



**BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) SOMATİK
EMBRİYOGENESİSE EPİGENETİK
İNHİBİTÖRLERİN ETKİSİ**

Sümevra UÇAR

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Murat AYDIN
2021
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

**BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) SOMATİK EMBRİYOGENESİSE EPIGENETİK
İNİHİTÖRLERİN ETKİSİ**

(Effects of Epigenetic Inhibitors on Somatic Embryogenesis in Wheat (*Triticum aestivum* L.))

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SümeYra UÇAR

Danışman: Doç. Dr. Murat AYDIN

Erzurum
Ağustos, 2021

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) SOMATİK EMBRİYOGENESİSE EPIGENETİK
İNHİBİTÖRLERİN ETKİSİ**

Doç. Dr. Murat AYDIN danışmanlığında, Sümeyra UÇAR tarafından hazırlanan bu çalışma, 18/08/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Doç. Dr. Murat AYDIN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Emre İLHAN <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi (BAP) projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2019-7168



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Doç. Dr. Murat AYDIN danışmanlığında sunulan “Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Somatik Embriyogenesise Epigenetik İnhibitörlerin Etkisi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	9	30
Kuramsal Temeller	1	30
Materyal ve Yöntem	10	35
Bulgular	13	20
Tartışma	3	20
Tezin Geneli	8	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Sümeysra UÇAR	Doç. Dr. Murat AYDIN
26.8.2021	26.8.2021
İmza:	İmza:
Aslı Islak İmzalıdır	Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bitkisel Biyotknoloji Laboratuvarı, Tarla Bitkileri Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı ve Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Tez çalışmamı destekleyen üniversitemiz BAP birimine teşekkür ederim.

Teşekkürlerin az kalacağı, değerli bilgilerini benimle paylaşan, her konuda yanımda olan, kıymetli zamanından bana ayırıp büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilecek ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donatan, yardım ve katkılarından dolayı başta saygıdeğer tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Murat AYDIN'a teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarımı yürüttüğümde, bana laboratuarlarında çalışma imkânı sunan sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a ve sayın Prof. Dr. Kâmil HALİLOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve bilgileriyle yol gösteren sayın Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR'a ve sayın Doç. Dr. Emre İLHAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda yardımlarından dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Esra ARSLAN'a, Araş. Gör. Esma YİĞİDER'e ve Araş. Gör. Merve YÜCE'ye teşekkür ederim.

Bana yaşamım boyunca güvenip desteklerini bir an bile esirgemeyen her zaman destekçim olan tüm aile üyelerime ve hep yanımda olan kıymetli arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sümeysa UÇAR

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) SOMATİK EMBRİYOGENESİSE EPIGENETİK İNHİBİTÖRLERİN ETKİSİ

SümeYra UÇAR

Danışman: Doç. Dr. Murat AYDIN

Amaç: Somatik embriyogenesis (SE), bitkilerin genetik iyileştirilmesinde güçlü bir araçtır. Epigenetik mekanizmalar, farklı genler tarafından kontrol edilen somatik embriyogenesis sırasındaki kritik faktörlerdir. Bu çalışmanın amacı epigenetik inhibitör olan TSA ve 5-Azac kimyasallarının ekmeklik buğdayda olgun embriyo kaynaklı SE üzerine ve SE’de rol alan bazı genlerin (WOX4, LEC1, BBM1 ve TaSERK) ifadesine etkilerini belirlemektir.

Yöntem: Kırık ekmeklik buğday çeşidinin olgun embriyoları TSA (0,1, 0,5, 1 ve 2 μ M) ve 5-Azac (5, 10, 20 ve 30 μ M) kimyasallarının farklı dozlarını içeren kallus oluşum ortamında (kontrol) (MS temel besi ortamı + 12 mg/l dikamba + 0,5 mg/l IAA) kültüre alınmış ve kallus ağırlığı (mg), kallus oluşum oranı (%), embriyogenik kallus oluşum oranı (%), cevap veren embriyogenik kallus oranı (%) ve eksplant başına rejenere bitki sayısı (adet) ile 14, 28 ve 42 günlük kalluslarda WOX4, LEC1, BBM1 ve TaSERK genlerinin mRNA ifade seviyeleri tespit edilmiştir.

Bulgular: Araştırmada biri kontrol olmak üzere TSA ve 5-Azac kimyasallarının farklı dozlarından oluşan uygulamaların *in vitro* parametrelere etkisinin çok önemli olduğu belirlenmiştir. İncelenen genlerin mRNA ifade seviyelerinin kallus yaşına ve uygulamalara göre değiştiği tespit edilmiştir. Yine, araştırmada, LEC1 geninin mRNA ifade seviyesinin en fazla 42 günlük kalluslarda; WOX4 ve BBM1 genlerinin ise mRNA ifade seviyelerinin 14 günlük kalluslarda tüm uygulamalarda arttığı tespit edilmiştir. TaSERK geninin ise 14 ve 28 günlük kalluslarda ifade seviyesinin uygulamalara göre değişiklik göstermiş ve 42 günlük kalluslarda azaldığı belirlenmiştir.

Sonuç: Araştırmada en yüksek bitki rejenerasyonu 0,5 μ M TSA ve 5 μ M 5-Azac uygulamalarından elde edilmiştir. Yine çalışmada TSA ve 5-Azac kimyasallarının somatik embriyogenesisde görev aldığı bilinen WOX4, LEC1, BBM1 ve TaSERK genlerinin mRNA ifade seviyelerine etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bitki rejenerasyonu, olgun embriyo, TSA, 5-Azac

Ağustos 2021, 73 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

EFFECTS OF EPIGENETIC INHIBITORS ON SOMATIC EMBRYOGENESIS IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

Sümeýra UÇAR

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat AYDIN

Purpose: Somatic embryogenesis (SE) is a powerful tool in the genetic improvement of plants. Epigenetic mechanisms are critical factors during somatic embryogenesis controlled by different genes. This study aims to determine the effects of TSA and 5-Azac chemicals, which are involved in epigenetic regulation, on mature embryo-derived SE in bread wheat as well as on the expression of some genes (WOX4, LEC1, BBM1, TaSERK) related to SE.

Method: The mature embryos of Kırık bread wheat cultivar were cultured in the callus formation medium (control) (MS basal medium supplemented with 12 mg/l dicamba and 0,5 mg/l IAA) containing different doses of TSA (0,1, 0,5, 1 and 2 µM) and 5-Azac (5, 10, 20 and 30 µM) chemicals. It was investigated the data related to callus weight (mg), callus formation rate (%), embryogenic callus formation rate (%), responded embryogenic callus rate (%), and the number of regenerated plants per explant. Also, the mRNA expression levels of WOX4, LEC1, BBM1, TaSERK genes in 14, 28 and 42-day-old calli were determined.

Findings: It was determined that the effect of treatments that were occurring from control and different doses of TSA and 5-Azac on *in vitro* parameters is very significant and the mRNA expression levels of examined genes change depending on treatments and age of callus compared. It was determined the highest mRNA expression level of the LEC1 gene was in the 42- day-old calli, while mRNA expression levels of the WOX4 and BBM1 genes increased in the 14-day-old calli in all treatments. On the other hand, the expression level of the TaSERK gene varied according to treatments in the 14 and 28-day-old calli and was decreased in the 42-day-old calli.

Result: It was determined that the effects of treatments consisting of different concentrations TSA and 5-Azac chemicals on *in vitro* parameters were very significant and the highest plant regeneration was obtained from 0.5 µM TSA and 5 µM 5-Azac treatments. Moreover, in this study, it was revealed that TSA and 5-Azac chemicals have effects on mRNA expression levels of WOX4, LEC1, BBM1, and TaSERK genes, which are known to be involved in somatic embryogenesis.

Keywords: Plant regeneration, mature embryo, TSA, 5-Azac

August 2021, 73 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	15
MATERYAL VE YÖNTEM	20
Materyal	20
Bitki materyali.....	20
<i>İn vitro</i> Kültür Ortamlarında Kullanılan Kimyasallar.....	20
Temel besi ortamı.....	20
MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan kimyasallar	21
<i>İn vitro</i> ortamda kullanılan TSA ve 5-Azac dozları.....	21
mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler	21
Yöntem.....	22
<i>İn vitro</i> Kültür Uygulamaları	22
Sterilizasyon yöntemleri.....	22
<i>İn vitro</i> kültür ortamı için stok solüsyonların hazırlanışı	23
TSA kimyasalının stok solüsyonunun hazırlanışı	25
5-Azac kimyasalının stok solüsyonunun hazırlanışı	25
Kültür ortamının hazırlanması	26
<i>İn vitro</i> 'da TSA ve 5-Azac kimyasallarının uygulanması.....	26
Araştırmada incelenen <i>İn vitro</i> karakterler	28
<i>İn vitro</i> verilerin istatistiksel analizi.....	29
mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesi.....	29
Gen ifadesinin analizi.....	29
Primerlerin hazırlanması	31
Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi	32

ARAŞTIRMA BULGULARI	33
<i>İn vitro</i> Karakterlere Ait Analiz Sonuçları.....	33
Embriyogenik Kallus Oluşum Oranı (EKOO) (%).....	35
Cevap Veren Embriyogenik Kallus Oranı (CEKO) (%).....	37
Eksplant Başına Rejenere Bitki Sayısı (EBBS) (adet).....	39
mRNA İfade Analiz Sonuçları	42
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
Sonuç ve Öneriler.....	51
KAYNAKÇA	52
ÖZGEÇMİŞ.....	60



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. MS Kültür Ortamında Kullanılan Kimyasallar ve Miktarları	20
Tablo 2. MS Tuzları ve Vitaminlerine İlave Olarak Kullanılan Kimyasallar.....	21
Tablo 3. Buğday Olgun Embriyo Kültüründe Uygulanan TSA ve 5-Azac Dozları	21
Tablo 4. mRNA İfade Seviyelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasal ve Çözeltiler	21
Tablo 5. Oksin Stok Solüsyonunun Hazırlanışı.....	25
Tablo 6. Sitokinin Stok Solüsyonunun Hazırlanışı.....	25
Tablo 7. TSA Deneme Dozları İçin Kullanılan Stok Solüsyon Miktarları.....	25
Tablo 8. 5-Azac Deneme Dozları İçin Kullanılan Stok Solüsyon Miktarları.....	26
Tablo 9. Q-PCR Analizinde Kullanılan Kimyasallar	31
Tablo 10. Kullanılan Primerlerin Baz Dizilimi ve Tm Sıcaklıkları.....	32
Tablo 11. Uygulamalara Göre Kallus Ağırlığı (KA) (mg), Kallus Oluşum Oranı (KOO) (%) , Embriyogenik Kallus Oluşum Oranı (EKOO) (%) , Cevap Veren Embriyogenik Kallus Oranı (CEKO) (%) ve Eksplant Başına Rejenere Bitki Sayısı (EBBS)(adet)	33
Tablo 12. Kallus Ağırlığına Ait Varyans Analiz Sonuçları	35
Tablo 13. Embriyogenik Kallus Oluşum Oranına Ait Varyans Analiz Sonuçları.....	36
Tablo 15. Eksplant Başına Bitki Sayısına Ait Varyans Analizi Sonuçları	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. SE'e genel bir bakış.	5
Şekil 2. Bazı genlerin SE'de rolleri.....	6
Şekil 3. SE'de epigenetik mekanizma.....	9
Şekil 4. DNA metilasyonu ile embriyogenik yeterlilik.....	10
Şekil 5. DNA metilasyon mekanizması	11
Şekil 6. Histon modifikasyonu	11
Şekil 7. Histon deasetilasyon mekanizması	12
Şekil 8. miRNA oluşum mekanizması	12
Şekil 9. SE indüksiyonunda epigenetik süreç	13
Şekil 10. TSA açık kimyasal formülü	13
Şekil 11. 5-Azac açık kimyasal formülü	14
Şekil 12. Sterilizasyon sonrası su emdirilmiş tohumun embriyosunun kesim kısımlarının gösterimi.....	27
Şekil 13. Uygulamalarda meydana gelen 14 günlük kallusların genel görünüşleri.....	34
Şekil 14. Uygulamaların kallus ağırlığı üzerine etkisi	35
Şekil 15. Uygulamaların embriyogenik kallus oluşum oranına etkisi.....	36
Şekil 16. Uygulamalarda meydana gelen embriyogenik kallusların genel görünüşleri	37
Şekil 17. Uygulamaların cevap embriyogenik kallus oranına etkisi	38
Şekil 18. Uygulamalarda meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünüşler	39
Şekil 19. Uygulamaların eksplant başına bitki sayısına etkisi	40
Şekil 20. Uygulamalarda meydana gelen bitkiciklerin görünümü	41
Şekil 21. Kontrole göre TSA ve 5-Azac uygulamalarında 14, 28 ve 42 günlük kalluslarda WOX4 geninin ifade değişimi	42
Şekil 22. Kontrole göre TSA ve 5-Azac uygulamalarında 14, 28 ve 42 günlük kalluslarda LEC1 geninin ifade değişimi.....	43
Şekil 23. Kontrole göre TSA ve 5-Azac uygulamalarında 14, 28 ve 42 günlük kalluslarda BBM1 geninin ifade değişimi.....	44
Şekil 24. Kontrole göre TSA ve 5-Azac uygulamalarında 14, 28 ve 42 günlük kalluslarda TaSERK geninin ifade değişimi	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
5-Azac	5- Azasitidin
ABI3	ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3
BMM1	Baby Boom1
CEKO	Cevap veren embriyogenik kallus oranı
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
da	Dekar
Dikamba	3,6-Diklorobenzoik asit
DH	Katlanmış (double) haploid (DH) üretimi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DEPC	Dietilpirokarbonat
EBBS	Eksplant başına rejenere bitki sayısı
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EKOO	Embriyogenik kallus oluşum oranı
FAO	Food and Agriculture Organisation
FUS3	FUSCA3
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
ha	Hektar
HDAC	Histon deasetilaz
IAA	İndol-3-asetik asit
K	Potasyum
KO	Kallus oluşum ortamı
KOO	Kallus oluşum oranı
kPA	Kilopaskal
l	Litre
L1L	LEC1-LIKE
LEC1	Leafy cotyledon

LPO	Lipid Peroksidasyon
m	Metre
MES hidrate	2- N-morfolino etansülfonik asit hidrate
mg	Miligram
ml	Mililitre
MS	Temel besi ortamı, Murashige and Skoog
N	Azot
NaCl	Sodyum klorür
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
P	Fosfor
pH	Asitlik derecesi
RNA	Ribonükleik
SE	Somatik embriyogenesis
SE	Standart hata
TaSERK	Somatik embryogenesis reseptör kinaz
TDZ	Thidiazuron
TF	Transkripsiyon faktörleri
TSA	Trikostatin A
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WOX4	Wuschel-related HOMEBOX4
WUSCHEL	WUS
µm	Mikrometre

GİRİŞ

Tahıllar mineral, vitamin, karbonhidrat ve diğer besin öğelerini içermeleri nedeniyle insan beslenmesinde önemli yer tutmaktadır. Tahıl ürünlerinden biri olan buğday (*Triticum aestivum* L.), yüksek karbonhidrat içeriğiyle vücudun temel enerji ve proteinini karşıladığından (Haider 2013; TÜBER 2015), insan beslenmesi, yaşam kalitesi ve sağlığı için en temel bitkisel üründür (Süzer ve Demir 2012).

Triticum monococcum L. (AA), *Triticum aestivum* L. (AABBDD) *Triticum turgidum* L. (AABB), *Triticum urartu* (AA), *Triticum timopheevii* (AAGG), ve *Triticum zhukovskyi* L. (AAAAGG) olmak üzere altı ana türden oluşan *Triticum* cinsi, *Poaceae* (Buğdaygiller) familyasına aittir. Bu türler kromozom sayılarına göre diploit ($2n=2x=14$), tetraploit ($2n=4x=28$) ve hekzaploit ($2n=6x=42$) olarak gruplandırılmaktadır (Matsuoka 2011; Atak 2017).

Buğday tanesi yaklaşık olarak %8–15 protein, %1– 5 yağ, %65–75 nişasta, %1–2 kül, %1,5–3 şeker ve %11–13 nem içermektedir. Ek olarak buğday tanesinde protein, karbonhidrat ve yağın yanında insan ve hayvan üzerinde önemli derecede rol oynayan vitaminler de mevcuttur (Kün 1988). Ayrıca dünya nüfusunun kaçınılmaz artışı göz önünde bulundurulduğunda buğdayın dünya nüfusu için gerekli olan karbonhidratın %55'ini, kalorisinin ise %20'sini karşılamasıyla dünya nüfusun yaklaşık %36'sının temel besin kaynağı durumundadır (Breiman and Graur 1995). Diğer taraftan buğday, genetik ve sitolojik çalışmalarda da önemli bir materyal olarak kullanılmaktadır (Matsuoka 2011; Atak 2017).

Buğdayın adaptasyon kabiliyetinin yüksek olması, yetiştiriciliğinin kısa sürede ve kolay olması, yüksek besin değerine sahip olması, depolama, işleme ve taşıma kolaylığı olmasından dolayı insanlar için vazgeçilmez bir gıda ürünü haline gelmiştir (Atar 2017). Dünya buğday üretiminin %90'ını oluşturan ekmeklik buğdaylar (*Triticum aestivum* L.), bu özellikleriyle dünyada en çok ekilen ve gıda olarak tüketilen önemli bir kültür bitkisi durumundadır (Hemdane *et al.* 2016). Ekmeklik buğday dünya çapında başlıca bir temel besin maddesidir ve buğday veriminin arttırmak, gelecek yıllarda yetiştiriciler için önemli bir amaç olacaktır (Youssef *et al.* 2018).

FAO 2019 yılı verilerine göre, ekim alanlarına göre mısırdan sonra ikinci sırada yer alan buğday ekim alanı 217 milyon ha, üretim miktarı 764 milyon ton olarak kaydedilmiştir. Buğday üretiminin yaklaşık %68'i Avustralya, Çin, Hindistan, Kanada, ABD, Almanya, Fransa, Pakistan, Ukrayna ve Rusya'da yapılmaktadır (FAO 2019).

TÜİK'in 2019 yılı verilerine göre ülkemiz 37 milyon 712 bin ha olan toplam tarım alanına sahiptir. Bu tarım alanlarından 15 milyon 347 bin ha'nı tahıllar oluşturmaktadır. Tahıllar içerisinde yer alan buğday ise 6,80 milyon ha'lık bir alanı kaplamakta ve yıllık üretim miktarı 19 milyon tondur. Yine ülkemizde 2019 yılı tahminlerine göre buğday üretiminin %2,5 azalacağı tahmin edilmektedir (TÜİK 2018). Artan nüfusu beslemek için ciddi üretim artışı gerekmektedir. Ancak gelişmiş ve dünya buğday üretiminin büyük kısmını karşılayan ülkelerde yaklaşık son 20 yıldır buğdayda verim artışı çok az olmaktadır (Atar 2017).

Dünyada ve Türkiye'de işlenen tarım alanlarının azalmış olması, birim alandan elde edilen ürün verimini arttırmak için bölge koşullarına uygun çeşitlerin agronomik uygulamalar ile geliştirilmesinin yanında bazı ıslah yöntemlerinin de önemi büyüktür. Artan dünya nüfusu göz önüne alındığında verimi yüksek çeşitlerin geliştirilmesi bitki ıslahçıların temel amacı olmuştur (Adak ve Ahmet 2007).

Buğdayda verim ve kalite; genotip, çevre ve genotip x çevre interaksyonundan önemli oranda etkilenmektedir. Buğdayda yüksek verim alabilmek için hastalık ve zararlara dayanıklı, soğuk, tuzluluk ve kuraklık gibi biyotik ve abiyotik stres faktörlerine toleranslı olması gerekmektedir (Aydin 2005; Aydoğan vd. 2007).

Günümüzde buğday ıslahında verim ve kalite artışına katkıda bulunan birçok yöntem kullanılmakta ve de üstün verimli ve kaliteli birçok çeşit klasik ıslah çalışmalarından yararlanılarak geliştirilmiştir. Ancak hastalık ve zararlılar başta olmak üzere bazı biyotik ve abiyotik strese karşı dayanıklılıkta henüz istenilen sonuç tam olarak elde edilememiştir. Bitki ıslahında klasik ıslah metotları kullanılarak kantitatif karakterleri etkileyen genlerin aktarılması sağlanmıştır. Ancak bu yöntemle bağlantı (linkage) gibi birçok sorunla karşılaşabilmekte ve çeşit geliştirmede ıslah süresi uzun zaman alabilmektedir (Aydin 2009).

Tahıllarda meydana gelen bu sorunlar klasik ıslaha yardımcı olan modern ıslah yöntemleri kullanılarak ortadan kaldırılabilir. Modern ıslah yöntemleri olarak adlandırılabilir bitki genetik mühendisliği veya biyoteknolojik yöntemlerin kullanılmasıyla genetik bağlılıkta (linkage) ve melezlemede karşılaşılan sorunlar yok edilebilmekte, aynı zamanda ıslah süresi kısaltılarak para ve zamanda tasarruf sağlanabilmektedir (Aydin 2009; Bie *et al.* 2012; Zao *et al.* 2020).

Bunun yanında biyoteknolojik yöntemlerin ilk uygulaması olan doku kültürü teknikleri ile bitkiden alınan herhangi bir parça (ekspant) ile aseptik şartlarda kısa sürede bitkinin istenen kısımlarının veya tüm bir bitkinin çoğaltımı mümkündür (Babaoğlu *et al.* 2001). Embriyo kültürü buğday ıslahında klasik bitki ıslahına oldukça yardımcı olan modern teknolojik yaklaşımdır (Sönmezoglu 2010).

Genetik mühendisliği çalışmalarından yararlanılarak doku kültürü yöntemleri ile kültüre alınan bitki hücrelerine gen aktarımı yapılabilmekte ve bu bitki kısımları aseptik şartlarda uygun besi ortamlarında tam bir bitki haline getirilerek, aktarılan geni taşıyan transgenik bitkiler elde edilebilmektedir (Aydin 2009). Buğdayda gen aktarım çalışmaları etkili bir bitki rejenerasyon sistemine bağlıdır. Bu çalışmanın başarısının başta genotip olmak üzere birçok faktöre bağlı olduğu bilinmektedir (Aydin 2009; Adak ve Ahmet 2007; Bie *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2018).

Bitki rejenerasyon sistemlerinden biri olan somatik embriyogenesis (SE), embriyo oluşumu için gerekli olan biyokimyasal ve moleküler süreçlerde önemli rol oynamaktadır (Nic-Can *et al.* 2013). Bu sistem, bitkilerde döllemeyi engelleyici çeşitli çevresel ve genetik faktörlerin üstesinden gelerek (Arnold *et al.* 2002) birçok bitki türünün, hızlı klonal çoğaltılmasında önemli bir potansiyele sahip olmasının yanı sıra sentetik tohum üretimi ve gen aktarımı alanlarında kullanılan önemli bir tekniktir.

Buğday’da genetik transformasyon çalışmalarında buğdayın eksplant türleri arasında olgunlaşmamış embriyo, olgun embriyo, anter ve genç başak kullanımının yaygın olmasının yanı sıra (Shariatpanahi *et al.* 2006; Dong *et al.* 2020) eksplant olarak yaşlanmış dokularının kullanımı durumunda embriyogenik hücre oluşturmak oldukça zordur (Karami *et al.* 2009).

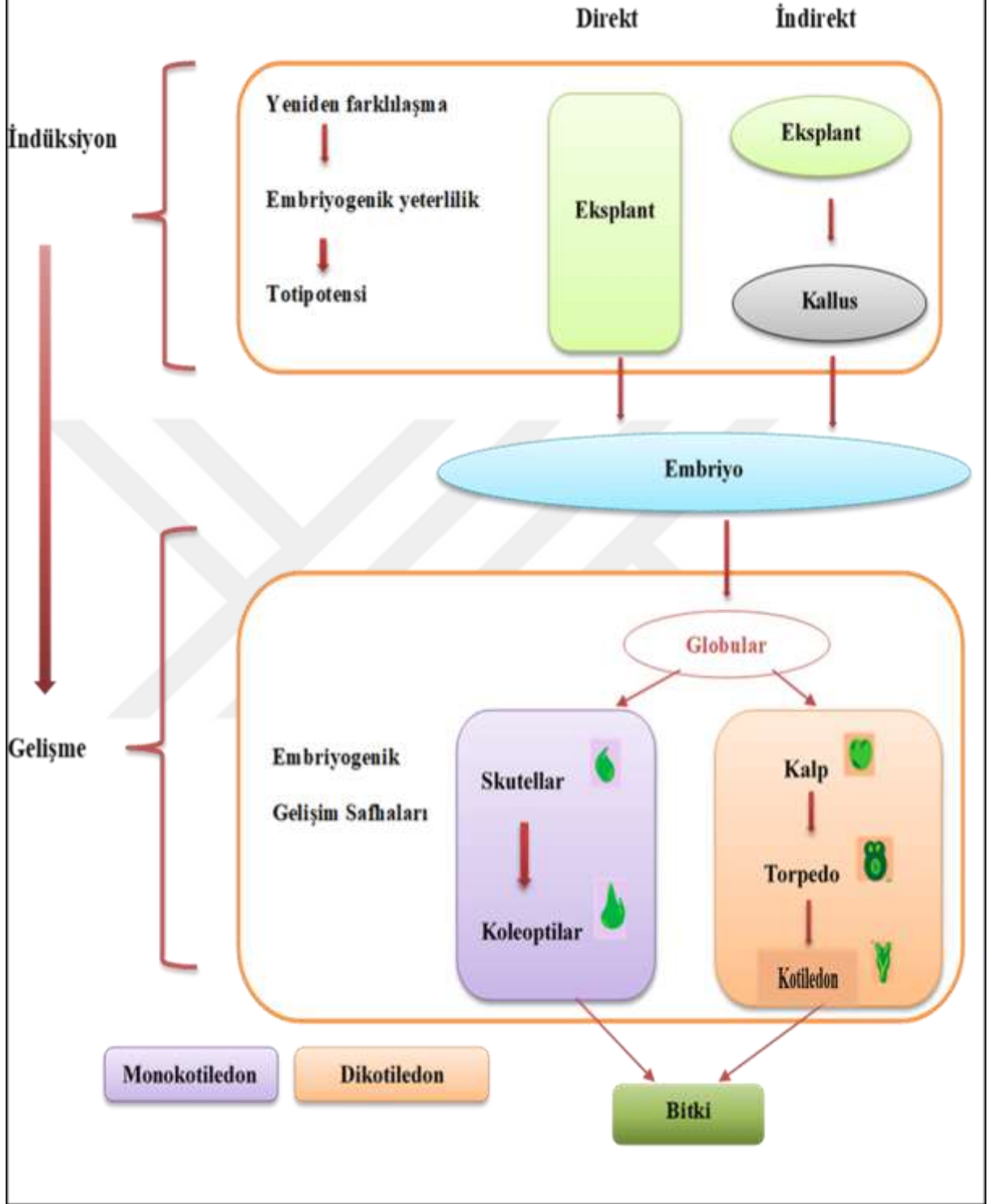
SE tekniği ile genetik transformasyon çalışmalarında buğday olgunlaşmamış embriyoları en yaygın eksplant kaynağı olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak bu eksplant kaynağı yılın sadece belirli dönemlerinde elde edilebilmektedir. Bunun yanında kontrollü koşullar altında seralar kullanılarak kışlık olan çeşitlerde vernalizasyon ihtiyacının giderilmesi gerekmektedir. Bu gereklilik zaman ve finans gücü bakımından önemli sorun teşkil etmektedir. Bu soruna karşın, yılın her döneminde kolay temin edilebilme ve kolay depolanabilme özellikleriyle olgun embriyolar, SE’de olgunlaşmamış embriyolara bir alternatif olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Aydin *et al.* 2011). Ek olarak olgun embriyo, uygun örnekleme avantajlarına sahiptir, çevresel koşullardan kolayca etkilenmez ve bireyler arasında aynı fizyolojik duruma sahiptir. Bu özellikleri ile genetik transformasyon çalışmaları için uygun bir eksplant türü olarak kabul edilmektedir (XG *et al.* 2014).

SE, bağımsız vasküler sisteme sahip olup kök ve sürgün aksini içeren iki kutuplu bir yapının oluşmasına yol açan ve somatik dokulardan üretilen bir eşeysiz üreme sürecidir (Babaoğlu *et al.* 2001, Elhiti *et al.* 2013). Bu süreç baştan sona kadar belirli aşamalardan (yeniden farklılaşma, totipotensi ve embriyogenik potansiyelin erken kazandırılması) oluşmaktadır. Bu aşamalardan ilki olan yeniden farklılaşma olayında olgun embriyo hücreleri meristematik hücrelere dönüşmek üzere farklılaşırlar. Daha sonra bitki rejenerasyonunda son

derece önemli olan totipotensi aşaması başlar ve bu aşamada hücreler tam bir bitki oluşturma potansiyeli kazanmaktadırlar (Verdeil *et al.* 2007; Ikeuchi *et al.* 2015). Son aşamada ise hücrelere embriyogenik yeteneğin kazandırılması ile hücreler somatik embriyogenik hücre durumuna geçmektedirler (Osorio-Montalvo *et al.* 2018; Elhiti *et al.* 2013; Méndez-Hernández *et al.* 2019; Von Arnold *et al.* 2002; Heringer *et al.* 2018).

SE'de embriyogenik oluşum safhalarında embriyo yapıları monokodiledon ve dikodiledon bitkilere göre farklılık göstermektedir. Dikodiledon bitkilerde embriyo gelişimi globular, kalp, torpido, kotiledon yapıları şeklinde meydana gelirken, buğday gibi monokotiledon bitkilerde ise globular, skutellar ve koleoptilar embriyo yapıları şeklindedir (Babaoğlu *et al.* 2001; Elhiti *et al.* 2013; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Winkelmann 2016; Zhao *et al.* 2017; Yang and Zhang 2010; Fujimura 2010) (Şekil 1.). Ancak, bu teknikle embriyogenik yeterliliğin kazandırılması ve somatik embriyogenik hücrelerin bitkiye geçişi uzun zaman almaktadır. Bundan dolayı beklenmeyen ve kontrol edilemeyen hücre ve dokularda genetik değişikliklere sebep olan varyasyonlar meydana gelmektedir. Bu varyasyonlar mikroçağaltım başta olmak üzere özellikle gen aktarım çalışmalarını sınırlandırmaktadır (Korkmaz vd. 2013; Bregitzer and Tonks 2003). Bu sınırlandırmanın önüne geçmek için bu süreçlerin hızlandırılması bu sistem için önem arz etmektedir. Bu sebepten dolayı somatik embriyogenesinin tüm yönleriyle (epigenetik, transkriptomik, biyokimyasal) incelenmesi son çalışmalarda öngörülmüştür (Osorio-Montalvo *et al.* 2018).

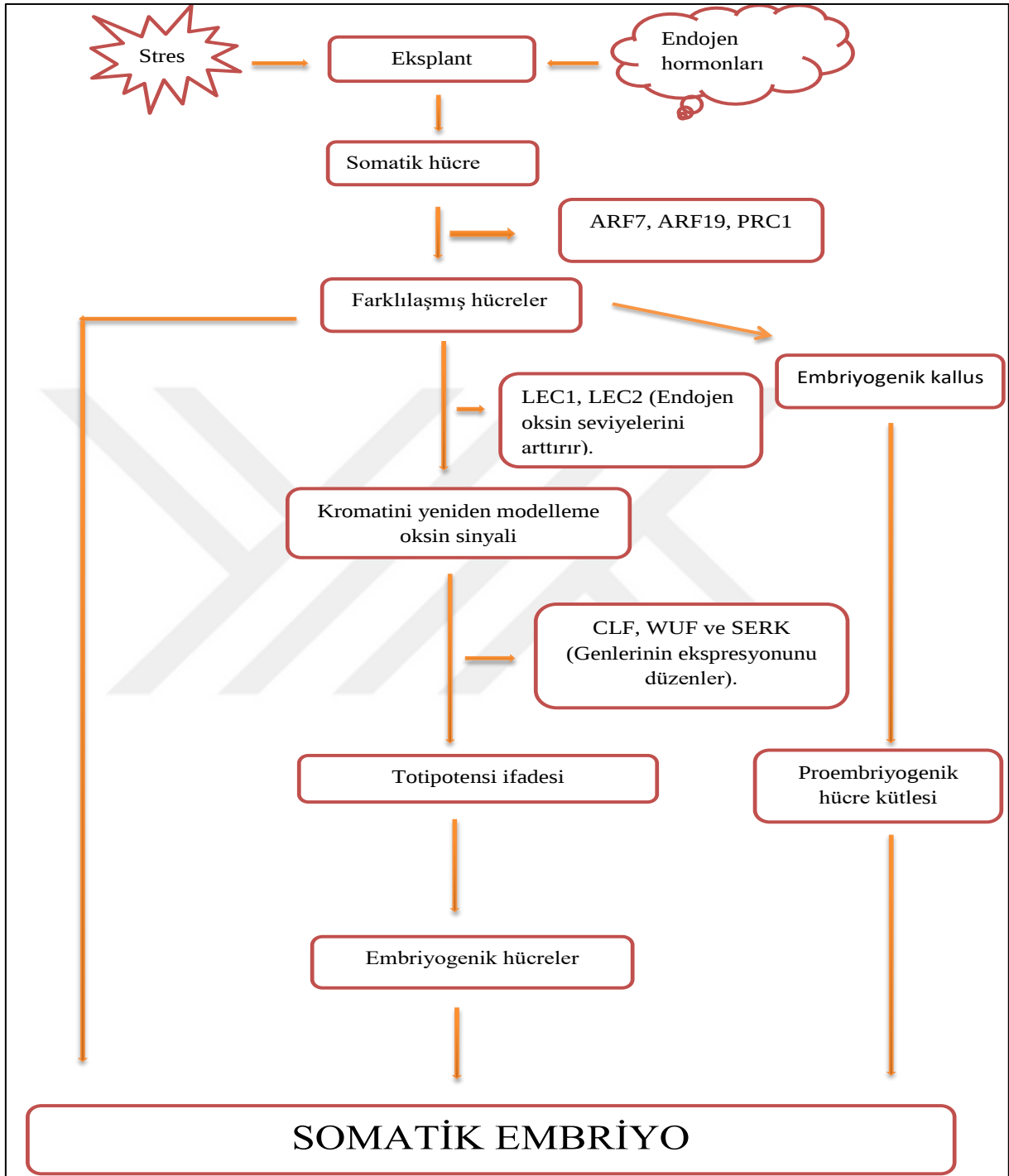
SOMATİK EMBRİYOGENESİS



Şekil 1. SE'e genel bir bakış (Osorio-Montalvo *et al.* 2018).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, geçmişten bugüne kadar çalışılan SE'nin birtakım genler (WOX, LEC, BBM1, SERK,) tarafından kontrol edildiğini ve epigenetik bir denge mekanizmasına sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle bu genlerin SE oluşum

aşamalarında (Şekil 2.) önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Wojcikowska *et al.* 2013; Feher *et al.* 2013; Gulzar *et al.* 2020; Koehler *et al.* 2020).



Şekil 2. Bazı genlerin SE’de rolleri (Kumar *et al.* 2017).

Wuschel-related HOMEBOX4 (WOX) genlerinin hem somatik hem de zigotik embriyo gelişiminde anahtar rolünün olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiş olup birçok protein ve hormonal faktör tarafından düzenlendiği ortaya konulmuştur (Tvorogova *et al.* 2019). WOX ailesinin transkripsiyon faktörleri (TF), bitki hücrelerinin çoğalması ve

farklılaşmasının önemli düzenleyicileri olarak işlev görüp kök ve sürgün meristemlerinin oluşma mekanizmasında yer almaktadır. Aynı zamanda bu TF, gelişmekte olan bitkinin şablon ve organizasyonunu önceden belirlemektedir (Wojcikowska *et al.* 2013; Haecker *et al.* 2004).

WOX gen ailesinin bir üyesi olan WUSCHEL (WUS), sürgün apikal meristem oluşumu sırasında düzenleyici olarak anahtar rol oynayıp, somatik embriyogenesi uyarıcı olarak görev yapmaktadır (Rupps *et al.* 2016).

Bir homeodomain transkripsiyon faktörünü kodlayan WUS geni, başlangıçta farklılaşmamış bir durumda sürgün apikal meristemin merkezi bölgesi kısmında hücre katmanları boyunca yönlendirilip, otonom olmayan bir şekilde ifade edilmektedir. WUS oksin ve sitokininlerle bağlantılı olup organogenesi ya da somatik embriyogenesi uyarmada görev almaktadır. Eksojen oksin konsantrasyonu seviyesi ile düzenlenen doğru bir WUS ifadesi, somatik embriyo indüksiyonu için gereklidir (Bouchabke-Coussa *et al.* 2013).

SE'nin kontrolünde merkezi bir rol alan Leafy cotyledon (LEC) genleri, özellikle somatik embriyo oluşturma aşamasında önemli görev almaktadır. Bu genler oksin biyosentezi yolağında görev alan diğer genlerin düzenlemesini sağlayarak endojen oksin seviyelerini arttırmaktadır (Wojcikowska *et al.* 2013). Aynı zamanda embriyogenezin oluşma sürecinin altında yatan mekanizmaları tanımlamak için bir araç olarak kullanılmaktadır (Braybrook ve Harada 2008). LEC1 ve LEC2, erken ve geç embriyogenezin birçok yönünü kontrol etmektedir. LEC1, CCAAT bağlanma faktörünün (CBF) HAP3 alt birimine bir TF homologunu kodlarken, LEC2, korunmuş RY motifini tanıyan ve zigotik embriyogeneze özgü transkripsiyonel olarak düzenlenen bitkilerde bir B3 DNA bağlama motifini kodlamaktadır (Brand *et al.* 2019).

LEC1 ve LEC2, LEC1-LIKE (L1L) ve B3 bölge proteinleri ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3 (ABI3) ve FUSCA3 (FUS3) ile birlikte topluca LAFL ağı (LEC1 / L1L, ABI3, FUS3 ve LEC2) olarak adlandırılır. LAFL proteinleri, embriyonun erken gelişim süreçlerini ve embriyo olgunlaşması süreçlerini düzenleyip embriyogenez boyunca işlev görürler. FUS3 ve ABI3 aşırı ifade edildiğinde somatik embriyogenezi indüklemesede, fidelere embriyo özellikleri kazandırmaktadırlar (Horstman *et al.* 2017).

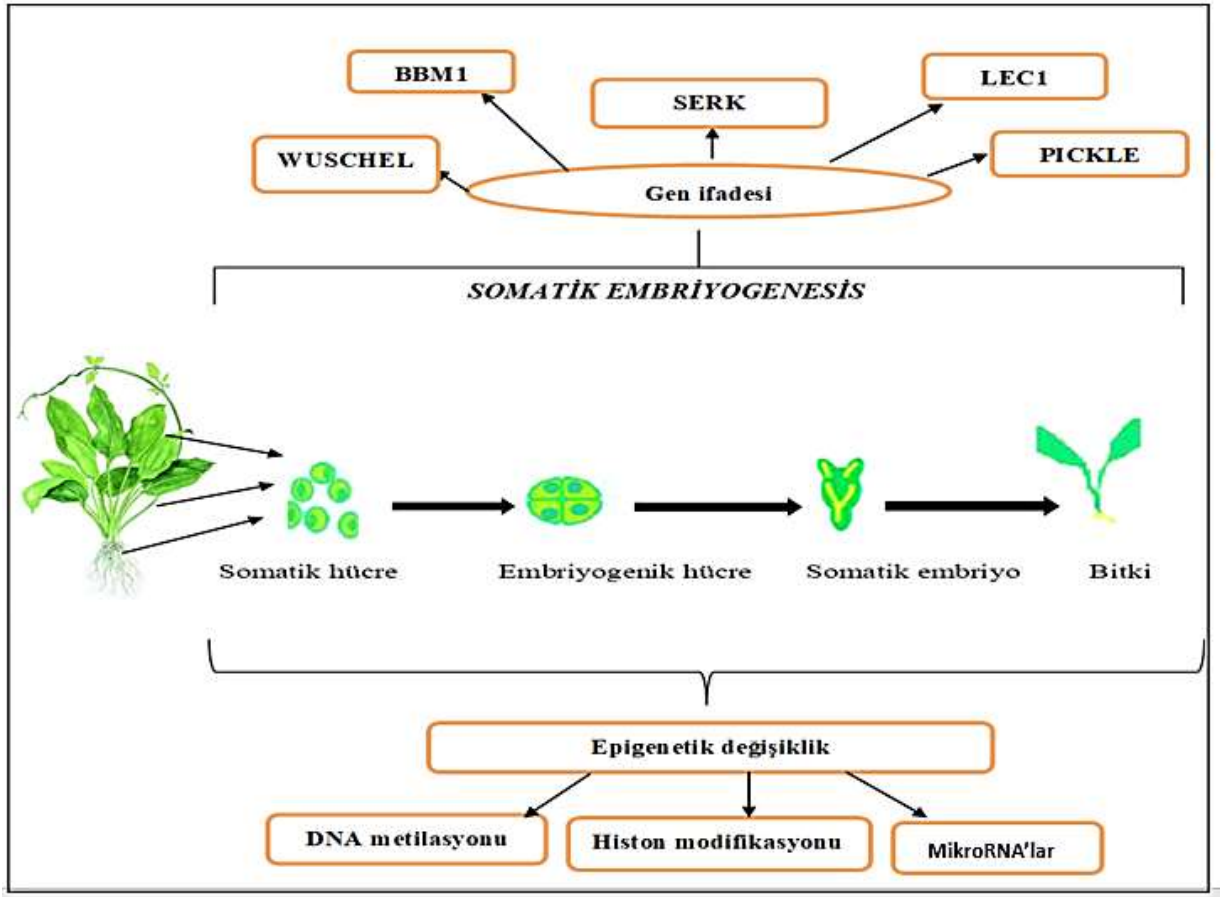
BABY BOOM (BBM), bitki gelişiminde çeşitli işlevlere sahip olan AP2 transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir. BBM AP2 / ERF domain proteini, *Brassica napus* mikrospordan türetilmiş embriyo kültürlerinde embriyo gelişimi için markör olarak kullanılan tohum ve kök-meristemlerde ifade olan bir transkripsiyon faktörüdür. BBM'nin ifadesi, fidelere somatik embriyo ve kallus oluşumunu indüklemektedir. BBM genlerinin ifadesi sadece SE indüksiyonundan sonra önemli role sahiptir (Rupps *et al.* 2016).

Somatik embriyogenesis reseptör kinazlar (SERK'ler), sinyal transdüksiyonunda yer alan reseptör benzeri kinazların küçük bir gen ailesine aittir. Aynı zamanda transmembran proteini olarak bilinen SERK, lösün açısından zengin tekrarların (LRR'ler) varlığı ile karakterize edilen geniş reseptör benzeri kinazlar (RLK'ler) grubunda yer almaktadır. SERK geni ilk olarak embriyogenik ve embriyogenik olmayan havuç kültürlerinin taranmasıyla tanımlanmış ve embriyogenik yeterliliğe sahip hücreler için spesifik bir markör olarak kabul edilmiştir (Rupps *et al.* 2016). Buğday olgun embriyo kültüründe, mısır, *Paspalum notatum*, *Brachypodium distachyon* ve *Oryza sativa* (Podio *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2017; Singla *et al.* 2009) başlıca embriyo gelişim evrelerinde TaSERK'lerin dokuya özgü ifadesi somatik embriyogenesis sırasında önemli rolleri mevcuttur (Singh and Khurana 2017). TaSERK genleri genel olarak hücre kültürlerinde embriyogenez sırasında ifade olmaktadır (Ortowska *et al.* 2017; Baudino *et al.* 2001; Hecht *et al.* 2001).

Özellikle SERK gen aileleri ve LEC, WUS gibi germin benzeri protein kodlayıcı genlerin SE tekniği ile transdüksiyon yolağı ve transkripsiyonel regülasyonda önemli ilişkileri olduğu tespit edilmiştir (Mahdavi-Darvari *et al.* 2015). Bu genler, SE'nin indüklenmesi için vazgeçilmezdirler.

SE tekniğinde somatik hücrelere embriyogenik yeteneğin kazandırılması, bir dizi genetik program tarafından yönetilmektedir. SE tekniğinde görev alan bu genlerin ifadeleri bir takım genetik tetikleyiciler tarafından baskılanmaktadır. Bu nedenle gen ifade modellerinin yeniden programlanması gerekmektedir. Bunun yanında somatik hücrelerde embriyo gelişimini yöneten epigenetik program devreye girmektedir (Feher ve *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2005).

DNA metilasyonu, kromatinlerin yeniden biçimlendirilmesi ve mikroRNA'lar (miRNA), SE'de rol alan epigenetik değişikliklerdir (Şekil 3.) (Kumar *et al.* 2017; Miguel and Marum 2011; Neelakandan and Wang 2012; Mahdavi-Darvari *et al.* 2015; Ikeuchi *et al.* 2016).

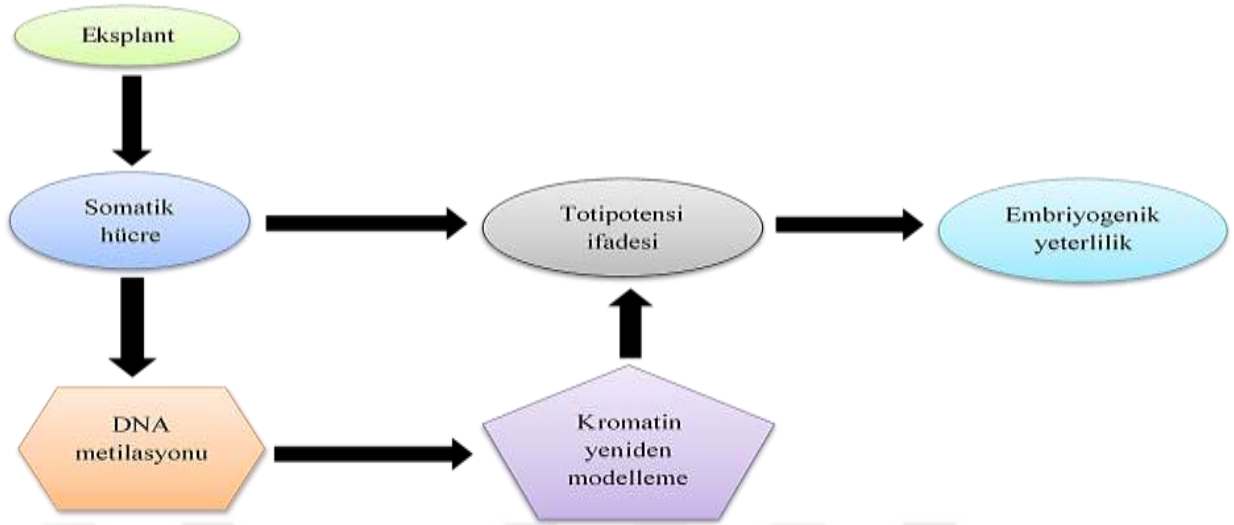


Şekil 3. SE’de epigenetik mekanizma (Osorio-Montalvo *et al.* 2018).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar epigenetik mekanizmaların düzenlenmesi sonucunda yukarıda bahsedilen embriyogenik düzenleyici genlerin ifade edilmesini sağlayarak somatik embriyogenesis çalışmalarını geliştireceğini savunmaktadırlar. Bu nedenle epigenetik mekanizmaların araştırılması farklı bitki türlerinin embriyogenik kapasitesini arttırmaya yarayarak bitki iyileştirilmesi hususunda bitki ıslahı için yeni yaklaşımları geliştirmeye yardımcı olacaktır (Kumar *et al.* 2017). SE’nin genetik temelini anlamada gelişmeler olmasına rağmen, bu süreci düzenleyen epigenetik mekanizma hala tam olarak açıklanamamıştır (Nic-Can *et al.* 2013).

Bütün bir bitkinin oluşumunu sağlayan somatik hücrelerin farklılaşması ve farklılaşmasında epigenetik mekanizmaların gen ifadesini modüle ederek çalıştığı genel olarak kabul edilmektedir (Mahdavi-Darvari *et al.* 2015) (Şekil 4). Epigenetik modifikasyonlar nükleotid sekanslarını değiştirmede, DNA şablonlarını susturabilen ya da süper aktif eden bir moleküler mekanizmadır (Habu *et al.* 2001; holliday, 1987). DNA metilasyonu, kromatinlerin yeniden biçimlendirilmesi ve miRNA’lar yoluyla gen ifadesinin düzenlenmesi, epigenetikte önemli süreçlerdir (Kumar *et al.* 2017; Ronemus *et al.* 1996, Jones ve Takai 2001). Özellikle DNA metilasyonu ve kromatinin yeniden modellenmesi, SE’nin indüksiyonunun

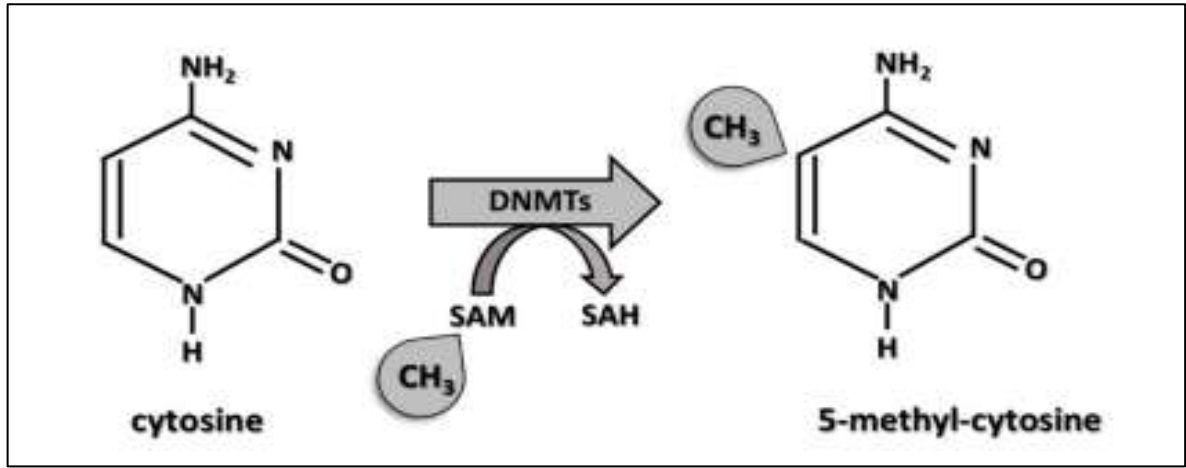
düzenlemesinde epigenetik mekanizmalar olarak da tanımlanmaktadır (Miguel ve Marum 2011; Krishnan and Siril 2017).



Şekil 4. DNA metilasyonu ile embriyogenik yeterlilik (Kumar *et al.* 2017).

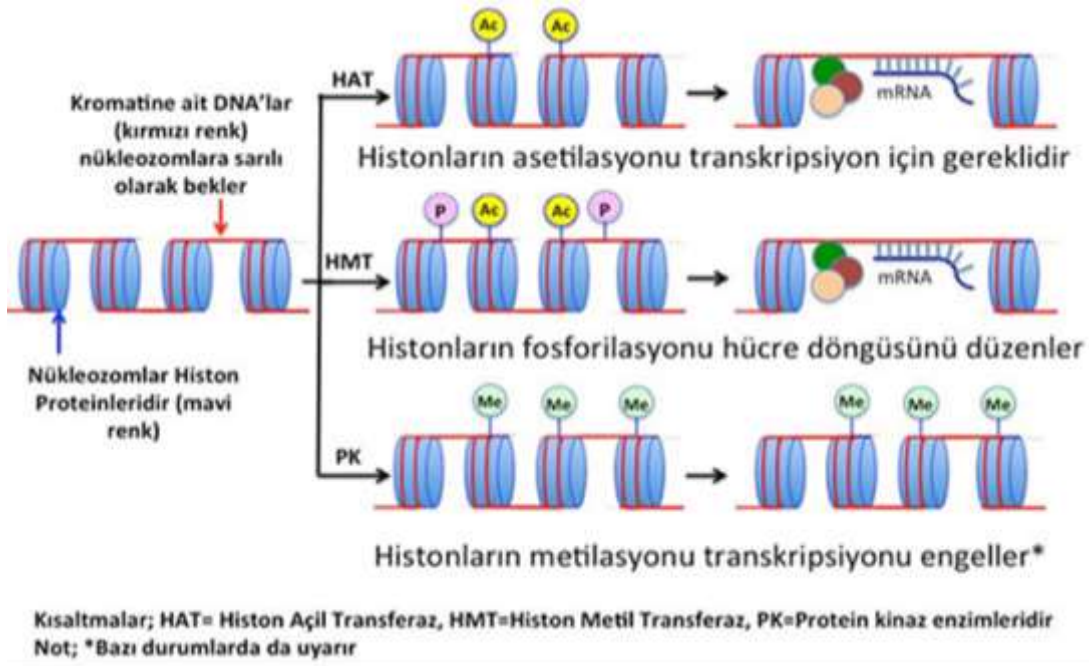
DNA metilasyonu 1948 yılında Hotchkiss tarafından ilk olarak keşfedilen epigenetik markör olmuştur. DNA metilasyonu, DNA sitozin metiltransferaz enzimleri (CMT), yeniden düzenlenmiş metiltransferaz (DRM) ve metiltransferaz (MET) aileleri aracılığıyla gerçekleşir (Miguel ve Marum 2011). DNA metilasyonu gen ifadesini etkileyerek hücre fonksiyonlarını değiştiren, bir metil grubunun kovalent şekilde DNA metiltransferaz (DNMT) katalizinde, bir CpG dinükleotidindeki Sitozinin 5-karbonunda yapıya eklenmesiyle meydana gelen bir olaydır. DNA metilasyonu özellikle gen ifadesinde önemli role sahiptir (Nestler 2014) (Şekil 5).

DNA metilasyonu, gen ifadesindeki temel rolü nedeniyle en çok çalışılan epigenetik mekanizmalardan biridir. Özellikle hipometilasyon ve hipermetilasyon arasındaki denge somatik embriyogenesisin başarısında oldukça önemlidir. Ancak olgun embriyo kültüründe stres faktörlerinden dolayı istenmeyen düzeyde metilasyonlar ortaya çıkmaktadır (Osorio-Montalvo *et al.* 2018). Birkaç raporda DNA metilasyon seviyesinin *in vitro* ortamlarda embriyogenik hücrelerde değişebileceği gösterilmiştir. DNA metilasyon modellerindeki değişiklikler veya modifikasyonlar, bitkilerde SE'nin başlatılması ve geliştirilmesinde rol oynayan çeşitli aday işaretleyici genlerin düzenleyici mekanizmalarına bağlıdır (Kumar *et al.* 2017).



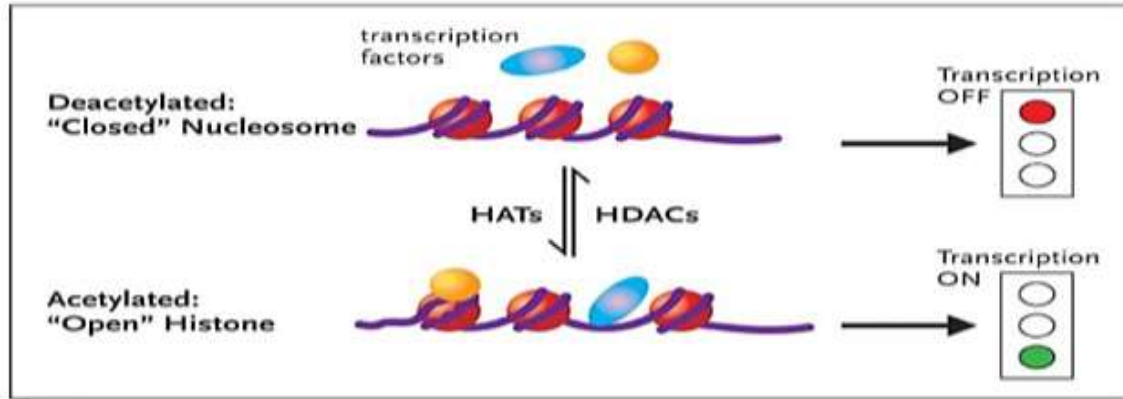
Şekil 5. DNA metilasyon mekanizması (Ciechomsk *et al.* 2019).

Diğer bir epigenetik mekanizma olan histon modifikasyonları kodlanan ve kodlanmayan genom sekanslarını oluşturmaktadır. Bu modifikasyonlar hücre döngüsünün gelişimsel fazında çevresel faktörlerden etkilenmektedir (Dolinoy vd. 2007). Histon modifikasyonlarından biri olan histon asetilasyonu transkripsiyonda doğrudan rol oynamaktadır. Histon asetilasyonu, histon proteinlerinin bazı amino asitlerine asetil gruplarının (-COCH₃) bağlayıp histonları asitleyerek, DNA ve histon arasındaki etkileşimin azalmasına neden olmaktadır (Zhao *et al.* 2010) (Şekil 6). Böylelikle asetilasyon gerçekleşmiş bölgedeki genlere, transkripsiyon proteinleri daha kolay ulaşmaktadır. Bundan dolayı histon asetilasyonu transkripsiyon için gereklilik arz etmektedir.



Şekil 6. Histon modifikasyonu (Anonim 2020a)

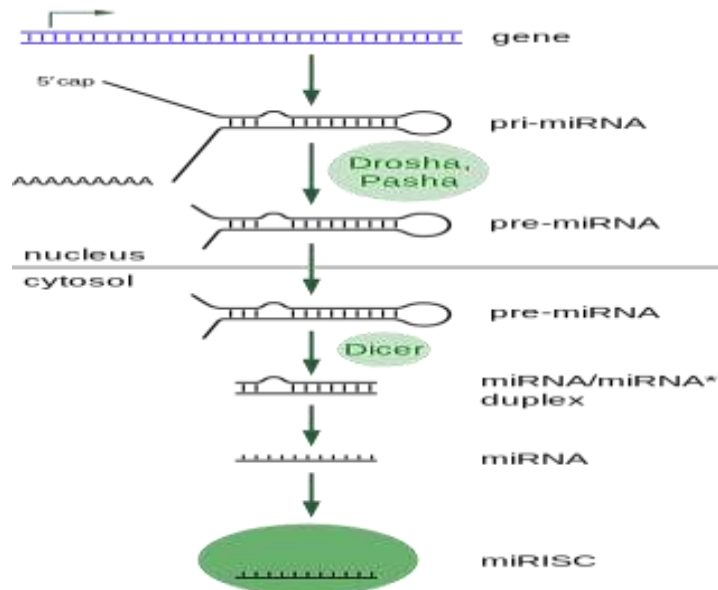
Ancak asetilasyon yerine histon deasetilasyonunun meydana gelmesi asetik grupların amino asitlere bağlanmasını engellenmesine ve DNA'ya histonları sıkıca bağlayarak genlerin ifadelerini engellemektedir (Can *et al.* 2011) (Şekil 7).



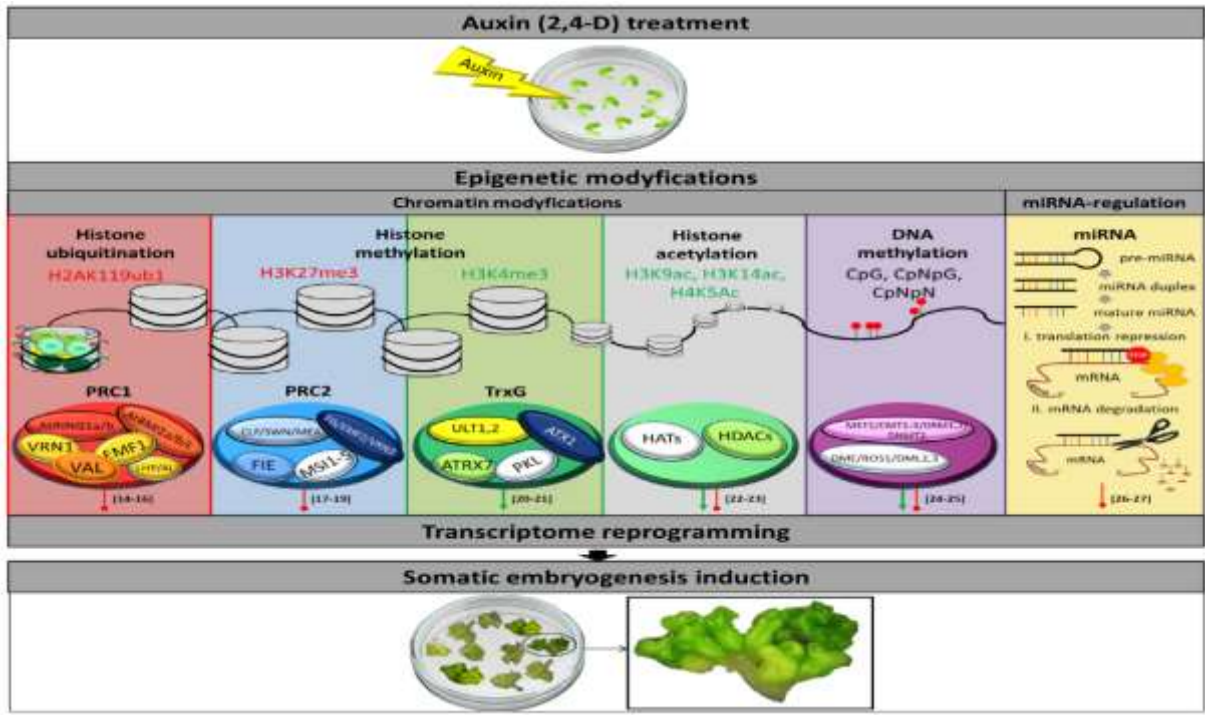
Şekil 7. Histon deasetilasyon mekanizması (Anonim 2020b)

Küçük, endojen protein kodlamayan düzenleyici RNA'lar, bitkilerde epigenetik süreçlerin yönetiminde ortaya çıkmaktadır. miRNA'lar, yaklaşık 21 nükleotit uzunluğundadır ve tek sarmallı RNA öncülerinden türetilmektedir. Bitkilerde olgunlaşmaları için dicer benzeri1 (DCL1) enzim tarafından parçalanmaları gerekmektedir (Tang *et al.* 2003) (Şekil 8).

Bitkilerde miRNA'lar, transkripsiyon anında ve transkripsiyon sonrasında kısmen veya tamamen tamamlayıcı sekans homolojisi yoluyla gen ifadesini düzenlemektedir (Neelakandan ve ark. 2012). Ayrıca miRNA'lar SE'nin indüksiyonunda görev almaktadır (Mahdavi-Darvari *et al.* 2015) (Şekil 9).

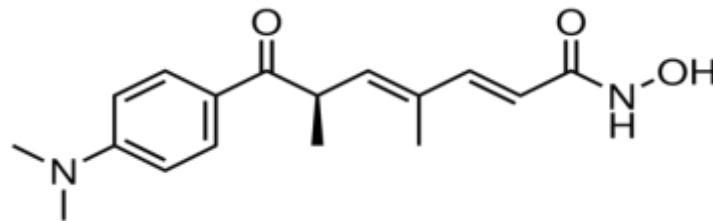


Şekil 8. miRNA oluşum mekanizması (Anonim 2020c).



Şekil 9. SE indüksiyonunda epigenetik süreç (Wójcikowska *et al.* 2020).

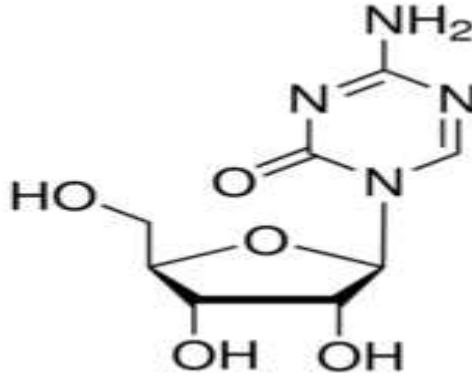
Histon deasetilaz inhibitörü olan trikostatın A (TSA) (Şekil 10), histon asetilasyonuna sebep olup genlerin ifade seviyelerini arttırmaktadır. TSA, alifatik zinciri histon deasetilaz (HDAC)'ların katalitik olarak aktif alanında bulunan hidrofobik yarığa yerleşir. TSA uygulamasının hayvanlarda ve bitkilerde gen ifadesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu yapılan bazı çalışmalarda vurgulanmıştır. Ayrıca TSA'nın embriyogenik geçişi kontrol eden bazı düzenleyici genlerin ifade edilmesine yardımcı olarak embriyogenik potansiyeli arttırdığı savunulmuştur (Wójcikowska *et al.* 2018; Finnin *et al.* 1999). Bunun yanında somatik embriyogenesiste görev alan bazı genler üzerine etkisinin olduğu ortaya konulmuştur. İslah çalışmalarında önemli bir yeri olan katlanmış (double) haploid (DH) üretiminde TSA'nın kullanılması verimlilikte önemli bir artışa neden olmuştur. Bu nedenle buğday ıslah programları için DH protokollerine TSA'nın dâhil edilmesi savunulmaktadır (Jiang *et al.* 2017).



Şekil 10. TSA açık kimyasal formülü (Anonymous 2020d).

Ortaya çıkana DNA metilasyon seviyeleri, DNA metilasyon inhibitörü olan 5-azasitidin (5-Azac) (Şekil 11) gibi kimyasalların kullanılmasıyla değiştirilebilmektedir. DNA demetilasyon aktivitesinin bir nükleotit analogu olan 5-Azac, DNA metilasyonunun gelişimsel

süreçlerdeki rolünü incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. 5-Azac, sitozin yerine yeni sentezlenmiş DNA zincirine rastgele eklenerek, DNA metiltransferaz aktivitesinde bir azalma meydana getirmektedir. 5-Azac uygulamasının, SE için bir doku kapasitesi de dahil olmak üzere *in vitro* olarak indüklenen morfojenik süreçleri etkilediği belirtilmesine rağmen, somatik bitki hücrelerinin gelişimsel plastisitesini kontrol eden genlerin epigenetik düzenlenmesinde bu modifikasyonun rolü hakkındaki bilgiler sınırlıdır (Grzybkowska *et al.* 2018).



Şekil 11. 5-Azac açık kimyasal formülü (Anonymous 2020e).

Somatik embriyogesisinde, embriyo oluşumu için gerekli olan biyokimyasal ve moleküler süreçler bitki rejenerasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada ekmeklik buğdayda olgun embriyo kaynaklı somatik embriyogesis üzerine epigenetik düzenlemelerde görev alan TSA ve 5-Azac kimyasallarının somatik embriyogesisinde rol alan bazı genlerin (BBM1, SERK, WOX ve LEC) ifadesine etkisi incelenerek bu genlerin buğdayda olgun embriyo kaynaklı somatik embriyogesisindeki rolleri incelenmiştir.

KURAMSAL TEMELLER

Buğday, insan beslenmesine katkı sağlayan en önemli gıda ürünlerinden biridir. Besin değerinden dolayı gıda ürünlerinin yapımında kullanılmaktadır. Bu yönüyle tahıllar arasında çok önemli pozisyona sahip olmuştur (Rashid *et al.* 2019). Ekmeklik buğday, dünyadaki buğday üretiminin %95’den fazlasını oluşturmaktadır. Buğday veriminin artırılması, dünyanın artan nüfusunu beslemek için büyük bir küresel önceliktir. Bu talebi karşılamak için buğday veriminin 2050 yılına kadar %50 oranında artması gerektiği tahmin edilmektedir (Tadesse *et al.* 2019). Buğday veriminin artırılması ıslah çalışmalarıyla mümkün olmaktadır. Son zamanlarda ıslaha yardımcı birçok biyoteknolojik metodun buğday ıslahında kullanılmasıyla zamandan tasarruf sağlanmış, verim ve kalite artırılmıştır. Bu biyoteknolojik yöntemlerden *in vitro* bitki rejenerasyon prosedürleri ile genetik transformasyon çalışmalarında başarı elde edilmiştir (Wu *et al.* 2003; Dejan *et al.* 2008).

SE’de rol alan genlerin ifadesi epigenetik mekanizmalar tarafından etkilenmektedir. Bu epigenetik mekanizmalardan olan DNA metilasyonu, kromatinin yeniden şekillenmesi ve miRNA’lar SE sırasında genlerin yeniden programlanmasını düzenlemektedir. Özellikle LEC ve WUS genleri, SE’nin indüksiyonunda epigenetik olarak düzenlenmektedir. DNA metilasyonu ve kromatinin yeniden şekillenmesi, somatik hücrelerde embriyogenik yeterliliğin erken tanımlanması için aday belirteçler olarak kullanılabilir. Ayrıca, epigenetik regülasyon mekanizmaları (DNA metilasyonu, kromatinin yeniden şekillenmesi ve miRNA’ların varlığı) SE indüksiyonunda görev almaktadır. Örneğin, somatik embriyogenezde aday miRNA’ların ve miRNA aracılı gen susturma mekanizmalarının tanımlanması ve araştırılmasının, bitki hücresi totipotensine yeni içgörüler sağlamasının yanı sıra somatik hücrelerin embriyogenik kapasitesini sürdürme ve geliştirme yollarının araştırılmasına rehberlik etmesi beklenmektedir (Mahdavi-Darvari *et al.* 2014). miRNA’lar ve diğer küçük kodlamayan RNA’lar (sRNA’lar), bitki gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayıp, epigenetik mekanizmayı etkilemektedir (Yakovlev and Fossdal 2017). Yine miRNA molekülleri, gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlemesine katkıda bulunmaktadır (Wójcikowska *et al.* 2020). DNA metilasyonu, bitkilerde SE kontrol eden genlerin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır (Chen *et al.* 2020). Histon asetilasyonu bitki hücrelerinin bölünmesinde ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Ancak buğday olgun embriyo kültüründe bu fonksiyon henüz tam olarak açıklanamamıştır (Bie *et al.* 2020),

January *et al.* (2002), somatik embriyogenesiste DNA metilasyonunun rolünü araştırmak için, *Medicago truncatula* bitkisinde demetilasyona sebep olan 5-Azac kimyasalını kullanarak bir çalışma yürütmüşlerdir. Somatik embriyolar üretmek için farklı dozlarda uygulanan 5-Azac'ın yüksek dozunun somatik embriyoların üretimini durdurarak rejenerasyon kapasitesinin kaybına neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Yine aynı çalışmada metillenmeye duyarlı enzimlerle yapılan analiz sonucunda, SE yeterliliğinde metilasyonla ilişkili bir bozulmanın meydana geldiği ve SE'nin belirli bir düzeyde DNA metilasyonuna bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Uddenberg *et al.* (2011) kozalaklı ağaçlarda (*Picea abies* ve *Pinus sylvestris*) TSA uygulamasının embriyogenik potansiyeli ve embriyogenesis ile ilgili LEC genlerinin ifadesini etkileyip etkilemediğini incelemişlerdir. *P. abies*'in TSA'ya maruz kaldıktan sonra, filizlenen somatik embriyoları, embriyogenik dokuyu ayırt etme yeterliliğini sağlamış ve hem somatik hemde zigotik embriyolarda erken embriyo gelişiminde LEC'in ifadesinde yüksek artış olduğunu tespit etmişlerdir.

Fraga *et al.* (2012), çalışmalarında kaymak ağacı (*Acca sellowiana*) kullanarak 5-Azac ve 2,4-D diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) kimyasallarının SE'de global DNA metilasyon seviyeleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 2,4-D içermeyen ortamda somatik embriyo oluşumunun meydana gelmediği, 2,4-D ve 5-Azac ile desteklenen ortamlarda ise somatik embriyo oluşumunun arttığı gözlemlenmiştir. Metilasyon bakımından değerlendirildiğinde SE indüksiyonu sırasında test edilen kültürlerin metilasyon seviyelerinde kademeli bir artışın olduğunu, 5-Azac uygulamasından sonra ise metilasyonun azaldığını bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda, DNA metilasyonunun *Acca sellowiana*'da SE'yi olumsuz yönde etkilediği, 5-Azac'ın ise metilasyonu doğrudan etkileyerek *Acca sellowiana*'da somatik embriyoların sayısını arttırdığını rapor etmişlerdir.

Wojcikowska *et al.* (2013), *in vitro* ortamda farklı oksin uygulamalarına *Arabidopsis* eksplantlarının morfogenez tepkilerini ve bu uygulamaların LEC2 gen ifade seviyesi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. LEC2 yüksek ifade seviyesinin, SE indüksiyonunda embriyogenik yapıları önemli derecede değiştirdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca oksin biyosentez yolunda görev alan YUCCA' ve TAA1'in SE indüksiyonunda rol aldığını ve YUCCA (YUC1, YUC4 ve YUC10) genlerinin ifade seviyelerinin LEC2 gen ifadesi ile ilişkili olduğunu ve de LEC2'nin SE'de anahtar bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır.

Nic-Can *et al.* (2013), *Coffea canephora*'da yaptıkları bir çalışmada SE'nin erken embriyogenik oluşum aşamalarında meydana gelen DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarına 5-Azac'ın etkisini araştırmışlardır. Araştırmada DNA metilasyonunun

(H3K9me2 ve H3K27me) embriyo gelişimine göre değiştiğini ve LEC1, BBM1 ifadesinin sadece SE indüksiyonundan arttığını, WOX4 geninin ifade seviyesinin ise embriyo olgunlaşması sırasında azaldığını belirtmişlerdir. Araştırma sonucunda, 5-Azac'ın hem DNA metilasyonunu hem de LEC1 ve BBM1 genlerinin ifade seviyelerini etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca WOX4 geninin H3K9me2 tarafından düzenlendiği, LEC1 ve BBM1'in ise H3K27me3 tarafından epigenetik olarak düzenlendiğini tespit etmişlerdir.

Mahdavi-Darvari *et al.* (2014), yaptıkları çalışmada erken SE belirteçleri olarak kabul edilen genleri (SERK, LEC ve WUS) incelemişlerdir. LEC ve WUS genlerinin embriyoya özgü olduğunu; SERK geninin ise somatik embriyoda ifadesinin daha az olduğunu rapor etmişlerdir.

Yakovlev *et al.* (2016), yaptıkları bir çalışmada SE'de epigenetik mekanizma ile ilgili çoklu gen modelleri için belirgin transkriptomik değişiklikleri izlemişlerdir. Bu genlerin epigenetik düzenlemede ana etken olduğunu vurgulayarak, epigenetik düzenlemede aday genler ile ilgili çalışmaların yapılmasını önermişlerdir.

Medicago sativa L. bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada embriyogenik ve embriyogenik olmayan hatlarda LEC geninin ifadesi araştırılmış ve bu araştırma sonucunda embriyogenik olmayan hatta kallus oluşumu olmasına rağmen LEC geninin ifade edilmediği, bunun aksine embriyogenik hatta ifade edildiği belirtilmiştir (Ortowska *et al.* 2017).

Bravo *et al.* (2017), SE tekniğinin odunsu bitkilerin vejetatif çoğalmasında etkili bir *in vitro* yöntem olduğunu ortaya koyarak özellikle SE'nin moleküler temelini anlaşılmaması ile bu tekniğin daha etkili olacağını savunmuşlardır. Aynı zamanda odunsu bitkilerin embriyogenesiste genlerin rollerinin olduğunu bildirerek, epigenetik bir modifikasyon olan metilasyonun, gen ifadesini kontrol eden asıl faktör olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar *Pinus radiata*'da olgunlaşmamış zigotik embriyolardan elde edilen embriyogenik ve embriyogenik olmayan hücre hatları arasındaki morfolojik ve moleküler farklılıkları incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda embriyogenik olmayan hatlarda embriyogenesis ile ilgili genlerin önemli ölçüde düşük mRNA ifade seviyelerinin ve yüksek global DNA metilasyonunun varlığını tespit etmişlerdir. Elde edilen bu sonuçlara göre DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların embriyogenesis ile ilgili genlerin ifadesini düzenlemede rolü olduğunu ve hücre farklılaşması üzerine etkilerinin olduğunu rapor etmişlerdir.

Jiang *et al.* (2017), yaptıkları çalışmada TSA'nın buğdayda DH üretimi için mikrospor kültüründeki rolünü incelemişlerdir. Optimal TSA dozlarını (0, 0.1, 0.3, 0.5 ve 10 μ M) buğday çeşitleri için belirleyerek F1 hibritlerinde doğrulamışlardır. Çalışma sonucunda hem çeşitlerde hem de F1 hibritlerinde TSA'nın DH üretiminde önemli bir artışa neden olduğunu

gözlemlemişlerdir. Bu nedenle, buğday ıslahı programlarında DH protokollerine TSA'nın dahil edilmesini savunmuşlardır.

Quinga *et al.* (2017), DNA metilasyonu ile SE arasındaki ilişkiyi araştırmak için *Theobroma cacao* L. bitkisinde yaptıkları çalışmada, genç (12 aylık), yaşlı (36 aylık) ve ekstra yaşlı (39 aylık) olgunlaşmamış çiçek tomurcuk eksplantlarında farklı dozlardaki 5-Azac uygulamalarının embriyogenik potansiyeline ve global DNA metilasyon seviyelerine olan etkilerini araştırmışlardır. Uzun süren SE'de DNA metilasyon seviyesinde artış meydana geldiği buna bağlı olarak embriyogenik potansiyelin azaldığı tespit edilmiş ve 5-Azac uygulamasından DNA metilasyonunun etkilenmediğini bildirmişlerdir. Bunun aksine yaşlı bitkide 5-Azac uygulamasının embriyogenik potansiyeli arttırdığını ve artan DNA metilasyon seviyelerinin ise SE sırasında bitki hücrelerinin maruz kaldığı stres koşullarına bir cevap olduğunu rapor etmişlerdir.

Arabidopsis bitkisinin kotiledonlarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada (Wójcikowska *et al.* 2018), histon deasetilaz inhibitörü olan TSA uygulamasının, eksojen oksin uygulaması olmadan SE üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırmada TSA ile muamele edilmiş kotiledonların verimli bir şekilde gelişen somatik embriyolar ürettiği bildirilmiştir. Yine aynı araştırmada, TSA ile muamele edilmiş eksplantlarda histon deasetilazın (HDAC) aktivitesinde önemli bir azalma gözlemlenmiş, böylece TSA ile teşvik edilen embriyogenik tepkinin histon asetilasyonu ile ilgili olduğu doğrulanmıştır. Yine bu sonuçlara ilave olarak LEC1, LEC2, BBM ve stres yanıtları (MYB118) dahil olmak üzere oksin biyosentezinde düzenleyici bir işlevi olan transkripsiyon faktörlerini (TF'ler) kodlayan genlerin ifadelerinin, TSA ile muamele edilmiş eksplantlarda arttığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar TSA'nın oksin biyosentezinde ve stres yanıtlarında düzenleyici bir işleve sahip olduğunu göstermektedir.

Osorio-Montalvo *et al.* (2018), 5-Azac'ın DNA metilasyonunu düzenlemedeki rolü hakkında araştırma yapmışlardır. Ayrıca, bu inhibitörün eksplantlarda embriyogenik potansiyelin nasıl etkilendiğini moleküler çıkarımlarla gözden geçirmişlerdir. Epigenetik mekanizmaları son zamanlarda SE sonucunu etkileyen önemli bir faktör olarak tanımlamışlardır. DNA metilasyonunun, gen ifadesindeki temel rolü nedeniyle en çok çalışılan epigenetik mekanizmalardan biri olduğunu, hipometilasyon ve hipermetilasyon arasındaki dengenin, SE'nin başarısında anahtar bir role sahip olduğunu vurgulamışlardır. Bu hususta DNA metilasyon seviyelerinin SE protokolleri sırasında DNA metilasyon inhibitörü olan 5-Azac'ın kullanılmasıyla dengelenebileceğini savunmuşlardır.

Awada *et al.* (2020), *Coffea arabica*'nın hücrelerine 1 μM TSA ile muamele etmişlerdir. Araştırma sonucunda, embriyogenik hücrelerin kontrol grubuna oranla 3 kat daha fazla arttığını rapor etmişlerdir.

Bie *et al.* (2020), buğday olgun embriyo kültüründe farklı dozlardaki TSA'nın bitki rejenerasyon üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda TSA'nın 0,5 μM dozunun embriyogenik kallus ve yeşil bitkicik oluşumunda önemli bir artışa, 2,5 μM TSA dozunun ise bir azalışa neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Castillo *et al.* (2020), iki ekmeklik buğday çeşidinde mikrospor embriyogenesi üzerine TSA'nın (0-0.4 μM) etkisini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda en yüksek mikrospor embriyogenesis etkinliğinin 0.4 μM TSA dozundan elde edildiğini bildirmişlerdir.

Chen *et al.* (2020), longan bitkisinde erken SE'de 5-Azac'ın etkisini epigenetik düzeyde araştırmışlardır. Araştırmaları sonucunda longan bitkisinde erken SE sırasında global DNA metilasyon seviyesinde bir düşüş olduğunu ve SE ile ilgili genlerin ifadelerinin değiştiğini ve de 5-Azac uygulamasının longan bitkisinde erken SE gelişimini olumlu yönde etkilediğini rapor etmişlerdir. Osorio-Montalvo *et al.* (2020), bu yaklaşımlarından yola çıkarak *Cocos nucifera* L. bitkisinde 5-Azac'ın SE süreci sırasında epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonuna ve SERK, WUS, BBM ve LEC genlerinin ifade seviyelerine olan etkisini incelemişlerdir. İnceleme sonunda özellikle 5-Azac kimyasalının 15 μM ve 20 μM dozlarının DNA metilasyonunu azaltarak SERK, WUS, BBM ve LEC genlerinin ifade seviyelerini düzenlediğini ve SE etkinliğini arttırdığını tespit etmişlerdir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bitki materyali

Araştırmada bitki materyali olarak Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edilen Kırık ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidi kullanılmıştır. Kırık, olgun embriyo kültürüne oldukça iyi cevap veren bir ekmeklik buğday çeşididir (Aydin *et al.* 2010).

In vitro Kültür Ortamlarında Kullanılan Kimyasallar

Temel besi ortamı

Temel besi ortamı olarak Murashige and Skoog (MS) (1962) tuzları kullanılmıştır. MS ortamının içerdiği kimyasallar ve miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. MS Kültür Ortamında Kullanılan Kimyasallar ve Miktarları

KİMYASAL BİLEŞİMİ	Miktarı (mg/l)
İnorganikler	
Makro elementler	
KNO ₃	1900
CaCl ₂	332,2
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄	180,7
NH ₄ NO ₃	1650
Mikro Elementler	
Na ₂ EDTA	37,26
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
KI	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Organikler	
Glisin	2
Nikotonik asit	0,5
Tiamin-HCl	0,1
Pridoksin-HCl	0,5
Myo-inositol	100

MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan kimyasallar

MS tuzlarına ve vitaminlerine ilave olarak çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. MS Tuzları ve Vitaminlerine İlave Olarak Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	Miktarı
Phytigel	2 g/l
MES hidrat (2-N-morfolino- etansulfonik asit hidrat)	1,95 g/l
Sakkaroz	20 g/l
IAA (İndol-3-Asetik Asit)	0,5 mg/l
Dikamba (3,6-Dikolorobenzoik asit)	12 mg/l
TDZ (Tidiazuron)	0,5 mg/l

İn vitro ortamda kullanılan TSA ve 5-Azac dozları

Çalışmada uygulanan TSA ve 5-Azac kimyasallarının dozları Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Buğday Olgun Embriyo Kültüründe Uygulanan TSA ve 5-Azac Dozları

Kimyasal adı	Doz (µM)
TSA	0,1, 0,5, 1,0 ve 2,0
5-Azac	5, 10, 20 ve 30

mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler

mRNA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. mRNA İfade Seviyelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Kimyasal ve Çözeltiler

RNA izolasyonunda kullanılan kimyasal ve çözeltiler
Trizol reagent
DEPC (dietilpirokarbonat)
Kloroform
Sodyum hipoklorit
Isopropanol
RNase free water
Etil alkol

Tablo 4. (Devamı)

cDNA sentezi için kullanılan kimyasal ve çözeltiler
DEPC
Revertaid first strand cDNA synthesis kit
Sodyum hipoklorit
Oligo (dT)
Ribolock RNase inhibitör
Revertaid M-MuLYRT
5x reaksiyon buffer
Nükleaz free water
Etil alkol
RT-PCR için kullanılan kimyasal ve çözeltiler
DEPC
Etil alkol
Sodyum hipoklorit
SYBR Green master mix
İleri-geri primer

Yöntem

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında aşağıda belirtilen işlemler uygulanmıştır.

***In vitro* Kültür Uygulamaları**

Sterilizasyon yöntemleri

➤ Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı

%70'lik Etil alkol (EtOH) hazırlanışı: %96'lık etil alkolden 700 ml alınarak hacim 960 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

%1'lik Sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonunun hazırlanışı: %5 NaOCl içeren ticari ACE® marka çamaşır suyundan 200 ml alınarak hacim 1000 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon ışık almaması için amber renkli şişeye doldurulup oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

➤ Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan yüzeyler (steril kabin içi) steril çalışma alanı sağlamak için kullanımdan 15 dakika önce %70'lik etil alkolle silinip canlı bitki materyali hariç diğer kullanılacak alet ve ekipmanlar (pens, bistüri vb.) yine %70'lik etil alkolden geçirilerek kabin içerisine alınıp UV lambası çalıştırılmıştır. 20 dakika sonra UV lambası kapatılıp kültüre alma

işlemi başlatılmıştır. Kullanılan aletler her kullanımdan önce etil alkol içerisine batırılıp alev den geçirilerek yüzey sterilizasyonları yapılmıştır. Alüminyum folyo içine sarılıp çalışmadan önce otoklav edilmiş kurutma kağıtları üzerinde eksplantların kesimi yapılmıştır.

➤ **Tohumların yüzey sterilizasyonu**

Tohumlar musluk suyu altında 5-10 dakika yıkanmıştır. Musluk suyunda yıkanan tohumlar %70'lik etil alkolde 5 dakika karıştırıldıktan sonra 3 kez steril saf suyla durulanmıştır. Daha sonra içerisine 1 damla Tween 20 damlatılmış %1'lik NaOCl'de (%20'lik ticari çamaşır suyu) manyetik karıştırıcı üzerinde 35 dakika steril edildikten sonra steril saf su ile arınana kadar yıkanmıştır.

➤ **Besi ortamının ve diğer bileşenlerinin sterilizasyonu**

Çalışmada kullanılan besi ortamları 105 kPa basınçta 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiş olup, vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicileri ise yüksek sıcaklıklarda bozulduğundan dolayı 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreler (milipor®) kullanılarak sterilize edildikten sonra besi ortamlarına eklenmiştir.

***In vitro* kültür ortamı için stok solüsyonların hazırlanışı**

MS makro (10X) ve MS mikro (100X) elementler ile MS demir şelat (100X) ve vitaminler (100X) için stok solüsyonlar hazırlanmıştır.

➤ **MS makro elementler için stok solüsyonunun hazırlanışı**

MS makro elementler (10X) için stok solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

a) Tablo 1'de verilen, makro elementlerin bir litredeki miktarlarının 10'ar katı hassas terazi ile tartılmıştır.

b) Sonrasında 1 litrelik erlenmayere 700 ml saf su eklenmiş ve içerisine 1 adet manyetik bar atılarak manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Makro elementler ayrı ayrı tartılarak erlenmayere eklenmiş ve elementler oda sıcaklığında eridikçe ilave edilmiş ve çözündürülmüştür. Çözünme işleminden sonra, saf su ile hacim bir litreye tamamlanmış ve karışımın ışık almasını önlemek için amber şişeye konulup 4°C'de muhafaza edilmiştir.

➤ **MS mikro elementler için stok solüsyonunun hazırlanışı**

MS mikro elementler (100X) için stok solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

- a) Tablo 1’de verilen mikro elementler başlığında $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ haricindeki diğer elementlerin 100’er katı hassas bir terazide tartılmıştır.
- b) Sonrasında 1 litrelik erlenmayere 700 ml saf su konulmuş içerisine 1 adet manyetik bar atılarak manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Mikro elementler ayrı ayrı tartılarak erlenmayere eklenmiş oda sıcaklığında eridikçe ilave edilmiş ve çözdürülmüştür. Çözünme işleminden sonra, saf su ile hacim bir litreye tamamlanmış ve karışım ışık almasını önlemek amacıyla amber şişeye konulup 4°C ’de muhafaza edilmiştir.

➤ **MS demir şelat stok solüsyonunun hazırlanışı**

MS demir şelat (100X) stok solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

- a) Tablo 1’de mikro elementler başlığında belirtilen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ miktarlarının 100 katı hassas terazide tartılmıştır.
- b) Yarım litrelik cam erlenmayer içerisine 300 ml saf su eklenmiş ve manyetik karıştırıcı üzerine konulup belirli bir ısıda karıştırılmıştır. 3,726 gram $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ tartılıp manyetik karıştırıcı üzerindeki solüsyonun içerisine ilave edilerek erimesi sağlanmıştır. Solüsyon eriyip homojen hal alınca ısıtıcı kapatılarak karıştırma işlemi sürdürülmüştür. Daha sonra solüsyonun hacmi oda sıcaklığındaki saf su ile 400 ml’ye tamamlanmıştır.
- c) 300 ml saf su ile dolu steril cam bir erlenmayere bar atılarak manyetik karıştırıcı üzerine konulup belli bir dereceye kadar ısıtılmıştır. 2,78 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılıp solüsyon içerisine eklenmiştir. Solüsyon eriyip homojen hal alınca ısıtıcı kapatılarak karıştırma işlemi sürdürülmüştür. Daha sonra solüsyonun hacmi oda sıcaklığındaki saf su ile 400 ml’ye tamamlanmıştır.
- d) Homojen hale getirilen bu iki solüsyon karıştırılmış toplam hacim oda sıcaklığındaki saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Açık sarı renge sahip olan bu stok karışımın ışık almasını önlemek amacıyla amber şişeye konularak 4°C ’de muhafaza edilmiştir.

➤ **MS vitamin stok solüsyonunun hazırlanışı**

MS vitamin stok (100X) solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

- a) Tablo 1’de organikler başlığında belirtilen bileşiklerin 100 katı tartılmıştır.
- b) 70 ml saf su ile dolu steril cam bir erlenmayere bar atılarak manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Vitaminler tartıldıktan sonra sırayla çözdürülmüştür. Daha

sonra karışımın hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve bu stok karışımın ışık almasını önlemek amacıyla amber şişeye konularak 4°C muhafaza edilmiştir.

➤ **MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan kimyasalların stok solüsyonlarının hazırlanışı**

MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak çalışmada kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 2'de verilmiştir. Bu kimyasallar tartılarak işlem görmeden ortama eklenmiştir. Çalışmada kullanılan oksin ve sitokinin gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonlarının hazırlanışı sırasıyla Tablo 5 ve Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5. Oksin Stok Solüsyonunun Hazırlanışı

Oksin Tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama Koşulu	Çalışma Konsantrasyonu
IAA	Etil alkol	Su	-20°C	1 mg/ml
Dikamba	Su/Etil alkol	Su	+4°C	1 mg/ml

Tablo 6. Sitokinin Stok Solüsyonunun Hazırlanışı

Sitokinin Tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama Koşulu	Çalışma Konsantrasyonu
TDZ	Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Su	+4°C	1 mg/ml

TSA kimyasalının stok solüsyonunun hazırlanışı

1,6536 mM TSA stok solüsyonu hazırlamak için 5 mg TSA 10 ml metanol ile çözdürülmüştür. Uygulamada kullanılan TSA dozları için stok solüsyonundan alınan miktarlar Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. TSA Deneme Dozları İçin Kullanılan Stok Solüsyon Miktarları

TSA (µM)	1 Litre Besi Ortamı için
0,1 µM	60,47 µl
0,5 µM	302,37 µl
1 µM	604,74 µl
2 µM	1,20 ml

5-Azac kimyasalının stok solüsyonunun hazırlanışı

204,918 mM 5-Azac stok solüsyonu hazırlamak için 500 mg 5-Azac kimyasalı tartılarak 10 ml asetik asit ile çözdürülmüştür. Uygulamada kullanılan 5-Azac dozları için stok solüsyonundan alınan miktarlar Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. 5-Azac Deneme Dozları İçin Kullanılan Stok Solüsyon Miktarları

5-Azac (μM)	1 Litre Besi Ortamı için
5 μM	24,4 μl
10 μM	48,8 μl
20 μM	97,6 μl
30 μM	146,4 μl

Kültür ortamının hazırlanması

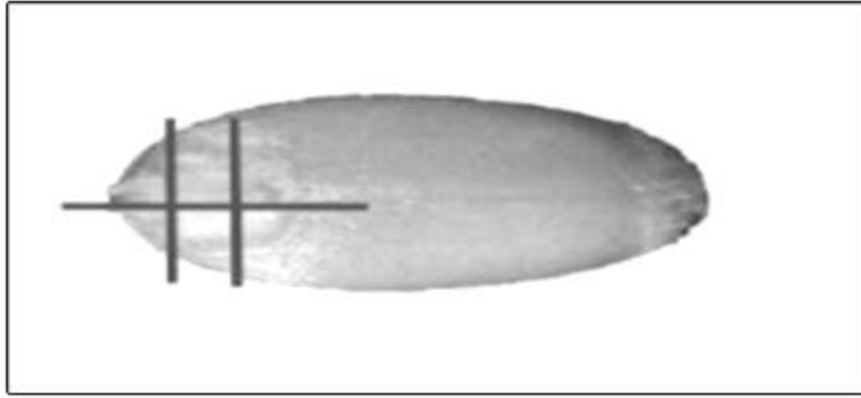
Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. İçerisinde manyetik bar bulunan 1 l'lik behere 600 ml bidistile su konularak manyetik karıştırıcı üzerine alınmıştır. Daha sonra beher içerisine;
 - a) MS makro element stok solüsyonundan (10X) 100 ml,
 - b) MS mikro element stok solüsyonundan (100X) 10 ml
 - c) MS demir şelalattan (100X) 10 ml eklenip karıştırılmaya devam edilmiştir.
2. Sonrasında hassas terazide 20 g sakkaroz ve 1,95 g MES tartılıp beher içerisine eklenerek çözdürülmüştür. Karışımın hacmi bidistile su ile 950 ml tamamlanmış ve 1N NaOH veya 0,1 N HCl çözeltisi ile pH:5,8'e ayarlanmıştır.
3. Son hacim saf su ile 985 ml'ye tamamlanmıştır.
4. 1 l'lik bir şişe içerisine ilk olarak 2 g jel yapıcı madde (phytagel) tartılıp konulmuştur. Üzerine beher içinde hazırlanmış olan karışım eklenmiş ve sterilizasyon işlemi için otoklava alınıp 105 kPa basınçta 121°C'de 20 dk sterilize edilmiştir.
5. 10 ml MS vitamin stok solüsyonu (10X) ile diğer kimyasal ve bitki büyüme düzenleyicilerinden gerekli miktarlar alınarak 50 ml'lik bir behere konulmuş üzeri saf su ile 15 ml'ye tamamlanmıştır ve otoklav bitene kadar 4°C'de bekletilmiştir.
6. Otoklav işlemi bittikten sonra besi yerinin sıcaklığı 40-45°C'ye düşürülmüş ve yüksek ısıdan bozulan vitamin, kimyasal ve bitki büyüme düzenleyiciler 0,2 μm porotizeteli selüloz nitrat filtrelerden (Agilent) geçirilip besi yerine ilave edilmiştir.

***In vitro*'da TSA ve 5-Azac kimyasallarının uygulanması**

Araştırmada endosperm destekli olgun embriyo kültürü için aşağıda belirtilen kültür aşamaları uygulanmıştır (Aydın *et al.* 2011).

- a) Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumların olgun embriyoları tohum üzerinden ayrılmadan 6 parçaya bölünmüştür (Şekil 12.).



Şekil 12. Sterilizasyon sonrası su emdirilmiş tohumun embriyosunun kesim kısımlarının gösterimi

- b) Kallus oluşumu için 6 parçaya bölünmüş embriyolar, biri kontrol olmak üzere farklı dozlardaki TSA (0,1, 0,5, 1, 2 μ M) (Uddenberg *et al.* 2011, Jiang *et al.* 2017) ve 5-Azac (5, 10, 20, 30 μ M) (Nic-can *et al.* 2013, Quinga *et al.* 2017) içeren kallus oluşum ortamında (KO) [Murashige and Skoog (1962) temel besi ortamı + 12 mg/l dikamba + 0,5 mg/l IAA + 1,95 mg/l MES hidrat, 2 g/l phytagel, 30 g/l sakkaroz] (Aydin *et al.* 2011) $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de karanlık şartlarda 14 gün süreyle petri kutularında kültüre alınmıştır. Araştırmada incelenen uygulamalar aşağıda özetlenmiştir.

Uygulama

Açıklama

Kontrol	KO
0,1 μ M TSA	KO + 0,1 μ M TSA
0,5 μ M TSA	KO + 0,5 μ M TSA
1,0 μ M TSA	KO + 1,0 μ M TSA
2,0 μ M TSA	KO + 2,0 μ M TSA
5,0 μ M 5-Azac	KO + 5,0 μ M 5-Azac
10,0 μ M 5-Azac	KO + 10,0 μ M 5-Azac
20,0 μ M 5-Azac	KO + 20,0 μ M 5-Azac
30,0 μ M 5-Azac	KO + 30,0 μ M 5-Azac

- c) 14. günün sonunda oluşan olgun embriyo kaynaklı kalluslar, TSA ve 5-Azac içermeyen kallus oluşum ortamında aynı kültür şartlarında alt kültüre alınarak kültür süresi 28 güne tamamlanmıştır.
- d) 28. gün sonunda meydana gelen kalluslar tohumlardan ayrılarak bitki rejenerasyonu için 14 gün hormonsuz bitki rejenerasyon ortamında [Murashige and Skoog (1962) temel besi ortamı + 1,95 mg/l MES hydrate + 2 g/l phytagel + 30 g/l sakkaroz] $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 16:8 saat fotoperiyotta kültüre alınmıştır. Bu işlemin ardından kalluslar bu ortama ilave olarak 0,5 mg/l TDZ içeren ortamda yine 14 gün süre ile alt kültüre

alınmıştır. Işık kaynağı olarak floresan lambası kullanılmış ve ışık yoğunluğu 60 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ olarak ayarlanmıştır.

- e) Rejenerasyon sonunda meydana gelen bitkicikler hormonsuz bitki rejenerasyon ortamı içeren Magenta kutularında 10-12 cm oluncaya kadar aynı kültür şartlarında büyütülmüştür. 10-12 cm boyundaki bitkiler torf içeren saksılara aktarılarak aklimasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada incelenen *In vitro* karakterler

Kallus oluşum oranı (KOO) (%)

Kallus kültür süresi sonunda aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Aydin 2010).

$$\text{KOO (\%)} = (\text{Toplam kallus sayısı} / \text{Eksplant sayısı}) \times 100$$

Kallus ağırlığı (KA) (mg)

Kallus kültür süresi sonunda aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{KA (mg)} = \text{Toplam kallus ağırlığı (mg)} / \text{Kallus sayısı}$$

Embriyogenik kallus oluşum oranı (EKO) (%)

Embriyogenik kallus, sert dokulu, dağılabilir özellikte, sıkı (pütürlü) yapılı ve embriyo oluşturma kapasitesine sahip kalluslardır. Kallus kültür süresi sonunda aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Aydin 2010).

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

Cevap veren embriyogenik kallus oranı (CEKO) (%)

Rejenerasyon kültür süresi sonunda aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Aydin 2010).

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

*: Bitkicik oluşturan embriyogenik kallus.

Eksplant başına rejenere bitki sayısı (EBBS) (Adet)

Rejenerasyon kültür süresi sonunda aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Aydin 2010).

$$\text{EBBS} = \text{Toplam rejenere bitki sayısı} / \text{Eksplant sayısı}$$

***İn vitro* verilerin istatistiksel analizi**

Araştırmada, kallus oluşum oranı (%), kallus ağırlığı (mg), embriyogenik kallus oluşum oranı (%), cevap veren embriyogenik kallus oranı (%) ve eksplant başına rejenere bitki sayısı (adet) ile ilgili veriler elde edilmiştir.

Araştırma, Tam Şansa Bağlı Deneme Desenine göre 4 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Araştırmada her petri kutusu bir tekerrür olarak kabul edilmiş ve her petri kutusundan 15 adet olgun embriyo kullanılmıştır. Doku kültürü parametrelerine ait veriler tam şansa bağlı deneme planına göre SAS (Version 9.3 for Windows) istatistik programında PROG GLM modelde tekyönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesi

Moleküler çalışmada kullanılacak örnekler, 14, 28 ve 42 günlük kalluslardan alınmış ve RNA izalasyonu yapılmak üzere -80°C’ de muhafaza edilmiştir.

Gen ifadesinin analizi

RNA İzolasyonu

- Buğdaydan RNA izolasyonu yapmak için Trizol reagent (Invitrogene, USA) kullanılmıştır.
- Çalışmaya başlamadan önce çalışılacak ortam ve kullanılacak alet ve ekipmanlar %70’lik etil alkol ve DEPC ile steril edilmiştir.
- 100 mg bitki örnekleri tartılıp havanlar içerisinde sıvı azot yardımıyla öğütülüp toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekler steril ependorf tüplere alınarak sıvı azot içerisine bırakılmıştır.
- Sıvı azottan alınan tüplerin kapakları atmayı önlemek amacı ile açılmıştır.
- Tüplerin üzerine 1 ml Trizol reaktifi (Invitrogene, USA) eklenmiştir.
- Trizol reaktifi eklenen örnekler nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışmasını sağlamak için 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek sonrasında 30 saniye boyunca vortekslenmiştir.
- Her bir ependorf tüpüne 0,2 ml kloroform eklenmiştir.
- Kapaklar sıkıca kapatılarak hızlı bir şekilde elle 15 saniye çalkalanmış ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında tüpler 4 °C’de 10 dakika 15000 rpm’de santrifüj edilmiştir.

- Üstteki sıvı faz yeni bir steril ependorf tüpe alınıp üzerine RNA'nın çökmesini sağlamak için isopropanol eklenmiştir. Örnekler -20 °C'de 20 dakika muhafaza edildikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 15000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atılarak %75'lik etil alkolden 1 ml kullanılarak RNA çökeltisinin yıkama işlemi yapılmıştır. Örnekler vorteks ile karıştırılarak 5 dakika 1000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası üst faz dökülüp oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
- Tüm bu işlemler sonunda RNA peleti oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve 30 µl RNase Free Water ile çözülüp 10 dakika 55-60 °C'de bekletilip kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.
- Elde edilen RNA'ların miktarlarını belirlemek için Nanodrop'ta (Qiagen) A_{260/280} absorpsiyon oranındaki ölçümler alınmıştır. RNA miktarları okunduktan sonra tüm örneklerin miktarları 0,5 µg olacak şekilde ayarlanmıştır.

cDNA analizi

- cDNA sentezi için üretici firma RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (K1621, Thermo Scientific) protokolüne göre şu işlemler uygulanmıştır.
- Hacimleri 0,1 ng olacak şekilde toplam RNA alınıp steril tüplere konulmuştur.
- Ardından RNA bulunan steril tüpe 1 µl oligo (dT) primer eklenerek toplam hacim 12 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım çok kısa santrifüj edildikten sonra 65 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Süre sonunda her tüpe, 4 µl 5X Reaksiyon Buffer, 1 µl RevertAid M-MuLV RT, 2 µl 10 mM dNTP Mix ve 1 µl RiboLock RNase Inhibitor eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.
- Örnekler çok kısa santrifüj edildikten sonra PCR cihazına yerleştirilmiştir. 25 °C'de 5 dakika, 42 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 5 dakika tutulmuştur.
- Elde edilen cDNA'lar qRT-PCR' da kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

qRT-PCR analizi

qRT-PCR işlemini gerçekleştirmek için SYBR Green/Hi-ROX (BIO-73005, Bioline) qPCR Kiti kullanılmıştır. Protokol üretici firmanın talimatları doğrultusunda aşağıdaki gibi yapılmıştır. Stok master mix aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır (Tablo 9)

Tablo 9. Q-PCR Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan Malzemeler	Miktarlar
SYBR Green/Hi-ROX QPCR Master Mix (2X)	10 µl
İleri Primer (0,3 µM)	0,8 µM
Geri Primer (0,3 µM)	0,8 µM
cDNA	4 µl
Steril Su	4,4 µl
Son Hacim	20 µl

Karışım PCR tüplerine aktarılarak ve Qiagen Rotor Gene cihazına yerleştirilmiştir. 95°C’de 2 dk, 40 döngü olacak şekilde 95°C’de 5 sn, primerlerin bağlanma sıcaklıklarına göre de 10 sn, 72°C’de 5 sn tutulmuştur.

Primerlerin hazırlanması

- *Triticum aestivum* genomunda yapılan biyoinformatik çalışmalar ile ilgili veri tabanlarından yararlanılarak *WOX4*, *LEC1*, *BBM1* ve *TaSERK* genlerine ait yeni bilgiler aday gen için primer tasarımı kullanılmıştır.
- Diğer bitkilerde bulunan bu seçilen genlerin protein sekansları kullanılmış ve NCBI-BLAST veri tabanı taramaları yapılarak EST protein dizileri belirlenmiştir.
- İlk olarak belirlenen protein dizileri arasında en çok benzerlik gösterenler diziler seçilmiştir.
- Böylece tarama yapılan EST dizileri ile *Triticum aestivum* proteinlerinin ne oranda benzerlik gösterdiği saptanmıştır.
- Sonrasında ise benzerlik oranı yüksek olan dizilerden ileri ve geri primer dizaynı yapılmıştır. *WOX4*, *LEC1*, *BBM1* ve *TaSERK* genlerinin ortologları bulunarak tespit edilmiştir.
- Son olarak Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) çevrimiçi programı yardımıyla primerler tasarlanmış ve hedef genler ile referans genlere ait ileri ve geri primer dizilimleri aşağıda belirtilmiştir (Tablo 10).
- Kullanılan primerler firmanın belirttiği miktarda sulandırılıp stok solüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra uygun hesaplamalar ile 1 µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

Tablo 10. Kullanılan Primerlerin Baz Dizilimi ve Tm Sıcaklıkları

Primerler	İleri (5' →3')	Geri (5' →3')	Tm sıcaklığı (°C)
WOX4	AGCAGATCAACAGTGCAGGA	GAAGAGCTCCAGGGTGACAT	59
LEC1	GCCAGCAGCAGAAGAATCG	CGCGACTAGCCAGATTGGA	58
BBM1	CAAGGGAGCCACCCACAG	AGCCCTGGGAGAGCTCGTA	62
TaSERK	CGGGTGGTGTGGAGGATTGAATG	CGAGCCAGTTGATGGAACCGCTC	57
ACTIN	GGCTGATGAGGATGTTCAACC	CCACCGATCCAGACACTGTA	58

Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi

Gen ifadesinin analizi sonucunda örneklerin eşik (threshold) değerleri belirlenmiştir. qRT-PCR analiz sonuçlarına göre örneklerin Ct değerlerine ait standart sapmalar Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Standart sapması düşük olan örnekler 3 tekerrür üzerinden değerlendirilmiştir. Buğday çeşidine ait genlerin ifade oranları Livak ve Schmittgen (2001)'e göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ oransal hesaplama algoritması ile belirlenmiştir. Örneklerin herbiri iki teknik kopya halinde analiz edilmiştir. qRT-PCR analizinde genlerin ifadesi referans gen ifadesine göre gerçekleştirilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI

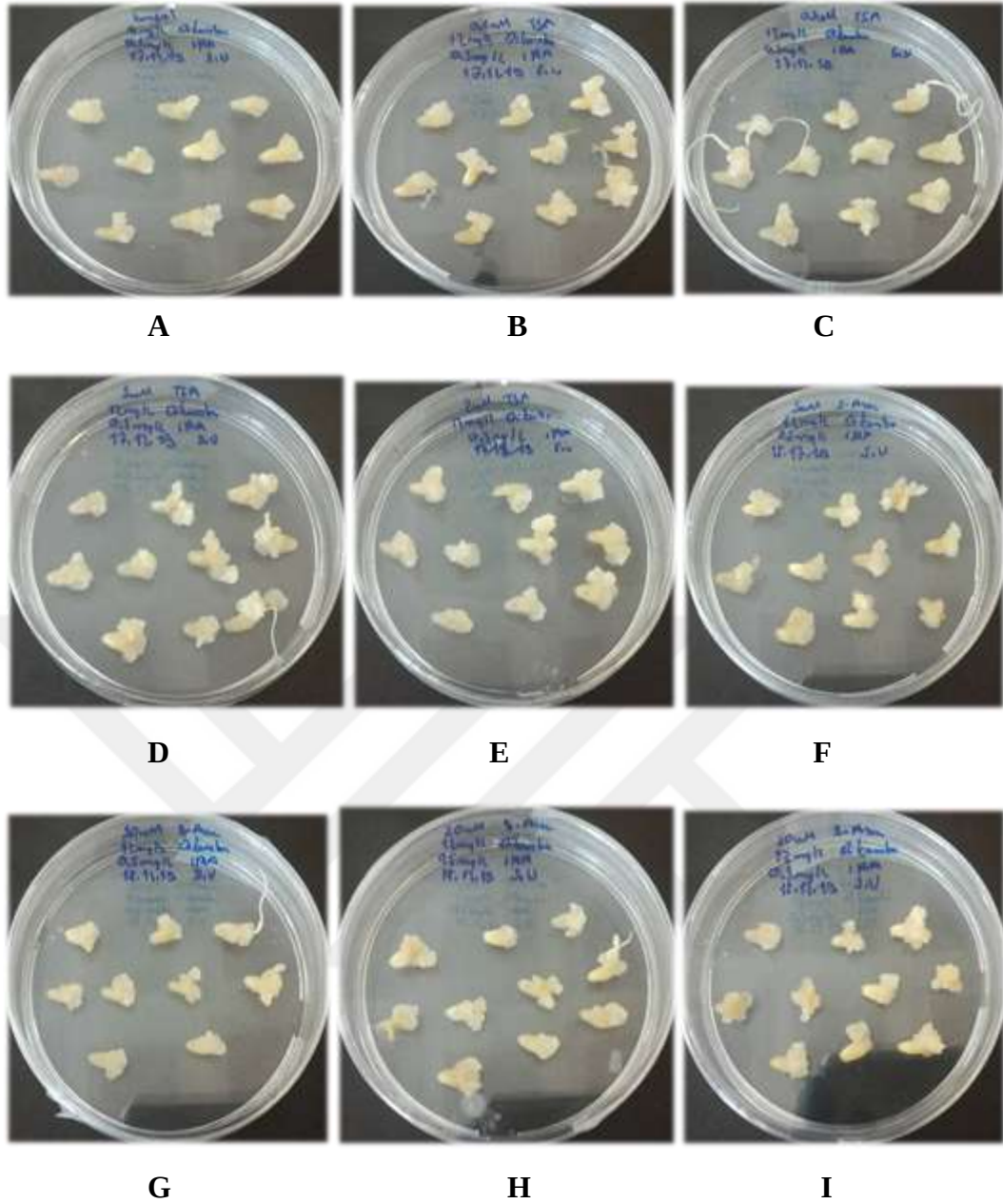
Bu araştırmada buğdayda olgun embriyo kültüründe epigenetik düzenlemede rolü olduğu bilinen TSA (0,1, 0,5, 1,0 ve 2,0 μ M) ve 5-Azac (5, 10, 20 ve 30 μ M) kimyasallarının farklı dozları ile kontrol uygulamasından oluşan dokuz farklı uygulamanın kallus oluşum oranı (%), embriyogenik kallus oluşum oranı (%), cevap veren embriyogenik kallus oranı (%) ve eksplant başına rejenere bitki sayısı (adet) parametrelerine olan etkisi ve SE ile ilişkisi olduğu bilinen bazı genlerin (WOX4, LEC1, BBM1, TaSERK) ifadesi üzerine olan etkileri belirlenmiş ve aşağıda açıklanan bulgulara ulaşılmıştır.

In vitro Karakterlere Ait Analiz Sonuçları

Araştırmada incelenen kallus oluşum oranı (%), embriyogenik kallus oluşum oranı (%), cevap veren embriyogenik kallus oranı (%) ve eksplant başına rejenere bitki sayısına (adet) ait sonuçlar Tablo 11’de verilmiştir. Tüm uygulamalarda kallus oluşum oranı %100 olmuştur (Şekil 13). Diğer parametrelere ait sonuçlar aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

Tablo 11. Uygulamalara Göre Kallus Ağırlığı (KA) (mg), Kallus Oluşum Oranı (KOO) (%), Embriyogenik Kallus Oluşum Oranı (EKOO) (%), Cevap Veren Embriyogenik Kallus Oranı (CEKO) (%) ve Eksplant Başına Rejenere Bitki Sayısı (EBBS)(adet) (ortalama $\pm$ SE)

Uygulama	KOO (%)	KA (mg)	EKOO (%)	CEKO (%)	EBBS (adet)
Kontrol	100 $\pm$ 0,0	122,5 $\pm$ 4,8	82,5 $\pm$ 2,5	67,5 $\pm$ 2,5	3,0 $\pm$ 0,2
0,1 μM TSA	100 $\pm$ 0,0	115,0 $\pm$ 2,9	82,5 $\pm$ 2,5	70,0 $\pm$ 0,0	3,5 $\pm$ 0,1
0,5 μM TSA	100 $\pm$ 0,0	141,3 $\pm$ 1,3	90,0 $\pm$ 0,0	90,0 $\pm$ 0,0	4,7 $\pm$ 0,1
1,0 μM TSA	100 $\pm$ 0,0	127,3 $\pm$ 9,2	77,5 $\pm$ 2,5	77,5 $\pm$ 4,8	3,7 $\pm$ 0,1
2,0 μM TSA	100 $\pm$ 0,0	137,5 $\pm$ 2,5	70,0 $\pm$ 0,0	67,5 $\pm$ 2,5	3,3 $\pm$ 0,2
5,0 μM 5-Azac	100 $\pm$ 0,0	110,0 $\pm$ 5,8	90,0 $\pm$ 0,0	90,0 $\pm$ 0,0	4,8 $\pm$ 0,1
10,0 μM 5-Azac	100 $\pm$ 0,0	124,8 $\pm$ 4,9	80,0 $\pm$ 0,0	75,0 $\pm$ 2,9	4,2 $\pm$ 0,1
20,0 μM 5-Azac	100 $\pm$ 0,0	95,0 $\pm$ 2,9	72,5 $\pm$ 2,5	62,5 $\pm$ 2,5	3,5 $\pm$ 0,1
30,0 μM 5-Azac	100 $\pm$ 0,0	97,0 $\pm$ 6,2	65,0 $\pm$ 2,9	57,5 $\pm$ 2,5	3,1 $\pm$ 0,1
Ortalama	100 $\pm$ 0,0	118,9 $\pm$ 3,0	78,9 $\pm$ 1,5	73,1 $\pm$ 1,9	3,7 $\pm$ 0,1



Şekil 13. Uygulamalarda meydana gelen 14 günlük kallusların genel görünümeleri
(A) Kontrol, (B) 0,1 μ M TSA, (C) 0,5 μ M TSA, (D) 1,0 μ M TSA, (E) 2,0 μ M TSA, (F) 5 μ M 5-Azac, (G) 10 μ M 5-Azac, (H) 20 μ M 5-Azac, (I) 30 μ M 5-Azac

Kallus ağırlığı (KA) (mg)

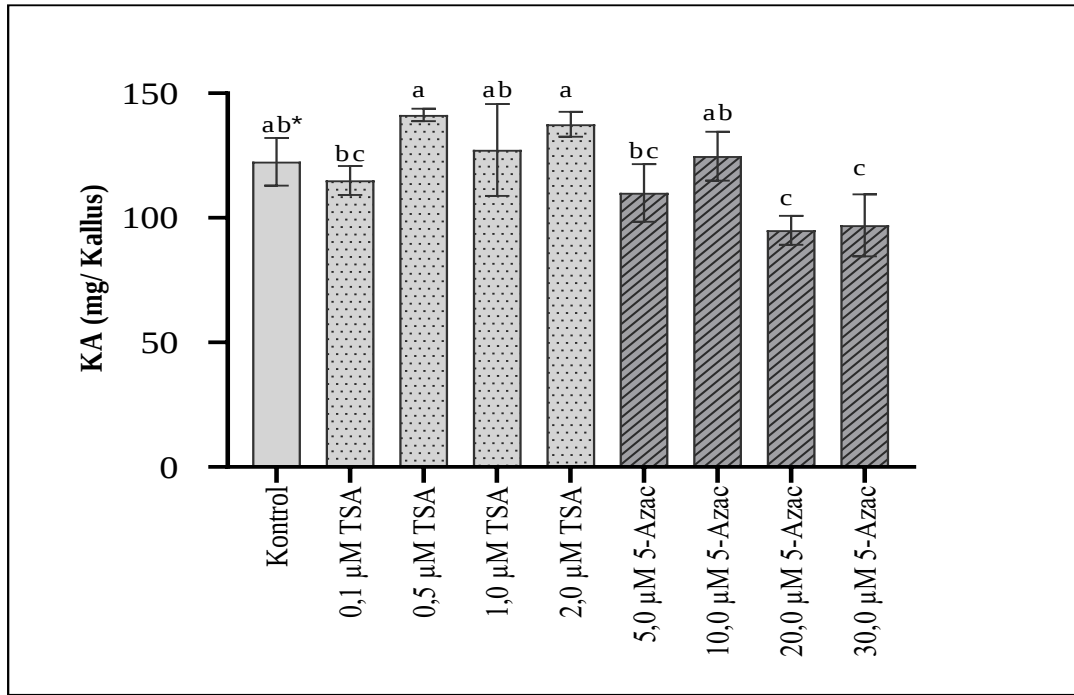
Kallus ağırlığı (KA) üzerine uygulamaların etkisi çok önemli ($p < 0,01$) bulunmuştur (Tablo 12). Uygulamaların etkisi karşılaştırıldığında uygulamalara ait KA değeri 95,0 mg ile 141,3 mg arasında değişmiştir (Tablo 11). En yüksek KA, 0,5 μ M TSA (141,3 mg) uygulamasında elde edilmiş olup bunu 2,0 μ M TSA (137,5 mg) uygulaması takip etmiştir. Her iki uygulama arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 14). En düşük kallus ağırlığı ise sırasıyla 20,0 μ M 5-Azac (95,0 mg) ve 30,0 μ M 5-Azac (97,0 mg) uygulamalarında belirlenmiş ve aralarındaki farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, kallus ağırlığı

bakımından 10,0 μ M 5-Azac (124,8 mg), 1,0 μ M TSA (127,3 mg) ve kontrol (122,5 mg) uygulamaları arasındaki farkın önemsiz olduğu kaydedilmiştir (Şekil 14).

Tablo 12. Kallus Ağırlığına Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	P
Uygulama	8	1053,813	10,346	0,000**
Hata	27	101,861		
Toplam	36			

** : Çok önemli ($p < 0,01$)



Şekil 14. Uygulamaların kallus ağırlığı üzerine etkisi

*Farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemlidir ($p < 0,05$)

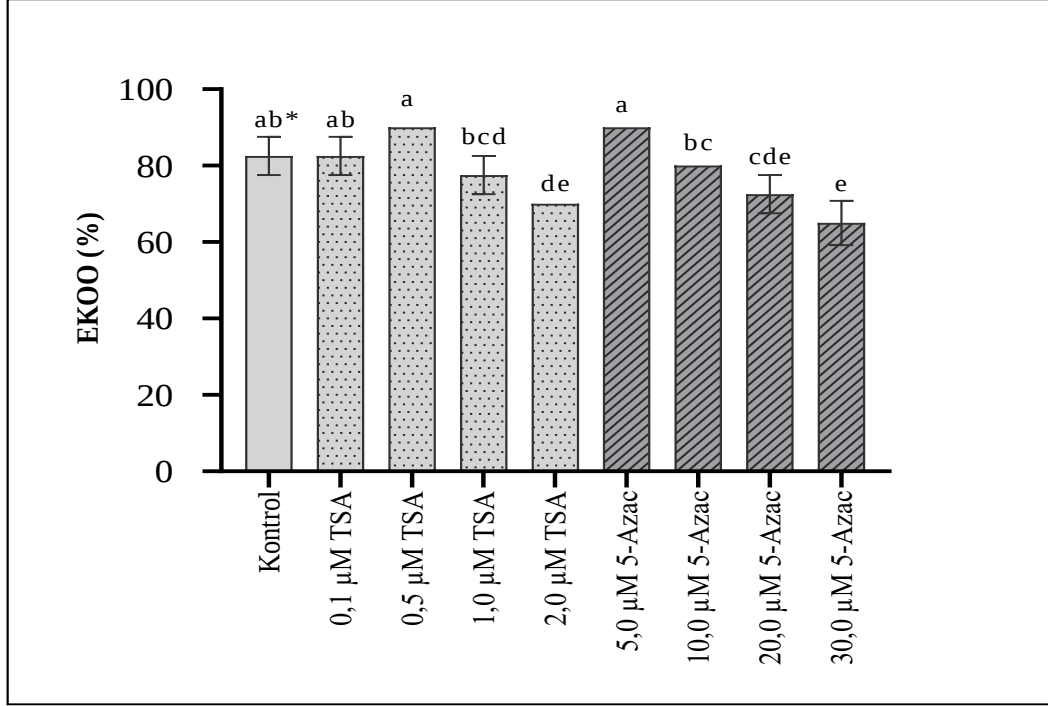
Embriyogenik Kallus Oluşum Oranı (EKOO) (%)

Embriyogenik kallus oluşum oranı (EKOO) üzerine uygulamaların etkisi çok önemli ($p < 0,01$) bulunmuştur (Tablo 13). Uygulamaların etkisi karşılaştırıldığında uygulamalara ait EKOO değeri %65,0 ile %90,0 arasında değişmiştir (Tablo 11). En yüksek EKOO %90,0 ile 0,5 μ M TSA ve 5,0 μ M 5-Azac uygulamalarından elde edilmiştir (Şekil 15). En düşük embriyogenik kallus oluşumu ise sırasıyla 30,0 μ M 5-Azac (%65,0) ve 2,0 μ M TSA (%70,0) uygulamalarında belirlenmiştir. Diğer taraftan, EKOO bakımından 0,1 μ M TSA (%82,5) ve kontrol (%82,5) uygulamaları arasındaki farkın önemsiz olduğu kaydedilmiştir (Şekil 15 ve 16).

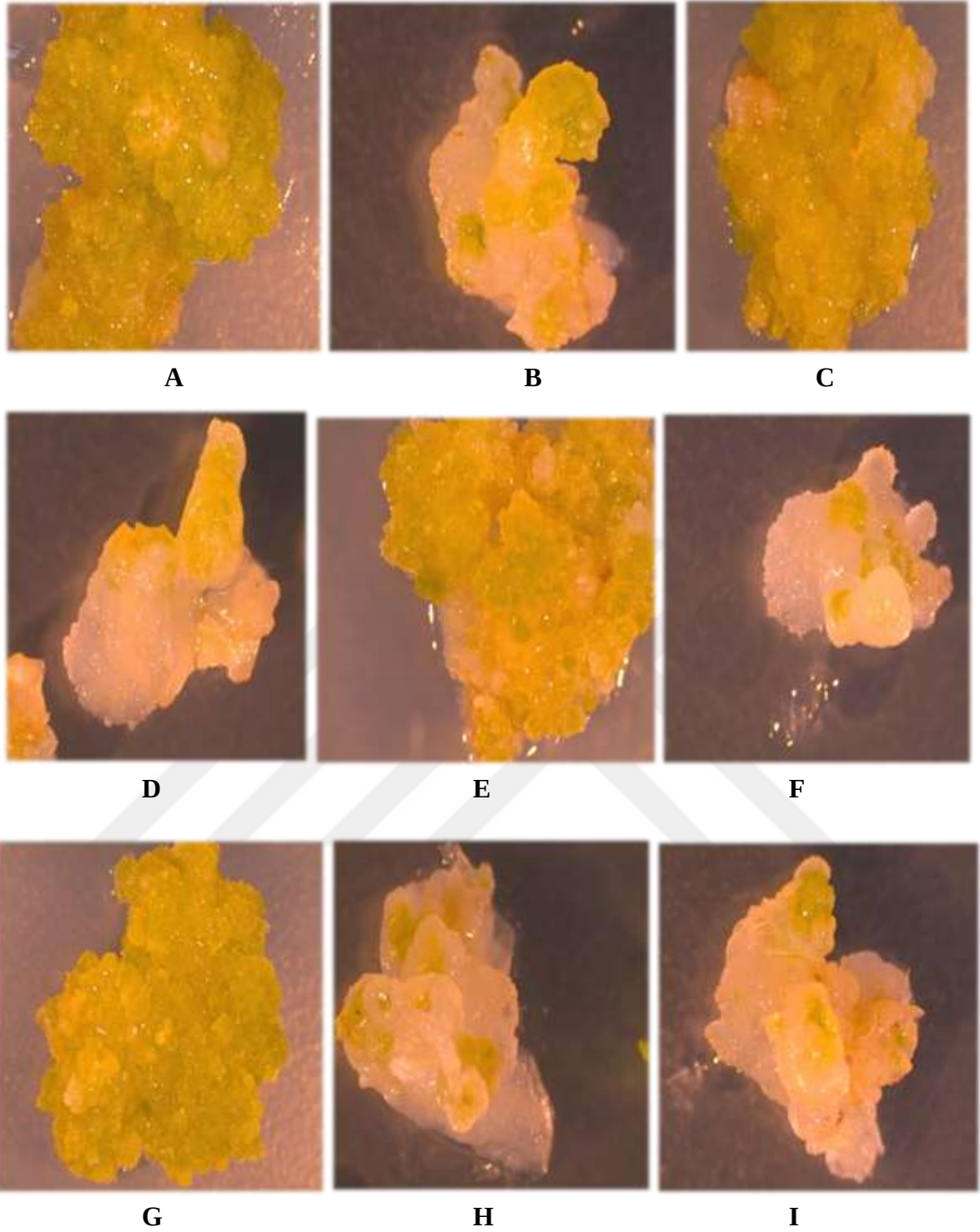
Tablo 13. Embriyogenik Kallus Oluşum Oranına Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Uygulama	8	294,444	19,875	0,000**
Hata	27	14,815		
Toplam	36			

** : Çok önemli ($p < 0,01$)

**Şekil 15.** Uygulamaların embriyogenik kallus oluşum oranına etkisi

*Farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 16. Uygulamalarda meydana gelen embriyogenik kallusların genel görünüşleri
(A) Kontrol, (B) 0,1 µM TSA, (C) 0,5 µM TSA, (D) 1,0 µM TSA, (E) 2,0 µM TSA, (F) 5 µM 5-Azac, (G) 10 µM 5-Azac, (H) 20 µM 5-Azac, (I) 30 µM 5-Azac

Cevap Veren Embriyogenik Kallus Oranı (CEKO) (%)

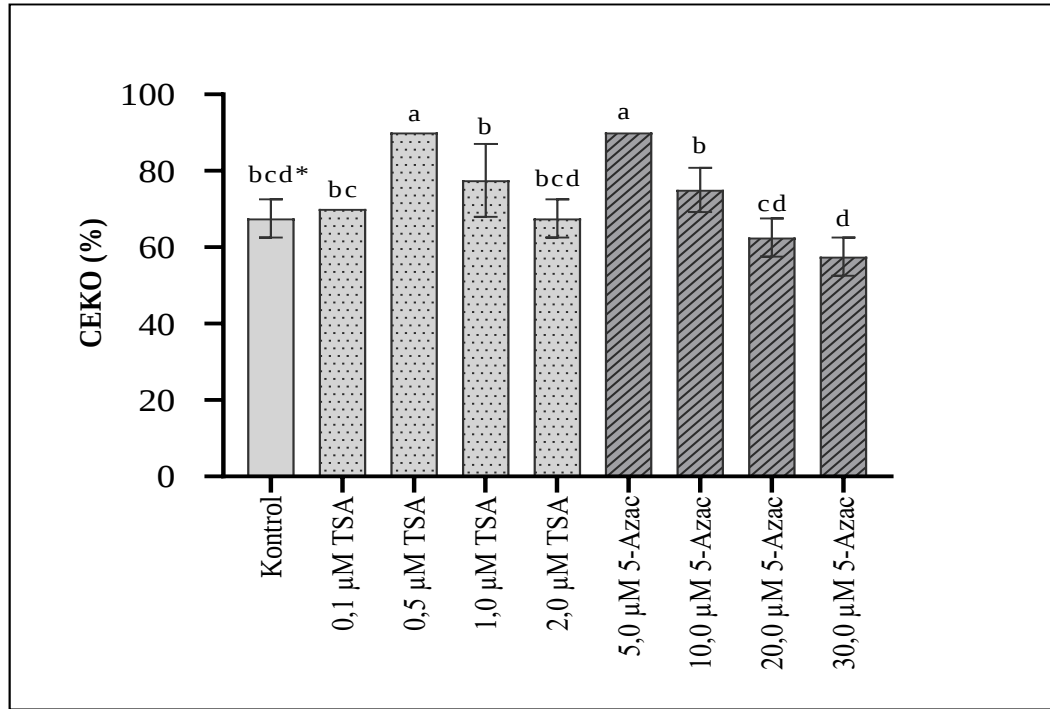
Cevap veren embriyogenik kallus oranı (CEKO) üzerine uygulamaların etkisi çok önemli ($p < 0,01$) bulunmuştur (Tablo 14). Uygulamalara göre cevap veren embriyogenik kallus oranı %57,5 ile %90,0 arasında değişmiştir (Tablo 11). En yüksek CEKO %90,0 ile 5,0 µM 5-Azac ve 0,5 µM TSA uygulamalarından elde edilmiştir (Şekil 17). En düşük cevap veren

embriyogenik kallus oranı ise 30,0 μ M 5-Azac'da (%57,5) belirlenmiş olup bunu 2,0 μ M 20,0 μ M 5-Azac (%62,5), 2 μ M TSA (%67,5) uygulamaları izlemiştir. Diğer taraftan, CEKO üzerine kontrol (%67,5) ile 2 μ M TSA (%67,5) uygulamalarının etkisi aynı olmuştur (Şekil 17 ve 18).

Tablo 14. Cevap Veren Embriyogenik Kallus Oranına Ait Varyans Analiz Sonuçları

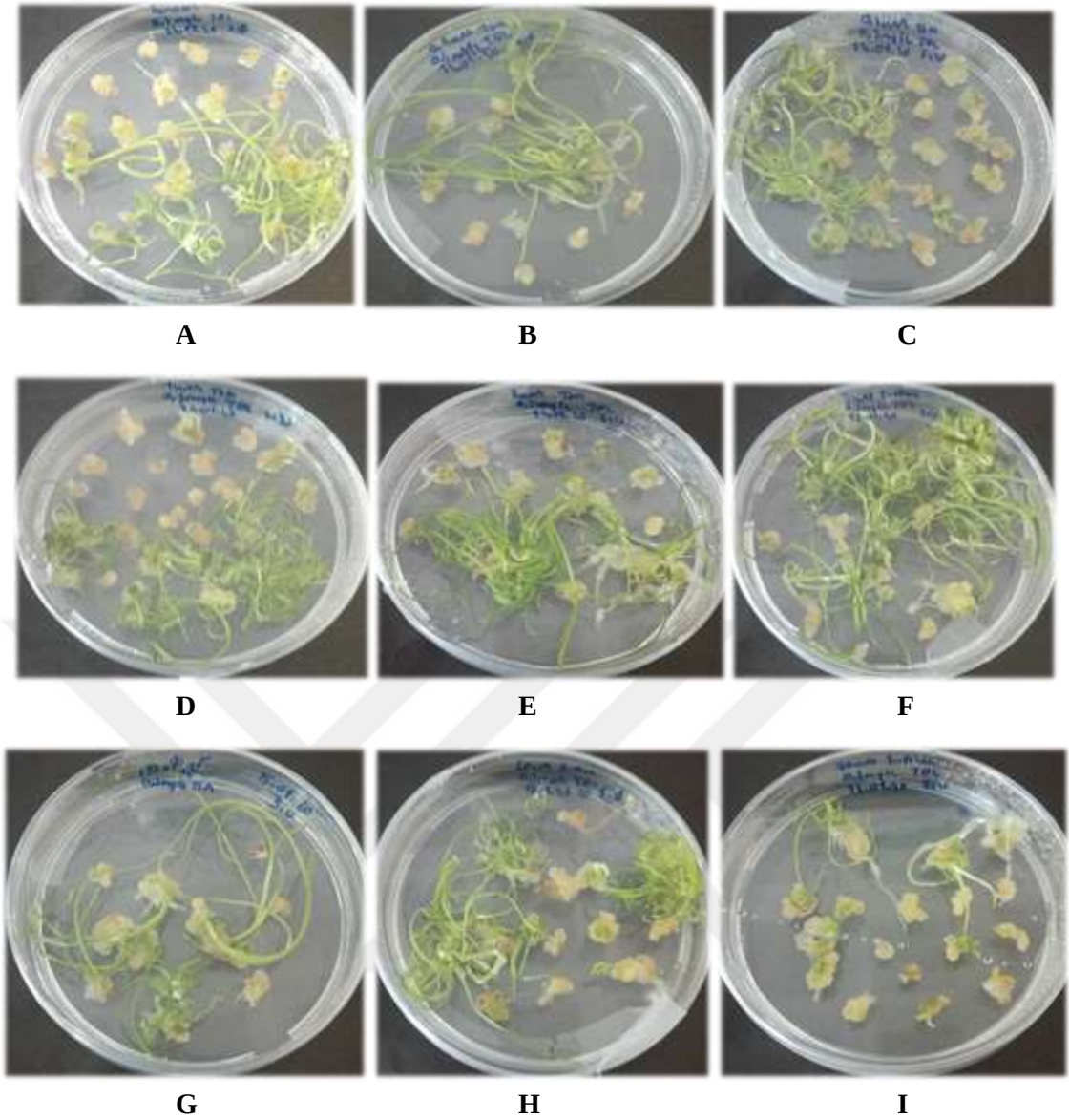
Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Uygulama	8	511,111	20,444	0,000**
Hata	27	25,000		
Toplam	36			

** : Çok önemli ($p < 0,01$)



Şekil 17. Uygulamaların cevap embriyogenik kallus oranına etkisi

*Farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 18. Uygulamalarda meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri (A) Kontrol, (B) 0,1 μ M TSA, (C) 0,5 μ M TSA, (D) 1 μ M TSA, (E) 2 μ M TSA, (F) 5 μ M 5-Azac, (G) 10 μ M 5-Azac, (H) 20 μ M 5-Azac, (I) 30 μ M 5-Azac

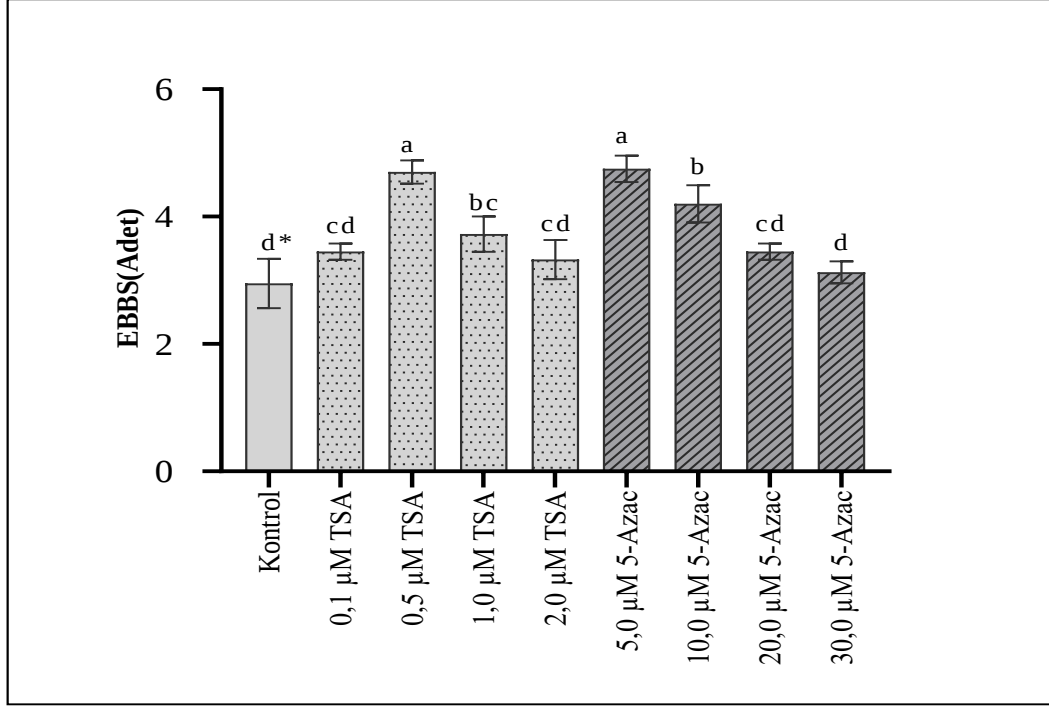
Eksplant Başına Rejenere Bitki Sayısı (EBBS) (adet)

Eksplant başına rejenere bitki sayısı üzerine uygulamaların etkisi çok önemli ($p < 0,01$) bulunmuştur (Tablo 15). Uygulamalara ait EBBS değeri 3,0 ile 4,8 adet arasında değişmiştir (Tablo 11). En yüksek etki 5,0 μ M 5-Azac (4,8 adet) uygulamasından elde edilmiş, bunu 0,5 μ M TSA (4,7 adet) uygulaması izlemiştir. Her iki uygulama arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 19). En düşük eksplant başına bitki sayısı ise 30,0 μ M 5-Azac (3,1 adet) uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 19 ve 20). Diğer taraftan, EBBS bakımından uygulamalar arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 15. Eksplant Başına Bitki Sayısına Ait Varyans Analizi Sonuçları

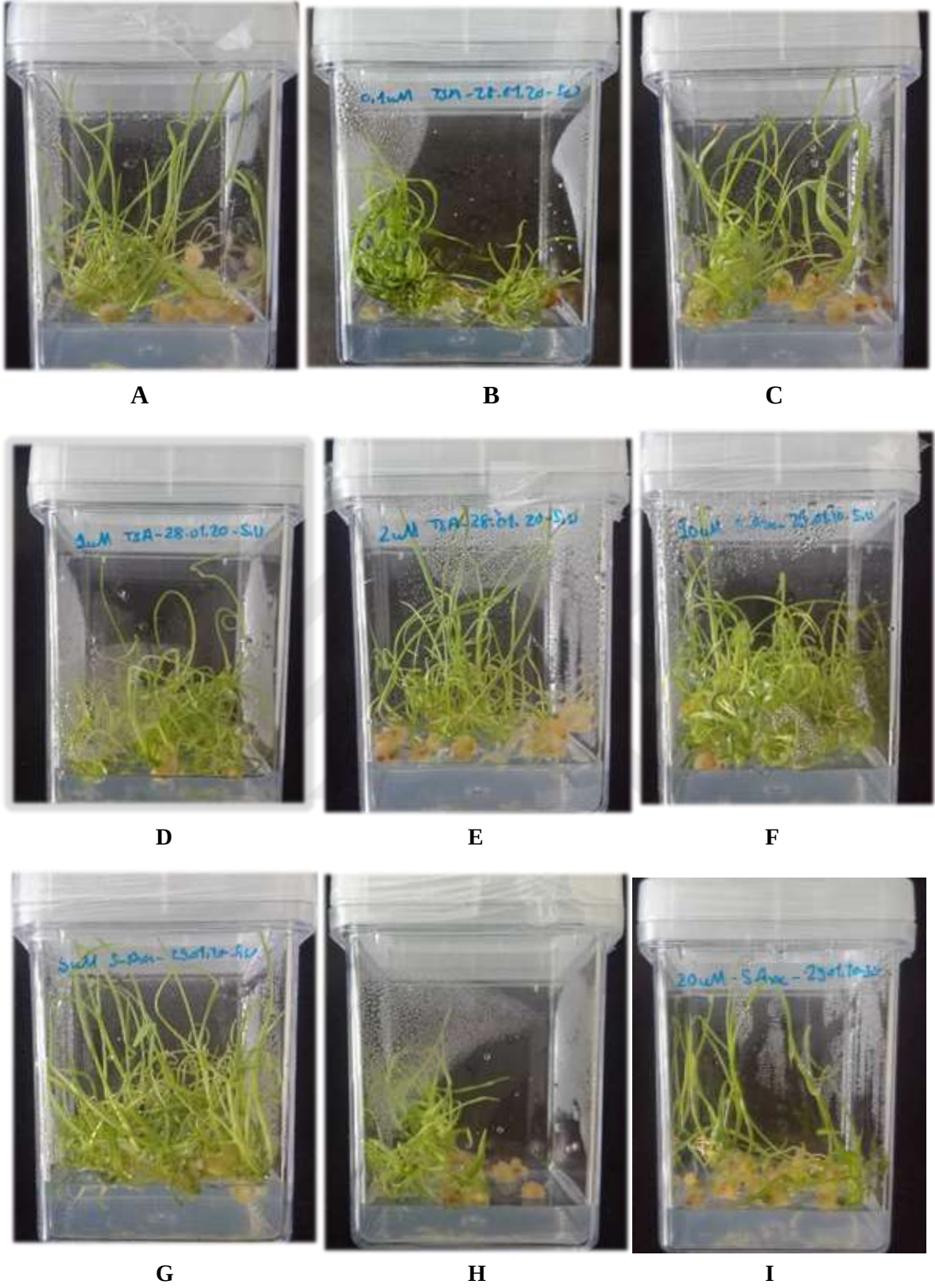
Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F	p
Uygulama	8	1,748	28,736	0,000**
Hata	27	0,061		
Toplam	36			

** : Çok önemli ($p < 0,01$)



Şekil 19. Uygulamaların eksplant başına bitki sayısına etkisi

*Farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemlidir ($p < 0,05$)



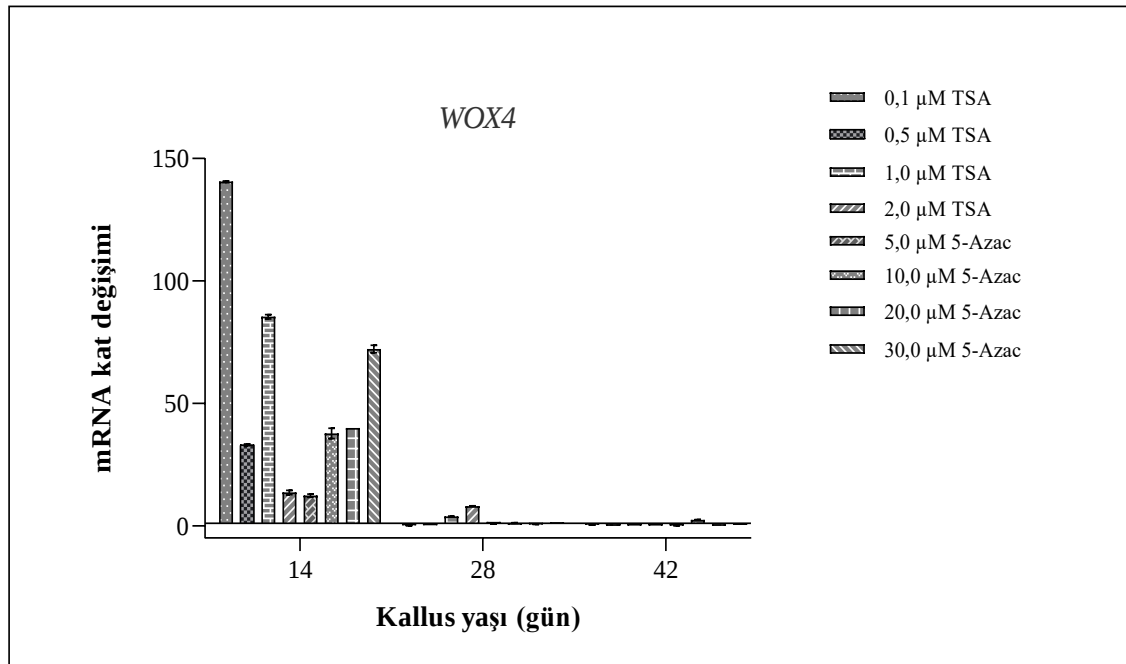
Şekil 20. Uygulamalarda meydana gelen bitkiciklerin görünümü

(A) Kontrol, (B) 0,1 μ M TSA, (C) 0,5 μ M TSA, (D) 1 μ M TSA, (E) 2 μ M TSA, (F) 5 μ M 5-Azac, (G) 10 μ M 5-Azac, (H) 20 μ M 5-Azac, (I) 30 μ M 5-Azac

mRNA İfade Analiz Sonuçları

Araştırmada incelenen WOX4, LEC1, BBM1, TaSERK genlerinin mRNA seviyelerine ait sonuçlar aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

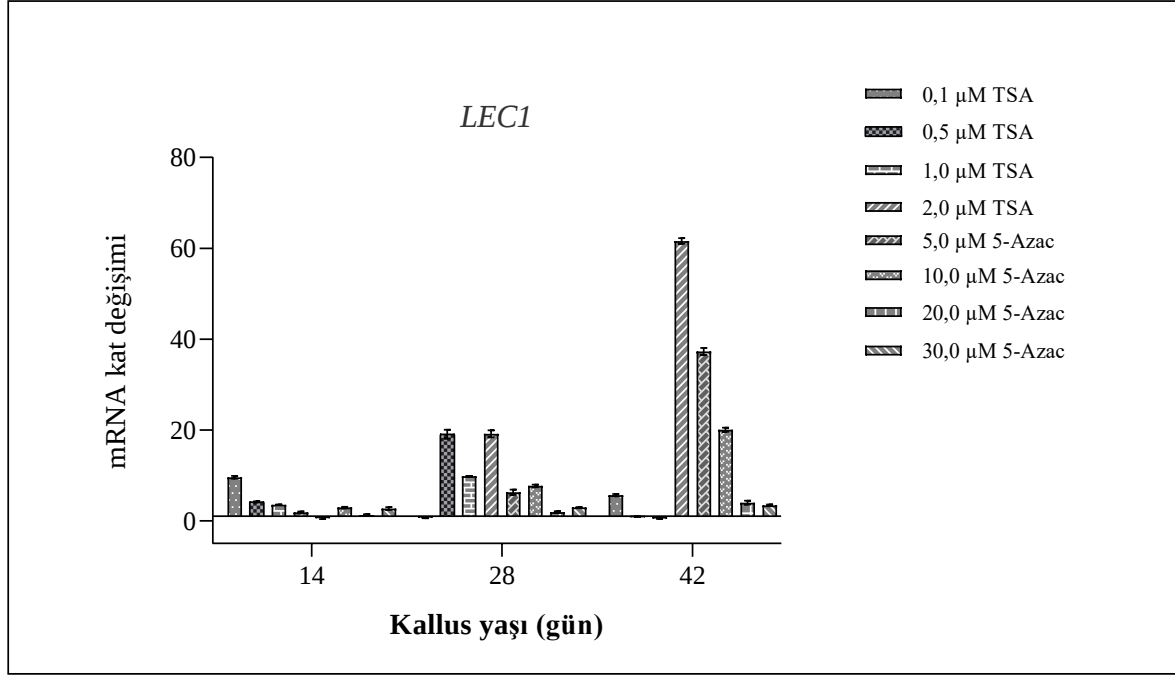
WOX4 geninin ifade analiz sonuçlarına göre WOX4 geninin ifade seviyesi 14 günlük kalluslarda TSA ve 5-Azac uygulamalarının tamamında, 28 günlük kalluslarda 1,0 μ M, 2,0 μ M ve 10,0 μ M TSA uygulamalarında, 42 günlük kalluslarda ise 10,0 μ M 5-Azac uygulamalarında artış gösterirken; diğer uygulamalarda azaldığı belirlenmiştir (Şekil 21.). WOX4 geninin TSA uygulamaları içerisinde en yüksek artış 14 günlük kalluslarda 0,1 μ M TSA (140,58) uygulamasında, en düşük azalış ise 42 günlük kalluslarda 1,0 μ M TSA (0,06) uygulamasında belirlenmiştir. Yine WOX4 geninin 5-Azac uygulamaları içerisinde en yüksek artış 14 günlük kalluslarda 30,0 μ M 5-Azac (72,19) uygulamasında, en düşük azalış ise (0,01) 42 günlük kalluslarda 20,0 μ M 5-Azac uygulamasında belirlenmiştir. Tüm uygulamalar ele alındığında WOX4 geninin en yüksek artışı 14 günlük kalluslarda 0,1 μ M TSA (140,58) uygulamasında, en düşük azalış ise 42 günlük kalluslarda 20,0 μ M 5-Azac (0,01) uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 21.).



Şekil 21. Kontrole göre TSA ve 5-Azac uygulamalarında 14, 28 ve 42 günlük kalluslarda WOX4 geninin ifade değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

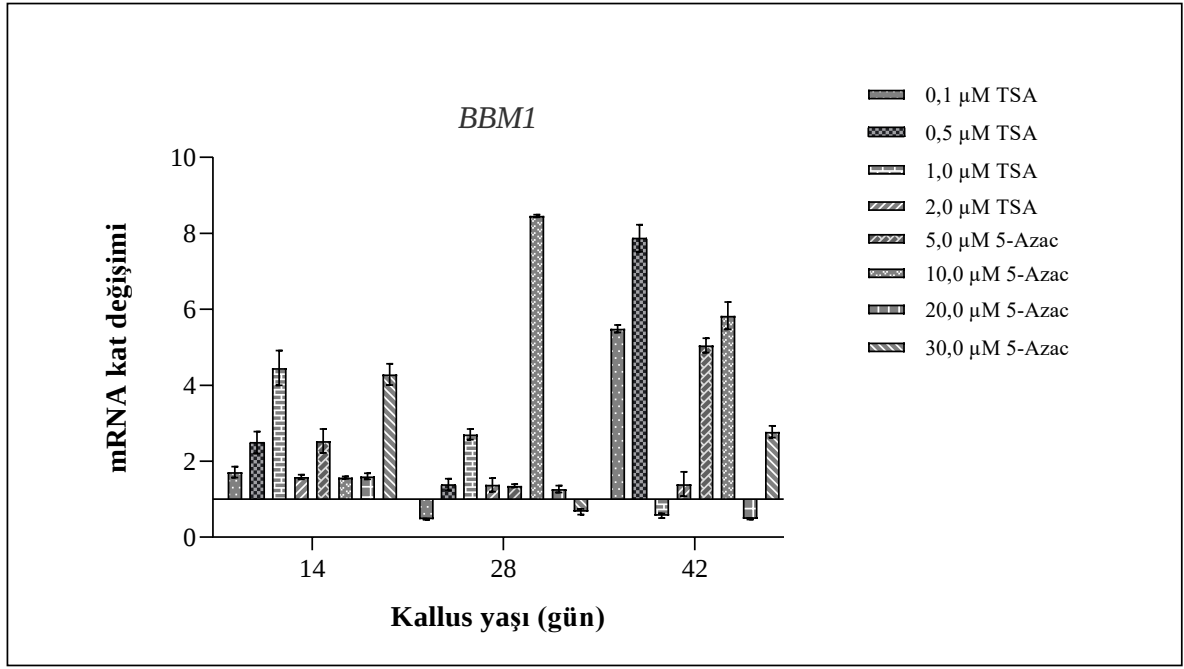
Analiz sonuçlarına göre LEC1 geninin ifade seviyesi TSA uygulamaları içerisinde en yüksek artış 42 günlük kalluslarda 2,0 μ M TSA (61,60) uygulamasında, en düşük azalış ise yine aynı günde 1,0 μ M TSA (0,48) uygulamasında belirlenmiştir. Yine LEC1 geninin ifade seviyesi 5-Azac uygulamaları içerisinde değerlendirildiğinde, en yüksek artış 42 günlük

kalluslarda 5,0 μ M 5-Azac (37,27) uygulamasında, en düşük azalış ise 14 günlük kalluslarda 5 μ M 5-Azac (0,57) uygulamasında belirlenmiştir. Tüm uygulamalar ele alındığında LEC1 geninin ifade seviyesinde en yüksek artış 42 günlük kalluslarda 2,0 μ M TSA (61,60) uygulamasında, yine aynı yaştaki kalluslarda 1,0 μ M TSA (0,48) uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 22.).



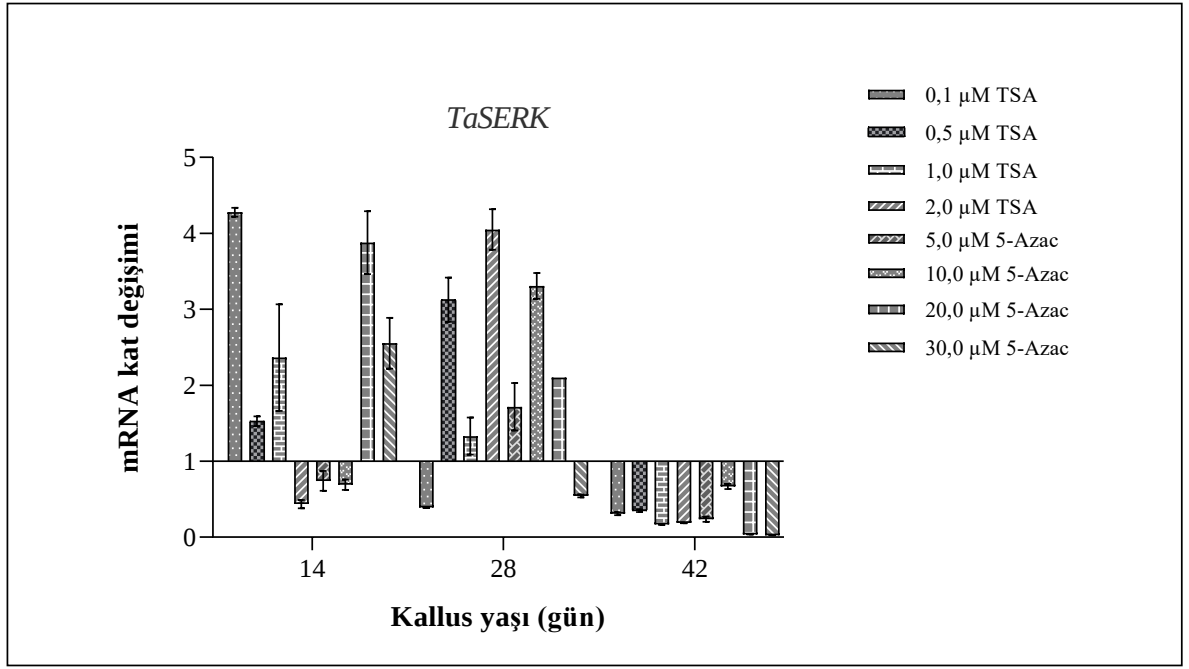
Şekil 22. Kontrole göre TSA ve 5-Azac uygulamalarında 14, 28 ve 42 günlük kalluslarda *LEC1* geninin ifade değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

BBM1 geninin ifade seviyesi TSA uygulamaları içerisinde en yüksek artış 42 günlük kalluslarda 0,5 μ M TSA (7,86) uygulamasında, en düşük azalış ise 28 günlük kalluslarda 0,1 μ M TSA (0,47) uygulamasında belirlenmiştir. Yine BBM1 geninin ifade seviyesi 5-Azac uygulamaları içerisinde değerlendirildiğinde, en yüksek artış 28 günlük kalluslarda 10,0 μ M 5-Azac (8,45) uygulamasında, en düşük azalış ise 42 günlük kalluslarda 20,0 μ M 5-Azac (0,48) uygulamasında belirlenmiştir. Tüm uygulamalar ele alındığında BBM1 geninin ifade seviyesinde en yüksek artış 28 günlük kalluslarda 10,0 μ M 5-Azac (8,45) uygulamasında, en düşük azalış ise 28 günlük kalluslarda 0,1 μ M TSA (0,47) uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. Kontrole göre TSA ve 5-Azac uygulamalarında 14, 28 ve 42 günlük kalluslarda *BBM1* geninin ifade değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

TaSERK geninin ifade analiz sonuçlarına göre TaSERK geninin ifade seviyesinin 42 günlük kalluslarda TSA ve 5-Azac uygulamalarının tümünde azaldığı belirlenmiştir. TaSERK geninin mRNA ifade seviyesi TSA uygulamaları içerisinde en yüksek artış 14 günlük kalluslarda 0,1 µM TSA (4,27) uygulamasında, en düşük azalış ise 42 günlük kalluslarda 1,0 µM TSA (0,16) uygulamasında belirlenmiştir. Yine TaSERK geninin ifade seviyesi 5-Azac uygulamaları içerisinde değerlendirildiğinde, en yüksek artış 14 günlük kalluslarda 20,0 µM 5-Azac (3,87) uygulamasında, en düşük azalış ise 42 günlük kalluslarda 30,0 µM 5-Azac (0,02) uygulamasında belirlenmiştir. Tüm uygulamalar ele alındığında TaSERK geninin ifade seviyesinin en yüksek artış 14 günlük kalluslarda 0,1 µM TSA (4,27) uygulamasında, en düşük azalış ise 42 günlük kalluslarda 30,0 µM 5-Azac (0,02) uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Kontrole göre TSA ve 5-Azac uygulamalarında 14, 28 ve 42 günlük kalluslarda *TaSERK* geninin ifade değişimi ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Buğday, dünya çapında en çok yetiştirilen gıda ürünlerinden biridir (Haberer vd. 2016). Bitki rejenerasyon teknikleri, genetik mühendisliği platformlarını kolaylaştırarak, yeni ıslah hattı ve çeşitlerinin hızlı gelişimini sağlayıp buğday verimliliğini artırmada önemli bir rol oynamaktadır (Forster and Thomas 2010; Delporte *et al.* 2012).

Somatik hücrelerin somatik embriyolara farklılaşmasında moleküler ve biyokimyasal bir süreç olan SE, bitki hücrelerinin en karakteristik fonksiyonlarından totipotensiyi temel alan, bitki gelişim çalışmalarının iyileştirilmesinde geleneksel tarım yöntemleri için yeni bir model sistem olarak kabul edilmektedir (Komamine *et al.* 1992; Gulzar *et al.* 2020; Talapatra *et al.* 2016). Bu yönüyle klonal ve transgenik bitkiler üretmenin yanında birçok alana yararlı sistemler sağlamasıyla biyoteknolojide oldukça dikkat çeken bir sistemdir. Arnold *et al.* (2002) ve Garcês and Sinha (2009), birçok bitki türünde çeşitli çevresel ve genetik faktörlerin döllenmeyi engellediğini, küresel ısınmanın artışına bağlı olarak bu problemin arttığını vurgulayarak, bu problemin çözümüne yönelik SE tekniğinin kullanılmasını hedeflemektedirler. Bu teknik, geleneksel ürün çoğaltımına güçlü bir alternatif olmasının yanında (Loyola-Vargas *et al.* 2008), tahıllarda klasik ıslaha yardımcı olan modern ıslah yöntemlerindendir (Aydın 2009). SE'nin epigenetik olarak incelenmesi ve bu inceleme sonucunda mekanizmasının açık şekilde ortaya konulması ile tekniğin başarısının artırılması öngörülmektedir (Thorpe 2012).

SE tekniği ile somatik hücreye embriyogenik yeterlilik kazandırılması ve bu hücrenin bitkiye geçişi uzun zaman aldığından gen aktarım amaçlı yürütülen çalışmalarda bu durum istenmeyen varyasyonlar meydana getirebilmekte ve gen aktarım çalışmalarını sınırlandırmaktadır (Korkmaz vd. 2013; Beiramizadeh *et al.* 2017). Araştırmamızda TSA ve 5-Azac kimyasallarının dozlarına bağlı olarak embriyogenik hücrelerin oluşumuna geçişin hızlı olduğu belirlenmiştir. Yine bu çalışmamızda 0,1 μM ve 0,5 μM TSA uygulamalarında kontrole göre EKKO, CEKO ve EBSS'de artış olduğu tespit edilmiştir. Jiang *et al.* (2017) doku kültüründe ıslah çalışmaları için DH üretiminde bu kimyasalın kullanılması ile yüksek verimlilik elde etmişlerdir. Özellikle buğdayda TSA'nın 0,1 ve 0,5 μM dozlarında embriyogenik kallus sayısında ve yeşil bitki üretiminde önemli ölçüde artış olduğunu rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar bulgularımızla uyum göstermektedir. Diğer taraftan, Wójcikowska *et al.* (2018), TSA ile muamele edilmiş kotiledonlardan, verimli bir şekilde gelişen somatik embriyoların elde edildiğini rapor etmişlerdir. Zhao *et al.* (2010), histon asetilasyonunun

transkripsiyon için gereklilik arz ettiğini belirtmişlerdir. Histon asetilasyonu, bitki hücrelerinin bölünmesinde, farklılaşmasında ve SE’de görev alan genlerin ifade seviyelerini düzenlemede önemli rol oynayarak SE’nin oluşum aşamalarında (yeniden farklılaşma, totipotensi ve embriyonik potansiyelin erken kazandırılması) süreyi hızlandırıp bitki rejenerasyonunu sağlamaktadır (Bie *et al.* 2020; Verdeil *et al.* 2007). Ancak bunun yerine histon deasetilasyonunun meydana gelmesi genlerin ifadesini engelleyebilmektedir. Bu nedenle Wójcikowska *et al.* (2018), histon desetilasyon inhibitörü olan TSA’nın uygun dozlarının kullanılarak SE’nin başarısını artırdığını belirtmişlerdir. Diğer taraftan, SE’nin başarısı dengeli bir epigenetik mekanizmaya bağlı olduğu ve somatik embriyo oluşumu ile ilgili genlerin ifade seviyeleriyle ilgili olabileceği bilinmektedir (Kumar *et al.* 2017). Çalışmamızda 2 μ M TSA dozunun diğer dozlara kıyasla EKO, CEKO ve EBSS’de azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Bunun muhtemel nedeni, TSA’nın yüksek dozlarının epigenetik dengeyi etkileyerek gen ifadesinde değişimlere neden olmasından kaynaklanmış olabilir.

DNA metilasyonu gen ifadesinde anahtar role sahip olan epigenetik mekanizmalarından biridir (Chen *et al.* 2020). De-la-Peña *et al.* (2015); Kumar and Staden (2017), DNA metilasyonunun SE’nin indüksiyonunda önemli olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda DNA metilasyon inhibitörü olan 5-Azac’ın doku kültürü parametrelerine etkisi incelendiğinde en yüksek EKO (%90,0), CEKO (%90,0) ve EBBS (4.8 adet) 5 μ M 5-Azac uygulamasında tespit edilmiştir. DNA metilasyon seviyesi *in vitro* ortamlarda embriyogenik hücrelerde değişebilmektedir (Osorio-Montalvo *et al.* 2018). Özellikle DNA metilasyonu, SE aşamalarında, görev alan bazı genlerin ifade seviyelerini etkileyerek embriyogenik potansiyeli etkilemektedir (Quinga *et al.* 2017). Olgun embriyo kültüründe stres faktörlerinden dolayı istenmeyen düzeyde metilasyonlar ortaya çıkmaktadır (Osorio-Montalvo *et al.* 2018). Hipometilasyona sebep olan 5-Azac gibi kimyasalın uygulanması ile bu durum tersine çevrilebilmektedir (Munsamy *et al.* 2013). DNA metilasyon modellerinde değişiklikler veya modifikasyonlar, bitkilerde SE’nin başlatılmasında ve geliştirilmesinde rol oynayan çeşitli genlerin düzenleyici mekanizmalarına bağlıdır (Kumar *et al.* 2017). Araştırmamızda, 5-Azac uygulamasının en yüksek dozu olan 30 μ M’da EKO, CEKO ve EBBS parametrelerin tamamında kontrole göre azalış tespit edilmiştir. Bu yüksek dozda bu parametrelerdeki azalmanın muhtemel sebebi SE tekniğinin başarısını etkileyen hipometilasyon ve hipermetilasyon arasındaki dengeden kaynaklanmış olabilir. Başka bir ifadeyle SE tekniğinde DNA metilasyon seviyesinin belli bir dengede olması gerekmektedir. DNA metilasyon inhibitörü gibi ajanların yüksek dozları DNA metilasyonunu ortadan kaldırarak SE tekniğini olumsuz yönde de etkileyebilmektedir (Kumar *et al.* 2017; Miguel and Marum 2011; Neelakandan and Wang 2012; Mahdavi-Darvari *et al.* 2015; Ikeuchi *et al.* 2016). Bu hususta

Santos *et al.* (2002), yaptıkları çalışmada 5-Azac kimyasalının dozlarında DNA metilasyon seviyelerinin farklılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmalarında 5-Azac kimyasalının yüksek dozlarında (100µM) metilasyonun ortadan kalktığını gözlemlemiş bunun sonucunda embriyogenik rejenerasyon kaybının meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu sonuca göre somatik embriyo üretiminin belli düzeyde DNA metilasyonuna bağlı olduğunu ve de uygun dozlar ile metilasyon seviyeleri dengelenerek somatik embriyo üretim kapasitesinin artırılabilirliğini savunmuşlardır.

SE tekniği birtakım genler (WOX, LEC, BBM1, SERK) tarafından kontrol edilir ve epigenetik bir denge mekanizmasına sahiptir. Özellikle bu genlerin SE oluşum aşamalarında önemli rol oynadıkları kaçınılmaz bir gerçektir (Wojcikowska *et al.* 2013; Feher *et al.* 2013; Boulard *et al.* 2017; Guo *et al.* 2013). SERK gen aileleri ve LEC, WUS gibi germin benzeri protein kodlayıcı genler SE tekniği ile transdüksiyon yolağı ve transkripsiyonel regülasyonda önemli ilişkileri olduğu tespit edilmiştir (Mahdavi-Darvari *et al.* 2015). Bu genler, SE'nin indüklenmesi için vazgeçilmezdirler. Epigenetik mekanizmalardan biri olan özellikle DNA metilasyonu, SE aşamalarında görev alan bazı genlerin ifade seviyelerini etkilemektedir. Osorio-Montalvo *et al.* (2018), 5-Azac kimyasalının uygun dozları ile metilasyon dengesinin sağlanabileceğini vurgulamışlardır. Yine epigenetik mekanizmalardan histon asetilasyonu gerçekleşmiş bölgelerdeki genlere, transkripsiyon proteinleri daha kolay ulaşabilmektedir. Ancak asetilasyon yerine histon deasetilasyonunun meydana gelmesi asetil gruplarının amino asitlere bağlanmasını engelleyerek, DNA'ya histonları sıkıca bağlayıp genlerin ifadelerini engellemektedir (Can *et al.* 2011). Valledor *et al.* (2010), *Pinus radiata* 'da, asetilasyonun fazla olduğu dokuların asetilasyon olmayan dokulara kıyasla daha fazla *in vitro* sürgün rejenerasyonu kapasitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Benzer şekilde *Brassica napus* 'da embriyogenesis sırasında H3 ve H4 asetilasyon seviyesinin yüksek olduğu buna bağlı olarak genlerin ifadesinin fazla olduğu belirlenmiştir (Rodríguez-Sanz *et al.* 2014). Bu raporlar birlikte, histonların asetilasyon durumunun, özellikle H3 ve H4'ün, somatik bitki hücrelerinde *in vitro* indüklemeye gelişim programlarını kontrol ettiğini doğrulamaktadır (Wojcikowka *et al.* 2018). Bununla birlikte, Lochmanová *et al.* (2019) histon deasetilaz inhibitörü olan TSA kimyasalını histon asetilasyonuna sebep olarak genlerin ifade seviyelerini artırdığını bildirmiş ve genlerin ancak doğru ifade seviyelerinde SE başarısını artırdığını belirtmişlerdir. Bir başka ifadeyle genin çok fazla ifade edilmesi ya da hiç ifade edilmemesi değil SE'nin başarısında istenen seviyede ifade edilmesi önem arz etmektedir. Bunun sebebi SE'de gen ifade seviyeleri SE'nin oluşum aşamalarında görev alan diğer genlerle bağlantılı olmasından kaynaklanmaktadır (Kumar *et al.* 2017).

WOX4 geni SE uyarıcı olarak görev yapmaktadır (Rupps *et al.* 2016). Bitkilerde embriyogenik oluşum gibi çeşitli gelişim süreçlerinde özelleşmiş fonksiyonlara sahip olan WOX genlerinin, embriyogenezin erken evrelerinde yer alan gen transkripsiyonunu koordine etmede önemli bir rol oynadığı vurgulanmıştır (Gambino *et al.* 2011). Bu nedenle SE'nin ilk dönemlerinde ifade seviyeleri artmaktadır. Araştırmamızda, WOX4 geninin ifade seviyesinin TSA ve 5-Azac'ın tüm dozlarında 14 günlük kalluslarda arttığı, kallus yaşındaki artışına bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Nic-Can *et al.* (2013) *Vitis vinifera* bitkisindeki SE çalışmalarında WOX4 geninin, erken dönemde ifade seviyelerinin arttığını, embriyo olgunlaşması sırasında ise ifade seviyesinin azaldığını tespit etmişlerdir. Bu durum yine Wojcikowska *et al.* (2013) tarafından TSA içeren oksinsiz ortamlarda incelenerek ortaya konulmuştur. Yine, *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışmada (Haecke *et al.* 2003) da WOX4 geninin erken embriyogenik oluşum safhasında ifade seviyesinin arttığı belirlenmiştir. Gerek araştırma bulgularımız ve gerekse bu sonuçlar WOX4 geninin embriyo olgunlaşması sırasında ifadesinin azaldığını göstermektedir.

LEC1 geni oksin biyosentezi yolağında görev alan diğer genlerin düzenlemesini sağlayarak endojen oksin seviyelerini arttırmaktadır (Braybrook ve Harada 2008). Wójcikowska *et al.* (2013), LEC genlerinin özellikle somatik embriyo oluşum ve bitki rejenerasyon aşamasında önemli görev aldığını vurgulamışlardır. Araştırmamızda, LEC1 geninin mRNA ifade seviyesinin kallus yaşına ve TSA ve 5-Azac'ın uygulama dozlarına göre değiştiği belirlenmiştir. Bu genin 14 ve 28 günlük kalluslarda çok az artış gösterdiği, kallus yaşındaki artışa bağlı olarak en fazla 42 günlük kalluslarda arttığı belirlenmiştir. En yüksek artış 42 günlük kalluslarda 2 μ M TSA'da tespit edilmiştir. Kumar *et al.* (2017), LEC geninin yüksek ifade seviyesinin somatik embriyogensiste görev alan rolleri tam olarak açıklanamayan diğer genleri tetikleyebileceğini bildirmişlerdir. Bitkiye geçiş döneminde LEC1 geninin ifade seviyesindeki artış TSA ve 5-Azac kimyasalının kullanılmasıyla meydana gelen histon asetilasyonlarının ortadan kaldırılması ve DNA metilasyon değişiminden kaynaklanmış olabileceği öngörülmektedir. Wójcikowska *et al.* (2018), yaptıkları çalışmada TSA ile muamele edilmiş eksplantlarda histon deasetilaz (HDAC) aktivitesinde önemli bir azalma olduğunu ve böylece TSA ile teşvik edilen embriyogenik tepkinin histon asetilasyon ile ilişkili olduğunu doğrulamışlardır.

BBM, etylen-response-factor (ERF) transkripsiyon faktörlerinin apetala2 (AP2) alt ailesine aittir. İlk olarak, *Brassica napus*'da mikrospor embriyogenik kültüründe belirlenmiştir (Boutilier *et al.* 2002). Bu gen somatik hücreleri embriyogenik ve totipotent hücrelere dönüştürmede görev almaktadır. BBM1, bir aintegumenta-like (AIL) apetala2 (AP2 / ERF)

etilene duyarlı eleman bağlama faktörüdür. Boutilier *et al.* (2002), *Arabidopsis* 'te (*Arabidopsis thaliana*), AIL genlerinin AP2 / ERF transkripsiyon faktör ailesi içinde küçük, sekiz üyeli bir küme oluşturduğunu ve buna ek olarak aintegumenta (ANT), AIL1, plethora1 (PLT1), PLT2, AIL6 / PLT3, chotto1 (CHO1) / embriomaker (EMK) / AIL5 / PLT5 ve PLT7 ile ilişkisinin olduğunu belirlemişlerdir. AIL genlerinin, kök, sürgün ve çiçek meristemleri dahil olmak üzere dokularda meristematik durumu sürdürmek için bölünme esnasında ifade edilmekte ve BBM1'in hücre bölünmesinin desteklenmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Horstman *et al.* 2014; Srinivasan *et al.* 2007).

BBM1 geninin *Arabidopsis thaliana* ve *Brassica napus*'da hücre proliferasyonu ve embriyogenesiste önemli roller oynadığı ve soya fasulyesinin somatik embriyo gelişiminde önemli rolleri olduğu ortaya konulmuştur (Ouakfaoui *et al.* 2010). Araştırmamızda TSA ve 5-Azac uygulamaların da SE'nin tüm aşamalarında (14, 28 ve 42 günlük kalluslarda) BBM1 geninin uygulamalara bağlı olarak ifadesinde artış olduğu tespit edilmiştir. En yüksek artış 28 günlük kalluslarda 10,0 µM 5-Azac uygulamasında tespit edilmiştir. 5-Azac kimyasalının bu dozunun DNA metilasyonunu çok fazla etkilediği düşünülmektedir. Araştırmamızdaki bulgulara benzer olarak Wojcikowska *et al.* (2018), TSA'nın tüm uygulamalarında embriyo oluşumunun ilk döneminde BBM1 geninin ifadesinde artış olduğunu rapor etmişlerdir.

TaSERK1 geni, reseptör benzeri kinaz genlerinin TaSERK'ler (TaSERK1, TaSERK2, TaSERK3, TaSERK4 ve TaSERK5) gen ailesine aittir. Korunmuş bir yapıyı ve önceden bildirilen bitki SERK genleri ile kapsamlı sekans homolojisini paylaşır. Özellikle bitki hücrelerinde embriyogenik yeterliliğin kazanılmasında rol oynamaktadırlar. (Somleva *et al.* 2000; Hecht *et al.* 2001). TaSERK genleri genel olarak hücre kültürlerinde embriyogenesis sırasında ifade edilmektedir. Araştırma bulgularımız bunu doğrulamaktadır. Yine, araştırmamızda en yüksek TaSERK gen ifadesi artışı embriyogenik hücrelerin oluşum aşaması olan 14 ve 28 günlük kalluslarda gözlemlenirken, TSA ve 5-Azac'ın tüm dozlarında bitkiye geçiş aşaması olan 42 günlük kalluslarda ifade seviyesinde azalış olduğu tespit edilmiştir. Gerek bizim bulgularımız ve gerekse daha önce yapılan çalışmalar (Ortowska *et al.* 2017; Baudino *et al.* 2001; Hecht *et al.* 2001) TaSERK geninin genel olarak hücre kültürlerinde embriyogenesis sırasında ifade edildiğini göstermektedir. Singla *et al.* (2008), buğdayda TaSERK1 geninin embriyogenik yeterlilik kazanma aşamasında geniş bir role sahip olduğunu ve somatik dokularda indüklenebildiğini vurgulamışlardır. Yine Somleva *et al.* (2000), *D. carota*'daki SERK gen ifadesinin, embriyogenik hücre kültürlerinde görüldüğünü ve embriyogenik olmayan kültürlerde ifadesinin saptanamadığını ve embriyoların globular aşamasında saptandığını rapor etmişlerdir.

Sonuç ve Öneriler

Bu araştırmada elde edilen sonuçlar ve daha sonra yapılacak çalışmalara yönelik öneriler aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

1. Buğday olgun embriyo kültüründe en yüksek bitki rejenerasyonu 0,5 μ M TSA ve 5 μ M 5-Azac uygulamalarında tespit edilmiştir. Bu uygulamaların, SE'nin oluşum aşamalarını (yeniden farklılaşma, totipotensi ve embriyonik potansiyelin erken kazandırılması) hızlandırdığı (veri sunulmamıştır) ve kültür süresine bağlı olarak somaklonal varyasyonu azaltmış olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu durumunun ve gerekse yukarıda belirtilen kimyasalların somaklonal varyasyona etkisinin farklı bir çalışma ile doğrulandıktan sonra buğday olgun embriyo kültüründe kullanılması önerilebilir.
2. WOX4 geninin ifade seviyesinin TSA ve 5-Azac'ın tüm dozlarında 14 günlük kalluslarda arttığı, diğer yaştaki kalluslarda ise mRNA ifade seviyelerinde azalma meydana geldiği belirlenmiştir.
3. LEC1 geninin mRNA ifade seviyesinin kallus yaşına ve TSA ve 5-Azac'ın uygulama dozlarına göre değiştiği, en yüksek artışın 42 günlük kalluslarda 2,0 μ M TSA uygulamasında olduğu tespit edilmiştir. LEC1 geninin ifadesinde TSA'nın 5-Azac uygulamasına göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.
4. BBM1 geninin mRNA ifade seviyesinin uygulamalara ve kallus yaşına göre değiştiği belirlenmiştir. Bu genin mRNA ifade seviyesinde 14 günlük kalluslarda tüm uygulamalarda artış görülürken; 28 ve 42 günlük kalluslarda uygulamalara göre değiştiği belirlenmiştir.
5. TaSERK geninin mRNA ifade seviyesi 14 ve 28 günlük kalluslarda uygulamalara değiştiği ve 42 günlük kalluslarda ise TSA ve 5-Azac'ın tüm dozlarında azaldığı tespit edilmiştir.
6. Araştırmamızda incelenen genler (WOX, LEC, BBM1, SERK) dışında da somatik embriyogenesiste rolleri tam olarak açıklanmamış diğer genlerin belirlenmesi için farklı bir çalışmanın yürütülmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Ahmet, H., & Adak, M. S. (2007). Irak'ta yetiştirilen bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(3), 285-292.
- Anonim 2020a. <https://tr.weblogographic.com>. Erişim tarihi: 17.09.2020
- Anonim 2020b. <https://tr.wikipedia.org/wiki/MikroRNA>. Erişim Tarihi: 12.09.2020
- Anonim 2020c. <https://www.wikiwand.com/tr/MikroRNA>. Erişim tarihi: 24.09.2020
- Anonim 2020d. <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/a3656>. Erişim tarihi: 25.09.2020
- Anonim 2020e. <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/a3656>. Erişim tarihi: 20.09.2020
- Atak, M., 2017. Buğday ve Türkiye Buğday Köy Çeşitleri. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 22(2), 71-88.
- Atar, B., 2017. Gıdamız buğdayın geçmişten geleceğe yolculuğu. Süleyman Demirel Üniversitesi Yalvaç Akademi Dergisi, 2(1),1-12.
- Awada, R., Verdier, D., Froger, S., Brulard, E., de Faria Maraschin, S., Etienne, H., & Breton, D., 2020. An innovative automated active compound screening system allows high-throughput optimization of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Scientific reports*, 10(1), 1-14.
- Aydin, M., Haliloğlu, K., Tosun, M., 2009. Buğday doku kültüründe alternatif eksplant kaynağı: olgun embriyo. SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 8(2), 34-45.
- Aydin, M., 2010. Bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aydin, M., Sağsöz, S., Haliloğlu, K., Tosun, M., 2011. Affecting Wheat Mature Embryo Culture. *Journal of the Faculty of Agriculture*; 42,1
- Aydin, M., Tosun, M., Haliloğlu, K., 2011. Plant regeneration in wheat embryo culture. *African journal of Biotechnology*, 10(70), 15749-15755.
- Aydin, N., Bayramoğlu, H.O., Mut, Z., Özcan, H., 2005. Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının Karadeniz koşullarında verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. *AÜZF Tarım Bilimleri dergisi*, 11(3), 257-262
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M. A., 2001. Plant tissue culture: Basic laboratory technique. *Biotechnology of plant, plant tissue culture and application*. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 1-35.
- Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, Hecht VRG, Dresselhaus T, Lörz H, Dumas C, Rogowsky PM., (2001) Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. *Planta* 213:1–10
- Beiramizadeh, E., Zarei, R., Hajibarat, Z., Hajibarat, Z., & Saeidi, A., 2017. Micropropagation of *Rosa canina* Through Axillary bud. *Crop Biotechnology*, 7(18), 93-102.
- Bie XM, Wang K, Liu C, Liu YW, Du LP, Mao XG, Ye XG., 2017. Effects of soil drought stress on plant regeneration efficiency and endogenous hormone levels of immature embryos in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak J Bot*, 49:1673–1679.

- Bie XM, Wang K, She MY, Du LP, Zhang SX, Li JR, Gao X, Lin ZS, Ye XG., 2012. Combinational transformation of three wheat genes encoding fructan biosynthesis enzymes confers increased fructan content and tolerance to abiotic stresses in tobacco. *Plant Cell Rep*, 31:2229–2238.
- Bie, X. M., Dong, L., Li, X. H., Wang, H., Gao, X. Q., & Li, X. G., 2020. Trichostatin A and sodium butyrate promotes plant regeneration in common wheat. *Plant Signaling & Behavior*, 1820681.
- Bouchabke-Coussa, O., Obellianne, M., Linderme, D., Montes, E., Maia-Grondard, A., Vilaine, F., & Pannetier, C., 2013. Wuschel overexpression promotes somatic embryogenesis and induces organogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues cultured *in vitro*. *Plant cell reports*, 32(5), 675-686.
- Boulard, C., Fatihi, A., Lepiniec, L., & Dubreucq, B., 2017. Regulation and evolution of the interaction of the seed B3 transcription factors with NF-Y subunits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(10), 1069-1078.
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, VK., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, CM., van Lammeren, AA., Miki, BL., Custers, JB., van Lookeren Campagne MM., 2002. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14:1737–1749
- Brand, A., Quimbaya, M., Tohme, J., & Chavarriaga-Aguirre, P., 2019. Arabidopsis LEC1 and LEC2 orthologous genes are key regulators of somatic embryogenesis in cassava. *Frontiers in plant science*, 10, 673.
- Bravo, S., Bertín, A., Turner, A., Sepúlveda, F., Jopia, P., Parra, M. J., ... & Hasbún, R., 2017. Differences in DNA methylation, DNA structure and embryogenesis-related gene expression between embryogenic and non embryogenic lines of *Pinus radiata* D. don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 130(3), 521-529.
- Braybrook, S. A., & Harada, J. J., 2008. LECs go crazy in embryo development. *Trends in plant science*, 13(12), 624-630.
- Bregitzer, P., Tonks, D., 2003. Inheritance and expression of transgenes in barley. *Cropscience*, 43(1), 4-12.
- Breiman, A. and Graur, D., 1995. Wheat evolution. *Israel Journal of Plant Sciences* 43 (2), 85-98.
- Can, M. İ., Aslan, A., 2011, Epigenetik Mekanizmalar ve Bazı Güncel Çalışmalar. *Karaelmas Fen ve mühendislik dergisi*, 6(2), 445-452.
- Castillo, A. M., Valero-Rubira, I., Burrell, M. Á., Allué, S., Costar, M. A., & Vallés, M. P., 2020. Trichostatin A Affects Developmental Reprogramming of Bread Wheat Microspores towards an Embryogenic Route. *Plants*, 9(11), 1442.
- Chen, R., Chen, X., Huo, W., Zheng, S., Lin, Y., & Lai, Z., 2020. Transcriptome analysis of azacitidine (5-AzaC)-treatment affecting the development of early somatic embryogenesis in longan. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 1-13.
- Chen, X., Xu, X., Shen, X., Li, H., Zhu, C., Chen, R., ... & Lai, Z., 2020. Genome-wide investigation of DNA methylation dynamics reveals a critical role of DNA demethylation during the early somatic embryogenesis of *Dimocarpus longan* Lour. *Tree Physiology*, 40(12), 1807-1826.
- Ciechomska, M., Roszkowski, L., & Maslinski, W., 2019. DNA methylation as a future therapeutic and diagnostic target in rheumatoid arthritis. *Cells*, 8(9), 953.

- Delporte F, Jacquemin JM, Masson P, Watillon B., 2012 Insights into the regenerative property of plant cells and their receptivity to transgenesis: wheat as a research case study. *Plant Signal Behav* 7(12):1608–1620
- Dodig, D., Zorić, M., Mitić, N., Nikolić, R., & Šurlan-Momirović, G., 2008. Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat. *Plant cell, tissue and organ culture*, 95(1), 107.
- Dolinoy, D., Weidman, J., Jirtle, R., 2007. Epigenetic gene regulation: Linking early developmental environment to adult disease. *Reprod. Toxicol.*, 23:297-307
- Dong LH, Yao FQ, Zhan Y, Li XG, Bie XM. Optimization of callus induction and regeneration system of mature embryo in spring wheats. *Mol Plant Breed*. 2020; 18:1244–1249.
- El Ouakfaoui, S., Schnell, J., Abdeen, A., Colville, A., Labbé, H., Han, S., ... & Miki, B., 2010. Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant molecular biology*, 74(4-5), 313-326.
- Elhiti, M., Stasolla, C., & Wang, A., 2013. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(6), 631-642.
- FAO, 2019. <http://www.fao.org/> (17.01.2021)
- Feher A, Pasternak TP, Dudits D., 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Org Cult* 74:201–228
- Feher A, Pasternak, TP., Dudits, D., 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74:201–228
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*. 1999; 401:188–193. doi:10.1038/43710
- Forster BP, Thomas WTB (2010) Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant breeding reviews*. Wiley, New York, pp 57–88
- Fraga, H. P., Vieira, L. N., Caprestano, C. A., Steinmacher, D. A., Micke, G. A., Spudeit, D. A., & Guerra, M. P. (2012). 5-Azacytidine combined with 2, 4-D improves somatic embryogenesis of *Acacia senegal* (L. Willd.) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant cell reports*, 31(12), 2165-2176.
- Fujimura, T. (2014). Carrot somatic embryogenesis. A dream come true? *Plant biotechnology reports*, 8(1), 23-28.
- Gaj, M. D., Zhang, S., Harada, J. J., & Lemaux, P. G., 2005. Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222(6), 977
- Gambino, G., Minuto, M., Boccacci, P., Perrone, I., Vallania, R., & Gribaudo, I., 2011. Characterization of expression dynamics of WOX homeodomain transcription factors during somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Journal of experimental botany*, 62(3), 1089-1101.
- Garcês, H., & Sinha, N., 2009. The ‘mother of thousands’ (*Kalanchoe daigremontiana*): a plant model for asexual reproduction and CAM studies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10), pdb-emo133.
- Grzybkowska, D., Morończyk, J., Wójcikowska, B., & Gaj, M. D., 2018. Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation*, 85(2), 243-256.

- Gulzar, B., Mujib, A., Malik, M. Q., Sayeed, R., Mangain, J., & Ejaz, B., 2020. Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 1-15.
- Guo, F., Liu, C., Xia, H., Bi, Y., Zhao, C., Zhao, S., Wang, X., 2013. Induced expression of AtLEC1 and AtLEC2 differentially promotes somatic embryogenesis in transgenic tobacco plants. *PLoS One*, 8(8), e71714.
- Haberer, G., Mayer, K. F., Spannagl, M., 2016. The big five of the monocot genomes. *Current opinion in plant biology*, 30, 33-40.
- Haecker, A., Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., Laux, T., 2004. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131:657–668
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J-P., Hartog, MV., Schmidt, ED., Boutilier, K., Grossniklaus, U., Vries, SC., 2001. The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in cultures. *Plant Physiol* 127:803–816
- Hemdane, S., Jacobs, P. J., Dornez, E., Verspreet, J., Delcour, J. A., & Courtin, C. M., 2016. Wheat (*Triticum aestivum* L.) bran in bread making: a critical review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(1), 28-42.
- Heringer, A. S., Santa-Catarina, C., Silveira, V., 2018. Insights from proteomic studies into plant somatic embryogenesis. *Proteomics*, 18(5-6), 1700265.
- Holliday, R., 1987. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987; 238:163–170.
- Horstman, A., Li, M., Heidmann, I., Weemen, M., Chen, B., Muino, J. M., Boutilier, K., 2017. The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 175(2), 848-857.
- Horstman, A., Willemsen, V., Boutilier, K., Heidstra, R., 2014. Antegumental-like proteins: hubs in a plethora of networks. *Trends Plant Sci* 19: 146–157
- Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Harashima, H., Shibata, M., Ohnuma, M., 2015. PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* 1, 1–7.
- Jiang, F., Ryabova, D., Diedhiou, J., Huc, P., Randhawa, H., Marillia, E. F., Kathiria, P., 2017. Trichostatin A increases embryo green plant regeneration in wheat. *Plant cell reports*, 36(11), 1701-1706.
- Jones, PA., Takai, D., 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 293:1068–1070.
- Karami, O., Aghavaresi, B., Pour, A. M. 2009. Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of chemical biology*, 2(4), 177-190.
- Koehler, A. D., Irsigler, A. S., Carneiro, V. T., Cabral, G. B., Rodrigues, J. C., Gomes, A. C. M., Alencar, Dusi, D. M., 2020. SERK genes identification and expression analysis during somatic embryogenesis and sporogenesis of sexual and apomictic *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*). *Planta*, 252(3), 1-15.
- Komamine, A., Kawahara, R., Matsumoto, M., Sunabori, S., Toya, T., Fujiwara, A., Fujimura, T., 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 28(1), 11-14.
- Korkmaz, Y., & Çölgeçen, H., 2013. Bitki doku kültürü çalışmalarında somaklonal varyasyon. *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 6(2), 74-78.

- Krishnan, S. S., & Siril, E. A., 2017. Auxin and nutritional stress coupled somatic embryogenesis in *Oldenlandia umbellata* L. *Physiology and molecular biology of plants*, 23(2), 471-475.
- Kumar, V. and Van Staden, J., 2017. New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiol. Plant.* 39, 194–210.
- Kün, E., 1988. Serin İklim Tahılları. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 1032. 322 s., Ankara
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lochmanová, G., Ihnatová, I., Kuchařiková, H., Brabencová, S., Zachová, D., Fajkus, J., Fojtová, M., 2019. Different Modes of Action of Genetic and Chemical Downregulation of Histone Deacetylases with Respect to Plant Development and Histone Modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5093.
- Mahdavi-Darvari, F., Noor, N. M., & Ismanizan, I., 2015. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(2), 407-422.
- Mahdavi-Darvari, F., Noor, N. M., & Ismanizan, I., 2015. Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(2), 407-422.
- Matsuoka, Y., 2011. Evolution of polyploid Triticum wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant and cell physiology*, 52(5), 750-764.
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., Loyola-Vargas, V. M., 2019. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in plant science*, 10, 77.
- Miguel C, Marum, L., 2011. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *J Exp Bot* 62(11):3713–3725
- Munsamy, A., Rutherford, R. S., Snyman, S. J., Watt, M. P., 2013. 5-Azacytidine as a tool to induce somaclonal in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant biotechnology reports*, 7(4), 489-502.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Neelakandan, A. K., Wang, K., 2012. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant cell reports*, 31(4), 597-620.
- Nestler, EJ., 2014. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, 76: 259-268.
- Nic-Can, G. I., Lopez-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola- Vargass, V. M., Rojas-Herrera, R., Derapena, C., 2013. New insights into somatic embryogenesis: Leafy Cotyledon 1, Baby boom1 and Wuschel-Related Homeobox4 Are Epigenetically Regulated İn. *Coffea Canephora Plos One*, 8(8), e72160.
- Oliveira, EJ., Koehler, AD., Rocha, DI., Vieira, LM., Pinheiro, MVM., Matos, EM., Cruz, ACF., Silva, TCR., Tanaka, FAO., Nogueira, FTS., Otoni, WC., 2017. Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Protoplasma* 254(5):2017–2034.

- Ortowska, A., Lgielski, R., Tagowska, K., Kepczynska, E., 2017. Identification of LEC polycomb Repressive Sive complex 2 genes and their expression during the induction phase of medicago truncatula gaertn. Somatic embryogenesis. Plant cell, tissue and organ cultre, 129(1), 119-132.
- Osoria-Montolvo, P., Saenz- Carbonell, L., Delapena, C., 2018. 5-Azacytidine: A Promoter of Epigetic Changes in the Quest to improve Plant Somatic Embryogenesis. International journal of molecular sciences, 19 (10), 3182
- Osorio-Montalvo, P., De-la-Peña, C., Oropeza, C., Nic-Can, G., Córdova-Lara, I., Castillo-Castro, E., & Sáenz-Carbonell, L., 2020. A peak in global DNA methylation is a key step to initiate the somatic embryogenesis of coconut palm (Cocos nucifera L). *Plant Cell Reports*, 39(10), 1345-1357.
- Pagano, A., Araújo, S. D. S., Macovei, A., Leonetti, P., Balestrazzi, A., 2017. The seed repair response during germination: Disclosing correlations between DNA repair, antioxidant response, and chromatin remodeling in Medicago truncatula. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1972.
- Podio, M., Felitti, SA., Siena, LA., Delgado, L., Mancini, M., Seijo, JG., González, AM., Pessino, SC., Ortiz, JP., 2014. Characterization and expression analysis of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK)* genes in sexual and apomictic *Paspalum notatum*. *Plant Mol Biol* 84:479–495.
- Pour, A. H., Aydin, M., & Haliloglu, K., 2019. Plant regeneration system in recalcitrant rye (*Secale cereale* L.). *Biologia*, 1-12.
- Pour, A. H., Aydin, M., Haliloglu, K., 2019. Plant regeneration system in recalcitrant rye (*Secale cereale* L.). *Biologia*, 1-12.
- Quinga, L. A. P., de Freitas Fraga, H. P., do Nascimento Vieira, L., Guerra, M. P., 2017. Epigenetics of long-term somatic embryogenesis in Theobroma cacao L.: DNA methylation and recovery of embryogenic potential. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131(2), 295-305.
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., Loyola-Vargas, V. M., 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3), 285.
- Rashid, K., Sadaqat, H. A., Khan, A. S., Ahmed, N., 2019. Assessment of spring wheat genotypes on physio-morphic attributes under water deficit milieu. *Pak. J. Agri. Sci*, 56(3), 629-632.
- Rodríguez-Sanz, H., Moreno-Romero, J., Solís, M. T., Köhler, C., Risueño, M. C., Testillano, P. S., 2014. Changes in histone methylation and acetylation during microspore reprogramming to embryogenesis occur concomitantly with BnHKMT and BnHAT expression and are associated with cell totipotency, proliferation, and differentiation in Brassica napus. *Cytogenetic and genome research*, 143(1-3), 209-218.
- Ronemus, MJ., Galbiati, M., Ticknor, C., Chen, J., Dellaporta, SL., 1996. Demethylation induced developmental pleiotropy in Arabidopsis. *Science*. 27:654–657
- Rupps, A., Raschke, J., Rümmler, M., Linke, B., Zoglauer, K., 2016. Identification of putative homologs of Larix decidua to Babyboom (BBM), leafy cotyledon1 (LEC1), Wuschel-related Homeobox2 (WOX2) and somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) during somatic embryogenesis. *Planta*, 243(2), 473-488.
- Santos, D., Fevereiro, P., 2002. Lost of DNA methylation affects somatic embriyogenesis in medicago truncatula. Plant cell, tissue and organ culture, 70(2), 155-161.

- Shariatpanahi ME, Belogradova K, Hessamvaziri L, Heberle-Bors E, Touraev A. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Rep.* 2006; 25:1294–1299. Doi:10.1007/s00299-006-0205-7
- Singh, A., Khurana, P., 2017. Ectopic expression of *Triticum aestivum* *SERK* genes (TaSERKs) control plant growth and development in *Arabidopsis*. *Sci Rep* 7:12368.
- Singla, B., Khurana, JP., Khurana, P., 2009. Structural characterization and expression analysis of the *SERK/SERL* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Int J Plant Genom.*
- Somleva, MN., Schmidt, EDL., Vries, SC., 2000. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. *Plant Cell Rep* 19:718–726
- Srinivasan, C., Liu, Z., Heidmann, I., Supena, ED., Fukuoka, H., Joosen, R., Lambalk, J., Angenent, G., Scorza, R., Custers, JB., Boutilier, K. *Planta*, 2016. 243:473–488 487 123
- Süzer, S. ve Demir, L., 2012. Sırta ekim sisteminde buğdayda (*Triticum aestivum* L.) en uygun ekim normunun belirlenmesi. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 8(4), 387-392.
- Tadesse, W., Sanchez-Garcia, M., Assefa, S. G., Amri, A., Bishaw, Z., Ogbonnaya, F. C., Baum, M., 2019. Genetic Gains in Wheat Breeding and Its Role in Feeding the World. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, 1(1).
- Talapatra, S., Goswami, P., Das, S., Raychaudhuri, S. S., 2016. Role of *SERK* during somatic embryogenesis and its interaction with Brassinosteroids. In *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications* (pp. 141-154). Springer, New Delhi.
- Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P., Zamore, P. D., 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & development*, 17(1), 49-63.
- Thorpe, T. A., 2012. *In vitro embryogenesis in plants* (Vol. 20). Springer Science & Business Media.
- TÜİK, 2019. <http://www.tuik.gov.tr> (17.01.2021).
- Türkiye Beslenme Rehberi TÜBER 2015. T.C. Sağlık Bakanlığı Yayın No:1031, Ankara: 2016.
- Tvorogova, V. E., Fedorova, Y. A., Potsenkovskaya, E. A., Kudriashov, A. A., Efremova, E. P., Kvitkovskaya, V. A., Lutova, L. A., 2019. The WUSCHEL-related homeobox transcription factor MtWOX9-1 stimulates somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138(3), 517-527. 988.
- Uddenberg, D., Valladares, S., Abrahamsson, M., Sundström, J. F., Sundas- Larsson, A., Von Arnold, S., 2011. Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor. *BioMed Central*. 5(7) 151.
- Valledor, L., Meijón, M., Hasbún, R., Cañal, M. J., Rodríguez, R., 2010. Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. *Journal of plant physiology*, 167(5), 351-357.
- Verdeil, J. L., Alemanno, L., Niemenak, N., and Tranbarger, T. J., 2007. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci.* 12, 245–252. doi: 10.1016/j.tplants.2007.04.002

- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L., 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 69(3), 233-249.
- Wang, Q. M., & Wang, L., 2012. An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. *Plant cell reports*, 31(9), 1535-1547.
- Winkelmann, T., 2016. "Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds," in *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, eds M. A. Germanà and M. Lambardi (New York, NY: Springer), 25–46. doi: 10.1007/978-1-4939-3061-6_2
- Wojcikowka, B., Botor, M., Moronczyk, J., Wojcik, A. M., Nodzynski, T., Karcz, J., Gaj, M., 2018. Trichostatin A triggers an embryogenic transition in Arabidopsis explants via an auxin-related pathway *frontiers in plant science*. 9, 1353.
- Wójcikowska, B., Botor, M., Morończyk, J., Wójcik, A. M., Nodzyński, T., Karcz, J., & Gaj, M. D., 2018. Trichostatin A triggers an embryogenic transition in Arabidopsis explants via an auxin-related pathway. *Frontiers in plant science*, 9, 1353.
- Wójcikowska, B., Jaskóła, K., Gąsior, P., Meus, M., Nowak, K., & Gaj, M. D., 2013. LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of Arabidopsis, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *Planta*, 238(3), 425-440.
- Wójcikowska, B., Wójcik, A. M., & Gaj, M. D., 2020. Epigenetic Regulation of Auxin-Induced Somatic Embryogenesis in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2307.
- Wu, B.H., Zheng, Y.L., Liu, D.C., Zhou, Y.H., 2003. Trait correlation of immature embryo culture in bread wheat. *Plant Breed* 122:47–51. doi:10.1046/j.1439-0523.2003.00778.x
- Yakovlev, I. A., Carneros, E., Lee, Y., Olsen, J. E., Fossdal, C. G., 2016. Transcriptional profiling of epigenetic regulators in somatic embryos during temperature induced formation of an epigenetic memory in Norway spruce. *Planta*, 243(5), 1237-1249.
- Yakovlev, I. A., Fossdal, C. G., 2017. In silico analysis of small RNAs suggest roles for novel and conserved miRNAs in the formation of epigenetic memory in somatic embryos of Norway spruce. *Frontiers in physiology*, 8, 674.
- Ye, X.G., Xu, H.J., Du, L.P., He, G.Y., Wang, K., Lin, Z.S., 2014. Establishment and application of large-scale transformation systems in wheat. *Zhongguo Nong Ye Ke Xue*, 47:4155–4171.
- Zhang, W., Yin, M.Q., Zhao, P., Wang, K., Du, L.P., Ye, X.G., 2018. Regeneration capacity evaluation of some largely popularized wheat varieties in China. *Zuo Wu Xue Bao*. 44:208–217.
- Zhao, B., Wu, T.T., Ma, S.S., Jiang, D.J., Bie, X.M., Sui, N., Zhang, X.S., Wang, F., 2020. TaD27-B gene controls the tiller number in hexaploid wheat. *Plant Biotechnol J.*, 18:513–525. doi:10.1111/pbi.13220
- Zhao, J., Whyte, J., Prather, R.S., 2010. Effect of epigenetic regulation during swine embryo embryogenesis and on cloning by nuclear transfer. *Cell and tissue research*, 341(1), 13-21.
- Zhao, P., Begcy, K., Dresselhaus, T., Sun, M. X., 2017. Does early embryogenesis in eudicots and monocots involve the same mechanism and molecular players? *Plant Physiology*, 173(1), 130-142.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Sümeyra UÇAR

Doğum tarihi:

Doğum Yeri:

Uyruğu:

Adres:

Tel:

E-mail:

Eğitim

Lise: Çat çok programlı lisesi

Lisans: Atatürk Üniversitesi/ Ziraat fakültesi/Tarımsal Biyoteknoloji

Yüksek lisans: Bitkisel Biyoteknoloji

Doktora: -

Yabancı Dil Bilgisi

İngilizce: İyi

Almanca: -

Rusça: -

Diğer: -

Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-