	169,1	6,4	0,000 **
Hata	144	26,4		
Genel Toplam	191			

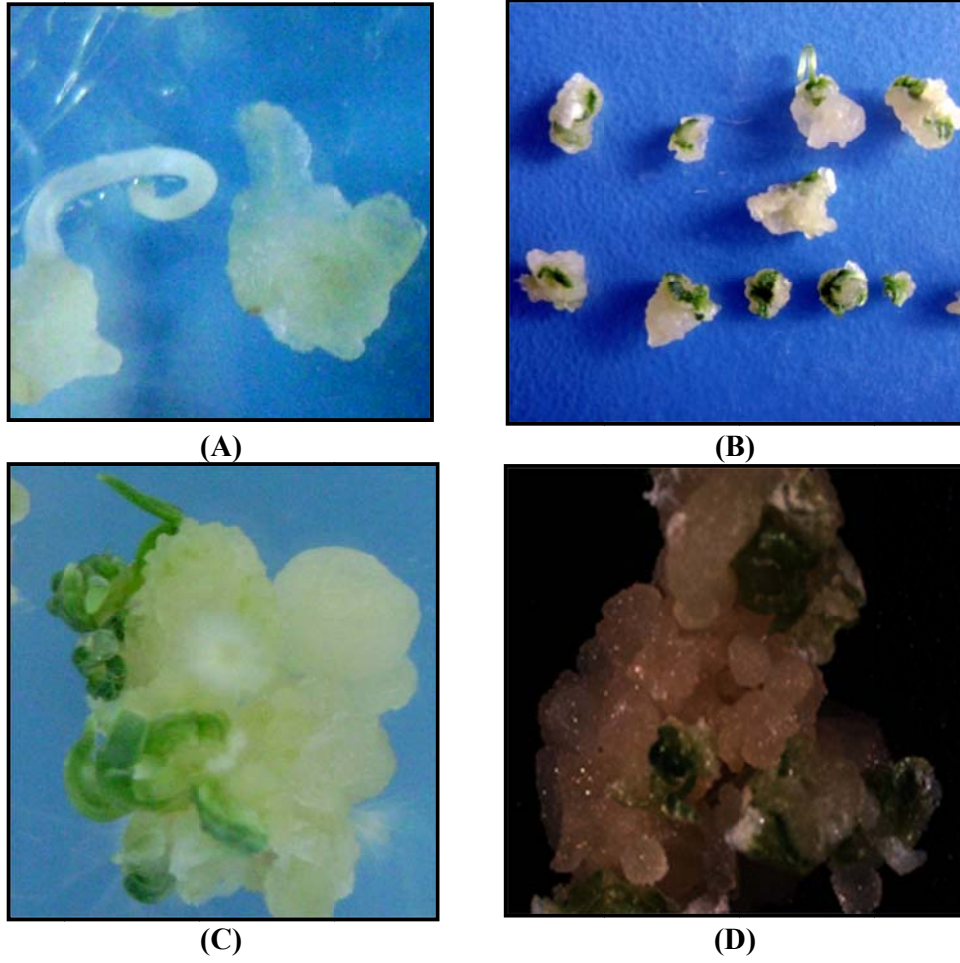
\*\* : Çok önemli (p<0,01).

**Çizelge 4.6.** Yöntemlere ve çeşitlere göre KSEKO oranları (%)<sup>1</sup>

Yöntemler	Çeşitler ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )				Ortalama
	Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
<b>1</b>	98,8±1,3 <sup>ns</sup> A	93,4±4,0AB	97,4±1,5A	100±0,0A	<b>97,4±1,2 A</b>
<b>2</b>	96,3±1,3 aAB	85,0±4,1bB	98,7±1,3 aA	100±0,0 aA	<b>95,0±1,8 A</b>
<b>3</b>	93,5±1,3 aAB	92,3±1,5 aAB	88,6±1,5 abDC	83,5±3,0 bDC	<b>89,5±1,3 BC</b>
<b>4</b>	92,9±2,8bAB	100±0,0aA	100±0,0aA	100±0,0aA	<b>98,2±1,0 A</b>
<b>5</b>	81,7±2,3 bC	100±0,0 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA	<b>95,4±2,1 A</b>
<b>6</b>	90,0±3,5 bB	100±0,0 aA	95,0±2,0 abA-C	100±0,0 aA	<b>96,3±1,4 A</b>
<b>7</b>	95,0±2,9 <sup>ns</sup> AB	98,8±1,3A	97,5±1,4AB	100±0,0A	<b>97,8±0,9 A</b>
<b>8</b>	91,3±1,3 <sup>ns</sup> B	93,5±2,6AB	89,4±3,8B-D	90,0±1,9BC	<b>91,0±1,2 B</b>
<b>9</b>	100±0,0aA	90,0±0,0bB	95,0±2,9abA-C	95,0±2,9abAB	<b>95,0±1,3 A</b>
<b>10</b>	90,0±4,1 aB	67,5±2,5bD	77,5±4,8 bE	95,0±2,9 aAB	<b>82,5±3,2 D</b>
<b>11</b>	80,0±0,0 <sup>ns</sup> DC	76,7±5,6C	81,9±4,0DE	81,2±7,7D	<b>80,0±2,4 D</b>
<b>12</b>	73,8±1,3 bC	75,8±2,8 bC	96,2±2,4 aA-C	98,8±1,3 aA	<b>86,1±3,1 C</b>
<b>Ortalama</b>	<b>90,3±1,2 c</b>	<b>89,4±1,7 c</b>	<b>93,1±1,2 b</b>	<b>95,3±1,2 a</b>	

1) Aynı sütunda aynı büyük harfle ve aynı satırda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. Aynı satırda “ns” ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

KSEKO oranı bakımından çeşitlerin yöntemlere göre farklılık göstermesi yöntem x çeşit etkisinin çok önemli (p<0,01) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.3). Her yöntem için çeşitler ortalama KSEKO oranı bakımından %5 önem düzeyinde karşılaştırıldıklarında 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 ve 12 nolu yöntemlerde çeşitler arasındaki farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Çeşitlere göre yöntemler karşılaştırıldığında en yüksek KSEKO oranı (%100) Kırık’te 9 nolu yöntemde, Doğu 88’de 4, 5 ve 6 nolu yöntemlerde, Bezostaja-1 çeşidinde 4 ve 5 nolu yöntemlerde ve Kate A-1 çeşidinde ise 1, 2, 4, 5, 6 ve 7 nolu yöntemlerde meydana gelmiştir (Çizelge 4.6).



**Şekil 4.5.** Çeşitlerin farklı yöntemlerde meydana gelen embriyogenik kallusların ve somatik embriyoların görünümü. A) Kırık çeşidinde 8 nolu yöntemde embriyogenik olmayan kallusun görünümü (Kalus oluşum ortamında 21. günde). B) Kırık çeşidinde 9 nolu yöntemde meydana gelen somatik embriyoların görünümü (Rejenerasyon ortamında 5. günde). C) Kırık çeşidinde 2 nolu yöntemde embriyogenik kallus görünümü (Rejenerasyon ortamında 6. günde) D) Bezostaja-1 çeşidinde 9 nolu yöntemde embriyogenik kallusun ve somatik embriyoların görünümü (Rejenerasyon ortamında 4.günde) .

#### 4.1.3. Cevap veren embriyogenik kallus oranı

Kök ve sürgüne sahip bitkicik meydana getiren embriyogenik kalluslar cevap veren embriyogenik kallus olarak değerlendirilmiştir. Cevap veren embriyogenik kallus oranı eksplant sayısına, kallus sayısına ve embriyogenik kallus sayısına göre üç şekilde değerlendirilmiştir.

#### 4.1.3.a. Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı

ESCEK oranı çeşitlere göre önemli bir değişim göstermemiş (Çizelge 4.7) olmakla birlikte ESCEK oranı bakımından ilk sırayı %2,3 ile Kırık almış, bunu %1,7 ile Doğu 88, %1,6 ile Bezostaja-1 ve Kate A-1 çeşitleri izlemiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.6).

**Çizelge 4.7.** ESCEK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	P
Çeşit	3	5,3	1,3	0,279 <sup>ns</sup>
Yöntem	11	368,8	89,4	0,000 <sup>**</sup>
Çeşit x Yöntem	33	4,2	1,0	0,450 <sup>ns</sup>
Hata	144	4,1		
Genel Toplam	191			

<sup>\*\*</sup> : Çok önemli (p<0,01)

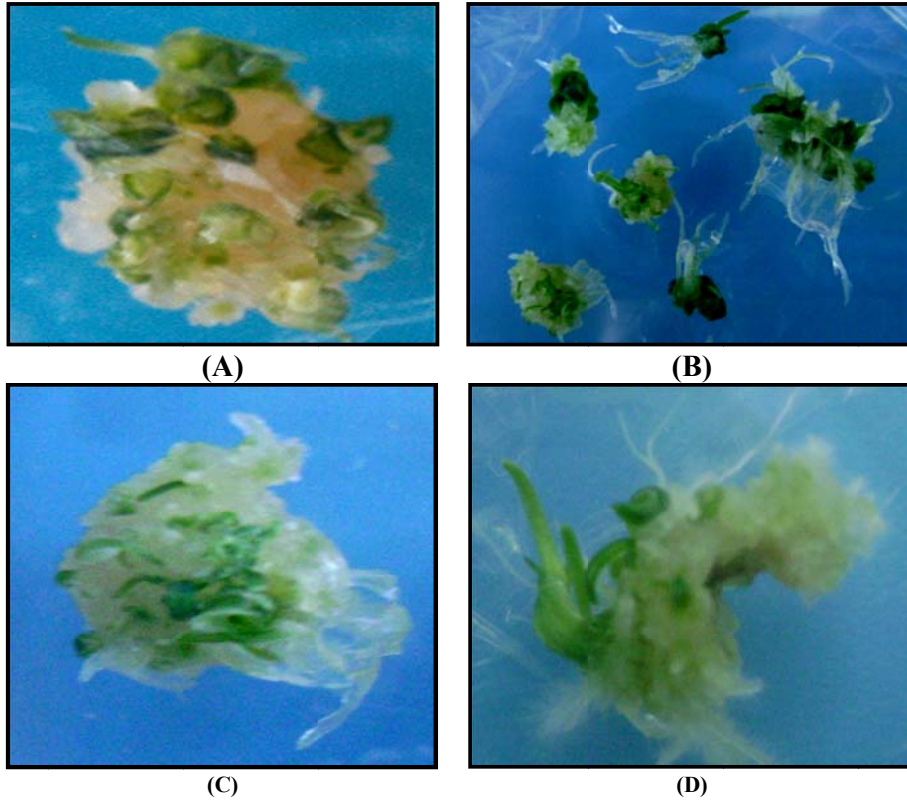
<sup>ns</sup> : Önemsiz (p>0,05)

ESCEK oranı üzerine yöntemin etkisi çok önemli (p<0,01) olmuştur (Çizelge 4.7). Bu özellik yönünden yöntemler karşılaştırıldığında sadece 2 ve 9 nolu yöntemde somatik embriyolardan bitki rejenerasyonu sağlanmış diğer yöntemlerde ise rejenerasyon gerçekleşmemiş bu nedenle %0,0 olarak gösterilmiştir (Çizelge 4.8). ESCEK oranı en yüksek 9 nolu yöntemde (%16,3) belirlenmiş ve bu oran 2 nolu yöntemde %5,3 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.6). Her iki yöntem içerisinde çeşitler karşılaştırıldığında en yüksek ESCEK oranı 9 nolu yöntemde %17,5 ile Kırık ve Doğu 88 genotiplerinde, 2 nolu yöntemde ise %10,0 ile Kırık'te elde edilmiştir (Çizelge 4.8). Bu değerler 9 ve 2 nolu yöntemlerde sırasıyla Doğu 88 çeşidi için % 17,5 ve %2,5, Bezostaja-1 çeşidi için %15,0 ve %5,0 ve Kate A-1 çeşidi için ise %15,0 ve %3,8 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.8.** Yöntemlere ve çeşitlere göre ESCEK oranları (%)<sup>1</sup>

Yöntemler	Çeşitler ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ )				Ortalama
	Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
2	10±0,0	2,5±2,5	5,0±2,9	3,8±2,4	5,3±1,2 B
3	00±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
4	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
8	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
9	17,5±2,5	17,5±2,5	15,0±2,9	15,0±2,9	16,3±1,3 A
10	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
11	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
12	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
<b>Ortalama</b>	<b>2,3±0,8<sup>ns</sup></b>	<b>1,7±0,7</b>	<b>1,6±0,7</b>	<b>1,6±0,7</b>	

1) Aynı sütunda aynı büyük harfle ve aynı satırda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. Aynı satırda “ns” ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.



**Şekil 4.6.** Kırık buğday çeşidinin 9 (A, B) ve 2 nolu (C, D) yöntemlerde rejenerasyon ortamında 7. gündeki embriyogenik kalluslarından sürgünlerin oluşumu.

#### 4.1.3.b. Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (KSCEK) oranı

KSCEK oranı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.9). KSCEK oranı bakımından ilk sırayı %2,3 ile Kırık almış bunu %1,7 ile Doğu 88 ve %1,6 Bezostaja-1 ve Kate A-1 çeşitleri izlemiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.7) .

**Çizelge 4.9.** KSCEK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Çeşit	3	5,1	87,4	1,295 <sup>ns</sup>
Yöntem	11	368,8		0,000 <sup>**</sup>
Çeşit x Yöntem	33	4,1		0,970 <sup>ns</sup>
Hata	144	4,2		
Genel Toplam	191			

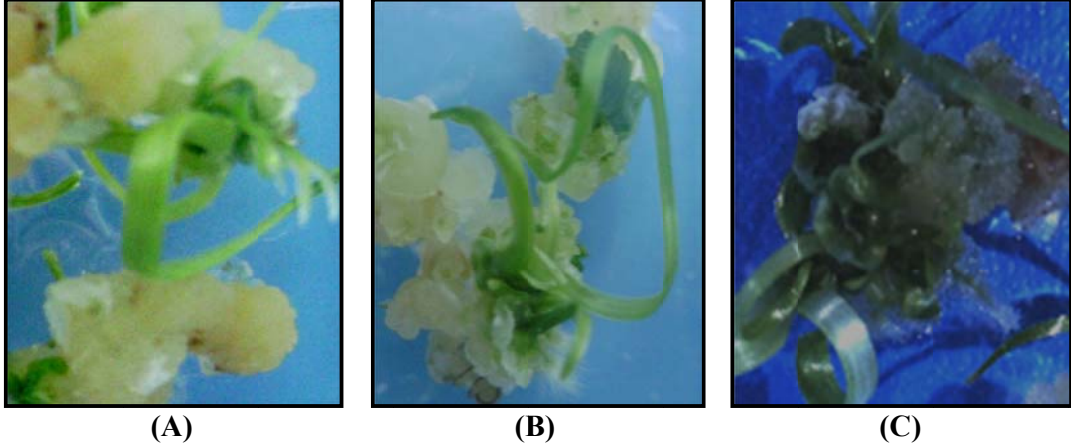
\*\* : Çok önemli (p<0,01)

<sup>ns</sup> : Önemsiz (p>0,05)

**Çizelge 4.10.** Yöntemlere ve çeşitlere göre KSCEK oranları (%)<sup>1</sup>

Yöntemler	Çeşitler ( $\bar{X} \mp S_{\bar{x}}$ )				Ortalama
	Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
2	10±0,0	2,5±2,5	5,0±2,9	4,1±2,7	5,4±1,3 B
3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
4	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
8	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
9	17,5±2,5	17,5±2,5	15,0±2,9	15,0±2,9	16,3±1,3 A
10	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
11	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
12	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
<b>Ortalama</b>	<b>2,3±0,8<sup>ns</sup></b>	<b>1,7±0,7</b>	<b>1,6±0,7</b>	<b>1,6±0,7</b>	

1) Aynı sütunda aynı büyük harfle ve aynı satırda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. Aynı satırda “ns” ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.



**Şekil 4.7.** Rejenerasyon ortamında 15. gündeki embriyogenik kalluslarda sürgünlerin oluşumu. A) Bezostaja-1 çeşidinde 2 nolu yöntemde embriyogenik kallusta sürgün oluşumu. B) Kırık çeşidinde 9 nolu yöntemde embriyogenik kallusta sürgün oluşumu. C) Doğu 88 çeşidinde 9 nolu yöntemde embriyogenik kallusta sürgün oluşumu.

KSCEK oranı yöntemlere göre değişmiş ve çeşitler arasındaki farklılıklar çok önemli ( $p<0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.9). Embriyogenik kalluslarda bitki rejenerasyonu yalnızca 2 ve 9 nolu yöntemlerde gerçekleşmiştir. En yüksek ortalama KSCEK oranı %16,3 ile 9 nolu yöntemde belirlenmiş ve bu değer 2 nolu yöntemde %5,4 olmuştur (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.7). Çeşitler bu özellik yönünden karşılaştırıldıklarında en yüksek KSCEK oranı 9 nolu yöntemde %17,5 ile Kırık ve Doğu 88 çeşitlerinde, 2 nolu yöntemde ise %10 ile Kırık'te meydana gelmiştir (Çizelge 4.10).

#### **4.1.3.c. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCEK) oranı**

KSCEK ve KSCEK oranlarında olduğu gibi, EKSCEK oranı üzerine çeşidin etkisi istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.11). En yüksek ortalama EKSCEK oranı (%2,3) Kırık çeşidinde meydana gelmiştir. Bunu azalan sıra ile Doğu 88 (%1,9), Bezostaja-1 ve Kate A-1 (%1,7) izlemiştir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.8).

**Çizelge 4.11.** EKSCCK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Çeşit	3	4,2	0,9	0,467 <sup>ns</sup>
Yöntem	11	412,0	83,1	0,000 <sup>**</sup>
Çeşit x Yöntem	33	4,4	0,9	0,643 <sup>ns</sup>
Hata	144	5,0		
Genel Toplam	191			

<sup>\*\*</sup> : Çok önemli (p<0,01)

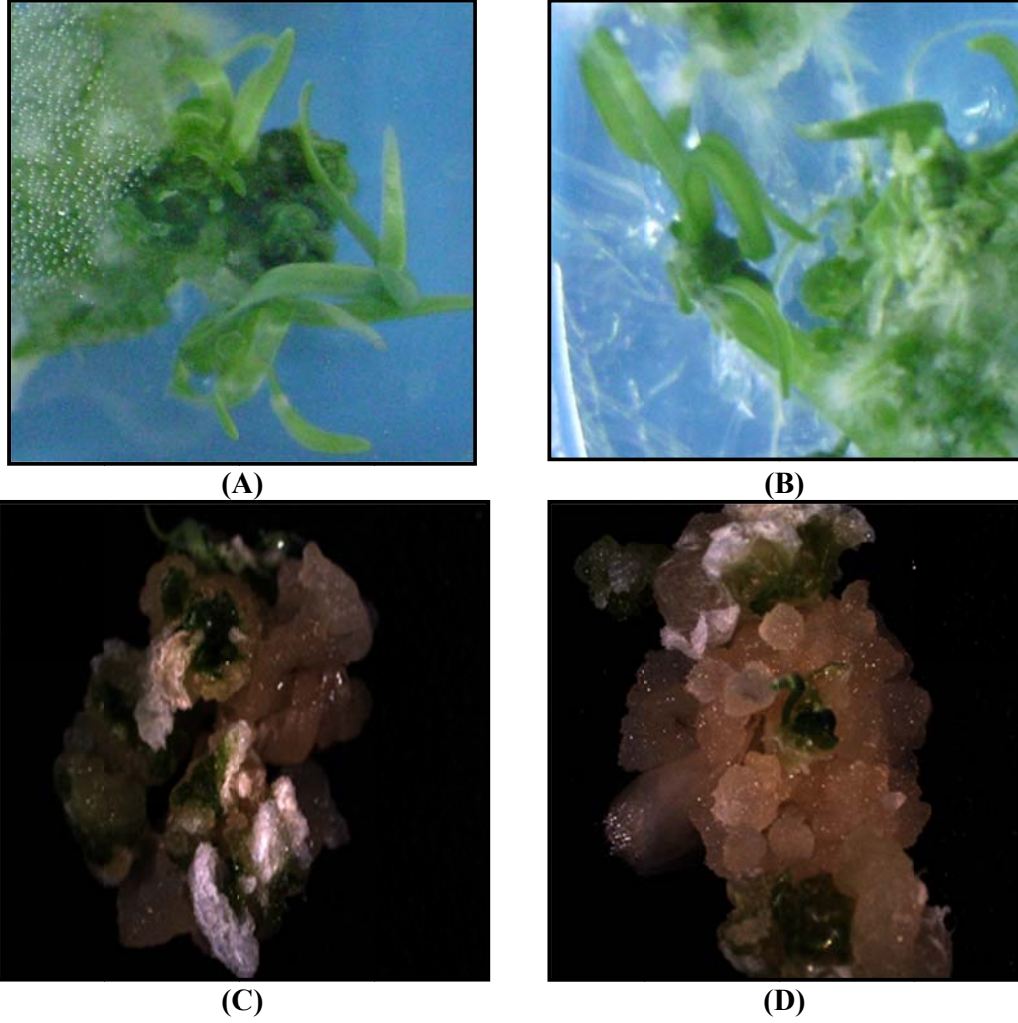
<sup>ns</sup> : Önemsiz (p>0,05)

**Çizelge 4.12.** Yöntemlere ve çeşitlere göre EKSCCK oranları (%)<sup>1</sup>

Yöntemler	Çeşitler ( $\bar{X} \mp S_{\bar{x}}$ )				Ortalama
	Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
2	10,4±0,1	3,3±3,3	5,0±2,9	4,1±2,7	5,7±1,4 B
3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
4	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
5	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
8	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
9	17,5±2,5	19,4±2,8	15,8±3,1	15,8±3,1	17,2±1,3 A
10	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
11	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
12	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0 C
<b>Ortalama</b>	<b>2,3±0,8</b> <sup>ns</sup>	<b>1,9±0,8</b>	<b>1,7±0,7</b>	<b>1,7±0,7</b>	

1) Aynı sütunda aynı büyük harfle ve aynı satırda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. Aynı satırda “ns” ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

EKSCCK oranı bakımından yöntemler arasındaki farklılıklar çok önemli (p<0,01) bulunmuştur (Çizelge 4.11). En yüksek EKSCCK oranı %17,2 ile 9 nolu yöntemden elde edilmiş ve bu oran 2 nolu yöntemde %5,7 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.8). Diğer yöntemlerde EKSCCK oranları %0,0 olmuştur (Çizelge 4.12). Bu iki yöntem için çeşitler karşılaştırıldığında en yüksek EKSCCK oranı 9 nolu yöntemde %19,4 ile Doğu 88 çeşidinde, 2 nolu yöntemde ise %10,4 ile Kırık buğday çeşidinde belirlenmiştir.



**Şekil 4.8.** Embriyogenik kalluslarda sürgünlerin oluşumu. A) Doğu 88 çeşidinde 2 nolu yöntemde rejenerasyon ortamında 17. gündeki embriyogenik kallusta sürgün oluşumu. B) Bezostaja-1 çeşidinde 9 yöntemde rejenerasyon ortamında 19. gündeki embriyogenik kallusta sürgün oluşumu. C) Kate A-1 çeşidinde 9 yöntemde rejenerasyon ortamında 4. gündeki embriyogenik kallusta sürgün oluşumu. D) Kırık çeşidinde 9 yöntemde rejenerasyon ortamında 5. gündeki embriyogenik kallusta sürgün oluşumu.

#### 4.1.3. Rejenerasyon etkinliği

Rejenerasyon etkinliği bakımından çeşitler ve yöntemler arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda çok önemli ( $p < 0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.13). Ortalama

rejenerasyon etkinliği bakımından ilk sırada (0,7 adet) Kate A-1 eşidi son sırada ise (0,3 adet) Bezostaja-1 ve Doğu 88 eşitleri yer almışlardır. Bu oran Kırık eşidinde 0,6 adet olarak kaydedilmiştir (izelge 4.14 ve Şekil 4.9). Rejenerasyon etkinliği bakımından Kate A-1 ve Kırık eşitleri ile Doğu 88 ve Bezostaja-1 eşitleri arasındaki fark istatitiki olarak önemli bulunmuştur.

**Çizelge 4.13.** Rejenerasyon etkinliğine ilişkin varyans analizi sonuçları

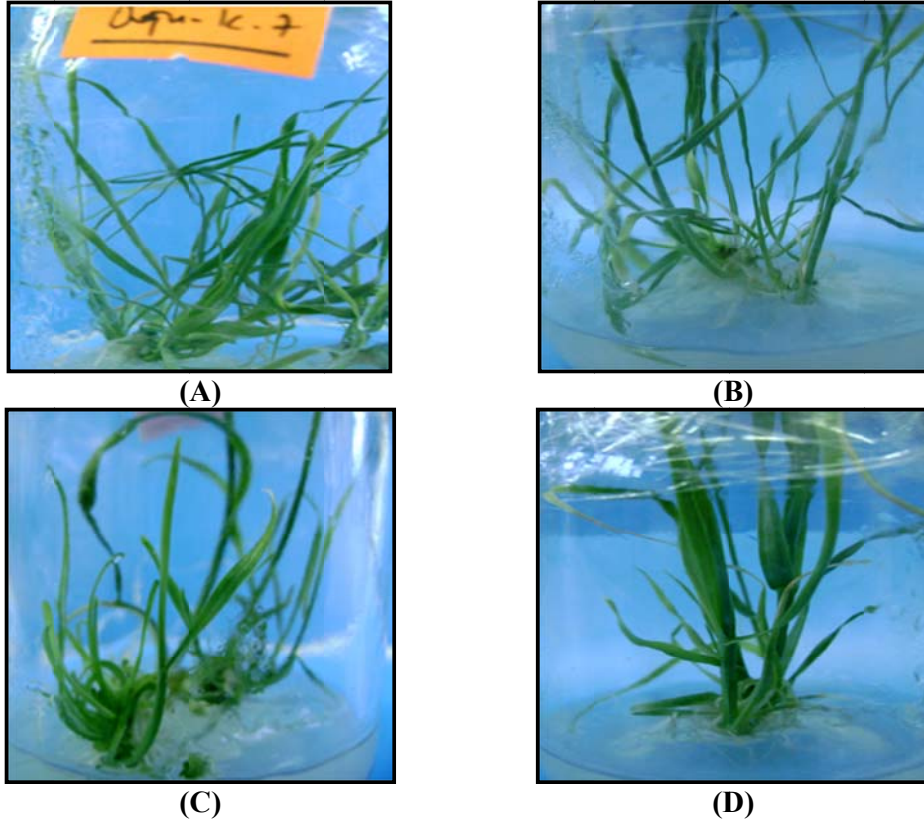
Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Yöntem	11	24,9	124,7	0,000 **
eşit	3	1,6	7,8	0,000 **
Yöntem x çeşit	33	1,2	6,0	0,000 **
Hata	144	0,2		
Genel Toplam	191			

\*\* : Çok önemli (p<0,01)

**Çizelge 4.14.** Yöntemlere ve çeşitlere göre rejenerasyon etkinlikleri (adet)<sup>1</sup>

Yöntemler	eşitler ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ )				Ortalama
	Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
<b>1</b>	0,0±0,0 <sup>ns</sup> C	0,0±0,0 B	0,0±0,0B	0,0±0,0 C	<b>0,0±0,0 C</b>
<b>2</b>	2,9±0,2 aB	0,6±0,6 bB	0,6±0,6 bB	1,4±0,8 abB	<b>1,4±0,4 B</b>
<b>3</b>	0,0±0,0 <sup>ns</sup> C	0,0±0,0 B	0,0±0,0 B	0,0±0,0 C	<b>0,0±0,0 C</b>
<b>4</b>	0,0±0,0 <sup>ns</sup> C	0,0±0,0 B	0,0±0,0 B	0,0±0,0 C	<b>0,0±0,0 C</b>
<b>5</b>	0,0±0,0 <sup>ns</sup> C	0,0±0,0 B	0,0±0,0 B	0,0±0,0 C	<b>0,0±0,0 C</b>
<b>6</b>	0,0±0,0 <sup>ns</sup> C	0,0±0,0 B	0,0±0,0 B	0,0±0,0 C	<b>0,0±0,0 C</b>
<b>7</b>	0,0±0,0 <sup>ns</sup> C	0,0±0,0 B	0,0±0,0 B	0,0±0,0 C	<b>0,0±0,0 C</b>
<b>8</b>	0,0±0,0 <sup>ns</sup> C	0,0±0,0 B	0,0±0,0 B	0,0±0,0 C	<b>0,0±0,0 C</b>
<b>9</b>	4,1±0,7 bA	3,3±0,3 bA	3,0±0,4 bB	6,5±0,5 aA	<b>4,2±0,4 A</b>
<b>10</b>	0,0±0,0 <sup>ns</sup> C	0,0±0,0 B	0,0±0,0 B	0,0±0,0 C	<b>0,0±0,0 C</b>
<b>11</b>	0,0±0,0 <sup>ns</sup> C	0,0±0,0 B	0,0±0,0 B	0,0±0,0 C	<b>0,0±0,0 C</b>
<b>12</b>	0,0±0,0 <sup>ns</sup> C	0,0±0,0 B	0,0±0,0 B	0,0±0,0 C	<b>0,0±0,0 C</b>
<b>Ortalama</b>	<b>0,6±0,2 a</b>	<b>0,3±0,1 b</b>	<b>0,3±0,1 b</b>	<b>0,7±0,3 a</b>	

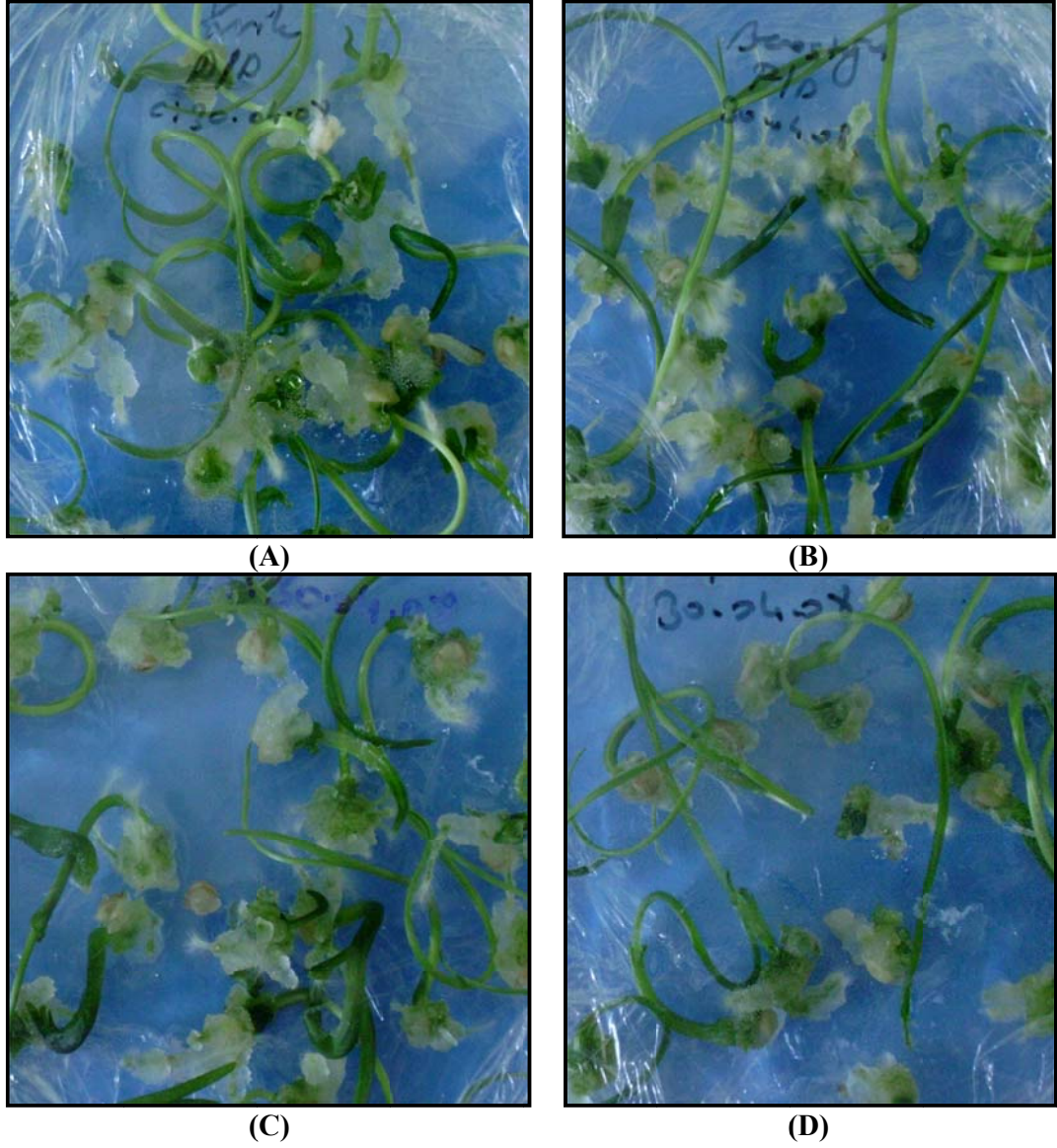
1) Aynı sütunda aynı büyük harfle ve aynı satırda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. Aynı satırda “ns” ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.



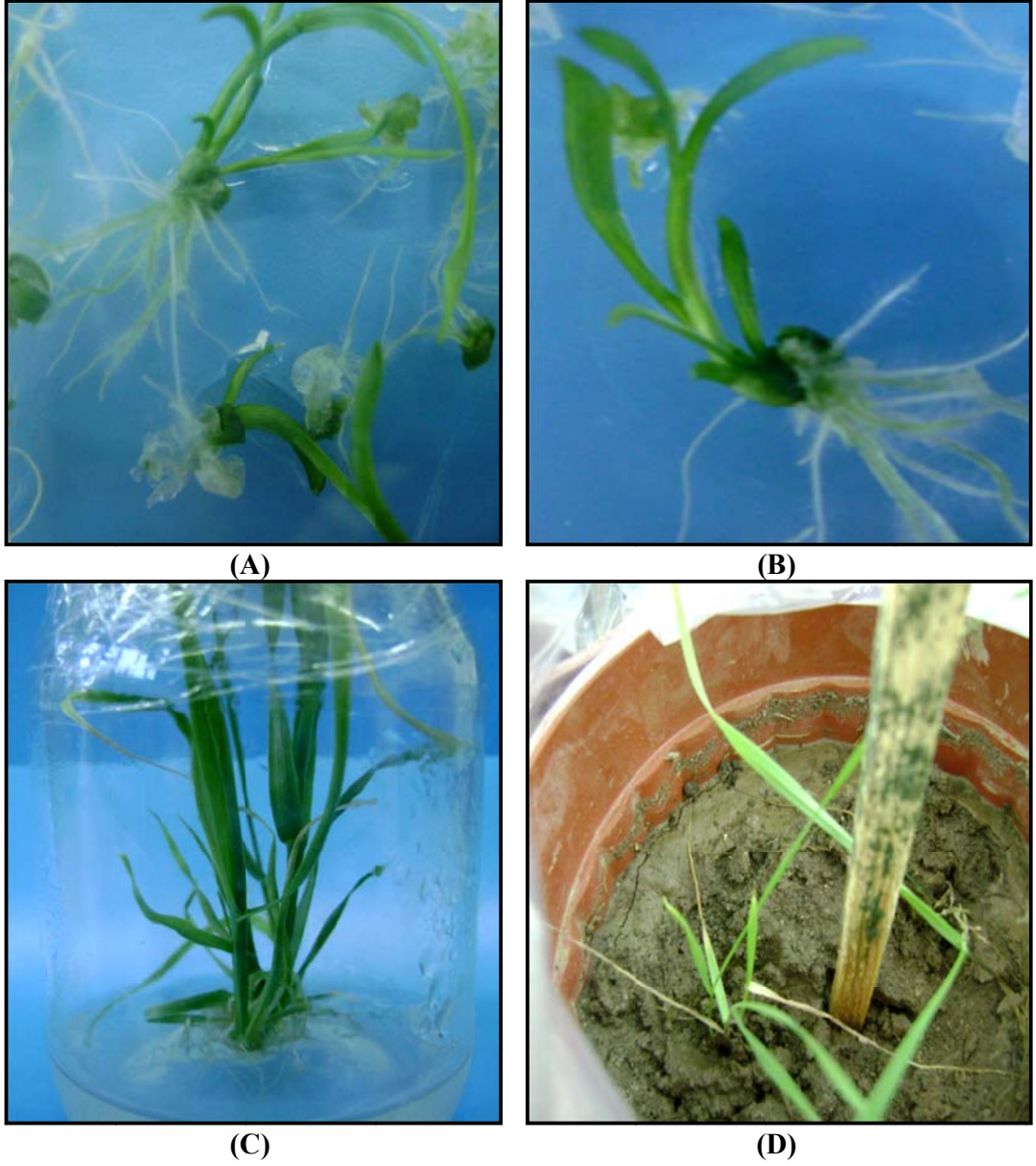
**Şekil 4.9.** 9 nolu yöntemde çeşitlere ait rejenera bitkilerin meganta kutularında büyütülmesi. A) Doğu 88, B) Kırık, C) Bezostaja-1 ve D) Kate A-1.

Ortalama rejenerasyon etkinliği bakımından yöntemler karşılaştırıldığında sadece 2 ve 9 nolu yöntemde somatik embriyolardan bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. Diğer yöntemlerde meydana gelen bitkiler ana embriyodan oluşmuştur. Bu nedenle bu ortamlarda meydana gelen bitkiler dikkate alınmamıştır (Şekil 4.10). Ortalama rejenerasyon etkinliği 9 nolu yöntemde (4,2) 2 nolu yöntemden (1,4) daha yüksek olmuş (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.11; 4.12) ve 9 nolu yöntem ile 2 nolu yöntem arasındaki farklılık önemli olmuştur. Çeşitlerin rejenerasyon etkinliği yöntemlere göre değiştiğinden yöntem x çeşit interaksyonu çok önemli ( $p<0,01$ ) çıkmıştır (Çizelge 4.13). Kate A-1 çeşidi için rejenerasyon etkinliği değeri 9 nolu yöntemde 6,5 olarak, 2 nolu yöntemde ise 1,4 olarak belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla 9 ve 2 nolu yöntemlerde Kırık çeşidi için 4,1 ve 2,9, Doğu 88 çeşidi için 3,3 ve 0,6, Bezostaja-1 çeşidi için ise 3,0 ve 0,6 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.14). Rejenerasyon etkinliği

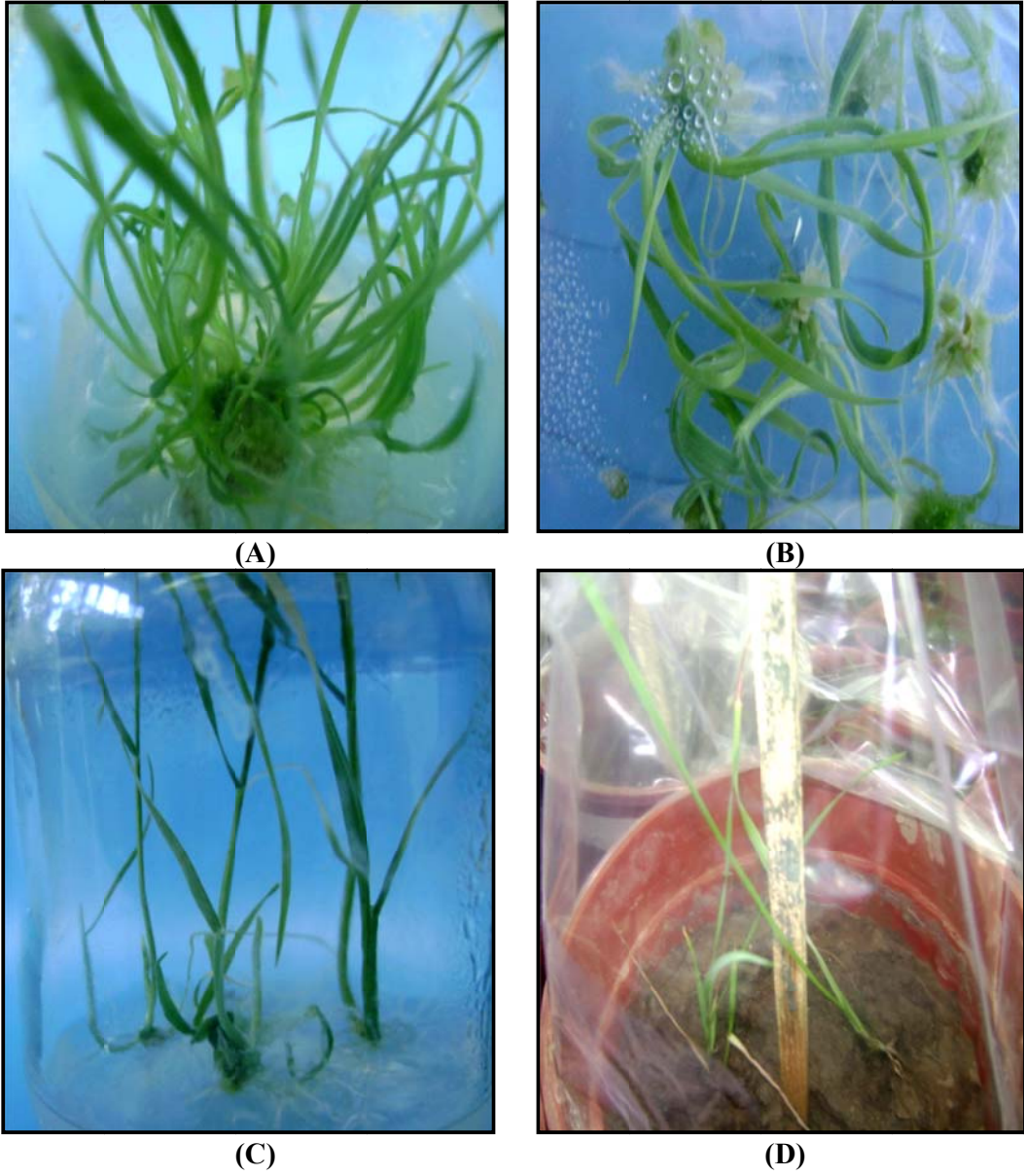
bakımından çeşitlere göre yöntemler karşılaştırıldığında tüm çeşitlerde en yüksek rejenerasyon etkinliği 9 nolu yöntemde meydana gelmiştir (Çizelge 4.14).



**Şekil 4.10.** Rejenerasyon oratamının 30. gününde ana embriyodan meydana gelen sürgünlerin görünümü. A) Kırık çeşidinde 4 nolu yöntemde ana embriyodan sürgün oluşumu. B) Bezostaja-1 çeşidinde 6 nolu yöntemde ana embriyodan sürgün oluşumu. C) Kate A-1 çeşidinde 12 nolu yöntemde ana embriyodan sürgün oluşumu. E) Doğu 88 çeşidinde 3 nolu yöntemde ana embriyodan sürgün oluşumu.



**Şekil 4.11.** Kate A-1 çeşidinde 9 nolu yöntemlerde meydana gelen rejener bitkilerinin görünümü. A) Somatik embriyolardan sürgün oluşumu. B) sürgün ve köke sahip rejener bitki. C) Rejener bitkilerin meganta kutusunda büyütülmesi. D) Rejener bitkilerin saksılarda büyütülmesi.



**Şekil 4.12.** Kırık genotipinde 2 nolu yöntemde meydana gelen rejenere bitkilerin görünümü. A) Embriyogenik kalluslarda meydana gelen sürgünlerin görünümü. B) Rejenere bitkilerin kök ve sürgünlerinin görünümü. C) Rejenere bitkilerin meganta kutusunda büyütülmesi. D) Rejenere bitkilerin saksılarda büyütülmesi.

#### 4.2. İkinci aşama

Rejenerasyon ortamında farklı sitokin tipleri ve dozlarının denendiği bu aşamada kallus oluşum ortamında standart ortam kullanılmış ve kallus oluşum oranı ile embriyogenik kallus oluşum oranları rejenerasyon ortamına aktarılmadan önce belirlenmiştir. Bu nedenle bu karakterlere istatistik analiz uygulanmamıştır. Ancak, kallus oluşum oranı ve embriyogenik kallus oluşum oranı (eksplant ve kallus sayısına göre) cevap veren embriyogenik kallus oranı (eksplant, kallus ve embriyogenik kallus sayısına göre) ve rejenerasyon etkinliğinin hesaplanmasında kullanılması nedeniyle bu karakterlerden aşağıda kısaca açıklanmıştır.

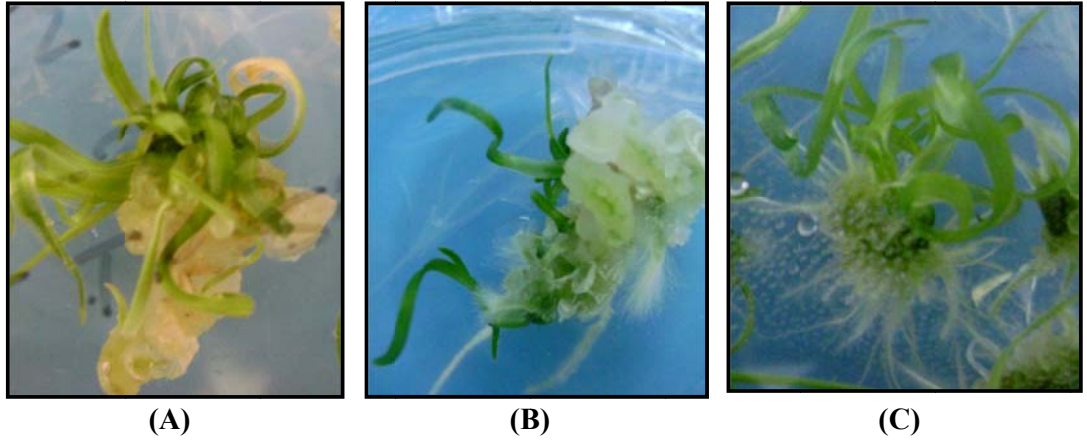
Çeşitlerin, farklı sitokin tipleri ve dozlarını içeren rejenerasyon ortamlarına aktarılmadan önceki kallus oluşum oranları %100 olmuş ve bu nedenle eksplant sayısına ve kallus sayısına göre embriyogenik kallus oranları aynı olmuştur (Çizelge 4.15).

**Çizelge 4.15.** Farklı sitokin tipleri ve dozlarını içeren rejenerasyon ortamına aktarılmadan önce belirlenen çeşitlere ait ESEKO oranları (%)

Yön.	Açıklama	Çeşitler ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )				Ortalama
		Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
<b>K</b>	<b>Sitokininsiz</b>	100±0,0	90,0±0,0	95±2,9	95,0±2,9	95,0±1,3
<b>1</b>	<b>0,5 mg/l TDZ</b>	100±0,0	92,5±2,5	95,0±5,0	97,5±2,5	96,3±1,5
<b>2</b>	<b>1,0 mg/l TDZ</b>	100±0,0	90,0±4,1	95,0±5,0	95,0±2,9	95,0±1,8
<b>3</b>	<b>1,5 mg/l TDZ</b>	100±0,0	90,0±4,0	95,0±2,9	95,0±2,9	95,0±1,6
<b>4</b>	<b>0,5 mg/l BAP</b>	100±0,0	90,0±0,0	95±2,9	95,0±2,9	95,0±1,3
<b>5</b>	<b>1,0 mg/l BAP</b>	100±0,0	90,0±4,0	90,0±2,1	95,0±2,9	93,8±2,2
<b>6</b>	<b>1,5 mg/l BAP</b>	100±0,0	90,0±0,0	95,0±2,9	95,0±2,9	95,0±1,3
<b>7</b>	<b>0,5 mg/l Kinetin</b>	100±0,0	90,0±4,1	92,3±2,5	92,5±4,8	93,8±2,4
<b>8</b>	<b>1,0 mg/l Kinetin</b>	100±0,0	87,5±4,8	95,0±2,9	97,5±2,5	95,0±1,8
<b>9</b>	<b>1,5 mg/l Kinetin</b>	100±0,0	92,5±4,8	95,0±2,9	97,5±2,5	96,3±1,5
<b>Ortalama</b>		<b>100±0,0</b>	<b>90,2±0,8</b>	<b>94,4±1,1</b>	<b>95,4±0,8</b>	

#### 4.2.1. Cevap veren embriyogenik kallus oranı

Cevap veren embriyogenik kalluslar rejenerasyon ortamına aktarıldıktan sonra bu ortamda bitkicikler oluşturmuşlardır (Şekil 4.13). Çeşitlerin kallus oluşum oranları %100 olduğu için eksplant sayısına ve kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranları aynı olmuştur. Bu nedenle, burada eksplant sayısına ve embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranlarına ait araştırma bulguları verilmiştir.



**Şekil 4.13.** Rejenerasyon ortamında 21. gündeki embriyogenik kalluslarda sürgünlerin oluşumu. A) Doğu 88 çeşidinde 1 nolu yöntemde embriyogenik kallusta sürgün oluşumu. B) Bezostaja-1 çeşidinde 4 nolu yöntemde embriyogenik kallusta sürgün oluşumu. C) Kırık çeşidinde 1 nolu yöntemde embriyogenik kallusta sürgün oluşumu.

##### 4.2.1.a Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı

ESCEK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları ve faktörlere ait ortalama değerler Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17’de verilmiştir. Çizelge 4.16 incelendiğinde ESCEK oranına çeşidin etkisinin çok önemli ( $p<0,01$ ) olduğu belirlenmiştir. Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranları yönünden çeşitler karşılaştırıldıklarında, Kırık %24,8’lik ortalama ESCEK oranı ile ilk sırada yer almış, bunu sırasıyla %17,8 ile Doğu 88, %16,8 ile Kate A-1 ve %15,5 ile Bezostaja-1 çeşitleri izlemiş, Kırık diğer çeşitlerden istatistiki olarak farklı ve diğer çeşitler arasındaki farkın önemsiz olduğu

bulunmuştur (Çizelge 4.17).

**Çizelge 4.16.** ESCEK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	P
Çeşit	3	687,3	14,7	0,000 **
Yöntem	9	1907,6	40,7	0,000 **
Çeşit x Yöntem	27	80,4	1,7	0,026 *
Hata	120	46,9		
Genel Toplam	159			

\*\* : Çok önemli (p<0,01)

\* : Önemli (p<0,05)

**Çizelge 4.17.** Farklı sitokin tipleri ve dozlarında çeşitlerin ESCEK oranları (%)<sup>1</sup>

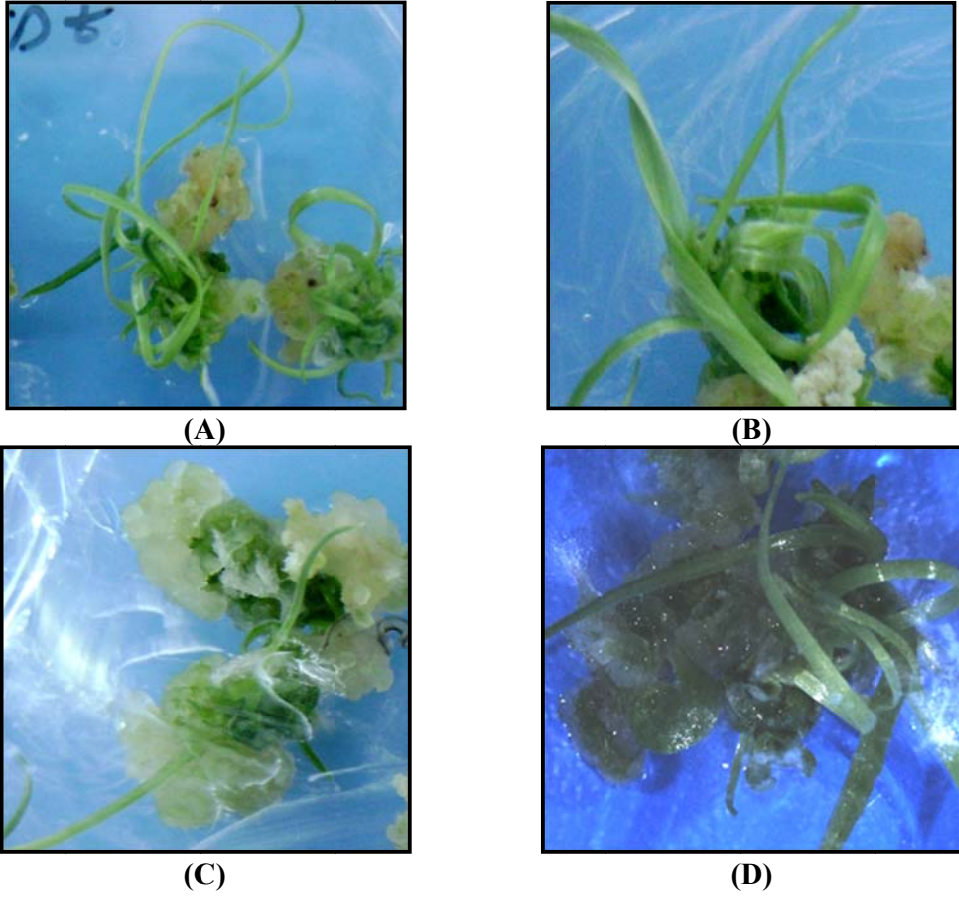
Yön.	Açıklama	Çeşitler ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )				Ortalama
		Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
<b>K</b>	<b>Sitokininsiz</b>	17,5±2,5 <sup>ns</sup> C	17,5±2,5B	15,0±2,9B-D	15,0±2,9B	<b>16,3±1,3C</b>
<b>1</b>	<b>0,5 mg/l TDZ</b>	65,0±2,9aA	42,5±2,5bA	40,0±0,0bA	45,0±2,9bA	<b>48,1±2,8A</b>
<b>2</b>	<b>1,0 mg/l TDZ</b>	22,5±2,5aBC	10,0±0,0bBC	15,0±2,9abB-D	20,0±4,1aB	<b>16,9±1,8C</b>
<b>3</b>	<b>1,5 mg/l TDZ</b>	20,0±4,1 <sup>ns</sup> BC	20,0±4,1AB	10,0±0,0bCD	17,5±2,5abB	<b>16,9±1,8C</b>
<b>4</b>	<b>0,5 mg/l BAP</b>	30,0±4,1 <sup>ns</sup> B	20,0±7,0bB	22,5±2,5abB	20,0±0,0bB	<b>23,1±2,2B</b>
<b>5</b>	<b>1,0 mg/l BAP</b>	20,0±4,1 <sup>ns</sup> BC	12,5±2,5abBC	20,0±4,1aBC	10,0±4,1bB	<b>15,6±2,0C</b>
<b>6</b>	<b>1,5 mg/l BAP</b>	20,0±4,1aBC	12,5±4,8abBC	5,0±2,9bD	10,0±0,0bB	<b>11,9±2,1CD</b>
<b>7</b>	<b>0,5 mg/l Kinetin</b>	15,0±5,0 <sup>ns</sup> C	20,0±0,0aB	10,0±4,1bCD	10,0±4,1bB	<b>13,8±2,0CD</b>
<b>8</b>	<b>1,0 mg/l Kinetin</b>	20,0±0,0 <sup>ns</sup> BC	17,5±4,8abB	10,0±4,1bCD	10,0±0,0bB	<b>14,4±1,8CD</b>
<b>9</b>	<b>1,5 mg/l Kinetin</b>	17,5±4,8 <sup>ns</sup> C	5,0±2,9bC	7,5±4,8bD	10,0±4,1abB	<b>10,0±2,2D</b>
	<b>Ortalama</b>	<b>24,8±2,5 a</b>	<b>17,8±1,9 b</b>	<b>15,5±1,8 b</b>	<b>16,8±1,8 b</b>	

1) Aynı sütunda aynı büyük harfle ve aynı satırda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. Aynı satırda “ns” ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

ESCEK oranı bakımından yöntemler arasındaki farklılığın çok önemli (p<0,01) olduğu belirlenmiştir. En yüksek ortalama ESCEK oranı 1 nolu yöntemde (%48,1), en düşük ise 9 nolu yöntemde (%10,0) belirlenmiştir (Çizelge 4.17). Bu oran bakımından 2, 3 ve 4 nolu yöntemler kontrole göre daha yüksek ESCEK oranına sahip olmuşlar, ancak 2, 3 ve kontrol yöntemler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli olmamış ve aynı grupta yer almışlardır. Ayrıca, ESCEK oranı bakımından çeşitlerin yöntemlere tepkileri farklılık gösterdiği için yöntem x çeşit etkileşimi önemli (p<0,05) çıkmıştır (Çizelge 4.16). Her yöntem için çeşitler ortalama ESCEK oranı bakımından %5 önem düzeyinde

karşılaştırıldıklarında 1, 2 ve 6 nolu yöntemlerde çeşitler arasındaki farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.17).

Çeşitlere göre yöntemler incelendiğinde tüm çeşitlerde en yüksek ESCEK oranı 1. yöntemde meydana gelmiştir (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.14). Bu oran Kırık için %65,0, Kate A-1 için %45,0 Doğu 88 için %42,5 ve Bezostaja-1 için %40,0 olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.14.** 1 nolu yöntemde çeşitlere ait rejenerasyon ortamında 15. gündeki embriyogenik kalluslarda sürgünlerin oluşumu. A) Kırık, B) Bezostaja-1, C) Doğu 88 ve D) Kate A-1.

#### 4.2.2.b. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCCK) oranı

EKSCCK oranı çeşitlere göre değişmiş ve çeşitler arasındaki farklılıklar çok önemli ( $p<0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.18). En yüksek ortalama EKSCCK oranı %24,8 ile Kırık çeşidinde meydana gelmiştir. Bunu sırasıyla %19,8 ile Doğu 88, %17,5 ile Kate A-1 ve %16,6 ile Bezostaja-1 çeşitleri izlemiştir (Çizelge 4.19). Doğu 88, Bezostaja 1 ve Kate A-1 çeşitleri arasındaki farklılık önemsiz olurken, Kırık çeşidi ile diğer çeşitler arasındaki farklar önemli olmuştur (Çizelge 4.19).

**Çizelge 4.18.** EKSCCK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	P
Çeşit	3	536,3	9,8	0,000 **
Yöntem	9	2034,0	37,1	0,000 **
Çeşit x Yöntem	27	87,1	1,6	0,048 *
Hata	120	54,9		
Genel Toplam	159			

\*\* : Çok önemli ( $p<0,01$ )

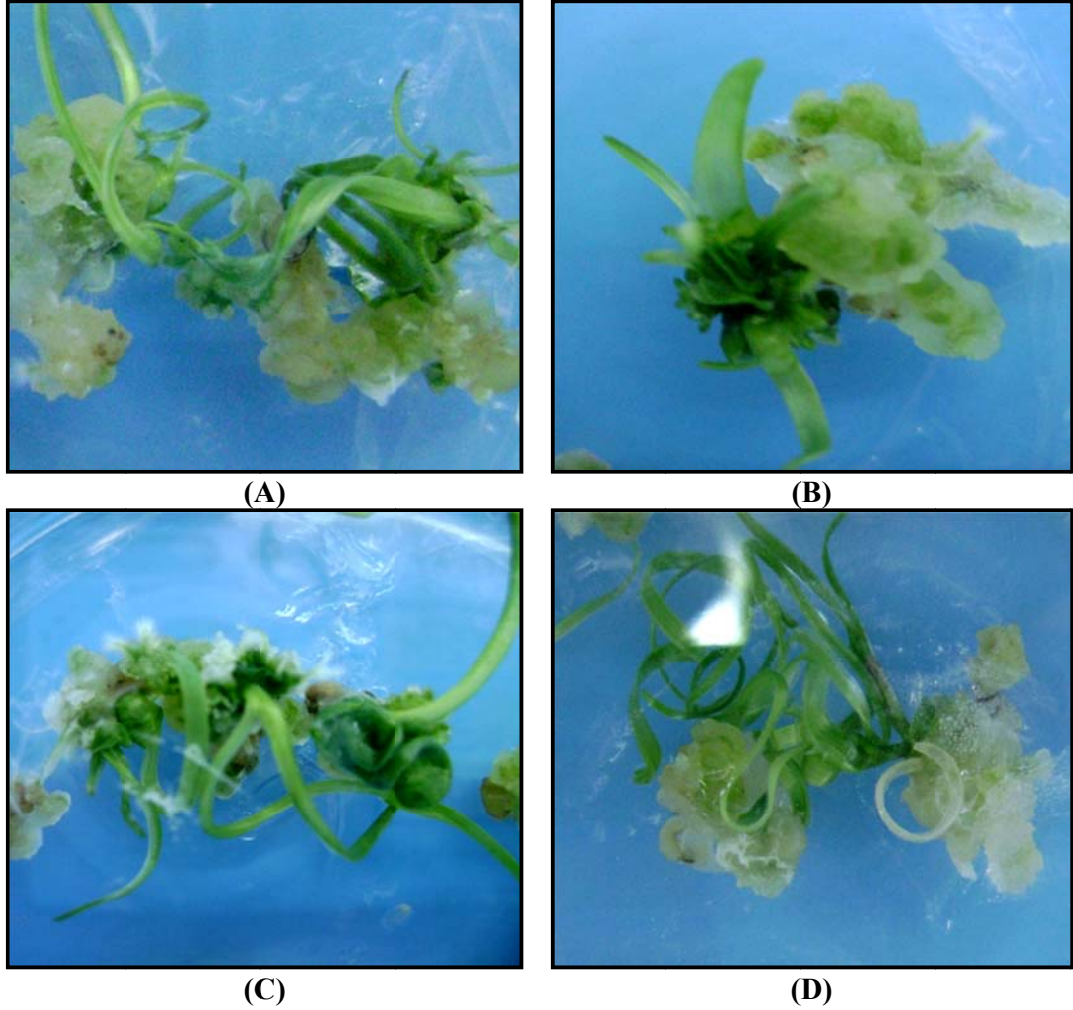
\* : Önemli ( $p<0,05$ )

**Çizelge 4.19.** Farklı sitokin tipleri ve dozlarında çeşitlerin EKSCCK oranları (%)<sup>1</sup>

Yön.	Açıklama	Çeşitler ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )				Ortalama
		Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
<b>K</b>	<b>Sitokininsiz</b>	17,5±2,5 <sup>nsC</sup>	19,4±2,8BC	15,8±3,1BC	15,8±3,1B-D	<b>17,2±1,3C</b>
<b>1</b>	<b>0,5 mg/l TDZ</b>	65,0±2,9aA	46,1±3,3bA	42,5±2,5bA	46,4±3,9bA	<b>50,0±2,7A</b>
<b>2</b>	<b>1,0 mg/l TDZ</b>	22,5±2,5aBC	11,2±0,5bBC	15,6±2,6abBC	20,8±3,9aBC	<b>17,5±1,7C</b>
<b>3</b>	<b>1,5 mg/l TDZ</b>	20,0±4,0abBC	22,6±4,8aB	10,6±0,3bC	18,6±2,9abB-D	<b>17,9±2,0C</b>
<b>4</b>	<b>0,5 mg/l BAP</b>	30,0±4,1 <sup>nsB</sup>	22,2±7,9B	23,6±2,2B	21,1±0,6B	<b>24,2±2,2B</b>
<b>5</b>	<b>1,0 mg/l BAP</b>	20,0±4,1 <sup>nsBC</sup>	14,0±2,8abBC	22,4±4,4aB	10,8±4,5bCD	<b>16,8±2,2C</b>
<b>6</b>	<b>1,5 mg/l BAP</b>	20,0±4,1aBC	13,9±5,3abBC	5,3±3,1bC	10,6±0,3abD	<b>12,4±2,2CD</b>
<b>7</b>	<b>0,5 mg/l Kinetin</b>	15,0±5,0 <sup>nsC</sup>	22,4±1,0aB	11,1±4,2bC	10,3±4,1bD	<b>14,7±2,1CD</b>
<b>8</b>	<b>1,0 mg/l Kinetin</b>	20,0±0,0 <sup>nsBC</sup>	20,6±6,2aB	10,6±4,1bC	10,3±0,3bD	<b>15,4±2,1CD</b>
<b>9</b>	<b>1,5 mg/l Kinetin</b>	17,5±4,8 <sup>nsC</sup>	5,9±3,4bC	8,3±5,3abC	10,0±4,1abD	<b>10,4±2,3D</b>
	<b>Ortalama</b>	<b>24,8±2,5a</b>	<b>19,8±2,0b</b>	<b>16,6±1,9b</b>	<b>17,5±1,9b</b>	

1) Aynı sütunda aynı büyük harfle ve aynı satırda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. Aynı satırda "ns" ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

Yöntemler yönünden değerlendirildiğinde, ortalama EKSCEK oranı bakımından yöntemler arasındaki farklılık çok önemli olmuştur (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.15). En yüksek ortalama EKSCEK oranı, ESCEK oranında olduğu gibi 1 nolu yöntemden (%50,0), en düşük ise 9 nolu yöntemden (%10,4) elde edilmiştir (Çizelge 4.19).



**Şekil 4.15.** Rejenerasyon ortamında 20. gündeki embriyogenik kalluslarda sürgünlerin oluşumu. A) Kırık genotipinde 2 nolu yöntemde embriyogenik kallusta sürgün oluşumu. B) Bezostaja-1 çeşidinde 3 nolu yöntemde embriyogenik kallusta sürgün oluşumu. C) Kate A-1 çeşidinde 8 nolu yöntemde embriyogenik kallusta sürgün oluşumu. D) Kırık genotipinde 4 nolu yöntemde embriyogenik kallusta sürgün oluşumu.

Çeşitlerin EKSCEK oranlarının yöntemlere göre farklılık göstermesi, yöntem x çeşit etkileşiminin önemli ( $p < 0,05$ ) çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.18). Her

yönteme ait EKSCCK oranı bakımından çeşitler karşılaştırıldığında 1, 2, 3 ve 6 nolu yöntemler için çeşitler arasındaki farklılığın önemli ( $p<0,05$ ) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.19) .

Çeşitlere göre yöntemlerin EKSCCK oranı karşılaştırıldığında tüm çeşitlerde en yüksek EKSCCK oranı TDZ'nin 0,5 mg/l dozunun kullanıldığı ortamda (1. yöntemde) meydana gelmiştir (Çizelge 4.19). Bu oran Kırık buğday çeşidinde %65,0, Kate A-1 çeşidinde %46,4, ile, Doğu 88 çeşidinde %46,1 ve Bezostaja-1 çeşidinde %42,5 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.19).

#### 4.2.2. Rejenerasyon etkinliği

Rejenerasyon etkinliği bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar çok önemli ( $p<0,01$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.20). Rejenerasyon etkinliği Kate A-1 buğday çeşidinde 3,1 adet ile en yüksek olmuş, bunu 2,9 adet ile Kırık, 2,5 adet ile Doğu 88, 2,4 adet ile Bezostaja-1 izlemiştir (Çizelge 4.21 ve Şekil 4.16). Doğu 88 ve Bezostaja-1 çeşitleri arasındaki farklılık önemsiz olmuştur. Bu çeşitler ile diğerleri arasındaki farklar ise önemli bulunmuştur.

**Çizelge 4.20.** Rejenerasyon etkinliğine ilişkin varyans analizi sonuçları

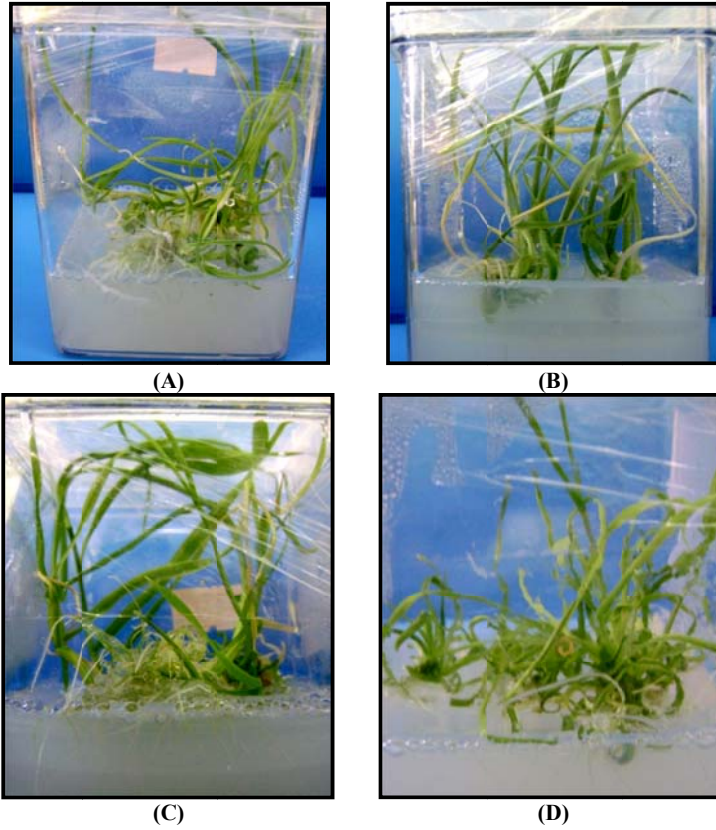
Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Çeşit	3	5,980	7,1	0,000 **
Yöntem	9	8,382	10,0	0,000 **
Çeşit x Yöntem	27	1,628	1,9	0,008 **
Hata	120	0,840		
Genel Toplam	159			

\*\* : Çok önemli ( $p<0,01$ )

**Çizelge 4.21.** Farklı sitokinin tipleri ve dozlarında çeşitlerin rejnerasyon etkinliği (adet)<sup>1</sup>

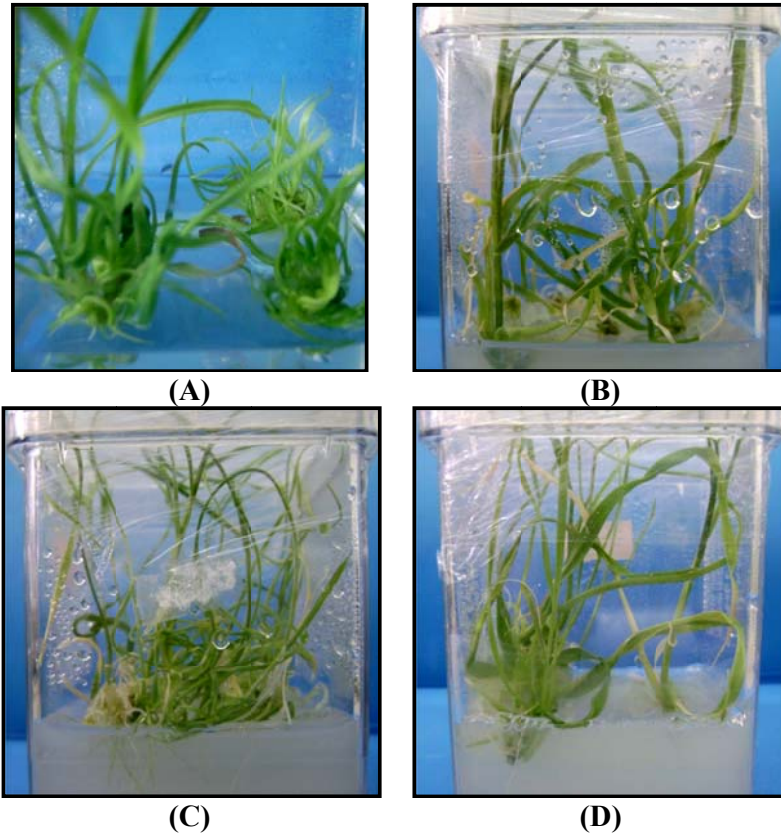
Yön.	Açıklama	Çeşitler ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ )				Ortalama
		Kırık	Doğu 88	Bezostaja-1	Kate A-1	
K	Sitokininsiz	4,1 ±0,7bA	3,3 ±0,3baA	3,0 ±0,4bAB	6,5 ±0,5aA	4,2 ±0,4A
1	0,5 mg/l TDZ	4,5±0,2aA	3,2±0,2bA	3,6±0,2bA	3,6±0,2bB	3,7±0,1A
2	1,0 mg/l TDZ	3,0±0,2 <sup>ns</sup> B	2,8±0,3AB	2,6±0,2A-C	2,5±0,2BC	2,7±0,1B
3	1,5 mg/l TDZ	2,7±0,2 <sup>ns</sup> B	2,4±0,3AB	2,3±0,3AD	2,3±0,1BC	2,4±0,1BC
4	0,5 mg/l BAP	2,4±0,2 <sup>ns</sup> B	2,5±0,2AB	2,3±0,3AD	3,0±0,2BC	2,6±0,1B
5	1,0 mg/l BAP	2,4±0,2 <sup>ns</sup> B	2,3±0,3AB	2,7±0,1AC	1,8±0,6C	2,3±0,2BC
6	1,5 mg/l BAP	2,8±0,3abB	1,8±0,6bB	1,3±0,8bCD	3,8±0,5aB	2,4±0,4BC
7	0,5 mg/l Kinetin	2,4±0,9 <sup>ns</sup> B	2,6±0,2AB	2,3±0,8AD	2,3±0,8BC	2,4±0,3BC
8	1,0 mg/l Kinetin	2,8±0,1 <sup>ns</sup> B	2,5±0,2AB	1,8±0,6BD	3,0±0,7BC	2,5±0,3BC
9	1,5 mg/l Kinetin	2,5±0,2 <sup>ns</sup> B	1,5±0,8B	1,0±0,6D	2,3±0,8BC	1,8±0,4C
	Ortalama	2,9±0,2 a	2,5±0,2 b	2,3±0,2 b	3,1±0,3 a	

1) Aynı sütunda aynı büyük harfle ve aynı satırda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. Aynı satırda “ns” ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.



**Şekil 4.16.** 4 nolu yöntemde genotiplere ait rejnere bitkilerin meganta kutularında büyütülmesi. A) Bezostaja-1, B) Doğu 88, C) Kate A-1 ve D) Kırık.

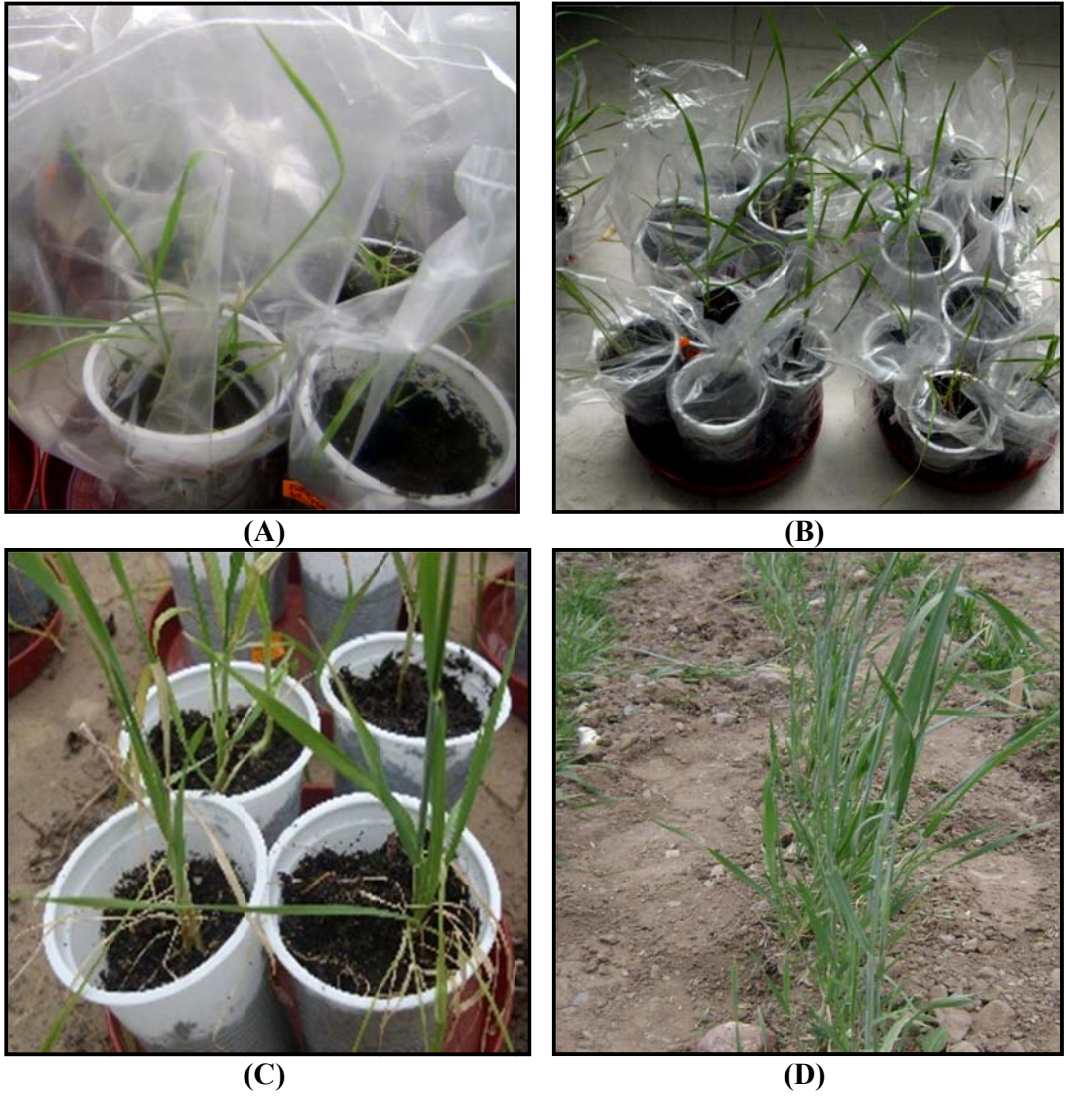
Rejenerasyon etkinliğine ilişkin varyans analizi sonuçlarına ait çizelgeden (Çizelge 4.20) görüleceği gibi, rejenerasyon etkinliği bakımından yöntemler arasındaki farklılığın çok önemli ( $p<0,01$ ) olduğu belirlenmiştir. En yüksek ortalama rejenerasyon etkinliğine sitokinin uygulanmadığı kontrol yöntemi (4,2 adet) sahip olurken, en düşük 9 nolu yöntemde (1,8 adet) belirlenmiştir (Çizelge 4.21). Bu özellik bakımından 1 nolu yöntem (3,7 adet; Şekil 4.17) ile kontrol yöntemi (4,2) arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli olmamış ve aynı grupta yer almışlar, ancak diğer yöntemlerle aralarındaki farklılıklar önemli olmuştur. Ayrıca, çeşitlerin rejenerasyon etkinliği yöntemlere göre farklılık gösterdiği için yöntem x çeşit etkileşimi çok önemli ( $p<0,01$ ) çıkmıştır (Çizelge 4.20). Her yöntem için çeşitler ortalama rejenerasyon etkinliği bakımından %5 önem düzeyinde karşılaştırıldıklarında kontrol, 1 ve 6 nolu yöntemlerde çeşitler arasındaki farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.15).



**Şekil 4.17.** 1 nolu yöntemde meydana gelen rejenerasyon bitkilerinin meganta kutularında büyütülmesi. A) Kırık, B) Kate A-1, C) Bezostaja-1 ve D) Doğu 88.

Çeşitlere göre yöntemler karşılaştırıldığında en yüksek rejenerasyon etkinliği Kırık (4,5 adet) ve Bezostaja-1 (3,6 adet) çeşitlerinde 1 nolu yöntemde meydana gelirken, Doğu 88 (3,3 adet) ve Kate A-1 (6,5) çeşidinde kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

Bu aşamada *in vitro* şartlarda elde edilen bitkiler toprak şartlarında yetiştirilmiş ancak bu şartlarda veriler alınmamıştır (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** Rejenere bitkilerin büyütülmesi. A) Bitkilerin saksılara aktarılması ve aklimasyona alınması. B) Bitkilerin aklimasyon sonrası görünümü. C) Bitkilerin serada büyütülmesi. D) Bitkilerin toprağa aktarılması ve büyütülmesi.

### 4.3. Üçüncü aşama

#### 4.3.1. Kallus oluşum oranı

Kallus oluşum oranı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda çok önemli ( $p<0,01$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.22). Ekmeklik buğday çeşitlerinde en yüksek kallus oluşum oranı (%100) Adana 99, Aksel 200, Bandırma 97, Basribey 95, Bolal 2973, Ceyhan 99, Colforitio, Daphan, Demir 2000, Doğankent 1, Gönen 98, Guadalupe, Karacabey 97, Kırgız 95, Kırkpınar 79, Momthcl, Osmaniyem, Pamukova 97, Panda, Pehlivan, Sagittario, Selimiye, Seri 82, Seyhan 95, Sivas 111/33, Sultan 95, Tahirova 2000, Yakar 99, Yayla 305, Kırık, Doğu 88, Bezostaja ve Kate A-1 çeşitlerinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.23). Diğer taraftan makarnalık çeşitlerde en yüksek kallus oluşumu %87,5 ile Mirzabey 2000 çeşidinde belirlenmiştir. Buna karşın ekmeklik Sürak M. 1593/51 ve makarnalık Ege 88 çeşitlerinde kallus meydana gelmemiştir (Çizelge 4.23 ve Şekil 4.19).

**Çizelge 4.22.** Buğday çeşitlerinin kallus oluşum oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Çeşit	90	3102,1	32,2	0,000 **
Hata	273	96,5		
Genel Toplam	363			

\*\* : Çok önemli ( $p<0,01$ )

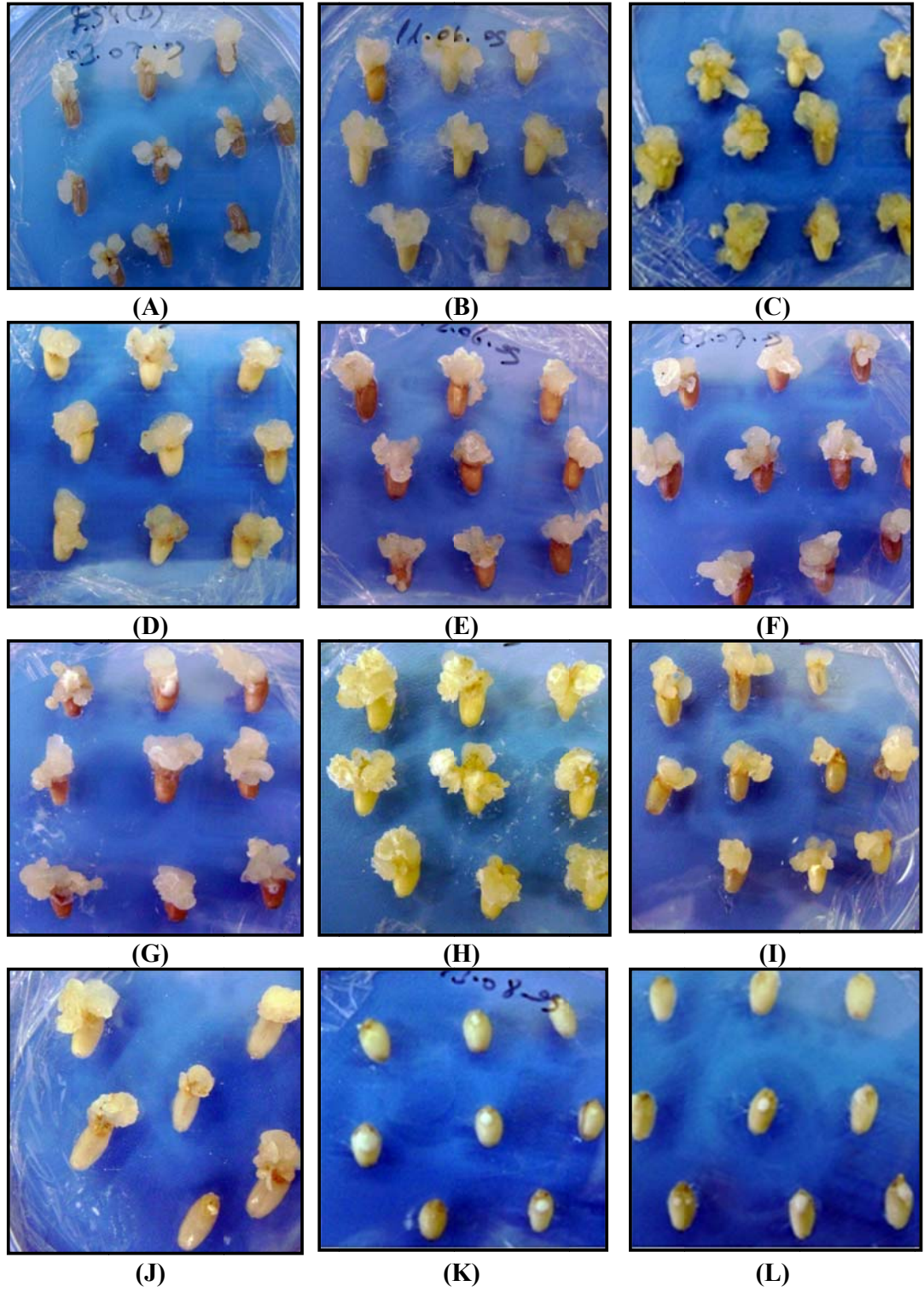
Çizelge 4.23. Buğday çeşitlerinin kallus oluşum oranları (%)

NO	ÇEŞİT	KO ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )	NO	ÇEŞİT	KO ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )
E1	Adana 99	100,0±0,0	E47	Momthel	100,0±0,0
E2	Aksel 2000	100,0±0,0	E48	Negev	93,3±4,7
E3	Alparslan	90,0±4,1	E49	Nurkent	97,5±2,5
E4	Atay 85	96,7±2,4	E50	Nenehatun	90,0±5,8
E5	Ath 2002	80,0±7,0	E51	Osmaniyem	100,0±0,0
E6	Bağcı 2002	50,0±12,2	E52	Palandöken 97	82,5±4,8
E7	Bandırma 97	100,0±0,0	E53	Pamukova 97	100,0±0,0
E8	Basribey 95	100,0±0,0	E54	Panda	100,0±0,0
E9	Bayraktar 2000	73,3±4,7	E55	Pehlivan	100,0±0,0
E10	Bolal 2973	100,0±0,0	E56	Sagittario	100,0±0,0
E11	Ceyhan 99	100,0±0,0	E57	Selimiye	100,0±0,0
E12	Colforito	100,0±0,0	E58	Seri 82	100,0±0,0
E13	Cumhuriyet 75	93,3±4,7	E59	Seyhan 95	100,0±0,0
E14	Dağdaş 94	96,7±2,4	E60	Sivas 111/33	100,0±0,0
E15	Daphan	100,0±0,0	E61	Sultan 95	100,0±0,0
E16	Dariel	97,5±2,5	E62	Sürak M. 1593/51	0,0±0,0
E17	Demir 2000	100,0±0,0	E63	Tahirova 2000	100,0±0,0
E18	Doğankent 1	100,0±0,0	E64	Tekirdağ	97,5±2,5
E19	Eser	100,0±0,0	E65	Türkmen	90,0±10,0
E20	Esperia	93,3±2,4	E66	Uzunyayla	87,5±12,5
E21	Flamura-85	100,0±0,0	E67	Yakar 99	100,0±0,0
E22	Galil	56,7±6,2	E68	Yayla 305	100,0±0,0
E23	Gelibolu	100,0±0,0	E69	Yıldırım	86,7±4,7
E24	Genç 99	82,5±2,5	E70	Yıldız 98	83,3±2,4
E25	Gerek 79	93,3±2,4	E71	Yunak	95,0±2,9
E26	Golia	82,5±8,5	E72	Yüreğir 89	93,3±2,4
E27	Göksu 99	42,5±4,8	E73	Zencirci 2002	77,5±2,5
E28	Gönen 98	100,0±0,0	E74	Ziyabey 98	55,0±8,7
E29	Guadalupe	100,0±0,0	E75	Kirik	100,0±0,0
E30	Gün 91	90,0±5,8	E76	Doğu 88	100,0±0,0
E31	Hawk	60,0±9,1	E77	Bezostaja-1	100,0±0,0
E32	Haymana 79	26,7±2,4	E78	Kate A-1	100,0±0,0
E33	İkizce 96	65,0±2,9	M1	Altın 40/98	46,7±6,2
E34	İzmir 85	43,3±4,7	M2	Altıntaş 95	25,0±2,9
E35	Karacabey 97	100,0±0,0	M3	Ankara 98	42,5±6,3
E36	Karacadağ 98	56,7±2,4	M4	Çakmak 79	50,0±5,8
E37	Karahan 99	2,5±2,5	M5	Çeşit 1252	43,3±4,7
E38	Karasu 90	90,0±4,1	M6	Ege 88	0,0±0,0
E39	Kaşif Bey 95	53,3±6,2	M7	Gediz 75	30,0±4,1
E40	Kınacı 97	36,7±2,4	M8	Kızıltan 91	32,5±6,3
E41	Kırgız 95	100,0±0,0	M9	Kunduru 1149	43,3±2,4
E42	Kırkpınar 79	100,0±0,0	M10	Mirzabey 2000	87,5±2,5
E43	Konya 2002	65,0±6,5	M11	Salihli 92	50,0±4,1
E44	Kutluk 94	77,5±7,5	M12	Selçuklu 97	67,5±2,5
E45	Lancer	93,3±2,4	M13	Yılmaz 98	47,5±2,5
E46	Mızrak	87,5±2,5			

LSD (0,05) = 13,7

E: Ekmeklik buğday

M: Makarnalık buğday



**Şekil 4.19.** Bazı ekmeklik ve makarnalık çeşitlerde kallus oluşum ortamında 15. gündeki kallusların görünümü. A) Panda, B) Aksel 2000, C) Basribey 95, D) Doğankent 1, E) Demir 2000, F) Pamukova 97, G) Pehlivan, H) Türkmen, I) Yakar 99, J) Mirzabey 2000, K) Sürak M. 1593/51 ve L) Ege 88.

### 4.3.2. Embriyogenik kallus oluşum oranı

#### 4.3.2.a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (ESEKO) oranı

ESEKO oranına ilişkin varyans analizi sonuçları izelge 4.24, çeşitlerin ortalama ESEKO oranları ise izelge 4.25'te verilmiştir. Çizelge 4.24 incelendiğinde ESEKO oranına çeşidin etkisinin çok önemli ( $p<0,01$ ) olduğu belirlenmiştir. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranları yönünden çeşitler karşılaştırıldıklarında, en yüksek ESEKO oranı (%100) Gelibolu, Guadalupe, Kırkpınar 79 ve Kırık ekmeklik buğday çeşitlerinde meydana gelmiştir (izelge 4.25 ve Şekil 4.20). Makarnalık buğday çeşitlerinde ise en yüksek ESEKO oranı kallus oluşum oranında olduğu gibi Mirzabey 2000 (%27,5) eşidinde belirlenmiştir. Ekmeklik Srak M. 1593/51 ile makarnalık Ege 88 buğday çeşitlerinde hiç kallus oluşmadığı için bu çeşitlerin ESEKO oranları %0,0 olmuştur (izelge 4.25). Diğer taraftan, makarnalık Altın 40/98, Gediz 75, Kunduru 1149 ve Salihli 92 eşitlerinde kallus oluşmasına rağmen embriyogenik kallus meydana gelmemiştir (izelge 4.25 ve Şekil 4.20).

**Çizelge 4.24.** Buğday eşitlerinin ESEKO oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
eşit	90	2731,3	36,3	0,000 **
Hata	273	75,3		
Genel Toplam	363			

\*\* : Çok önemli ( $p<0,01$ )

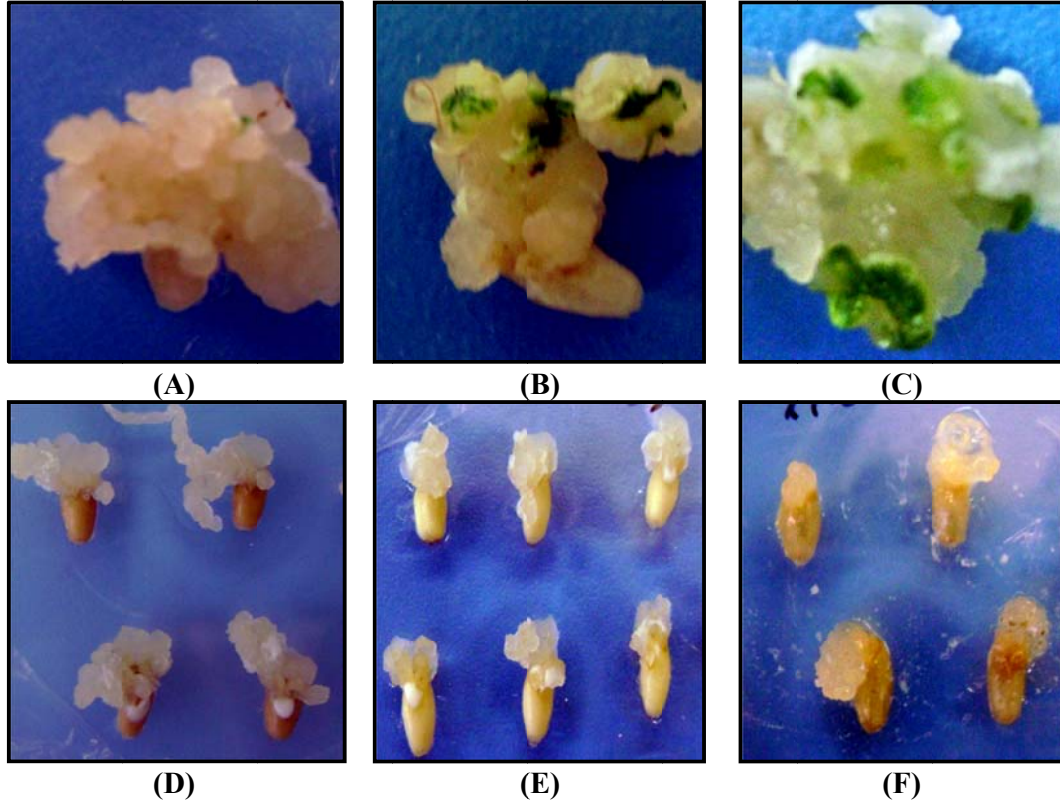
Çizelge 4.25. Buğday çeşitlerinin ESEKO oranları (%)

NO	ÇEŞİT	ESEKO ( $\bar{X} \mp s_{\bar{X}}$ )	NO	ÇEŞİT	ESEKO ( $\bar{X} \mp s_{\bar{X}}$ )
E1	Adana 99	82,5±6,3	E47	Momthcl	92,5±2,5
E2	Aksel 2000	76,7±2,4	E48	Negev	30,0±4,1
E3	Alparslan	70,0±4,1	E49	Nurkent	85,0±5,0
E4	Atay 85	66,7±2,4	E50	Nenehatun	82,5±2,5
E5	Ath 2002	66,7±4,7	E51	Osmaniyem	97,5±2,5
E6	Bağcı 2002	20,0±7,1	E52	Palandöken 97	65,0±15,5
E7	Bandırma 97	90,0±0,0	E53	Pamukova 97	33,3±4,7
E8	Basribey 95	73,3±2,4	E54	Panda	70,0±4,1
E9	Bayraktar 2000	63,3±2,4	E55	Pehlivan	4,0±0,0
E10	Bolal 2973	86,7±2,4	E56	Sagittario	52,5±2,5
E11	Ceyhan 99	86,7±4,7	E57	Selimiye	73,3±2,4
E12	Colfiorito	90,0±0,0	E58	Seri 82	80,0±0,0
E13	Cumhuriyet 75	83,3±11,8	E59	Seyhan 95	57,5±2,5
E14	Dağdaş 94	90,0±0,0	E60	Sivas 111/33	82,5±2,5
E15	Daphan	86,7±2,4	E61	Sultan 95	72,5±4,8
E16	Dariel	97,5±2,5	E62	Sürak M. 1593/51	0,0±0,0
E17	Demir 2000	93,3±2,4	E63	Tahirova 2000	77,5±2,5
E18	Doğankent 1	93,3±2,4	E64	Tekirdağ	75,0±2,9
E19	Eser	96,7±2,4	E65	Türkmen	60,0±10,8
E20	Esperia	73,3±2,4	E66	Uzunyayla	55,0±8,7
E21	Flamura-85	70,0±0,0	E67	Yakar 99	77,5±2,5
E22	Galil	43,3±8,5	E68	Yayla 305	32,5±2,5
E23	Gelibolu	100,0±0,0	E69	Yıldırım	56,7±2,4
E24	Genç 99	82,5±2,5	E70	Yıldız 98	66,7±2,4
E25	Gerek 79	93,3±2,4	E71	Yunak	75,0±2,9
E26	Golia	45,0±5,0	E72	Yüreğir 89	50,0±4,1
E27	Göksu 99	30,0±4,1	E73	Zencirci 2002	50,0±0,0
E28	Gönen 98	80,0±0,0	E74	Ziyabey 98	32,5±12,5
E29	Guadalupe	100,0±0,0	E75	Kırık	100,0±0,0
E30	Gün 91	37,5±2,5	E76	Doğu 88	92,5±2,5
E31	Hawk	30,0±7,1	E77	Bezostaja-1	95,0±5,0
E32	Haymana 79	20,0±0,0	E78	Kate A-1	97,5±2,5
E33	İkizce 96	35,0±2,9	M1	Altın 40/98	0,0±0,0
E34	İzmir 85	30,0±4,1	M2	Altıntaç 95	5,0±2,9
E35	Karacabey 97	90,0±0,0	M3	Ankara 98	5,0±2,5
E36	Karacadağ 98	43,3±4,7	M4	Çakmak 79	0,0±0,0
E37	Karahan 99	0,0±0,0	M5	Çeşit 1252	6,7±4,7
E38	Karasu 90	22,5±2,5	M6	Ege 88	0,0±0,0
E39	Kaşif Bey 95	53,3±6,2	M7	Gediz 75	0,0±0,0
E40	Kınacı 97	6,7±4,7	M8	Kızıltan 91	15,0±5,0
E41	Kırgız 95	32,5±2,5	M9	Kunduru 1149	0,0±0,0
E42	Kırkpınar 79	100,0±0,0	M10	Mirzabey 2000	27,5±4,8
E43	Konya 2002	40,0±10,0	M11	Salihli 92	0,0±0,0
E44	Kutluk 94	62,5±8,5	M12	Selçuklu 97	17,5±10,3
E45	Lancer	63,3±6,2	M13	Yılmaz 98	7,5±2,5
E46	Mızrak	42,5±6,3			

LSD (0,05) = 12,1

E: Ekmeklik buğday

M: Makarnalık buğday



**Şekil 4.20.** Bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde embriyogenik ve embriyogenik olmayan kallus oluşumu. A) Kırkpınar 79 (Kallus oluşum ortamında 21. günde), B) Guadalupe (Rejenerasyon ortamında 4. günde), C) Kırık (Rejenerasyon ortamında 4. günde), D) Gelibolu (Kallus oluşum ortamında 21. günde), E) Mirzabey 2000 (Kallus oluşum ortamında 21. günde) ve F) Altın 40/98 (Kallus oluşum ortamında 21.günde).

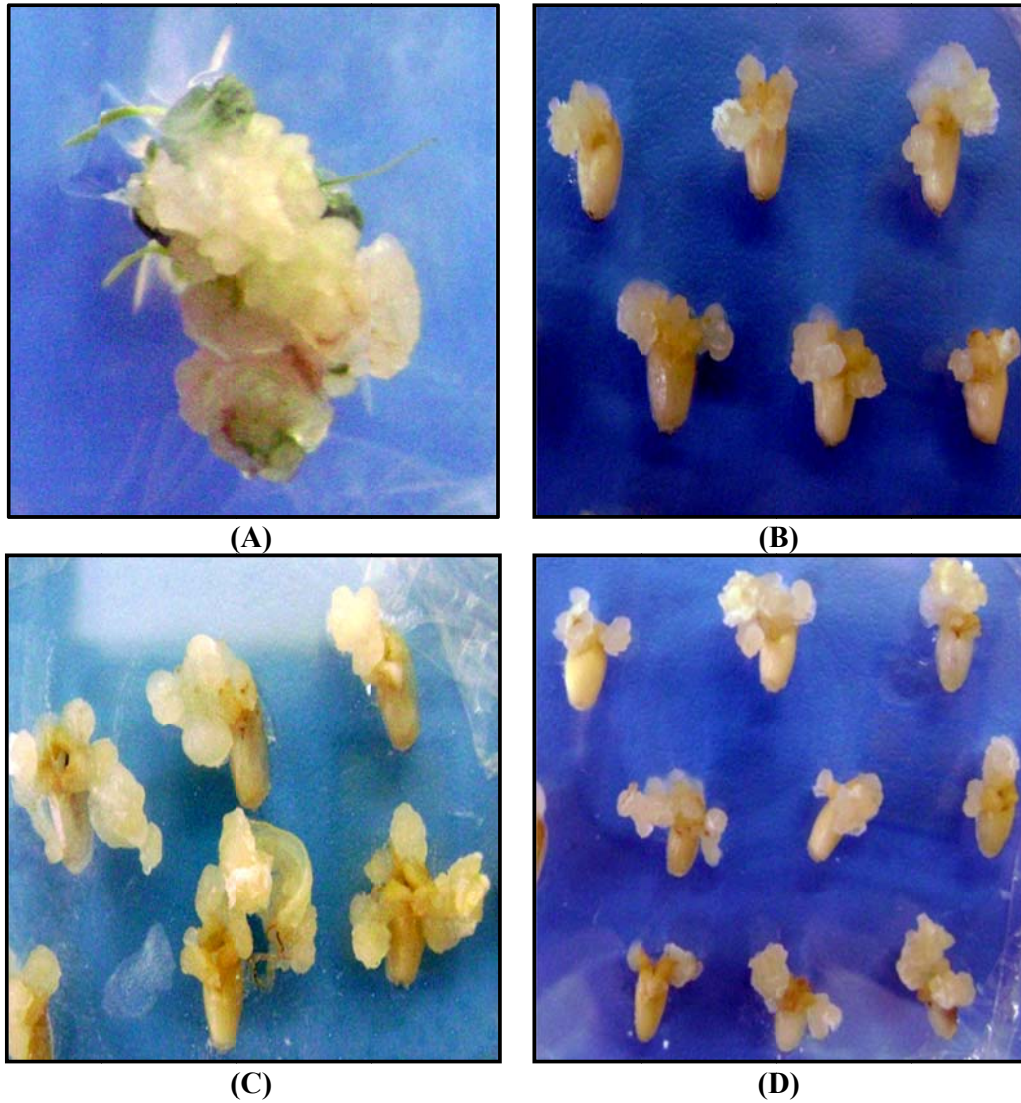
#### 4.3.2.b. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (KSEKO) oranı

Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumunda olduğu gibi kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı bakımından da çeşidin etkisi çok önemli ( $p < 0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.26). Ortalama kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı Dariel, Gelibolu, Genç 99, Gerek 79, Guadalupe, Kaşifbey, Kırkpınar 79 ve Kırık ekmeklik buğday çeşitlerinde %100 olmuştur (Çizelge 4.27 ve Şekil 4.21). Buna karşın, makarnalık buğdaylarda en yüksek KSEKO oranı %44,2 ile Kızıltan 91 çeşidinde gözlenmiştir. ESEKO oranında olduğu gibi Ekmeklik Sürak M. 1593/51 ile makarnalık Altın 40/98, Ege 88, Gediz 75, Kunduru 1149 ve Salihli 92 çeşitlerinde embriyogenik kallus oluşmamıştır ve KSEKO oranı %0,0 olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 4.26.** Buğday çeşitlerinin KSEKO oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p	
Çeşit	90	2762,0	22,5	0,000	**
Hata	273	123,0			
Genel Toplam	363				

\*\* : Çok önemli ( $p < 0,01$ ).



**Şekil 4.21.** Bazı ekmeklik ve makarnalık genotiplerde embriyogenik kallus oluşumu. A) Dariel (Rejenerasyon ortamında 5. günde), B) Guadalupe (Kallus oluşum ortamında 21. günde), C) Kaşif Bey 95 (Kallus oluşum ortamında 21. günde) ve D) Kırkpınar (Kallus oluşum ortamında 21. günde).

Çizelge 4.27. Buğday çeşitlerinin KSEKO oranları (%)

NO	ÇEŞİT	KSEKO ( $\bar{X} \mp s_{\bar{X}}$ )	NO	ÇEŞİT	KSEKO ( $\bar{X} \mp s_{\bar{X}}$ )
E1	Adana 99	82,5±6,3	E47	Momthcl	92,5±2,5
E2	Aksel 2000	76,7±2,4	E48	Negev	31,8±3,1
E3	Alparslan	77,6±1,0	E49	Nurkent	87,2±4,7
E4	Atay 85	69,2±3,6	E50	Nenehatun	92,5±4,8
E5	Ath 2002	83,7±1,4	E51	Osmaniyem	97,5±2,5
E6	Bağcı 2002	34,4±12,5	E52	Palandöken 97	78,5±18,0
E7	Bandırma 97	90,0±0,0	E53	Pamukova 97	33,3±4,7
E8	Basribey 95	73,3±2,4	E54	Panda	70,0±4,1
E9	Bayraktar 2000	87,2±5,1	E55	Pehlivan	40,0±0,0
E10	Bolal 2973	86,7±2,4	E56	Sagittario	52,5±2,5
E11	Ceyhan 99	86,7±4,7	E57	Selimiye	73,3±2,4
E12	Colfiorito	90,0±0,0	E58	Seri 82	80,0±0,0
E13	Cumhuriyet 75	87,9±8,9	E59	Seyhan 95	57,5±2,5
E14	Dağdaş 94	93,3±2,4	E60	Sivas 111/33	82,5±2,5
E15	Daphan	86,7±2,4	E61	Sultan 95	72,5±4,8
E16	Dariel	100,0±0,0	E62	Sürak M. 1593/51	0,0±0,0
E17	Demir 2000	93,3±2,4	E63	Tahirova 2000	77,5±2,5
E18	Doğankent 1	93,3±2,4	E64	Tekirdağ	76,9±2,4
E19	Eser	96,7±2,4	E65	Türkmen	65,0±6,5
E20	Esperia	78,5±0,5	E66	Uzunyayla	62,5±2,5
E21	Flamura-85	70,0±0,0	E67	Yakar 99	77,5±2,5
E22	Galil	74,5±10,3	E68	Yayla 305	32,5±2,5
E23	Gelibolu	100,0±0,0	E69	Yıldırım	66,3±5,9
E24	Genç 99	100,0±0,0	E70	Yıldız 98	80,1±2,7
E25	Gerek 79	100,0±0,0	E71	Yunak	79,4±5,5
E26	Golia	55,8±6,6	E72	Yüreğir 89	53,4±3,3
E27	Göksu 99	72,5±11,1	E73	Zencirci 2002	64,7±2,2
E28	Gönen 98	80,0±0,0	E74	Ziyabey 98	54,4±11,3
E29	Guadalupe	100,0±0,0	E75	Kırık	100,0±0,0
E30	Gün 91	41,9±2,8	E76	Doğu 88	92,5±2,5
E31	Hawk	51,5±10,5	E77	Bezostaja-1	95,0±5,0
E32	Haymana 79	77,1±7,9	E78	Kate A-1	97,5±2,5
E33	İkizce 96	53,6±2,1	M1	Altın 40/98	0,0±0,0
E34	İzmir 85	69,0±4,2	M2	Altıntaç 95	16,7±9,6
E35	Karacabey 97	90,0±0,0	M3	Ankara 98	8,3±4,2
E36	Karacadağ 98	75,8±5,5	M4	Çakmak 79	0,0±0,0
E37	Karahan 99	0,0±0,0	M5	Çeşit 1252	13,8±9,4
E38	Karasu 90	25,1±2,9	M6	Ege 88	0,0±0,0
E39	Kaşif Bey 95	100,0±0,0	M7	Gediz 75	0,0±0,0
E40	Kınacı 97	21,2±15,7	M8	Kızıltan 91	44,2±6,6
E41	Kırgız 95	32,5±2,5	M9	Kunduru 1149	0,0±0,0
E42	Kırkpınar 79	100,0±0,0	M10	Mirzabey 2000	31,9±6,6
E43	Konya 2002	60,1±9,8	M11	Salihli 92	0,0±0,0
E44	Kutluk 94	80,7±8,9	M12	Selçuklu 97	25,0±14,7
E45	Lancer	68,1±7,4	M13	Yılmaz 98	15,0±5,0
E46	Mızrak	49,3±9,0			

LSD (0,05) = 15,4

E: Ekmeklik buğday

M: Makarnalık buğday

### 4.3.3. Cevap veren embriyogenik kallus oranı

#### 4.3.3.a Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı

ESCEK oranına ilişkin varyans analizi sonuçları ile çeşitlerin ortalama ESCEK oranları sırasıyla Çizelge 4.28 ve Çizelge 4.29’da verilmiştir. ESCEK oranına çeşidin etkisi çok önemli ( $p<0,01$ ) olmuştur. En yüksek ESCEK oranı %65,0 ile Kırık çeşidinde gözlenmiştir. Bunu azalan sıra ile Nenehatun (%52,5), Gönen (%46,7), Kate A-1 (%45,0), Doğu 88 (%42,5), Bezostaja-1 (%40,0), Kaşif Bey 95 (%36,7), Kırkpınar 79 (%36,7), Genç 99 (%32,5) izlemiş ve diğer çeşitlerin ESCEK oranları %30’un altında olmuştur (Çizelge 4.29 ve Şekil 4.22). Ekmeklik buğday çeşitlerinden kallus oluşmayan Sürak M. 1593/51 ile embriyogenik kallus oluşturan Bağcı 2002, Haymana 79, İkizce 96, Karahan 99, Kınacı 97, Sagittario, Yayla 305, Yüreğir 89 ve Zencirci 2002 çeşitlerinde sürgün meydana gelmemiştir. Bu nedenle cevap veren embriyogenik kallus oranları %0,0 olmuştur (Çizelge 4.29). Yine, makarnalık buğdayların [Ege 88 (hiç kallus oluşumu yok), Altın 40/98, Gediz 75, Kunduru 1149 ve Salihli 92 (hiç embriyogenik kallus oluşumu yok)] hiç birinde bitki rejenerasyonu meydana gelmemiştir (%0,0) (Çizelge 4.29).

**Çizelge 4.28.** Buğday çeşitlerinin ESCEK oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Çeşit	90	264,2	15,3	0,000 **
Hata	273	17,3		
Genel Toplam	363			

\*\* : Çok önemli ( $p<0,01$ ).

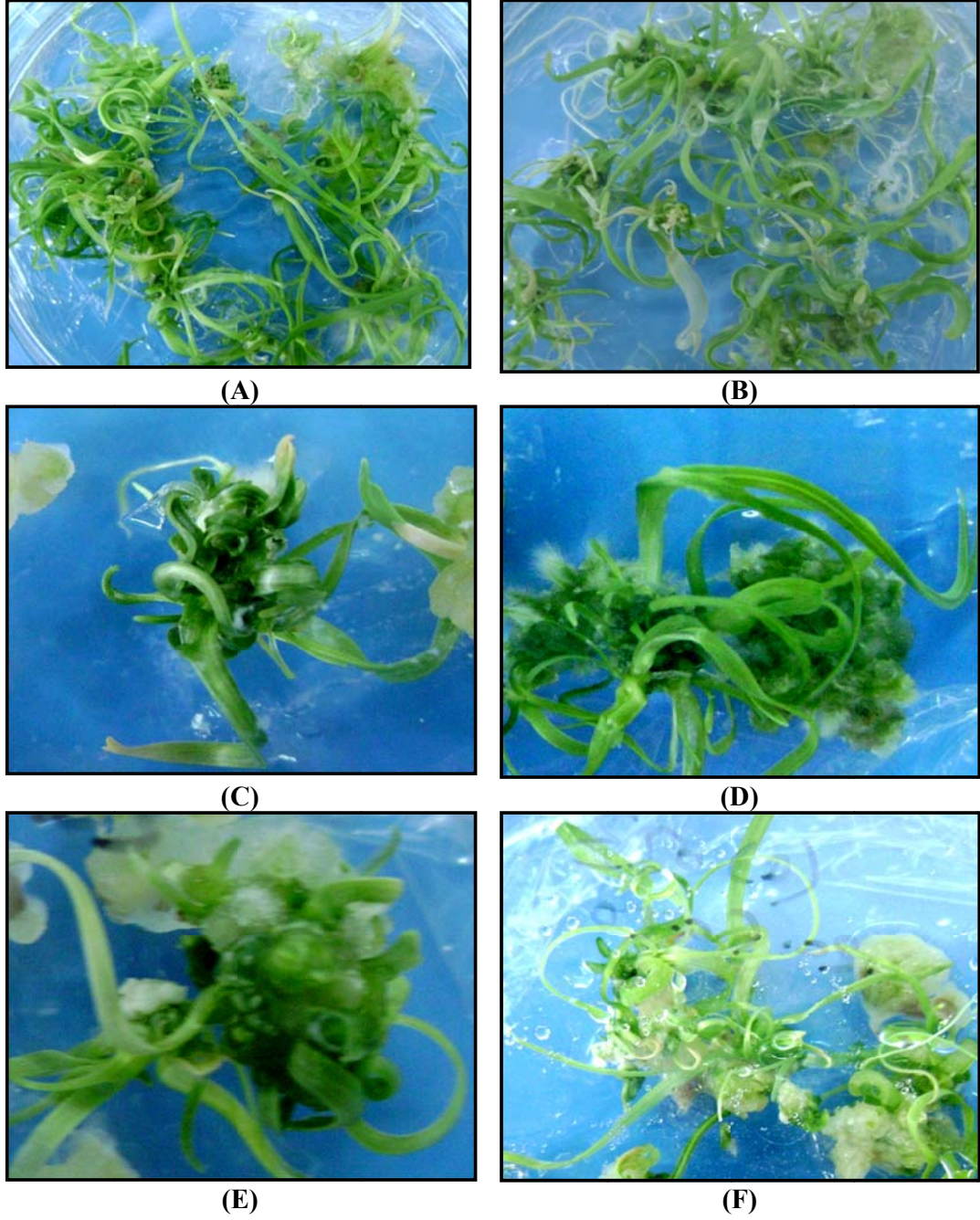
Çizelge 4.29. Buğday çeşitlerin ESCEK oranları (%)

NO	ÇEŞİT	ESCEK ( $\bar{X} \mp s_{\bar{X}}$ )	NO	ÇEŞİT	ESCEK ( $\bar{X} \mp s_{\bar{X}}$ )
E1	Adana 99	5,0±2,9*	E47	Momthcl	15,0±2,9
E2	Aksel 2000	16,7±2,4	E48	Negev	3,3±2,4
E3	Alparslan	10,0±7,1	E49	Nurkent	25,0±5,0
E4	Atay 85	13,3±2,4	E50	Nenehatun	52,5±9,5
E5	Ath 2002	6,7±2,4	E51	Osmaniyem	27,5±2,5
E6	Bağcı 2002	0,0±0,0	E52	Palandöken 97	27,5±2,5
E7	Bandırma 97	20,0±5,8	E53	Pamukova 97	3,3±2,4
E8	Basribey 95	6,7±4,7	E54	Panda	3,3±2,4
E9	Bayraktar 2000	13,3±4,7	E55	Pehlivan	3,3±2,4
E10	Bolal 2973	3,3±2,4	E56	Sagittario	0,0±0,0
E11	Ceyhan 99	10,0±4,1	E57	Selimiye	3,3±2,4
E12	Colfiorito	6,7±2,4	E58	Seri 82	10,0±0,0
E13	Cumhuriyet 75	20,0±8,2	E59	Seyhan 95	12,5±4,8
E14	Dağdaş 94	16,7±2,4	E60	Sivas 111/33	15,0±6,5
E15	Daphan	10,0±4,0	E61	Sultan 95	12,5±4,8
E16	Dariel	27,5±2,5	E62	Sürak M. 1593/51	0,0±0,0
E17	Demir 2000	20,0±0,0	E63	Tahirova 2000	17,5±4,8
E18	Doğankent 1	6,7±2,4	E64	Tekirdağ	7,5±2,5
E19	Eser	16,7±2,4	E65	Türkmen	12,5±4,8
E20	Esperia	3,3±2,4	E66	Uzunyayla	15,0±6,5
E21	Flamura-85	6,7±2,4	E67	Yakar 99	2,5±2,5
E22	Galil	6,7±2,4	E68	Yayla 305	0,0±0,0
E23	Gelibolu	10,0±0,0	E69	Yıldırım	3,3±2,4
E24	Genç 99	32,5±4,8	E70	Yıldız 98	13,3±4,7
E25	Gerek 79	20,0±0,0	E71	Yunak	2,5±2,5
E26	Golia	2,5±2,5	E72	Yüreğir 89	0,0±0,0
E27	Göksu 99	2,5±2,5	E73	Zencirci 2002	0,0±0,0
E28	Gönen 98	46,7±6,2	E74	Ziyabey 98	7,5±4,8
E29	Guadalupe	13,3±2,4	E75	Kırık	65,0±2,9
E30	Gün 91	7,5±4,8	E76	Doğu 88	42,5±2,5
E31	Hawk	2,5±2,5	E77	Bezostaja-1	40,0±0,0
E32	Haymana 79	0,0±0,0	E78	Kate A-1	45,0±2,9
E33	İkizce 96	0,0±0,0	M1	Altın 40/98	0,0±0,0
E34	İzmir 85	6,7±2,4	M2	Altıntaş 95	0,0±0,0
E35	Karacabey 97	10,0±0,0	M3	Ankara 98	0,0±0,0
E36	Karacadağ 98	10,0±4,1	M4	Çakmak 79	0,0±0,0
E37	Karahan 99	0,0±0,0	M5	Çeşit 1252	0,0±0,0
E38	Karasu 90	2,5±2,5	M6	Ege 88	0,0±0,0
E39	Kaşif Bey 95	36,7±2,0	M7	Gediz 75	0,0±0,0
E40	Kınacı 97	0,0±0,0	M8	Kızıltan 91	0,0±0,0
E41	Kırgız 95	5,0±5,0	M9	Kunduru 1149	0,0±0,0
E42	Kırkpınar 79	36,7±2,4	M10	Mirzabey 2000	0,0±0,0
E43	Konya 2002	7,5±4,8	M11	Salihli 92	0,0±0,0
E44	Kutluk 94	12,5±6,3	M12	Selçuklu 97	0,0±0,0
E45	Lancer	23,3±8,5	M13	Yılmaz 98	0,0±0,0
E46	Mızrak	2,5±2,5			

LSD (0,05) = 5,8

E: Ekmeklik buğday

M: Makarnalık buğday



**Şekil 4. 22.** Bazı çeşitlerin embriyogenik kalluslarından sürgünlerin oluşumu. A) Nenehatun (Rejenerasyon ortamında 30. günde), B) Kaşif Bey 95 (Rejenerasyon ortamında 21. günde), C) Dariel (Rejenerasyon ortamında 21. günde), D) Gönen 98 (Rejenerasyon ortamında 21. günde), E) Genç 99 (Rejenerasyon ortamında 21. günde) ve F) Kırık (Rejenerasyon ortamında 26. günde) .

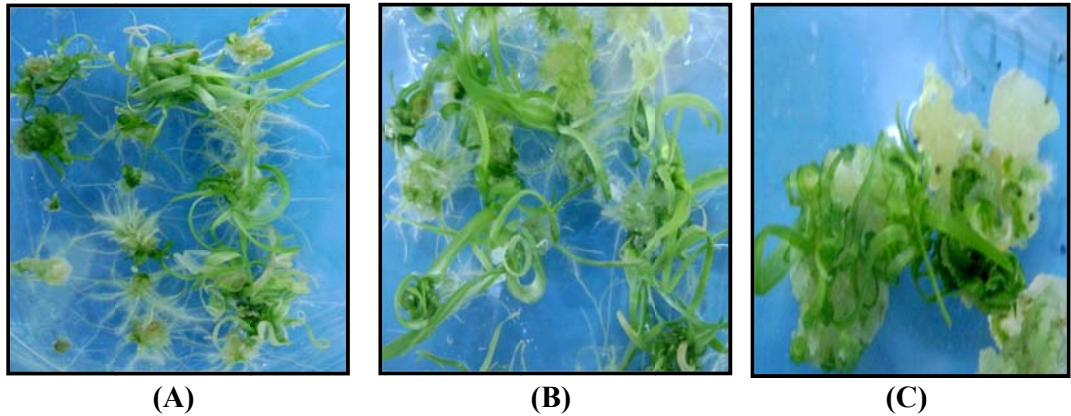
#### 4.3.3.b. Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (KSCEK) oranı

Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda çok önemli ( $p<0,01$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.30). En yüksek KSCEK oranı ekmeklik Kaşif Bey 95 (%67,5) çeşidinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.31). Bu çeşidi Kırık (%65,0), Nenehatun (%60,0), Gönen 98 (%46,7), Kate A-1 (%45,0), Doğu 88 (%42,5), Bezostaja-1 (%40,0), Genç 99 (%39,2), Kırkpınar 79 (%36,7) ve KSCEK oranı %30'un altında olan diğer çeşitler izlemiştir (Çizelge 4.31 ve Şekil 4.23). Ekmeklik buğdaylardan Sürak M. 1593/51, Bağcı 2002, Haymana 79, İkizce 96, Karahan 99, Kınacı 97, Sagittario, Yayla 305, Yüreğir 89 ve Zencirci 2002 çeşitlerinde ve makarnalık buğdayların tamamında KSCEK oranları %0,0 olmuştur (Çizelge 4.31).

**Çizelge 4.30.** Buğday çeşitlerinin KSCEK oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Çeşit	90	350,4	11,6	0,000 **
Hata	273	30,3		
Genel Toplam	363			

\*\* : Çok önemli ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4.23.** Bazı çeşitlerin rejenerasyon ortamında 15. gündeki embriyogenik kalluslarından sürgünlerin oluşumu. A) Kaşif Bey 95, B) Gönen 98 ve C) Kırkpınar.

Çizelge 4.31. Buğday çeşitlerinin KSCEK oranları (%)

NO	ÇEŞİT	KSCEK ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )	NO	ÇEŞİT	KSCEK ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )
E1	Adana 99	5,0±2,9*	E47	Momthcl	15,0±2,9
E2	Aksel 2000	16,7±2,4	E48	Negev	4,0±3,0
E3	Alparslan	12,2±8,8	E49	Nurkent	25,6±4,8
E4	Atay 85	13,7±2,2	E50	Nenehatun	60,0±13,5
E5	Athı 2002	9,2±3,4	E51	Osmaniyem	27,5±2,5
E6	Bağcı 2002	0,0±0,0	E52	Palandöken 97	33,6±3,6
E7	Bandırma 97	20,0±5,8	E53	Pamukova 97	3,3±2,4
E8	Basribey 95	6,7±4,7	E54	Panda	3,3±2,4
E9	Bayraktar 2000	17,0±5,9	E55	Pehlivan	3,3±2,4
E10	Bolal 2973	3,3±2,4	E56	Sagittario	0,0±0,0
E11	Ceyhan 99	10,0±4,1	E57	Selimiye	3,3±2,4
E12	Colfiorito	6,7±2,4	E58	Seri 82	10,0±0,0
E13	Cumhuriyet 75	20,4±8,2	E59	Seyhan 95	12,5±4,8
E14	Dağdaş 94	17,1±2,1	E60	Sivas 111/33	15,0±6,5
E15	Daphan	10,0±4,0	E61	Sultan 95	12,5±4,8
E16	Dariel	28,3±2,9	E62	Sürak M. 1593/51	0,0±0,0
E17	Demir 2000	20,0±0,0	E63	Tahirova 2000	17,5±4,8
E18	Doğankent 1	6,7±2,4	E64	Tekirdağ	7,8±2,6
E19	Eser	16,7±2,4	E65	Türkmen	12,5±4,8
E20	Esperia	3,4±2,4	E66	Uzunyayla	15,0±6,5
E21	Flamura-85	6,7±2,4	E67	Yakar 99	2,5±2,5
E22	Galil	10,7±3,7	E68	Yayla 305	0,0±0,0
E23	Gelibolu	10,0±0,0	E69	Yıldırım	3,5±2,4
E24	Genç 99	39,2±5,4	E70	Yıldız 98	16,5±5,9
E25	Gerek 79	21,5±0,5	E71	Yunak	2,5±2,5
E26	Golia	4,2±4,2	E72	Yüreğir 89	0,0±0,0
E27	Göksu 99	5,0±5,0	E73	Zencirci 2002	0,0±0,0
E28	Gönen 98	46,7±6,2	E74	Ziyabey 98	11,2±6,6
E29	Guadalupe	13,3±2,4	E75	Kırık	65,0±2,9
E30	Gün 91	8,1±4,9	E76	Doğu 88	42,5±2,5
E31	Hawk	3,1±3,1	E77	Bezostaja-1	40,0±0,0
E32	Haymana 79	0,0±0,0	E78	Kate A-1	45,0±2,9
E33	İkizce 96	0,0±0,0	M1	Altın 40/98	0,0±0,0
E34	İzmir 85	13,8±4,7	M2	Altıntaç 95	0,0±0,0
E35	Karacabey 97	10,0±0,0	M3	Ankara 98	0,0±0,0
E36	Karacadağ 98	17,7±6,8	M4	Çakmak 79	0,0±0,0
E37	Karahan 99	0,0±0,0	M5	Çeşit 1252	0,0±0,0
E38	Karasu 90	2,8±2,8	M6	Ege 88	0,0±0,0
E39	Kaşif Bey 95	67,5±6,3	M7	Gediz 75	0,0±0,0
E40	Kınacı 97	0,0±0,0	M8	Kızıltan 91	0,0±0,0
E41	Kırgız 95	5,0±5,0	M9	Kunduru 1149	0,0±0,0
E42	Kırkpınar 79	36,7±2,4	M10	Mirzabey 2000	0,0±0,0
E43	Konya 2002	11,2±6,6	M11	Salihli 92	0,0±0,0
E44	Kutluk 94	16,8±9,2	M12	Selçuklu 97	0,0±0,0
E45	Lancer	24,8±9,3	M13	Yılmaz 98	0,0±0,0
E46	Mızrak	3,1±3,1			

LSD (0,05) = 7,7

E: Ekmeklik buğday

M: Makarnalık buğday

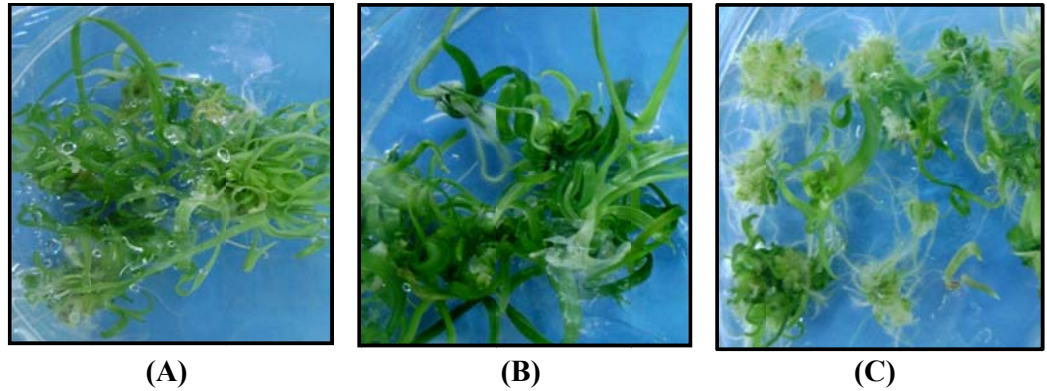
#### 4.3.3.c Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCEK) oranı

EKSCEK oranı çeşitlere göre değişmiş ve çeşitler arasındaki farklılıklar çok önemli ( $p<0,01$ ) olmuştur (Çizelge 4.32). Ekmeklik Kaşif Bey 95 çeşidi %67,5 ile en yüksek EKSCEK oranına sahip olmuştur (Çizelge 4.33). Bunu azalan sıra ile Kırık (%65,0), Nenehatun (%63,9), Gönen (58,3), Kate A-1 (%46,4), Doğu 88 (%46,1), Bezostaja-1 (%42,5), Genç 99 (39,2), Kırkpınar 79 (%36,7), Lancer (%34,2) ve diğer çeşitler izlemiştir (Şekil 4.24). ESCEK ve KSCEK oranlarında olduğu gibi, ekmeklik buğdaylardan Sürak M. 1593/51, Bağcı 2002, Haymana 79, İkizce 96, Karahan 99, Kınacı 97, Sagittario, Yayla 305, Yüreğir 89 ve Zencirci 2002 çeşitlerinde ve makarnalık buğdayların tamamının EKSCEK oranları %0,0 olmuştur (Çizelge 4.33).

**Çizelge 4.32.** Buğday çeşitlerinin EKSCEK oranlarına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Çeşit	90	421,7	6,9	0,000 **
Hata	273	61,0		
Genel Toplam	363			

\*\* : Çok önemli ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4.24.** Bazı çeşitlerin rejenerasyon ortamında 15. gündeki embriyogenik kalluslarından sürgünlerin oluşumu. A) Kaşif Bey 95, B) Nenehatun ve C) Lancer.

Çizelge 4.33. Buğday çeşitlerinin EKSCCK oranları (%)

NO	ÇEŞİT	EKSCCK ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )	NO	ÇEŞİT	EKSCCK ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )
E1	Adana 99	6,2±3,6	E47	Momthcl	16,4±3,4
E2	Aksel 2000	22,0±3,4	E48	Negev	15,3±11,9
E3	Alparslan	16,1±11,8	E49	Nurkent	28,8±3,7
E4	Atay 85	19,9±3,1	E50	Nenehatun	63,9±12,1
E5	Ath 2002	10,8±3,9	E51	Osmaniyem	28,3±2,9
E6	Bağcı 2002	0,0±0,0	E52	Palandöken 97	53,4±15,6
E7	Bandırma 97	22,2±6,4	E53	Pamukova 97	8,7±5,9
E8	Basribey 95	8,5±5,9	E54	Panda	5,4±3,9
E9	Bayraktar 2000	20,7±7,4	E55	Pehlivan	8,3±5,9
E10	Bolal 2973	4,1±2,9	E56	Sagittario	0,0±0,0
E11	Ceyhan 99	11,0±4,1	E57	Selimiye	4,7±3,4
E12	Colfiorito	7,4±2,6	E58	Seri 82	12,5±0,0
E13	Cumhuriyet 75	21,0±8,2	E59	Seyhan 95	20,8±8,0
E14	Dağdaş 94	18,5±2,6	E60	Sivas 111/33	17,7±7,3
E15	Daphan	11,2±4,5	E61	Sultan 95	17,7±7,3
E16	Dariel	28,3±2,9	E62	Sürak M. 1593/51	0,0±0,0
E17	Demir 2000	21,5±0,5	E63	Tahirova 2000	22,3±5,8
E18	Doğankent 1	7,3±2,6	E64	Tekirdağ	10,3±3,4
E19	Eser	17,4±2,7	E65	Türkmen	17,6±6,4
E20	Esperia	4,3±2,9	E66	Uzunyayla	23,2±9,4
E21	Flamura-85	9,5±3,4	E67	Yakar 99	3,6±3,6
E22	Galil	13,0±4,4	E68	Yayla 305	0,0±0,0
E23	Gelibolu	10,0±0,0	E69	Yıldırım	6,5±4,7
E24	Genç 99	39,2±5,4	E70	Yıldız 98	20,5±7,4
E25	Gerek 79	21,5±0,5	E71	Yunak	3,6±3,6
E26	Golia	6,2±6,2	E72	Yüreğir 89	0,0±0,0
E27	Göksu 99	6,2±6,2	E73	Zencirci 2002	0,0±0,0
E28	Gönen 98	58,3±7,8	E74	Ziyabey 98	19,6±12,2
E29	Guadalupe	13,3±2,4	E75	Kırık	65,0±2,9
E30	Gün 91	18,7±12,0	E76	Doğu 88	46,1±3,3
E31	Hawk	5,0±5,0	E77	Bezostaja-1	42,5±2,5
E32	Haymana 79	0,0±0,0	E78	Kate A-1	46,4±3,9
E33	İkizce 96	0,0±0,0	M1	Altın 40/98	0,0±0,0
E34	İzmir 85	20,1±7,1	M2	Altıntaş 95	0,0±0,0
E35	Karacabey 97	11,1±0,0	M3	Ankara 98	0,0±0,0
E36	Karacadağ 98	24,1±8,8	M4	Çakmak 79	0,0±0,0
E37	Karahan 99	0,0±0,0	M5	Çeşit 1252	0,0±0,0
E38	Karasu 90	8,3±8,3	M6	Ege 88	0,0±0,0
E39	Kaşif Bey 95	67,5±6,3	M7	Gediz 75	0,0±0,0
E40	Kınacı 97	0,0±0,0	M8	Kızıltan 91	0,0±0,0
E41	Kırgız 95	12,5±12,5	M9	Kunduru 1149	0,0±0,0
E42	Kırkpınar 79	36,7±2,4	M10	Mirzabey 2000	0,0±0,0
E43	Konya 2002	15,5±9,0	M11	Salihli 92	0,0±0,0
E44	Kutluk 94	20,1±9,1	M12	Selçuklu 97	0,0±0,0
E45	Lancer	34,2±11,8	M13	Yılmaz 98	0,0±0,0
E46	Mızrak	4,2±4,2			

LSD (0,05) = 10,9

E: Ekmeklik buğday

M: Makarnalık buğday

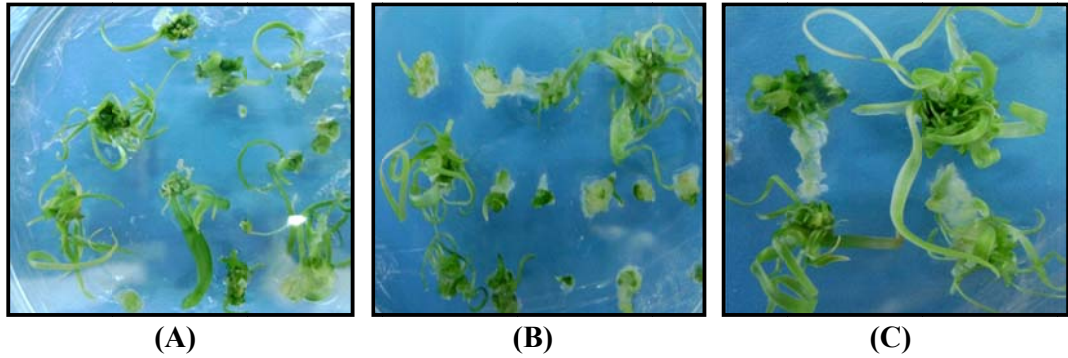
#### 4.3.4. Rejenerasyon etkinliği

Rejenerasyon etkinliği bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar çok önemli ( $p < 0,01$ ) bulunmuştur (izelge 4.34). Cevap veren embriyogenik kallus başına en yüksek ortalama bitki sayısı 4,9 adet ile Kaşif Bey 95 ve Genç 99 eşitlerinde belirlenmiştir (Şekil 4.25). Bunu 4,6 adet ile Nenehatun, 4,5 adet ile Kırık, 4,2 adet ile Dağdaş 94, ve 4.0 adet ile Osmaniyem izlemiştir. Diğer çeşitlerde cevap veren embriyogenik kallus başına bitki sayısı 4'ün altında olmuştur (izelge 4.35 ve Şekil 4.26). Ekmeklik buğdaylardan Sürak M. 1593/51, Bağcı 2002, Haymana 79, İkizce 96, Karahan 99, Kınacı 97, Sagittario, Yayla 305, Yüreğir 89 ve Zencirci 2002 eşitlerinde, makarnalık buğdayların ise tamamında bitki rejenerasyonu meydana gelmemiştir (izelge 4.35). Araştırmada, Palandöken eşidinde somaklonal varyasyona bağlı olarak bir adet albino bitki oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.27).

**Çizelge 4.34.** Buğday eşitlerinin rejenerasyon etkinliğine ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
eşit	90	0,9	6,0	0,000 **
Hata	273	0,2		
Genel Toplam	363			

\*\* : Çok önemli ( $p < 0,0$ ).



**Şekil 4.25.** Bazı çeşitlerin ayrılmış embriyogenik kalluslarından bitkiciklerin oluşumu. A) Kaşif Bey 95, B) Nenehatun ve C) Genç 99.

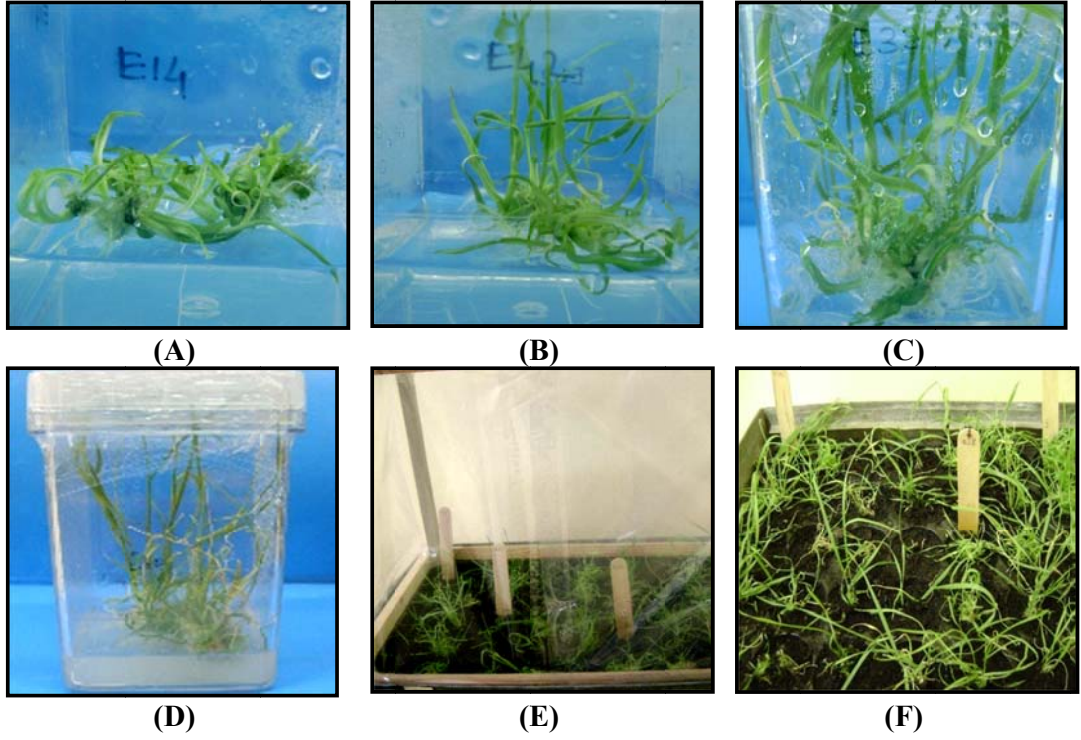
Çizelge 4.35. Buğday çeşitlerinin rejenerasyon etkinliği (adet)

NO	ÇEŞİT	RE ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )	NO	ÇEŞİT	RE ( $\bar{X} \mp S_{\bar{X}}$ )
E1	Adana 99	1,0±0,6*	E47	Momthcl	1,7±0,2
E2	Aksel 2000	1,5±0,2	E48	Negev	1,5±0,9
E3	Alparslan	1,0±0,6	E49	Nurkent	2,9±0,4
E4	Atay 85	1,8±0,1	E50	Nenehatun	4,6±0,2
E5	Ath 2002	1,5±0,5	E51	Osmaniyem	4,0±0,0
E6	Bağcı 2002	0,0±0,0	E52	Palandöken 97	2,8±0,3
E7	Bandırma 97	2,8±0,5	E53	Pamukova 97	1,0±0,6
E8	Basribey 95	0,7±0,4	E54	Panda	2,0±1,2
E9	Bayraktar 2000	1,9±0,7	E55	Pehlivan	1,0±0,6
E10	Bolal 2973	1,0±0,6	E56	Sagittario	0,0±0,0
E11	Ceyhan 99	2,3±0,9	E57	Selimiye	2,0±1,2
E12	Colfiorito	1,5±0,5	E58	Seri 82	3,0±0,6
E13	Cumhuriyet 75	1,5±0,5	E59	Seyhan 95	1,5±0,5
E14	Dağdaş 94	4,2±0,5	E60	Sivas 111/33	1,9±0,7
E15	Daphan	1,3±0,4	E61	Sultan 95	1,7±0,6
E16	Dariel	2,8±0,1	E62	Sürak M. 1593/51	0,0±0,0
E17	Demir 2000	2,0±0,2	E63	Tahirova 2000	2,1±0,1
E18	Doğankent 1	1,5±0,5	E64	Tekirdağ	1,7±0,6
E19	Eser	1,8±0,1	E65	Türkmen	1,7±0,7
E20	Esperia	0,5±0,3	E66	Uzunyayla	1,7±0,6
E21	Flamura-85	1,5±0,5	E67	Yakar 99	0,5±0,5
E22	Galil	2,2±0,9	E68	Yayla 305	0,0±0,0
E23	Gelibolu	2,3±0,2	E69	Yıldırım	1,0±0,6
E24	Genç 99	4,9±0,2	E70	Yıldız 98	1,7±0,6
E25	Gerek 79	2,2±0,2	E71	Yunak	0,7±0,7
E26	Golia	0,5±0,5	E72	Yüreğir 89	0,0±0,0
E27	Göksu 99	1,2±1,2	E73	Zencirci 2002	0,0±0,0
E28	Gönen 98	3,4±0,2	E74	Ziyabey 98	1,1±0,7
E29	Guadalupe	2,6±0,4	E75	Kırık	4,5±0,2
E30	Gün 91	1,1±0,7	E76	Doğu 88	3,2±0,2
E31	Hawk	0,5±0,5	E77	Bezostaja-1	3,6±0,2
E32	Haymana 79	0,0±0,0	E78	Kate A-1	3,6±0,2
E33	İkizce 96	0,0±0,0	M1	Altın 40/98	0,0±0,0
E34	İzmir 85	3,4±1,1	M2	Altıntaş 95	0,0±0,0
E35	Karacabey 97	2,3±0,2	M3	Ankara 98	0,0±0,0
E36	Karacadağ 98	3,2±1,1	M4	Çakmak 79	0,0±0,0
E37	Karahan 99	0,0±0,0	M5	Çeşit 1252	0,0±0,0
E38	Karasu 90	1,0±1,0	M6	Ege 88	0,0±0,0
E39	Kaşif Bey 95	4,9±0,5	M7	Gediz 75	0,0±0,0
E40	Kınacı 97	0,0±0,0	M8	Kızıltan 91	0,0±0,0
E41	Kırgız 95	0,5±0,5	M9	Kunduru 1149	0,0±0,0
E42	Kırkpınar 79	3,8±0,2	M10	Mirzabey 2000	0,0±0,0
E43	Konya 2002	1,2±0,7	M11	Salihli 92	0,0±0,0
E44	Kutluk 94	2,1±0,7	M12	Selçuklu 97	0,0±0,0
E45	Lancer	2,5±0,8	M13	Yılmaz 98	0,0±0,0
E46	Mızrak	1,0±4,2			

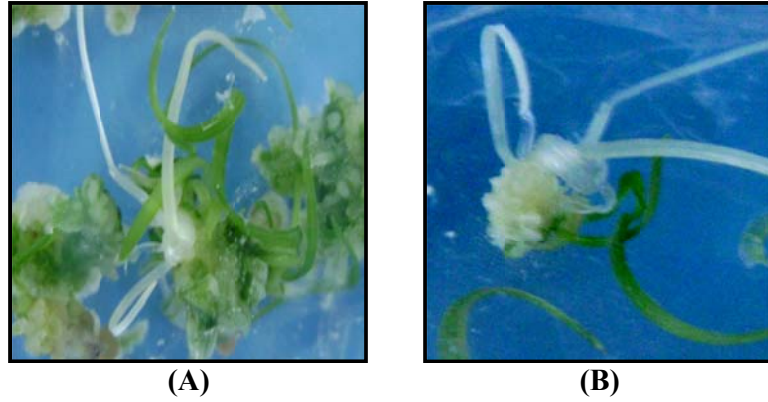
LSD (0,05) = 0,5

E: Ekmeklik buğday

M: Makarnalık buğday



**Şekil 4.26.** Meydana gelen rejener bitkilerin meganta kutularında ve toprakta büyütülmesi. A) Dağdaş 94 B) Kırkpınar 79 C)Karasu 90 D) Sivas 111/33 E) Rejener bitkilerin toprağa aktarılması ve aklimasyona alınması. F) Aklimasyon sonrası bitkilerin genel görünümü.



**Şekil 4.27.** Palandöken 97 çeşidinde meydana gelen albino bitkinin görünümü.

#### 4.4. Araştırmada incelenen karakterler arasındaki korelasyon analizi

Birinci aşamada incelenen karakterler arasındaki ilişkiler Çizelge 4.36'da verilmiştir. Bu aşamada KO oranı ile KSEKO oranı ( $r = 0,46$ ,  $p < 0,01$ ), ESEKO oranı ile KSEKO oranı ( $r = 0,86$ ,  $p < 0,01$ ) ve EKSEK oranı ile RE ( $r = 0,93$ ,  $p < 0,01$ ) arasındaki ilişkiler olumlu ve çok önemli çıkmıştır. Aynı şekilde, ESCEK oranı ile KSCEK oranı ( $r = 1,00$ ,  $p < 0,01$ ), EKSEK oranı ( $r = 1,00$ ,  $p < 0,01$ ) ve RE ( $r = 0,94$ ) arasındaki ilişkiler olumlu ve yine KSCEK oranı ile EKSEK oranı ( $r = 1,00$ ,  $p < 0,01$ ) ve RE ( $r = 0,94$ ,  $p < 0,01$ ) arasındaki ilişkiler de olumlu ve çok önemli olmuştur.

**Çizelge 4.36.** Birinci aşamada incelenen karakterler arasındaki Pearson korelasyon analizi sonuçları.

	ESEKO	KSEKO	ESCEK	KSCEK	EKSEK	RE
KO	0,46**	0,08	0,16	0,16	0,16	0,15
ESEKO		0,86**	0,21	0,21	0,20	0,20
KSEKO			0,14	0,14	0,13	0,14
ESCEK					1,00**	0,94**
KSCEK					1,00**	0,94**
EKSEK						0,93**

\*\* : Çok önemli ( $p < 0,01$ ).

İkinci aşamada EKSEK oranı ile RE ( $r = 0,48$ ,  $p < 0,01$ ) ve KSCEK oranı ile EKSEK oranı ( $r = 0,99$ ,  $p < 0,01$ ) ve RE ( $r = 0,47$ ,  $p < 0,01$ ) arasındaki ilişkiler ve çok önemli olmuştur (Çizelge 4.37). Yine, ESCEK oranı ile KSCEK oranı ( $r = 1,00$ ,  $p < 0,01$ ), EKSEK oranı ( $r = 0,99$ ,  $p < 0,01$ ) ve RE ( $r = 0,47$ ,  $p < 0,01$ ) arasındaki ilişkiler de olumlu ve çok önemli olmuştur (Çizelge 4.37).

**Çizelge 4.37.** İkinci aşamada incelenen karakterler arasındaki Pearson korelasyon analizi sonuçları.

	KSCEK	EKSEK	RE
ESCEK	1,00**	0,99**	0,47**
KSCEK		0,99**	0,47**
EKSEK			0,48**

\*\* : Çok önemli ( $p < 0,01$ ).

Ülkemizde tescil edilmiş bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlendiği üçüncü aşamada ESEKO oranı ile EKSCEK oranı ve RE arasındaki ilişkiler olumlu ancak önemsiz, KO oranı ile ESEKO oranı arasındaki ilişki ( $r = 0,25$ ,  $p < 0,05$ ) ise olumlu ve önemli olmuştur. Bunların dışındaki diğer özellikler arasındaki ilişkiler olumlu ve çok önemli olmuştur (Çizelge 4.38).

**Çizelge 4.38.** Üçüncü aşamada incelenen karakterler arasındaki Pearson korelasyon analizi sonuçları.

	<b>ESEKO</b>	<b>KSEKO</b>	<b>ESCEK</b>	<b>KSCEK</b>	<b>EKSCEK</b>	<b>RE</b>
<b>KO</b>	0,25*	0,44**	0,40**	0,32**	0,35**	0,39**
<b>ESEKO</b>		0,65**	0,34**	0,27*	0,19	0,15
<b>KSEKO</b>			0,42**	0,43**	0,38**	0,41**
<b>ESCEK</b>				0,98**	0,95**	0,67**
<b>KSCEK</b>					0,98**	0,69**
<b>EKSCEK</b>						0,68**

\*\* : Çok önemli ( $p < 0,01$ ).

\* : Önemli ( $p < 0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

### 5.1. Tartışma

Tahıllardaki genetik mühendisliği çalışmaları etkili bir bitki rejenerasyon sistemine bağlıdır. Olgunlaşmamış embriyolar bu amaçla en yaygın olarak kullanılan eksplant kaynağını oluşturmuştur. Olgunlaşmamış embriyoların eksplant kaynağı olarak kullanılabilmesi için donör bitkiden belli dönemlerde eksplant kaynağının temin edilmesine ve kışlık çeşitlerde vernalizasyon ihtiyacının karşılanması için seralara ve kontrollü koşullara gereksinim duyulmaktadır. Bu durumda daha uzun bir süre ve daha fazla finansman gerekmektedir. Buna karşın, olgun embriyoların kaynağı olan tohumlar kolaylıkla temin edilebildikleri ve depolanabildikleri için yılın her döneminde çalışma olanağı sağlamaktadırlar. Bu nedenle olgun embriyolar genetik transformasyon çalışmalarında kullanılacak kallusların üretimi için alternatif eksplant kaynağını oluştururlar. Ancak, olgun embriyoların somatik embriyogenesis yolu ile rejenerasyon kapasitelerinin düşük olması nedeniyle fazla tercih edilmemektedir. Üç aşamada yürütülen bu çalışmanın ilk iki aşamasında (olgun embriyo kültürü için uygun yöntemin belirlenmesi ve sitokininlerin bitki rejenerasyonu üzerine olan etkisinin belirlenmesi aşamaları) buğdayda olgun embriyodan somatik embriyogenesis yolu ile rejenerasyon sistemi geliştirilmiş ve olgun embriyoların bitki rejenerasyon etkinliği artırılmıştır. Son aşamada (farklı buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlenmesi aşaması) ülkemizde tescil edilmiş bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyoları kullanılarak doku kültürüne tepkileri belirlenmiştir.

Buğdayda, genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılarak gen aktarmada önemli bir adım olan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında başarımın büyük ölçüde genotipe bağlı olduğu bilinmektedir (Şehirli ve Özgen 1998). Bu araştırmanın üç aşamasında da kallus oluşumu, embriyogenik kallus oluşumu, cevap veren embriyogenik kallus oluşumu ve rejenerasyon etkinliği üzerine genotipin etkisinin çok önemli olduğu saptanmıştır. Bu konuda yapılan birçok çalışmada da benzer bulgular elde edilmiştir (Özgen *et al.* 1996; Özgen *et al.* 1998; Rashid *et al.* 2002; Sarker and

Biswas 2002; Li *et al.* 2003; Zale *et al.* 2004; Chen *et al.* 2006; Patnaik *et al.* 2006; Ahmet ve Adak 2007 ve Bi *et al.* 2007).

Araştırma sonucunda en üstün olarak belirlenen 9 nolu yöntemi kullanan Filippov *et al.* (2006), doku kültürüne iyi cevap verdiğini belirledikleri Tayozhnaya genotipinde eksplant başına en yüksek 5,4 adet bitki elde etmişlerdir. Bizim araştırmamızda ise bu değerler en yüksek Kırık çeşidinde 2,9 adet [Eksplant başına bitki sayısı = (ESCEK oranı x Rejenerasyon etkinliği) / 100] olarak belirlenmiştir. Bunu sırasıyla Nenehatun (2,4 adet), Kaşif Bey 95 (1,8 adet) ve diğer çeşitler izlemiştir. Bu farklılığın en önemli nedeni kullanılan genotiplerin farklı olmasıdır. Nitekim, Bregitzer (1992) ve Li *et al.* (2003), buğdayda kallus oluşumuna ve bitki rejenerasyonuna etki eden en önemli faktörün genotip olduğunu bildirmişlerdir. Yine, Mathias and Simpson (1986), doku kültüründe genotipin ortamdan daha önemli olduğunu kaydetmişlerdir. Bunun yanında endosperm destekli olgun embriyodan meydana gelen kalluslarda bitki rejenerasyonunu araştıran Özgen *et al.* (1998), 12 ekmeklik buğday genotipinde yapmış olduğu çalışmada eksplant başına ortalama 0,23 adet bitki elde etmişlerdir. Buna karşın bizim araştırmamızda ise 3. aşamada kullanılan çeşitlerin tamamı göz önüne alındığında eksplant başına ortalama 0,33 adet bitki elde edilirken, ekmeklik buğdaylar göz önüne alındığında ise ortalama 0,38 adet bitki elde edilmiştir. Hem Özgen *et al.* (1998) tarafından yapılan çalışmada ve hem de bizim araştırmada ortak olarak kullanılan 6 çeşidi (Bolal 2973, Bezostaja-1, Gerek 79, Haymana 79, Sivas 111/33 ve Yayla 305) karşılaştırdığımızda Özgen *et al.* (1998) bu çeşitlerden eksplant başına ortalama 0,24 adet bitki elde ederken, araştırmamızda bu değer 0,37 adet olmuştur. Yine aynı araştırmada eksplant başına elde edilen en yüksek bitki sayısı 0,47 adettir. Her iki araştırmada hem aynı çeşitler ve hem de endosperm destekli olgun embriyo kullanılmasına rağmen, bu araştırmadan elde ettiğimiz bulgular belirgin bir şekilde daha iyi olmuştur. Bu farklılık çeşitli nedenlerden kaynaklanmış olabilir. Bunlardan birincisi, çalışmamızda embriyolar tohumdan ayrılmadan skutellumu ile birlikte sürgün eksenini kesildiği için kesilen bölgelerdeki hücreler mitoz bölünme için uyarılmış olabilir. İkincisi, sürgün ekseninin kesilmesi nedeniyle embriyodan muhtemel bir sürgün oluşumu engellenerek kültür ortamındaki ve endospermdeki besinlerin sürgün

oluşumunda kullanılması önlenmiş ve böylece buradaki besinler kallus ve somatik embriyo oluşumunda kullanılmıştır. Üçüncüsü, mevcut araştırmadan farklı olarak araştırmamızda kallus oluşum ortamında MS ortamı kullanılmış ve böylece endospermin yanında ilave bir besin sağlanmıştır. Diğer bir muhtemel neden, mevcut araştırmadan farklı olarak kullanılan oksin tipi ve miktarı (12 mg/l dikamba + 0,5 mg/l IAA) olabilir. Buğdayda ve diğer tahıl türlerinin olgun embriyo kültüründe en çok kullanılan oksin tipi 2,4-D'dir (Filippov *et al.* 2006). Ancak, buğdayda endosperm destekli ve desteksiz olgun embriyo kültürlerinde oksin tiplerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda dikambanın 2,4-D'den daha etkili olduğu belirlenmiştir (Mendoza and Kaeppler 2002 ve Filippov *et al.* 2006). Papenfuss and Carmen (1987), dikambanın, metabolizma tarafından daha hızlı kullanıldığını ve bu nedenle sürgün oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. Buna karşın 2,4-D, enzimatik parçalanmaya ve birleşmeye direnç göstermekte ve bu nedenle bitki hücrelerinde yüksek oranda kararlı bir şekilde kalabilmektedir (Moore 1989).

Özgen *et al.* (1998), yapmış oldukları çalışmada Haymana 79 ve Yayla 305 genotiplerinde bitki rejenerasyonu sağlamışlar, ancak bizim araştırmamızda bu çeşitlerden bitki rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Bu farklılık çeşitlerin o yılki (tohumun hasat edildiği yıl) yetiştirme koşullarının farklı oluşundan kaynaklanabilir. Bu tür çalışmalarda, eksplantın alınacağı bitkilerin yetiştirme koşulları (örneğin ışık, nem, toprağın besin durumu ve mevsimsel faktörler) kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda önemli etkiye sahiptir. Nitekim Hess and Carman (1998), buğdayda donör bitkiler yüksek sıcaklık, kuraklık, düşük ışık yoğunluğu ve besin noksanlığı gibi olumsuz çevre koşullarında yetiştirildiklerinde ve fungal veya bakteriyel hastalıklarla enfekte olduklarında ya da böcekler tarafından istila edildiklerinde eksplanttaki ve dokulardaki içsel hormon seviyelerinin değiştiğini bildirmişlerdir. Bu durum bitki rejenerasyonunu olumsuz etkileyebilir.

Ülkemizde tescil edilmiş 78 ekmeklik ve 13 makarnalık buğday çeşidinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlendiği 3. aşamada makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkileri ekmeklik buğday çeşitlerine göre oldukça düşük

olmuş ve makarnalık buğday çeşitlerinin hiçbirinde bitki rejenerasyonu sağlanamamıştır. Jia *et al.* (2007), buğdayın doku kültürüne cevabını belirleyen kantitatif özellik lokuslarını belirlemek için yaptığı çalışmada embriyodan kallus oluşumuna 5, kallustan rejenere bitki oluşumuna 4 ve kallus başına meydana gelen bitki sayısına ise 4 kromozom bölgesinin etki ettiğini bildirmişlerdir. Bu özelliklerden en az ikisinin 2A, 2D, 5A, 5B ve 5D kromozomlarında bulunan genler tarafından yönetildiğini göstermişlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda bu araştırmada makarnalık buğdayların doku kültürüne tepkilerinin düşük olmasının nedeninin makarnalık buğdayda D genomunun bulunmamasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Araştırmanın 3. aşamasında kullanılan ekmeklik buğday çeşitlerinden sadece Sürak M. 1593/51 çeşidinde kallus oluşumu meydana gelmezken, Bağcı 2002, Haymana 79, İkizce 96, Karahan 99, Kınacı 97, Sagittorio, Yayla 305, Yüreğir 89 ve Zencirci 2002 çeşitlerinde kallus ve embriyogenik kallus oluşmasına rağmen, rejenere bitki meydana gelmemiştir. Bu durum, çeşitlerde bitki rejenerasyonunda etkili olan içsel hormon seviyelerinin yetersiz olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim Bhaskaran and Smith (1990) ve Carman (1990) kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu yönünden genotipler arasındaki farklılıkların içsel hormon seviyesindeki farklılıkla ilgili olabileceğini bildirmişlerdir. Bunun başka bir nedeni de kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin farklı genler tarafından idare edilmesi olabilir (Özgen *et al.* 1998).

Tohumlardan doğrudan elde edilen endosperm desteksiz olgun embriyolar (Ozias-Akins and Vasil 1983b; Kato *et al.* 1991; Kintzios *et al.* 1996; Varshney *et al.* 1999; Mendoza and Kaepler 2002; Patnaik and Khurana 2003; Li *et al.* 2003 ve Zale *et al.* 2004), ince olgun embriyo parçaları (Delporte *et al.* 2001) ve endosperm destekli olgun embriyolar (Özgen *et al.* 1996; Özgen *et al.* 1998; Chen *et al.* 2006 ve Filippov *et al.* 2006) kallus oluşturmada ve bitki rejenerasyonunda eksplant olarak kullanılmışlardır. On iki farklı yöntemin denendiği birinci aşamada en yüksek bitki rejenerasyonu endosperm destekli olgun embriyoların eksplant olarak kullanıldığı 9 nolu yöntemden elde edilmiştir. Aynı şekilde buğdayda (Bartok and Sagi 1990 ve Chen *et al.* 2006), arpada (He and Jia 2008)

ve tritikalede (Birsin and Özgen 2004) endosperm destekli olgun embriyoların endosperm desteksiz olgun embriyolara göre bitki rejenerasyon kapasitelerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Endosperm destekli olgun embriyoların bitki rejenerasyonu bakımından daha iyi olmasının nedeni ile ilgili çeşitli görüşler bildirilmiştir. Bu görüşlerden biri, endosperm destekli olgun embriyo kültüründe endospermin yapay besi ortamına göre daha fazla besin sağladığı yönündedir (Bartok and Sagi 1990). Diğer görüş ise embriyodaki bazı hücrelerin endospermden sinyal alabileceği ve böylece eksplantta düzgün bir şekilde farklılaşma sağlanabileceği ve bunun sonucunda da yüksek kalitede bitkilerin oluşacağı şeklindedir (Chen *et al.* 2006). Bu araştırmanın birinci aşamasında endosperm desteksiz olarak kullanılan 2 nolu yöntem hariç diğer yöntemlerin tamamında embriyogenik kallus oluşumu görülmesine rağmen bitki rejenerasyonu sağlanamamıştır.

Bitki doku kültüründe, bitki büyüme düzenleyicilerinin tipi ve miktarı önemli bir yere sahiptir. Araştırmanın birinci aşamasında oksin tipi ve miktarı olarak 2 nolu yöntemde 8 mg/l 2,4-D, 12 nolu yöntemde 8 mg/l dikamba ve 9 nolu yöntemde 12 mg/l dikamba + 0,5 mg/l IAA kullanılmış, diğer yöntemlerde ise 4 mg/l ve altında miktarlar kullanılmıştır. Araştırma sonucunda yüksek miktarlarda oksin dozunun kullanıldığı 2 (8 mg/l 2,4-D) ve 9 (12 mg/l dikamba + 0,5 mg/l IAA) nolu yöntemlerde bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. Bu bulgular bize olgun embriyo kültüründe oksin miktarının yüksek kullanılması gerektiğini göstermektedir. Nitekim Filippov *et al.* (2006), olgun embriyoların olgunlaşmamış embriyolara göre daha yaşlı ve daha fazla farklılaşmış dokular içerdiğini ve bu nedenle tersine farklılaşma için daha yüksek oranda oksin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Yine, aynı araştırmacılar endosperm destekli olgun embriyo kültüründe endospermin bitki büyüme düzenleyicilerini absorbe edebileceğini ve bu nedenle endosperm destekli olgun embriyo kültüründe endosperm desteksiz olgun embriyo kültürüne göre daha yüksek oranda oksin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan Mendoza and Kaeppler (2002), buğdayda olgun embriyo kültüründe en iyi bitki rejenerasyonunu 4 mg/l dikamba içeren ortamdan elde etmişlerdir. Buna karşın, bizim araştırmamızın birinci aşamasında 4, 5, 6, 7, 10 ve

11 nolu yöntemlerde aynı oksin tipi ve dozu kullanmamıza rağmen bitki rejenerasyonu sağlanamamıştır. Bu farklılığın en önemli nedeni kullanılan çeşitlerin farklı olması yanında diğer araştırmada buğday doku kültüründe model çeşit olarak kabul edilen 'Bobwhite' çeşidinin kullanılmasıdır.

Araştırmanın birinci aşamasında endosperm desteksiz olgun embriyoların ve hormonlar dışında aynı besi ortamının kullanıldığı 2 ve 12 nolu yöntemde aynı miktarda (8 mg/l) sırasıyla 2,4-D ve dikamba kullanılmasına rağmen dikambanın kullanıldığı 12 nolu yöntemde bitki rejenerasyonu meydana gelmemiştir. Filippov *et al.* (2006) en iyi bitki rejenerasyonunu 2,4-D'nin 10 mg/l dozundan, dikambanın ise 12 mg/l dozundan elde etmişlerdir. Yine, aynı araştırmada 14 mg/l dikamba içeren ortamda bitki rejenerasyonu 10 mg/l 2,4-D içeren ortamdaki daha yüksek olmuştur. Bu sonuçlar dikambanın 2,4-D'ye göre daha yüksek dozda etkili olabileceğini göstermektedir. Ancak, bu durumun doğrulanması için ayrı bir çalışma yapılması yararlı olabilir. Diğer taraftan araştırmamızda elde edilen bu bulgular doku kültürü çalışmalarında hormon tipi ve dozunun ayrı birer faktör yerine kombinasyon halinde tek bir faktör olarak değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Buğday olgun embriyo kültüründe farklı oksin tiplerini ve dozlarını çalışan Mendoza and Kaeppler (2002) oksin tipi x oksin dozu interaksiyonunun çok önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Embriyogenik kallusların olgunlaşması ve bitki rejenerasyonu için embriyogenik kalluslar hormonsuz ortama ya da düşük oksin seviyelerine sahip ortamlara aktarılmaktadır. Ayrıca, bu ortamlarda sitokininler oksinlerle birlikte veya tek başlarına kullanılmaktadır (Schulze 2007). Bitki doku kültüründe ve çeşitli büyüme olaylarında hücre bölünmesini uyarıcı bir faktör olan sitokinin (Marcinska *et al.* 2001) proembriyogenik kitlenin gelişim oranını artırmaktadır (Ge *et al.* 2006). Buğdayda sürgün rejenerasyonunda sitokininin yüksek dozları, düşük dozdaki oksinle ya da oksinsiz olarak kullanılmaktadır (Jones 2005). En yaygın olarak kullanılan sitokininler BAP, kinetin, zeatin ve TDZ'dir (Bhojwani and Razdan 1996).

Sitokininlerin bitki rejenerasyonu üzerine olan etkisinin belirlendiği araştırmanın ikinci

aşamasında ortalama rejenerasyon etkinliği en yüksek kontrol uygulamasında (4,2 adet) meydana gelmiş bunu 3,7 adet ile 0,5 mg/l TDZ'nin kullanıldığı 1. yöntem izlemiştir. Kontrol uygulamasının rejenerasyon etkinliği 1. yönteme göre yüksek olmasına rağmen 1. yöntemin ESCEK (%48,1) ve EKSCCK (%50,0) oranları kontrol uygulamasına göre (sırasıyla %16,3 ve %17,2) oldukça yüksek olmuştur. Bu nedenle, gerek eksplant başına bitki sayısı ve gerekse elde edilen toplam bitki sayısı 1. yöntemde (0,5 mg/l TDZ) en yüksek olmuştur. Bu bulgular TDZ'nin olgun embriyo kültüründe etkili bir bitki büyüme düzenleyicisi olduğunu göstermektedir. Nitekim, son zamanlarda tahıl doku kültüründe yapılan çalışmalarda TDZ uygulamasının umut verici olduğu kaydedilmiştir (Shan *et al.* 2000, Ganeshan *et al.* 2003 ve Gairi and Rashid 2004). Yine Staden *et al.* (2008), doku kültüründe fenil ürelerin BAP, kinetin, ya da zeatin gibi adenin tipi sitokininlerden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Arpa ve buğdayın olgunlaşmamış embriyolarında yapılan bir çalışmada (Shan *et al.* 2000) TDZ içeren rejenerasyon ortamlarında bitki rejenerasyonun 2,4-D + BAP ve IAA + kinetin içeren ortamlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yine, buğdayda olgunlaşmamış embriyo kültüründe bitki rejenerasyon ortamında TDZ, zeatin ve dikambayı deneyen Fahmy *et al.* (2004), en iyi bitki rejenerasyonun TDZ içeren ortamda meydana geldiğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde çeltiğin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarında yapılan bir çalışmada TDZ'nin diğer sitokininlere göre (Zeatin, BAP, kinetin ve 2iP) üç kat daha fazla sürgün oluşturduğu kaydedilmiştir (Tian *et al.* 1994).

Buğdayda TDZ'nin etkisi, olgunlaşmamış embriyolar kadar olgun embriyolardan meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonunda da oldukça etkili olduğu belirlenmiştir (Li *et al.* 2003 ve Chauhan *et al.* 2007). İki buğday çeşidinde tohumlarının eksplant olarak kullanıldığı bir çalışmada (Malik *et al.* 2004) bitki rejenerasyon ortamında BAP ve IAA'nin 7 farklı kombinasyonları (mg/l) (sırasıyla 0,0 ve 0,1; 0,5 ve 0,1; 2,5 ve 0,1; 5,0 ve 0,1; 0,5 ve 0,0; 2,5 ve 0,0; 5,0 ve 0,0) denenmiştir. Bitki rejenerasyonu sadece 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA (%67,7) ve 0,5 mg/l BAP + 0,0 mg/l IAA (%13,0) kombinasyonlarında meydana gelmiştir. En yüksek bitki rejenerasyonunu ise 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA kombinasyonunda gerçekleştirmiştir. Bu sonuçlar bitki rejenerasyonunda BAP'ın tek başına yetersiz olduğunu, düşük oksin

dozu ile birlikte kullanılması gerektiğini göstermiştir. Murthy *et al.* (1998), TDZ'nin tek başına somatik embriyogenesi teşvik ettiğini bildirmişler. Schulze (2007) TDZ'nin oksin metabolizmasında bir role sahip olduğunu ve bu nedenle somatik embriyogenesiste tek başına kullanımının yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Nitekim Murch and Saxena (2001), TDZ'ye maruz kalmış dokularda, IAA'in taşımının ve birikiminin çoğaldığını bildirmişlerdir. Araştırmamızda TDZ'nin diğer sitokinlere göre daha etkili olmasının en önemli nedeni bu olabilir.

TDZ, adenin tipi sitokinlerle karşılaştırıldığında yapısında pürin halkasına sahip olmayıp, bunun yerine fenil üre bulunmaktadır. TDZ hücre bölünmesini (Thomas and Katterman 1986) ve sitokin ribonükleotitlerinin aktif ribonükleotitlere dönüşümünü uyarmaktadır (Capella *et al.* 1983). Yine TDZ'nin içsel sitokinlerin sentezini artırdığı ve onların parçalanmasını engellediği bildirilmiştir (Thomas and Katterman 1986).

Bitki doku kültürü uygulamalarında bitki büyüme düzenleyicilerinin tipi yanında dozu da oldukça önemli bir yere sahiptir. Araştırmanın ikinci aşamasında genellikle sitokin dozu arttıkça bitki rejenerasyonu azalmıştır. Nitekim, Chauhan *et al.* (2007), buğdayda olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyo kültüründe kültür dönemine bağlı olarak oksin ve/veya sitokin kombinasyonunda TDZ'nin düşük dozunun (0,5 mg/l) etkili olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın Li *et al.* (2003) buğday olgun embriyo kültüründe en iyi dozun 1 mg/l olduğunu belirlemişlerdir. Malik *et al.* (2004), yüksek dozda kullanılan sitokininin kalluslara toksik etki yaptığını ve buna bağlı olarak kallus ölümlerinin arttığını bildirmişlerdir. Fahmy *et al.* (2004), TDZ'nin BAP ya da zeatinden daha yüksek biyolojik aktiveye sahip olduğunu ve bu nedenle diğer sitokinlere göre daha düşük dozlarda etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, buğdayda olgunlaşmamış embriyo kültüründe en yüksek bitki rejenerasyonunu 0,2 mg/l TDZ'de elde etmişlerdir. Yine, buğday ve arpanın olgunlaşmamış embriyolarında yapılan bir araştırmada (Shan *et al.* 2000), en yüksek bitki rejenerasyonunun buğdayda TDZ'nin 0,2 mg/l dozunda, arpada ise 1 mg/l dozunda meydana geldiği kaydedilmiştir. Bu bilgiler ve araştırma bulguları doğrultusunda ileriki araştırmalarda bitki rejenerasyon ortamında TDZ'nin daha düşük dozlarının denenmesinde fayda görülmektedir. Çünkü TDZ sitokinleri

parçalayan sitokinin oksidaza oldukça dayanıklı ve doku kültürü ortamlarında oldukça stabildir (Mok *et al.* 1982). Bu nedenle düşük dozlarının kullanılması yeterli görülmektedir. Ayrıca bitki rejenerasyon ortamında diğer sitokinin tiplerinin, değişik oksin tipleri ve dozları ile kombinasyon halinde denenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

Araştırmada incelenen özellikler arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde özellikle 1. aşamada kallus oluşum oranı ile bitki rejenerasyon ortamında incelenen özellikler (cevap veren embriyogenik kallus oranı ve rejenerasyon etkinliği) arasındaki ilişkiler önemsizken, üçüncü aşamada bu karakterler arasındaki ilişki çok önemli bulunmuştur. Birinci aşamada çeşitlerin kültüre alındığı yöntemlerin tamamında kallus oluşmasına rağmen, bunlardan sadece iki yöntemde bitki rejenerasyonu meydana gelmiştir. Birinci ve üçüncü aşama arasındaki farklılığın en önemli nedeni bu olabilir. Özgen *et al.* (1998), buğdayın olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyo kültüründe kallus oluşum oranı, kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi arasındaki ilişkinin önemsiz olduğunu saptamışlardır. Diğer taraftan Zale *et al.* (2004), kallus oluşumu ile rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkinliği arasında olumlu ve önemli ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

## 5.2. Sonuç ve Öneriler

Üç aşamalı olarak yürütülen bu araştırma sonucunda buğday olgun embriyo kültüründe kullanılabilecek etkili bir rejenerasyon sistemi geliştirilmiştir. Ayrıca, buğday doku kültüründe olgun embriyoların, olgunlaşmamış embriyolara alternatif eksplant kaynağı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar ve daha sonra yapılacak çalışmalara yönelik öneriler şu şekilde sıralanabilir.

1. Her üç aşama sonucunda buğday olgun embriyo kültüründe başarının büyük ölçüde genotipe bağlı olduğu belirlenmiştir. Kallus oluşum oranı, embriyogenik kallus oluşum

oranı, cevap veren embriyogenik kallus oranı ve bitki rejenerasyon etkinliği yönünden çeşitler arasındaki farklar çok önemli olmuştur.

2. Ekmeklik çeşitlerden Kırık, Nenehatun ve Kaşif Bey 95 çeşitlerinin ülkemizde yapılacak olgun embriyo kültürü çalışmalarında model çeşit olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

3. Birinci ve ikinci aşamadan elde edilen bulgulara göre buğday olgun embriyo kültürü ile ilgili çalışmalarda, eksplant olarak tohum üzerinden ayrılmadan embriyoların 6 eşit parçaya bölündüğü endosperm destekli olgun embriyoların, kallus oluşum ortamı olarak 12 mg/l dikamba ve 0,5 mg/l IAA içeren MS ortamının (1. aşamanın 9 nolu yöntemi), bitki rejenerasyon ortamı olarak 0,5 mg/l TDZ içeren MS ortamının (2. aşamanın 1 nolu yöntemi) kullanılması önerilebilir.

4. Doku kültürü çalışmalarında hormon tipi ve dozunun ayrı birer faktör yerine tek bir faktör olarak değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

5. İkinci aşama sonucunda bitki rejenerasyon ortamında TDZ'nin tek başına yeterli olduğu belirlenmiştir. Ancak, TDZ'nin doku kültürü ortamlarında oldukça stabil olması nedeniyle 0,5 mg/l'den daha düşük dozlarının kullanıldığı çalışmaların yapılmasının ve ayrıca bitki rejenerasyon ortamında diğer sitokin tiplerinin, değişik oksin tipleri ve dozları ile kombinasyon halinde denenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

6. Eksplantın alınacağı bitkilerin yetiştirme koşulları (örneğin ışık, nem, toprağın besin durumu ve mevsimsel faktörler) kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda önemli etkiye sahiptir. Bu nedenle genotiplerin karşılaştırıldığı çalışmalarda aynı şartlarda yetiştirilen bitkilerden elde edilen eksplantların kullanılması önerilebilir.

**KAYNAKLAR**

- Abumhadi, N., Kamenarova K., Todorouska E., Dimov G., Trifonova A., Gecheff K. and Atanassov A., 2005. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos. *Biotechnol and Biotechnol Eq.*, 32-38.
- Ahloowalia, B. S., 1982. plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Science*, 22, 405-410.
- Ahmet, H. ve Adak M.S., 2007. Irakta yetiştirilen bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. *Tarım Bilimleri Dergisi*,13(3),285-292.
- Alizadeh H., Naghavi M.R., Omid M. and Saatin B., 2003. Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of Wheat. [www.cropscience.org.au/ics2004/poster](http://www.cropscience.org.au/ics2004/poster) (10.12.2007).
- Altıntaş, S., Hatipoğlu, R., Genç, İ., 2005. Donor bitkilerin yetiştirme koşulları ve anterlere farklı sürelerle soğuk uygulamasının ekmeklik buğdayda haploid bitki rejenerasyonuna etkileri üzerinde bir araştırma. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, Antalya.
- Anonymous, 2003. Plant tissue culture.
- Arı, Ş., 2001. Doğrudan gen aktarım teknikleri. *Bitki Biyoteknolojisi II*, Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., S.Ü. Basımevi, 160-189s,Konya.
- Aydın, M., 2006. Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) olgun embriyo kaynaklı kallus oluşumunu ve rejenerasyon kapasitesini etkileyen faktörlerin belirlenmesi. Y. Lisans, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bahieldin, A., Dyer W.E., Qu R., 2000. Concentration effects of dikamba on shoot regeneration in wheat. *Plant Breeding*, 119, 437–439.
- Bartok, T. and Sagi F., 1990. A new endosperm supported culture callus induction method for wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*,22,37-41.
- Bhaskaran, S. and Smith R.H., 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science*, 20, 1328-1336.
- Bhojwani, S.S. and Razdan M. K., 1996. Tissue culture.Plant tissue culture: Theory and practice, a revised edition. Elsevier science, 39-62p, Amsterdam, Netherlands.
- Bi, R.M., Kou M., Chen L.G., Mao S.R. and Wang H.G., 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. *Plant Breeding*,126 (9),9-12.
- Birsin, M. and Özgen M., 2004. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explant of Triticale. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 353–361.
- Bohorova, N. E., Pfeiffer W. H., Mergoum M., Crossa J., Pacheco M. and Estanol P., 2001. Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos. *Plant Breeding*, 120, 291-295.
- Bregitzer, P., 1992. Plant regeneration and callus type in barley: Effect of genotype and culture medium. *Crop Science*, 32, 1108-1112.
- Capella, S.C., Mok D.W. and Kirchner S.C., 1983. Effect of thidiazuron on cytokinin autonomy and metabolism of N6-(2-İsopentenyl) 18-C 14 adenosine in callus *Phaseolus lunatus* L. *Plant Phys.*,37,796-802.
- Carman, J. G., 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and

- behavior. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 26, 746-753.
- Chang Y., VanZitzewitz j., Hayes P.M. and Chen T.H.H., 2003. High frequency plant regeneration from immature embryos of one elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex). *Plant Cell. Rep.*, 21, 733-738.
- Chauhan, H., Desai, S.A. and Khurana, P., 2007. Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 91, 191-199.
- Chawla, H. S. and Wenzel G., 1987. Regeneration potential of callus from wheat and barley. *Archiv fur Zuchtungsforchung*, 17 (6), 337-343.
- Chen J.Y., Yue R.Q., Xu H.X. and Chen X.J., 2006. Study on plant regeneration of wheat mature embryo under endosperm- supported culture. *Agric. Sci. China*, 5, 572-578.
- Chu, C.C., Wang C.C., Sun C.S., Hsu C., Yin K.C., Chu C.Y. and Bi F.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18, 659-668.
- Delporte, F., Mostade O. and Jacquemin J.M., 2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, 73-80
- Delporte, F., Li S. and Jacquemin J. M., 2005. Calluses initiated from thin mature embryo fragments are suitable targets for wheat transformation as assessed by long-term GUS expression studies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80, 139-149.
- Dudits, D., Nemet G. and Haydu Z., 1975. Studies of callus growth and organ formation in wheat tissue cultures. *Can. J. Bot.*, 53, 957-963.
- Elena, B.E. and Ginzo H.D., 1988. Effect of auxin levels on shoot formation with different embryo tissues from a cultivar and a commercial hybrid of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiol.*, 132, 600-603.
- Fahmy, A.H., El-Shafy Y.H., El-Shihy O.M. and Madkour M.A., 2004. A highly efficient regeneration system via somatic embryogenesis from immature embryos of Egyptian wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using different growth regulators. *Arab J. Biotech.*, 7(2), 229 – 238.
- Fazelienasab, B., Omidi M. and Amiritokaldani M., 2004. Effects of abscisic acid on callus induction and regeneration of different wheat cultivars to mature embryo culture. [www.bcpc.org/Seminars2004](http://www.bcpc.org/Seminars2004) (25.05.2006)
- Felsenburg, T., Feldman M. and Galun E., 1987. Aneuploid and alloplasmic lines as tools for the study of nuclear and cytoplasmic control of culture ability and regeneration of scutellar calli from common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 74, 802-810.
- Fennel, S., Bohorova N., Ginkel M., Crossa J. and Hoisington D.A., 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. *Theor Appl Genet.*, 92, 163-169.
- Filippov, M., Miroshnichenko D., Vernikovskaya D. and Dolgov S., 2006. The effect of auxin and exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 213-222.
- Gairi A. and Rashid A., 2004. TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2,4-D. *Plant Cell Tissue Organ*

- Culture, 76,29-33.
- Galiba, G., Kovacs G. and Sutka J., 1986. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breeding*, 97, 261–263.
- Gamborg, O.L., Miller R.A. and Ojima K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.
- Ganeshan, S., Baga M., Harvey B.L., Rossnagel B.G., Scoles G.J. and Chibbar R.N., 2003. Production of multiple shoots from thidiazuron-treated mature embryos and leaf base/apical meristems of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 73, 57-64.
- Ganeshan, S., Chodaparombil S.V., Bega M., Fowler B., Hucl P., Rossnagel B.G. and Chibbar R.N., 2006. In vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85,63-73.
- Ge, X., Chu Z. and Lin Y., 2006. A tissue culture system for different germplasm of India rice. *Plant Cell. Report*, 25,392-402.
- Gurel, F., Karakas O, Albayrak G. and Ari S.2009. Regeneration capacity of mature embryo-derived callus in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Biologica Hungarica*, 60(3),309-319.
- Haliloğlu, K. and Baenzinger P.S., 2003a. *Agrobacterium tumefaciens* mediated wheat transformation. *Cereal Research Communications*, 31(1-2),9-16.
- Haliloğlu, K. and Baenzinger P.S., 2003b. The effect of age and size of wheat anther culture-driven embryos on regeneration of green and albino plantlets. *Israel Journal of Plant Sciences*, 51,207-212.
- Haliloğlu, K., Sağsöz S., Tosun M., Taşpınar M.S. ve Aydın M., 2003. Buğdayda olgunlaşmamış embriyo kültürünü etkileyen bazı faktörlerin incelenmesi. Türkiye 5. Tarla Bitkileri Kongresi, Diyarbakır.
- Haliloğlu, K. and Baenzinger P.S., 2005. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from immature embryos cultures. *J. Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14, 77–82.
- Haliloğlu, K., Ozturk A., Tosun M. and Bulut S., 2005. Relationship between tissue culture and agronomic traits of winter wheat. *Cereal Research Communications*, 33 (2-3), 469-476.
- Haliloğlu, K., 2006. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments. *Biologia Plantarum*, 50 (3), 326–330.
- Hanzel, J. J., Miller J.P., Brinkman M.A. and Fendos E., 1984. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Science*, 25, 27-31.
- He,T and Jia J.F., 2008. High frequency plant regeneration from mature embryo explants of highland barley (*Hordeum vulgare* L. nudum Hk.f.) under endosperm supported culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 95,251-254.
- Henry, Y. and De Buyser J., 1985. Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.*, 4, 307–310.
- Hess, J. R. and Carman J.G., 1998. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment and endogenous hormone levels. *Crop Science*, 38, 249–253.
- Higgins, P. and Mathias R.J., 1987. The effect of the 4B chromosomes of hexaploid wheat on the growth and regeneration of callus cultures. *Theor. Appl. Genet.* 74: 439–444.

<http://www.oup.com/uk/orc/bin/9780199254682/ch02.pdf> (25.05.2006).

<http://www.oup.com/uk/orc/bin/9780199254682/ch02.pdf> (25.05.2006).

- Hunsinger, H. and Schanz K., 1987. The influence of dicamba on somatic embryogenesis and frequency of plant regeneration from cultured immature embryos of wheat. *Plant Breeding*, 98, 119-123.
- Ingram, H. M., Power J. B., Lowe K.C. and Davey M.R., 2000. Microspore-derived embryo induction from cultured anthers of wheat. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 60, 235-238.
- Ivanov, P., Atanassov Z., Milkova V. and Nikolova L., 1998. Culture selected somoclonal variation in five *Triticum aestivum* genotypes. *Euphytica*, 104, 167-172.
- Jia, H., Yi D., Yu J., Xue S., Xiang Y., Zhang C., Zhang Z., Zhang L. and Ma Z., 2007. Mapping QTLs for tissue culture response of mature wheat embryos. *Mol. Cell.*, 23 (3), 323-330.
- Jones, H. D., 2005. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science* 41, 137-147.
- Kaleikau, E. K., Sears R.G. and Gill B.S., 1989. Control of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 78, 783-787.
- Karaca, Ö. and Bürün B., 1999. Buğdayda embriyo kültüründen kallus oluşumu. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 23 (2), 269-274.
- Kato, K., Chowdhury S.H. and Harada S., 1991. Effect of culture condition on plant regeneration capacity of mature embryo derived callus in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Wheat Inf Serv*, 72, 95-97.
- Kaur, P. and Kathari S.L., 2004. In vitro culture of kodo millet: Influence of 2,4-D and Picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73, 73-79.
- Kintzios, S.E., Trantafyllou M and Drossopoulos J., 1996. Effect of genotype and different growth regulator treatments on callus induction, proliferation and plant regeneration from mature wheat embryos. *Cereal Research communications*, 24(2), 147-153.
- Koyuncu, N., 2008. Türkiyede yetiştirilen ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin in vitro koşullarda tuz toleransının belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Krysiak, C., Mazus B. and Buchowicz J., 1999. Generation of DNA double strand breaks and inhibition of somatic embryogenesis by tungsten microparticles in wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 58, 163-170.
- Langridge, P., Lazari P. and Lörz H., 1991. A segment of rye chromosome 1 enhances growth and embryogenesis of calli derived from immature embryos of wheat. *Plant Cell Rep.*, 10, 148-151.
- Li, W., Ding C.H., Hu Z., Lu W. and Guo G.Q., 2003. Relationship between tissue culture and agronomic traits of spring wheat. *Plant Science*, 164, 1079-1085
- Linacero, R., Lopez-Bilbao M.G., Romero C., Laurie D.A and Vanquez A.M., 1996. Genotypic differences in polyembryo formation and somatic embryogenesis increment in wheat (*Triticum aestivum* L.) following: 2,4-D treatment. *Euphytica*, 89, 345-348.
- Linsmaier, E., M. and Skoog F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18, 100-127.

- Ma, R. and Pulli S., 2004. Factors influencing somatic embryogenesis and regeneration ability in somatic culture of spring and winter rye. *Agriculture and Food Science*, 13, 363-377.
- Machii, H., Mizuno H., Hirabayashi, T., Li H., and Hagio T., 1998. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 53, 67-74.
- Malik, S.I., Rashid H., Yasmin and Minhas N.M., 2004. Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature seed explant of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan journal of Botany*, 36 (3), 621-627.
- Marcinska, I., Filek M., Biesagakoscielniale J., Sagi F. and Bortek T., 2001. Cytokinin activities cells of wheat inflorescence in dependence of its developmental stage. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 6, 313-318.
- Mathias, R.J. and Fukui K., 1986. The effect of specific chromosome and cytoplasm substitutions on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus. *Theor. Appl. Genet.*, 71, 797-800.
- Mathias, R.J. and Simpson E.S., 1986. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. thell) callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 7, 31-37
- Mc Hugen, A., 1983. Rapid regeneration of wheat in vitro. *Ann Bot.*, 51, 851-853.
- Mc Kinnon, C., Gunderson G. and Nabors M.W., 1987. High efficiency plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature embryo explants of bread wheat (*Triticum aestivum*) and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 23, 443-448.
- Mendoza, M. G. and Kaeppler H.F., 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of Wheat (*Triticum aestivum*). *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 38, 39-45.
- Mok, M.C., Moke D., Armstrong D.J., Shudo K., Isogai Y. and Okamoto T., 1982. Cytokinin activity of N-Pheny-N-1,2,3-Thiadiazol-Ylurea (Thidiazuron). *Phyto Chem.*, 21, 1509-1511.
- Moore, T.C., 1989. *Biochemistry and physiology of plant hormones*. Springer, New York.
- Murashige, T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
- Murch, S.J. and Saxena P.K., 2001. Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *pelargonium x hortorum* Bailey. *Plant Growth Regulation*, 35, 269-275.
- Murthy, B.N.S., Murch J.S. and Saxena P.K., 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 34, 267-275.
- Ou, G., Wang W.C. and Nguyen H. T., 1989. Inheritance of somatic embryogenesis and organ regeneration from immature cultures of winter wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 78, 137-142.
- Ozias-Akins P. and Vasil I.K., 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 110, 95-105
- Ozias-Akins P. and Vasil I.K., 1983a. Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat). *Protoplasma* 117: 40-44
- Ozias-Akins P. and Vasil I.K., 1983b. Callus induction and growth from the mature

- embryo of wheat. *Protoplasma*, 115, 104–113.
- Öktem, H. A., Eyidoğan F. İ., Ertuğrul F. S. and Yücel M., 1999. Marker gene delivery to mature wheat embryos via particle bombardment. *Tr. J. of Botany*, 23, 303-308.
- Özcan, S. ve Özgen M., 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. *Kükem Dergisi*. s: 69-95.
- Özgen, M., Türet M., Özcan S. and Sancak C., 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breed.*, 115, 455–458.
- Özgen, M., Türet M., Altınok S., Sancak C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat genotypes. *Plant Cell reports*, 18, 331-335.
- Özgen, M., Türet M. and Avcı M., 2001. Cytoplasmic effects on the tissue culture response of callus from winter wheat mature embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 81–84.
- Papenfuss, J.M. and Carman, J.G., 1987. Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin. *Crop Science*, 27, 588–593.
- Patnaik, D. and Khurana P., 2003. Genetic transformation of indian bread (*Triticum aestivum*) and pasta (*Triticum durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-driven calli. *BMC plant biology*, 3(5), 1-11.
- Patnaik, D., Vishnudason D. and Khurana P., 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current Science*, 91(3),307-317.
- Peng, J. and Hodges, T.K., 1989. Genetic analysis of plant regeneration in rice. *In vitro Cell Dev. Biol.*,25, 91-94.
- Przetakiewicz, A., Orczyk W. and Nadolska-Orczyk A.,2003. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73, 245-256.
- Rashid, H., Ghani R.A. and Chaudhry Z., 2002. Effect of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). *Biotechnology*, 1 (1): 49-54.
- Rashid, V.A., 2002. Induction of multiple shoots by thidiazuron from caryopsis cultures of minor millet and its effect on the regeneration of embryogenic callus cultures. *Plant Cell Report*,21, 9-13.
- Redway, F. A., Vasil V., Lu D. and Vasil I.K., 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 79, 609–617.
- Rode, A., Hartman C., De Buyser J. and Henry Y., 1988. Evidence for a direct relationship between mitochondrial genome organization and regeneration ability in hexaploid wheat somatic tissue cultures. *Curr. Genet.*,14, 387-394.
- Sarker, R.H. and Biswas A., 2002. *In vitro* plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Cult.*,12 (2), 155-165.
- Satyavathi, V.V., Jauhar P.P., Elias E.M. and Rao M.B., 2004. Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. *Crop Science*, 44, 1830- 1846.
- Schulze, J., 2007. Improvements in cereal tissue culture by thidiazuron. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 1(2),64-79.

- Sears, R.G. and Deckard E.L., 1982. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Sci*, 22, 546–550.
- Şehirli, S. ve Özgen M., 1998. Bitki ıslahı, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi yayınları:1059; Ders kitabı:310. Ankara Üniv. Basımevi, Ankara, s261.
- Shah, M.I., Jabeen M. and Ilahi I., 2003. In vitro callus induction ,its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum*) . *Pak. J. Bot.*, 35(2), 209-217
- Shan, X., Li D. and Qu R., 2000. Thidiazuron promotes in vitro regeneration of wheat and barley. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 36, 207-210.
- Sharma, V.K., Hansch R., Mendel R.R. and Schulze J., 2005a. Mature embryo axis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Experimental Botany*, 56 (417), 1913-1922.
- Sharma, V.K., Hansch R., Mendel R. and Schulze J.,2005b. Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long term retention of morphogenecity using meristematic shoot segments. *Plant Breeding*,124,242-246.
- Staden, I.M., Zazimalova E. and George E.F., 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonist. *Plant Propagation by tissue culture 3<sup>rd</sup> edition*, George, E.F. and Hall M.A. Springer, Netherlands, 205-226.
- Thomas, J.C. and Katterman F.R.,1986. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Phys.*, 81,681-683.
- Tian, W., Rance I., Sivamani E., Fauquet C. and Beachy R.N., 1994. Improvement of plant regeneration frequency in vitro indica rice. *Chinese J. Genet.*, 21, 1-9.
- TÜİK, 2010. [www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr).
- Turhan, H. and Baser I., 2004. Callus Induction from Mature Embryo of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*, 3 (1), 17-19.
- Varshney, A., Jain S. and Kothari S.L., 1999. Plant regeneration from mature embryos of 20 cultivars of wheat. *Cereal Research Communications*, 27 (1-2), 163-170.
- Viertel, K. and Hess D., 1996. Shoot tips as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 44,183–188;
- Willman, M.R., Scroll S.M. and Hodges T.K., 1989. Inheritance of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from primary callus in maize. *In vitro Cell. Dev. Biol.*,25,95-100.
- Yu,Y., Wang J., Zhu M.L. and Wei Z.M., 2008. Optimization of mature embryo-based high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grow in china. *Plant Breeding* 127, 249-255.
- Yurkova, G.N., Levenko B.A. and Novozhilov O.V., 1982. Plant regeneration in wheat tissue culture. *Biochem Physiol*, 177, 337–344.
- Zale, M. J., Borchardt-Wier H., Kidwell K.K. and Steber C.M., 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 76, 227-281.
- Zhou, M.D. and Lee T.T., 1983. Selectivity of auxin for induction and growth of callus from embryos of spring and winter wheat. *Can. J. Bot.*, 62, 1393–1397.

## ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Muğla'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Dalaman, Lise öğrenimini Ortaca ilçesinde tamamladı. 1999 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden mezun oldu. 2002 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2006 yılında Yüksek Lisans öğrenimini tamamlayarak aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalında Doktora öğrenimine başladı. 2002 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde Araştırma Görevlisi kadrosunda göreve başladı. Halen bu göreve devam etmektedir.