T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Puccinellia distans (ÇORAK ÇİMİ)'IN *IN VITRO* DOKU KÜLTÜRÜ VE BORA (B) TEPKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Ufuk BACAKSIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

KONYA, 2009

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Puccinellia distans (ÇORAK ÇİMİ)'IN *IN VITRO* DOKU KÜLTÜRÜ VE BORA (B) TEPKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Ufuk BACAKSIZ

Selçuk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU

KONYA-2009, Sayfa: 74

Jüri: Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU

Jüri: Doç. Dr. Süleyman SOYLU

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR

Bu tez çalışması 2007 yılında 3 farklı alandan toplanan (Konya Keçeli Kanalizasyon Kanalı etrafından, Eskişehir Kırka Bor (B) işletmesi maden alanı ve yine aynı alandaki yıkama göleti) Çorak çimi (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl) tohumlarınnın *in vitro* fidelerinin, bor alma ve biriktirme durumlarının ICP-AES (Inductively coupled plasma-Atomic emission spectrometry) ile tespiti ve *in vitro* doku kültürü yöntemleri ile çoğaltılması araştırılması amacıyla yürütülmüştür.

Bor denemeleri için tohumlar, % 0.7 agar, % 3 sakkaroz ve sırasıyla; 0, 50, 250, 500 ve 1000 mg l^{-1} B içeren MS temel besin ortamında kültüre alınmıştır. Bor alımının tespiti için 120 günlük fideler ICP-AES ile analiz edilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre; B konsantrasyonu arttıkça bitkide biriken B miktarının arttığı, bu artışın her üç farklı alandan toplanan tohumlardan yetişen fidelerde de meydana geldiği, en düşük B alımının 0 mg l^{-1} B içeren kültür koşullarında, en yüksek B alımının 1000 mg l^{-1} B içeren kültür koşullarında meydana geldiği belirlenmiştir.

In vitro rejenerasyon çalışmalarında ve meristem kültürü tekniği çalışmalarında çimlenme yetenekleri daha iyi olduğu için Maden alanından toplanan tohumlar kullanılmıştır. Bu çalışmalarda eksplantlar embriyogenik ve organogenik kallus elde etmek için, %3 sakkaroz ve % 0.7 agar ile MS, B_5 ve N_6 temel besin ortamlarında 2 mg l^{-1} 2,4-D x Kinetin ve BAP'nin farklı konsantrasyonları denenmiştir. Çalışmalar sonucunda kalluslar elde edilmiş ancak elde edilen kalluslardan organogenesis yada embriyogenesis uyarılamamıştır.

Meristem kültürü tekniği ile çoğaltma yapmak için 10 günlük steril fideciklerin meristem içeren kardeşlenme bölgeleri eksplant olarak kullanılmıştır. Eksplantlar MS temel besin ortamında Zeatin, Kinetin ve BAP'nin farklı konsantrasyonlarında test edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *in vitro* sürgünler köksüz olarak elde edilmiştir. En fazla *in vitro* sürgün sayısı MS+2 mg l^{-1} Zeatin içeren besin ortamı kombinasyonundan elde edilmiş, elde edilen köksüz sürgünler MS+0.5 mg l^{-1} IAA içeren besin ortamında % 90 oranında köklendirilmiştir. Köklendirilen sürgünlerin aklimatizasyonu % 80 oranında başarılı olmuştur.

Abiyotik strese toleranslı bir bitki olan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl buğdaygil familyasınını bir üyesi olduğu için biyoteknoloji ve fizyoloji çalışmalarında önemli bir genetik kaynaktır. Bu çalışma temel araştırma niteliğindedir.

ANAHTAR KELİMELER: Bor, Çorak Çimi, Doku Kültürü, ICP-AES, MS, *Puccinellia*

ABSTRACT

MASTER THESIS

THE STUDY OF IN VITRO TISSUE CULTURE OF *Puccinellia distans* (DESERT GRASS) AND ITS RESPONSE TO BORON

Mehmet Ufuk BACAKSIZ

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU

KONYA-2009, Pages: 74

Jury: Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU

Jury: Doç. Dr. Süleyman SOYLU

Jury: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR

In this study, surveyed the *in vitro* shoots of the seeds of desert grass (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl), which were collected from three different areas, one being around Konya Kecheli Sewage Canal, another Eskişehir Kırka Boron (B) Plant and the other being the washing pond at the same area, so as to identify their capacity to absorb and accumulate boron and to germinate through *in vitro* tissue culture.

For boron trials, the seeds were cultured MS basal medium that contained 0.7 % agar, 3 % sucrose, and respectively 0, 50, 250, 500 and 1000 mg l^{-1} B. To identify the amount of boron absorption, the shoots that were 120 day-old ICP-AES.

According to the analyses, it was identified that as the concentration of B increased, the amount of grew larger, that this increase occurred in the shoots collected from the three different areas, that the lowest amount of B absorption took place in circumstances with 1 mg l^{-1} B, and that the highest amount of B absorption took place in circumstances with 1000 mg l^{-1} B.

Because they are more capable of germinating in vitro culture studies, the seeds collected from the Mining site were used as explant. In these studies, so as to obtain embryonic and organogenic calluses, different concentrations of 2 mg l^{-1} 2,4-D x Kinetin and BAP were tried in MS, B_5 and N_6 basal media. Calluses were obtained at the end of the studies, but no organogenesis or embriogenesis was stimulated in the calluses obtained.

Multiplication attempts through meristem culture were made, and for this, the meristem containing germination parts of sterile 10-day shoots that were obtained form the seeds that were collected again from the mining area were used. So as to achieve multiplication via meristem culture technique, explants were tested in different concentrations of Zeatin, Kinetin and BAP in MS basal medium. In the studies conducted, in vitro shoots were obtained without roots. The highest number of in vitro shoots were obtained in basal medium containing MS+2 mg l^{-1} Zeatin, and the rootless shoots that were obtained were rooted in basal medium containing MS+0.5 mg l^{-1} IAA. The acclimatization of the rooted shoots were successful at a rate of 80 %.

Abiotic stress tolerant *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl plant is very important genetic resource for biotechnology and physiology research. Because it is member of graminea family. This study was basic research quatitatively.

KEY WORDS: Boron, Alkaligrass, Tissue Culture , ICP-AES, MS, *Puccinellia*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, büyük sabır ve emek harcayan, gerek bilimsel gerekse manevi yönde gelişmemde sonsuz emeği geçen ve fikirleri ile beni aydınlatan değerli hocam, Sayın **Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU'**na en derin teşekkür ve saygılarımı sunarım

Çalışmalarım boyunca her açıdan büyük destek gördüğüm ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen Sayın hocalarım, **Prof. Dr. Bayram SADE, Doç. Dr. Süleyman SOYLU** ve **Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR'**a ve bir abla gibi her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın, **Arş. Gör. Emine ATALAY'**a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca bu günlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen sevgili annem **Hatice BACAKSIZ**, babam **İlyas BACAKSIZ** ve kardeşim **Barış BACAKSIZ'**a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

KONYA, 2009 **Mehmet Ufuk BACAKSIZ**

İÇİNDEKİLER

ÖZET ---------- i

ABSTRACT ---------- iii

TEŞEKKÜR ---------- v

İÇİNDEKİLER ---------- vi

ŞEKİLLER LİSTESİ ---------- viii

ÇİZELGELER LİSTESİ ---------- x

SİMGELER VE KISALTMALAR ---------- xii

1.GİRİŞ. ---------- 1

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI ---------- 4

2.1. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl (Çorak çimi) ile İlgili Araştırmalar 4

2.2. Bor (B) ile İlgili Araştırmalar ---------- 7

2.3. Bitki Rejenerasyonu ile İlgili Araştırmalar ---------- 11

3.MATERYAL VE METOT ---------- 19

3.1. Materyal ---------- 19

3.2. Metot ---------- 20

3.2.1. Sterilizasyon ---------- 20

3.2.1.1. Genel sterilizasyon ---------- 21

3.2.1.2. Besin ortamlarının sterilizasyonu ---------- 21

3.2.1.3. Bitki materyallerinin sterilizasyonu ---------- 22

3.2.2. Besin ortamlarının hazırlanması ---------- 22

3.2.2.1. Bor (B) denemelerinde kullanılan *In vitro* çimlendirme ortamlarının hazırlanması ---------- 23

3.2.2.2. Rejenerasyon ortamlarının ve meristem kültürü ortamlarının hazırlanması ---------- 24

3.2.3. Bor'lu besin ortamlarında *In vitro* çimlendirme ---------- 25

3.2.4. Denemelerdeki gözlem ve ölçümler ---------- 25

3.2.5. ICP-AES analizleri ---------- 26

3.2.5.1. ICP-AES analizleri için bitki örneği hazırlama ---- 26

3.2.5.2. ICP-AES analizleri için bitkilerin mikrodalgada yakılması ---------- 26
3.2.5.3. ICP-AES ile örneklerin okunması ---------- 27
3.2.6. Bitki rejenerasyonu çalışmaları ---------- 28
3.2.6.1. Kallus kültürü ---------- 28
3.2.6.2. Meristem kültürü----------30
3.2.7. Denemelerin değerlendirilmesi ve istatistiki analizler30
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA ---------- 31
4.1. Bor'un Çimlenme ve Fide Gelişimi Üzerine Etkisi ---------- 31
4.1.1. Çimlenme ---------- 31
4.1.2. Gövde boyu---------- 33
4.1.3. Kök boyu ---------- 37
4.1.4. Kuru ağırlık---------- 41
4.2. Bitki Bor Alımı ---------- 46
4.3. Bitki Doku Kültürü Çalışmaları ---------- 51
4.3.1. Kallus ağırlığı ve çapı ---------- 51
4.3.2. Meristem kültürü ---------- 58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER ---------- 63
6. KAYNAKLAR---------- 67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Eskişehir ili Kırka bor (B) maden alanında *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl bitkisinin görünümü 20

Şekil 3.2. Bitki örneklerinin yakıldığı kapalı sistem mikrodalga fırına ve mikrodalgada yakılan örneklerin süzülmesine ait bir görünüş 27

Şekil 3.3. ICP-AES ile örneklerin okunmasına ait bir görünüş 28

Şekil 4.1. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Kanal lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerinin 90. günde görünümü 35

Şekil 4.2. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Maden lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerinin 90. günde görünümü 36

Şekil 4.3. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Gölet lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerinin 90. günde görünümü 36

Şekil 4.4. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Kanal lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirlen fidelerin köklerinin 90. günde görünümü 40

Şekil 4.5. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Maden lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerin köklerinin 90. günde görünümü 40

Şekil 4.6. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Gölet lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerin köklerinin 90. günde görünümü 41

Şekil 4.7. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından meristem kültüründe kardeşlenme bölgelerini kullanmak amaçlı yetiştirilen fidecikleri 60

Şekil 4.8. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından

elde edilen fideciklerin kardeşlenme bölgelerinin
kültüre alınışı 61

Şekil 4.9. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından
elde edilen fideciklerin kardeşlenme bölgelerindeki
meristematik hücrelerden MS temel besin ortamına
ilave edilen farklı dozlardaki Zeatin, BAP ve Kinetinin
etkisi ile rejenere olan köksüz sürgünler 61

Şekil 4.10. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın meristem kültürü
sonrası elde edilen köksüz sürgünlerinin köklendirilmesi 62

Şekil 4.11. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın a. Köklendirme
sonrası aklimatize edilmiş fidelerine ait ve MS+0.5 mg l^{-1}
IAA köklenmiş bir fidesine ait görünüm..... 62

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın çimlenme yüzdeleri 31

Çizelge 4.2. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın çimlenme yüzdelerine ait varyans analizi 32

Çizelge 4.3. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin Ortalama gövde boyları 33

Çizelge 4.4. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde boylarına ait varyans analizi 34

Çizelge 4.5. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama kök boyları 37

Çizelge 4.6. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama kök boylarına ait varyans analizi 38

Çizelge 4.7. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde ağırlıkları 42

Çizelge 4.8. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde ağırlıklarına ait varyans analizi 43

Çizelge 4.9. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama kök ağırlıkları 44

Çizelge 4.10. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama kök ağırlıklarına ait varyans analizi 46

Çizelge 4.11. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans*(Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde B içeriği 47

Çizelge 4.12. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde B içeriğine ait varyans analizi 48

Çizelge 4.13. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından, farklı besin ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında elde edilen kallusların ağırlıklarına ait ortalama değerler 53

Çizelge 4.14. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından, farklı besin ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında elde edilen kallusların ağırlıklarına ait varyans analizleri 54

Çizelge 4.15. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından, farklı besin ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında elde edilen kallusların çaplarına ait ortalama değerler 56

Çizelge 4.16. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından, farklı besin ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında elde edilen kallusların çaplarına ait varyans analizleri 57

Çizelge 4.17. Farklı dozlarda ve farklı büyüme düzenleyicileri içeren MS sürgün rejenerasyonu ortamlarında kültüre alınan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın meristem bölgelerinden elde edilen toplam sürgün sayısı 58

Çizelge 4.18. Farklı dozlarda ve farklı büyüme düzenleyicileri içeren MS sürgün rejenerasyonu ortamlarında kültüre alınan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın meristem bölgelerinden elde edilen toplam sürgün sayılarına ait varyans analizi 59

SİMGELER VE KISALTMALAR

MS: Murashige ve Skoog, 1962

B_5: Gamborg ve ark. 1968

N_6: Chu, 1975

BAP: 6-Benzil amino pürin

NAA: Naftalen asetik asit

IAA: İndol-3- asetik asit

IBA: İndol-3- butirik asit

2,4-D: 2,4-Diklorofenoksi asetik asit

2,4,5-T: 2,4,5-Triklorofenoksi asetik asit

Zea: Zeatin

Kin: Kinetin

ZR: Zeatin ribozid

2IP: İzopentil adenin

TDZ: 1-Fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) üre

Adenin: Amino pürin

Dicamba: 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid

Picloram: 4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

F: F değeri

SD: Serbestlik derecesi

KO: Kareler ortalaması

VK: Varyasyon katsayısı

BO: Besin ortamı

BD: Büyüme düzenleyicisi

BDK: Büyüme düzenleyicisi konsantrasyonu

LSD: Çoklu karşılaştırmalı istatistiksel test

EC: Elektriksel konduktvite

KOH: Potasyum hidroksit

HCl: Hidroklorik asit

NaOCl: Sodyum hipoklorit

H_2PO_3: Hidrojen per-oksit

HNO_3: Nitrik asit

N: Normalite

H_3BO_3: Borik asit

NaCl: Sodyum klorür

$NaHCO_3$: Sodyum hidrojen karbonat

mol m^{-3}: Mol / metreküp

µE m^{-2} s^{-1}: Işık etkisi x metre kare / saniye

µM: Mikromolar

mM: Milimolar

g l^{-1}: Gram / litre

mg kg^{-1}: Miligram / kilogram

mg g^{-1}: Miligram / gram

mg l^{-1}: Miligram / litre

dS m^{-1}: Desisimens / metre

kg ha^{-1}: Kilogram / hektar

ppm: Milyonda bir

ton ha^{-1}: Ton / hektar

µm: Mikrometre

mm: Milimetre

cm: Santimetre

ml: Mililitre

mg: Miligram

g: Gram

kg: Kilogram

h/h: Hacim hacim

a/h: Ağırlık hacim

pH: Hidrojen gücü

^oC: Santigrad derece

ICP-AES: Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer

1. GİRİŞ

Olumsuz çevre koşullarının arttığı, bazı bitki besin elementleri ile ilgili toksite problemlerinin ortaya çıktığı ve kuraklığın küresel bir problem haline geldiği günümüzde, özellikle kültürü yapılan bitkilerdeki genetik tabanın daraldığı da göz önüne alındığında, doğal florada bulunan bitkiler gelecekte tarımsal faaliyetlerin yapılabilmesi açısından genetik materyal olarak ön plana çıkmaktadırlar. Doğal florada bulunan *Poaceae* familyasının *Poaideae* çim alt familyasından olan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl. (Çorak çimi) bitkisi bunlardan biridir. Çünkü bu bitki tuzlu ve yüksek bor (B) içeren ortamlarda veya kurak fakir toprak şartlarında yetişebilmektedir. Bu bitkilerin korunması ve ıslah programlarında değerlendirilebilmesi için temel araştırmaların yapılması gereklidir. Bu amaçla yapılan biyoteknolojik çalışmaların önemi ön plana çıkmaktadır. Biyoteknolojik yöntemlerden biri olan ve bitkilerin tarımsal niteliklerinin geliştirilmesi amacıyla laboratuvar koşullarında uygulanan doku kültürü teknikleri, zamanla tarla koşullarında yapılan çalışmalarda karşılaşılan sorunların giderilmesinde de kullanılmaya başlanılmıştır. Sonuçlarının daha kısa sürede alınabildiği, bitkilerin hücre, doku ve çeşitli organlarının kullanıldığı bu çalışmalar bitki ıslahına önemli derecede katkıda yapmaktadır.

Poaceae familyasının bilinen 100'den fazla türü vardır. *Puccinellia distans*, *Poaceae* familyasının alkali ve özellikle tuzlu alanlara yüksek adaptasyon gösteren bir üyesidir (Smallcombe 2004).

Florada doğal olarak yaygın bulunmakla birlikte *Puccinellia* türlerinin çoğunun tarımı yapılmamakta, şu ana kadar ıslah çalışmalarında yeterince kullanılmamaktadır. Tohumlarının çok olmasına karşın kısa sürede çimlenme yeteneğini kaybetmeleri üreme sorununu ortaya çıkarmakta ve bu nedenle doku kültürü ile klonal çoğaltım yapılması gerekliliğini ortaya çıkmaktadır. Diğer rejenerasyon yöntemlerine ilave olarak somatik embriyogenesis yoluyla rejenerasyonun başarılması gen transferi açısından önemli olduğundan diğer buğdaygillerin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu bitkilerin yem bitkisi olarak değerlendirilmesi yanında, kuraklık, tuzluluk ve besin elementi toksitesi ile

ilgili fizyolojik ve genetik çalışmalarda kullanılabilme potansiyeline sahip türlerle ilgili yapılacak doku kültürü çalışmalarının türlerin korunmasına, geliştirilmesi, bilime ve ekonomiye önemli katkılar sağlayacağına inanılmaktadır.

Puccinellia'nın buğdaygiller familyasına giren bitkilere yakın benzerliğinden dolayı bazı gen sekanslarının çeltik ve buğday ile benzerlik göstereceği düşünülebilir. Bu nedenle özellikle tahılların ıslahına önemli katkı sağlayacağı söylenebilir. Bu açıdan model bir bitki olabilecek *Puccinellia* ile ilgili çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

Bitkilerin ihtiyaç duydukları bitki besin elementlerinin miktarları, bitkilerdeki alım mekanizmaları ve meydana gelen biyokimyasal olayların anlaşılması, doğal kaynakların sınırlandığı ve dünya nüfus varlığının sürekli arttığı günümüzde, bitkisel üretimin miktar ve kalitesinin arttırılması açısından oldukça önem kazanmıştır.

Bir mikro besin elementi olan bor (B); dünyada ve Türkiye'de özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde topraktaki miktarlara bağlı olarak çok dar alanlarda bile lokal olarak toksik etki yapabilmektedir. Bu nedenle B toksitesi dünyanın çeşitli bölgelerinde özellikle tahıllarda verim düşüşlerinin başta gelen sebepleri arasında gösterilmektedir. (Torun ve ark. 1999). Nitekim Gezgin ve ark. (2002), Orta Güney Anadolu bölgesi tarım topraklarında yaptıkları çalışmada, bölge topraklarının elverişli B miktarlarını tespit etmişler ve tahıllar için bu bölge topraklarının % 26.6'sında B noksanlığı ve % 18.0'inde ise B toksitesi olduğunu ifade etmişlerdir.

Kurak ve yarı kurak iklim bölgeleri topraklarının fazla B içermesi, söz konusu bölgelerde yetiştirilen kültür bitkilerinde ve özellikle tahıllarda B toksitesinin çok yaygın bir beslenme problemi olmasına yol açmaktadır.

Bitkilerin B içerikleri arasında dikkate değer farklar vardır. Bu farklar bitkilerin yetiştiği ortamda bulunan elverişli B miktarı ve genotiple yakından ilişkilidir. Bitki türleri arasında olduğu kadar aynı bitkinin farklı çeşitleri arasında da B miktarları ve B'a gösterilen tepki açısından farklılıklar vardır (Taban ve Erdal (2000), B toksitesine olduğu kadar noksanlığına da tolerans için fizyolojik ve genetik varyasyon, bu varyasyonun B açısından elverişli olmayan topraklarda bitki yetiştirilmesinde nasıl kullanılabileceği, böylece bitkisel üretiminin maksimuma çıkarılmasının nasıl sağlanabileceği konularındaki çalışmalar önem kazanmıştır.

Bu araştırma, Konya Keçeli Kanalı boyu ve Eskişehir Kırka Bor İşletmesi alanında doğal yayılış gösteren *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın toplanan tohumlarının B'a ve doku kültürüne olan tepkilerini (rejenereasyon kabiliyetini) belirlemek amacıyla *in vitro* şartlarda yapılmıştır. Element ile ilgili çalışmaların *in vitro* şartlarda yürütülmesi; genotip x çevre interaksiyonun minimuma indirilmesi gibi noktalarda diğer tekniklere göre avantaj sağlar. Doku kültürü ile rejenerasyon sisteminin belirlenmesi ise gen transferi de dahil olmak üzere birçok çalışma açısından önemlidir. Çalışma sonunda elde edilen veriler; *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın (çorak çimi) B alımı ve *in vitro* seleksiyon gibi modern ıslah yöntemlerine kaynak teşkil etme açısından önemlidir. Bu çalışma ayrıca, bilgimiz dahilinde, *Puccinellia* cinsinde bu alanda Türkiye'de yapılan ilk lisansüstü çalışması niteliğindedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl (Çorak çimi) ile İlgili Araştırmalar

Poaceae familyasının çim alt familyası *Poaideae* iklim istekleri ve yayılış bakımından en fazla çeşitlilik gösteren çim alt familyasıdır. Yaklaşık 150 cinsle tüm çimlerin 1/4'ini kapsamaktadır. *Puccinellia* cinsi bilinen 100'den fazla türü ile *Poaideae* alt familyasının ortalama büyüklükte bir üyesidir (Choo ve ark. 1994).

Puccinellia cinsi genellikle hem kıyı kesimlerde hem de karaların iç kesimlerinde tuzlu alanlarda yayılmıştır. Coğrafi dağılımı temel olarak kuzey yarım küre ile sınırlıdır ve genellikle orta enlemlerden yüksek enlemlere doğru yayılmıştır. Cinsin bir kaç türü ise Güney Amerika, Afrika ve Avustralya'nın genellikle yüksek kesimlerinde görülmüştür. Kuzey Amerika ve Avrasya'nın kuzey bölgelerinde *Puccinellia*'nın türleri düzenli olarak yayılış göstermesine rağmen, daha güneyde birbirinden kopuk birkaç bölgede *Puccinellia* görülmektedir (Choo ve ark. 1994).

Ortalama gövde boyu 70-80 cm arasındadır. Kökleri saçak kök yapısında, kurak ve çorak alanlarda 6-7 m genişlikteki derinliklere kadar yayılabilmektedir. Gövde otsu yapıdadır, boğum ve boğum aralarından oluşmaktadır. Boğum aralarında gövdenin içi boş, boğumlarda ise öz ile doludur. Gövde toprağa yakın boğumlardan fazla miktarda kardeşlenerek yumak oluşturur. Yapraklar her boğumdan bir tane çıkarak, sap boyunca almaşıklı olarak dizilirler ve gövdeye sapsız olarak bağlanırlar. Yaprak ayası küt veya kayık şeklindedir. Başakçıklar birbirine eşit uzunlukta olmayan saplarla salkım eksenine birleşmişlerdir (Smallcombe 2004).

İngilizce adı "Alkaligrass" olan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl bitkisi bütün çim türleri arasında tuza en çok dayanan türdür. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın ise henüz tarımı yapılmasa da *Puccinellia*' nın tarımı yapılan türleri, *Puccinellia ciliata* ve *Puccinellia maritima* olup, bu türler 10-40 dSm^{-1} (çok tuzlu) tuz içeren topraklarda ve çorak alanlarda verim kaybına uğramadan yetişebilmektedir. *Puccinellia ciliata* ve *Puccinellia maritima* tarımı genellikle batı Avustralya'da tuzlu alanlarda yapılmaktadır. Optimum koşullarda %10-18 arasındaki protein oranı tuzlu

alanlarda %5'e düşmektedir. %60-78 olan sindirilebilirlik oranı ise tuzlu alanlarda %50'lere düşmektedir. Ot verimi 3-8 ton ha^{-1}'dır (Smallcombe, 2004).

Tuzcul ve kurağa dayanıklı olması nedeniyle dikkat çeken *Puccinellia'*da yapılan çalışmalar sınırlıdır. Ulaşılabilen çalışmalar tarih sırasına göre aşağıda verilmiştir:

Venables ve Wilkins (1978), tuzlu alanlarda doğal olarak yetişebilen *Agropyron repens*, *Agrostis stolonifera*, *Festuca rubra*, *Hordeum secalinum*, *Lolium perene* ve *Puccinellia distans* türleri üzerinde yürüttükleri çalışmalarda maksimum kök büyüme oranlarının tuza bağlı olarak farklılık gösterdiğini, *Lolium* ve *Hordeum*'un tuz içermeyen kontrol grubunda en uzun kök yaptıklarını, *Puccinellia*'nın 100 mM tuz konsantrasyonunda en uzun kök oluşturduğu halde diğer türlerin 50 mM NaCl tuzda en uzun kök oluşturduklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılara göre bitki gelişimi dikkate alındığında diğer türler en fazla 100 mM NaCl'de gelişebilirken *Puccinellia*'nın 200 mM'da etkilenmeden gelişmeye devam ettiğini ifade etmişlerdir.

Ashraf ve ark. (1986), *Agrostis stolonifera* L., *Agrostis capillaris* L., *Holcus lanatus* L., *Lolium perenne* L., *Dactylis glomerata* L., *Festuca rubra* L. ve *Puccinellia distans* (L.) Parl. türlerini 0, 150 ve 250 mol m^{-3} NaCl içeren besin çözeltisi içinde 14 gün boyunca yetiştirmiş, ve bitkileri ortama verdikleri tepki açısından seçerek sınıflandırmışlardır. Yaptıkları bu çalışma sonunda artan tuz konsantrasyonunun tüm türlerin ortalama kök uzunluğunda azalmaya sebep olduğunu, 250 mol m^{-3} NaCl içeren besin çözeltisinde *Puccinellia distans* (L.) Parl. dışında tüm türlerde kök büyümesinin engellendiğini belirlemişlerdir.

Parker ve Thomason (1991), *Astragalus, Leucaena, Medicago, Trifolium, Elymus, Elytrigia, Festuca, Leymus, Oryzopsis, Psathyrostachys, Puccinellia* ve *Sporobolus* cinslerinden pek çok tür, çeşit ve hattı bor ve tuza tolerans bakımından hücre süspansiyon kültürlerinde seleksiyon baskısına maruz bıraktıklarında hem tür içinde hem de türler arasında önemli varyasyon olduğunu belirlemişler, ümit veren 15 türü fide gelişimi döneminde tekrar test ettiklerinde bunlar içerisinde en ümitvar olanların *Astragalus bisulcatus*, *A. racemosus*, *Elytrigia pontica*, *Puccinellia distans* ve *Sporobolus airoides* olduğunu, bunlarda tuzluluk seviyesi (EC50 değerinin) 20

dSm^{-1} olduğunda çimlenmenin %50 azaldığını ve fide gelişim döneminde uygulanan 4 mM bordan etkilenmediklerini ifade etmişlerdir.

Choo ve ark. (1994), *Catabrosa, Phippsia*, *Sclerochola* ve *Puccinellia*, kloroplastlarından izole edilen DNA'lardan genetik farklılıkların belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalar *Puccinellia*'nın genomik olarak tek kaynaklı farklı bir tür olduğunu göstermiştir. *Sclerochola* ise *Puccinellia*'ya yakın akraba bir cins olarak tespit edilmiştir. *Phippsia, Puccinellia* ve *Sclerochola*' nın doğal melezi olarak da tespit edilmiştir ve *Catabrosa*'nın ise diğer türlere uzak kaldığı belirtilmiştir.

Alshammary ve ark. (2004), yaptıkları sera saksı ve su kültürleri (hidrofonik) çalışmalarında *Poa pratensis* L., *Festuca arundinacea* Screb., *Puccinellia distans* (L.) Parl. ve *Distichlis spicata* (Torr.) bitkilerinin tuza karşı toleranslarını ve büyüme tepkilerini karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Saksı denemelerinde kum kültürlerinde yetiştirilen bitkilere farklı seviyelerde tuz içeren sulama suyu uygulanmış, hidrofonik kültürlerde de bitkiler tuz çözeltisinde yetiştirilmiştir. Kök ve gövde uzunlukları, kök kütlesi, büyüme oranı gibi incelenen parametreler açısından bitkiler sınıflandırıldığında *Distichlis spicata* (Torr.) tuza çok dayanıklı, *Puccinellia distans* (L.) Parl. dayanıklı, *Festuca arundinacea* Screb. yarı hassas ve *Poa pratensis* L. hassas olarak belirlenmiştir.

Peng ve ark. (2004), monokotil (tek çenekli) bitkilerde tuz tolerans mekanizması çalışmalarında iyi bir model bitkinin olayışının ciddi bir problem olduğunu, halofit bir buğdaygil olan *Puccinellia tenuiflora*'nın tuza dayanıklılığı sebebiyle model bitki olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. *Puccinellia tenuiflora*'nın tuz tolerans mekanizmasının anlaşılabilmesi için yürüttükleri çalışmalarında ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) ile *Puccinellia tenuiflora*'yı aynı ortamda yetiştirmişler ve her ikisinin de tuz uygulamasına tepki olarak kök ve gövdelerinde biriktirdikleri Na^+ ve K^+ miktarını iyon analizi ile belirlemişlerdir. Ozmotik dengenin kurulması, protein sentezi ve enzim aktivitesi gibi önemli metabolik olaylarda görev alan K^+'nın buğdayla kıyaslandığında *Puccinellia tenuiflora*'da Na^+'ya göre daha fazla alındığını ve biriktirildiğini bulmuşlardır. Bu durum *Puccinellia tenuiflora*'daki iyon taşıma sistemlerindeki Na^+ seçiciliğinin

önemli olduğunu, tuza tolerans mekanizmasında tuzlu koşullarda olduğu gibi normal koşullarda da yüksek K^+ alınımının etkili olduğunu göstermiştir. *Puccinellia*'nın çoğu buğdaygil tarla bitkisine olan yakın benzerliği ve *Puccinellia*'daki bazı gen sekanslarının çeltik ve buğday ile benzerlik göstermesi sebebiyle ileride transgenik tuza dayanıklı bitki geliştirme potansiyeli açısından değerli olduğunu vurgulamışlardır.

Wang ve ark. (2007), *Puccinellia tenuiflora*'da yürüttükleri çalışmada $NaHCO_3$ (sodyum karbonat) uygulamasından 6, 12, 24, 48 saat sonra RNA izolasyonu yapmışlar ve gen ekspresyonlarının değiştiğini belirlemişlerdir. Yaklaşık %40 yeni yada fonksiyonu belirlenmemiş gen tespit etmişler ve protein sekanslarının incelenmesi sonucunda *Puccinellia tenuiflora* ile çeltik (*Oryza sativa)* ve ekmeklik buğday (*Triticum aestivum)* arasında yakın akrabalık belirlemişlerdir. Besin açısından önemli olan bu iki bitkiye yakınlığı ve $NaHCO_3$'e toleransı sebebiyle *Puccinellia tenuiflora*'nın tolerans mekanizmasının anlaşılmasının tuzlulukla ilgili çalışmalarda model bitki olarak kullanılabileceğini, toleransla ilgili genlerin belirlenmesi durumunda transgenik bitki geliştirmede önemli potansiyele sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

Eremchenko ve Lymar (2007), Rusya'daki Solikamsk–Berezniki endüstri bölgesinde yoğun tuzluluk stresi altındaki yerel florada bulunan bitkiler ve bunlardaki tuz metabolizmasını anlamaya yönelik yürüttükleri çalışmalarında, çevredeki tahribat ve tuzluluğun artışına bağlı olarak floradaki tür sayısının %70-90 arasında azaldığını, bitki örtüsünün düzensizleştiğini belirlemiştir. Bu türlerden en baskın olanların sırasıyla *Puccinellia distans, Lactuca tatarica, Lepidium latifolium* ve *Ctenopodium glaucum* olduğu, bunlara ilaveten, *Agropyron repens, Calamagrostis epigeios*, *Atriplex patula*, *A. calotheca*, *Leucanthemum vulgare, Artemisia vulgaris* ve *Hieracium umbellatum* olduğunu ifade etmişlerdir.

2.2. Bor (B) ile İlgili Araştırmalar

Bitkiler, biyokimyasal sentez olaylarını yerine getirebilmek için her birinin ayrı fonksiyonları olan çeşitli elementlere ihtiyaç duyarlar. Bu elementler "bitki besin

elementleri" olarak adlandırılırlar. Bu elementlerden biri olan B bitkilerin çoğunda önemli mekanizmalarda görev almaktadır. Bu nedenle B noksanlığı veya fazlalığı çoğu bitkide sorunlara neden olmaktadır. Bilim adamları son 50 yılda zirai ürünlerin çoğunda değişik hastalıklar görülmeye başlandığını bu durumun mantarlar ve haşerelerden kaynaklanan hastalıklar olmayıp genellikle B noksanlığından veya fazlalığından kaynaklandığını ifade etmiştir (Reis, 1996).

Çoğu bitki, toprak çözeltisindeki B konsantrasyonuna duyarlıdır. Hem düşük (noksan) hem de yüksek (toksik) B konsantrasyonu bitkilerde verimi düşürmektedir. B'un verime etkileri genellikle B konsantrasyonunun yüksek olduğu toprakta, sulama amaçlı kullanılan B içeriği yüksek olan sulama suyunun kullanıldığı alanlarda, kurak veya yarı kurak bölgelerde ortaya çıkar. Bir tarla denemesinde sulamada kullanılan tuzlu su sonucunda B toksitesinin uzun dönemdeki etkileri tuzun etkisinden daha fazla öne çıkarak verimi etkilemiştir. B toksitesi bitkilerin kök ve yeşil aksam büyümesini engelleyen ve tane verimini ciddi şekilde sınırlayan bir mikro element problemidir. Borun bitkilere yeterli miktarı ile toksik miktarı arasında dar bir sınır vardır. Bu sınır bitki türlerine göre değişmektedir (Şener 1983).

Tahıllar B'a karşı duyarlı bitkilerdir. Buğday, yetiştirme ortamında 2 mg kg^{-1}'e kadar B'u tolere etmekte ve bu seviyenin üzerindeki B'dan ise olumsuz yönde etkilenmeye başlamaktadır (Gupta ve ark. 1985).

Tahıllardan özellikle buğday ve arpa B fazlalığına diğer bitki türleriyle karşılaştırılamayacak kadar büyük bir duyarlılık göstermektedir. Bitkilerin büyük bir bölümünde B toksitesi zararı dokularda 100-1000 mg B kg^{-1} kuru madde dolayında olduğunda ortaya çıkarken, buğday ve arpada B zararı dokularda 20-50 ppm düzeyinde bile görülebilmektedir (Gupta ve ark. 1985; Bergman 1992).

Bitki bünyesinde B karbonhidrat ve protein metabolizmasında, doku farklılaşmasında, oksin ve fenol metabolizmasında, membran geçirgenliğinde, polen çimlenmesinde ve polen tüpünün uzamasında önemli roller üstlenmektedir (Marschner 1995). Bitkilerin ihtiyaç duydukları B miktarı oldukça azdır. Genellikle tek çenekli (monokotil) bitkilerin B gereksinimi, çift çenekli (dikotil) bitkilerin B gereksiniminden daha azdır. B toksite ve noksanlık sınır değerleri birbirlerine yakın

olduğu için gerek duyulan B'un çok az da olsa fazlası, B noksanlığında olduğu gibi bitkilerin gelişmesi üzerine olumsuz etki yapmaktadır.

Rerkasem ve Jamjod (1997) tarafından B noksanlığına karşı bitkilerde görülen genotipik varyasyon ve bunun bitki ıslahında kullanılması üzerine yapılan bir araştırmada, buğdayda B'a hassasiyet bakımından türler arasında farklılıklar görüldüğü, bazen de tür içerisindeki genotipik varyasyonun çok farklı olduğu tespit edilmiştir.

Alkan ve ark. (1997), Orta Anadolu Bölgesinde tahıl yetiştirilen bazı alanlarda B toksitesi problemine rastlanıldığını, bu nedenle de tahıl üretiminde önemli ölçüde verim düşüşleri meydana geldiğini, tahıllardan özellikle buğday ve arpanın topraktaki veya dokulardaki B fazlalığına büyük bir duyarlılık gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Atalay (2003), ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry) ile buğday (*Triticum durum* Desf.) ve arpa (*Hordeum vulgare* L.) *in vitro* fidelerinin B alımı ve biriktirme durumlarını araştırmıştır. Tohumlar; 200 ml'lik cam kavanozlarda, %0.7 agar, %3 sakaroz ve sırasıyla; 0.0, 6.2, 18.6, 55.8, 111.6 mg l^{-1} H_3BO_3 (borik asit) içeren 50 ml MS besin ortamlarında, her kavanozda 5 adet tohum olacak şekilde kültüre alınmıştır. Kızıltan-91'de köklerde en az B birikimi 2.2 µg g^{-1} kuru madde olarak kontrol ortamından elde edilirken, en yüksek kök B içeriği ise 15.1 µg B g^{-1} ile 111.6 mg l^{-1} H_3BO_3 içeren ortamdan elde edilmiştir. Gövdede B birikimi en az 4.9 µg B g^{-1} ile kontrolde, en yüksek 67.6 µg B g^{-1} ile 111.6 mg l^{-1} H_3BO_3 içeren besin ortamında olmuştur. Tokak-157/37'de en düşük kök B konsantrasyonunun 0.53 µg B g^{-1} ile yine kontrol ortamında, en yüksek birikimi ise 17.3 µg B g^{-1} ile 111.6 mg l^{-1} H_3BO_3 de olmuştur. Araştırıcı arpada en düşük gövde B konsantrasyonunun 0.74 µg B g^{-1} ile 0 mg l^{-1} H_3BO_3 da, en yüksek 100.5 µg B g^{-1} ile 111.6 mg l^{-1} H_3BO_3 da yetiştirilen fidelerin gövdelerinde biriktiğini bildirmiştir.

Soylu ve ark. (2004), tahıllar için düşük B ihtiva eden (0.19 mg kg^{-1}) toprakta, tarla koşullarında yaptıkları çalışmada 6 makarnalık buğday çeşidine (Kızıltan-91, Ç-1252, Selçuklu-97, Kunduru-1149, Yılmaz-98 ve Çakmak-79) 4 farklı B dozları (0, 1, 3 ve 9 kg B ha^{-1}) uygulamışlardır. İki yıl süren araştırma sonucunda, makarnalık buğday çeşitlerinin B dozlarına önemli derecede genotipik

farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hektara 3 kg B uygulaması ile Kızıltan-91 çeşidinde % 38'lik oranda en yüksek verim artışı sağlanırken, Çakmak-79 çeşidinde ise aynı dozda % 11'lik verim artışı kaydedilmiştir. Altı çeşidin ortalama tane verimi incelendiğinde verimde 1 kg ha^{-1} B uygulaması ile % 11, 3 kg ha^{-1} ile % 9 ve 9 kg ha^{-1} ile % 7 artış olduğu görülmüştür. Çeşitlerin bayrak yapraklarındaki B miktarları B dozlarının artışı ile ritmik bir artış göstermiş, kontrol parsellerinde 11.1 mg kg^{-1} olan B konsantrasyonu 1, 3, 9 kg ha^{-1} B uygulamalarında sırasıyla 14.67, 17.33 ve 24.28 mg kg^{-1} olmuştur.

Babaoğlu ve ark. (2004) tarafından Eskişehir İli, Kırka İlçesi'nde halen faaliyette bulunan yüksek oranda alınabilir ve toplam B içeren bor madeni alanında *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat. var. *sphaerocephala*, *Gypsophila perfoliata* L., *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl. ve *Elymus elongatus* olmak üzere sadece 4 bitki türünün yaşamını devam ettirebildiğini diğer türlerin ortamdan kaybolduğunu tespit etmişlerdir. Bu bitkilerde yaptıkları analizlerde B konsantrasyonunun çok yüksek olduğunu ve element analizleri sonuçlarına göre *Puccinellia distans*'ın *Gypsophila'dan* sonra alanda yetişen en fazla B biriktiren 3. bitki türü olduğunu belirlenmiş, bu bitkinin tuza karşı da toleranslı olduğu da ifade edilmiştir.

Yorgancılar ve Babaoğlu (2005), Orta Güney Anadolu tarım bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen makarnalık (*Triticum durum* Desf., Kızıltan-91, Kunduru-1149, Selçuklu-97) ve ekmeklik (*Triticum aestivum* L., Bezostoja-1, Gerek-79, Gün-91) buğday çeşitlerinde farklı B uygulamalarının çimlenme üzerine etkileri *in vitro* ve saksı denemeleri ile araştırmıştır. *In vitro* denemeler sırasıyla; 0, 1.08, 3.24, 9.72, 29.16 mg kg^{-1} B içeren MS besin ortamında yürütülmüştür. Çimlenme üzerine B dozlarının etkisi önemli bulunmazken, çeşitlerin ve çeşit x B interaksiyonun etkisi önemli bulunmuştur. Araştırma sonucunda bitki besin maddelerinin etkilerini belirlemede *in vitro* denemelerin saksı ve tarla çalışmalarına alternatif bir metot olarak tavsiye edilebileceğini ifade etmişlerdir.

Ayrıca Babaoğlu 2007 yılında aynı maden alanına yaptığı bir başka ziyarette işleme ve arıtma fabrikası atıklarının döküldüğü gölet kenarında en yakın alanda sadece *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ı bulurken, daha uzaklarda *Gypsophila*

türlerine rastlamış, bundan dolayı *Puccinellia*'nın çok yüksek B içeren sulu ve nemli ortamlarda *Gypsophila*'dan daha fazla B'a toleransa sahip olduğunu ifade etmiştir (Kişisel Görüşme 2008). Bu gezi sırasında toplanan bitki ve toprak örneklerinde 5000-6000 ppm toplam, 1000 ppm'e kadar da bitkiye elverişli B içeriği analiz edilmiştir. Bu nedenle *Puccinellia*'nın tuza ilave olarak B'a karşı da oldukça toleranslı olduğuna ve bu türle ilgili çalışmaların artması gerektiğine işaret edilmiştir.

2.3. Bitki Rejenerasyonu ile İlgili Araştırmalar

Modern ıslah metodları olarak kabul edilen tekniklerden birisi olan doku kültürünün bitki ıslahında kullanılması hem zaman hem de uzun dönemde uygulandığı takdirde yapılacak masraflar açısından büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları= eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Babaoğlu ve ark. 2001).

Bitki büyüme düzenleyicileri doku kültürü ortamlarının en önemli unsurudur. Kompleks yapılar gösteren yüksek organizasyonlu canlılar düzenli olarak büyüyüp gelişebilmek için hücreler arası iletişime ihtiyaç duyarlar. Bitkilerde bu iletişimi sağlayan temel araç, bilgiyi kimyasal mesaj olarak hücreden hücreye taşıyan, bitkisel hormonlar ya da fitohormonlardır. Söz konusu maddeler bitkilerde çok düşük konsantrasyonlarda bulunmakta ve bitki metabolizmasında önemli görevler üstlenmektedirler. Yapıları itibariyle bitkilerde bulunan doğal hormonlara benzeyen sentetik düzenleyiciler üretebilmekte ve hormon isminin elde edilen maddeleri tam tanımlamamasından hareketle bunlara büyüme ve gelişme düzenleyiciler denmektedir (George, 1993).

Büyüme düzenleyicilerinden oksinler; fotoperyodizm, köklendirme, apikal dominans, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesi ve hücre gelişiminde etkilidir. Oksinler, doku kültüründe tek başına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını, sitokininlerle birlikte yine kallus oluşumunu, sürgün rejenrasyonunu (organogenesis) ve somatik embriyo oluşumunun uyarılmasını sağlamaktadırlar. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde vazgeçilmez bir kullanıma sahiptirler. Köklendirmede IAA (Indole-3- butirik asit) temel hormon formu olarak kullanılır. Sentetik oksinler ise NAA (α-Naphthaleneacetic acid), IBA (), 2,4-D (2,4- dikloro fenoksi asetik asit), Picloram ve 2,4,5-T (2,4,5-trikloro fenoksi asetik asit) olarak belirtilmektedir (Smith, 1992).

Doğal sitokinin formları zeatin (ZEA) ve zeatin ribozid (ZR)'dir. 2IP (İzopentil adenin), K (kinetin), BAP (6-Benzil amino pürin) en çok kullanılan adenin (aminopurin) türevleridir. Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma (re-differentiation), bitki rejenerasyonu ve sürgün çoğaltımında etkili olup, antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler (Babaoğlu ve ark. 2001).

Puccinellia'da doku kültürü çalışmaları ya yeterli miktarda yapılmaması ya da doku kültürü ile rejenerasyon kabiliyetinin düşük olması bu türde rejenerasyon çalışmalarının sınırlı kalmasına neden olmuştur. Bu nedenle aynı cins içinde yer alan bitkiler üzerinde yapılmış rejenerasyon çalışmalarına da yer verilmiştir;

Boyd ve ark. (1986), *Poa pratensis'*in Merion ve Victa çeşitlerinde 0.2 mg l^{-1} 2,4-D+0.1 mg l^{-1} BAP +100 mg l^{-1} Casein+25 g l^{-1} sakkaroz içeren MS ortamında en iyi bitki rejenerasyonu ve kallus gelişimini tespit etmişlerdir. Birkaç bireyde kallus yüzeyinde embriyo benzeri yapılar oluştuğu ve meristematik sürgünlerin geliştiği tespit edilmiştir. Elde edilen yeşil bitkiler toprağa kolaylıkla transfer edilmiştir.

Binh ve ark. (1989), *in vitro*'da yaptıkları çalışmalarda. *Puccinellia distans* (L.) Parl.'da tohumlardan kallus kaynaklı rejenerasyon çalışmıştır. 2 mgl^{-1} 2,4-D ve 0.5 mgl^{-1} kinetin içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmış ve elde edilen kallusları, 0.1 mgl^{-1} 2,4-D içeren MS besin ortamında yeniden kültüre almışlar ve üç tip kallus tespit etmişlerdir. Elde edilen kalluslardan yüksek frekansda bitki

rejenerasyonuna ve embriyogenesise uygun olanlar seçilip, hormonsuz N_6 ve N_6 + kinetin (5–10 mgl^{-1}) veya kinetin (2 mgl^{-1}) ve IAA (0.5 mgl^{-1}) içeren besin ortamlarında kültüre alınmış ancak yeterli rejenerasyon elde edilememiştir.

Heszky ve ark. (1989), *Puccinellia limosa* (Schur.) Holmbg tohumlarından yaptıkları araştırmada MS temel besin ortamını kullanmışlardır. MS temel besin ortamına ilave edilen 2,4-D (diklorofenoksi asetik asit) ve kinetin kombinasyonları ile 3 farklı tipte kallus elde etmişlerdir. 1. tip kallus rejenerasyon yeteneğine sahip değildir. 2. tip kallustan sadece kök elde edilebilmiş, denenen bütün kültür kombinasyonlarında sürgün elde edilememiştir. 3. tip kallus embriyonik özelliğe sahiptir. Embriyogenik kallus çok düşük oranda oluşmuştur. Elde edilen sonuçlara göre embriyogenik 3. tip kalluslardan yeşillenenlerden % 87 oranında, yeşillenmeyen kalluslardan da % 4 oranında rejenerasyon elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Sahravat ve ark. (2000), araştırmalarında çeltik (*Oryza sativa L.*) bitkisinde 3, 4, 5 ve 7 günlük koleoptilleri eksplant olarak kullanmışlardır. Yüksek oranda embriyogenik kallus ve somatik embriyo 0.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} kinetin + 490 µM L-tryptophan + %3 sakkaroz içeren MS besin ortamı kombinasyonu ile elde edilmiştir.

Yasmin ve ark. (2001), 235/2 buğday çeşidinin olgun embriyolarını LS temel tuzları ve 0-2 mg l^{-1} 2,4-D içeren veya 0.2 mg l^{-1}BAP, 0.2 mg l^{-1} kinetin içeren besin ortamlarında kültüre almışlardır. Çalışmalar boyunca embriyogenik ve embriyogenik olmayan kalluslar elde etmişlerdir. En uygun embriyogenik kallus gelişimi ortamı olarak 1.5 mg l^{-1} 2,4-D içeren besin ortamı kombinasyonunu tespit etmişler ve. embriyogenik olan kallusların büyüme düzenleyici içermeyen besin ortamda alt kültüre alındıklarında sürgün oluşturduklarını ve bu sürgünlerin geliştiklerini bildirmişlerdir.

Goldman ve ark. (2003), genellikle golf sahalarının yeşillendirilmesinde kullanılan *C. dactylon*'un bir çeşidi olan Tifeagle'de bitki rejenerasyonu çalışmıştır TTifeagle'den alınan kesilmiş rizomlar embriyogenik kallus gelişimi için 1 mg l^{-1} 2,4-D + 0.01 mg l^{-1} BAP içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Daha sonra elde edilen kalluslar 0.75 mg l^{-1} 2,4-D + 0.01 mg l^{-1} BAP içeren MS temel besin ortamında karanlıkta alt kültüre alınmış ve embriyogenesis uyarılmıştır. Elde edilen

somatik embriyolar 0.13 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} BAP içeren ortamda aydnlık koşullarda kültüre alındığında ise sürgün gelişimi için başarılı bir şekilde uyarılmıştır.

İhsan ve ark. (2003), bir ekmeklik buğday (*Triticum aestivum L.*) çeşidi olan Lu-26S'nin tohumlarında 2,4-D, IAA ve BAP'nin kallus oluşumu ve rejenerasyon üzerine olan etkisini araştırmışlardır. MS temel besin ortamında 3.5 mg l^{-1} 2,4-D' de uygun kallus gelişimini tespit etmişlerdir. Ayrıca 2 mg l^{-1} 2,4-D ve 0.5 mg l^{-1}BAP kombinasyonunda da iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Oluşan embriyogenik kalluslardan 4 mg l^{-1} BAP veya 2 mg l^{-1}BAP ve 1 mg l^{-1} IAA kombinasyonundan rejenerasyon elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Artunduaga ve ark. (2004), *Botriochola ischaemum* ve *C. dactylon L.'*nin farklı genotiplerinin farklı oksin konsantrasyonlarında embriyogenik kallus oluşturma yeteneklerinin belirlenmesine çalışmışlardır. Bu amaçla *Botriochola ischaemum* genotipleri olan A-8793 ve A-8911c ve *C. dactylon L.* genotipleri olan A-10978b, A-12164 ve Brazos'u kullanmışlardır. Çalışmada eksplant olarak olgunlaşmamış çiçekler 9 mm uzunluğunda kesilerek, MS temel besin ortamında 0, 1, 3, 5 mg l^{-1} 2,4-D' de 25 ^{o}C'de karanlıkta 4 hafta boyunca kültüre alınmıştır. Bu koşullarda embriyogenik kalluslar oluşmuş, daha sonra oksin içermeyen MS temel besin ortamında 25 ^{o}C'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlıkta 8 hafta boyunca kültüre alınmış ve embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu uyarılmıştır. Besin ortamındaki 3 mg l^{-1} 2,4-D konsantrasyonu Brazos hariç kullanılan bütün genotiplerden maksimum oranda embriyogenesisi uyarmıştır. Somatik embriyolar ışık altındaki kültürden sonra gelişmiştir. Ancak Brazos'un kallusları embriyogenik olmadığı için ondan rejenerasyon elde edilememiştir.

Farooq ve ark. (2004), buğdayda tohumlardan bitki rejenerasyonu kabiliyetini araştırmışlardır. 2 mg l^{-1} 2,4-D içeren MS temel besin ortamında embriyogenik kallus oluşturulmuştur. Daha sonra kalluslardan 2.5 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} IAA içeren MS temel besin ortamında Bakthawar-92 çeşidinden %40, Punjab-96 çeşidinden %33 ve Inqilab-91 çeşidinden de %25 oranında rejenerasyon elde edildiğini bildirmişleridir.

Hy ve ark. (2004), *in vitro'*da *Cynodon dactylon'*da embriyogenik kalluslarından rejenerasyon elde edebilmek için bir doku kültürü sistemi geliştirmişlerdir. Embriyogenik kalluslar daha çok karyopsis'den elde edilmiştir. MS temel besin ortamında 2-6 mg l^{-1} 2,4-D konsantrasyonlarında en iyi tepkiler oluşmuş, en uygun 2,4-D konsantrasyonu olarak 4 mg l^{-1} 2,4-D tespit edilmiştir. Kallus gelişiminin devamı için, kalluslar 1-2 kez 4 mg l^{-1} 2,4-D içeren MS besin ortamında alt kültür yapılmış ve ½ MS'de (büyüme düzenleyici içermeyen) 10 gün boyunca kültüre alındıktan sonra MS + 3 mg l^{-1} BAP'da %31,7 sürgün rejenerasyonu elde edildiğini bildirmişlerdir.

Goldstein ve ark. (2004), *in vitro'*da arpada (*Hordeum vulgare L.*) olgunlaşmamış embriyo kaynaklı bir rejenerasyon sistemi araştırmışlardır. Olgunlaşmamış embriyoları Gamborg (B_5) temel besin ortamında, 2,4-D ve 2,4,5-T içeren besin ortamlarında kültüre almışlar ve embriyogenik kalluslar elde etmişlerdir. 1 mg l^{-1} 2,4-D ve 5 mg l^{-1} 2,4,5-T içeren besin ortamı kombinasyonlarında elde edilen embriyogenik kalluslar, oksinsiz veya 1 mg l^{-1} 2,4,5-T içeren besin ortamlarında kültüre aldıklarında somatik embriyogenesis yoluyla rejenerasyon elde etmişlerdir.

Griffin ve ark. (2004), *in vitro'*da *Poa pratensis* tohumlarında farklı gelişim düzenleyicilerinin besin ortamındaki oranlarının rejenerasyon yeteneğine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada temel besin ortamı olarak MS kullanılmıştır. MS temel besin ortamında 2 mg l^{-1} 2,4-D'de embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Besin ortamına ilave edilen 10 mg l^{-1} Dicamba veya 10 mg l^{-1} Picloram desteği ile bitki rejenerasyonu %0.4'den %4'e yükselmiştir. 10 mg l^{-1} Dicamba ve 2.25 mg l^{-1} BAP kombinasyonlu ortamda kalluslardan %20 oranında bitki rejenerasyonu sağlandığını, büyüme düzenleyicilerin yüksek oranlarında (10 yada 20 mg l^{-1} Dicamba ve 4.5 mg l^{-1} BAP) %45 bitki rejenerasyonu elde edildiğini bildirmişlerdir.

Valk ve ark. (2004), *in vitro'*da *Poa pratensis* tohumlarında kallus gelişimine BAP'nin etkisini araştırmışlardır. Araştırmada MS temel besin ortamını kullanmışlardır. Çalışmalarında 1-2 mg l^{-1} 2,4-D'ye ek olarak besin oratmına ilave edilen 0.1 ve 0.3 mg l^{-1} BAP'nin kullanımının, güçlü embriyogenik kallusların elde edilmesinde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Hu ve ark. (2005), *Poa pratensis*'de yaptıkları çalışmada eksplant olarak tohumlardan elde edilen sürgün parçalarınının meristematik bölgelerini 0.2 mg l^{-1} 2,4-D +2 mg l^{-1} BAP içeren besin ortamında 20 gün kültüre almış ve kallus elde etmiştir. Kalluslar daha sonra 2 mg l^{-1} BAP'da kültüre alınarak organogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu elde edilmiştir.

Thapa ve ark. (2005), *in vitro'*da Brazos ve PCR52 (*C. dactylon*) çeşitlerini kullanarak oksin tipi ve miktarının kallus gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında eksplant olarak genç çiçek dokularını kullanmışlardır. Genç dokuları 0, 1, 3, 5, 7 mg l^{-1} oranlarında Picloram ve 2,4-D içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Çalışmalara göre kalluslar 0 mg l^{-1} oksin içeren besin ortamları hariç diğer besin ortamlarında gelişmiştir. Brazos 3, 5 ve 7 mg l^{-1} 2,4-D içeren besin ortamında en iyi kallus gelişimini gösterirken, PCR52 5 ve 7 mg l^{-1} 2,4-D içeren besin ortamında en iyi sonucu vermiştir. Brazos'un kallusları rejenerasyon konusunda sıkıntı çekerken, PCR52'de 3 mg l^{-1} 2,4-D içeren besin ortamındaki alt kültürde sürgün rejenerasyonunun meydana geldiği tespit edilmiştir.

Bi-po ve ark. (2006), *Poa Pratensis*'de kallus yoluyla somatik embriyogenesis elde etmek için yaptıkları çalışmalarında olgun tohumları kallus eldesi için eksplant olarak kullanmışlar, 2.0 mg l^{-1} 2,4-D içeren MS ortamında somatik embriyo gelişiminin uyarıldığını belirlemişlerdir. Elde edilen somatik embriyolardan en iyi sürgün rejenerasyonu 0.25 mg l^{-1} TDZ içeren MS ortamında gerçekleşmiştir.

Liu ve ark. (2006), *in vitro'*da 11 adet *Lolium perenne* çeşidinde en uygun kallus gelişiminin 5 mg l^{-1} 2,4-D ve 0.05 mg l^{-1} BAP içeren MS besin ortamı kombinasyonunda tespit etmişlerdir. Oluşan kalluslardan bitki rejenrasyonunda MS ortamına ilave edilen büyüme düzenleyicilerin oranlarına göre büyük çeşitlilik görülmüş ve en iyi bitki rejenerasyonunu 3 mg l^{-1} BAP, 1 mg l^{-1} NAA ve 1 mg l^{-1} kinetin içeren MS besin ortamında Barlennium, Pace, Emerland ve Premier çeşitlerinde gözlemlemişlerdir.

Zang ve ark. (2006), *in vitro'*da *C. dactylon* bitkisinin Sundevil ve Mirage çeşitlerinde olgun tohum kullanarak bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Çalışmada 2 mg l^{-1} 2,4-D içeren MS temel besin ortamında embriyogenik kalluslar

elde edilememiş, besin ortamına ilave edilen 0.1 ve 0.5 mg l^{-1} BAP ile sıkı, kırılgan ve sarımtrak kalluslar elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar büyüme düzenleyici içermeyen MS besin ortamında alt kültüre alındığında % 70 rejenerasyon elde edildiğini bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (2007), *in vitro*'da yaptıkları çalışmalarda, triploid ve tetraploid *C. dactylon* türlerinden alınan farklı eksplant tiplerinin rejenerasyon yeteneklerini karşılaştırmışlardır. Eksplant olarak çiçek ve rizomlar kullanılmıştır. Eksplantlar 1-1.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.01 mg l^{-1} BAP +1.16 g l^{-1} prolin içeren MS temel besin ortamında kültüre alınmış ve bunun sonucunda dört doku tipi tespit edilmiştir. 1. tip doku yumuşak, hassas ve beyaz emriyogenik olmayan doku, 2. tip doku küre şeklinde, saydam, sert, yapışkan, embriyogenik öncesi dokudur ve alt kültür için seçilebilecek dokudur, 3. tip doku saydam, sıkı ve emriyogeniktir, 4. tip doku ise beyaz, yuvarlak ve sıkıdır. Hem 3. hem de 4. tip dokular emriyogenik ve rejenerasyon kabiliyetleri yüksektir. MS temel besin ortamı + 2 g l^{-1} gelrite ve 5 g l^{-1} agar dokuların kalitesini geliştirmiştir ve alt kültür süresince embriyogenik doku oranını artırmıştır. Embriyogenik dokular 0.1 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5-4.0 mg l^{-1} BAP ortamında alt kültüre alınmış ve sürgün gelişimi elde edilmiştir. Buna ek olarak hafif ($30\mu mol^{-2}\ s^{-1}$) şiddetli beyaz ışık uygulaması yapılmış ve bu da rejenerasyon oranını % 6.7'den % 40'a yükseltmiştir.

Ahmet ve Adak (2007), Irak florasında genetik materyal olarak ve yetiştiricilik açısından önem taşıyan Temmuz 2, Irak, Eliz 66, İba 99 Musaddak ekmeklik buğday çeşitlerinde kallus ve rejenere bitkicik potansiyelinin çalışmıştır. Kallus oluşumu için 8 mg l^{-1} 2,4-D içeren MS ortamı ve 20 g l^{-1} sakaroz, 7g l^{-1} agar kullanılmıştır. Çalışmada, kallus oluşumu, kallus ağırlığı, rejenerasyon kapasitesi, kültür etkisi ve rejeneratif bitki sayısı parametre olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; kallus oluşumu % 88.75 (Eliz 66) – % 98.75 (İba 99, Musaddak), kallus ağırlığı 0.70 g (Temmuz 2) – 7.22 g (Eliz 66), rejenerasyon kapasitesi % 86.75 (Eliz 66) - % 98.75 (İba 99 Musaddak), kültür etkisi % 77.50 (Eliz 66) - % 97.50 (İba 99 Musaddak), bitki sayısı ise 3.500 (İba 99 Musaddak) – 16.26 (Temmuz 2) arasında belirlenmiştir. Ayrıca karakterler arasındaki ilişki incelendiğinde; kallus ağırlığının bitki sayısını arttırdığı belirtilmiştir. Artan kallus ağırlığının, rejenerasyon yeteneğinin yüksek olmasını sağladığı belirtilmiştir. Irak'ta geliştirilen ve yaygın

olarak yetiştirilen (kuraklık, tuzluluk gibi bazı abiyotik stres faktörlerine dayanıklı / toleranslı) bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve rejenerasyon yetenekleri; bir başka deyişle bu çalışmada adı geçen buğday çeşitlerinin doğrudan gen aktarma yöntemlerinde kullanabilme potansiyelleri belirlenmiş, bunlardan Irak çeşidinin bu tip çalışmalarda en uygun çeşit olduğu ifade edilmiştir.

Ha ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada eksplant olarak *Poa pratensis'*in olgun tohumları kullanmış ve yüksek doku rejenerasyonu için en uygun koşulların kısık ışık altında (10-30 µE m^{-2} s^{-1}, 16 saat fotoperiyotda) 1-2 mg l^{-1} 2,4-D ve 0.1-0.5 mg l^{-1} BAP konsantrasyonlarındaki besin ortamında meydana geldiğini bildirmişlerdir. Çalışmada MS temel besin ortamı kullanılmıştır. Elde edilen kalluslardan büyüme düzenleyicisi içermeyen besin ortamında rejenerasyon sağlanmıştır

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada Konya Keçeli Kanalizasyon Kanalı etrafından, Eskişehir Kırka Bor (B) işletmesi maden alanı ve yine aynı alandaki yıkama göleti olmak üzere 3 farklı alandan toplanan Çorak çimi (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl) tohumları materyal olarak kullanılmıştır. Tohumların toplandığı bu alanlara bundan sonra lokasyon denilmiştir. Tohumların toplandıkları bölgelerin toprak analizleri yapılmış, Konya Keçeli Kanalizasyon Kanalı etrafından alınan toprak örneklerinde 26.72 mg kg^{-1}, Eskişehir Kırka B işletmesi maden alanından alınan toprak örneklerinde 2032.05 mg kg^{-1} ve yine aynı alandaki yıkama göleti bölgesinden alınan toprak örneklerinde 2057.61 mg kg^{-1} elverişli B olduğu tespit edilmiştir.

2007 yılında, ihtiyaç durumunda materyal kaynağı olarak kullanma amaçlı bitkilerin vejetatif büyüme hızlarının yüksek olduğu Nisan-Mayıs aylarında yeşil köklü bitkiler getirilmiş ve canlı bitkilerin Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi iklim kontrollü otomatik araştırma serasında saksılara dikilerek idameleri sağlanmıştır. Daha sonra aynı yılın Temmuz-Ağustos aylarında tohum bağlama sonrası araziye çıkılarak tohumlar, doku kültürü çalışmalarında materyal olarak kullanma amaçlı getirilmiştir. Toplanan tohumların ise temizlenmesi sonrası çimlenme testleri yapılmıştır.



Şekil 3.1. Eskişehir ili Kırka Etimaden Bor (B) İşletmesi maden alanında *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl bitkilerinin görünümü

3.2. Metot

Çorak çimi (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl) bitkisinde bor alımının ve rejenerasyon sisteminin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışma *in vitro* koşullarda yürütülmüştür. Hazırlanan farklı bor seviyelerine sahip besin ortamlarında yetiştirilen fidelerde element analizleri yapılırken, yine farklı büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında rejenerasyon çalışmaları yapılmıştır. Elementel analizler dışında çalışmanın tamamı S.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüş, elementel analizler S.Ü. Ziraat Fakültesi Toprak Bölünümü Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki Denemeler Tesadüf Parselleri deneme desenine göre yürütülmüştür.

3.2.1. Sterilizasyon

Sterilizasyon işlemleri bütün laboratuvar düzeyinde ele alınarak çalışılan materyal ve malzemenin özelliğine göre uygun olarak aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır.

3.2.1.1. Genel sterilizasyon

Tüm steril çalışmalar 0.22 µm porozitede hepa filtrelere sahip yatay hava akışlı (0.5 m sn^{-1}) kabin içinde gerçekleştirilmiştir. Steril çalışmalara başlamadan önce yatay hava akışlı kabinin içi % 96'lık etil alkolle silinmiş ve kabin içi 20 dakika süreyle açık bırakılan ultra-viyole (U.V.) lambası ile sterilize edilmiştir.

Steril çalışmalarda kullanılacak aletler (bisturi, pens vb.) kullanımdan önce % 96'lık etil alkol içine batırıldıktan sonra alev lambasına tutularak alevle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur.

Tohum sterilizasyonunda kullanılan saf su ve sterilizasyon sonrası tohumların kurutulmasında kullanılan filtre kağıtları otoklavda 121 °C de 1.5 atm basınç altında 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sırasında kullanılacak kavanozlar, boş olarak kapakları kapatılıp aynı şekilde sterilize edilmiştir. Eksplantların kesilerek kültüre alınmasında kullanılan 15x15 cm ebadındaki fayanslar alüminyum folyo ile sarılıp otoklav poşetine konulduktan sonra yine otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.1.2. Besin ortamlarının sterilizasyonu

Bor çalışmalarında kullanılan besin ortamları hazırlandıktan sonra Magenta kaplarına konulmuş, kapakları hafifçe kapatılarak etiketlenmiş ve kapaklarına otoklav bandı yapıştırıldıktan sonra otoklav sterilizasyonuna tabi tutulmuştur (otoklav bandı sterilizasyon sonrası renk değiştirdiği için kapların veya ortamın sterilize edilip edilmediğinin göstergesidir). Tüm besin ortamları otoklavda (Hirayama, Hiclive HV-85) 121 °C de 1.5 atm. basınç altında 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası kapaklar hemen sıkıştırılmıştır. Bütün ortamlar otoklav edildikten sonra 1-2 saat dışarıda bekletilmiş, soğutulduktan sonra kullanılıncaya kadar kapalı bir dolapta saklanmıştır.

Rejenerasyon çalışmalarında kullanılan besin ortamları da aynı şekilde sterilize edilmiş, ısıya duyarlı büyüme düzenleyicileri otoklav sonrasında steril

olarak laminar kabin içinde ortama ilave edilmiştir. Rejenerasyon çalışmaları çoğunlukla petrilerde yürütüldüğü için petrilere dağıtılacak ortamlar ağzı kapaklı bir şişede hazırlanıp otoklav sonrası katılaşmadan yatay hava akışlı kabin içerisinde 20 ml'lik steril plastik pipetle her petriye 30 ml olacak şekilde 9 mm çapındaki steril cam petri kaplarına dağıtılmıştır. Ortamlar katılaştıktan sonra petri kaplarının kenarları parafilm ile sarılarak kapalı dolapta muhafaza edilmiştir. Bor ihtiva eden besin ortamları ve çalışmada kullanılan ısı ile bozulmayan büyüme düzenleyici ihtiva eden besin ortamları da otoklovda sterilize edilmiştir.

3.2.1.3. Bitki materyallerinin sterilizasyonu

Ön sterilizasyon için her lokasyondan ortalama 300 adet tohum seçilmiş ve öncelikle akan musluk suyu altında 15 dakika bekletilmiştir.

Sterilizasyonda ise öncelikle 30 saniye süreyle % 96'lık (h/h) alkol ile muamele edilen tohumlar alkol kuruyuncaya kadar bekletildikten sonra hazırlanan 1-2 damla yayıcı-yapıştırıcı madde (Tween-20) ihtiva eden % 30'luk (h/h) ticari hipoklorit çözeltisi (%50 NaOCl içeren HES) içinde 15 dakika çalkalanmıştır. Sürenin sonunda 3-4 defa steril saf su ile durulanarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Tohumlarda boş dane oranı yüksek olduğundan genelde düşük çimlenme kabiliyetine sahiptir. Denemelerde tüm tekerrürlerde eşit bitki sayısının elde edilebilmesi için sterilizasyon sonrası tohumlar petrilerde steril su ile ıslatılmış filtre kağıdı üzerinde 12 saat bekletilmiş ve su alıp şişen endospermleri dolu tohumlar denemelerde kullanılmıştır.

3.2.2. Besin ortamlarının hazırlanması

Bütün ortamlar ve stok solüsyonları, Sigma ve Merck'ten elde edilen analitik seviyede kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır.

MS, B_5 ve N_6'ya dayalı ortamlar, ticari olarak hazırlanmış toz preparatlar veya stok solüsyonları ile hazırlanmış çözeltilere karbon kaynağı olarak sakkaroz ve yarı-katı hale getirmek için agar ve bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilerek hazırlanmıştır. Sakkaroz katı olarak ilave edilmiştir. Sakkaroz tamamen eritildikten sonra ortamın pH'sı 0.1-1 N KOH yada 0.1-1 N HCl ile pH 5.8'e ayarlanmış, distile su ile istenilen hacme tamamlanmış, 7 g l^{-1}agar ilave edilmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda eritildikten sonra kültür kaplarına istenilen hacimde dağıtılmıştır.

Stok solüsyonlar bir laboratuvarda dikkatli bir şekilde hazırlanıp sürekli taze olarak elde tutulması gereken besin ortamı unsurlarındandır. Çünkü ticari olarak satılan hazır preparatlar pahalı olmakta ve ortam içeriği istenildiği gibi değiştirilememektedir. En çok hazırlanan stok solüsyonlar; makro ve mikro elementler, bitki büyüme düzenleyicileri, vitaminler ve antibiyotiklerdir. Stok solüsyonları hazırlanırken, her biri hassas terazide tartıldıktan ve 80 ml saf su içinde, manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlanmış ve çözeltiler kullanılıncaya kadar plastik kaplar içerisinde buzdolabında saklanmıştır. Tüm stok solüsyonlar Babaoğlu ve ark (2001)'na göre hazırlanmıştır.

3.2.2.1. Bor (B) denemelerinde kullanılan *in vitro* çimlendirme ortamlarının hazırlanması

Bor (B) denemelerinde kullanılan MS ortamları standart formulasyona göre (Murashige ve Skoog, 1962) stok solüsyonlar kullanılarak laboratuvarda hazırlanmış ve borik asit (H_3BO_3) miktarları emprik olarak ortamlarda kontrol edilerek modifiye edilmiştir. Bir litre besin ortamı hazırlamak için 2 litrelik bir kapta 800 ml saf su ile işe başlanmıştır. Erlen manyetik karıştırıcı üzerine konulup karıştırıcı çalıştırıldıktan sonra MS formülasyonunda tüm makro besin elementleri hassas terazide teker teker tartılarak ilave edilmiştir. Mikro besin elementleri daha önce hazırlanmış stok solüsyonlar kullanılarak hassas pipet (Gilson) yardımıyla ortama ilave edilmiş ve 5 farklı konsantrasyonda borik asit formunda 0, 50, 250, 500 ve 1000 mg B l^{-1} (a/h) olacak şekilde ortama eklenmiştir. Sonra sakkaroz (30 g l^{-1}, a/h) ilave edilerek pH 5.8'e ayarlanıp hacim 1 litreye tamamlanarak katılaştırıcı olarak 7 g l^{-1} (a/h) agar

ilave edilmiştir. Ortam şeffaf bir renk alıncaya kadar ısıtılıp 200 ml'lik kültür kapları olan Magenta (Sigma) adı verilen özel kültür kaplarına her Magenta kabında 50 ml besin ortamı olacak şekilde dağıtılmıştır. Bor dozlarına göre etiketlenen Magentaların kapakları kapatılarak örtülerek otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.2.2 Rejenerasyon ortamları ve meristem kültürü ortamlarının hazırlanması

Bitki rejenerasyon çalışmalarında kullanılan besin ortamlarını hazırlamak için MS, B_5 ve N_6 ticari toz ortamları kullanılmıştır. Çalışmalara başlamadan önce gerekli olan besin ortamı miktarı belirlenmiş, hazır besin ortamlarından tartılarak ağzı kapaklı otoklava dayanıklı bir kabın içinde saf suda çözüldükten sonra, gerekli oranda sakkaroz (30 mg l^{-1}) ilave edilmiş ve pH 5.8'e ayarlanarak hacmi tamamlanmış, yarı katılaştırıcı olarak tüm ortamlarda agar 7 g l^{-1} oranında kullanılmıştır. Hazırlanan ortamlar ağızları kapatılarak otoklavda sterilizasyona tabi tutulmuştur. Otoklav sonrası gerekli olan filtre veya otoklavla sterilize edilmiş büyüme düzenleyicileri kabin içinde steril şartlarda uygun konsantrasyonda ortamlara ilave edilmiş, iyice karıştırıldıktan sonra yine steril pipetle 90 mm çaplı petri kutularına 20 ml olarak dağıtılmış, agarın katılaşması sonrası eksplantlar kültüre alınmıştır.

Meristem kültüründe kullanılan besin ortamlarını hazırlamak için MS ticari toz ortamları kullanılmıştır. Çalışmalara başlamadan önce gerekli olan besin ortamı miktarı belirlenmiş hazır besin ortamından tartılarak ağzı kapaklı otoklava dayanıklı bir kabın içinde saf suda çözüldükten sonra, gerekli oranda sakkaroz (30 mg l^{-1}) ilave edilmiş ve pH 5.8'e ayarlanarak hacmi tamamlanmış, yarı katılaştırıcı olarak tüm ortamlarda agar 7 g l^{-1} oranında kullanılmıştır. Hazırlanan ortamlar ağızları kapatılarak otoklavda sterilizasyona tabi tutulmuştur. Otoklav sonrası gerekli olan filtre veya otoklavla sterilize edilmiş büyüme düzenleyicileri kabin içinde steril şartlarda uygun konsantrasyonda ortamlara ilave edilmiş, iyice karıştırıldıktan sonra yine steril pipetle 90 mm çaplı petri kutularına 20 ml olarak dağıtılmış, agarın katılaşması sonrası eksplantlar kültüre alınmıştır.

3.2.3. Bor'lu besin ortamlarında *In vitro* çimlendirme

Sterilize edilen tohumlar, içinde % 0.7 (a/h) agar, % 3 (a/h) sakkaroz ve 5 farklı H_3BO_3 (0, 286.2, 1430. 8, 2861.6 ve 5273.1 mg l^{-1}) konsantrasyonuna sahip MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Denemeler her doz için 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Her Magenta kabına 7 adet tohum konulmuş ve çimlenmeden hemen sonra steril kabin içinde bitkiler 5'e seyreltilmiştir. Magentalar 16 saat fotoperiyot, % 60 nem, 25°C (±1) sıcaklık ve 3000 lüks ışık yoğunluğu koşullarında raflı kültür dolabına konulmuştur. Kültür sonrası 8. ve 12. günde tohumlar gözlenmiş ve çimlenme yüzdeleri tespit edilmiştir.

3.2.4. Denemelerdeki gözlem ve ölçümler

Çimlenme üzerine borun etkisinin ve lokasyonlar arasındaki farklılıkların belirlenmesi için tohumlar 8. ve 12. günde gözlenmiş, çimlenen tohum sayısı belirlenmiş, elde edilen değerlere göre çimlenme durumu % olarak kaydedilmiştir.

Fide boyu, kök boyu, gövde kuru ağırlığı, kök kuru ağırlığı kültürün 120. gününde her tekerrür için 5 adet bitki fideleri alınmış ve bitkinin gövde ve kök uzunlukları ölçülerek ortalama uzunluk cm olarak belirlenmiştir.

Bitki kök ve gövdesi bir bisturi yardımı ile birbirinden ayrılmış, köklerdeki agar saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra etüvde 70 °C'de 72 saat süreyle kurutulmuş, kuru gövde ve kök ağırlıkları (mg) belirlenmiştir.

Rejenerasyon denemelerinde oluşan kalluslarda kallus ağırlığı (mg) ve kallus çapı (mm) olarak ölçülmüştür.

Meristem kültürü çalışmalarında eksplantlardan oluşan sürgün sayıları (adet) sayılmıştır.

3.2.5. ICP-AES analizleri

Farklı B içeriklerinde yetiştirilen 120 günlük fideler sahip oldukları B miktarının belirlenmesi için ICP-AES'de analiz edilmiştir. Elementel analizler S.Ü. Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.2.5.1. ICP-AES analizleri için bitki örneği hazırlama

Kökler; tohum yüzeyinden bisturi ile kesilerek tohumdan ayrılmış ve saf su ile agardan arındırılana kadar yıkandıktan sonra kağıt havlu arasında suyu alınmış ve 70°C'deki etüve plastik kaplar içinde konularak yaklaşık 72 saat kurutulup yakma işlemine geçilmiştir.

Bitki gövdesi (Sap+Yaprak); her bir farklı konsantrasyonda B içeren kavanozlarda bulunan tüm bitki gövdeleri tohum yüzeyinden bisturi ile kesilerek tohumdan ayrılmıştır. Bitki gövdeleri kurutma ve yakma sırasında kolaylık sağlaması amacıyla bisturi ile 2-3 parça olacak şekilde kesilip plastik kaplara konulmuş ve 70°C'deki etüvde yaklaşık 72 saat kurutulduktan sonra yakma işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.5.2. ICP-AES analizleri için bitkilerin mikrodalgada yakılması

Etüvde 70 °C' de bünyesindeki hava nemini kaybederek sabit ağırlığa gelen bitki kısımlarının ağırlıkları elementel analizde kullanılmak üzere hassas terazide belirlendikten sonra mikrodalga fırının yakma sırasında kullanılacak ısı ve basınca dayanıklı teflon kaplarına konulmuş ve her bir örneğin üzerine 5 ml nitrik asit (HNO_3) ve 2 ml hidrojen peroksit (H_2O_2) ilave edilmiştir. Kaplar bu şekilde 10-20 dk. kadar bekletilmiş, kapakları, gaz çıkışı azaldığında kapatılmış, kılıflarına takılmış ve vidaları sıkıştırılarak mikrodalga fırının (Cem Marks Express) içine yerleştirilmiştir. Minerallerin çözünmesi için yapıdaki organik maddenin parçalanmasını sağlayan yakma işlemi 190 °C'de 15 dk., 200 °C'de 5 dk. ve 205

°C'de 20 dk. olmak üzere toplam 40 dakikada tamamlanmıştır. Yakma işlemi tamamlanınca hacim göstergeli plastik tüplere aktarılan örneklerin hacmi saf su ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. Örnekler kapaklı plastik kaplara mavi bantlı filtre kağıdıyla süzülerek aktarılmış, yüksek B dozlarından elde edilen bitki örnekleri (50, 250, 500 ve 1000 mg l^{-1} B dozları) ICP-AES okumalarının sağlıklı olabilmesi için seyreltilmiştir. 50 mg l^{-1} B dozundaki örnekler 1/50, 250 mg l^{-1} B dozundaki örnekler 1/250, 500 mg l^{-1} B dozundaki örnekler 1/500, 1000 mg l^{-1} B dozundaki örnekler 1/1000 oranında seyreltilmiştir. Hazırlanan tüm örnekler buzdolabında +4°C'de ICP-AES'de okuma yapılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. a. Bitki örneklerinin yakıldığı kapalı sistem mikrodalga fırına ait bir görünüş b. Mikrodaldgada yakılan örneklerin süzülmesine ait bir görünüş

3.2.5.3. ICP-AES ile örneklerin okunması

Okumaya başlamadan önce standart çözeltiler (0.25, 0.50, 1 ve 5 ppm B) kullanılarak cihazın kalibrasyonu yapılmıştır. ICP-AES cihazı ile bir okumada 73 elementin miktarı belirlenebilmektedir. Bu çalışmada sadece B elementi yönünden analiz yapılmıştır. Okuma sonrası elde edilen veriler; B (µg g^{-1} kuru ağırlık)=sulandırma faktörü (hacim) / örnek ağırlığı formülü ile gerçek değere çevrilmiş ve istatistiki analizlerde kullanılmıştır. Seyreltme yapılmış örneklerde hesaplamalar yapılırken seyreltme katsayısı da dikkate alınmıştır.



Şekil 3.3. ICP-AES ile örneklerin okunmasına ait bir görünüş

3.2.6. Bitki rejenerasyonu çalışmaları

3.2.6.1. Kallus kültürü

Puccinellia distans (Jacq.) Parl'ın tohumlarından MS, B_5 ve N_6 temel besin ortamlarında farklı büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarında (2,4-D x Kinetin, 2,4-D x BAP, NAA x BAP, NAA x Kin, 2,4,5-T x Kin, Zeatin x IAA, TDZ ve TDZ x NAA) embriyogenesis ve organogenesis araştırılmıştır. Tohum toplanan lokasyonlar içinde yaptığımız çimlenme testleri sonucunda en iyi çimlenme oranı Maden lokasyonunda tespit edildiği için doku kültürü çalışmaları bu lokasyondan elde edilen tohumlar üzerinde yürütülmüştür.

Yaptığımız literatür araştırmalarında buğdaygil familyasına ait bitkilerde kallus gelişimi için 2,4-D'nin tek başına veya BAP ve Kinetin ile kombinasyon halinde kullanıldığı ortamların en uygun ortamlar olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmalarımızda kullandığımız 2,4-D dışındaki diğer büyüme düzenleyicilerle yaptığımız denemelerde kallus gelişimi çok zayıf ve sağlıksız olarak meydana gelmiştir. Bu nedenle çalışmalarımızda 2,4-D'nin üzerinde durulmuştur. En uygun 2,4-D dozunu belirlemek için denemeler yapılmış 2,4-D'nin 1-10 mg l^{-1} aralığındaki tüm dozları denenmiştir. En uygun doz olarak 2 mg l^{-1} 2,4-D dozu tespit edilmiştir. Ancak 2,4-D tek başına embriyogenik yada organogenik kallus oluşumu için yeterli olmamıştır. Bu nedenle BAP ve Kinetin'in uygun konsantrasyonları araştırılmış 1-5 mg l^{-1} aralığında ki tüm dozları denenmiş, en uygun dozlar olarak 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.5 mg l^{-1} dozları belirlenmiş, 2 mg l^{-1} 2,4-D'ye ek olarak ortama ilave edilmiş ve bunların embriyogenik ve organogenik kallus gelişimine etkisine bakılmıştır. Ortama ilave edilen BAP ve Kinetin kallus gelişimi bakımından olumlu sonuçlar vermiş ancak BAP'li ve Kinetin'li ortamlardan elde edilen kalluslardan organogenesis veya embriyogenesis yoluyla rejenerasyon uyarılamamıştır. Bunlara ilaveten farklı besin ortamı formülasyonlarınında etikisi araştırılmış, bunun için MS, B_5 ve N_6 temel besin ortamlarının embriyogenik ve organogenik kallus gelişimine önemli derecede etki edip etmediği araştırılmış ve kallus ağırlıkları (mg) ve kallus çapları (mm) ölçülmüştür.

3.2.6.2. Meristem kültürü

Puccinellia distans (Jacq.) Parl'ın tohumlarından elde edilen 10 günlük steril fideciklerin kardeşlenme bölgelerinden MS temel besin ortamında Zeatin, Kinetin ve BAP'nin farklı konsantrasyonlarındaki uygulamalarının (Doz_1= 0.2 mg l^{-1}, Doz_2= 1 mg l^{-1}, Doz_3= 2 mg l^{-1}) meristemlerden sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi için meristem kültürü yapılmıştır. Deneme 3 tekerrürlü olarak kurulmuş her tekerrürde 5 kardeşlenme bölgesi kültüre alınmıştır.

3.2.7. Denemelerin değerlendirilmesi ve istatistiki analizler

Analizler bilgisayarda MSTAT-C istatistik programı ile varyans analizine tabi tutulmuş ve istatistiki açıdan önemli bulunan karakterlerde çoklu karşılaştırma testi olan LSD uygulanmıştır Buna göre analiz edilen değerlerden istatiksel olarak önemli bulunanlarda LSD önem testi yapılmıştır. (Düzgüneş ve ark. 1987).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Bor'un Çimlenme ve Fide Gelişimi Üzerine Etkisi

4.1.1. Çimlenme

0, 50, 250, 500 ve 1000 mg B l^{-1} içeren MS ortamında denemeye alınan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl bitkisine ait üç farklı lokasyondan toplanan tohumlarda 8. ve 12. günde gözlemler yapılmış ve çimlenme durumları belirlenmiştir. Her iki gözlem zamanında da çimlenme oranlarında bir değişiklik meydana gelmediği için sonuçlar birleştirilip tek tablo halinde verilmiştir (Çizelge 4.1).

Yapılan varyans analizlerine göre çimlenme değerleri üzerine bor dozlarının etkisi, tohum toplanan lokasyonlar bakımından istatistiksel olarak % 1 önem seviyesinde farklı olmuştur (Çizelge 4.2).

Bor dozlarının ortalamalarına bakıldığında (Çizelge 4.1) en yüksek çimlenme yüzdeleri 0, 50 ve 250 mg l^{-1} B dozlarından elde edilirken çimlenme yüzdeleri 500 mg l^{-1} B dozundan itibaren belirgin olarak düşmeye başlamasına karşın en yüksek doz olan 1000 mg l^{-1}'de bile çimlenme göstermiştir.

Çizelge 4.1. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın çimlenme yüzdeleri (%)

Lokasyonlar	**Bor Dozları (mg l^{-1})**					**Ort.**
	0	**50**	**250**	**500**	**1000**	
Kanal	100.00	100.00	100.00	33.20	33.20	**73.28**
Maden	100.00	100.00	100.00	26.60	33.20	**71.96**
Gölet	100.00	100.00	100.00	26.60	20.00	**69.30**
Ortalama	**100.00 a**	**100.00 a**	**100.00 a**	**28.80 b**	**28.80 b**	

$LSD_{\%1}$ B dozu: 0.43

Lokasyonların farklı B dozlarındaki çimlenme oranları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, 0, 50 ve 250 mg B l^{-1} dozları aynı grupta (a) yer alırken, 500 ve 1000 mg l^{-1} dozları ise farklı grupta (b) yer almışlardır.

Çizelge 4.2. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın çimlenme yüzdelerine ait varyans analizi

Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F
Lokasyon	2	0.15	1.40
Bor	4	34.13	307.20**
Lokasyon x Bor	8	0.10	0.90
Hata	30	0.11	
Genel	**44**		

VK: % 9.32, ** % 1 seviyesinde önemlidir.

Atalay (2003), farklı B dozlarının *in vitro*'da MS temel besin ortamında Kızıltan-91 buğday çeşidinde çimlenme üzerine etkisini 0, 1, 3, 9 ve 18 mg l^{-1} B içeren ortamlarda 20 gün boyunca araştırmış ve en yüksek B dozunda çimlenme yüzdesinin besin ortamındaki nem oranının yeterli düzeyde olmasından dolayı beklenen seviyede olumsuz etki yapmadığını bildirmiştir. Paul ve ark. (1988), saksı denemelerinde 25, 50, 150 mg B kg^{-1} uygulayarak 7 buğday ve 2 arpa çeşit ve hattının çimlenme üzerine tepkilerini inceledikleri araştırmalarında 150 mg B kg^{-1} uygulamasının çimlenmeyi geciktirdiğini ancak çimlenme yüzdesinde bir değişiklik meydana gelmediğini bildirmiştir.

Çalışmamızda da literatürde verildiği gibi başlangıç dozlarında çimlenme ortamdaki B'den etkilenmemiştir. Çalışmamız bu yönüyle literatür ile uyumludur. Çimlenmenin 250 mg B l^{-1}'den sonraki konsantrasyonlarda (500 ve 1000 mg B l^{-1}) etkilenmiş olması yönüyle çalışmamız farklılık farklılık göstermektedir. Bu durum *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın yüksek B'a karşı toleranlı olduğu, ancak belirli bir seviyeden sonra tolerans eşiğinin aşılması nedeniyle çimlenmenin azaldığı şeklinde yorumlanabilir. Diğer kültür bitkilerinin dayandığı seviyenin çok üstündeki B konsantrasyonlarında çimlenmenin görülmesi dikkat çekicidir.

4.1.2. Gövde boyu

Farklı bor dozları içeren besin ortamında 120 gün yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl bitkisinin fidelerinde gövde boyları ölçülmüş, gövde uzunluklarına ait elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3. de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde boyları (cm)

Lokasyonlar	**Bor Dozları (mg l^{-1})**					**Ort.**
	0	**50**	**250**	**500**	**1000**	
Kanal	17.90 ab	13.90 c	13.73 c	12.33 c	7.50 d	**13.07 b**
Maden	18.46 ab	19.43 a	19.36 a	13.40 c	6.66 d	**15.46 a**
Gölet	17.66 ab	20.23 a	15.33 bc	5.56 d	0.00 e	**11.76 b**
Ortalama	**18.01 a**	**17.85 a**	**16.14 a**	**10.43 b**	**4.72 c**	

$LSD_{\%1}$ lokasyon: 1.56
$LSD_{\%1}$ B dozu: 2.01
$LSD_{\%1}$ lokasyon x B dozu: 3.49

Tohum toplanan lokasyonların B dozlarına tepkileri incelendiğinde farklı B dozlarında denemeye alınan lokasyonlar % 1 önem seviyesinde önemli bulunmuştur. En yüksek gövde uzunluğu (20.23 cm) Gölet lokasyonunda 50 mg B l^{-1} dozunda, en düşük gövde uzunluğu (0.00 cm) yine Gölet lokasyonunda 1000 mg B l^{-1} dozunda tespit edilmiştir.

Bor dozlarının *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın gövde uzunluğu üzerine etkisi incelendiğinde istatiksel olarak % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.4). LSD önem testi gruplaması sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge 4.3'de de görüldüğü gibi en yüksek gövde uzunluğu ortalaması 0 mg B l^{-1} dozundan elde

edilirken (18.01 cm) (a) en düşük gövde uzunluğu 1000 mg B l^{-1} dozundan (4.72 cm) (c) elde edilmiştir. Gövde uzunluğu bakımından 0, 50, 250 mg B l^{-1} dozları (a) aynı grupta yer alırken gövde uzunluklarında belirgin düşüş 500 mg B l^{-1} (b) dozunda ve 1000 mg B l^{-1} (c) dozunda meydana gelmiştir.

Bor x tohum toplanan lokasyon interaksiyonu incelendiğinde Maden ve Gölet lokasyonlarında gövde uzunlukları, 50 mg l^{-1} B dozuna kadar artış göstermiş ve B dozunun daha da arttırılması ile düşüşe geçmiş, Kanal lokasyonundan toplanan tohumlarda ise 0 mg B l^{-1} dozundan itibaren düşüşe geçtiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl tohumlarının alındığı bölgeye göre gelişimlerinin farklılık gösterebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.4. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde boylarına ait varyans analizi

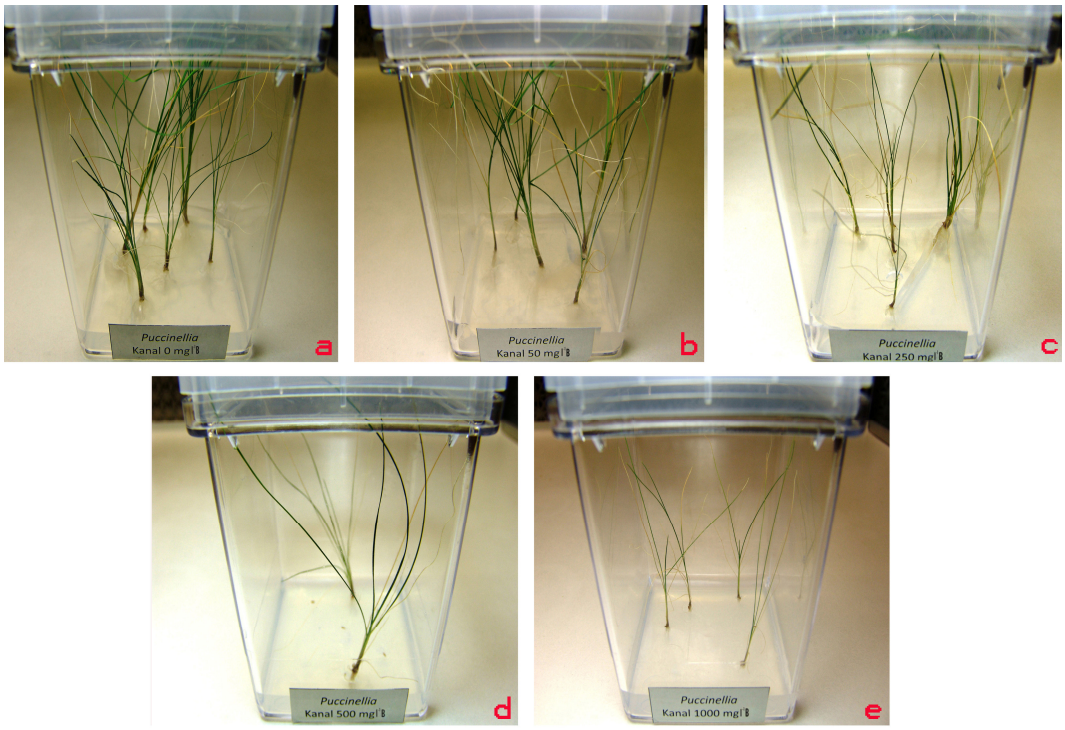
Varyasyon kaynağı	**S.D.**	**K.O.**	**F**
Lokasyon	2	52.93	21.84**
Bor	4	298.54	123.18**
Lokasyon x Bor	8	28.31	11.68**
Hata	30	2.42	
Genel	**44**		

VK: % 11.59, ** % 1 seviyesinde önemlidir

Bor toksitesinin bitkilerin kök ve yeşil aksam büyümesini engelleyen ve tane verimini ciddi bir şekilde sınırlayan bir mikro element problemi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca B toksitesinin buğdayda özellikle gövde boyunun uzamasını ve yeşil aksam gelişimini durduran (Paull ve ark. 1990), büyümeyi geciktiren (Paull ve ark. 1988) ve kök gelişimini azaltan (Huang ve Graham, 1990) bir problem olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda da B 250 mg l^{-1}'ye kadar gövde boyundaki gelişmeyi etkilemezken bu dozdan sonraki 500 ve 1000 mg l^{-1} B dozlarında gövde boyu

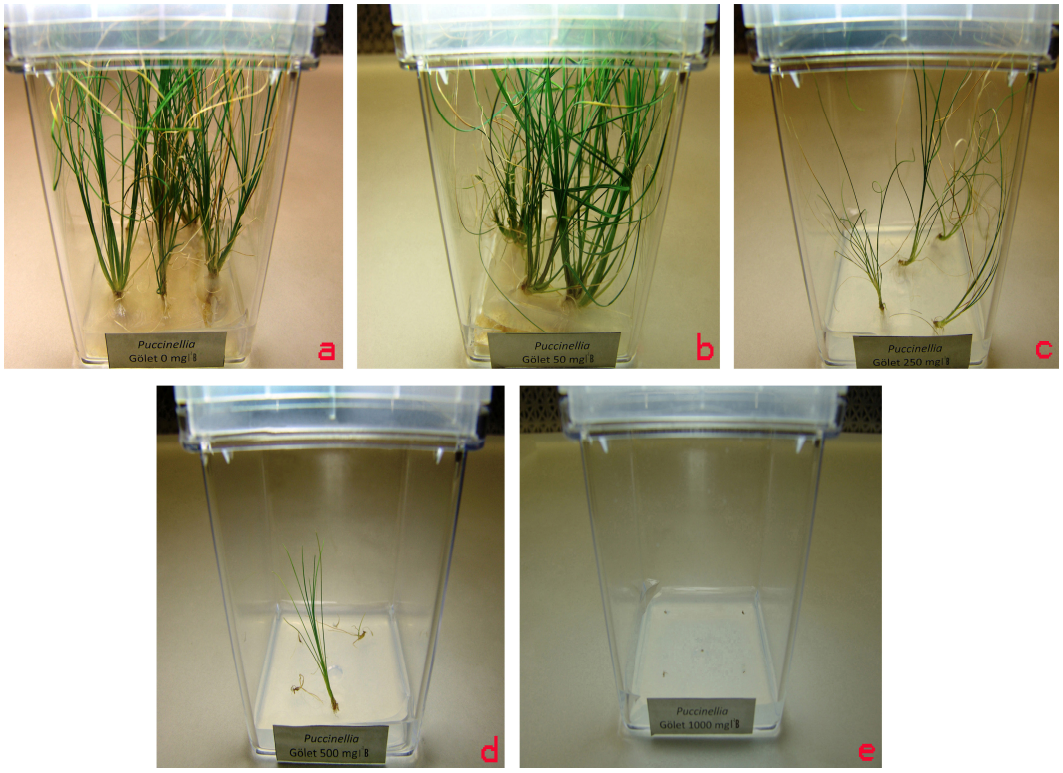
gelişiminin olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür. Lokasyonlara göre farklılık gösterse de belli bir B dozundan sonra bitki gelişimi olumsuz etkilenmektedir. Bu durum literatür bilgileri ile uyumludur. Tohum toplanan lokasyonlar gövde uzunluğu bakımından 250 mg l^{-1} B dozuda dahil etkilenmemiştir. Bu da *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın bir çok buğdaygil familyası bitkisinin yetişemeyeceği konsantrasyondaki B dozlarına toleranslı olduğunu göstermektedir. Bu özelliği yönüyle bu bitki tuzluluk ve kuraklığa dayanımı yanında B'a tolerans bakımından da önemli bir potansiyele sahiptir.



Şekil 4.1. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Kanal lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerinin 90. günde görünümü, a. 0 mg l^{-1} B dozu, b. 50 mg l^{-1} B dozu, c. 250 mg l^{-1} B dozu, d. 500 B mg l^{-1} dozu, e. 1000 mg l^{-1} B dozu



Şekil 4.2. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Maden lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerinin 90. günde görünümü, a. 0 mg l^{-1} B dozu, b. 50 mg l^{-1} B dozu, c. 250 mg l^{-1} B dozu, d. 500 B mg l^{-1} dozu, e. 1000 mg l^{-1} B dozu



Şekil 4.3. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Gölet lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerinin 90. günde görünümü, a. 0 mg l^{-1} B dozu, b. 50 mg l^{-1} B dozu, c. 250 mg l^{-1} B dozu, d. 500 B mg l^{-1} dozu, e. 1000 mg l^{-1} B dozu

4.1.3. Kök boyu

Farklı bor dozları içeren besin ortamında 120 gün yetiştirilen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl fidelerinde kök uzunluklarına ait değerler Çizelge 4.5 de verilmiş ve farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerin ortalama kök uzunlukları yapılan LSD önem testi ile gruplandırılarak çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama kök boyları (cm)

Lokasyonlar	**Bor Dozları (mg l^{-1})**					**Ort.**
	0	**50**	**250**	**500**	**1000**	
Kanal	4.76 e-g	6.16 b-e	3.96 g	4.06 fg	0.01 h	**3.79 b**
Maden	7.20 b	7.03 bc	6.03 b-e	5.66 c-e	0.01 h	**5.18 a**
Gölet	6.36 b-d	9.40 a	5.40 d-f	0.63 h	0.00 h	**4.36 b**
Ortalama	**6.11 b**	**7.53 a**	**5.13 c**	**3.45 d**	**0.01 e**	

$LSD_{\%1}$ lokasyon: 0.64
$LSD_{\%1}$ B dozu: 0.82
$LSD_{\%1}$ lokasyon x B dozu: 1.43

Lokasyonların B dozlarına kök uzunlukları bakımından verdiği tepkiler incelendiğinde lokasyonlar % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). Bor uygulamalarının etkilerinin ortalama değerlerine bakıldığında (Çizelge 4.5) en uzun ortalama kök uzunluğu Maden lokasyonunda (5.18 cm) (a) tespit edilmiştir. En kısa ortalama kök uzunluğu Kanal lokasyonunda (3.79 cm) (b) belirlenmiştir. Kanal ve Gölet lokasyonları aynı grupta (b) yer alırken, Maden lokasyonu (a) farklı bir grupta yer almıştır (Çizelge 4.5).

Bor dozlarının etkilerine bakıldığında B dozları % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). En yüksek kök uzunluğu ortalaması 50 mg l^{-1} B dozunda (7.53 cm) (a) en düşük kök uzunluğu ortalaması 1000 mg l^{-1} B dozunda (0.01 cm) (e)

tespit edilmiştir. Bor dozlarının kök boylarına etkisi bakımından bütün dozlar farklı alt gruplarda yer almıştır (Çizelge 4.5).

Bor dozu x lokasyon interaksiyonu incelendiğinde bu interaksiyon % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). Bitki kök uzunlukları 0.01 cm (üç lokasyondada 1000 mg l^{-1} B dozunda) ile 9.40 cm (Göletde 50 mg l^{-1} B dozunda) arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.5). Lokasyonların kök uzunluklarında geniş bir dağılım gözükmektedir. Lokasyonların B uygulamalarına tepkileri teker teker değerlendirildiğinde en yüksek kök uzunluğu Gölet'de (9.40 cm) 50 mg l^{-1} B dozunda ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.5). Kanal en iyi kök gelişimini (6.16 cm) 50 mg l^{-1} dozunda ve Maden (7.20 cm) ise 0 mg l^{-1} dozunda gerçekleştirmiştir (Çizelge 4.5). En düşük kök uzunlukları 1000 mg l^{-1} B dozunda elde edilirken genelde kök uzunlukları farklı B dozlarında birbirinden farklı alt gruplarda yer almışlardır. Bu nedenle B dozlarının kök uzunluklarına etkileri bakımından genel bir değerlendirme yapılırsa en iyi kök gelişimi için 50 mg l^{-1} B dozu uygun bir doz sayılabilir.

Kök uzunlukları bakımından lokasyonlar arasında bir genelleme yapılacak olursa kök uzunluklarının yüksek B uygulamasından daha çok etkilendiği görülmektedir.

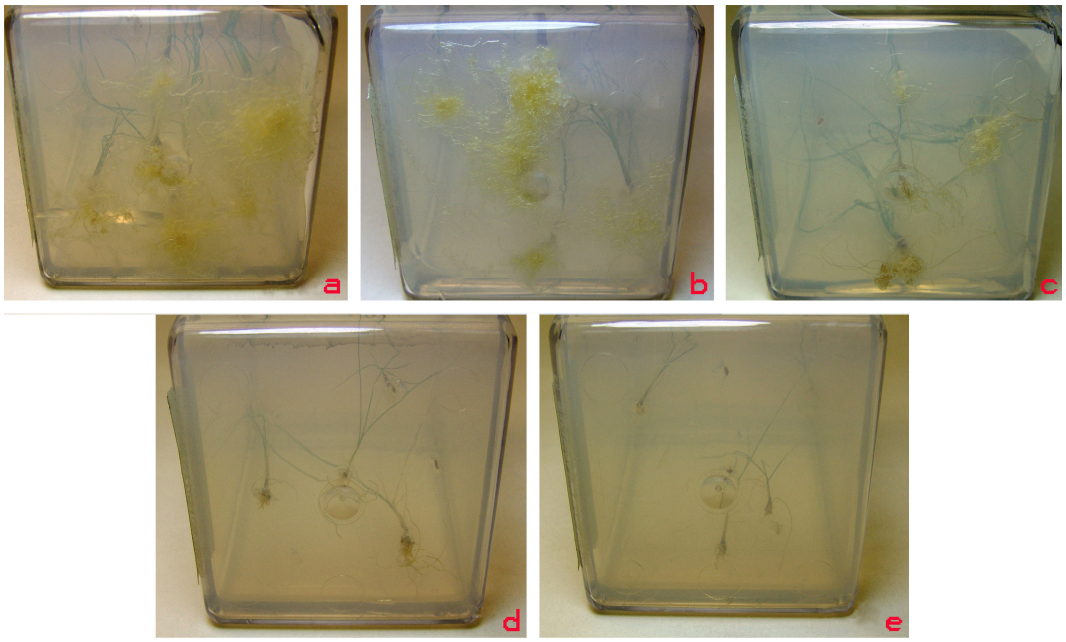
Çizelge 4.6. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama kök boylarına ait varyans analizi

Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F
Lokasyon	2	7.36	18.10**
Bor	4	75.23	184.99**
Lokasyon x Bor	8	7.20	17.72**
Hata	30	0.40	
Genel	**44**		

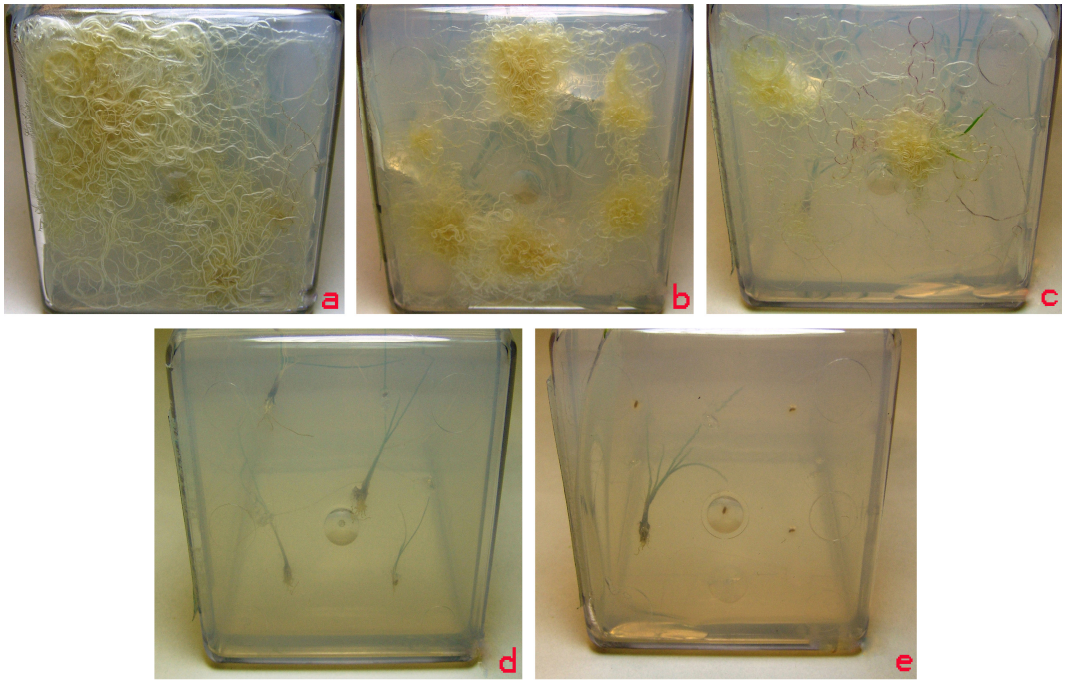
VK: % 14.33, ** % 1 seviyesinde önemlidir

El-Sharkawi ve ark. (1999), buğdayda artan B uygulamasıyla kılcal kök gelişiminin hızlandığını belirtmişlerdir. Chantachume ve ark. (1995) ile kök boylarının bora toleranslılık için ıslah kriteri olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Campbell ve ark. (1998), yaptıkları araştırmada farklı H_3BO_3 dozlarını uygulayarak ekmeklik buğdayın bora toleransını araştırmışlar ve en iyi kök gelişiminin 0-50 µM (0-3.1 mg B l^{-1}) H_3BO_3 konsantrasyonu içeren ortamlarda meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda en iyi kök gelişimi 50 mg B l^{-1} uygulamasından elde edilmiş ve bunun üzerindeki B dozları kök gelişiminde genel bir artışa neden olmamış ve köklerde de borun zararlı etkisi görülmüştür.

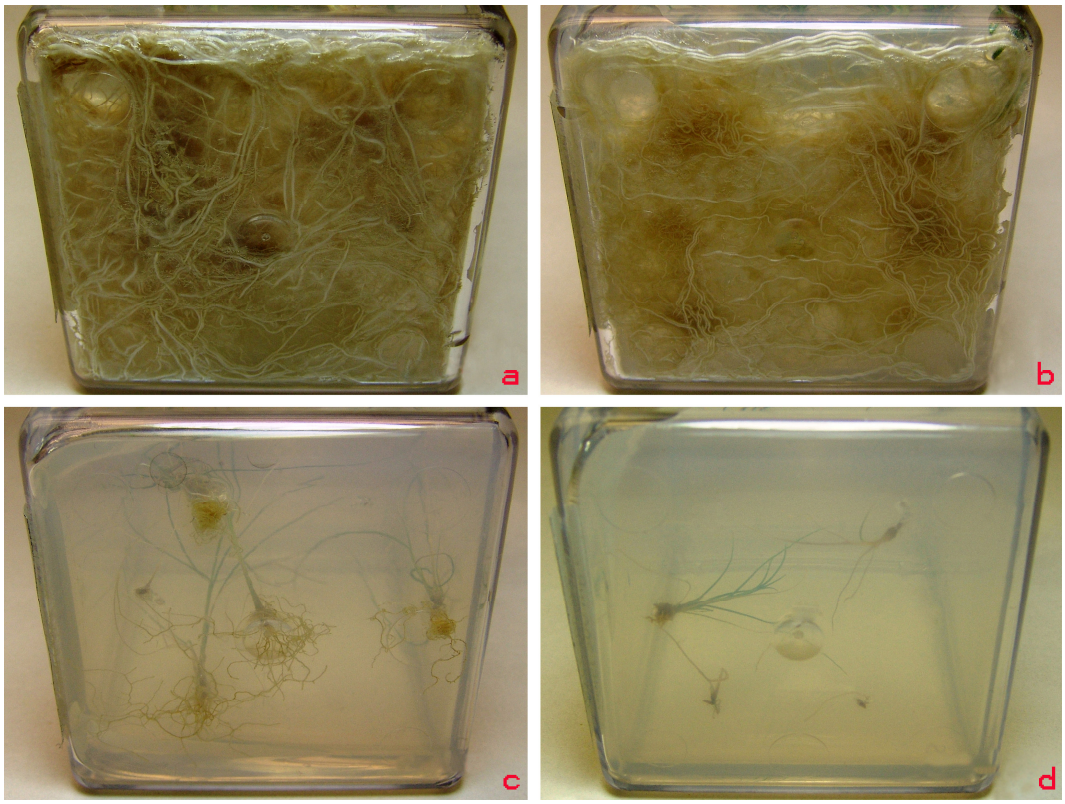
Bor'un ilk gelişme döneminde toprak altı aksamın gelişimine etkisi daha fazla olduğundan uyguladığımız yüksek konsantrasyonda borun uygulandığı koşullarda toprak üstü aksam gelişirken kök gelişimi buna nazaran daha çok etkilenmiştir. Yaptığımız çalışmada en yüksek B uygulaması olarak 1000 mg l^{-1} B dozu kullanılmıştır. Bunun etkisi ile kök uzunlukları bu yüksek dozdan oldukça fazla etkilenmiş ve 1 cm'nin bile altında çok kısa kökler oluşmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kök uzunluğu gibi bazı verilerin tolerans için kriter olarak değerlendirilebileceğini akla getirmektedir. Bu düşüncemiz Chantachume ve ark. (1995)'nın çalışmasıyla desteklenmektedir.



Şekil 4.4. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Kanal lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerinin köklerinin 90. günde görünümü, a. 0 mg l^{-1} B dozu, b. 50 mg l^{-1} B dozu, c. 250 mg l^{-1} B dozu, d. 500 B mg l^{-1} dozu, e. 1000 mg l^{-1} B dozu



Şekil 4.5. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Maden lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerinin köklerinin 90.günde görünümü, a. 0 mg l^{-1} B dozu, b. 50 mg l^{-1} B dozu, c. 250 mg l^{-1} B dozu, d. 500 B mg l^{-1} dozu, e. 1000 mg l^{-1} B dozu



Şekil 4.6. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın Gölet lokasyonunun farklı B dozlarında yetiştirilen fidelerinin köklerinin 90. günde görünümü, a. 0 mg l^{-1} B dozu, b. 50 mg l^{-1} B dozu, c. 250 mg l^{-1} B dozu, d. 500 B mg l^{-1} doz

4.1.4. Kuru ağırlık

Bor uygulamalarının *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinde kuru gövde ve kök ağırlıklarına etkileri araştırılmıştır.

Kuru gövde ağırlıklarına ait ortalama değerler Çizelge 4.7 de verilmiş ve farklı bor dozlarının kuru gövde ağırlığı üzerine olan etkileri LSD önem testine göre Çizelge 4.7 de gruplandırılmıştır.

Çizelge 4.7. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde ağırlıkları (mg)

Lokasyonlar	Bor Dozları (mg l^{-1})					Ort.
	0	**50**	**250**	**500**	**1000**	
Kanal	300 de	170 d-f	70 f	40 f	10 f	**118 b**
Maden	360 cd	630 ab	160 d-f	120 ef	30 f	**260 a**
Gölet	540 bc	810 a	50 f	70 f	0.00 f	**294 a**
Ortalama	**400 b**	**536.66 a**	**93.33 c**	**76.66 c**	**13.33 c**	

$LSD_{\%1}$ lokasyon: 0.10
$LSD_{\%1}$ B dozu: 0.12
$LSD_{\%1}$ lokasyon x B dozu: 0.22

Bor uygulamalarının tohum toplanan lokasyonlar üzerine fide döneminde kuru gövde ağırlığına etkisi incelendiğinde lokasyonlar istatistiksel olarak % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8). Bor uygulamalarının tohum toplanan lokasyonların kuru gövde ağırlıkları üzerine etkisi genel olarak incelendiğinde en iyi gelişim ortalaması Gölet lokasyonunda (294 mg) meydana gelirken en az gelişim ortalaması Kanal lokasyonunda (118 mg) meydana gelmiştir (Çizelge 4.7). Maden ve Gölet lokasyonları aynı grupta (a) yer alırken Kanal lokasyonu farklı bir grupta (b) yer almıştır.

Bor dozlarının kuru ağırlık bakımından etkileri incelendiğinde dozlar istatistiksel olarak % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8). Bor dozlarının kuru ağırlığa etkisi bakımından en yüksek gövde ağırlığı ortalaması 50 mg l^{-1} dozunda (536.66 mg) en düşük gövde ağırlığı ortalaması ise 1000 mg l^{-1} dozunda belirlenmiştir. 50 mg l^{-1} B dozu (a) ve 0 mg l^{-1} B dozu (b) farklı gruplarda yer alırken 250, 500 ve 1000 mg l^{-1} B dozları aynı grupta (c) yer almıştır (Çizelge 4.7).

Bor dozu x tohum toplanan lokasyon interaksiyonu incelendiğinde bu interaksiyon istatistiksel açıdan % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8). Kuru gövde ağırlıkları 0 mg ile 630 mg arasında değişim göstermiştir (Çizelge 4.7). Tohum toplanan lokasyonlar B dozlarına karşı tepkileri kuru gövde ağırlığı bakımından farklılıklar göstermiştir. Gölet ve Maden kuru gövde ağırlığı bakımından

en iyi gelişimi 50 mg l^{-1} B dozunda gösterirken Kanal en iyi gelişimi 0 mg l^{-1} B dozunda göstermiştir. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl fidelerinde kuru gövde ağırlıkları bakımından en az gelişim ise bütün tohum toplanan lokasyonlarda 1000 mg l^{-1} B dozunda görülmüştür.

Çizelge 4.8. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde ağırlıklarına ait varyans analizi

Varyasyon kaynağı	**S.D.**	**K.O.**	**F**
Lokasyon	2	0.13	12.49**
Bor	4	0.47	45.69**
Lokasyon x Bor	8	0.06	6.18**
Hata	30	0.01	
Genel	**44**		

VK: % 45.13, ** % 1 seviyesinde önemlidir

Bitki analizleri de bitkilerin besin elementi ihtiyacı ve çeşitlerin o elementin noksanlığına veya toksitesine olan tepkisinin tahmininde kullanılabilmektedir (Eyüpoğlu ve ark. 1995).

Tahıllarda bora hassasiyet bakımından tür ve çeşit seviyesinde benzer tepki farklılıkları Brezilya, Çin, Hindistan, Nepal, Tayland ve Türkiye gibi değişik ülkelerde yapılan tarla denemelerinde belirgin olarak ortaya konulmuştur (Silva ve Andrade 1983). Rerkasem ve Jamjod (1997), buğdayda bora hassasiyet bakımından türler arasında farklılıklar görüldüğünü, bazen de tür içerisinde bile geniş bir genotipik varyasyon olabileceğini bildirmiştir. Rerkasem ve ark. (2004) buğdayda B fazlalığı gibi eksikliğinin de büyüme ve gelişmeyi etkilediğini belirtmiştir.

Güneş ve Alpaslan (2000), sera şartlarında yetiştirdikleri 8 mısır genotipinde B uygulamasının tüm genotiplerde B alımını ve konsantrasyonunu arttırırken kuru ağırlığı azalttığı ifade etmişlerdir. Riley ve ark. (1994) arpada, Bagheri ve ark.

(1992), bezelyede genotiplerin B artışına bağlı olarak belli bir dozdan sonra bitki ağırlığının azaldığını ifade etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da 50 mg l^{-1} B uygulamasından daha yüksek doz uygulamaları olan 250, 500 ve 1000 mg l^{-1} B uygulamalarında bitki gövde kuru ağırlığının belirgin bir şekilde etkilendiği görülmüştür. Ayrıca 50 mg l^{-1} B dozunda ortalama gövde boyu 0 mg l^{-1} B dozuna kıyasla daha düşük olurken kuru ağırlık bakımından bu dozun 0 mg l^{-1} B dozundan daha yüksek sonuç vermesinin nedeni 50 mg l^{-1} B dozunda kardeşlenmenin daha fazla olmasıdır. Ayrıca gövde uzunluğu bakımından 0, 50 ve 250 mg l^{-1} B dozları istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır fakat gövde kuru ağırlığı bakımndan 50 mg l^{-1} B dozundan sonra büyük bir düşüş meydana gelmiştir bunun nedeni bu dozdan sonra kardeşlenmemin önemli oranda azalmasıdır.

Bor dozlarının 120 günlük *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl fidelerinin kuru kök ağırlıklarına etkisi üzerine araştırma yapılmış yapılan araştırma sonuçlarına göre kuru kök ağırlıklarına ait elde edilen değerler Çizelge 4.9'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre varyans analizi yapılmış yapılan varyans analiz sonuçlarına göre LSD gruplaması yapılmış Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama kök ağırlıkları (mg)

Lokasyonlar	**Bor Dozları (mg l^{-1})**					**Ort.**
	0	**50**	**250**	**500**	**1000**	
Kanal	110 bc	50 cd	10 d	10 d	0.01 d	**36 c**
Maden	130 b	260 a	60 b-d	40 cd	0.01 d	**98 b**
Gölet	300 a	320 a	20 d	10 d	0.01 d	**130 a**
Ortalama	**180 a**	**210 a**	**30 b**	**20 b**	**0.01 b**	

$LSD_{\%1}$ lokasyon: 0.03
$LSD_{\%1}$ B dozu: 0.04
$LSD_{\%1}$ lokasyon x B dozu: 0.07

Tohum toplanan lokasyonlar üzerine B dozlarının kuru kök ağırlığı bakımından etkileri incelendiğinde lokasyonlar % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.10). En yüksek kuru kök ağırlığı Gölet lokasyonunda (130 mg) tespit edilmiş bunu Maden (98 mg) ve Kanal (36 mg) lokasyonları takip etmiştir (Çizelge 4.9). Kuru kök ağırlığı bakımından üç lokasyonda farklı alt gruplarda yer almıştır. Burada da görüleceği gibi (Çizelge 4.9) farklı B uygulamalarında kuru kök ağırlığı bakımından Gölet lokasyonu diğer lokasyonlara göre daha iyi gelişim göstermiştir.

Bor dozlarının kuru kök ağırlığına etkileri incelenmiş dozların kuru kök ağırlığına etkisi incelendiğinde dozlar % 1 önem seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.10). En yüksek kuru kök ağırlığı ortalaması 50 mg l^{-1} B dozunda (210 mg) tespit edilirken en düşük kuru kök ağırlığı ortalaması 1000 mg l^{-1} B dozunda (0.01 mg) tespit edilmiştir. 0 ve 50 mg l^{-1} B dozları aynı grupta (a) yer alırken 250, 500 ve 1000 mg l^{-1} B dozları farklı bir grupta (b) yer almıştır (Çizelge 4.9).

Bor dozları x tohum toplanan lokasyon interaksiyonunun kuru kök ağırlığına etkisi incelendiğinde istatistiksel açıdan bu interaksiyon % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.10). Kök kuru ağırlıkları 0.01 mg (üç lokasyon için, 1000 mg l^{-1} B dozu) ile 320 mg (Gölet, 50 mg l^{-1} B dozu) arasında değişim göstermiştir. Tohum toplanan lokasyonlar kendi içerisinde değerlendirildiğinde Gölet ve Maden lokasyonlarında en iyi kuru kök ağırlığı 50 mg l^{-1} B dozunda, Kanal lokasyonunda ise 0 mg l^{-1} B dozunda meydana gelirken en az kuru kök ağırlıkları tüm lokasyonlarda 1000 mg l^{-1} dozunda meydana gelmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.10. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama kök ağırlıklarına ait varyans analizi

Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F
Lokasyon	2	0.03	49.47**
Bor	4	0.09	136.37**
Lokasyon x Bor	8	0.01	23.49**
Hata	30	0.00	
Genel	**44**		

VK: % 28.36, ** % 1 seviyesinde önemlidir

Yau ve Saxena (1997); Rerkasem ve ark. (2004) B fazlalığının buğdayda büyüme ve gelişmeyi etkilediğini belirtmiştir.

Çalışmamızda 50 mg l^{-1} B dozunun üzerinde uygulanan B dozları kuru kök ağırlıklarında azalmalara sebep olmuştur. Bu duruma göre *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl fidelerinin kök gelişimi 250, 500 ve 1000 mg l^{-1} B konsantrasyonlarında engellenmiştir. 250 mg l^{-1} B dozu, 0 ve 50 mg l^{-1} B dozuyla kıyaslandığında gövde uzunluğu bakımından aynı grupta yer alırken kök ağırlığı ve uzunluğu bakımından bu iki dozdan farklı grupta yer almış özellikle kök ağırlığı bakımından 250 mg l^{-1} B dozundan itibaren büyük bir düşüş meydana gelmiştir bunun nedeni olarak B'un ilk gelişim döneminde toprak altı aksamda daha etkili olması ve kardeşlenmenin 250 mg l^{-1} B dozundan itibaren belirgin şekilde azalmasıdır.

4.2. Bitki Bor Alımı

Puccinellia distans (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin gövde B içerikleri ICP-AES cihazı ile belirlenmiştir. Elde edilen B miktarları mg kg^{-1} olarak hesaplanmış ortalama değerler Çizelge 4.11'de verilmiştir. LSD önem testi yapılmış elde edilen veriler Çizelge 4.11'de gruplandırılmıştır. Gölet lokasyonunun 1000 mg l^{-}

[1] B dozunda çimlenme sonrası bitki gelişimi olmadığı için Gölet lokasyonu için 1000 mg l^{-1} B dozunda analiz yapılamamıştır.

Çizelge 4.11. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans*(Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde B içeriği (mg kg^{-1})

Lokasyonlar	Bor Dozları (mg l^{-1})					Ort.
	0	50	250	500	1000	
Kanal	2.13 h	20.28 g	47.16 f	122.85 d	327.42 a	**103.97 a**
Maden	1.29 h	18.56 g	49.48 f	143.28 c	326.12 a	**107.74 b**
Gölet	2.01 h	31.34 g	91.46 e	242.07 b	0.00 h	**73.38 b**
Ortalama	**1.81 e**	**23.39 d**	**62.70 c**	**169.40 b**	**217.84 a**	

$LSD_{\%1}$ lokasyon: 7.03
$LSD_{\%1}$ B dozu: 9.07
$LSD_{\%1}$ lokasyon x B dozu: 15.73

Bor dozlarının tohum toplanan lokasyonlara gövde B içeriği açısından etkileri incelendiğinde lokasyonlar % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.12). Gövde B alımı bakımından en yüksek ortalama değer Maden lokasyonunda (107.74 mg kg^{-1},) tespit edilirken, en düşük ortalama değer Gölet lokasyonunda (73.38 mg kg^{-1}) tespit edilmiştir (Çizelge 4.11). Maden ve Gölet lokasyonu aynı grupta (b) yer alırken, Kanal lokasyonu ayrı bir grupta (a) yer almıştır.

Bor dozlarının gövde B içeriği bakımından tohum toplanan lokasyonlara etkileri incelendiğinde dozlar % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur(Çizelge 4.12). Bor dozu arttıkça gövde B alımı da artmış ve 1000 mg l^{-1} B dozunda (217.84 mg kg^{-1}) gövde B alımı en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Çizelge 4.11). Bor dozları kendi içerisinde gruplandırıldığı zaman her doz faklı alt gruplarda yer almıştır.

Bor dozu x tohum toplanan lokasyon interaksiyonu incelendiğinde bu interaksiyon istatistiksel açıdan % 1 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.12). Gövde B içerikleri 1.29 mg kg^{-1} (Maden) ile 327.42 mg kg^{-1} (Kanal) arasında

değişim göstermiştir ve en düşük B alımı tüm lokasyonlarda 0 mg l^{-1} B dozunda meydana gelirken en yüksek B alımı 1000 mg l^{-1} B dozunda meydana gelmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı bor dozları içeren MS ortamında yetişen *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın 120 günlük fidelerinin ortalama gövde B içeriğine ait varyans analizi

Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F
Lokasyon	2	5327.69	108.62**
Bor	4	79830.84	1627.61**
Lokasyon x Bor	8	28914.45	589.51**
Hata	30	49.04	
Genel	**44**		

VK: % 7.37, ** % 1 seviyesinde önemlidir

Uzun çalışmaların bir ürünü olarak Murashige ve Skoog tarafından 1962' de geliştirilen MS temel besin ortamı biyoteknolojik çalışmalarda en yaygın kullanılan formülasyondur. Element konsantrasyonları bitki ihtiyacına göre ideal sınırlarda ayarlanmış ve bu sayede elementlerin etkileşimleri minimuma indirilmiştir. Büyütme sırasında kültür dolabının kullanılması da yine çevre etkilerini oldukça azaltmakta, gelişmekte olan bitki için ideal sıcaklık, nem ve fotoperiyot isteği karşılanmaktadır. Besin ortamının nem kaybı söz konusu olamadığından fiksasyon gibi bazı olayların meydana gelmesi engellenmektedir. Ortamın pH değeri bitkiler için uygun olan aralıkta (pH: 5.8) sabit bir şekilde ayarlanmakta ve bu sayede pH kaynaklı özelliklede mikro elementler ile ilgili problemlerin teşhisinde kolaylık sağlayabilmektedir.

Kültür ortamı; toprak, saksı ve hidrofonik kültürlere göre avantajlıdır. Besin ortamlarında özellikle filtreleme ve mikroorganizmalar gibi pek çok faktörden etkilenen ortam komponenetlerinin konsantarsyonları kontrol edilebilmektedir. Örneklemeden sonra ortamda kalan borun analizi köklerin bor salgısının olup olmadığını test edilebilmesi için imkan sunabilir. Toprak yerine agar kullanımı ise

toprakta meydana gelen bazı faktörleri (adsorbsiyon, yıkanma, fiksasyon vs.) elemine etmektedir. Daha önce yaygın olarak toprak, kum ve hidrofonik kültürlerde çalışılmış olduğu düşünüldüğünde özellikle mikro besin elementleri ile ilgili çalışmalara tez çalışmasında kullanılan yöntemler yeni bir bakış açısı getirmektedir. Kullanılan agarın tek dezavantajı içerisinde belirli bir miktar B bulunabileceğidir. Ama tüm deneylerde aynı agar kullanıldığı için çeşitler ve bitki kısımlarının göstereceği tepkinin değişmeyeceği düşünülmektedir. Klasik yöntemlere göre daha kısa sürede ve daha güvenilir bir şekilde bu çalışma ve benzerleri ile tespiti zor olan bazı hususların üstesinden gelinebilir.

Bor alımı yönünden bitki türleri hatta aynı türün genotipleri arasında önemli farklar vardır ve benzer çevre şartlarında yetişseler bile türler arasında bor konsantrasyon farklılıkları bariz bir şekilde ortaya çıkar. Bu tez çalışmasında uygulanan yöntem; B alımı üzerine etki eden pek çok faktörü ortadan kaldırmakta yada minimum seviyeye indirmektedir. Bu sayede bitki faktörü daha doğru bir şekilde gözlenebilir. Tür bazında yapılan bu tez çalışmasında kullanılan yöntemler; klasik ıslah yöntemlerini desteklemek ve yeni toleranslı (noksanlık-toksite) genotipleri belirlemek için alternatif bir yol sunmaktadır.

Bu çalışma hemen hemen bütün bitki türleri için özellikle fide gelişimi ve vejetatif gelişim dönemi boyunca pratik olarak uygulanabilmektedir. Uygulanan yöntem sadece bir element için değil diğer bütün elementler içinde kullanılabilme özelliğine sahiptir. Besin ortamını oluşturan elementlerin stok solüsyonları, besin ortamlarının amaca göre kolayca modifiye edilebilmesini sağlar. Bu sayede element seviyesinde araştırmalar yapılabildiği gibi element interaksiyonları da tespit edilebilmektedir. Kullanılan bu metot ile laboratuvar şartlarında farklı genotiplerin tolerans ve hassasiyetleri belirlenerek bu yönde seçim yapılabilir. En azından bu genotiplerin B alımı ve B'un bitkideki dağılımı belirlenebilir.

Yapılan literatür taramalarında gövde B alımları ile ilgili farklı değerlendirmelerle karşılaşılmıştır. Nable (1988); Nable ve ark. (1990a); Bagheri ve ark. (1992); Kalaycı ve ark. (1997); Güneş ve ark. (2000), dayanıklı genotiplerin gövde de daha az B biriktirdiğini ifade etmiştir.

Yau ve ark. (1995) yüksek B uygulamasında çeşitler arasında sürgün B konsantrasyon farklılıklarının önemli olmadığını belirtmişlerdir. Riley ve Rabson (1994), sera şartlarında arpada yaptıkları denemelerde tanede ve gövdede toksite için kritik B değerlerinin sırasıyla 2-15 mg kg^{-1} ve 50-420 mg kg^{-1} B arasında değiştiği ve bu dokulardaki B konsantrasyonlarının B toksitesinin teşhisinde güvenilir sonuçlar vermediği belirtilmiştir. Yaptığımız çalışmada gövde de benzer şekilde B kapsamları 1.29-327.42 mg kg^{-1} arasında değişim göstermiştir B alımları yönünden tohum toplanan lokasyonlar arası fark ortaya konulmuştur.

Nable ve ark. (1997), yaprak B analizlerinde yapraklarda B konsantrasyonunun çevre şartlarından etkilenebildiği için yaprak analizlerinin tam olarak güvenilir kabul edilemediğini, bu analizlerin elementlerin alınım mekanizmaları gibi konularda genetik varyasyonun belirlenmesi, dayanıklı genotiplerin ıslahı ve bazı genetik çalışmalar açısından kolaylık sağladığını ifade etmişlerdir.

Yorgancılar (2004), *in vitro'da* Orta Güney Anadolu tarım bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen makarnalık (*Triticum durum* Desf., Kızıltan-91, Kunduru-1149, Selçuklu-97) ve ekmeklik (*Triticum aestivum* L., Bezostoja-1, Gerek-79, Gün-91) buğday çeşitlerinde, MS temel besin ortamında 0,1,3,9 ve 27 mg l^{-1} B dozlarının bitki gövde B alımına etkisini 20 gün boyunca araştırmış. En düşük gövde B alımının 0 mg l^{-1} B uygulamasında meydana geldiğini B dozları arttıkça bitki gövde B alımının arttığını, en yüksek gövde B alımının uygulanan en yüksek doz olan 27 mg l^{-1} B dozunda meydana geldiğini bildirmiştir.

Nable ve ark. (1990), Schooner (B toksitesine çok duyarlı), Sahara 3771 (toleranslı) ve WI-276 (kısmen toleranslı) arpa çeşitleriyle yaptıkları uzun süreli deneylerde, 0.618-395 mg l^{-1} borik asit aralığında B konsantrasyonu arttıkça B alımının lineer olarak arttığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlarda çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Tez çalışmasında da 0, 50, 250, 500 ve 1000 mg l^{-1} B dozları uygulanmış en düşük gövde B alımı 0 mg l^{-1} B dozunda meydana gelirken, en yüksek gövde B alımı 1000 mg l^{-1} B dozunda meydana gelmiş, B dozu arttıkça bitki gövde B alımı artmıştır. Bu yönüyle tez çalışması literatürle benzerlik göstermiştir. Yaptığımız

çalışmada çok yüksek oranda bor uygulanan ortamlarda kültüre alınan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'da yapılan analizler sonucu bitki bünyesinde ortamda bulunan bora oranla daha az bor bulunması fakat yüksek oranda bor içeren ortamlarda yaşamını idame ettirmesi bu bitkinin bor hiperakümülatörü değil daha çok belli bir orandan sonra alımını durduran yani toleranslı bir bitki olduğunu göstermektedir. Zira tohumların toplandığı Eskişehir Kırka B işletmesi maden alanından alınan toprak örneklerinde 2032.05 mg kg^{-1} ve yine aynı alandaki yıkama göleti bölgesinden alınan toprak örneklerinde 2057.61 mg kg^{-1} elverişli B olduğu, 5000-6000 mg kg^{-1} toplam B olduğu tespit edilmiştir.

Bugdaygil familyasına üye olan bitkilerde bor toksitesinin önemli bir problem olması bu bitkilerin dayanabildikleri bor seviyelerinin düşük olması ve *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın B'a toleranslılık mekanizmasının çözülmesi ve bu mekanizmanın diğer buğdaygillere aktarılması bor toksisitesi görülen alanlarda buğdaygil bitkilerinin tarımının yapılmasına olanak sağlayabilir.

4.3. Bitki Doku Kültürü Çalışmaları

4.3.1. Kallus ağırlığı ve çapı

Farklı büyüme düzenleyici kombinasyonları ve dozları içeren MS, B_5 ve N_6 ortamlarında 30 gün boyunca kültüre alınan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın olgun tohumlarından elde edilen kallusların ağırlıklarına ait değerler Çizelge 4.13'de verilmiş, Çizelge 4.13'deki değerlere göre LSD önem testi yapılmış elde edilen sonuçlara göre gruplama yapılmıştır. Değerlendirme sonrası besin ortamı x büyüme düzenleyicisi tipi x büyüme düzenleyicisi konsantrasyonu interaksiyonu % 5 seviyesinde önemli olmuştur (Çizelge 4.14). Denemelerde kullanılan temel besin ortamlarında uygulanan büyüme düzenleyicisi tipi ve dozlarına ait ortalama değerler de Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Çizelgede görüldüğü gibi uygulanan büyüme düzenleyicisi dozlarının kallus ağırlıklarına etkileri incelendiğinde, uygulanan dozlar arasında en iyi kallus ağırlığı

0.05 mg l^{-1} dozunda (33.89 mg) elde edilirken, en düşük kallus ağırlığı 0.1 mg l^{-1} dozundan (27.49 mg) elde edilmiştir (Çizelge 4.13).

Denemelerde kullanılan temel besin ortamlarına ilave edilen büyüme düzenleyicisi tiplerinin kallus ağırlığına etkisinin genel ortalamaları incelendiğinde ise en iyi kallus ağırlığı N_6 temel besin ortamındaki Kinetin uygulamasından (35.16 mg) elde edilirken, en düşük kallus ağırlığı B_5 temel besin ortamındaki BAP uygulamasından (26.54 mg) elde edilmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından, farklı besin ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında elde edilen kallusların ağırlıklarına ait ortalama değerler (mg)

	MS			**N_6**			**B_5**			
Doz (mg l^{-1})	**Kinetin**	**BAP**	**Ort.**	**Kinetin**	**BAP**	**Ort.**	**Kinetin**	**BAP**	**Ort.**	**Gen. Ort.**
0.01	34.66 a-f	28.33 c-h	**31.49**	31.52 a-h	31.40 a-h	**31.46**	23.36 e-h	45.33 ab	**34.34**	**32.43**
0.05	32.58 a-h	32.66 a-h	**32.62**	47.36 a	26.66 c-h	**37.01**	38.85 a-e	25.23 d-h	**32.04**	**33.89**
0.1	28.09 c-h	34.33 a-g	**31.21**	34.44 a-g	31.47 a-h	**32.96**	31.17 f-h	18.16 gh	**19.66**	**27.49**
0.5	42.62 a-c	34.33 a-g	**38.47**	27.33 c-h	39.99 a-d	**33.66**	29.64 b-h	17.43 h	**23.53**	**31.89**
Ort.	**34.49**	**32.41**	**33.45***	**35.16**	**32.38**	**33.77***	**28.25**	**26.54**	**27.40***	

$LSD_{\%5}$ BO x BD x BDK: 16.32
***** Besin ortamı ortalamaları

Çizelge 4.14. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından, farklı besin ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında elde edilen kallusların ağırlıklarına ait varyans analizleri

Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F
B.O.	2	309.61	3.13
B.D.	1	86.35	0.87
B.O x B.D	2	1.75	0.01
B.D.K	3	116.29	1.17
B.O. x B.D.K.	6	137.66	1.39
B.D. x B.D.K.	3	216.86	2.19
B.O. x B.D. x B.D.K	6	269.38	2.72*
Hata	48	98.88	
Genel	**71**		

VK: % 31.53, * % 5 seviyesinde önemlidir
BO: Besin ortamı
BD: Büyüme düzenleyicisi
BDK: Büyüme düzenleyicisi konsantrasyonu

Farklı büyüme düzenleyici kombinasyonları ve dozları içeren MS, B_5 ve N_6 ortamlarında 30 gün boyunca kültüre alınan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın olgun tohumlarından elde edilen kallus çaplarına ait değerler Çizelge 4.15'de verilmiştir. Çizelge 4.15'deki değerlere göre LSD önem testi yapılmış ve gruplama yapılmıştır.

Denemelerde kullanılan besin ortamlarına uygulanan büyüme düzenleyicisi dozlarının etkileri incelendiğinde dozlar % 1 seviyesinde önemli olmuştur (Çizelge 4.16). En iyi kallus çapı 0.05 mg l^{-1} dozunda (4.72 mm) elde edilirken, en düşük kallus çapı 0.1 mg l^{-1} dozundan (4.12 mm) elde edilmiştir (Çizelge 4.15).

Denemelerde kullanılan besin ortamlarına ilave edilen büyüme düzenleyici tiplerinin etkisi incelendiğinde büyüme düzenleyicileri % 5 seviyesinde önemli olmuştur (Çizelge 4.16). En iyi ortalama kallus çapı N_6 temel besin ortamındaki Kinetin uygulamasından (4.97 mm) elde edilirken, en düşük kallus çapı B_5 temel besin ortamındaki BAP uygulamasından (3.83 mm) elde edilmiştir (Çizelge 4.15).

Denemelerde kullanılan besin ortamı tiplerinin kallus çapına etkisi incelendiğinde besin ortamı tipi % 1 seviyesinde önemli olmuştur. En iyi kallus çapı N_6 (4.67 mm) besin ortamında meydana gelirken, en düşük kallus çapı B_5 besin ortamında (4.07 mm) meydana gelmiştir (Çizelge 4.15).

Çalışmamızda MS, B_5 ve N_6 temel besin ortamlarında 2,4-D (2 mg l^{-1}) sabit tutularak Kinetin ve BAP'nin 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.5 mg l^{-1} dozlarında uygulamalarının kallus ağırlıklarına ve çaplarına genel etkileri değerlendirildiğinde en iyi etkinin N_6 temel besin ortamına 0.05 mg l^{-1} dozunda uygulanan Kinetin ile meydana geldiği, B_5 temel besin ortamında BAP'nin 0.5 mg l^{-1} dozunda uygulanması ile en düşük etkinin meydana geldiği görülmüştür. Yapılan literatür çalışmalarında çim familyasına ait bitkilerde 2,4-D, BAP ve Kinetin'in embriyogenik ve organogenik kallus gelişimine etkisi olduğu görülmüştür (Boyd ve ark. 1986; Valk ve ark. 2004; Liu ve ark. 2006). Çalışmalarımızda kalluslar elde edilmiş, büyütülmüş ama bu kalluslardan embriyogenesis yada organogenesis uyarılamamıştır. Bunu nedeni olarak *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın rejenerasyon çalışmalarına verdiği tepkilerin düşük olması gösterilebilir. Ancak kallusların elde edilmesi ve başarıyla çoğaltılması hücre düzeyinde yapılabilecek bir çok element ve stres faktörü çalışmalarına materyal sağlayabilir.

Çizelge 4.15. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından, farklı besin ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında elde edilen kallusların çaplarına ait ortalama değerler (mm)

	MS			**N_6**			**B_5**			
Doz (mg l^{-1})	**Kinetin**	**BAP**	**Ort.**	**Kinetin**	**BAP**	**Ort.**	**Kinetin**	**BAP**	**Ort.**	**Gen. Ort.**
0.01	4.89	4.33	**4.61**	4.91	4.25	**4.58**	4.21	4.74	**4.48**	**4.56 ab**
0.05	4.56	4.45	**4.50**	5.65	4.27	**4.96**	5.07	4.36	**4.71**	**4.72 a**
0.1	4.04	4.78	**4.41**	4.65	4.19	**4.42**	3.81	3.24	**3.52**	**4.12 b**
0.5	4.04	4.45	**4.24**	4.67	4.75	**4.71**	4.18	3.00	**3.59**	**4.18 b**
Ort.	**4.38 a**	**4.50 b**	**4.44 ab***	**4.97 a**	**4.36 b**	**4.67 a***	**4.32 a**	**3.83 b**	**4.07 b***	

$LSD_{\%1}$ BO: 0.44
$LSD_{\%5}$ BD: 0.27
$LSD_{\%1}$ BDK: 0.51
* Besin ortamı ortalamaları

Çizelge 4.16. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından, farklı besin ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında elde edilen kallusların çaplarına ait varyans analizleri

Varyasyon kaynağı	S.D.	K.O.	F
B.O.	2	2.14	6.42**
B.D.	1	1.87	5.62*
B.O x B.D	2	0.90	2.70
B.D.K	3	1.55	4.66**
B.O. x B.D.K.	6	0.56	1.69
B.D. x B.D.K.	3	0.35	1.05
B.O. x B.D. x B.D.K	6	0.73	2.20
Hata	48	0.33	
Genel	**71**		

VK: % 13.12, ** % 1 seviyesinde önemlidir, * % 5 seviyesinde önemlidir
BO: Besin ortamı
BD: Büyüme düzenleyicisi
BDK: Büyüme düzenleyicisi konsantrasyonu

4.3.2. Meristem kültürü

Meristem içeren kardeşlenme bölgelerinden elde edilen toplam sürgün sayılarına ait ortalama değerler Çizelge 4.17'de verilmiştir. Elde edilen değerlerden varyans analizi yapılmış sonuçlar LSD önem testine göre gruplandırılmıştır (Çizelge 4.17).

Büyüme düzenleyicisi tipinin etkisine bakıldığında büyüme düzenleyicisi tipi % 1 seviyede önemli olmuştur (Çizelge 4.18). En fazla ortalama sürgün sayısı (27 adet) Zeatin uygulanan ortamdan elde edilirken en az sürgün sayısı (10 adet) kinetin uygulanan ortamdan elde edilmiştir. Uygulanan büyüme düzenleyicileri istatistiksel olarak farklı alt gruplarda yer almıştır (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Farklı dozlarda ve farklı büyüme düzenleyicileri içeren MS sürgün rejenerasyonu ortamlarında kültüre alınan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın meristem bölgelerinden elde edilen toplam sürgün sayısı (adet)

Dozlar (mg l^{-1})	**Büyüme düzenleyicileri**			**Ort.**
	Zeatin	**Kinetin**	**BAP**	
0.2	20 d	6 h	24 c	**16.66 b**
1	27 b	9 g	12 f	**16 c**
2	34 a	15e	12 f	**20.33 a**
Ortalama	**27 a**	**10 c**	**16 b**	

$LSD_{\%1}$ BD: 1.045
$LSD_{\%1}$ BDK: 1.045
$LSD_{\%1}$ BD x BDK: 1.810

Doz uygulamalarının etkisine bakıldığında dozlar % 1 seviyede önemli olmuştur (Çizelge 4.18). En fazla ortalama sürgün sayısı (20.33 adet) 2 mg l^{-1} dozundan elde edilirken en az ortalama sürgün sayısı (16 adet) 1 mg l^{-1} dozundan elde edilmiştir. Uygulanan büyüme düzenleyicisi dozları istatistiksel olarak farklı alt gruplarda yer almıştır.

Büyüme düzenleyicisi x doz interaksiyonuna bakıldığında bu interaksiyon % 1 seviyede önemli olmuştur (Çizelge 4.18). En fazla sürgün sayısı 2 mg l^{-1} Zeatin (34 adet) içeren besin ortamında meydana gelirken en az sürgün sayısı 0.2 mg l^{-1} Kinetinde (6 adet) meydana gelmiştir. Büyüme düzenleyicisi x doz interaksiyonu istatistiksel olarak farklı alt gruplarda yer almıştır (Çizelge 4.17).

Tüm kombinasyonlardan elde edilen köksüz sürgünler MS temel besin ortamına 0.5 mg l^{-1} IAA ilave edilerek köklendirme çalışmaları yapılmış ve % 90 oranında başarı sağlanmıştır.

Çizelge 4.18. Farklı dozlarda ve farklı büyüme düzenleyicileri içeren MS sürgün rejenerasyonu ortamlarında kültüre alınan *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın meristem bölgelerinden elde edilen toplam sürgün sayılarına ait varyans analizi

Varyasyon kaynağı	**S.D.**	**K.O.**	**F**
B.D.	2	633.81	1069.56**
B.D.K	2	50.03	84.43**
B.D. x B.D.K	4	150.37	253.75**
Hata	18	0.593	
Genel	**26**		

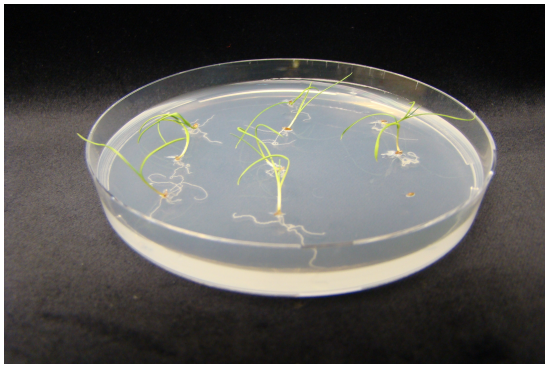
VK: % 4.29, ** % 1 seviyesinde önemlidir
BD: Büyüme düzenleyicisi
BDK: Büyüme düzenleyicisi konsantrasyonu

Köklendirilen fideler daha sonra 24 ^{o}C'de % 60 nem içeren kültür odasında iklime alıştırma (aklimatizasyon) işlemine tabi tutulmuş ve % 80 oranında başarı sağlanmıştır.

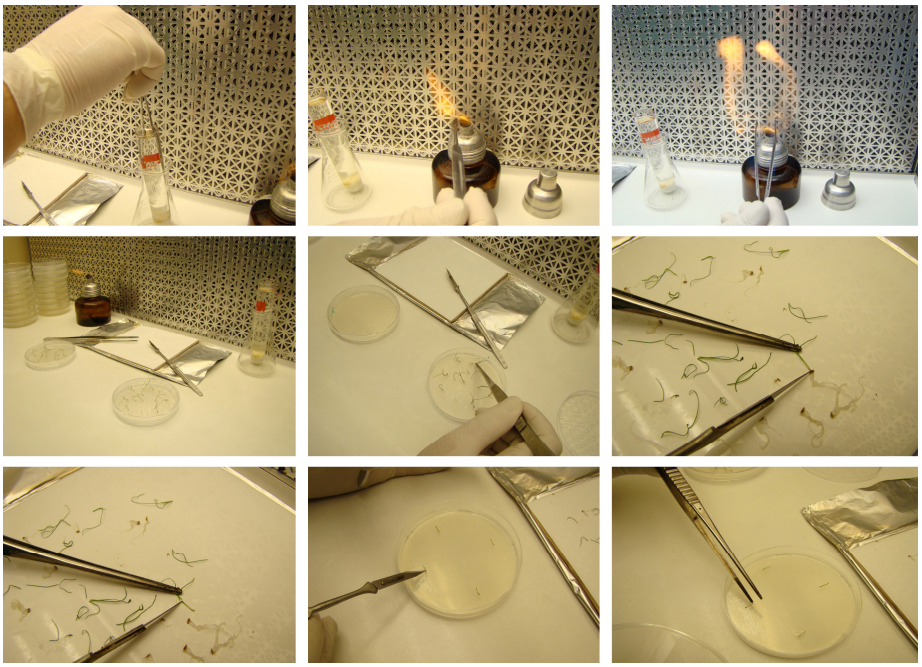
Ekonomik açıdan önem taşıyan doğal bitkisel kaynakların değerlendirilmesi, tarımsal ürünlerin çeşitlendirilmesi ve geliştirilmesinde doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır. Bu yöntemler *in vitro* hücre seleksiyon, haploid kültürü gibi modern ıslah yöntemlerine kaynak teşkil etme açısından önemlidir. Doğada genetik olarak kaybolma tehlikesi altında olan bitki türleri de doku kültürü ile laboratuvar

şartlarında muhafaza altına alıp uzun yıllar saklanabilir ve bunlar genetik çalışmalarda kullanabilir. Bu şekilde genetik materyaller koruma altına alınarak gen bankası oluşturulabilir. Ayrıca bu bitkiler laboratuvar şartlarında mikro çoğaltma ile istenilen miktarda üretilebilir (Babaoğlu 2001).

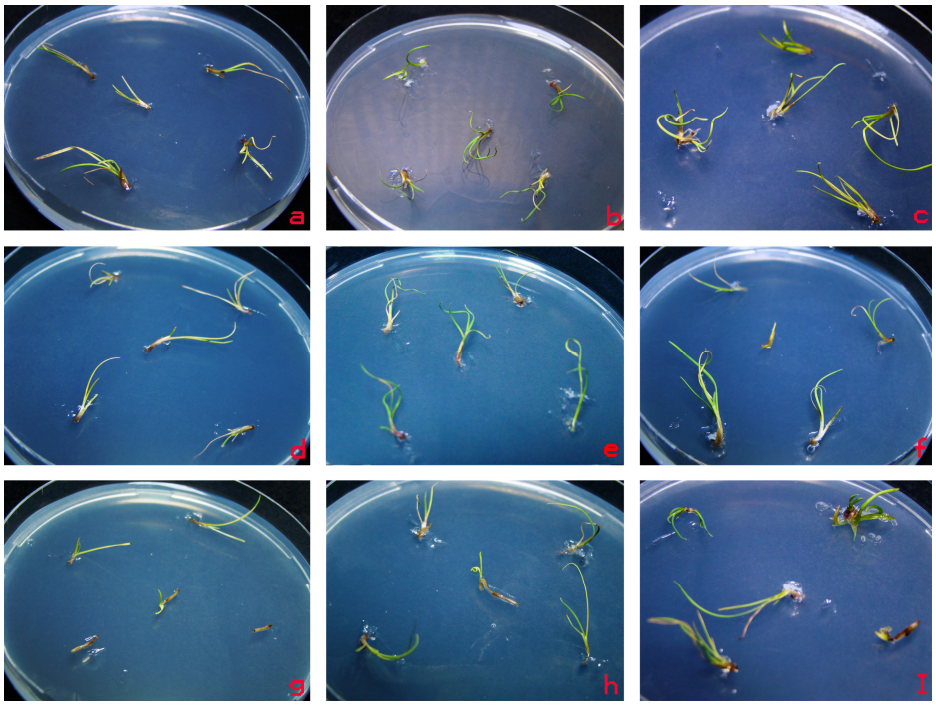
Yapılan literatür taramalarında *Puccinellia* cinsine ait türlerde meristem kültürü ile çoğaltma çalışmalarına rastlanmamıştır. Ayrıca *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarında yaptığımız çimlenme testlerinin sonuçlarına göre tohumların çimlenme yeteneklerinin zayıf olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle bu bitkinin tohumlarının toplandığı bölgeye bağlı kalmadan yılın her döneminde *in vitro* koşullarda yapılacak çalışmalarda homojen materyal elde etmek için meristem kültürü tekniği başarıyla kullanılabilir.



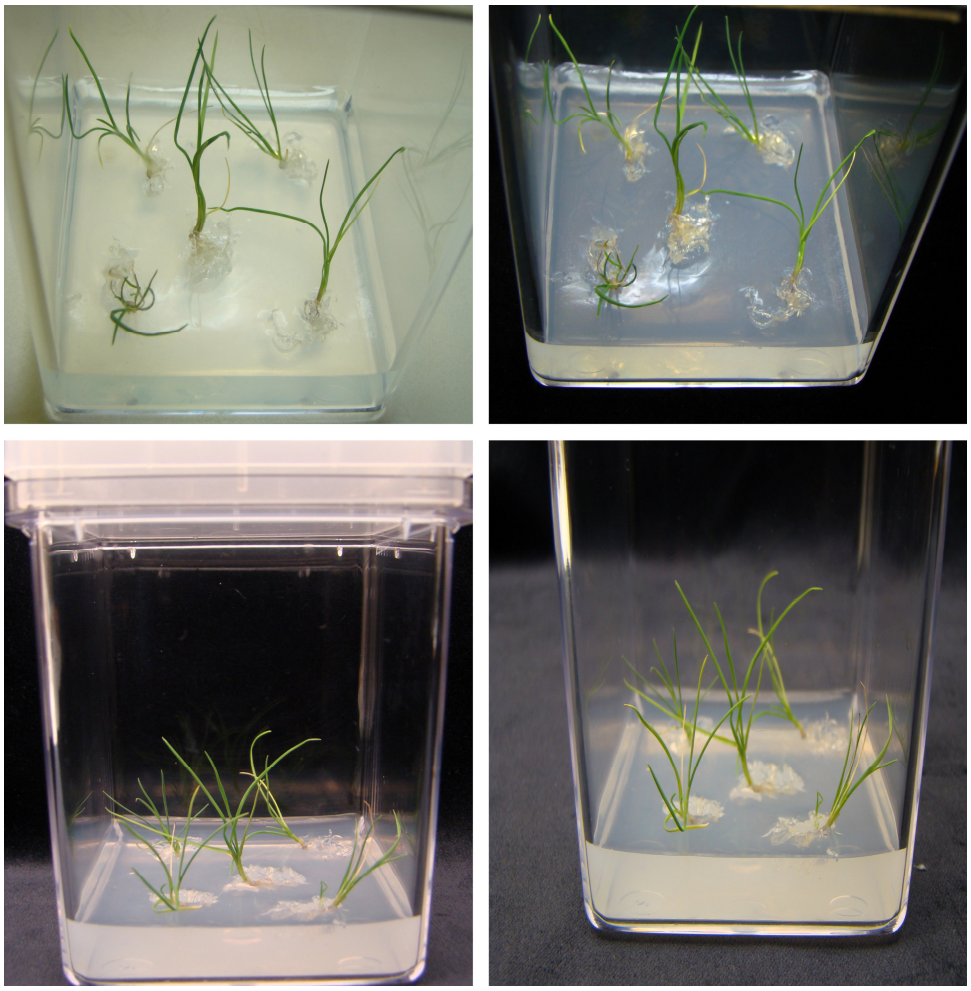
Şekil 4.7. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından meristem kültüründe kardeşlenme bölgelerini kullanmak amaçlı yetiştirilen fideciklerine ait bir görünüm



Şekil 4.8. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından elde edilen fideciklerin kardeşlenme bölgelerinin kültüre alınmasına ait bir görünüm



Şekil 4.9. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın tohumlarından elde edilen fideciklerin kardeşlenme bölgelerindeki meristematik hücrelerden MS temel besin ortamına ilave edilen farklı dozlardaki Zeatin, BAP ve Kinetinin etkisi ile rejenere olan köksüz sürgünlere, a. 0.2 mg l^{-1} Zeatin, b. 1 mg l^{-1} Zeatin, c. 2 mg l^{-1} Zeatin, d.0.2 mg l^{-1} BAP, e.1 m gl^{-1} BAP, f. 2 mg l^{-1} BAP, g. 0.2 mg l^{-1} Kinetin, h. 1 mg l^{-1} Kinetin, ı. 2 mg l^{-1} Kinetin, ait bir görünüm



Şekil 4.10. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın meristem kültürü sonrası elde edilen köksüz sürgünlerinin MS+0.5 mg l^{-1} IAA'de köklendirilmesine ait bir görünüm



Şekil 4.11. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl'ın a. Köklendirme sonrası aklimatize edilmiş fidelerine ait bir görünüm b. MS+0.5 mg l^{-1} IAA köklenmiş bir fidesine ait görünüm

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması 2007 yılında 3 farklı alandan toplanan (Konya Keçeli Kanalizasyon Kanalı etrafından, Eskişehir Kırka Bor (B) işletmesi maden alanı ve yine aynı alandaki yıkama göleti) Çorak çimi (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl) tohumlarınnın *in vitro* fidelerinin, bor alma ve biriktirme durumlarının ICP-AES (Inductively coupled plasma-Atomic emission spectrometry) ile tespiti ve *in vitro* doku kültürü yöntemleri ile çoğaltılması araştırılması amacıyla yürütülmüş ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

Puccinellia distans (Jacq.) Parl'ın tohum toplanan lokasyonlarında B uygulaması olarak 0, 50, 250, 500 ve 1000 mg l^{-1} B dozları denenmiştir. Denenen dozlar içinde 500 ve 1000 mg l^{-1} B dozları çimlenmeyi olumsuz yönde oldukça etkilemiştir. Bu iki dozda çimlenme % 28.8'e kadar düşmüştür. Çalışmamız da bir çok bitki türü için yüksek bir B konsantrasyonu olan 250 mg l^{-1} B denenmiş bu konsantrasyonda dahi çimlenme % 100 olarak meydana gelmiştir.

Borun bitki gelişim unsurları üzerine etkileri değerlendirildiğinde genel olarak yükselen B uygulaması ile gövde uzunlukları azalmıştır, bu düşüş 250 mg l^{-1} B uygulamasından sonraki dozlar olan 500 ve 1000 mg l^{-1} B uygulamalarında belirgin bir şekilde meydana gelmiştir. Tohum toplanan lokasyonlar arası farklılıklar incelendiğinde ise Maden lokasyonu en yüksek gövde boyuna ulaşırken bunu Kanal ve Gölet takip etmiştir.

Fidelerin kök uzunlukları değerlendirildiğinde; en uzun kök uzunluğu 50 mg l^{-1} B uygulamasından elde edilirken, en kısa kök uzunluğu en yüksek B dozu olan 1000 mg l^{-1} B dozundan elde edilmiştir. B uygulamaları değerlendirildiğinde 50 mg l^{-1} B kök gelişimi için en iyi doz olarak belirlenmiştir. 1000 mg l^{-1} B uygulamasında tohum toplanan her üç lokasyonda kökler neredeyse 1 mm'nin bile altında çok kısa kalmış neredeyse hiç gelişim gösterememişlerdir.

Bor uygulamaları ile fidelerin gövde ağırlıkları arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde en iyi kuru gövde ağırlığı 50 mg l^{-1} B uygulamasından elde edilmiş ve bu dozdan sonra bir düşüş gözlenmiştir. Ortalama gövde uzunluklarına B dozlarının etkisine bakıldığı zaman 50 ve 250 mg l^{-1} aynı grupta (a) yer alırken

ortalama gövde ağırlıklarında bu iki doz arasında ve 250 mg l^{-1} B dozundan sonra belirgin bir düşüş yaşanmıştır.

Bor uygulamalarının fide kök ağırlıklarına etkilerine bakıldığında kök ağırlığı bakımından 50 mg l^{-1} B uygulaması en iyi sonuçları vermiş, bu dozdan sonraki dozlarda (250,500 ve 1000 mg l^{-1}) kök ağırlığında belirgin bir düşüş meydana gelmiştir.

Borun bitki organları tarafından alınmasında, B dozunun arttırılması ile fidelerde B alımının arttığı tespit edilmiştir. En yüksek B alımı 1000 mg l^{-1} B dozunda meydana gelirken en düşük B alımı 0 mg l^{-1} B dozunda meydana gelmiştir. *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl çimlenme oranı, kök boyu, gövde boyu, kuru bitki ağırlığı, kuru kök ağırlığı ve bitki B alımı gibi kriterler açısından 500 ve 1000 mg l^{-1} B gibi yüksek oranlarda B içeren ortamlarda düşük değerler vermiş olsada bir çok bitki türünün yaşayamıyacağı koşullar olan yüksek konsantrasyonda B içeren ortamlarda yaşamıştır.

Puccinellia distans (Jacq.) Parl'ın tohumlarından elde edilen 10 günlük steril fideciklerin kardeşlenme bölgelerine MS temel besin ortamında Zeatin, Kinetin ve BAP'nin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu, üç büyüme düzenleyicininde uygulanan konsantrasyonlarından köksüz sürgünler elde edilmiştir. En fazla sürgün MS+2 mg l^{-1} Zeatin kombinasyonundan elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler MS temel besin ortamına ilave edilen 0.5 mg l^{-1} IAA'de % 90 başarı ile magenta kaplarında köklendirilmiştir. Köklenmiş bitkilerin 24 ^{o}C'de % 60 nem içeren kültür odasında aklimatizasyonları % 80 başarı ile yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde;

Dünya'da ve Türkiye'de tarım yapılabilecek alanların son sınırlarına ulamış olması, küresel ısınma, kuraklık ve tuzluluk gibi etmenlerden dolayı mevcut tarım alanlarının önemli bir kısmında verimliliğin düşmesi sonucunda yapılan çalışmaların amacı, birim alandan elde edilen verimin yükseltilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Verimin arttırılması için bölge koşullarına uygun çeşitlerin geliştirilmesi, bu çeşitlerim üretime alınması, agronomik uygulamaların yerinde ve zamanında yapılması önem arz etmektedir. Günümüzde sağlanan üretim artışında; çeşitlerin veriminin yüksek olması yanında, uygulanan ıslah yöntemlerinin önemi büyüktür.

Ancak artan olumsuz çevre faktörleri ve nüfus karşısında verimin daha da yükseltilmesi önemlidir.

Biyoteknolojik yöntemlerle bitkilerin tarımsal niteliklerinin geliştirilmesi amacıyla laboratuar koşullarında uygulanan doku kültürü teknikleri, zamanla tarla koşullarında yapılan çalışmalarda karşılaşılan sorunların giderilmesinde kullanılmaya başlanılmıştır. Sonuçlarının daha kısa sürede alınabildiği, bitkilerin hücre, doku ve çeşitli organlarının kullanıldığı bu çalışmalar bitki ıslahına önemli derecede katkıda bulunmaktadır.

Tahıllarda genetik varyasyon oldukça azalmıştır ve bu nedenle hassas bitkiler arasında yer alan tahıllarda abiyotik strese dayanıklılık mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalar oldukça önemli olmaktadır.

Puccinelli'nın abiyotik stres koşullarından kuraklık ve tuzluluğa önemli derecede tolerans göstermesi, tarım için uygun olmayan topraklarda geniş bir adaptasyon alanının bulunması, bor elementinin yüksek seviyelerinde yetişebilmesi ve buğdaygil familyasının bir üyesi olması, dünya'da insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir besin kaynağı olan buğdaygil ailesi üyelerinin iyileştirilmesi ve geliştirilmesinde önemli bir gen kaynağı olarak kullanılabileceğini, tarıma uygun olamayan alanların iyileştirilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu nedenle yaptığımız çalışma ileride tahıllarda yapılacak fizyolojik ve genetik çalışmalara kaynak oluşturacaktır.

Puccinelli'nın birkaç türü hariç hala tarım da yaygın olarak kullanılmaması, ıslah anlamında yeterli sayıda çalışmanın bulunmaması, düşük ot verimi gibi yönleride geliştirilmesi gereken yönleri arasında yer almaktadır.

In vitro fidelerin optimum koşullarda yetiştirilmesi nedeniyle bitkinin bor elementi alımı ve yüksek seviyedeki oranlara verdiği tepkiler ile bitkinin genetik potansiyeli çevre koşullarının etkisi olmadan belirlenebilmiştir.Çalışmalar arazi ve sera çalışmalarıyla devam ettirilebilir.

Bitkinin rejenerasyon sisteminin elde edilememesi arzu edilmeyen bir durum olarak karşımıza çıkmıştır.

Meristem kültürüne tepki vermesi en azından ileride yürütülebilecek fizyolojik çalışmalar için homojen bitki elde edilmesine, ayrıca klonlama yapıldığı için de seleksiyona imkan tanıma açısından değerlendirilebilir.

Ancak yine de rejenerasyon ortamının tespiti için çalışmalara devam edilmesi olası genetik transformasyon çalışmaları açısından potansiyel öneme sahiptir.

6. KAYNAKLAR

Ahmet, H., Adak, S., M. 2007. Irak'ta yetiştirilen bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 13 (3): 285-292.

Alkan, A., Torun, B., Özdemir, A., Başbay, G., Çakmak, İ. 1997. Değişik Buğday Arpa Çeşitlerinde B Toksitesi Üzerine Çinkonun Etkisi. I. Ulusal Çinko Kongresi. Eskişehir.

Alshammary, Qian S.-F., Wallner, S.-J. 2004. Growth response of four turfgrass species to salinity. Agricultural Water Management, 66. p. 7–111.

Artunduaga, I.R., Taliaferro, M.C., Johnson, B.L. 2004. Effect of Auxin Concentration on Induction and Growth of Embriyogenic Callus from Young in Florescence Explants of Old World Bluestem (*Botriochola Spp.*) and Bermuda (*Cynodon Spp.*) Grasses Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol: 12 p. 13-19.

Ashraf, B.Y.M., Mcneilly, T., Bradshaw, A.D. 1986. The potential for evolution of salt (NaCl) tolerance in seven grass species, New Phytot. 103**,** 299-309.

Atalay, E. 2003. Buğday (Kızıltan-91) ve arpa (Tokak-157/37) *in vitro* fidelerinde bor alımının ICP-AES ile tespiti. S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.

Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A. 2001. Bölüm 1 Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi: I-Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, ISBN: 975-6652-03-09.

Babaoğlu, M., Gezgin, S., Topal, A., Sade, B., Dural, H. 2004. *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat. A Boron Hyperaccumulator Plant Species That May Phytoremediate Soils with Toxic B Levels. Turkish Journal of Botany. Vol: 28 p. 273-278.

Babaoğlu, M. 2008. Kişisel Söyleşi

Bagheri, A., Paull, J.G., Rathjen, A.J., Ali, S.M., Moody, D.B. 1992. Genetic variation in the response of pea (*Pisum sativum* L.) to high soil contentrations of boron. Plant and Soil. 146:1-2, 261-269; 17 ref.

Bergmann, W. 1992. Nutritional Disorders of Plants Colour Atlas. p. 204-239. Gustav Fischer, New York, USA.

Binh, D.Q., Heszky, L.E., Gyulai, G., Kiss, E., Csillag, A. 1989. Plant Regeneration from Callus of *Puccinelli distans* (L.) Parl Plant Cell Tissue and Organ Culture, Vol: 18 p. 195-200.

Campbell, T.A., Rathjen, A.J., Paull, J.G., Islam, AKMR. 1998. Method for screening bread wheat for tolerance to boron. Euphytica 100: 131-135, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Cartwright, B., Zarcinas, R., Mayfield, A.H. 1984. Toxic Concentrations of Boron in a Red-Brown Earth at Gladstone, South Australia. Aust. J. Soil Res. 22:261-72.

Cartwright, B., Zarcinas, R., Spoucer, L.R. 1986. Boron Toxicity in South Australian Barley Crops. Aust. Lagric. Res. 37:351-359.

Chantachume, Y., Smith, D., Hollanby, G.J., Paull, J.G., Rathjen, A.J. 1995. Screening for boron tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) by solution culture in filter paper. Plant and Soil. 177: 249-254.

Choo, M.K., Soreng, J.R., Davis, J. 1994. Phylogenetic Relationships Among P. and Allied Genera of Poaceae as Inferred from Chloroplast DNA Restriction Site Variation Ameracan Journal of Botany, Vol. 81, No. 1. p. 119-126.

Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O., Gürbüz, F. 1987. Araştırma ve Deneme Metodları (İstatistik Metodları-II), Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın no: 1021, Ders kitabı: 285, Ankara.

El-Sharkawi, H.M., Farkhali, K.A., Sayed, S.A. 1999. Growth characteristics of *Triticum aestivum* L. roots under different treatment combinations of boron, matric water potential and temperature. Seed Science and Technology. 27:1 239-249; 25 ref.

Eremchenko, Z.O., Lymar, A.O. 2007. "Soil-Ecological Conditions of the Zone of Salt Waste Dumping and Plant Adaptation to Them". Russian Journal of Ecology, Vol. 38, No. 1, p. 16–21.

Faroog, M., Rashid, H., Chaudhry, I. Z., Marwat, B. K. 2004. Comparative Tissue Culture Response of Wheat Cultivars and Evaluation of Regenerated Plants, Pakistan Journal of Biological Sciences Vol.7 (3) p. 406-408.

Eyüpoğlu, F., Kurucu, N., Talaz, S. 1995. Türkiye Topraklarının Bitkiye Yarayışlı Mikroelementler Bakımından Genel Durumu. Toprak Gübre Araştırma Enstitüsü, 629/A-002 Nolu Projesi Toplu Sonuç Raporu, Ankara.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.

George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture Part I. The Technology, Second Edition, Exegetics Ltd. England, p. 74

Gezgin, S., Uyanöz, Ş. 1994. Bazı toprak Profillerinde Mikro Besin Elementlerinin Dağılımı ve Toprak Özellikleri İle İlişkisi. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 5(7):124-140.

Gezgin, S., Dursun, N., Hamurcu, M., Harmankaya, M., Önder, M., Sade, B., Topal, A., Soylu, S., Akgün, N., Yorgancılar, M., Ceyhan, E., Çiftçi, N., Acar, B., Gültekin, İ., Işık, Y., Şeker, C., Babaoğlu, M. 2002. Determination of B Contents of Soils in Central Anatolian Cultivated Lands and its Relations between Soil and Water Characteristics. Boron in Plant and Animal Nutrition. Edited by Goldbach et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Goldstein, C.S., Kronstad, W.E. 1985. Tissue Culture and Plant Regeneration from Immature Embryo Explants of Barley (*Hordeum vulgare*) Theorectical and Applied Genetics, Vol. 71 p. 631-636.

Griffin, D.J. Dibble, M.S. 2004. High- Frequency Plant Regeneration from Seed-Derived Callus Cultures of Kentucky Bluegrass (*Poa Pratensis* L.) Plant Cell Reports, Vol. 14 p. 721-724.

Gupta, U.C., Jame, Y.W., Campbell, C.A., Leyson, A.J., Nıcholaıchuk, W. 1985. Boron Toxicity and Deficiency: A Rewiew. Canadian Journal of Soil Science. 65:381-409.

Günel, N. 1983. Toprak Verimliliği ve Gübreler. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No:168 3.Baskı, Adana.

Güneş, A., Alpaslan, M. 2000. Boron Uptake and Toxicity and Maize Genotypes in Relation to Boron and Phosphorus Supply. Journal of Plant Nutrition. Vol. 23. 4: 541-550

Güneş, A., Alpaslan, M., Çıkılı, Y., Özcan, H. 2000. The Effect of Zinc on Alleviation of Boron Toxicity in Tomato Plants (*Lycopersicon esculentum* L.). Turk. J. Agric For 24 505-509.

Ha, D.C., Lemaux, P. G., Cho, M. 2007. Stable Transformation of a Recalcitrant Kentucky Bluegrass (*Poa Pratensis* L.) Cultivar Using Mature Seed-Derived Highly Regenerative Tissues In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, Vol. 37 p. 6-11.

Hezsky, L.E., Binh, D.Q., Kiss, E., Gyulai, G. 1989. Increase of Green Plant Regeneration Efficiency by Callus Selection in (*Puccinellia Limosa*) (Schur.) Holmbg. Plant Cell Reports Vol. 8 p. 174-177.

Hu, X.R., Yang, A.F., Zhang, K.W., Wang, J., Zhang, J.R. 2005. Optimization of *In vitro* Multiple Shoot Clump Induction and Plantlet Regeneration of Kentucky Bluegrass (*Poa Pratensis*) Plant Cell, Tissue and Organ Culture Vol. 84 p. 90-99.

Huang, C., Graham, R.D. 1990. Resistrance of Wheat Genotypes to Boron Toxicity is Expressed At Cellular Level. Plant Soil 26: 295-300.

Hy, X., Bz, M., Yq, C. 2004. Induction of embryogenic calli from caryopses of common bermudagrass and ultrastructure of embryogenic cells as well as plant regeneration Biotechnology Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China. Vol. 30(2), p. 15.

İhsan, S. M., Jabeen, M., İlahi, I. 2003. *In vitro* Callus Induction, Its Proliferation and Regeneration In Seed Explants of Wheat (*Triticum aestivum* L. var. Lu- 265) Pakistan Journal of Botany Vol. 35(2) p. 209-217.

Kalaycı, M., Alkan, A., Çakmak, İ., Bayramoğlu, O., Yılmaz, A., Aydın, M., Özbek, V., Ekiz, H., Özberisoy, F. 1997. Studies on differential response of wheat cultivars to boron toxicity. Wheat: propects for global improvement. Proceedings of the 5th International Wheat Conference, Broun, H.J.(ed)10-14 June. Ankara, Turkey. Developments in Plant Breeding. Vol. 6;11 ref.

Keren, R., Bingham, F.T. 1985. Boron in Water, Soil and Plants. Adv. Soil Sci 1. 229-276.

Khan, T.N., Young, K.J.,, Gartrell, J.W. 1985. Boron Toxicity in Barley. Farmnote, Western Australian Deratmentof Agriculture. No.10/85:All.

Liu, P., Zhang, X.Z., Yuan, J.G., Xi, G. B., Du, X.L., Yang, Z.Y. 2006. Callus Induction and Plant Regeneration In Eleven Perennol Ryegrass Cultivars Biotechnology and Biotechnological Equipment Vol: 20(3) p. 30-37.

Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, New York. p. 379-396.

MSTAT-C. 1980. MStat User's Quides Statistics (Version 5 ed.) Michigan State Universty. Michigan, USA.

Murashige, T., Skoog, F.A. 1962. Revised Sedium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nable, R.O. 1997. Boron Toxicity.Plant and Soil.198:181-198.

Nable, R.O. 1988. Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars. A preliminary examination of the resistance mecanism. Plant and Soil. 112: 45-52.

Nable, R.O., Lance, R.C.H., Cartwright, B. 1990 a. Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity. Annals of Botany. 66:1, 83-90; 15 ref.

Nable, R.O., Cartwright, B., Lance, R.C.M. 1990 b. Genotypic differences in boron accumulation in barley: Relative susceptibilities to boron deficiency and toxicity. Genetic aspects of plant mineral nutrition. 243-251.

Nable, R.O., Paull, J.G., Cartwright, B. 1990 c. Problems associated with the use of foliar analysis for diagnosing boron toxicity in barley. Plant and Soil. 128: 2, 225-232; 22 ref.

Parker, D.R., Page, A.L., Thomason, 1991. D.N. Salinity and boron tolerances of candidate plants for the removal of selenium from soils. Journal of environmental quality, Vol. 20 (1), p. 157-164.

Peng,Y.H., Zhu,Y.F., Mao,Y.Q., Wang, S.M., Su, W.A., Tang, Z.C. 2004. Alkali grass resists salt stress through high [K^+] and an endodermis barrier to [Na^+]. Journal of Experimental Botany, Vol. 55, No. 398, p. 939-949.

Paull, J.G., Cartwright, B., Rathjen, A.J. 1988. Responses of wheat and barley genotypes to toxic concentrations of soil boron. Euphytica. 39, 137-144.

Paull, J.G., Rathjen, A.L., Cartwright, B., Nable, R.O. 1990. Selection parameters for assessing the tolerance of wheat to high concentrations of boron. In Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition. Ed. N El Bassam. p. 361-369. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Nether1ands.

Reis, İ. 1996. Borlu Termal Suların İncelenmesi. Yayınlanmış yüksek lisans tezi. Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.

Reisenauer, H.M., Walsh, L.M., Hoeft, R.G. 1973. Testing Soils For Sulphur, Boron, Molybdenum, and Chlorine. In: Soil Testing And Plant Analysis. Walsh L.M., Beaton J.D. (Eds.), Soil Science Society Of America. Madison, Wisconsin, USA, p. 173-200.

Rerkasem, B., Jamjod, S. 1997. Genotypic Variation In Plant Respance to Low Boron and Implications for Plant Breeding. Kluwer Acamedic Publisters. Printed Nederland.

Rerkasem, B. Jamjod, S. 2004. Boron Deficiency İn Wheat: A Review. Field Crops Research In Press, Accepted 31 January Elsevier.

Riley, M.M., Rabson, A.D. 1994. Pattern of supply affects boron toxicity in barley. Journal of Plant Nutrition. Vol. 17 (10) p. 1721-1738.

Sahrawat, A.K. Chand, S. 2001. High-Frequency Plant Regeneration from Coleoptile Tissue of Indica Rice (*Oryza sativa*) *In vitro* Cellular & developmental Biology – Plant, Vol. 37 No. 1 p. 55-61.

Silva, D.A.R., Andrade, J.M.V. 1983. Influence of Microstrients on The Male Sterility on Upland Wheat and Rice And Soybean Yields in Red Yellow Latosal. Pesq. Agropec Bras Brasilia 18, 593-601. (In Portuquese With English Abstract).

Smallcombe, A., 2004. Agriculturel Notes ISSN, 1329-8062

Smith, R. 1992. Plant Tissue Culture Techniques and Exferiments Academic Press Inc., UK, p. 27.

Soylu, S., Topal, A., Sade, B., Akgün, N., Gezgin, S., Babaoğlu, M. 2004. Yield and Yield Attributes of Durum Wheat (Triticum durum Desf.) Genotypes as Affected by Boron Application in Boron-Deficient Calcareous Soils: An Evaluation of Major Turkish Genotypes for B Efficiency. Journal of Plant Nutrition, Vol. 27, No. 6, p.1077-1106.

Şener, S. 1983. Sulama Suyunun Özellikleri ve Sınıflandırılması, Toprak Su 103. Menemen.

Taban, S., Erdal, İ. 2000. Bor Uygulamasının Değişik Buğday Çeşitlerinde Gelişme ve Toprak Üstü Aksamda Bor Dağılımı Üzerine Etkisi. Turkish. J. Agric. For. 24: 255-262.

Thapa, R., Parco, A., Talaiferro, C. 2005. Bermudagrass Callus Induction and Growth as Influenced by Cultivar, Auxin Type and Concentration Oklahoma State University, Stillwater, 368 Agricultural Hall, Stillwater, OK 74078.

Torun, A., Yılmaz, A., Kalaycı, M., Gültekin, İ., Torun, B., Eker, S., Çakmak, İ. 1999. Konya koşullarında yetiştirilen farklı buğday çeşitlerinin bor toksitesine duyarlılığının sera ve tarla koşullarında araştırılması. Hububat Sempozyumu, Altıncı oturum: Hububat Yetiştirme, 317-327, 8-11 Haziran, Konya.

Valk, V.P., Zeel, M.A.C.M., Molenaar, Ö.C. 2004. Somatic Embriyogenesis and Plant Regeneration in Inflorescence and Seed Derived Callus Cultures of Poa Pratensis L. (*Kentuck bluegrass*) Plant Cell Reports Vol. 7 p. 644- 647.

Venables, A.V., Wilkins, D.A. 1978. Salt tolerance in pasture grasses New Phytol. 80, 613-622.

Wang, Y., Yang, C., Liu, G., Jiang, J. 2007. Development of a cDNA microarray to identify gene expression of *Puccinellia tenuiflora* under saline-alkali stress. Plant Physiology and Biochemistry, 45: 567-76.

Yasmin, R. Javed, F. Arfan, M. 2001. Somatic Embryogenesis in Callus Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Accession 238-12 International Tournel of Agriculture & Biology 1510-8530/03-2 p. 163-166.

Yau, S.K., Nahcit, M.M., Ryan, J., Hamblin, J. 1995. Phenotypic variation in boron toxicity tolerance at seedling state in durum wheat (*Triticum durum* L.). Euphytica. 83:3, 185-191; 16 ref.

Yau, SK, Saxena, MC. 1997. Variation in growth development and yield of durum wheat in response to high soil boron 1. Average effects. Australian Journal of Agricultural Research, 48 (7): 945-949, Csiropublications, Collingwood.

Yorgancılar, M., Babaoğlu, M. 2005. Buğday Çeşitlerinde Borun Çimlenme Üzerine Etkisinin *In Vitro* ve Saksı Şartlarında Araştırılması S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 19(35): p. 109-114.

Zang, X.Y., Hong, B.S., Murugesan, D., Lim. G.J., Kim, H.D. 2006. Plant Regeneration Tury-Type Common Bermuda Grass (*Cynodon dactylon*) Via Somatic Embriyogenesis From Seed-Derived Callus Horticulture Environment and Biotechnology Vol. 47 No. 4 p. 217-221.

Zhang, S., Hanna, W., Akins, P.O. 2007. Comparison of Callus İnduction and plant Regeneration from Different Explants in Triploid and Tetraploid Turf-Type Bermudagrasses", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 90 Number: 1 p. 71-78.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Karaman'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Karaman'da tamamladım. 2001 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nü kazandım. Buradaki dört yıllık lisans eğitimimden sonra, yüksek lisans eğitimimi Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda tamamladım. Yüksek Lisans boyunca Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi bünyesinde bulunan Bitki Biyoteknolojisi ve Moleküler Genetik Laboratuarında aktif olarak çalışmalarda bulundum.