ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IN VITRO REKABETİN OLGUN BUĞDAY (*Triticum* sp.) EMBRİYOLARINDAN KALLUS OLUŞUMU VE SÜRGÜN REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

SEDA PELİT

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2011

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Seda PELİT tarafından hazırlanan "*In Vitro* Rekabetin Olgun Buğday (*Triticum* sp.) Embriyolarından Kallus Oluşumu ve Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi" adlı tez çalışması 13/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

Jüri Üyeleri **:**

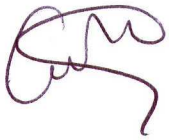
Başkan **:** Doç. Dr. Mustafa YILDIZ



Üye **:** Prof. Dr. Nilgün BAYRAKTAR



Üye **:** Yard. Doç. Dr. Gölge SARIKAMIŞ



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özer KOLSARICI
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IN VITRO REKABETİN OLGUN BUĞDAY (*Triticum* sp.) EMBRİYOLARINDAN KALLUS OLUŞUMU VE SÜRGÜN REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Seda PELİT

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

Bu çalışma, *in vitro* rekabet ve stress arasındaki ilişkileri ve bunların olgun buğday embriyolarından kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini belirlemek için yapılmıştır. Eksplantlar arasındaki rekabet, eksplantların kültüre alındığı mesafeler değiştirilerek sağlanmıştır. 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 cm olarak dört farklı kültür mesafesi kullanılmıştır. Sonuçlar, eksplantlar arasındaki kültür mesafesinin 2.0 cm'den 1.0 cm'ye düşürülerek onların rekabete teşvik edilmesinin sürgün rejenerasyon kapasitesini bir noktaya kadar artırdığını, bundan sonra başlayan stresin bütün parametrelerde önemli düşüşlere neden olduğunu göstermiştir. 1.0 cm'lik aralık mesafelerde kültüre alınan eksplantlar, doku kültürü tepkisi bakımından en yüksek sonuçları vermiştir. Bu çalışma, ilgili genotip için doku kültürü çalışmalarının başarısının yalnızca büyüme ortamındaki oksin ve sitokininlerin doğru konsantrasyon ve kombinasyonlarının belirlenmesiyle değil, aynı zamanda kültüre alınan eksplantlar arasındaki rekabetten yararlanılarak da artırılabileceğini göstermiştir.

2011, 40 sayfa

Anahtar Kelimeler: *In vitro* rekabet, *Triticum*, sürgün rejenerasyonu

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

THE EFFECT OF *IN VITRO* COMPETITION ON CALLUS FORMATION AND SHOOT REGENERATION FROM MATURE EMBRYOS OF WHEAT (*Triticum* sp.)

Seda PELİT

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

This study was carried out to determine the relationship between *in vitro* competition and stress and their effects on callus formation and shoot regeneration from mature embryos of wheat. Competition among explants was achieved by changing the distances they cultured. Four different culture distances were used as 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 cm. The results showed that encouraging explants for competition by decreasing the culture distances among them from 2.0 cm to 1.0 cm increased shoot regeneration capacity till a certain point from where stress initiated and significant decreases in all parameters were observed. Explants cultured at 1.0 cm interval gave rise to the highest scores with respect to tissue culture response. This study showed that the success of tissue culture studies for related genotype could be increased not only by determination of correct concentrations and combinations of auxins and cytokinins in growth medium but also by evaluating competition among explants cultured.

2011, 40 pages

Key Words: *In vitro* competition, *Triticum*, shoot regeneration

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında bana destek veren ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı) ve laboratuardaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Okula başladığım ilk günden beri maddi-manevi desteklerinin yanısıra gülen yüzlerini esirgemeyen başta sevgili annem ve babam olmak üzere tüm Pelit ailesine teşekkürlerimi sunarım.

Seda PELİT
Ankara, Haziran 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT ii

TEŞEKKÜR iii

SİMGELER DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ vi

ÇİZELGELER DİZİNİ vii

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ 4

3. MATERYAL VE METOT 9

3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 9

3.2 Bitki Materyali 9

3.3 Metot 9

3.3.1 Büyüme ortamı ve kültür koşulları 9

3.3.2 Tohum yüzey sterilizasyonu ve embriyo izolasyonu 10

3.3.3 Kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu, köklenmiş bitkicik elde edilmesi ve toprakta bitki gelişimi 10

3.3.4 Klorofil kapsamının belirlenmesi 11

3.4 İstatistiksel Değerlendirmeler 12

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 13

4.1 Çakmak 79 Makarnalık Buğday Çeşidinin Olgun Embriyolarından Kallus Oluşumu, Sürgün Rejenerasyonu ve Bitki Elde Edilmesi 13

4.2 Bezostaja-1 Ekmeklil Buğday Çeşidinin Olgun Embriyolarından Kallus Oluşumu, Sürgün Rejenerasyonu ve Bitki Elde Edilmesi 22

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 25

KAYNAKLAR 28

ÖZGEÇMİŞ 32

SİMGELER DİZİNİ

2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
MS	Murashige ve Skoog

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1	Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyolardan kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu	16
Şekil 4.2	Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyolardan sürgün gelişimi	17
Şekil 4.3	Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde köklendirme ortamında gelişen sürgünler	18
Şekil 4.4	Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde köklendirme ortamında gelişen bitkicikler	19
Şekil 4.5	Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde köklenmiş bitkiciklerin farklı aralık mesafelerde toprakta gelişimi	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 MS (Murashige ve Skoog) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları 10

Çizelge 4.1 Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyolardan kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu 21

Çizelge 4.2 Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyoların kalluslarından oluşan bitkiciklerin farklı aralık mesafelerde toprakta gelişimi 22

Çizelge 4.3 Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyolardan kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu 23

Çizelge 4.4 Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyoların kalluslarından oluşan bitkiciklerin farklı aralık mesafelerde toprakta gelişimi 24

1. GİRİŞ

Bitkiler, yeryüzündeki yaşamın kaynağını oluştururlar. İnsanlar tarafından tüketilen enerjinin %90'ı, proteinin ise %80'i bitkisel kaynaklıdır. Geriye kalan enerji ve protein gereksinimi ise hayvansal ürünlerden karşılanmaktadır.

Dünya nüfusunun yıllık %1.5'lik artışla 2020 yılında 8 milyar, 2050 yılında da 11 milyar olacağı tahmin edilmektedir (Vasil 1998). Günümüzde tarım yapılan alanlar dünya yüzeyinin %3'ünü oluşturmaktadır. Ancak, işlenen alanlar erozyon, tuzlulaşma, asitleşme, yoğun tarım ve aşırı otlatma gibi nedenlerle hızla daralmaktadır. Tüm bu faktörler artan nüfusun da etkisiyle 2050 yılına kadar 0.26 hektar olan kişi başına işlenen alanın 0.15 hektara düşmesine neden olacağı düşünülmektedir. Buna ek olarak, modern tarım için gerekli su kaynaklarının bulunması; artan su tüketimi ve suların giderek kirlenmesi nedeniyle zorlaşacaktır (Vasil 1998).

Bir yandan dünya nüfusunun her geçen gün arttığı, öte yandan tarımda kullanılan alanların son sınırına dayandığı düşünüldüğünde, verim artışının gelecekte de devam etmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır. Aslında yapılan araştırmalar, bugünkü verim düzeyinin potansiyel verimin çok altında olduğunu göstermektedir. O halde, potansiyel verim düzeyine ulaşabilmek için bitkilerin genetik yapılarının iyileştirilmesi gerekir. Ancak, klasik bitki ıslahında, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi kantitatif karakterlerin, bir başka deyişle birden fazla gen tarafından belirlenen tarımsal özelliklerin iyileştirilmesinde birçok sınırlamalarla karşılaşılmaktadır. Aralarında melezleme yapılabilen tür sayısının azlığı, yapılan melezlemelerde istenen karakterlerle birlikte istenmeyen özelliklerin de birlikte geçişinin engellenememesi, istenmeyen karakterlerin geri melezleme yoluyla elimine edilmesinin çok uzun zaman alması klasik bitki ıslahının önemli dezavantajları arasındadır (Özcan ve Özgen 1996). Bu yüzden, verim artışı sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen çevreyle dost biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması zorunludur. Bitki genetik mühendisliğinin son yıllardaki

başarılı uygulamalarıyla, bir bitkinin orijinal karakteri değiştirilmeden bir veya birden fazla gen yüksek verimli çeşitlere kolayca aktarılabilmektedir.

Buğday insan beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri arasında dünyada ekiliş ve üretim bakımından ilk sırada yer almaktadır. Bunun sebebi buğday bitkisinin geniş bir adaptasyon yeteneğine sahip olmasıdır. Ayrıca buğday tanesi uygun besleme değeri, saklama ve işlenmesindeki kolaylıklar nedeniyle yaklaşık olarak 50 ülkenin temel besini durumundadır. Buğday başta unlu mamuller olmak üzere birçok gıda ve sanayi sektöründe kullanılmaktadır.

İnsan beslenmesinde bu denli önemli yer tutan bir üründe, biyotik ve abiyotik stres şartlarına dayanıklı ve yüksek verimli yeni çeşitlerin geliştirilmesi çalışmaları son yıllarda hız kazanmıştır. Bitki doku kültürleri, gen aktarımı gibi ileri biyoteknolojik çalışmaların temelini oluşturur. Zira, sonucunda rejeneratif bitki elde edilemeyen bir doku kültürü çalışmasının pratikte hiç bir önemi yoktur. Özellikle gen aktarımında, yüksek başarı sağlanabilmesi için adventif sürgün rejenerasyonunun ve eksplant başına rejenere olan sürgün sayısının yüksek olması gerekir. Yüksek sürgün rejenerasyon frekansının elde edilmesinde, çalışılan bitkiye özgü en uygun eksplantın ve büyüme düzenleyicilerinin en etkili konsantrasyon ve kombinasyonlarının belirlenmesi çok önemlidir.

Tarla şartlarında stress ve rekabetin bitkiler üzerine etkileri konusunda yapılmış pek çok araştırma bulunmaktadır. Bitkiler aralarında toprak üzerinde yaprak ve saplarıyla ışık için, toprak altında da kökleriyle su ve besin maddesi için rekabet ederler. (Wilson 1988, McPhee ve Aarssen 2001). *In vitro* şartlarda eksplantlar arasında ortaya çıkan rekabetin doku kültürü tepkisi üzerine etkileri ilk kez ketende Yıldız (2011) tarafından ortaya konulmuştur.

Bilindiği gibi, buğday tüm dünyada insan beslenmesinde en yoğun kullanılan bitkilerden biridir. Aynı şekilde doku kültürü çalışmalarının da önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Doku kültürü çalışmalarında en yüksek sürgün rejenerasyonunun

elde edilebilmesi için çalışmaya konu olan bitkide farklı eksplantlar, değişik büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında kültüre alınmaktadır.

Bu tez çalışması buğdayda *in vitro* şartlarda kültüre alınan olgun embriyo eksplantları arasında bir rekabet ve stresin bulunup bulunmadığını araştırmak, eğer böyle bir durum varsa, bunun sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yürütülmüştür.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karadimova ve Djambova (1993), 1 ekmeklik ve 3 makarnalık buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını eksplant olarak kullandıkları *in vitro* tuzluluk çalışmasında, kallusları farklı dozlarda tuz içeren ortamlara aktarmışlardır. İki alt kültür yaptıkları çalışmada, kallusların gelişme oranını kallus ağırlığını karşılaştırarak belirlemişlerdir. Tüm dozlarda elde ettikleri rejenere bitkileri yetiştirerek bunların tohum bağlamasını sağlamışlardır. R_1 generasyonunda *in vivo* da tekrar kullandıkları en yüksek dozlar olan %0.5 ve %0.7 NaCl içeren sularla sulama yapmışlar ve bu dozlara dayanıklı çeşitlerin yeni kuşaklarının da dayanıklı olduğunu gözlemişlerdir. Çalışmada ekmeklik buğday, makarnalıklara oranla daha dayanıklı bulunmuştur.

Kintzios vd. (1997), 'Vergina' ekmeklik buğday çeşidinin olgun embriyolarını 0, 3, 6 ve 9 g/l dozlarında NaCl ve değişik yoğunluklarda büyüme düzenleyiciler içeren ortamlarda kültüre almışlar, tuz dozlarını ortamlara kallus gelişimi sağlandıktan sonra eklemişlerdir. Oluşturulan kalluslarda kallus çoğaltımı, kök oluşumu ve sürgün gelişiminin incelenmesi amacıyla üç ayrı yöntem uygulanmıştır. Tuzun kallusların morfolojik görünümlerinde önemli bir etkiye neden olmadığı ancak yüksek tuz dozlarında kallus büyümesinin yavaşladığı, kök oluşumu ve sürgün gelişiminin azaldığı gözlenmiştir. Araştırmacılar tuza toleranslı bitki seçimi için 3-5 g/l dozlarının uygun olduğunu ve bu uygulamanın bitki rejenerasyonu aşamasında yapılmasını önerdiklerini belirtmişlerdir.

Wilson (1988) ile McPhee ve Aarssen (2001), bitkilerin kendi aralarında toprak üzerinde yaprak ve saplarıyla ışık için, toprak altında da kökleriyle su ve besin maddesi için rekebet ettiklerini bildirmişlerdir.

Özgen vd. (1998), 12 ekmeklik buğday çeşidinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna eksplant türünün etkisini (olgunlaşmamış embriyo ve endosperm-destekli olgun embriyo) araştırmışlar; her iki embriyo kültüründe de rejenere bitki elde edildiğini ve kültür tepkilerinin genotiplere bağlı olduğunu, kallus oluşumu,

rejenerasyon kapasitesi ve rejenere bitki sayısının birbirinden bağımsız olduğunu, olgun embriyolarda kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunun yüksek olduğunu ve yılın her döneminde kolay bulunabileceği için buğday doku kültürü çalışmalarında başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Stoffella ve Bryan (1988), bitki sıklığının birçok sebzede bitki gelişimini ve verimi etkilediğini bildirmişlerdir.

Sayar vd. (1999), diploid, tetraploid ve hekzaploid buğday çeşitlerinde endosperm destekli olgun embriyo tekniğini kullanarak, tane iriliğinin kallus oluşumuna etkisini araştırdıkları çalışmalarında; buğday çeşitlerine ait tohumları küçük ve büyük olarak ikiye ayırmışlar, yüzey sterilizasyonu uygulanan bu tohumların embriyoları steril kabin içerisinde endospermden hafifçe ayırılıp 8 mg/l 2,4-D içeren sıvı ortamda kallus oluşturmaları sağlanmış, içinde oksin bulunmayan MS ortamına rejenerasyon için aktarılmıştır. Araştırıcılar, tüm genotiplerde büyük tanelerin, küçük tanelere göre kallus oluşturma frekansı, kallus net ağırlığı, rejenerasyon kapasitesi ve kültür oluşturabilme yeteneğinin önemli derecede yüksek değerler gösterdiğini; tohum ağırlığı ile kallus ağırlığı ($r = 0,86$) ve kallus ağırlığı ile rejenerasyon kapasitesi ($r = 0,85$) arasında önemli ilişki olduğunu, büyük taneli buğdaylarda endosperm destekli embriyo tekniği kullanılarak yüksek düzeyde rejeneratif kallus oluşumu elde edildiğini, bu nedenle bu tekniğin olgunlaşmamış embriyolara alternatif olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Daşgan ve Abak (2003), biberde artan bitki sıklığının bitkiler arasında ortaya çıkan rekabet nedeniyle verimi düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Morgade ve Willey (2003), bitki sıklığı arttıkça meyve veriminin de arttığını tespit etmişlerdir.

Yıldız vd. (2003), yurt dışından getirilen üç keten çeşidini kullanarak yaptıkları çalışmada, steril edilen tohumlardan gelişen farklı yaşlardaki (7, 12, 17 gün) fidelerden elde edilen hipokotil parçaları agar ve phytagel ile katılaştırılan MS ve B-

5 ortamlarında sürgün rejenerasyonuna almışlardır. Sonuçta, en yüksek sürgün rejenerasyon yüzdesi her üç çeşitte ve tüm ortamlarda 12 günlük fidelerden alınan hipokotil eksplantlarından elde edilirken; eksplant başına sürgün sayısı ve petride gelişen toplam sürgün sayısı bakımından en yüksek değerler denemeye alınan üç çeşitte de ortam olarak MS ve katılaştırıcı olarak agarın kullanıldığı 7 günlük fidelerden alınan hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir.

Yıldız vd. (2005), son yıllarda sürgün rejenerasyonunu artırmada yaygın olarak kullanılan TDZ'nin (thidiazuron) keten hipokotil eksplantlarından sürgün gelişimi üzerine olan etkisini BAP ve NAA ile karşılaştırımışlardır. Özellikle gen aktarımı yapıldıktan sonra, gen aktarılmış dokulardan transgenik sürgünlerin rejenerasyonu son derece önemlidir. Başarılı bir gen aktarımı için adventif sürgün rejenerasyonunun ve özellikle de eksplant başına rejenere olan sürgün sayısının yüksek olması gerekmektedir. Keten hipokotil eksplantlarından yüksek adventif sürgün elde etmek için rejenerasyon ortamında yaygın olarak BAP ve NAA kullanılmaktadır. Farklı TDZ dozları (1, 2, 4 ve 8 mg/l) arasında; sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve petri başına toplam sürgün sayısı bakımından en uygun dozun 2 mg/l olduğu belirlenmiş ve TDZ dozları BAP ve NAA ile karşılaştırılmıştır.

Özgen vd. (2007), tuza toleranslı buğday ıslahında *in vitro* mutagenesis aracılığı ile kallus ve rejeneratif bitkilerden yararlanılarak, tuza toleranslı çeşit geliştirmede başlangıç materyali ya da gen kaynağı olarak kullanılabilecek rejenerantların elde edilmesi amacıyla yürüttükleri çalışmada, bitki materyali olarak tescilli 1 adet ekmeklik (*Triticum aestivum* L., Bezostaja 1) ve 1 adet makarnalık (*Triticum durum* Desf., Çakmak 79) buğday çeşidi kullanmışlardır. Araştırmada, tuz kaynağı olarak toprakta en çok bulunan NaCl kullanılmış, 0 dozu kontrol olarak değerlendirilmiş ve 4, 8, 12, 16, 20 g/l olmak üzere toplam 6 tuz dozunda tepkiler belirlenmiştir. Gama radyasyonu kullanılarak yapılan muamelelerde ise dozlar, embriyolar için 100, 200, 300, 400 ve 500 Gy; kalluslar için 30, 60, 90, 120 ve 150 Gy olarak belirlenmiştir. Çalışma sonunda 12, 16 ve 20 g/l'lik tuz dozları arasında her iki çeşitte de rejenere olan bitki sayısı bakımından en yüksek değerler 12 g/l tuz dozundan elde edilmiştir. Radyasyon dozlarında ise, en yüksek rejenere olan bitki sayısı Bezostaja 1 çeşidinde,

tohuma 100 Gy ve kallusa 30 Gy radyasyon dozu uygulamasından alınırken; Çakmak 79 çeşidinde tohuma 400 Gy ve kallusa 30 Gy radyasyon dozu uygulamasından elde edilmiştir.

De Klerk (2007), doğal şartlarda biyotik stres faktörü olan sıklığı, bitkiler arasındaki rekabetin temel nedeni olduğunu rapor etmiştir.

Abubaker (2008), yüksek bitki sıklığının fasulyede, su ve besin maddeleri için bitkiler arasında ortaya çıkan yüksek rekabet nedeniyle verimi düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Asghari vd. (2009), hindiba bitkilerinde yüksek sıklık nedeniyle bitkiler arasında ortaya çıkan rekabet sonucu daha fazla su alabilmek için kök çapının arttığını gözlemlemişlerdir.

Yıldız (2009), gama radyasyonundan yararlanılarak hücre ve dokularda fiziksel ve biyolojik değişikliklerin oluşturulması ve bu şekilde partikül bombardımanı yöntemi kullanılarak yapılan gen geçişlerinin ve bitki rejenerasyonunun artırılmasını hedeflendiği çalışmasında, öncelikle farklı gama kaynaklarının (Kobalt 60 ve Sezyum 137) ve bunlara ilişkin dozların bitki rejenerasyonuna olan etkisi belirlenmiş; uygun radyasyon kaynağı ve dozlar belirlendikten sonra partikül bombardımanı ve bitki rejenerasyonu çalışmalarına başlamıştır. Olgun embriyolardan kallus kültürü aracılığıyla bitki rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan her iki buğday çeşidinde (Bezostaja-1 ve Çakmak 79) de incelenen tüm karakterlerde en yüksek sonuçlar kontrol (0 Gy) uygulamasından alınmış, bunu 15 Gy'lik gama radyasyon dozu uygulaması izlemiştir. Gama radyasyon dozlarındaki artışa paralel olarak elde edilen sonuçlarda önemli düşüşler gözlenmiştir. 15 Gy'in üzerindeki gama radyasyon dozlarında sürgün rejenerasyonu görülse de herhangi bir bitkicik gelişimi olmamıştır. Araştırmada kullanılan her iki çeşitte de en yüksek sonuçların Kobalt 60 gama kaynağının kullanıldığı uygulamalardan elde edilmiştir. Sezyum 137 gama kaynağı kullanıldığında, incelenen tüm karakterlerden elde edilen sonuçlarda önemli düşüşler gözlenmiştir. 15

Gy'lik gama radyasyonu uygulamasında kallus ve embriyo eksplantları karşılaştırıldığında, tüm karakterlerde en yüksek sonuçların kallustan alındığı belirlenmiştir.

Yıldız vd. (2011), *in vitro* rekabet ve stresin *Linum usitatissimum* hipokotil eksplantlarının doku kültürü tepkisine olan etkilerini belirlemek için yaptıkları çalışmada, eksplantlar arasındaki rekabeti, eksplantların kültüre alındığı mesafeleri değiştirerek sağlamışlardır. 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 cm olarak dört farklı kültür mesafesinin kullanıldığı araştırmada, kültür başlangıcından 6 hafta sonra hipokotil yaş ve kuru ağırlıkları, sürgün rejenerasyon yüzdesi, hipokotil başına sürgün sayısı, rejenere sürgün uzunluğu, petride gelişen toplam sürgün sayısı ve toplam klorofil kapsamı belirlenmiştir. Sonuçlar, eksplantlar arasındaki kültür mesafesinin 2.0 cm'den 1.0 cm'ye düşürülerek onların rekabete teşvik edilmesinin hipokotil başına sürgün sayısını, rejenere olan sürgün uzunluğunu ve petrideki toplam sürgün sayısını önemli derecede artırdığını göstermiştir. Eksplantlar, 0.5 cm mesafede kültüre alındığında, stres başlamış ve bütün parametrelerde belirgin düşüşler gözlenmiştir. Bu araştırma, doku kültürü çalışmalarının başarısının yalnızca büyüme ortamındaki oksin ve sitokininlerin doğru konsantrasyon ve kombinasyonlarının belirlenmesiyle değil, aynı zamanda kültüre alınan eksplantlar arasındaki rekabetten yararlanılarak da artırılabileceği göstermiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler Sigma Chemical Co., Merck ya da Duchefa'dan temin edilmiştir.

3.2 Bitki Materyali

Çalışmada bitki materyali olarak Türkiye'de halen yetiştirilmekte olan ve daha önce *in vitro* çalışmalarda başarılı sonuçlar veren, tescilli 1 adet ekmeklik (*Triticum aestivum* L. – Bezostaja-1) ve 1 adet makarnalık (*Triticum durum* Desf. - Çakmak 79) buğday çeşidi kullanılmıştır.

3.3 Metot

3.3.1 Büyüme ortamı ve kültür koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962, Çizelge 3.1) ile %3 sukroz içeren ve %0.7'lik agar (Type A) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MS0) kullanılmıştır. Ortam hazırlığında distile saf su kullanılmış, gerektiğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilâve edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı (27 μmol m^{-2} s^{-1}) altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 24°C'de tutulmuştur. Her muamele, içerisinde 11 adet eksplantın bulunduğu 4 tekerrürlü 100x10 mm'lik petri kutularından oluşmuştur.

Çizelge 3.1 MS (Murashige ve Skoog) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

Ortamda Bulunan Maddeler		**Konsantrasyonu (mg/l)**
Makro Elementler	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$CaCl_2.2H_2O$	440
	$MgSO_4.7H_2O$	370
	KH_2PO_4	170
Mikro Elementler	Kl	0.83
	H_3BO_3	6.2
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
	$FeSO_4.7H_2O$	27.8
	$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3
Vitaminler	Inisitol	100
	Nicotinic Acid	0.5
	Pyridoxine-HCl	0.5
	Thiamine-HCl	0.1
	Glycine	2

3.3.2 Tohum yüzey sterilizasyonu ve embriyo izolasyonu

Yüzey sterilizasyonu yapılacak tohumlar manyetik karıştırıcıda etil alkolde (%70) 5 dakika bekletilerek 3 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra, 25 dakika ticari çamaşır suyunda (%5 sodyum hipoklorit içeren) çalkalanıp 6-7 kez steril saf su ile durulanmıştır. Steril tohumlar, +4°C'de yaklaşık 24 saat bekletilerek, embriyoların kolayca ayrılması sağlanmıştır. Steril edilen tohumların embriyoları steril kabin içerisinde bistüri yardımıyla dikkatlice tohumdan ayrılarak skutellum kısmı aşağı gelecek şekilde besin ortamına yerleştirilmiştir.

3.3.3 Kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu, köklenmiş bitkicik elde edilmesi ve toprakta bitki gelişimi

Kallus oluşumu için steril tohumlardan izole edilen embriyolar, sürgün rejenerasyonu için embriyolardan gelişen kalluslar, köklendirme için kalluslardan oluşan rejenere

sürgünler ve bitki gelişimi için de köklenmiş bitkicikler 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 cm aralık mesafelerde kültüre alınarak eksplantların aralarında rekabete girmeleri teşvik edilmiştir.

Kültürler kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamında ve 25±1°C'de karanlık inkübatörde 14 gün bırakılmış, bu süre sonunda kallus oluşum yüzdesi ve kallus ağırlıkları belirlenmiştir.

Oluşan kalluslar sürgün rejenerasyonu için 2,4-D'siz MS ortamına aktarılarak kültür odasına yerleştirilmiş, 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyotta ve 25±1°C sıcaklıkta 4 hafta süreyle tutulmuştur. Rejenerasyon sonunda yüzde cinsinden kallusun rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkinliği ile eksplant başına rejenere sürgün sayısı belirlenmiştir.

Rejenerasyon sonrası 10-15 mm uzunluğa ulaşan rejenere sürgünler kültür odasında hormonsuz MS besin ortamı içeren Magenta kaplarında köklendirmeye alınmıştır. Sürgünler köklendirme aşamasında 4 hafta tutulmuş ve daha sonra bitkicik ve kök uzunlukları, bu bitkiciklerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri belirlenmiştir.

Köklendirme sonrası gelişen bitkicikler saksılarda 8 hafta süreyle büyümeye alınmıştır. Gelişen bitkilerde boy, bayrak yaprağı genişliği ile bayrak yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri tespit edilmiştir.

3.3.4 Klorofil kapsamının belirlenmesi

Kallustan gelişen bitkiciklerin ve toprakta gelişen bitkilerin yapraklarında klorofil a, kolorofil b ve toplam klorofil içerikleri Curtis ve Shetty (1996) tarafından bildirilen protokol kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için, 50 mg yeşil materyal, 3 ml metanol içine konularak 23°C'lik sıcaklıktaki karanlık ortamda 2 saat süreyle tutulmuş ve yeşil materyalde bulunan klorofilin metanol içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda sıvı kısımdan (klorofil içeren metanol) 1.5 ml alınarak 650 ve 665

nm'de spektrofotometre aracılığıyla optik yoğunluğu (OD) ölçülmüş ve klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarları "µg klorofil/g taze doku" cinsinden belirlenmiştir.

3.4 İstatistiksel Değerlendirmeler

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekrarlamadan oluşmuştur. Elde edilen veriler "SPSS for Windows" programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuş, muamele ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerlere istatistik analizinden önce arcsin ($\sqrt{X}$) transformasyonu uygulanmıştır (Snedecor ve Cochran 1967).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Araştırmada Çakmak 79 ve Bezostaja-1 buğday çeşitlerinde farklı aralık mesafelerde (0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 cm) kültüre alınan eksplantlarda kallus aşamasında kallus oluşum yüzdesi ve kallus ağırlığı; rejenerasyon aşamasında kallusun rejenerasyon kapasitesi, kültür etkinliği ve rejenere olan sürgün sayısı; köklenme ve bitkicik gelişim aşamasında gelişen bitkicik sayısı, bitkicik uzunluğu, kök uzunluğu, bitkiciklerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları; toprakta gelişim aşamasında ise bayrak yaprağı genişliği, bitki boyu, gelişen bitkilerin bayrak yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamlarına ait ölçümler yapılmıştır.

4.1 Çakmak 79 Makarnalık Buğday Çeşidinin Olgun Embriyolarından Kallus Oluşumu, Sürgün Rejenerasyonu ve Bitki Elde Edilmesi

14 gün sonunda Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidine ait olgun embriyolardan elde edilen kallusların oluşumu %98.89 ve kallus ağırlığının 0.114 g ile en çok 0.5 cm mesafede kültüre alınan eksplantlardan elde edildiği görülmektedir (Çizelge 4.1).

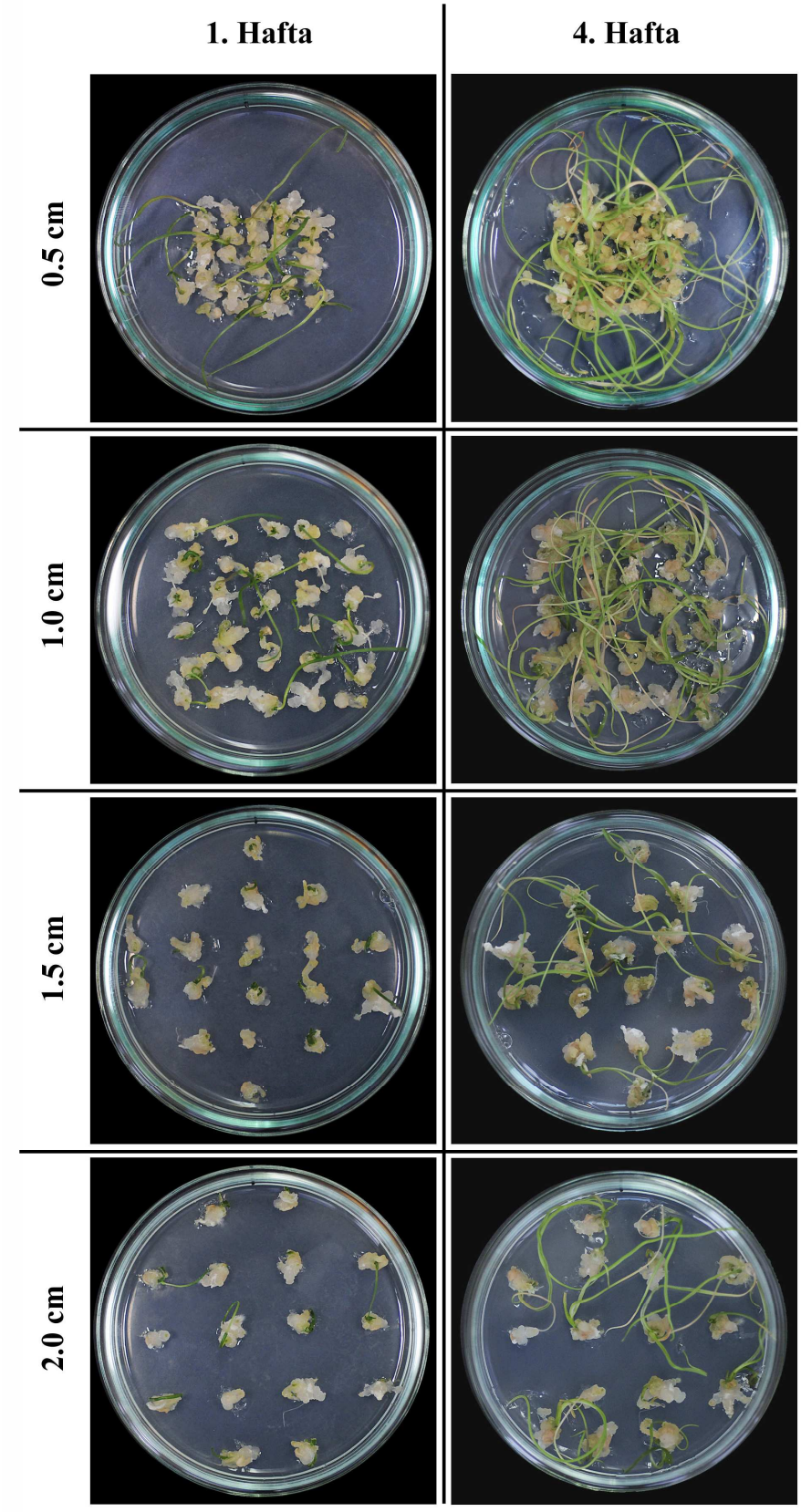
Farklı aralık mesafelerde kültüre alınan eksplantların rejenerasyon aşamasında ise kallusun rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkinliği yüzdeleri incelendiğinde, en yüksek değerler 0.5 cm aralıkta görülürken, en düşük değerler 2.0 cm aralıkta ölçülmüştür. Rejenerasyon aşamasında, artan mesafelerle birlikte rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkinliği yüzde değerlerinde düşüşler gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Rejenere olan sürgün sayısına bakıldığında, en yüksek değerin 23.33 adet ile 1.0 cm'lik aralık mesafeden alındığı görülmektedir. Bu aralık mesafesinin altında (0.5 cm) ve üzerinde (1.5 ve 2.0 cm) alınan sonuçların düştüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1, 4.2).

Köklendirme ortamına aktarılan rejenere sürgünlerden gelişen en yüksek bitkicik sayısı, bitkicik uzunluğu ve bitkicik kök uzunluğu 17.33 adet, 21.53 cm ve 7.69 cm ile 1.0 cm aralık mesafeden alınmıştır. Daha düşük ve daha yüksek aralık

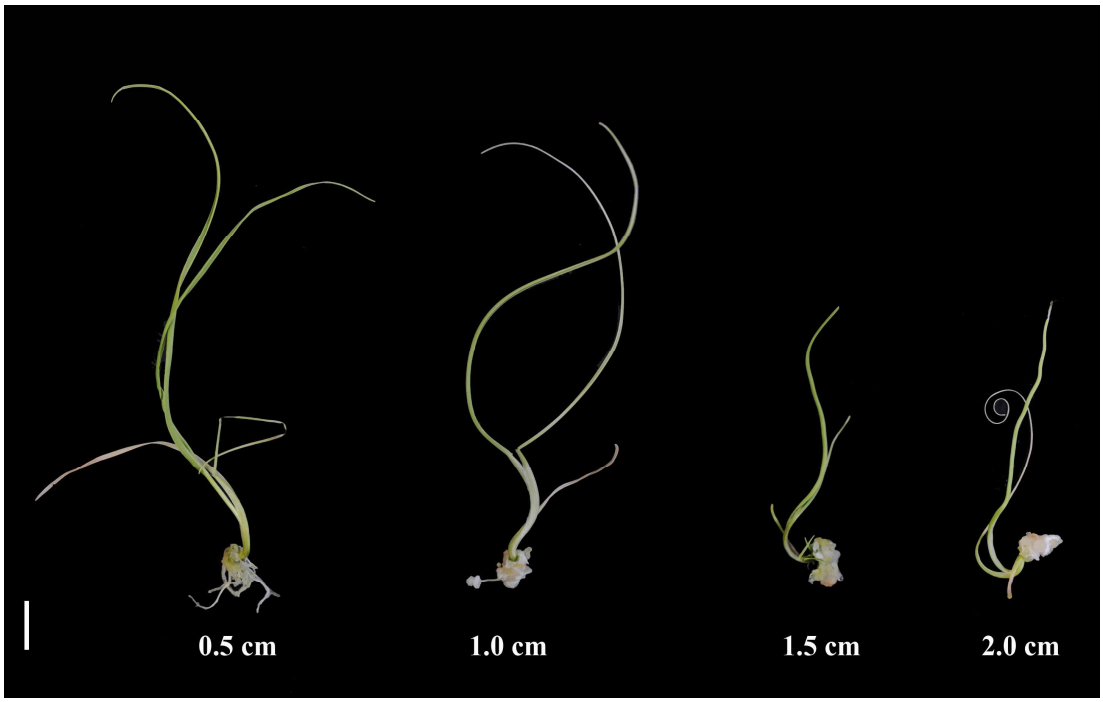
mesafelerinde alınan sonuçların düşüş gösterdiği görülmüştür (Çizelge 4.1, Şekil 4.3, 4.4).

Köklenme ve bitkicik gelişim aşamasının sonunda (kültür başlangıcından 10 hafta sonra) Magenta kaplarında gelişen bitkiciklerde yapılan klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil analiz sonuçlarına bakıldığında, en yüksek değerlerin 1.5 cm aralıkta sırasıyla 783.97, 282.61 ve 567.82 µg klorofil/g taze doku olarak elde edilmiştir.

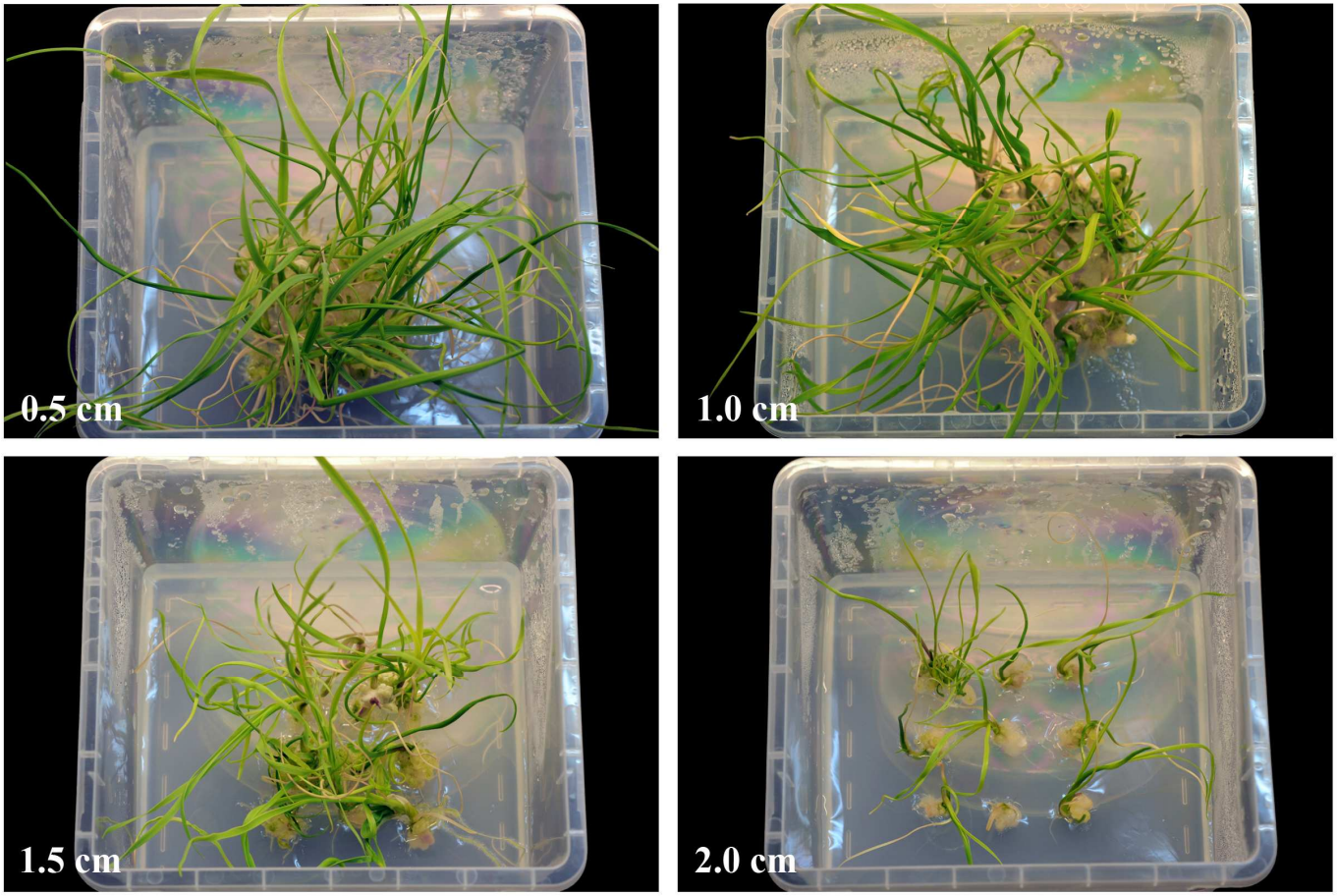
Toprakta gelişen bitkilerin bayrak yaprak genişliği ve bitki boyu bakımından en yüksek değerler 0.78 cm ve 39.2 cm olarak 1.0 cm aralık mesafeden elde edilmiştir. Bitkilerde yapılan klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil analiz sonuçlarına bakıldığında, 1.0 cm aralıkta sırasıyla 1287.83, 781.89 ve 1016.11 değerleri hesaplanmış ve diğer tüm aralık mesafeleri içerinde en yüksek değerler elde edilmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.5).



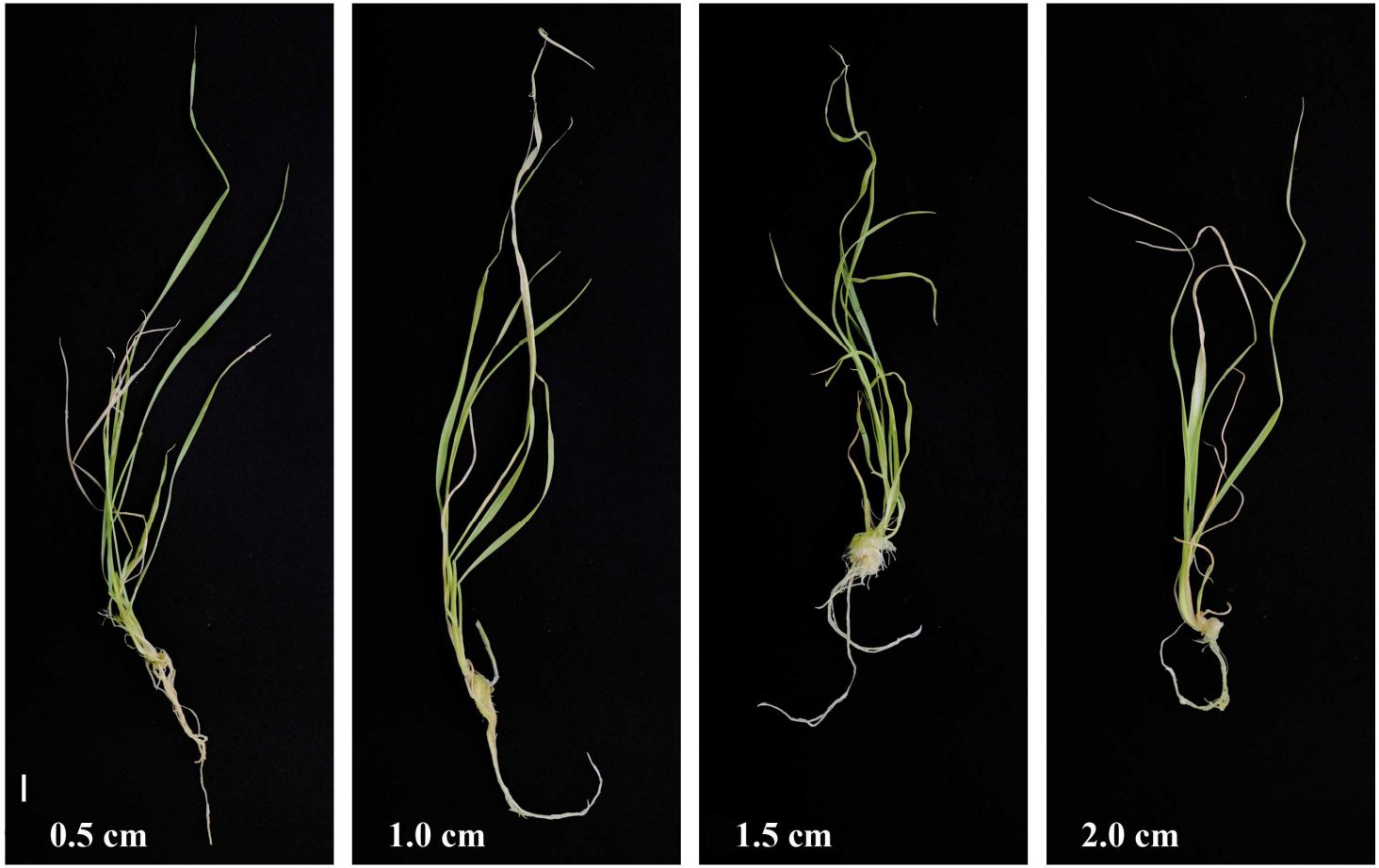
Şekil 4.1 Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyolardan kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu



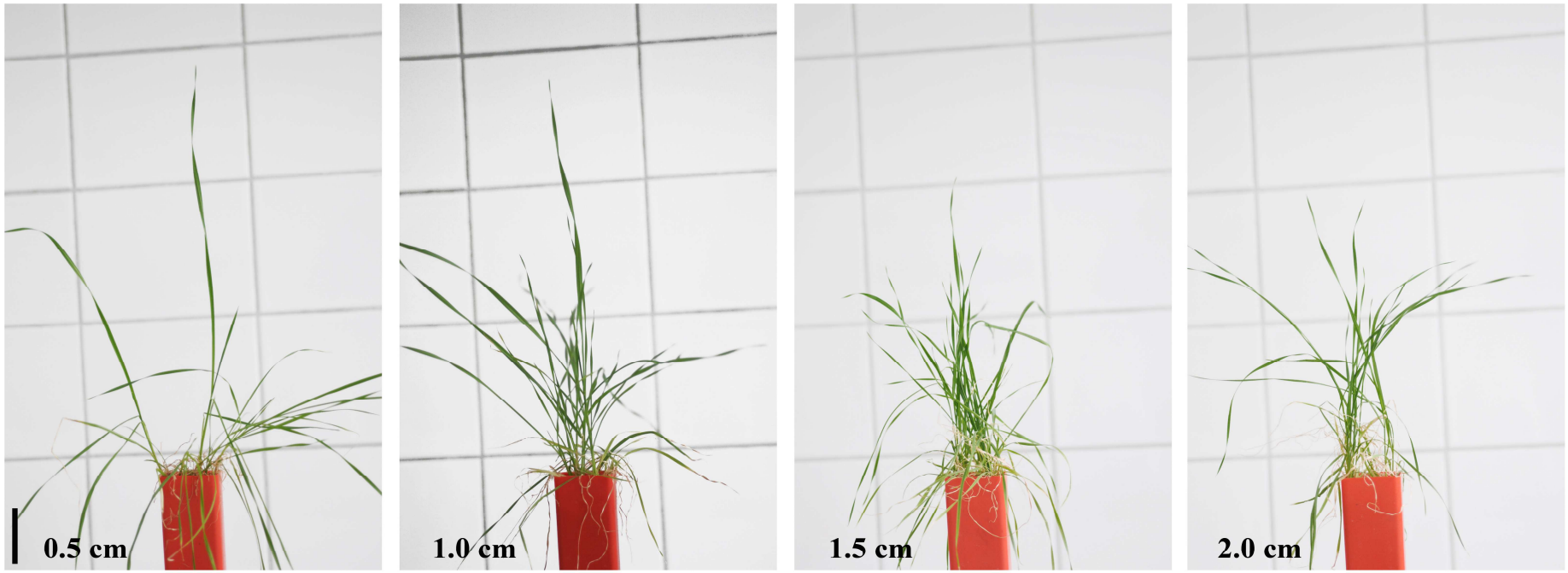
Şekil 4.2 Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyolardan sürgün gelişimi (Bar = 1 cm)



Şekil 4.3 Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde köklendirme ortamında gelişen sürgünler



Şekil 4.4 Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde köklendirme ortamında gelişen bitkicikler (Bar = 1 cm)



Şekil 4.5. Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde köklenmiş bitkiciklerin farklı aralık mesaferlerde toprakta gelişimi (Bar = 5 cm)

Çizelge 4.1 Çakmak 79 makarnalık buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyolardan kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu

Aralık Mesafe (cm)	Kallus Aşaması		Rejenerasyon Aşaması			Köklenme ve Bitkicik Gelişim Aşaması					
	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi[1] (%)	Kültür Etkinliği[2] (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Bitkicik Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)	Klorofil a (µg klorofil/g taze doku)	Klorofil b (µg klorofil/g taze doku)	Toplam Klorofil (µg klorofil/g taze doku)
0.5	98.89	0.114	78.66	77.78 a	19.66 a	14.67 a	17.60	6.82	490.00 b	196.63 ab	372.19 b
1.0	94.45	0.087	72.31	67.78 ab	23.33 a	17.33 a	21.53	7.69	633.95 ab	232.84 a	462.89 ab
1.5	98.15	0.104	68.08	66.67 ab	12.66 b	9.33 b	18.62	6.19	783.97 a	282.61 a	567.82 a
2.0	97.92	0.107	61.81	60.42 c	10.66 b	8.33 b	18.03	6.15	565.58 b	133.87 b	361.58 b

[1] Rejenere olan kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100
[2] Rejenere olan kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.2 Çakmak 79 ekmeklik buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyoların kalluslarından oluşan bitkiciklerin farklı aralık mesafelerde toprakta gelişimi

Aralık Mesafe (cm)	Bayrak Yaprağı Genişliği (cm)	Bitki Boyu (cm)	Klorofil a (µg klorofil/g taze doku)	Klorofil b (µg klorofil/g taze doku)	Toplam Klorofil (µg klorofil/g taze doku)
0.5	0.55 b	37.1 ab	823.11 b	322.29 b	618.28 c
1.0	0.78 a	39.2 a	1287.83 a	781.89 a	1016.11 a
1.5	0.42 c	34.9 ab	1139.90 a	461.71 ab	859.29 b
2.0	0.48 bc	30.9 b	523.81 c	148.85 b	353.13 d

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

4.2 Bezostaja-1 Ekmeklik Buğday Çeşidinin Olgun Embriyolarından Kallus Oluşumu, Sürgün Rejenerasyonu ve Bitki Elde Edilmesi

Kültür başlangıcından 14 gün sonra Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidine ait olgun embriyolarda kallus oluşumu %100 ve kallus ağırlığı 0.074 g ile en yüksek 1.5 cm mesafede kültüre alınan eksplantlardan elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

Rejenerasyon aşamasında ise kallusun rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkinliği yüzdeleri bakımından en yüksek değerler 0.5 cm, 1.0 cm ve 2.0 cm mesafelerde %100 olarak görülürken, en düşük 1.5 cm aralıkta sırasıyla %94.95 ve %88.89 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.3).

Rejenere olan sürgün sayısına bakıldığında, en yüksek değerin 20.67 adet ile 1.0 cm'lik aralık mesafeden alındığı görülmektedir. Bu aralık mesafesinin altında (0.5 cm) ve üzerinde (1.5 ve 2.0 cm) alınan sonuçların düştüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyolardan kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu

Aralık Mesafe (cm)	Kallus Aşaması		Rejenerasyon Aşaması			Köklenme ve Bitkicik Gelişim Aşaması					
	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Kallusun Rejenerasyon Kapasitesi[1] (%)	Kültür Etkinliği[2] (%)	Rejenere Olan Sürgün Sayısı	Gelişen Bitkicik Sayısı	Bitkicik Uzunluğu (cm)	Kök Uzunluğu (cm)	Klorofil a (µg klorofil/g taze doku)	Klorofil b (µg klorofil/g taze doku)	Toplam Klorofil (µg klorofil/g taze doku)
0.5	93.39	0.070 ab	100.00 a	100.00 a	10.67 b	3.66 b	6.07 b	7.01 b	481.13 c	293.43 b	340.62 c
1.0	96.67	0.066 b	100.00 a	100.00 a	20.67 a	9.66 a	10.00 a	12.25 a	633.34 b	298.82 a	488.72 b
1.5	94.45	0.074 a	94.45 b	88.89 b	9.67 b	5.00 b	5.93 b	5.93 bc	890.54 a	300.22 a	627.31 a
2.0	100.00	0.057 c	100.00 a	100.00 a	7.00 b	3.33 b	5.65 b	3.85 c	511.47 c	172.65 b	360.32 c

[1] Rejenere olan kallus sayısı / Kallus oluşturanların sayısı x 100
[2] Rejenere olan kallus sayısı / Kültüre alınan embriyo sayısı x 100
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Köklendirme ortamına aktarılan rejenere sürgünlerden gelişen en yüksek bitkicik sayısı, bitkicik uzunluğu ve bitkicik kök uzunluğu 9.66 adet, 10.00 cm ve 12.25 cm ile 1.0 cm aralık mesafeden alınmıştır. Daha düşük ve daha yüksek aralık mesafelerinde alınan sonuçların düşüş gösterdiği görülmüştür (Çizelge 4.3).

Köklenme ve bitkicik gelişim aşamasının sonunda (kültür başlangıcından 10 hafta sonra) Magenta kaplarında gelişen bitkiciklerde yapılan klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil analiz sonuçlarına bakıldığında, en yüksek değerlerin 1.5 cm aralıkta sırasıyla 890.54, 300.22 ve 627.31 µg klorofil/g taze doku olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.4 Bezostaja-1 ekmeklik buğday çeşidinde farklı aralık mesafelerde kültüre alınan olgun embriyoların kalluslarından oluşan bitkiciklerin farklı aralık mesafelerde toprakta gelişimi

Aralık Mesafe (cm)	Bayrak Yaprağı Genişliği (cm)	Bitki Boyu (cm)	Klorofil a (µg klorofil/g taze doku)	Klorofil b (µg klorofil/g taze doku)	Toplam Klorofil (µg klorofil/g taze doku)
0.5	0.45 c	37.1 bc	741.57 c	219.04 b	495.80 b
1.0	0.86 a	43.4 a	1342.41 a	447.91 a	941.03 a
1.5	0.68 b	41.2 ab	1125.47 ab	413.47 a	821.87 a
2.0	0.60 bc	32.4 c	906.96 bc	427.20 a	743.54 a

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Toprakta gelişen bitkilerin bayrak yaprak genişliği ve bitki boyu bakımından en yüksek değerler 0.86 cm ve 43.4 cm olarak 1.0 cm aralık mesafeden elde edilmiştir. Bitkilerde yapılan klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil analiz sonuçlarına bakıldığında, 1.0 cm aralıkta sırasıyla 1342.41, 447.47 ve 941.03 µg klorofil/g taze doku değerleri hesaplanmış ve diğer tüm aralık mesafeleri içerinde en yüksek değerler elde edilmiştir (Çizelge 4.4).

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bitki doku kültürü tekniklerinin bitki ıslahında kullanılabilmesi için etkili bir rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi gerekir. Olgunlaşmamış embriyolar buğdaygillerde rejenerasyon için en çok kullanılan eksplantlardır (Dale ve Deambrogio 1979, Goldstein ve Kronstad 1986, Tuchisawa vd. 1986). Ancak, olgunlaşmamış embriyoların yıl boyunca bulunmasının ve kültür için uygun safhasının yakalanmasının zorluğu, bu eksplantların kullanım şansını sınırlamaktadır. Diğer taraftan, olgun embriyolar zaman sınırlaması olmadan yıl boyunca her an kullanılabilmektedir. Son zamanlarda buğdayda olgun embriyoların kültürü ve sürgün rejenerasyonu başarıyla sağlanmıştır. Kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu genotip ve kültür ortamından önemli derecede etkilenmektedir (Hanzel vd. 1985).

Bitkiler kendi aralarında toprak üzerinde yaprak ve saplarıyla ışık için, toprak altında da kökleriyle su ve besin maddesi için rekabet etmektedirler (Wilson 1988, McPhee ve Aarssen, 2001). Biyotik stres faktörü olarak sıklık, doğal şartlarda bitkiler arasındaki rekabetin temel sebebidir (De Klerk 2007). Stoffella ve Bryan (1988), bitki sıklığının birçok sebzede bitki gelişimini ve verimi etkilediğini, Morgade ve Willey (2003), bitki sıklığı arttıkça meyve veriminin de arttığını tespit etmişlerdir. Artan bitki sıklığı nedeniyle su ve besin maddeleri bakımından bitkiler arasında ortaya çıkan rekabet nedeniyle biberde (Daşgan ve Abak 2003) ve fasulyede (Abubaker 2008) verimin düştüğü tespit edilmiştir.

Araştırmada Çakmak 79 ve Bezostaja-1 buğday çeşitlerinde farklı aralık mesafelerde (0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 cm) kültüre alınan eksplantlar arasında ortaya çıkan rekabet ve stresin olgun embriyolardan kallus oluşumu, sürgün rejenerasyonu ve bitki gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir.

Araştırma sonuçları incelendiğinde, her iki çeşitte de benzer sonuçların alındığı görülmektedir. Rejenere olan sürgün sayısı, gelişen bitkicik sayısı, bitkicik uzunluğu, bitkiciklerde kök uzunluğu ile toprakta gelişen bitkilerde bayrak yaprağı genişliği, bitki boyu, klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarlarında en yüksek değerlerin

1.0 cm aralık mesafeden alındığı görülmektedir. Bu sonuçlar dikkate alındığında, 1.0 cm'lik aralık mesafede eksplantlar arasında ortaya çıkan rekabetin incelenen parametrelerde önemli artışlara neden olduğu söylenebilir. 0.5 cm'lik aralık mesafede kültüre alınan eksplantlar, ortamdaki yetersiz su ve besin maddesi nedeniyle strese girmekte, sonuçta incelenen karakterler bakımından düşük sonuçlar alınmaktadır. Nitekim, Abubaker (2008), yüksek bitki sıklığının fasulyede, su ve besin maddeleri için bitkiler arasında ortaya çıkan yüksek rekabet nedeniyle verimi düşürdüğünü rapor etmiştir. Yıldız vd. (2011), keten hipokotil eksplantlarının farklı aralık mesafelerde doku kültürü tepkisini önemli ölçüde etkilediğini bildirmişlerdir. Araştırıcılar, besin ortamı içerisindeki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyon ve kombinasyonları değiştirilmeden, yalnızca eksplantları rekabete sokmakla adventif sürgün rejenerasyonunun önemli derecede artırılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Yaprak klorofil kapsamı, bitki büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynayan (Yang vd. 2010) fotosentetik kapasitesinin bir göstergesi (Emerson 1929, Pal ve Laloraya 1972, Wright vd. 1994, Nageswara vd. 2001) olup, dokudaki miktarı stress şartları altında değişmektedir (Rensburg ve Kruger 1994, Kyparissis vd. 1995, Jagtap vd. 1998). Köklenme ve bitkicik gelişim aşamasında her iki çeşitte de klorofil kapsamları bakımından en yüksek değerler 1.5 cm'lik aralık mesafeden alınmış, bunu 1.0 cm'lik aralık mesafe izlemiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.3). Bunun muhtemel sebebi, 1.0 cm'lik aralık mesafede fazla sayıda bulunan sürgünlerin birbirlerini gölgelemesidir. Nitekim, Fleischer (1935), fotosentezin gerçekleştiği kloroplastların klorofil kapsamlarının ışık şiddetiyle değiştiğini bildirmiştir. Toprakta bitkicik gelişimi aşamasında ise klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarları bakımından en yüksek değerler, 1.0 cm'lik aralık mesafede kültüre alınan uygulamalardan elde edilmiştir. Bu mesafede, kültüre alınan eksplantlar arasında ortaya çıkan rekabet nedeniyle klorofil kapsamları bakımından en yüksek değerler alınmıştır.

Bu tez, *in vitro* doku kültürü çalışmalarında eksplantlar arasında ortaya çıkan rekabet ve stresin, iki buğday çeşidinin (Çakmak 79 ve Bezostaja-1) olgun embriyo eksplantlarından kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerinin

incelendiği bir çalışmadır. Araştırma sonuçları, bitki doku kültürü çalışmalarında en uygun eksplantın ve büyüme düzenleyicilerinin en etkili konsantrasyon ve kombinasyonlarının belirlenmesinin, sürgün rejenerasyon frekansının artırılmasında yalnız başına yeterli olmadığını, eksplantları rekabete teşvik etmekle sürgün rejenerasyon frekansının önemli derecede artırılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

Abubaker, S. 2008. Effect of plant density on flowering date, yield and quality attribute of bush beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under center pivot irrigation system. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 3, 666-668.

Asghari, M.T., Daneshian, J. and Farahani, A.A. 2009. Effects of drought stress and planting density on quantity and morphological characteristics of chicory (*Cichorium intybus* L.). Asian Journal of Agricultural Sciences 1, 12-14.

Curtis, O.F. and Shetty, K. 1996. Growth medium effects on vitrification, total phenolics, chlorophyll, and water content of *in vitro* propagated oregano clones. Acta Horticulture 426, 498-503.

Dale, P.J. and Deambrogio, E. 1979. A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordeum vulgare*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 94, 65-77.

Daşgan, H.Y. and Abak, K. 2003. Effects of plant density and number of shoots on yield and fruit characteristics of peppers grown in glasshouses. Turk. J. Agric. For. 27, 29-35.

De Klerk, G.J. 2007. Stress in plants cultured *in vitro*. Propagation of Ornamental Plants 7(3), 129-137.

Emerson, R. 1929. Chlorophyll content and the rate of photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 15(3), 281-284.

Fleischer, W.E. 1935. The relation between chlorophyll content and rate of photosynthesis. The Journal of General Physiology 18(4), 573-597.

Goldstein, C.S. and Kronstad, W.E. 1986. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare* L. Theoretical and Applied Genetics 71, 631-636.

Hanzel, J.J., Miller, J.P., Brinkmann, M.A. and Fendos, E. 1985. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. Crop Science 25, 27-31.

Jagtap, V., Bhargava, S., Sterb, P. and Feierabend, J. 1998. Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. J. Exp. Bot. 49, 1715-1721.

Karadimova, M. and Djambova, G. 1993. Increased NaCl-tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf.) through *in vitro* selection, In vitro Cell. Dev. Biol. 29, 180-182.

Kintzios, S.E., Barberaki, M., Aivalakis, G., Drossopoulus, J. and Holevas, C.D. 1997. *In vitro* morphogenetic responses of mature wheat embryos to different NaCl concentrations and growth regulator treatments. Plant Breeding 116, 113-118.

Kyparissis, A., Petropoulou, Y. and Manetas, Y. 1995. Summer survival of leaves in a soft-leaved shrub (*Phlomis fruticosa* L., Labiatae) under Mediterranean field conditions: Avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents. J. Exp. Bot. 46, 1825-1831.

McPhee, C.S. and Aarssen, L.W. 2001. The seperation of above- and below-ground competion in plants. A review and critique of methodology. Plant Ecol. 152, 119-136.

Morgade, L. and Willey, R. 2003. Effect of plant population and nitrogen fertilizer on yield and efficiency of maize/bean intercropping. Pesq. Agropec. Bras. Brasilia 38, 1257-1264.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497.

Nageswara, R.R.C., Talwar, H.S. and Wright, G.C. 2001. Rapid assessment of specific leaf area and leaf nitrogen in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using chlorophyll meter. J. Agron. Crop Sci. 189, 175-182.

Özcan, S. ve Özgen, M. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. Kükem Dergisi, 1: 69-95.

Özgen, M., Türet, M., Altınok, S. and Sancak, C. 1998. Efficient calluc induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Plant Cell Reports 18, 331-335.

Özgen, M., Yıldız, M. ve Yıldız, Ç. 2007. Kışlık Buğdayda (*Triticum* sp.) *In vitro* Mutagenesiz Aracılığıyla Tuza Toleranslı Rejenerantların Seçimi, TÜBİTAK, Proje No: 104O494.

Pal, R.N. and Laloraya, M.M. 1972. Effect of calcium levels on chlorophyll synthesis in peanut and linseed plants. Biochem. Physiol. Pflanezen. 163, 443-449.

Rensburg, L.V. and Kruger, G.H.J. 1994. Evaluation of components of oxidative stres metabolism for use in selection of drought tolerant cultivars of *Nicotiana tabacum* L. J. Plant Physiol. 143, 730-737.

Sayar, M., Birsin, M.A., Ulukan, H. and Özgen, M. 1999. Effect of seed size on the tissue culture response of callus from mature embryos of wheat species. Wheat Information Service 89, 1-6.

Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa, USA.

Stoffella, P.J. and Bryan, H.H. 1988. Plant population influences growth and yields of bell pepper. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113, 835-839.

Tuchisawa, M., Enomoto, S. and Ohyama, K. 1986. Plant regeneration from callus of immature barley embryos. Japanase Journal of Breeding 36, 28-29.

Vasil, I.K. 1998. Biotechnology and food security for 21st century: A real-world perspective, Nature Biotechnology 16, 399-400.

Wilson, J.B. 1998. Shoot competition and root competition. J. Appl. Ecol. 25, 279-296.

Wright, G.C., Nageswara, R.R.C. and Farquhar, G.D. 1994. Water use efficiency and carbon isotope discrimination in peanut under water deficit conditions. Crop Sci. 34, 92-97.

Yang, X., Wang, X. and Wei, M. 2010. Response of photosynthesis in the leaves of cucumber seedlings to light intensity and CO_2 concentration under nitrate stress. Turk. J. Bot. 34, 303-310.

Yıldız, M., Ulukan, H. ve Özbay, A. 2003. Ketende (*Linum usitatissimum* L.) farklı ortam, katılaştırıcı ve eksplant yaşının hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi. XIII. Biyoteknoloji Kongresi. 137-144, Çanakkale.

Yıldız, M., Koyuncu, N. ve Özgen, M. 2005. Adventitious shoot regeneration from hypocoty explants of flax (*Linum usitatissimum* L.). Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi. 369-373, Antalya.

Yıldız, Ç. 2009. Gamma radyasyonunun buğdayda (*Triticum* sp.) partikül bombardımanı tekniği ile gen aktarımına ve bitki rejenerasyonuna etkisi.

Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı.

Yıldız, M., Sağlık, Ç., Telci, C. and Erkılıç, E.G. 2011. The effect of *in vitro* competition on shoot regeneration from hypocotyl explants of *Linum usitatissimum*. Turk. J. Bot. 35, 211-218.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Seda PELİT

Doğum Yeri : Yalova

Doğum Tarihi : 04/06/1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Çınarçık Firuzan Kınal lisesi, 2003

Lisans : Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, 2009

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 2011

Yayınları:

Telci, C., Yıldız, M., **Pelit, S.**, Onol, B., Erkılıç, E.G. and Kendir, H. 2011. The effect of surface-disinfection process on dormancy-breaking, seed germination, and seedling growth of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. under *in vitro* conditions. Propagation of Ornamental Plants 11, 10-16.

Yıldız, M., **Pelit, S.**, Telci, C., Koçak, N., Onol, B. ve Erkılıç, E.G. 2011. *In vitro* şartlar altında kültüre alınan eksplant yoğunluğunun doku kültürü tepkisi üzerine etkisi. Uluslararası Katılımlı 1. Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi ve Fuarı, Nisan 27-30, s. 126, Eskişekir.

Yıldız, M., Erkılıç, E.G., Telci, C., **Pelit, S.**, Doğan, M. ve Özcan, S. 2011. *In vitro* tuz stresinin ketende (*Linum usitatissimum* L.) çimlenme, fide gelişimi ve klorofil kapsamı üzerine etkisi. Uluslararası Katılımlı 1. Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi ve Fuarı, Nisan 27-30, ss. 2677-2683, Eskişekir.