

**DOMUZ AYRIĞINDA (*Dactylis glomerata* L.)
OLGUN EMBRİYO KAYNAKLI
BİTKİ REJENERASYONU**

Selçuk KODAZ

**Yüksek Lisans Tezi
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Bilim Dalı
Prof. Dr. Kamil HALILOĞLU
2014
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DOMUZ AYRIĞINDA (*Dactylis glomerata* L.) OLGUN EMBRİYO
KAYNAKLI BİTKİ REJENERASYONU**

Selçuk KODAZ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Bilim Dalı

ERZURUM
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**DOMUZ AYRIĞINDA (*Dactylis glomerata* L.) OLGUN EMBRİYO KAYNAKLI
BİTKİ REJENERASYONU**

Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU danışmanlığında, Selçuk KODAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 03.../07.../2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Metin TOSUN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emine ORHAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 10.../07.../2014 tarih ve 28.../876... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2013/139

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOMUZ AYRIĞINDA (*Dactylis glomerata* L.) OLGUN EMBRİYO KAYNAKLI BİTKİ REJENERASYONU

Selçuk KODAZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kamil HALILOĞLU

Domuz ayrığı (*Dactylis glomerata* L.), çok yıllık, yumak oluşturan bir serin mevsim yem bitkisi. Birçoğu yabancı döllenene kendine uyumsuzluk gösteren yem bitkilerinin ıslahı oldukça güçtür. Bu durum çeşit geliştirme özelliğini kısıtlar. Ancak, biyoteknolojik yöntemlerle bu zorlukların bir kısmı aşılabılır. Bu araştırmada, rejenerasyon için domuz ayrığının olgun embriyoları 3 oksin tipi (2,4-D, dikamba ve pikloram) ve 6 dozundan (2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mg/l) oluşan 18 yöntemde 3 temel besi ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda araştırmada incelenen tüm parametreler üzerine yöntemin, temel besi ortamının ve bunların interaksyonu çok önemli olmuştur ($P<0.01$). En yüksek kalus oluşumu %62,5 ile 12 mg/dikamba içeren N6 ortamında, en yüksek embriyonik kalus oluşum oranı %45,0 ile 12 mg/l dikamba içeren SH ortamında, cevap veren embriyogenik kalus oluşumu %15 ile 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında, en yüksek rejenerasyon etkinliği ise 17,0 adet ile 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında elde edilmiştir. Sonuç olarak, domuz ayrığında endosperm destekli olgun embriyoların başarılı bir şekilde kullanılabileceği ve en iyi bitki rejenerasyonun 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında meydana geldiği belirlenmiştir.

2014, 51 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Olgun embriyo, oksin tipi, temel besi ortamı, bitki rejenerasyonu

ABSTRACT

Master Thesis

PLANT REGENERATION FROM MATURE EMBRYOS OF ORCHARDGRASS (*Dactylis glomerata* L.)

Selçuk KODAZ

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops
Cereals and Pulse Crops
Supervisor: Prof. Dr. Kamil HALILOĞLU

Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) is perennial, cool-season forage plant. Their open pollinated nature and self-incompatibility make breeding of forage crops difficult. This limits the genetic improvement and cultivar development. However, some of these difficulties can be overcome by methods of biotechnology. In this study, orchardgrass mature embryos were cultured in three basic nutrient medium with 18 combinations consisting of 3 auxin type (2,4-D, dicamba and picloram) and 6 doses (2, 4, 6, 8, 10 and 12 mg / l) for *in vitro* regeneration. As a result, the nutrient medium and their interactions were significant ($P < 0.01$). The highest callus formation (62.5%) was observed in N6 medium containing with 12 mg/l dicamba, the highest embryogenic callus formation rate (45.0%) was in SH medium with 12 mg / l dicamba and the highest responding embryogenic callus rate (15%) was monitored in MS medium with 8 mg/l 2,4-D. The highest regeneration efficiency was observed in MS medium (17.0 plantlets) with 8 mg / l 2,4-D. Consequently, endosperm-supported mature embryos of orchardgrass can be successfully used as explant and the best plant regeneration medium was determined as MS medium containing 8 mg / l 2,4-D.

2014, 51 pages

Keywords: Mature embryo, type of auxin, basal medium, plant regeneration

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmam boyunca benden bilimsel katkı ve yardımlarını esirgemeyen, her konuda örnek aldığım ve hayatımı yönlendirmemde çok büyük etkisi olan, değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan ve uygulamalarımda bana yön veren değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na, Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN'a ve Doktora öğrencisi Sayın Arash HOSSEİN POUR'a en içten dileklerle teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca, desteği ve sevgisi ile her zaman yanımda olan, varlığı ile bana güven veren, bugünlere gelmemde büyük emek sahibi aileme sonsuz teşekkür ederim.

Selçuk KODAZ

Haziran, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	i
ÇİZELGELER DİZİNİ	ii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	7
2.1. Domuz Ayrığının Bitki Sistematiğindeki Yeri ve Sitogenetiği.....	7
2.2. Domuz Ayrığının Bitkisel Özellikleri	8
2.3. Domuz Ayrığının Önemi ve Kullanım Alanı	9
2.4. Domuz Ayrığının Islahı.....	10
2.4.1. Klasik Islahı.....	10
2.4.2. Doku Kültürü Çalışmaları ve Gen Aktarımı	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Bitki Materyali	20
3.1.2. Kimyasallar	20
3.1.2.a. Sterilizasyon için kullanılan kimyasallar.....	20
3.1.2.b. Kültür ortamları için kullanılan kimyasallar	20
3.1.2.c. Besi ortamındaki MS, SH ve N6 tuzları ve vitaminlere ilave olarak kullanılan kimyasallar	21
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Uygulanan sterilizasyon teknikleri.....	23
3.2.1.a. Uygulamanın yapıldığı çalışma ortamı ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu.....	23
3.2.1.b. Çalışmada kullanılan tohumların yüzey sterilizasyonu.....	23
3.2.1.c. Kullanılan besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu ...	23
3.2.1.d. Sterilizasyonunda kullanılan solüsyonların hazırlanışı	24

3.2.2. Çalışmada kullanılan temel besi ortamları ve hormonlar için stok solüsyonunun hazırlanışı.....	24
3.2.2.a. Makro elementlerin stok solüsyonunun hazırlanışı	24
3.2.2.b. Mikro elementlerin stok solüsyonunun hazırlanışı	25
3.2.2.c. Demir şelatın hazırlanışı	25
3.2.2.d. Vitamin stok solüsyonunun hazırlanışı	26
3.2.2.e. Araştırmada kullanılan oksinlerin hazırlanışı	26
3.2.3. Kalus oluşum ortamının hazırlanışı.....	27
3.2.4. Bitki rejenerasyon ortamının hazırlanışı	28
3.2.5. Eksplantın hazırlanışı	28
3.2.6. Araştırmada incelenen karakterler.....	29
3.2.7. Verilerin istatistiksel analizi	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	30
4.1. Kalus Oluşum Oranı (%)	30
4.2 . Embriyogenik Kalus Oluşum Oranı (%)	32
4.3. Cevap Veren Embriyogenik Kalus Oluşum Oranı (%)	35
4.4. Rejenerasyon Etkinliği (Adet).....	38
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	42
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	52

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	Santimetre
mm	Milimetre
g	Gram
mg	Miligram
μ M	Mikromolar
N	Normal
l	Litre
Mbp	Mega baz çifti
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
Dikamba	3,6-Diklorobenzoik asit
Pikloram	4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit
NAA	Naftelan asetik asit
ABA	Absisik asit
CH	Kazein hidrozolat
BAP	6-Benzil amino pürin
MS	Temel besi ortamı, Murashige and Skoog (1962)
SH	Temel besi ortamı, Schenk and Hildebrandt (1972)
N6	Temel besi ortamı, Chu <i>et al.</i> (1978)
LS	Temel besi ortamı, Linsmaier and Skoog (1965)
B5	Temel besi ortamı, Gamborg <i>et al.</i> (1968)
KO	Kalus oluşum oranı
EKO	Embriyogenik kalus oluşum oranı
CEKO	Cevap veren embriyogenik kalus oluşum oranı
RE	Rejenerasyon etkinliği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Tohumun embriyosunun kesim bölgeleri	28
Şekil 4.1. Kalus oluşum ortamında meydana gelen kaluslar.	32
Şekil 4.2. Rejenerasyon ortamına aktarıldıktan sonra meydana gelen embriyogenik kaluslar.	35
Şekil 4.3. Embriyogenik kaluslardan sürgün oluşumu	38
Şekil 4.4. Besi ortamlarında meydana gelen rejenere bitkiler	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. MS, SH ve N6 kültür ortamları için kullanılan kimyasal bileşimleri ve miktarları	21
Çizelge 3.2. MS, SH ve N6 ortamlarına ek olarak kullanılan kimyasallar	22
Çizelge 3.3. Oksin tipi ve dozlarına göre yöntemler	22
Çizelge 3.2. Oksinlerin stok solüsyonlarının hazırlanışı	27
Çizelge 4.1. Temel besi ortamlarına ve yöntemlere göre kalus oluşum oranı (%).....	30
Çizelge 4.2. Temel besi ortamlarına ve yöntemlere göre Embriyogenik kalus oluşum oranı (%).....	33
Çizelge 4.3. Temel besi ortamlarına ve yöntemlere göre cevap veren embriyogenik kalus oluşum oranı (%).....	36
Çizelge 4.4. Temel besi ortamlarına ve yöntemlere göre rejenerasyon etkinliği (adet).....	39

1. GİRİŞ

Ülkemiz insanların ana besin kaynağını bitkisel kökenli besinler oluşturmaktadır. Hayvansal ürünlerin tüketimi ise çağdaş ülkelerle kıyaslanamayacak kadar düşük düzeyde bulunmaktadır. Hayvansal besinlerin yeterli tüketimi hayvansal ürün miktarını artırmaktan, hayvansal ürünleri arttırmanın yolu ise, bol ve kaliteli kaba yemle hayvanları beslemek ve yerli hayvan ırklarını ıslah etmekten geçmektedir. Hayvansal üretimin temel taşları olan yem bitkileri, ülkemizde tarla bitkileri yetiştirildiği tüm alanlar içerisindeki payı %5-6 gibi oldukça düşük bir düzeydedir. Buna karşın bu oran gelişmiş ülkelerde bu oran %30-50'lercivarındadır. Bu veriler ülkemizde yem bitkileri yetiştiriciliğinin, olması gereken düzeyden çok uzakta olduğunu göstermektedir (Hatipoğlu vd 2009).

İnsanlar tarafından tüketilen enerjinin %90'ı ve proteinin ise %80'i ise bitkisel kaynaklıdır (Mantell *et al.* 1985). Geriye kalan enerji ve protein gereksinimi hayvansal besinlerden karşılanmaktadır. Bununla birlikte insan beslenmesinde bitkisel ve hayvansal ürünlerin oranı ülkelerin gelişmişlik düzeylerine göre farklılık gösterir ve bu ürünlerin miktarları oranında ülkeler gelişmiş, gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkeler olarak sınıflandırılmaktadır (Tükel ve Hatipoğlu 1997). Bu kriterlere göre ülkemiz gelişmekte olan ülkeler grubunda yer almaktadır. Çünkü ülkemizde kişi başına tüketilen bir günlük protein miktarı dünya ortalaması olan 69,2 g'dan fazla olmasına karşın, tüketilen proteinin %80'ine yakın kısmı bitkisel kaynaklı gıda maddelerinden karşılanmaktadır. Bunun nedeni ise ülkemizde hayvansal ürünlerin üretiminin yetersiz olmasıdır (Tükel ve Hatipoğlu 1997).

Tarım, bitkisel ve hayvansal üretim ile bu ürünleri değerlendirme bilim ve tekniği olarak düşünüldüğünde, yem bitkileri ülke tarımında önemli rol oynamaktadır. Yem bitkileri bir yandan hayvan yetiştiriciliğinin ihtiyacı olan kaliteli kaba yem ihtiyacını karşılanırken, diğer taraftan bitkisel üretimde önemli yeri bulunan ekim nöbeti uygulamaları için vazgeçilmez bir unsurdur (Avcıoğlu vd 2009).

İnsanların sağlıklı beslenmesi yeterli ve kaliteli hayvansal gıdaları tüketmelerine bağlıdır. Kaliteli hayvansal gıdalar da yeterli ve nitelikli yemlerle beslenen hayvanlardan sağlanabilir. Ülkemizde hayvansal gıda maddelerin üretiminin yetersiz olması, ülkemiz hayvancılığının sorunları ile ilgilidir. Ülkemiz hayvancılığının en önemli sorunlarından biri kaba yem üretimidir (Avcıoğlu vd 2009).

Ülkemizin hayvan varlığına bakıldığı zaman büyükbaş ve küçükbaş yaklaşık 53 milyon baş olduğu görülmektedir. Bu hayvan varlığımızın ihtiyaç duyduğu kaba yemin karşılanacağı alanlar ise çayır-meralar ve tarla tarımda yer alan yem bitkileri üretim alanlarıdır. Ülkemizde yaklaşık olarak 1,5 milyon ha alanda çayır, 13 milyon ha alanda mera ve 1,5 milyon ha alanda yem bitkileri üretim yapılmaktadır. Bu alanlardan yaklaşık olarak 21 milyon ton kaba yem üretilmektedir. Bu üretim ise hayvan varlığımızın yıllık ihtiyacı olan 38 milyon tonun gerisinde kalmaktadır (Koç vd 2012).

Tarımsal kaynaklarımıza bakıldığında hayvancılık sektörünün kaba yem ihtiyacının en ucuz ve en kolay sağlandığı ana kaynağın çayır ve meralar olduğu görülmektedir. Ancak yapılan araştırmalar, bu doğal kaynaklarımızın yıllardır süren bilinçsiz kullanma sonucunda bitki örtüsünü kaybetmiş, çıplaklaşmış ve erozyona uğramış araziler olduğunu göstermektedir (Tosun 1996). Vejetasyonu zayıflamış, verimi ve kalitesi düşük olan bu meralardan yeterli hayvansal ve bitkisel ürün alınamamaktadır (Gençkan 1983).

Ülkemiz çayır ve meralarının yıllardır düzensiz kullanılması nedeniyle verimliliğini önemli ölçüde yitirmiş olması ve tarla tarımı içinde yem bitkileri yetiştiriciliğinin yeterli önemi kazanamaması yalnızca hayvancılığımızı olumsuz yönde etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda toprak ve su kaynaklarımızın da olumsuz yönde etkilenmesine neden olmaktadır (Süle 2005).

Hayvancılığımızın kaba yem sorununu çözmek, toprak ve su kaynaklarımız üzerindeki olumsuz etkiyi kaldırmak için çayır ve meralarımızın uygun ıslah yöntemleri uygulanarak yeniden bol ve kaliteli yem üretir duruma getirilmeleri sağlanmalıdır. Aynı

zamanda tarla tarımında yem bitkileri yetiştiriciliğinin de yaygınlaştırılması gerekmektedir

Yem bitkilerinin yeşil yem olarak, toprak verimliliği ve toprak koruma açısından önemli bir yeri vardır. Toprağın ihtiyacı olan organik maddeyi sağlamak amacıyla yetiştirilen bitkilerin genellikle çiçeklenme döneminde sürülerek toprak altına gömülmesi işlemi yeşil gübreleme olarak adlandırılır (Henson 1955). Yem bitkileri yetiştigi toprakları verimli kılar. Bu bitkiler farklı toprak katmanlarında yayılan yüksek orandaki kök kalıntıları ve sap artıkları ile toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından önemli rol oynarlar. Bitki artıkları toprağı organik madde ve bazı besin elementleri bakımından zenginleştirmektedir (Mohering and Rowls 1970). Yem bitkileri toprağı kaplama alanlarının yüksekliği, iyi bir çim kapağı oluşturmaları, büyük bir kısmının çok yıllık olması ve yılın uzun bir döneminde gelişme göstermeleri, toprağın agregatlaşmasını artıran organik madde içeriğini yükseltmeleri, ortamın geçirgenliğini artırarak yüzey akışını azaltıp daha fazla suyun toprakta tutunmasını sağlayarak yağmur damlalarının düşüş hızını keserek diğer bitkilere oranla toprağın erozyonla aşınmasını azaltmaktadır (Thurow *et al.* 1988).

Dünya üzerinde serin mevsim kuşağında yer alan meraların en önemli bitkileri buğdaygillerdir (Avcıoğlu vd 2009). Bitkiler âlemi içerisinde tek çenekliler alt sınıfına giren buğdaygiller familyası (*Gramineae*), dünya üzerinde yaklaşık 650-785 cins içerisinde yer alan 10 000 türden oluşmaktadır (Watson and Dallwitz 1992). Mera bitkisi olarak buğdaygillerin otlatmaya dayanıklılığı baklagillerden daha fazladır. Buğdaygillerin adaptasyon kabiliyetleri yüksektir. Elverişsiz iklim (soğuk, sıcak ve kurak) ve toprak (verimsiz ve bozuk) şartlarında doğal vejetasyonların dominant bitkilerini oluştururlar. Akdeniz ikliminin hâkim olduğu yerlerde kış döneminin hâkim bitkileri serim mevsim buğdaygilleri, yaz döneminin ise sıcak mevsim buğdaygilleridir. Buğdaygiller hayvan besleme açısından, gerek tarım arazilerinde yetiştirilen yem bitkisi türleri olarak, gerekse çayır-meralarda yetişen doğal türler olarak büyük önem taşırlar (Avcıoğlu vd 2009).

Buğdaygiller familyası (*Gramineae*)'nın yumak oymağı (*Festuca*) içerisindeki en küçük cinslerden biri olan ve 15 türü içeren domuz ayrığı (*Dactylis*) cinsinin en bilinen türü olan domuz ayrığı (*Dactylis glomerata* L.), çok yıllık, yumak oluşturan bir serin mevsim bitkisidir. Serin mevsim buğdaygil yem bitkileri içerisinde en verimli türlerden biridir. Saf olarak veya diğer çok yıllık buğdaygil ve baklagil yem bitkileri ile karışık olarak yetiştirilir. Avrupa, Kuzey Afrika ve Asya'nın ılıman bölgelerinin doğal bir türüdür (Whyte *et al.* 1975). Ülkemizin hemen hemen bütün bölgelerinde doğal olarak yetişir. Dünyanın nemli-ılıman bölgelerinde birçok ülkede mera bitkisi, kuru ot, yeşil ot ve silaj bitkisi olarak yetiştirilir (Avcıoğlu vd 2009).

Diğer kültür bitkilerine göre daha geç kültüre alınan yem bitkilerinin ıslahı 20. yüzyılda başlamıştır. Yem bitkilerinde ot verimi ve kalitesinin ıslahı için yoğun çalışmalar sürdürülmüştür. Fakat bu çalışmalar, klasik ıslah yöntemleri ile yem bitkileri ıslahının çok uzun zaman aldığını göstermiştir (Avcıoğlu vd 2009).

Birçoğu yabancı döllenene kendine uyumsuzluk gösteren yem bitkilerinin ıslahı oldukça güçtür (Spangenberg *et al.* 1997). Çünkü bu bitkiler heterezigottur ve kendine uyumsuzluk, arzu edilen genlerin kısa sürede bir bitkide toplanması işlemini kısıtlar. Bu durum çeşit geliştirme özelliğini kısıtlar. Yem bitkileri ıslahında biyoteknolojik yöntemleri klasik ıslah yöntemlerini tamamlayıcı araçlar olarak kullanmak suretiyle bu bitkilerin kısa sürede homozigot bitkiler elde edilebilir, tarımsal açıdan yararlı genler bir başka bitki veya organizmadan gen halinde izole edilerek üzerinde çalışılan yem bitkisine aktarılabilir, çeşitler DNA düzeyinde tanımlanabilir ve DNA markörlerinden yararlanarak seleksiyon süreci kolaylaştırılabilir (Avcıoğlu vd 2009).

Yem bitkilerinde embriyo kültürü, meristem kültürü, anter kültürü, kalus kültürü ve hücre ve protoplast kültürü gibi *in vitro* kültür teknikleri uygulanabilmektedir (Avcıoğlu vd 2009).

Embriyo kültürü tekniği, türler arası ve cinsler arası melezlemelerde oluşan ve yaşama kabiliyeti olmayan melez embriyolardan melez bitkilerin elde edilmesinde

kullanılmaktadır. Çok farklı kullanım alanına sahip olan embriyo kültürünün, türler ve cinsler arası melezlemelerde melez uyumsuzluğunun ortadan kaldırılması amacıyla kullanılması embriyo kurtarma tekniği olarak adlandırılmaktadır (Hatipoğlu 1997). Embriyo kurtarma tekniği, melezlemeden sonra oluşan genç melez embriyonun, uygun dönemde tohum taslağından izole edilmesi ve uygun besi ortamında, steril koşullarda kültüre alınarak melez bitkinin elde edilmesini kapsamaktadır (Avcıoğlu vd 2009).

Meristem kültürü, bitkinin büyüme konisi ve birkaç yaprak primordiasını içeren kısmının, *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla bitki elde edilmesidir (Hatipoğlu 1997). Meristem kültürü tekniği, ekonomik değeri yüksek bitkilerin laboratuvar koşullarında çoğaltılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yem bitkilerinde ise virüs eliminasyonu, gen kaynaklarının muhafazasında ve değerli ıslah materyalinin klonal çoğaltılmasında kullanılmaktadır. Bu teknik kullanılarak bir yem bitkisi çeşidini oluşturan az miktarda anaç bitkilerden kısa sürede yeterli miktarda anaç tohum elde edilebilir (Dalton and Dale 1985). Meristem kültürü, yem bitkilerinde haploid bitkiler, steril mutant bitkiler ve aneuploid bitkiler gibi özel materyallerin muhafazasında da uygulama alanı bulabilir. Bunu yanında, mikro-balistik yöntemiyle gen aktarılmasında da meristem kültürlerinden yararlanılmaktadır (Avcıoğlu vd 2009).

Anter kültürü, belirli gelişme devresindeki haploid mikrosporları içeren anterlerin, *in vitro* koşullarda uygun besi ortamlarında kültüre alınarak, mikrosporların normal gelişmesinin engellenmesi ve hücre bölünmesi sonucu oluşan kalus ve somatik embriyolardan, gametik kromozom sayısında haploid bitkilerin elde edilmesi tekniğidir (Hatipoğlu 1997). Elde edilen haploid bitkilerin kök veya sürgünlerinin kolkisin ile muamele edilmesiyle kromozom sayısı ikiye katlanarak fertil diploid homozigot bitkiler elde edilebilir. Bu teknik ile melezleme ıslahında klasik yöntemlerle 5-6 yılda elde edilebilecek homozigot hatların bir yılda edilmesi mümkün olabilmektedir (Avcıoğlu vd 2009).

Bitki parçaları (eksplant), *in vitro* şartlarda uygun çeşit ve konsantrasyonda büyüme düzenleyicisi içeren ortamlarda kültüre alındığında, bu bitki parçasındaki hücreler mitoz

bölünmeyle çoğalarak kalus adı verilen organize olmamış hücre topluluklarını meydana getirirler. Organize olmamış hücre topluluklarından *in vitro* şartlarda uygun büyüme düzenleyicisi konsantrasyonunu içeren ortamlarda somatik embiyolar oluşur. Bu somatik embriyolardan kökü, sapı ve yaprağı bulunan yeni bitkiler rejenere olur (Hatipoğlu 1997). Kalus oluşturmak amacıyla eksplant olarak, olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyolar, genç yapraklar, karyopsis, genç çiçek durumları, endosperm, hipokotil, kök, boğum ve boğum araları gibi parçacıklar kullanılmaktadır (Avcıoğlu vd 2009).

Domuz ayrığı ıslah çalışmalarında, moleküler ıslah yöntemlerinin yüksek düzeyde kullanılabilmesi için, etkin bir *in vitro* rejenerasyon sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Doku kültürü çalışmalarında en fazla kullanılan eksplant olgunlaşmamış embriyo (Arzani and Mirodjagh 1999) olmakla beraber, domuz ayrığında anter (Christensen *et al.* 1997), yaprak (Somleva *et al.* 1993; Tomaszewskiz *et al.* 1994; Kuklin and Conger 1995; Horn *et al.* 1988) ve tohum (Hyoshin *et al.* 2000; Eunkyung *et al.* 2002; Sanghoon *et al.* 2004) gibi değişik eksplant türleri kullanılmıştır. Eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış embriyonun kullanılması daha uzun süre ve finansman gerektirmesi sistemin etkinliğini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle alternatif bir eksplant kaynağı olan olgun embriyo kullanmanın daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Olgun embriyoların kaynağı olan tohumların temin edilmesi ve depolanması yılın her döneminde çalışma olanağı sağlamaktadır (Birsin ve Özgen 2004).

Bu çalışmanın amacı, önemli bir yem bitkisi olan domuz ayrığı için hızlı, güvenilir, tekrarlanabilir ve modern bitki ıslahında kullanılabilir *in vitro* rejenerasyon sisteminin geliştirilmesidir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Domuz Ayrığı'nın Bitki Sistematikindeki Yeri ve Sitogenetiği

Domuz ayrığı (*Dactylis glomerata* L.), buğdaygiller familyasının (*Poaceae*) Yumak oymağı (*Festuceae*) içerisindeki en küçük cinslerden biri olan ve 15 türü içeren Domuz Ayrığı cinsinin (*Dactylis* sp.) en bilinen türüdür (Serin ve Tan 2012).

Âlem: Bitkiler Alemi (*Plantea*)

Alt Âlem: Embriyolu Bitkiler (*Embryophyta*)

Bölüm: Trakeli Bitkiler (*Tracheophyta*)

Alt Bölüm: Yapraklı Bitkiler (*Pteropsida*)

Sınıf: Kapalı Tohumlular (*Angiospermae*)

Alt Sınıf: Tek Çenekliler (*Monocotyledoneae*)

Takım: Kavuzlu Bitkiler (*Glumiflorae*)

Familya: Buğdaygiller (*Gramineae* = *Poaceae*)

Alt Familya: Yumaklar (*Festucoideae*)

Oymak: Yumak Oymağı (*Festuceae*)

Cins: Domuz Ayrığı Cinsi (*Dactylis* sp.)

Tür: Domuz Ayrığı (*Dactylis glomerata* L.)

Domuz ayrığı doğal poliploit olarak üzerinde en çok çalışılan cinslerden biridir (Mizianty 1990). Domuz ayrığı 4312 Mbp genom boyuna sahip olup, diploit ($2n=2x=14$), tetraploit ($2n=4x=28$) ve hekzaploit ($2n=6x=42$) kromozom sayılarına sahip bireyleri bulunmaktadır (Last *et al.* 2013). Poliploidi formlarına göre domuz ayrığı'nın dünya üzerindeki yayılımına bakıldığında zaman en yaygın poliploidi formunun tetraploit olduğu ve Türkiye'nin de tetraploit formunun bulunduğu alan içerisinde yer aldığı görülmektedir (Borill 1977).

Domuz ayrığında mayotik özelliklerin belirlenmesi için yapılan çalışmalar bivalent eşlenmelerin ağırlıkta olduğunu göstermektedir (Tosun vd 1999). Yine, Lentz *et al.* (1983) en yaygın eşlenme şeklinin bivalent eşlenme olduğunu, bu eşlenmeyi kuadivalent, ünivalent ve trivalentlerin izlediğini belirlemişlerdir. Falistocco and Mariani (1984) kromozom eşlenme tipleri bakımından *D. glomerata* ve *D. hispanica* alttürleri arasında önemli farklılık olduğunu belirlemişlerdir. Bu farklılıkların da domuz ayrığı alttürlerinin teşhisinde önemli bir özellik olduğunu bildirmişlerdir.

Tosun vd (1999), Erzurum yöresinde doğal olarak yetişen yabani domuz ayrığı bitkilerinde bazı sitolojik özellikleri belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada kromozom sayımları sonucunda bütün bitkilerin tetraploit ($2n=48=28$) olduğu belirlenmiştir. Metefaz I döneminde en yaygın eşlenme şeklinin bivalent olduğu, bunu kuadivalent, ünivalent ve trivalent eşlenme şekillerinin izlediği tespit edilmiştir. İncelenen anafaz I hücrelerinin büyük kısmında kromozom ayrılışlarının dengeli olduğu ve az sayıda gecikmeli ve köprülü hücrelerin olduğu saptanmıştır.

2.2. Domuz Ayrığının Bitkisel Özellikleri

Domuz ayrığı çok yıllık yumak oluşturan bir bitkidir. Gövde çiçekli dönemde iklime bağlı olarak bitki boyu 60-200 cm arasında değişir (Jung and Baker, 1985). Saplarda yaprak sayısı azdır. Fakat bitkinin taban kısmı bol yapraklıdır. Yaprak ayasının enine kesiti V şeklindedir. Yaprak kını yassı ve omurgalıdır. Yakacık zarımsı yapıda ve 3-10 mm uzunluğundadır. Kulakçık bulunmaz. Yaprak ayaları 2-12 mm kalınlığında ve yaklaşık 1 m uzunluğundadır. Yaprakların rengi koyu yeşilden mavi-yeşile kadar değişir. Yaprak karakterleri çevre koşullarına ve çeşide bağlı olarak farklılık gösterir. Çiçek durumu 8-15 cm uzunluğunda bir salkımdır. Salkımın alttaki dalları üsteki dallara göre daha uzundur ve daha fazla dallanır. Salkımdaki başakçıkların her birinde 2-5 çiçek bulunur. Kavuzlu meyveler 4-7 mm uzunluğunda, 1-1,5 mm genişliğinde ve 0,2-0,8 mm kalınlığındadır (Gençkan 1983). 1000 tane ağırlığı 1 g'dır. Diğer buğdaygillerde olduğu gibi domuz ayrığı da saçak kök sistemine sahiptir. Kökler çayır

salkım otu ve kelp kuyruğuna göre daha fazla toprak derinliğine inmesine karşın kılçıksız broma göre daha azdır (Avcıoğlu vd 2009).

2.3. Domuz Ayrığı'nın Önemi ve Kullanım Alanı

Domuz ayrığı bol yapraklı, verimli ve değişik iklim ve toprak şartlarına adapte olabilen bir bitkidir. Adapte olduğu yörelerde yabancı otlar ve diğer buğdaygillerle rekabet edebilir. Domuz ayrığı en fazla otlatmak amacıyla, kuru ot, yeşil yem ve silajlık olarak kullanılmaya uygundur (Serin ve Tan 2012).

Domuz ayrığı gerek yalnız gerekse baklagillerle karışık ekilerek otlatmak amacıyla kullanılır. İlkbaharda erken gelişen bir bitki olduğundan, erken ilkbahar taban merası olarak kullanılmaya uygundur. Otlatmak amacıyla kullanıldığında münavebeli otlatılmalıdır. Ağır otlatmaya uygun değildir. Çünkü hayvanlar taze sürgünleri ve genç bitkileri tercih ettiklerinden bitkiler zayıflar ve neticede ölürler (Serin ve Tan 2012).

Domuz ayrığı yumak oluşturan bir yem bitkisi olduğundan uygun bir idare ile farklı baklagillerle birlikte ekilebilir. Genellikle ladino ak üçgülü ile yetiştirilir, ancak soğuk bölgelerde yonca ile birlikte ekilir. Domuz ayrığı daha erken olgunlaştığı ve olgunlaşma ile besin değeri hızla düştüğünden dolayı erken hasat veya otlatma ile yüksek kaliteli ot sağlanabilir (Sprague and Barber 1950; Robinson and Sprague 1952).

Domuz ayrığı dik gelişen bir bitki olduğundan biçerek kullanılmaya uygun bir bitkidir. Kuru ot üretmek amacıyla sulu şartlarda yetiştirilmektedir (Altın 1987; Koç vd 1998).

Diğer serin mevsim buğdaygilleri ile karşılaştırıldığı zaman domuz ayrığı otunun beslenme değeri orta seviyededir. Bitkinin en büyük dezavantajlarında birisi hızlı bir gelişme göstermesi nedeniyle besin değerinin azalmasıdır (Serin ve Tan 2012).

Domuz ayrığı genellikle yonca ve çayır üçgülü ile ortak yetiştirilmektedir. Bu karışımın biçim zamanı baklagile göre ayarlanmalıdır. Karışımında yer alacak domuz ayrığının gelişme zamanı baklagille uyumlu olmalıdır. Çünkü domuz ayrığı erkenci bir bitkidir. Domuz ayrığı vejetatif dönemdeyken besin değeri yoncanın vejetatif dönemdeki besin değerine yakındır. Buna karşın tam çiçekteyken besin değeri yarı yarıya düşer. Kalitedeki bu önemli düşüşten kaçınmak için domuz ayrığı baklagil ile biçim zamanı bakımından uyumlu olmalıdır. Yonca ilk çiçeklendiğinde tam salkılanma veya çiçeklenme dönemindeki domuz ayrığı karışım için uygundur (Altın 1987).

2.4. Domuz Ayrığının Islahı

Domuz ayrığı buğdaygil yem bitkileri içerisinde yabancı tozlaşan bir serin iklim yem bitkisidir. Bu nedenle aşağıda yabancı tozlaşan buğdaygil yem bitkilerine ait ıslah yöntemlerinden bahsedilmiştir.

2.4.1. Klasik Islahı

Çayır mera ve yem bitkileri birçok özellik bakımından diğer bitki türlerinden ayrılır. Yem bitkilerinin ıslah edilerek geliştirilmesi tozlanma yöntemi, döllenmedeki düzensizlikler, tohum bağlamadaki zorluklar ve çoğu yem bitkisinin çok yıllık olması gibi zorluklar gibi nedenlerden dolayı oldukça zordur (Poehlman 1978). Yem bitkileri ıslahında diğer bitkilerde kullanılan yöntemler kullanılmasına rağmen birçok sorun ortaya çıkmaktadır.

Yabancı döllen yem bitkilerinde introdüksiyon yaygın bir şekilde kullanılan bir klasik ıslah yöntemidir. Birçok ülkede introdüksiyon yoluyla elde edilen ve geniş alanlarda üretimi yapılan pek çok yem bitkisi türü bulunmaktadır (Avcıoğlu vd 2009).

Yabancı dölenen çayır mera ve yem bitkilerinde seleksiyon iki farklı şekilde uygulanabilmektedir. Bunlardan birincisi toplu seleksiyon, diğeri ise döl kontrollü doğal teksel seleksiyondur. Toplu seleksiyonda kaynak popülasyondan istenen karakterlere

sahip olan bitkilerden tohumlar alınır ve karıştırılır. Karıştırılan bu tohumlar ekilir. Seleksiyon bitkilerin fenotipine göre yapılır. Üstün genotipe sahip bitkilerin seçilmeme, polen kaynağının bilinmemesi gibi olumsuzluklara sahiptir. Döl kontrollü teksel seleksiyonda ise başlangıç popülasyonundan seçilen üstün genotipe sahip bitkilerin tohumları ekilerek kontrolleri yapılır. Yem bitkilerinde yabancı dölleme olduğundan farklı kombinasyonlar ortaya çıkabilir. Üstün bitkiler tekrar seçilir. Birkaç kuşak seleksiyon ve döl kontrolü yapılır ve seçilen tohumlar karıştırılarak geniş alanlarda tohum üretimi yapılır (Avcıoğlu vd 2009).

Domuz ayrığında genellikle ot verimi ve kalitesi yönünde seleksiyon çalışmaları yapılmıştır. Şahin (2008) yaptığı bir seleksiyon çalışmasında iki ekotip kullanmıştır. Bu iki ekotip morfolojik görünüşleri bakımından birbirinden farklı olduğunda aralarında 2 km mesafe bulunan iki ayrı deneme olarak yürütmüştür. Popülasyon içerisindeki varyasyondan yararlanarak uygun özellikte bitkileri seçmek amacıyla ana hat seleksiyon yöntemini uygulamıştır.

Shenk and Westerhass (1982) domuz ayrığı germplazm kaynaklarından verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi ve seçilen materyalin genetik parametrelerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada 1000'in üzerinde yerli ve yabancı kaynaklardan hastalıktan ari ve güçlü klonlardan 130 orta geçici ve 101 geçici klon seçmişlerdir.

Bir grup seçilmiş bireyin (kendilenmiş hat, melez, çeşit veya klon) oluşturduğu açık döllenen bir popülasyonun ileri kuşağı sentetik çeşit olarak adlandırılır. Sentetik çeşidi oluşturan bireylerin kombinasyon yeteneklerine göre seçilmeleri gerekmektedir (Allard 1960). Sentetik çeşit oluşturulurken heterosis etkisi başlıca üç faktöre bağlıdır. Bu faktörler sentetik çeşide giren hat sayısı, her bir hattın verim gücü ve hatlar arasındaki kombinasyon uyuşmasının üstünlüğüdür (Demir 1975).

Yem bitkilerinde sentetik çeşit, bireylerin tek tek bir araya getirilmesi ile oluşur. Çok sayıda bitki istenen özellikler bakımından gözlenir, özellikleri taşıyan bitkiler fenotiplerine göre seçilir. Seçilen bitkiler açık tozlanmaya bırakılır ve kombinasyon

yeteneklerinin saptanması için döl testine tabi tutulur. Son aşamada döllerin performansına göre seçilen bitkilerden sentetik çeşit oluşturulur (Poehlman 1978).

Yabancı döllenen bitkilerde heterezigot bitkiler anaç olarak seçilir. Bu yüzden önce kendileme ile homozigotlaşma sağlanır. Kendilemeye birkaç kuşak devam edilir ve homozigot bitkiler elde edilir. Yabancı döllenen bitkilerde kendilenmiş hat sayısına göre melezler, tek melez, çift melez, üçlü melez ve çoklu melez olarak farklı şekilde oluşur (Geçit vd 2009).

Tek melez, kendilenmiş iki hattın melezlenmesi ile elde edilir. Bu bitkiler melezlendikten sonra ana ve baba bitkiden üstün özellikler göstermesine melez azmanlığı (heterosis) denir. Çift melez, iki tek melezin melezlenmesi ile elde edilir. Üçlü melez, bir tek melez ile kendilenmiş bir hattın melezlenmesi sonucu elde edilir. Çoklu melez ise iki çift melezin melezlenmesi ile meydana gelir (Geçit vd 2009).

Christie (1973) yaptığı bir çalışmada tek melez domuz ayrığını verim, *in vitro* sindirilebilirlik ve nispi olgunluklarını değerlendirmiş ve hibrit çeşitlerin ot verimi bakımından daha yüksek olduğunu belirlemiştir.

2.4.2. Doku Kültürü Çalışmaları ve Gen Aktarımı

Yem bitkileri diğer kültür bitkilerine göre daha geç kültüre alındığı için yem bitkileri ıslahı da daha geç başlamıştır. Yem bitkilerinde ot verimi ve kalitesinin ıslahı için birçok çalışma yapılmıştır. Ancak bu çalışmalar klasik ıslah yöntemleri ile çok uzun zaman aldığı açıkça görülmektedir. Yem bitkilerinin klasik ıslahı diğer bitki türlerine göre daha zordur. Yem bitkilerinin çoğu yabancı döllek oldukları için saf hatları geliştirmek ve safiyeti korumak güçtür. Yem bitkilerinde kendine kısırlık yaygın olduğundan dolayı kendileme ile tohum tutma oranı çok düşüktür. Çiçekleri küçük olduğundan dolayı melezleme yapmak çok zordur. Yem bitkilerinde tohum verimleri, tohumların çimlenme kabiliyetleri zayıftır. Çok yıllık yem bitkilerinde fide gelişmesi yavaş olduğundan iyi bir bitki örtüsü oluşturmak zordur. Polenlerin taşınma mesafesi

uzun olduğu için izolasyon mesafesi fazladır. Doğada çok sayıda yabani formlarının bulunması izolasyonu daha da zorlaştırmaktadır. İslah çalışmaları geniş aralıklarla ekilen bitkilerde yapılmaktadır. Oysa yem bitkileri daha sık yetiştirildiklerinden elde edilen özellikler uygulamada değişebilmektedir. Çok yıllık bitkilerde sonuç alınması için uzun zamana ihtiyaç vardır. İslah edilen çeşitlerin uygun özellikleri değişik kullanım şartlarında (biçime, otlatma ve karışım) kaybolabilmektedir. Yem bitkilerinde poliploidi yaygın olduğundan genetik olaylar oldukça karışıktır. Yem bitkilerinde ıslah ve değerlendirme metotları tahıllardaki kadar açık değildir. Bu nedenlerden dolayı yem bitkilerinin klasik ıslahı çok zordur (Serin ve Tan 2011).

Yem bitkileri ıslahında biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması başta zaman olmak üzere yem bitkilerinin klasik ıslahında karşılaşılan sorunların bir kısmını gidermede önemli rol oynayabilir. Biyoteknoloji; canlı organizmaları kullanarak yeni bir ürün elde etmek veya bir ürünü değiştirmek, bitki veya hayvan ıslah etmek ya da özel kullanım amaçlı mikroorganizmaları geliştirmek için kullanılan teknoloji demektir (Gözen vd 1995).

Biyoteknolojik yöntemlerden biri olan doku kültürü ise, aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kalus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir (Babaoğlu vd 2001).

Bitkiden izole edilerek doku kültürü ortamına konulan bitkisel materyale eksplant denilmektedir ve doku kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerden biridir. Buğdaygillerde doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan eksplant kaynağının olgunlaşmamış embriyo (Arzani and Mirodjagh 1999) olmasına rağmen, domuz ayrığında anterler (Christensen *et al.* 1997), yapraklar (Horn *et al.* 1988; Somleva *et al.* 1993; Tomaszewskiz *et al.* 1994; Kuklin and Conger 1995), tohumlar (Hyoshin *et al.* 2000; Eunkyung *et al.* 2002; Sanghoon *et al.* 2004) ve olgunlaşmamış salkımlar (Can vd 1994) gibi farklı eksplantlar da kullanılmıştır. Ancak, olgunlaşmamış

embriyoların eksplant kaynağı olarak kullanılması fazla zaman alması ve daha fazla finansman gerektirmesinden dolayı sistem içinde dezavantaj oluşturmaktadır. Bu yüzden olgun embriyoların doku kültürü çalışmalarında eksplant kaynağı olarak kullanılmasının bir avantaj olduğu görülmektedir. Olgun embriyoların kaynağı olan tohumlar depolanabildikleri için yılın her döneminde çalışma imkânı sağlamakta ve kolay temin edilebilmektir (Birsin ve Özgen 2004).

Conger and Carabia (1978), yaptıkları bir çalışmada kalus oluşumu için domuz ayrığının tohumlarını 2,15 mg/l kinetin ve 15 mg/l 2,4-D içeren SH ortamında kültüre almışlardır. Meydana gelen kaluslar 3 hafta aralıklarla iki kez 5 mg/l 2,4-D içeren SH ortamında alt kültüre almışlardır. Araştırmada organogenesisin 1 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda azaldığını belirtmişlerdir.

Şahin vd (2010), domuz ayrığı (*Dactylis glomerata* L.)'nin iki yabani ekotipine (Oltu, Ulubağ) ve iki çeşidine (ABD Islah, Amba) ait olgun embriyoların doku kültürüne tepkileri belirlenmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Araştırmada 2 oksin tipi (dikamba ve pikloram), bu oksin tiplerinin 3 farklı dozu (1,5 mg/l, 2,0 mg/l, 2,5 mg/l) ve kalus oluşumu aşamasında iki farklı dozda (20-30 g/l) sukroz kullanmışlardır. Uygulamaların kalus oluşum oranı üzerine etkisi önemsiz olduğunu fakat bitki rejenerasyonu üzerine çok önemli bir etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Bitki rejenerasyonu genotiplere, hormon tiplerine ve hormon dozlarına göre değişim göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre domuz ayrığında olgun embriyodan bitki rejenerasyonu için pikloramın 1,5 mg/l'lik dozunun uygun olduğunu bulmuşlardır.

Domuz ayrığını yanında aynı familyaya giren birçok bitkide olgun embriyolar başarıyla kullanılmıştır. Lee *et al.* (2012), yaptıkları bir çalışmada kalus oluşumu için yüksek çayır yumağının olgun embriyoları 3 mg/l 2,4-D, 0,1 mg/l BA ve 30 g/l sakkaroz içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Olgun embriyolardan oluşan kaluslar 1 mg/l 2,4-D 3 mg/l BA ve 30 g/l sakkaroz içeren N6 ortamına bitki rejenerasyonu için aktarmışlardır. Yine, Lowe *et al.* (1979), kalus oluşumu için yüksek çayır yumağının olgun

embriyolarını 9 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Daha sonra oluşan kaluslar 5 mg/l 2,4-D bulunan MS ortamında alt kültüre aktarmışlar ve kök ve sürgün oluşumunu test etmişlerdir.

Domuz ayrığında ve aynı familyaya giren diğer buğdaygil yem bitkilerinde genç salkımlarda doku kültürü çalışmalarında eksplant olarak kullanılmıştır. Dale and Dalton (1983), genç salkımlardan direk sürgün oluşumunu *Lolium*, *Festuca*, *Phleum* ve *Dactylis* türlerinde elde edildiğini bildirmişlerdir.

Can vd (1994), 10 farklı domuz ayrığı klonundan alınan genç salkım segmentlerini 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarını içeren LS ortamında kalus oluşumu ve bitki rejenerasyon potansiyellerini incelemek amacıyla kültüre almışlardır. Araştırmada Çukurova Üniversitesi kampüsü içindeki doğal meralardan toplanan ve sera koşullarında yetiştirilen 10 farklı domuz ayrığı klonuna ait 50 bitkiyi kullanmışlardır. Kalus oluşumu için 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarını (2,5 mg/l, 5 mg/l, 7,5 mg/l ve 10 mg/l) içeren LS ortamını kullanmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre kalus oluşum oranının klonlara göre değiştiğini belirlemişlerdir. Kalus oluşum oranının %82,8 ile %4,7 arasında değiştiğini saptamışlardır. Kalus oluşum oranı üzerine 2,4-D konsantrasyonlarının etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığını belirtmişlerdir. Yine 2,4-D konsantrasyonlarının kalus ağırlığı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını saptamışlardır. Ancak, 2,4-D konsantrasyonlarının sürgün oluşum oranı üzerinde önemli rol oynadıkları belirlenmiştir. 2,5 mg/l ve 7,5 mg/l 2,4-D konsantrasyonlarında 5 mg/l ve 10 mg/l konsantrasyonlarına göre daha yüksek sürgün oluşum oranını elde etmişlerdir.

Chaudhury and Qu (2000) yaptıkları bir çalışmada *Cynodon dactylon* ve *Cynodon dactylon* x *Cynodon transvaalensis* bitkilerinden aldıkları genç salkım segmentlerini eksplant olarak kullanmışlardır. *Cynodon dactylon* genç salkımlarını 2,4-D ile BAP, ABA, NAA ve Casein hydrolysate kombinasyonlarından (1 mg/l 2,4-D+0,01 mg/l BAP, 1 mg/l 2,4-D+0,5 mg/l ABA, 0,5 mg/l 2,4-D+1 mg/l NAA, 3 mg/l 2,4-D+200 mg/l CH) oluşan MS ortamlarında kültüre almışlardır. *Cynodon dactylon* x *Cynodon*

transvaalensis genç salkımlarını 2,4-D ile BAP, ABA, NAA ve Casein hydrolysate kombinasyonlarından (1 mg/l 2,4-D+0,01 mg/l BAP, 1 mg/l 2,4-D+500 mg/l CH3 mg/l 2,4-D+200 mg/l CH) oluşan MS ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda ise BAP'ın embriyogenik kalus oluşumunu arttırdığını bildirmişlerdir.

Liu *et. al* (2004), *Leymus chinensis* bitkisinin bitki rejenerasyonu üzerine etkilerini incelemek için yaptıkları çalışmada, 3-5 mm uzunluğundaki olgunlaşmamış salkım segmentlerini 2,26-22,6 µM 2,4-D içeren N6 ortamında kültüre almışlardır. Kaluslardan sürgün elde etmek için 4,65 µM kinetin ve 4,44 µM BA içeren N6 ortamına aktarmışlardır. Yüksek konsantrasyonlu (9,04 ve 22,6 µM) 2,4-D içeren ortamları bitki rejenerasyonu için uygun bulmuşlardır.

Neibaur *et al.* (2008), *Paspalum vaginatum* Swartz yaptıkları bir çalışmada rejenerasyon etkinliğine sahip kalus oluşumu için genç salkımlardan alınan 0,2 cm uzunluğundaki dokuları 3 mg/l dikambaya ilave olarak 0,1 mg/l veya 1 mg/l BAP ve 3 mg/l 2,4-D'ye ilave olarak 0,1 mg/l veya 1 mg/l BAP içeren MS ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda dikamba bulunan ortamlarda 2,4-D bulunan ortamlara göre bitki rejenerasyonunun 12 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Bitki doku kültüründe, bitki büyüme düzenleyicileri önemli rol oynamaktadırlar. Kültür ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinden oksinler, hücre bölünmesini ve gelişimini uyaran ve somatik embriyo oluşumunu en fazla etkileyen bileşiklerdir. Embriyogenesis oluşumu için en fazla kullanılan oksin tipinin 2,4-D olmakla birlikte NAA, pikloram ve dikamba da tek başlarına veya 2,4-D ile birlikte kullanılmaktadır. Diğer yandan oksinlerin embriyogenesis oluşumunu teşvik etmek amacıyla kullanılmalarına rağmen kültür ortamında sürekli oksin bulunması somatik embriyoların gelişimini engellemektedir. Sitokininlerin ise kültür ortamında bulunması genelde somatik embriyoların gelişimini durdurmaktadır. Fakat somatik embriyonun tam olarak olgunlaşması ve bitki gelişimi için içsel hormon seviyesine bağlı olarak çok düşük seviyelerde sitokinin gerekli olmaktadır (Aydın, 2010).

Kültür ortamındaki bitki büyüme düzenleyicilerinin tipinin yanında miktarı da morfogenez ve büyüme için önemli rol oynamaktadır. Genellikle kalus oluşumu ve hücre çoğalmasını artırmak için yüksek konsantrasyonda oksin, düşük konsantrasyonda sitokininin kültür ortamında bulunması gerekmektedir. (Ge *et al.* 2006; Aydın 2010).

Muhumuza and Okari (2013), yaptıkları bir çalışmada Sorgum türlerinde *in vitro* rejenerasyon sistemi geliştirmek için anterleri iki farklı ortamda (MS ve L3) kültüre almışlardır. En iyi *in vitro* 2,5 mg/l 2,4-D ve 0,5 mg/l kinetin içeren ortamlarda elde etmişlerdir. Yüksek oranda 2,4-D'nin kalus oluşumu ve bitki rejenerasyonunu azalttığını bildirmişlerdir.

Trigiano *et al.* (1987) domuz ayrığında *in vitro* gelişme embriyogenesise mefluidide ve dikambanın etkisini araştırmak üzere yaptıkları bir çalışmada yaprak dokularını 15-120 μ M dikamba ve 1-100 μ M mefluidide içeren SH ortamında kültüre almışlardır.

McDonnell and Conger (1984) çayır salkım otunun olgun embriyolardan kalus oluşumu ve gelişimi için 2,4-D ve dikamba ve pikloramin farklı konsantrasyonlarını içeren (5, 10, 20, 40, 60 ve 80 μ M) içeren SH ortamında kültüre almışlardır. Genellikle 2,4-D'nin artan konsantrasyonların yaprak gelişiminin azalttığını belirtmişlerdir. 2,4-D'siz 5, 10, 20 μ M dikamba bulunan ortamlarda kalus gelişiminin yüksek olduğunu ve 40 μ M dikambada kalus ağırlığının azaldığını belirlemişlerdir. Pikloramin bütün konsantrasyonlarında embriyolardan kalus oluşumu uyarılmış ve en yüksek kalus oluşumu 60 μ M pikloramin olan ortamda elde edildiğini saptamışlardır. 20 μ M dikamba ve 60 μ M pikloramin olan ortamda kalus oluşumunu teşvik eden en iyi ortam olduğunu bildirmişlerdir.

Plazek *et al.* (1999) Çayır kelp kuyruğu bitkisinin rejenerasyon yeteneğini geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada olgun embriyolar 5 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l dikamba içeren MS ortamında kültüre almışlardır.

Doku kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerden biri de temel besi ortamıdır. Çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen birçok besi ortamı formülasyonu olmasına rağmen MS, B5, LS, N6 ve SH yaygın olarak kullanılan besi ortamlarıdır. MS ortamı birçok bitki türünde başarı ile kullanılmaktadır. SH ise hem monokotiledon hem de dikotiledon bitkiler için uygun bir ortamdır.

Can vd (2008), yaptıkları bir çalışmada otlak ayrığı genç salkımlarını iki farklı oksinin (dikamba ve pikloram) farklı konsantrasyonlarını içeren (2, 4, 6, 8 mg/l) içeren iki farklı ortamda (LS ve SH) kalus oluşumu, kalus ağırlığı ve direk sürgün oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. En yüksek kalus oluşum oranı ve ağırlığını 4 mg/l dikamba içeren LS ortamında elde etmişlerdir. En yüksek sürgün oluşumu ise 2 mg/l pikloram içeren SH ortamında elde etmişlerdir.

Ahn *et al.* (1985) *Lolium multiflorum*, *Festuca rubra* ve *Dactylis glomerata* türlerinde somatik embriyogenesisten bitki rejenerasyonu sağlandığını bildirmişlerdir. Olgunlaşmamış çiçek yapıları kalus oluşumu için 1 mg/l 2,4-D bulunan MS ve N6 ortamlarında kültüre almışlardır. Kalus gelişiminin N6 ortamında MS ortamına göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

YongWoo *et al.* (2000) İtalyan çimi (*Lolium multiflorum*) bitkisinde yaptıkları bir çalışmada SH, MS ve N6 ortamları arasında MS ortamını kalus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için en etkili besi olduğunu bildirmişlerdir. Kalus oluşumu için 5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı kullanırken bitki rejenerasyonu için 1,0 mg/l BA ve 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamını kullanmışlardır.

Genetik yönden iyileştirilmiş yem bitkileri çeşitlerinin geliştirilmesinde trasgenik teknoloji klasik ıslah yöntemlerini tamamlayıcı ve/veya hızlandırıcı olarak hizmet etmektedir (Haliloğlu vd 2011).

Trasgenik bitkilerin elde edilmesinde ilk olarak etkili bir bitki rejenerasyonu ve gen aktarım sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir. Buğdaygil yem bitkilerinin

Agrobacterium ile gen aktarımında higromisin transferaz seçici geni kullanılmıştır (Wang and Ge, 2005a; Ge *et al.* 2006).

Agrobacterium aracılığıyla hem monokotiledon hem de dikotiledonlarda kullanılan düşük maliyetli ve etkili gen transfer sistemidir. *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi mikro bombardıman sistemine göre daha fazla avantajlara sahiptir. *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferinin İtalyan çimi, kamışsı yumak, bent çimi ve çok yıllık çimde yapıldığı bildirilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* birçok yem bitkisi türlerinde gen transferinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Transgenik domuz ayrığı bitkileri protoplast ile direk gen transferi (Horn *et al.* 1988) ve yaprak hücrelerinden elde edilen embriyonik kaluslara ya da olgun embriyolardan elde edilen kaluslara mikro bombardıman ile elde edilmiştir (Denchev *et al.* 1997) . Ancak *Agrobacterium* ile gen transferinin sisteminin optimizasyonu domuz ayrığında bildirilmemiştir.

Ge *et al.* (2006) yaptıkları bir çalışmada serada yetiştirdikleri zoysia çiminden aldıkları 2-3 cm uzunluğundaki boğumlardan 0,5 cm uzunluğunda segmentler almışlar ve direk olarak *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarılmıştır.

Transgenik yüksek çayır yumağı, dallı darı ve delice otu gibi buğdaygil yem bitkileri geliştirmek için olgun embriyolardan elde edilen kaluslar *Agrobacterium* aktarılmış ve higromisine dayanıklı kaluslar seçilmiş ve transgenik bitkiler dayanıklı kaluslardan elde edilmiştir (Wang and Ge 2005b). Bermuda çimi, bent çimi (*Agrostis stolonifera*) ve zoysia çiminin (*Zoysia japonica*) stolon boğumları gen aktarımında kullanılmıştır. Stolon boğumları *Agrobacterium* ile muamele edilmiş ve bulaşmış boğumlardan direkt transgenik bitkiler elde edilmiştir (Wang and Ge 2006).

Denchev *et al.* (1997) yaptıkları bir çalışmada genç sürgünlerden aldıkları 3-4 mm uzunluğundaki dokuları 30 µM dikamba içeren SH ortamında kültüre almışlardır mikro bombardıman ile gen aktarımı yapmışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Bu araştırmada domuz ayrığı bitkisinin Bamba çeşidine ait tohumlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar

3.1.2.a. Sterilizasyon için kullanılan kimyasallar

-Etil alkol (%70) ve sodyum hipoklorit (%1)

3.1.2.b. Kültür ortamları için kullanılan kimyasallar

Kalus ve bitki rejenerasyonu için MS (Murashige ve Skoog (1962)), SH (Schenk and Hildebrandt (1972)) ve N6 (Chu Basal Medium) temel besi ortamları kullanılmıştır. MS, SH ve N6 ortamlarında bulunan kimyasal bileşimleri ve miktarları izelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. MS, SH ve N6 kültür ortamları için kullanılan kimyasal bileşimleri ve miktarları

Kimyasal Bileşimi	Miktar (mg/l)		
	MS	SH	N6
İnorganikler			
Makro Elementler			
KNO ₃	1900	2500	2830
NH ₄ NO ₃	1650	-	-
NH ₄ .2SO ₄	-	-	463
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	300	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	400	185
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	200	166
KH ₂ PO ₄	170	-	400
Mikro Elementler			
MnSO ₄ .H ₂ O	-	10.0	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	-	4.4
KI	0.83	1.0	0.8
H ₃ BO ₃	6.2	5.0	1.6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	1.0	1.5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.2	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.1	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.1	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	15.0	27.85
Na ₂ EDTA	37.3	20.0	-
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	-	-	37.25
Organikler			
Nikotinik asit	0.5	5.0	0.5
Pridoksin-HCl	0.5	0.5	0.5
Thiamin-HCl	0.1	5.0	1.0
myo-inositol	100	1000	-

3.1.2.c. Besi ortamındaki MS, SH ve N6 tuzları ve vitaminlere ilave olarak kullanılan kimyasallar

MS, SH ve N6 ortamlarına ek olarak kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. MS, SH ve N6 ortamlarına ek olarak kullanılan kimyasallar

Komponentler	Miktar (g/l)
MES hidrat	1
Fitajel	2
Sakkaroz	20

3.2. Yöntem

Yapılan bu çalışmada, domuz ayrığına ait endosperm destekli olgun embriyolardan kalus oluşumu incelenmiştir. Bunun için, 3 farklı hormon (2,4-D, Dikamba ve Pikloram) ve 6 bunların konsantrasyonundan (2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mg/l) oluşan 18 farklı yöntemde 3 farklı temel besi ortamında (MS, SH ve N6) eksplantlar kültüre alınmıştır. Çalışma her bir tekerrürde 20 adet eksplant bulundurmak üzere 4 tekerrürlü gerçekleştirilmiştir. Eksplantlar $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık ortamda 1 ay süreyle kültüre alınmıştır. Meydana gelen kaluslar bitki rejenerasyonu için hormonsuz ortama aktarılmış ve $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta bekletilmiştir. Aydınlatmada kaynak olarak floresan lambası ve ışık yoğunluğunun olarak ise 1500 lüks kullanılmıştır. Çalışmanın yürütülmesi esnasındaki işlemler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.3. Oksin tipi ve dozlarına göre yöntemler

Yöntem	Oksin Tipi ve Dozu
1	2 mg/l 2,4-D
2	4 mg/l 2,4-D
3	6 mg/l 2,4-D
4	8 mg/l 2,4-D
5	10 mg/l 2,4-D
6	12 mg/l 2,4-D
7	2 mg/l Dikamba
8	4 mg/l Dikamba
9	6 mg/l Dikamba
10	8 mg/l Dikamba
11	10 mg/l Dikamba
12	12 mg/l Dikamba
13	2 mg/l Pikloram
14	4 mg/l Pikloram
15	6 mg/l Pikloram
16	8 mg/l Pikloram
17	10 mg/l Pikloram
18	12 mg/l Pikloram

3.2.1. Uygulanan sterilizasyon teknikleri

3.2.1.a. Uygulamanın yapıldığı çalışma ortamı ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu

Steril olarak çalışılabilmesi için kullanılacak olan yüzeyler (steril kabin içi), kullanımdan en az 20 dakika önce %70'lik etil alkolle silinmiş ve ardından UV lambası açılmıştır. UV lambası kültüre alma işlemi başlamadan önce kapatılmıştır. Çalışmada kullanılan aletler (bisturi, pens vb.), çalışma esnasındaki kullanımdan önce etil alkol içine batırılmış, ardından alev lambasına tutularak, alev muamelesiyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Eksplantların kesimi esnasında kullanılan 10x15 cm boyutlarındaki kurutma kâğıtları alüminyum folyoya sarılarak otoklav edilmiş, ardından bu sterilize edilmiş kurutma kâğıtları üzerinde kesimler yapılmıştır.

3.2.1.b. Çalışmada kullanılan tohumların yüzey sterilizasyonu

Yapılan bu çalışmada, tohumlar kavuzlarından ayrıldıktan sonra musluk suyunda yıkanmış ve devamında %70'lik etil alkolde 3 dakika iyice çalkalandıktan sonra 3 defa steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra 1 damla Tween 20 ilave edilmiş olan %1'lik sodyum hipokloritte (%20'lik çamaşır suyunda) 15 dakika çalkalandıktan sonra 3 defa steril saf sudan geçirilmiştir. Bu işlemlerden sonra bekletmeden endosperm destekli olgun embriyolar kültüre alınmıştır.

3.2.1.c. Kullanılan besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan besi ortamları, uygun bir sterilizasyon için otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'ye tabi tutulmuştur. Ancak sıcakla muamele edildiğinde bozulan vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu için 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreleri kullanılmıştır.

3.2.1.d. Sterilizasyonunda kullanılan solüsyonların hazırlanışı

a. %70'lik Etil alkolün hazırlanışı: %96'lık etil alkolden 700 ml alınmış ve hacim 960 ml'ye tamamlanmıştır.

b. %1'lik Sodyum hipoklorit solüsyonunun hazırlanışı: %5 sodyum hipoklorit NaOCl içeren ticari ACE® marka çamaşır suyundan 200 ml alınmış ardından hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.2. Çalışmada kullanılan temel besi ortamları ve hormonlar için stok solüsyonunun hazırlanışı

3 farklı besi ortamı için ayrı ayrı makro (20X) ve mikro (200X) elementler ile demir şelat (200X) ve vitaminler (200X) için stok solüsyon hazırlanmıştır. Yine çalışmada kullanılan hormonlar içinde ayrıca stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Bu kimyasalların stok solüsyonlarının hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

3.2.2.a. Makro elementlerin stok solüsyonunun hazırlanışı

Besi ortamında bulunması gereken makro elementlerin (Çizelge 3.1) stok solüsyonlarının hazırlanmasında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

1) Besi ortamının 1 litresinde bulunması gerekli makro elementlerin miktarlarının 20'şer katı hassas bir terazi ile tartılmıştır.

2) Tartılan makro elementler, içerisinde 200 ml bidistile su bulunan ve bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 2 litrelik bir erlenmayer kabına sırasıyla ilave edilmiştir.

3) İlave edilen makro elementler su içerisinde iyice çözüldükten sonra, karışımın hacmi

1 litreye tamamlanmıştır.

4) Çözelti amber şişeye aktarıldıktan sonra, şişe üzerine hazırlanma tarihi ve hangi besi ortamına ait makro element çözeltisi olduğu ve konsantrasyonu (20X) belirtilen etiket yapıştırıldıktan sonra, muhafaza edilmek üzere buzdolabına (4°C) yerleştirilmiştir.

3.2.2.b. Mikro elementlerin stok solüsyonunun hazırlanışı

1) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ hariç besi ortamının 1 litresinde bulunması gerekli mikro elementlerin miktarlarının 200'er katı hassas bir terazi ile tartılmıştır.

2) Tartılan mikro elementler, içerisinde 200 ml bidistile su bulunan ve bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 2 litrelik bir erlenmayer kabına sırasıyla ilave edilmiştir.

3) İlave edilen mikro elementler su içerisinde iyice çözüldükten sonra, karışımın hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.

4) Çözelti amber şişeye aktarıldıktan sonra, şişe üzerine hazırlanma tarihi ve hangi besi ortamına ait mikro element çözeltisi olduğu ve konsantrasyonu (200X) belirtilen etiket yapıştırıldıktan sonra, muhafaza edilmek üzere buzdolabına (4°C) yerleştirilmiştir.

3.2.2.c. Demir şelatın hazırlanışı

Bu şelatın hazırlanmasında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

1) Besi ortamının bir litresinde bulunması gerekli olan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ miktarlarının 200 katı olan hassas terazide tartılmıştır.

2) Tartılan $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, içerisinde 350 ml bidistile su bulunan ve bir manyetik karıştırıcı

üzerine yerleştirilmiş olan 1 litrelik erlenmayer kabına ilave edilmiş ısıtılarak çözdürülmüştür. Yine ayrı bir kapta 350 ml bidistile su içerisinde tartılan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ısıtılarak çözdürülmüştür.

3) Bu iki ayrı çözelti birleştirilerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Bu birleştirme işleminden sonra bu çözeltinin rengi açık sarı renkte olmuştur. Hazırlanmış olan bu şelat, amber renkli şişeye aktarılmış ve direkt ışık almayacak şekilde buzdolabında (4°C) saklanmıştır.

3.2.2.d. Vitamin stok solüsyonunun hazırlanışı

Besi ortamlarında bulunması gerekli olan vitaminlerinin stok solüsyonun hazırlanmasında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir:

- 1) Besi ortamının bir litresinde bulunması gerekli olan vitamin miktarlarının 200 katı 100 ml'lik stok solüsyon için hesaplanmış ve buna göre hassas terazide tartılmıştır.
- 2) Tartılan vitaminler içinde 30 ml bidistile su bulunan ve bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 250 ml'lik erlenmayer kabına sırasıyla ilave edilmiştir.
- 3) İlave edilen vitaminler su içerisinde iyice çözdürüldükten sonra, karışımın hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 4) Hazırlanmış vitamin çözeltisi üzerine hazırlanma tarihi ve konsantrasyonu yazıldıktan sonra, amber renkli cam şişe içerisinde buzdolabında (4°C) saklanmıştır.

3.2.2.e. Araştırmada kullanılan oksinlerin hazırlanışı

Kalus oluşum ortamında kullanılan oksinlerin stok solüsyonları hazırlanmıştır. Oksinlerin stok solüsyonları hazırlanırken kullanılan çözücü ve seyreltici kimyasallar ile

saklama sıcaklıkları ve çalışma konsantrasyonları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. Oksinlerin stok solüsyonlarının hazırlanışı

Oksin Tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama koşulu	Çalışma konsantrasyonu
2,4-D	Etil alkol	Su	+4°C	1 mg/ml
Dikamba	Su / etil alkol	Su	+4°C	1 mg/ml
Pikloram	DMSO	Su	+4°C	1 mg/ml

3.2.3. Kalus oluşum ortamının hazırlanışı

Çalışmada kullanılan kalus oluşum ortamının hazırlanması sırasında aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1) 600 ml ultra saf su olan behere makro element stok solüsyonunda (20X) 50 ml, mikro element stok solüsyonundan (200X) 5 ml ve demir şelat stok solüsyonundan 5 ml alınıp ilave edilmiştir.

2) Daha sonra 20 g sakkaroz, 1 g MES Hidrat (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate, 4-Morpholineethanesulfonic acid) tartılıp eklenmiş ve çözünene kadar karıştırılmıştır.

3) Çözelti dereceli silindire aktarılıp hacim ultra saf su ile 980 ml'ye tamamlanmıştır.

4) Hacmi 980 ml'ye tamamlanan çözelti tekrar behere aktarılmış ve bir süre karıştırılmıştır. Daha sonra 1 N NaOH solüsyonu kullanılarak pH: 5,8'e ayarlanmıştır.

5) 2 g Phytigel içeren şişeye aktarılan çözelti otoklavda 20 dakika süreyle 105 kPa basınçta 121°C sıcaklıkta bekletilerek sterilize edilmiştir.

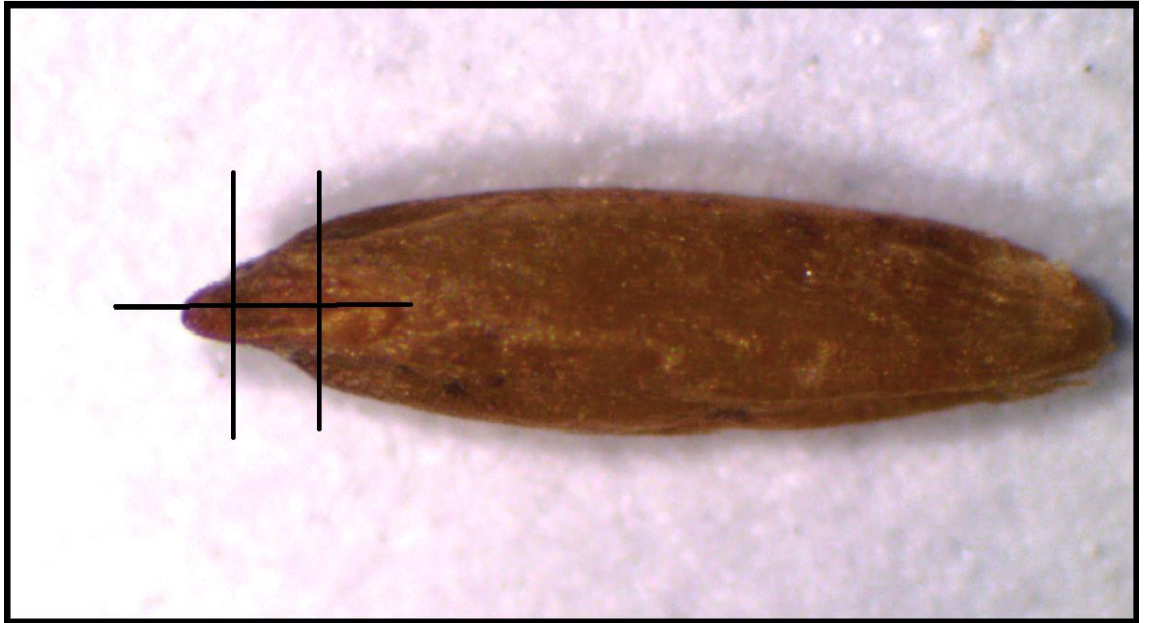
6) Yüksek sıcaklıkta bozulan maddeler otoklav aşaması bittikten sonra ilave edilmiştir. Bunun için 50 ml beher içerisine vitamin stok solüsyonundan (200X) 5 ml ve hormon ilave edilmiş ve karıştırıldıktan sonra 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtrelerden geçirildikten sonra sıvı besi ortama eklenmiştir.

3.2.4. Bitki rejenerasyon ortamının hazırlanışı

Kalus oluşum ortamından farklı olarak hormonlar bu aşamada kullanılmamıştır.

3.2.5. Eksplantın hazırlanışı

Çalışmada kullanılan embriyolar steril edildikten sonra tohum üzerinden ayrılmadan 4 parçaya bölünmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tohumun embriyosunun kesim bölgeleri

3.2.6. Araştırmada incelenen karakterler

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

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

2. Embriyogenik kalus oluşum oranı (%): Embriyogenik kalus, sert dokulu, dağılılabılır özellikte, sıkı (pütürlü) yapılı ve embriyo oluşturma kapasitesine sahip kaluslardır. Eksplant ve kalus sayısına göre hesaplanmıştır.

3. Cevap veren embriyogenik kalus oranı (%): Eksplant sayısına, eksplantlardan meydana gelen kalus sayısına ve meydana gelen embriyogenik kalus sayısına göre hesaplanmıştır.

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

$$\text{RE} = \text{Rejenere bitki sayısı} / \text{Cevap veren embriyogenik kalus sayısı}^*$$

*: Kök ve sürgüne sahip bitkicik meydana getiren embriyogenik kalus sayısı

3.2.7. Verilerin istatistiksel analizi

Araştırmada, endosperm destekli olgun embriyo kültüründe kalus oluşumu, embriyogenik kalus oluşumu, cevap veren embriyogenik kalus oluşumu ve rejenerasyon etkinliği üzerine, 3 farklı temel besi ortamının (MS, SH ve N6), 3 oksin tipinin (2,4-D, Dikamba ve Pikloram) ve 6 farklı konsantrasyonlarından (2, 4, 6, 8, 10, 12 mg/l) oluşan 18 farklı yöntemin etkileri araştırılmıştır. Araştırmada incelenen parametrelere ilişkin 3x18 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. İncelenen karakterlerde besi ortamı, hormon tipi ve konsantrasyonlarına ait ortalamalar arasındaki farklar, %5 önem seviyesinde LSD çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kalus Oluşum Oranı (%)

Kalus oluşumu üzerine oksin tipi ve dozlarından oluşan yöntemlerin ve temel besi ortamlarının etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$) (Çizelge 4.1). En yüksek kalus oluşum oranı %44,2 ile N6 ortamında gerçekleşmiş olup bunu %42,1 ile MS ve %39,2 ile SH temel besi ortamları izlemiş ve besi ortamları arasındaki fark önemli bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Temel besi ortamlarına ve yöntemlere göre kalus oluşum oranı (%)

Yöntem	Oksin Tipi ve Dozu	Temel Besi Ortamı			Ortalama
		MS	SH	N6	
1	2 mg/l 2,4-D	32,5±1,4 ^{de}	33,8±1,3 ^{hi}	40,0±2 ^{ef}	35,4±1,3 ^h
2	4 mg/l 2,4-D	41,3±1,3 ^{bc}	41,3±1,3 ^{def}	40,0±2 ^{ef}	40,8±0,8 ^f
3	6 mg/l 2,4-D	41,3±3,1 ^{bc}	45,0±0 ^{bcd}	46,3±2,4 ^{bcd}	44,2±1,4 ^e
4	8 mg/l 2,4-D	55,0±2 ^a	48,8±1,3 ^b	50,0±0 ^{bc}	51,3±1,1 ^b
5	10 mg/l 2,4-D	37,5±3,2 ^{cd}	40,0±0 ^{etg}	38,8±3,8 ^f	38,8±1,5 ^{lg}
6	12 mg/l 2,4-D	32,5±3,2 ^{de}	32,5±1,4 ^{hi}	38,8±3,8 ^f	34,6±1,8 ^h
7	2 mg/l Dikamba	46,3±2,4 ^b	32,5±1,4 ^{hi}	40,0±2 ^{ef}	39,6±2 ^f
8	4 mg/l Dikamba	53,8±2,4 ^a	38,8±1,3 ^{ig}	42,5±1,4 ^{def}	45,0±2,1 ^{de}
9	6 mg/l Dikamba	53,8±2,4 ^a	40,0±2 ^{etg}	46,3±2,4 ^{bcd}	46,7±2,1 ^{cde}
10	8 mg/l Dikamba	55,0±2 ^a	43,8±1,3 ^{cde}	47,5±1,4 ^{bcd}	48,8±1,6 ^{bc}
11	10 mg/l Dikamba	56,3±2,4 ^a	45,0±2 ^{bcd}	51,3±1,3 ^b	50,8±1,7 ^b
12	12 mg/l Dikamba	60,0±2 ^a	61,3±2,4 ^a	62,5±1,4 ^a	61,3±1,1 ^a
13	2 mg/l Pikloram	22,5±1,4 ^f	22,5±1,4 ^f	30,0±0 ^g	25,0±1,2 ^j
14	4 mg/l Pikloram	27,5±1,4 ^{ef}	32,5±1,4 ^{hi}	31,3±1,3 ^g	30,4±1 ⁱ
15	6 mg/l Pikloram	31,3±1,3 ^{de}	31,3±2,4 ⁱ	45,0±2 ^{cde}	35,8±2,2 ^{gh}
16	8 mg/l Pikloram	30,0±0 ^e	32,5±1,4 ^{hi}	46,3±1,3 ^{bcd}	36,3±2,2 ^{gh}
17	10 mg/l Pikloram	37,5±3,2 ^{cd}	36,3±2,4 ^{gh}	48,8±1,3 ^{bc}	40,8±2,1 ^f
18	12 mg/l Pikloram	43,8±2,4 ^{bc}	47,5±3,2 ^{bc}	51,3±1,3 ^b	47,5±1,6 ^{cd}
Ortalama		42,1±1,4^B	39,2±1,1^C	44,2±1^A	41,8±0,7
F değeri (Yöntem)		25,8**	25,4**	15,0**	55,4**
F değeri (Temel Besi ortamı)		-	-	-	29,1**
F değeri (YxT)		-	-	-	5,6**
LSD (0,05) (Y)		6,4	4,9	5,6	3,2
LSD (0,05) (T)		-	-	-	1,3
LSD (0,05) (Y*T)		-	-	-	2,8
Varyasyon Katsayısı %		10,7	8,9	8,9	9,6

** ile işaretli F değerleri 0,01 ihtimal düzeyinde önemlidir.

¹: Aynı sütunda farklı küçük harfle ve aynı satırda farklı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar 0,05 ihtimal düzeyinde önemlidir.

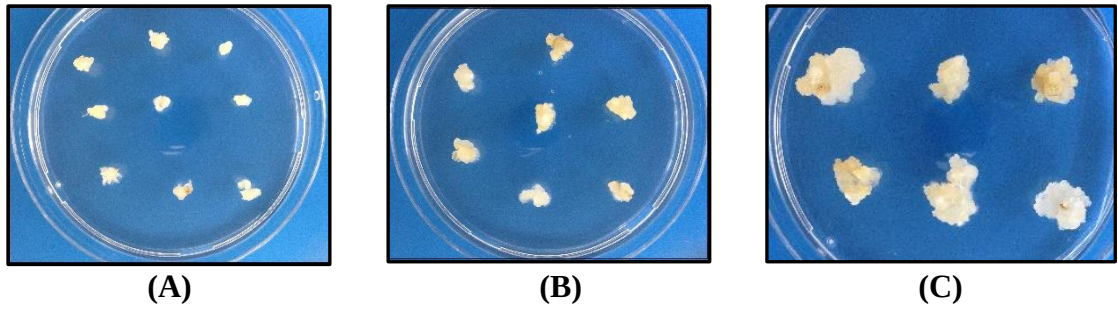
Yöntemlerin kalus oluşumu temel besi ortamına göre farklılık gösterdiğinden yöntem x temel besi ortamı interaksyonu çok önemli olmuştur.

MS ortamında, yöntemlerin kalus oluşumu üzerine olan etkileri çok önemli olmuştur ($P<0,01$) (Çizelge 4.1). Bu ortamda yöntemlere göre kalus oluşum oranı %60,0 - %22,5 arasında değişmiş ve ortalama %42,1 olarak belirlenmiştir. MS ortamında en yüksek kalus oluşumu %60,0 ile 12 mg/l dikamba içeren ortamda meydana gelirken en düşük kalus oluşumu %22,5 ile 2 mg/l pikloramda meydana gelmiştir. Bu temel besi ortamında oksin tiplerinin dozları kendi içlerinde karşılaştırıldığında 2,4-D hariç, dikamba ve pikloramda doz artışına paralel olarak kalus oluşum oranı da artmıştır. Hem dikamba hem de pikloramda en yüksek kalus oluşumu 12 mg/l'de meydana gelirken (Şekil 4.1A), 2,4-D'de ise 8 mg/l'de meydana gelişmiştir (Çizelge 4.1) ve bu konsantrasyondan sonra kalus oluşumu azalış göstermiştir.

SH ortamında yöntemlerin kalus oluşumu üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$) (Çizelge 4.1). Kalus oluşum oranı yöntemlere göre %61,3 - %22,5 arasında değişmiş ve ortalama %39,2 olarak belirlenmiştir. SH ortamında en iyi kalus oluşumu %61,3 ile 12 mg/l dikamba içeren ortamda meydana gelirken en düşük kalus oluşumu %22,5 ile 2 mg/l pikloramda meydana gelmiştir. Oksin tiplerinin dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında 2,4-D hariç, dikamba ve pikloramda doz artışına bağlı olarak kalus oluşum oranı da artmıştır. Hem dikamba hem de pikloramda en yüksek kalus oluşumu 12 mg/l'de meydana gelmiştir. MS ortamında olduğu gibi SH ortamında da en yüksek kalus oluşum oranı 8 mg/l 2,4-D'de görülmüştür (Şekil 4.1B) (Çizelge 4.1).

N6 ortamında yöntemlerin kalus oluşumu üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$) (Çizelge 4.1). Yöntemlere göre kalus oluşum oranı %62,5 - %30,0 arasında değişmiş ve ortalama %44,2 olmuştur. Bu ortamda en iyi kalus oluşumu %62,5 ile 12 mg/l dikamba içeren ortamda, en az kalus oluşumu %30,0 ile 2 mg/l pikloramda meydana gelmiştir. Oksin tipleri kendi aralarında karşılaştırıldığında MS ve SH ortamlarında elde edilen bulgulara benzer sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Temel besi ortamlarının ortalamasına göre ksin tipi ve dozlarından oluşan yöntemler karşılaştırıldığında en yüksek kalus oluşumu %61,3 ile 12 mg/l dikamba içeren ortamda meydana gelirken (Şekil 4.1C), en düşük kalus oluşumu %25,0 ile 2 mg/l pikloram içeren ortamda meydana gelmiştir. Temel besi ortamlarında elde edilen bulgulara benzer sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Kalus oluşum ortamında meydana gelen kaluslar.

A) 4. günde MS temel besi ortamında 12. yöntemde kalus oluşumu. **B)** 14. Günde SH ortamında 4. yöntemde kalus oluşumu. **C)** 30. günde N6 temel besi ortamında 11. yöntemde kalus oluşumu

4.2 . Embriyogenik Kalus Oluşum Oranı (%)

Sert dokulu, dağılabilir özellikte, sıkı yapılı ve krem renkli kaluslar embriyogenik kalus (Şekil 4.2A, B), beyaz ve sulu yapılı kaluslar ise embriyogenik olmayan kalus olarak değerlendirilmiştir.

Embriyogenik kalus oluşumu üzerine oksin tipi ve dozlarından oluşan yöntemlerin ve temel besi ortamlarının etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$) (Çizelge 4.2). En yüksek embriyogenik kalus oluşum oranı %23,7 ile MS ortamında elde edilmiş bunu %23,5 ile SH ve %21,3 ile N6 ortamı izlemiş ve MS ile SH arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmamıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Temel besi ortamlarına ve yöntemlere göre Embriyogenik kalus oluşum oranı (%).

Yöntem	Oksin Tipi ve Dozu	Temel Besi Ortamı			Ortalama
		MS	SH	N6	
1	2 mg/l 2,4-D	15,0±2 ^f	20,0±2 ^{d-g}	20,0±2 ^{e-h}	18,3±1,3 ^{ijk}
2	4 mg/l 2,4-D	21,3±1,3 ^{de}	26,3±1,3 ^{bcd}	22,5±1,4 ^{d-g}	23,3±0,9 ^{efg}
3	6 mg/l 2,4-D	25,0±2 ^{cd}	28,8±3,1 ^{bc}	23,8±1,3 ^{def}	25,8±1,4 ^{de}
4	8 mg/l 2,4-D	35,0±0 ^a	31,3±3,1 ^b	25,0±2 ^{cde}	30,4±1,7 ^{bc}
5	10 mg/l 2,4-D	21,3±1,3 ^{de}	21,3±2,4 ^{def}	18,8±2,4 ^{f-i}	20,4±1,1 ^{g-j}
6	12 mg/l 2,4-D	22,5±1,4 ^{de}	20,0±2 ^{d-g}	16,3±1,3 ^{hi}	19,6±1,1 ^{hij}
7	2 mg/l Dikamba	28,8±3,1 ^{bc}	18,8±2,4 ^{efg}	15,0±2 ^{hi}	20,8±2,2 ^{gh}
8	4 mg/l Dikamba	28,8±1,3 ^{bc}	20,0±2 ^{d-g}	26,3±2,4 ^{cd}	25,0±1,5 ^{def}
9	6 mg/l Dikamba	30,0±2 ^{abc}	23,8±2,4 ^{cde}	27,5±1,4 ^{cd}	27,1±1,3 ^{cd}
10	8 mg/l Dikamba	31,3±1,3 ^{ab}	23,8±1,3 ^{cde}	30,0±2 ^{bc}	28,3±1,3 ^{cd}
11	10 mg/l Dikamba	31,3±1,3 ^{ab}	31,3±2,4 ^b	37,5±3,2 ^a	33,3±1,5 ^b
12	12 mg/l Dikamba	35,0±0 ^a	45,0±4,6 ^a	35,0±2 ^{ab}	38,3±2,1 ^a
13	2 mg/l Pikloram	12,5±1,4 ^f	13,8±2,4 ^g	8,8±1,3 ^j	11,7±1,1 ^m
14	4 mg/l Pikloram	13,8±1,3 ^f	15,0±2 ^{fg}	13,8±2,4 ^{ij}	14,2±1 ^{lm}
15	6 mg/l Pikloram	15,0±2,9 ^f	15,0±2 ^{fg}	15,0±2 ^{hi}	15,0±1,2 ^{klm}
16	8 mg/l Pikloram	17,5±2,5 ^{ef}	18,8±2,4 ^{efg}	15±2,9 ^{hi}	17,1±1,4 ^{kl}
17	10 mg/l Pikloram	25,0±2 ^{cd}	20,0±2 ^{d-g}	16,3±2,4 ^{hi}	20,4±1,6 ^{g-j}
18	12 mg/l Pikloram	17,5±2,5 ^{ef}	31,3±1,3 ^b	17,5±1,4 ^{ghi}	22,1±2,2 ^{fgh}
Ortalama		23,7±0,9^A	23,5±1^A	21,3±1^B	22,8±0,6
F değeri (Yöntem)		16,2**	10,3**	13,9**	31,8**
F değeri (Temel Besi ortamı)		-	-	-	7,0**
F değeri (YxT)		-	-	-	3,5**
LSD (0,05) (Y)		5,2	6,8	5,9	3,4
LSD (0,05) (T)		-	-	-	1,4
LSD (0,05) (Y*T)		-	-	-	3,0
Varyasyon Katsayısı %		15,5	20,5	19,5	18,6

** ile işaretli F değerleri 0,01 ihtimal düzeyinde önemlidir.

¹: Aynı sütunda farklı küçük harfle ve aynı satırda farklı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar 0,05 ihtimal düzeyinde önemlidir.

Yöntemlerin embriyogenik kalus oluşumu üzerine olan etkileri temel besi ortamına göre farklılık gösterdiğinden yöntem x temel besi ortamı interaksiyonunun çok önemli olmasına neden olmuştur (Çizelge 4.2).

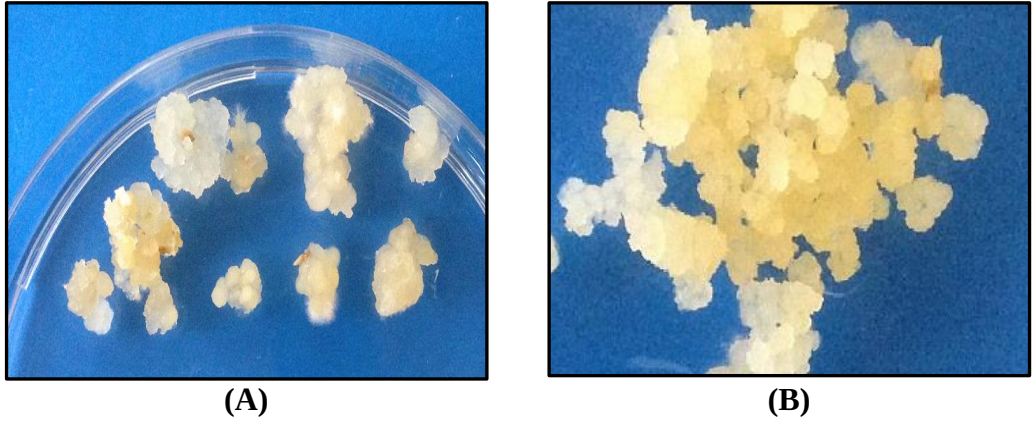
MS ortamında yöntemlerin embriyogenik kalus oluşumu üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$) (Çizelge 4.2). Bu temel besi ortamında yöntemlere göre

embriyogenik kalus oluşum oranı %35,0-%12,5 arasında değişmiş ve ortalama %23,7 olmuştur. MS ortamında en yüksek embriyogenik kalus oluşumu %35,0 ile 12 mg/l dikamba ve 8 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda meydana gelirken en düşük kalus oluşumu %12,5 ile 2 mg/l pikloramda meydana gelmiştir. (izelge 4.2).

SH ortamında yöntemlerin embriyogenik kalus oluşumu üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$) (izelge 4.2). Yöntemlere göre embriyogenik kalus oluşum oranı %45,0-%13,8 arasında değişmiş ve ortalama %23,5 olmuştur. SH ortamında en yüksek embriyogenik kalus oluşumu %45,0 ile 12 mg/l dikamba içeren ortamda, en az embriyogenik kalus oluşumu %13,8 ile 2 mg/l pikloramda meydana gelmiştir. Oksin tiplerinin dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında 2,4-D hariç, dikamba ve pikloramda doz artışına bağlı olarak embriyogenik kalus oluşum oranı da artmıştır. Hem dikamba hem de pikloramda en yüksek embriyogenik kalus oluşumu 12 mg/l'de meydana gelmiştir. 2,4-D'de ise 8m/l'de belirlenmiştir (izelge 4.2).

N6 ortamında yöntemlerin embriyogenik kalus oluşumu üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$). Yöntemlere göre embriyogenik kalus oluşum oranı %37,5-%8,8 arasında değişmiş ve ortalama %21,3 olarak belirlenmiştir. N6 ortamında en yüksek embriyogenik kalus oluşumu %37,5 ile 10 mg/l dikamba içeren ortamda meydana gelirken en düşük embriyogenik kalus oluşumu %8,8 ile 2 mg/l pikloramda meydana gelmiştir (izelge 4.2).

Temel besi ortamlarının ortalamasına göre oksin tipi ve dozlarından oluşan yöntemler karşılaştırıldığında en yüksek embriyogenik kalus oluşumu %38,3 ile 12 mg/l dikamba içeren ortamda meydana gelirken, en düşük kalus oluşumu %11,7 ile 2 mg/l pikloram içeren ortamda meydana gelmiştir. Oksin tiplerinin dozları kendi içlerinde değerlendirildiğinde 2,4-D hariç dikamba ve pikloramdaki doz artışına paralel olarak kalus oluşum oranı da artmıştır. 2,4-D ise 8 mg/l dozuna kadar artış gösterirken bu dozdan sonra azalış gözlenmiştir (izelge 4.2).



Şekil 4.2. Rejenerasyon ortamına aktarıldıktan sonra meydana gelen embriyogenik kaluslar.

A) SH temel besi ortamında 12. yöntemde embriyogenik kalus oluşumu. **B)** MS temel besi ortamında 4. yöntemde embriyogenik kalus üzerindeki somatik embriyolar

4.3. Cevap Veren Embriyogenik Kalus Oluşum Oranı (%)

Kök ve sürgüne sahip bitkicik meydana getiren embriyonik kaluslar cevap veren embriyogenik kalus olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3A,B).

Cevap veren embriyogenik kalus oluşumu üzerine oksin tipi ve dozlarından oluşan yöntemlerin ve temel besi ortamlarının etkisi çok önemli olmuştur ($P < 0,01$) (Çizelge 4.3). En yüksek kalus oluşum oranı %7,9 ile MS ortamında bunu %5,7 ile SH ve %3,8 ile N6 ortamı izlemiş ve aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli olmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Temel besi ortamlarına ve yöntemlere göre cevap veren embriyogenik kalus oluşum oranı (%).

Yöntem	Oksin Tipi ve Dozu	Temel Besi Ortamı			Ortalama
		MS	SH	N6	
1	2 mg/l 2,4-D	5,0±0 ^c	5,0±0 ^d	0,0±0 ^d	3,3±0,7 ^f
2	4 mg/l 2,4-D	10,0±0 ^b	5,0±0 ^d	0,0±0 ^d	5,0±1,2 ^e
3	6 mg/l 2,4-D	13,8±1,3 ^a	5,0±0 ^d	0,0±0 ^d	6,3±1,8 ^{bcd}
4	8 mg/l 2,4-D	15,0±0 ^a	7,5±1,4 ^{bc}	5,0±0 ^c	9,2±1,4 ^a
5	10 mg/l 2,4-D	10,0±0 ^b	5,0±0 ^d	5,0±0 ^c	6,7±0,7 ^{bc}
6	12 mg/l 2,4-D	10,0±0 ^b	5,0±0 ^d	5,0±0 ^c	6,7±0,7 ^{bc}
7	2 mg/l Dikamba	5,0±0 ^c	5,0±0 ^d	0,0±0 ^d	3,3±0,7 ^f
8	4 mg/l Dikamba	5,0±0 ^c	5,0±0 ^d	5,0±0 ^c	5,0±0 ^e
9	6 mg/l Dikamba	7,5±1,4 ^{bc}	5,0±0 ^d	5,0±0 ^c	5,8±0,6 ^{cde}
10	8 mg/l Dikamba	7,5±1,4 ^{bc}	6,3±1,3 ^{cd}	5,0±0 ^c	6,3±0,7 ^{bcd}
11	10 mg/l Dikamba	7,5±1,4 ^{bc}	7,5±1,4 ^{bc}	5,0±0 ^c	6,7±0,7 ^{bc}
12	12 mg/l Dikamba	10,0±0 ^b	10,0±0 ^a	10,0±0 ^a	10,0±0 ^a
13	2 mg/l Pikloram	5,0±0 ^c	0,0±0 ^e	5,0±0 ^c	3,3±0,7 ^f
14	4 mg/l Pikloram	5,0±0 ^c	0,0±0 ^e	5,0±0 ^c	3,3±0,7 ^f
15	6 mg/l Pikloram	6,3±1,3 ^c	5,0±0 ^d	5,0±0 ^c	5,4±0,4 ^{de}
16	8 mg/l Pikloram	6,3±1,3 ^c	7,5±1,4 ^{bc}	7,5±1,4 ^b	7,1±0,7 ^b
17	10 mg/l Pikloram	6,3±1,3 ^c	10,0±0 ^a	0,0±0 ^d	5,4±1,3 ^{de}
18	12 mg/l Pikloram	7,5±1,4 ^{bc}	8,8±2,4 ^{ab}	0,0±0 ^d	5,4±1,4 ^{de}
Ortalama		7,9±0,4^A	5,7±0,4^B	3,8±0,4^C	5,8±0,2
F değeri (Yöntem)		11,1**	9,8**	77,8**	18,7**
F değeri (Temel Besi ortamı)		-	-	-	139,9**
F değeri (YxT)		-	-	-	13,4**
LSD (0,05) (Y)		2,6	2,5	1,0	1,2
LSD (0,05) (T)		-	-	-	0,5
LSD (0,05) (Y*T)		-	-	-	1,0
Varyasyon Katsayısı %		22,7	30,5	18,1	25,8

** ile işaretli F değerleri 0,01 ihtimal düzeyinde önemlidir.

¹: Aynı sütunda farklı küçük harfle ve aynı satırda farklı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar 0,05 ihtimal düzeyinde önemlidir.

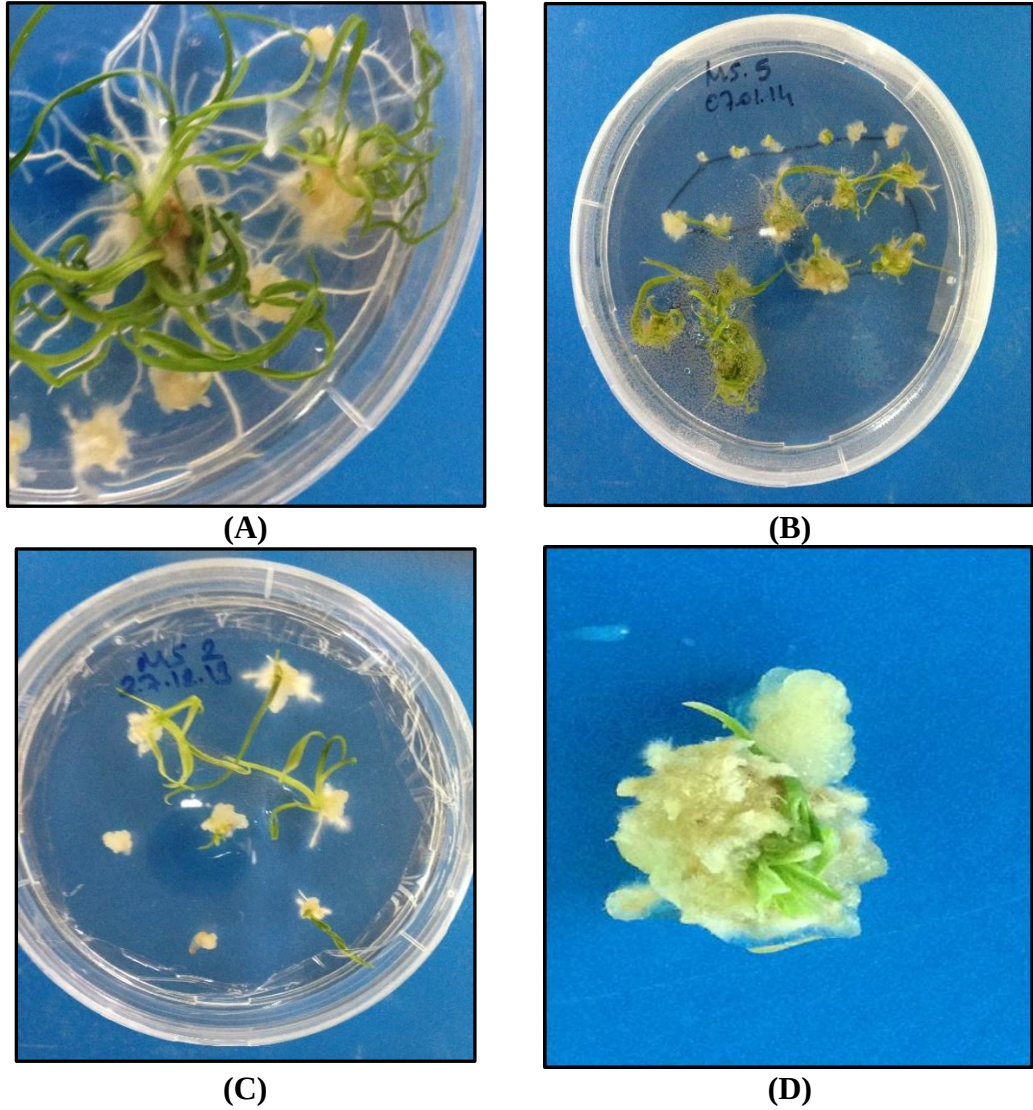
Oksin tipi ve dozlarından oluşan yöntemlerdeki cevap veren embriyogenik kalus oluşumu temel besi ortamına göre farklılık gösterdiğinden yöntem x temel besi ortamı interaksyonu çok önemli olmuştur.

MS ortamında yöntemlerin cevap embriyogenik kalus oluşumu üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$) (Çizelge 4.3). Yöntemlerin cevap veren embriyogenik kalus oluşum oranı %15,0 - %5,0 arasında değişmiş ve ortalama %7,9 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3B,C). MS ortamında en yüksek cevap veren embriyogenik kalus oluşumu %15,0 ile 8 mg/l 2,4-D içeren ortamda en az cevap veren embriyogenik kalus oluşumu %5,0 ile 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l dikamba, 4 mg/l dikamba, 2 mg/l pikloram ve 4 mg/l pikloram içeren ortamlarda meydana gelmiştir (Çizelge 4.3).

SH ortamında yöntemlerin cevap veren embriyogenik kalus oluşumu üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$) (Şekil 4.3D). Yöntemlere göre cevap veren embriyogenik kalus oluşum oranı %10,0-%0,0 arasında değişmiş ve ortalama %5,7 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3A). SH ortamında en yüksek cevap veren embriyogenik kalus oranı %10,0 ile 12 mg/l dikamba ve 10 mg/l pikloram içeren ortamlarda meydana gelirken 2 mg/l ve 4 mg/l pikloramda cevap veren embriyogenik kalus oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 4.3).

N6 ortamında yöntemlerin cevap veren embriyogenik kalus oluşumu üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$). Yöntemlere göre cevap veren embriyogenik kalus oluşum oranı %10,0-%0,0 arasında değişmiş ve ortalama %3,8 olmuştur. N6 ortamında en yüksek cevap veren embriyogenik kalus oranı %10,0 ile 12 mg/l dikamba içeren ortamda meydana gelirken, 2 mg/l 2,4-D, 4 mg/l 2,4-D, 6 mg/l 2,4-D, 2 mg/l dikamba, 10 mg/l pikloramda ve 12 mg/l pikloramda cevap veren embriyogenik kalus oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 4.3).

Temel besi ortamlarının ortalamasına göre oksin tipi ve dozlarından oluşan yöntemler karşılaştırıldığında en yüksek cevap veren embriyogenik kalus oluşumu %10,0 ile 12 mg/l dikamba içeren ortamda meydana gelirken, %3,3 ile 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l dikamba 2 mg/l pikloram ve 4 mg/l pikloram içeren ortamlarda cevap veren embriyogenik kalus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.3. Embriyogenik kaluslardan sürgün oluşumu

A) SH temel besi ortamında 12. yöntemde somatik embriyodan rejenere bitki oluşumu **B)** MS temel besi ortamında 5. yöntemde embriyogenik kaluslardan sürgün oluşumu. **C)** MS temel besi ortamında 2. yöntemde embriyogenik kaluslardan sürgün oluşumu. **D)** SH ortamında embriyogenik kalusdan sürgün oluşumu

4.4. Rejenerasyon Etkinliği (Adet)

Rejenerasyon etkinliği üzerine oksin tipi ve dozlarından oluşan yöntemlerin ve temel besi ortamlarının etkisi çok önemli olmuştur ($P < 0,01$) (Çizelge 4.4). En yüksek rejenerasyon etkinliği 6,2 adet ile MS ortamında meydana gelirken bunu, 6,1 adet ile SH ve 2,9 adet ile N6 ortamı izlemiş ve MS ve SH temel besi ortamları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmamıştır (Çizelge 4.4) (Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. Temel besi ortamlarına ve yöntemlere göre rejenerasyon etkinliği (adet).

Yöntem	Oksin Tipi ve Dozu	Temel Besi Ortamı			Ortalama
		MS	SH	N6	
1	2 mg/l 2,4-D	8,7±0,7 ^c	5,8±0,5 ^g	0,0±0 ^g	4,8±1,1 ^{ef}
2	4 mg/l 2,4-D	8,8±0,1 ^c	7,5±0,7 ^{def}	0,0±0 ^g	5,4±1,2 ^{de}
3	6 mg/l 2,4-D	11±0,4 ^b	7,5±0,6 ^{def}	0,0±0 ^g	6,2±1,4 ^{cd}
4	8 mg/l 2,4-D	17,0±0,7 ^a	8,8±0,5 ^{cde}	11,8±0,6 ^a	12,5±1,1 ^a
5	10 mg/l 2,4-D	6,0±0 ^{de}	7,3±0,6 ^{ef}	10,5±0,5 ^a	7,9±0,6 ^b
6	12 mg/l 2,4-D	6,1±0,3 ^{de}	6,7±0,6 ^{fg}	1,0±0 ^{fg}	4,6±0,8 ^{fg}
7	2 mg/l Dikamba	2,5±0,6 ^{ij}	5,7±0,2 ^g	0,0±0 ^g	2,7±0,7 ^{ij}
8	4 mg/l Dikamba	3±0,4 ^{hi}	6,3±0,6 ^{fg}	2,6±0,1 ^{de}	4,0±0,6 ^{gh}
9	6 mg/l Dikamba	4±0,4 ^{gh}	8,9±0,6 ^{cd}	3,0±0 ^d	5,3±0,8 ^{ef}
10	8 mg/l Dikamba	6,7±0,5 ^d	9,3±0,8 ^{bc}	4,3±1,5 ^c	6,7±0,8 ^c
11	10 mg/l Dikamba	7,0±0 ^d	10,8±0,6 ^{ab}	5,8±0,5 ^b	7,8±0,7 ^b
12	12 mg/l Dikamba	7,2±0,3 ^d	11,7±0,6 ^a	6,0±0 ^b	8,3±0,8 ^b
13	2 mg/l Pikloram	1,3±0,1 ^j	0,0±0 ⁱ	2,0±0,2 ^{def}	1,1±0,3 ^k
14	4 mg/l Pikloram	2,8±0,5 ^{hi}	0,0±0 ⁱ	1,3±0,3 ^{fg}	1,3±0,4 ^k
15	6 mg/l Pikloram	3,0±0,4 ^{hi}	3,0±0 ^h	1,5±0,3 ^{ef}	2,5±0,3 ^j
16	8 mg/l Pikloram	4,5±1 ^{fg}	3,5±0,6 ^h	2,0±0,4 ^{def}	3,3±0,5 ^{hi}
17	10 mg/l Pikloram	5,3±0,2 ^{ef}	4,0±0,7 ^h	0,0±0 ^g	3,1±0,7 ^{ij}
18	12 mg/l Pikloram	6,3±0,3 ^{de}	3,5±0,3 ^h	0,0±0 ^g	3,3±0,8 ^{hij}
	Ortalama	6,2±0,4^A	6,1±0,4^A	2,9±0,4^B	5,0±0,3
F değeri (Yöntem)		65,8**	37,4**	64,1**	105,4**
F değeri (Temel Besi ortamı)		-	-	-	276,4**
F değeri (YxT)		-	-	-	27,5**
LSD (0,05) (Y)		1,3	1,5	1,3	0,8
LSD (0,05) (T)		-	-	-	0,3
LSD (0,05) (Y*T)		-	-	-	0,7
Varyasyon Katsayısı %		14,8	17,7	31,1	19,1

** ile işaretli F değerleri 0,01 ihtimal düzeyinde önemlidir.

¹: Aynı sütunda farklı küçük harfle ve aynı satırda farklı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar 0,05 ihtimal düzeyinde önemlidir.

Yöntemler rejenerasyon etkinliği temel besi ortamına göre farklılık gösterdiğinden yöntem x temel besi ortamı interaksyonu çok önemli olmasına neden olmuştur (Çizelge 4.4).

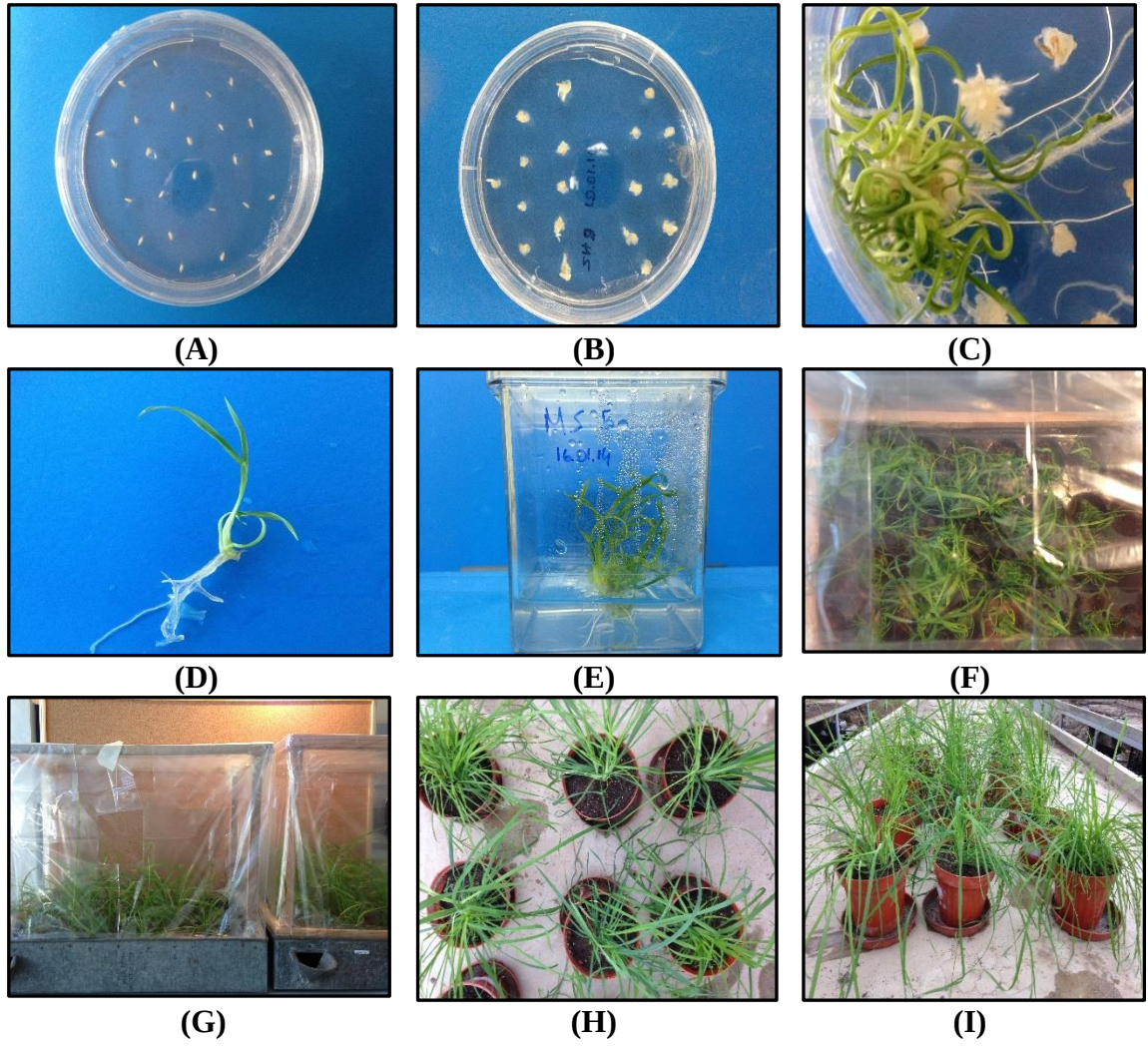
MS ortamında yöntemlerin rejenerasyon etkinliği üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$) (Çizelge 4.4). Yöntemlere göre rejenerasyon etkinliği 17,0 adet ile 1,3 adet

arasında değişmiş ve ortalama 6,2 adet olarak belirlenmiştir. MS ortamında en yüksek rejenerasyon etkinliği 17,0 adet ile 8 mg/l 2,4-D içeren ortamda meydana gelirken en düşük rejenerasyon etkinliği 1,3 adet ile 2 mg/l pikloram içeren ortamda meydana gelmiştir (izelge 4.4).

SH ortamında yöntemlerin rejenerasyon etkinliği üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$). Yöntemlere göre rejenerasyon etkinliği 11,7 adet ile 0,0 adet arasında değişmiş ve ortalama 6,1 adet olmuştur. SH ortamında en yüksek rejenerasyon etkinliği 11,7 adet ile 12 mg/l dikamba içeren ortamda meydana gelirken 2 mg/l ve 4 mg/l pikloramda bitki oluşumu gözlenmemiştir (izelge 4.4).

N6 ortamında yöntemlerin rejenerasyon etkinliği üzerine etkisi çok önemli olmuştur ($P<0,01$). Yöntemlere göre rejenerasyon etkinliği 11,8 adet ile 0,0 adet arasında değişmiş ve ortalama 2,9 adet olarak belirlenmiştir. Bu ortamında en yüksek rejenerasyon etkinliği 11,8 adet ile 8 mg/l 2,4-D içeren ortamda meydana gelirken, 2 mg/l 2,4-D, 4 mg/l 2,4-D, 6 mg/l 2,4-D, 2 mg/l dikamba, 10 mg/l pikloramda ve 12 mg/l pikloramda bitki oluşumu gözlenmemiştir (izelge 4.4).

Temel besi ortamlarının ortalamasına göre oksin tipi ve dozlarından oluşan yöntemler karşılaştırıldığında en yüksek rejenerasyon etkinliği 12,5 adet ile 8 mg/l 2,4-D içeren ortamda meydana gelirken, en düşük rejenerasyon etkinliği 1,1 adet ile 2 mg/l pikloram içeren ortamda meydana gelmiştir (şekil 4.4) (izelge 4.4).



Şekil 4.4. Besi ortamlarında meydana gelen rejenere bitkiler

A) Kültür başlangıcı **B)** Kalus oluşumu **C)** embriyonik kaluslardan oluşan bitkicikler **D)** Tek Bitki **E)** Rejenere bitkilerin magenda kutusunda kök ve sürgünlerinin geliştirilmesi **F)** Rejenere bitkilerin aklimizasyonu **G)** Rejenere bitkilerin viyollerde geliştirilmesi **H ve I)** Rejenere bitkilerin saksılara aktarılması

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Genetik mühendisliği çalışmaları etkili bir bitki rejenerasyon sistemine bağlıdır. Olgunlaşmamış embriyolar bu amaçla en yaygın olarak kullanılan eksplant kaynağını oluştururlar. Olgunlaşmamış embriyoların eksplant kaynağı olarak kullanılabilmesi için donör bitkiden belli dönemlerde eksplant kaynağının temin edilmesine ve kışlık çeşitlerde vernalizasyon ihtiyacının karşılanması için seralara ve kontrollü koşullara gereksinim duyulmaktadır. Bu durumda daha uzun bir süre ve daha fazla finansman gerekmektedir. Buna karşın, olgun embriyoların kaynağı olan tohumlar kolaylıkla temin edilebildikleri ve depolanabildikleri için yılın her döneminde çalışma olanağı sağlamaktadırlar. Bu nedenle olgun embriyolar genetik transformasyon çalışmalarında kullanılacak kalusların üretimi için alternatif eksplant kaynağını oluştururlar. Ancak, olgun embriyoların somatik embriyogenesis yolu ile rejenerasyon kapasitelerinin düşük olması nedeniyle fazla tercih edilmemektedir.

Araştırmamızda, endosperm destekli olgun embriyodan başarılı bir şekilde bitki rejenerasyonu sağlanmış bulunmaktadır. Aynı şekilde, domuz ayrığında bitki rejenerasyonu için olgun embriyoları Conger and Carabia (1978) ve Şahin vd (2010)'de kullanmışlardır. Bunun yanında, buğdayda (Bartok and Sagi 1990; Chen *et al.* 2006; Aydın 2006), arpada (He and Jia 2008) ve tritikalede (Birsin and Özgen 2004) endosperm destekli olgun embriyoların endosperm desteksiz olgun embriyolara göre bitki rejenerasyon kapasitelerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Araştırmamızda en iyi kalus oluşumu 12 mg/l dikambanın kullanıldığı ortamda (12 nolu yöntem) gözlenmiştir. Buna karşın, Kılınç (2004) buğdayda olgun embriyo kültüründe yapmış olduğu çalışmada dikambanın 2,5, 5, 7,5 ve 10 mg/l dozlarını kullanmış ve en iyi kalus oluşumunun 5 mg/l dikambada elde etmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda farklı bitki türü ve endosperm destekli olgun embriyolar kullanılmıştır.

Endosperm destekli olgun embriyoların direk embriyolara göre bitki rejenerasyonu bakımından daha iyi olmasının nedeni ile ilgili çeşitli görüşler bildirilmiştir. Bu görüşlerden biri, endosperm destekli olgun embriyo kültüründe endospermin yapay besi

ortamına göre daha fazla besin sağladığı yönündedir (Bartok and Sagi 1990). Diğer görüş ise embriyodaki bazı hücrelerin endosperminden sinyal alabileceği ve böylece eksplantta düzgün bir şekilde farklılaşma sağlanabileceği ve bunun sonucunda da rejenere bitkilerin oluşacağı şeklindedir (Chen *et al.* 2006).

Bitki doku kültüründe, bitki büyüme düzenleyicileri önemli rol oynamaktadırlar. Kültür ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinden oksinler, hücre bölünmesini ve gelişimini uyaran ve somatik embriyo oluşumunu en fazla etkileyen bileşiklerdir. Embriyogenesis oluşumu için en fazla kullanılan oksin tipi 2,4-D olmakla birlikte NAA, pikloram ve dikamba da tek başlarına veya 2,4-D ile birlikte kullanılmaktadırlar. Diğer yandan oksinlerin embriyogenesis oluşumunu teşvik etmek amacıyla kullanılmalarına rağmen kültür ortamında sürekli oksin bulunması somatik embriyoların gelişimini engellemektedir (Aydın 2010).

Araştırmamızda en iyi oksin tipinin kalus ve embriyogenik kalus oluşumu için dikamba, cevap veren embriyogenik kalus ve rejenerasyon etkinliği için 2,4-D olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde buğdayda endosperm destekli ve desteksiz olgun embriyo kültürlerinde oksin tiplerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda dikambanın 2,4-D'den daha etkili olduğu belirlenmiştir (Mendoza and Kaeppler 2002; Filippov *et al.* 2006). Yine, Can vd (2008), otlak ayrığında yaptıkları çalışmada en iyi kalus oluşumunu dikambada elde etmişlerdir. Papenfuss and Carmen (1987), dikambanın, metabolizma tarafından daha hızlı kullanıldığını ve bu nedenle sürgün oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. Ancak, Redway *et al.* (1990), buğday doku kültüründe yapmış oldukları çalışmada dikamba ve 2,4-D arasında herhangi bir fark olmadığını kaydetmişlerdir. Transgenik bitki elde edilmesinde önemli unsurlardan biri elde edilen rejenere bitki sayısıdır. Araştırmamızda, oksin tipi ve dozlarından oluşan yöntemlerle temel besi ortamları birlikte değerlendirildiğinde en yüksek rejenere bitki sayısı 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamından elde edilmiştir. Yine, birçok araştırmacı kalus oluşumu için 2,4-D'nin başarılı bir şekilde kullanıldığını bildirmişlerdir (Karp 1994; Özgen vd 1996, 1998). Chen *et al.* (2006), buğdayda yapmış olduğu endosperm destekli olgun embriyo kültüründe 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamını kullanmıştır. Yine, buğday olgun embriyo

kültüründe çalışan Ahmet ve Adak (2007), olgun embriyoları 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Tritikalede çalışan Birsin ve Özgen (2004), endosperm destekli olgun embriyo kültüründe 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamını önermişlerdir.

Araştırmada kullandığımız üç oksin tipinde de yüksek dozlarda bitki rejenrasyonunun daha iyi olduğu belirlenmiştir. Nitekim Filippov *et al.* (2006), olgun embriyoların olgunlaşmamış embriyolara göre daha yaşlı ve daha fazla farklılaşmış dokular içerdiğini ve bu nedenle tersine farklılaşma için daha yüksek oranda oksin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Yine, aynı araştırmacılar endosperm destekli olgun embriyo kültüründe endosperm bitki büyüme düzenleyicilerini absorbe edebileceğini ve bu nedenle endosperm desteksiz olgun embriyo kültürüne göre daha yüksek oranda oksin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. En yüksek bitki rejenerasyonu 8 mg/l 2,4-D’de meydana gelirken, dikamba ve pikloramda ise 12 mg/l meydana gelmiştir. Buğdayda olgun embriyoda çalışan Filippov *et al.* (2006) en iyi bitki rejenerasyonunu 2,4-D’nin 10 mg/l dozundan, dikambanın ise 12 mg/l dozundan elde etmişlerdir. Yine, aynı araştırmada 14 mg/l dikamba içeren ortamda bitki rejenerasyonu 10 mg/l 2,4-D içeren ortamdan daha yüksek olmuştur. Yine, Muhumuza and Okari (2013), sorgum türlerinde en iyi bitki rejenerasyonunu 2,5 mg/l 2,4-D ve 0,5 mg/l kinetin içeren ortamlarda elde etmişler ve yaptıkları bir çalışmada 2,4-D’nin yüksek oranda kullanılması durumunda kalus oluşumunu ve bitki rejenerasyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Yine, McDonnell and Conger (1984) çayır salkım otu bitkisinde 2,4-D’nin artan konsantrasyonlarının yaprak gelişimini azalttığını, 2,4-D’siz 5, 10, 20 µM dikamba bulunan ortamlarda kalus gelişiminin yüksek oranda olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar dikambanın 2,4-D’ye göre daha yüksek dozda etkili olabileceğini göstermektedir. Nitekim, 2,4-D, enzimatik parçalanmaya ve birleşmeye direnç göstermekte ve bu nedenle bitki hücrelerinde yüksek oranda kararlı bir şekilde kalabilmektedir (Moore 1989). Yine, 2,4-D’nin yüksek konsantrasyonlarında kromozomal anormalliklerin ve somaklonal varyasyonun arttığı ve bu nedenle 2,4-D’ye alternatif olarak dikamba ve pikloram gibi oksinlerin kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Pedrosa and Vasil 1996). Nitekim, gen aktarım çalışmalarında istenmeyen bir özellik olan somaklonal varyasyon için en iyi oksin tipi ve dozunun belirlenmesine ihtiyaç vardır. Bu nedenle bu çalışmanın devamı olarak

somaklonal varyasyona yönelik çalışmaların planlanması daha uygun olacaktır.

Doku kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerden biri de temel besi ortamıdır. Çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen birçok besi ortamı formülasyonu olmasına rağmen MS, B5, LS, N6 ve SH yaygın olarak kullanılan besi ortamlarıdır. MS ortamı birçok bitki türünde başarı ile kullanılmaktadır. Bu çalışmada SH ortamı diğer ortamlara (MS ve N6) göre daha iyi sonuç vermiştir. SH ise hem monokotiledon hem de dikotiledon bitkiler için uygun bir ortamdır. Aynı şekilde, Can vd (2008), otlak ayrığına yaptıkları çalışmada en yüksek sürgün oluşumunu SH ortamında elde etmiştir. Ancak, Ahn *et al.* (1985) *Lolium multiflorum*, *Festuca rubra* ve *Dactylis glomerata* türlerinde kalus gelişiminin N6 ortamında MS ortamına göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir. Yine, YongWoo *et al.* (2000), İtalyan çimi (*Lolium multiflorum*) bitkisinde yaptıkları bir çalışmada SH, MS ve N6 ortamları arasında MS ortamının kalus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için en etkili besi olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, domuz ayrığına endosperm destekli olgun embriyoların başarılı bir şekilde kullanılabileceği ve en iyi bitki rejenerasyonun 8 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında meydana geldiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Ahmet, H. ve Adak M.S., 2007. Irakta yetiştirilen bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde kalus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. Tarım Bilimleri Dergisi,13(3),285-292.
- Ahn, B.J., Huang, F.H. and King, J.W. 1985. Plant Rejuvenation Through Somatic Embryogenesis in Common Bermudagrass Tissue culture. Arkansas Agric. Exp. Stn.
- Allard, R.W., 1960. Principles of plant breeding. John Wiley and Sons, New York.
- Altın, M., 1987. Sulu koşullarda bazı yem bitkileri ile bunların karışımlarının değişik azot seviyelerindeki kuru ot verimleri. Doğa Tu. Tar. ve Orm. Der., 11: 249-261.
- Arzani, A. and Mirodjagh, S.S. 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and in vitro salt stress. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 58:67-72.
- Avcıoğlu, R., Hatipoğlu, R. Ve Karadağ, Y. 2009. Yem Bitkileri, Buğdaygil ve Diğer Familya Yem Bitkileri, Cilt 3. Sayfa: 611.
- Avcıoğlu, R., Hatipoğlu, R. ve Karadağ, Y., 2009. Yem Bitkileri, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Cilt 1. Sayfa : 12. ANKARA.
- Aydın, M., 2006. Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) olgun embriyo kaynaklı kalus oluşumunu ve rejenerasyon kapasitesini etkileyen faktörlerin belirlenmesi. Y. Lisans, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aydın M., 2010. Bazı ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin olgun embriyo kültürüne tepkilerinin belirlenmesi. Doktora tezi , A.Ü. Fen Bilimleri enstitüsü, Erzurum.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. 2001. Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulama Kitabı, Cilt 1.
- Bartok, T. and Sagi, F., 1990. A new endosperm support culture callus induction method for wheat (*Triticum aestivum* L.) Plant Cell Tissue Organ Cult., 22, 37-41.
- Birsin, M.A. and Özgen, M., 2004. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale (*Triticosecale* Wittmack). Cellular and Molecular Biology Letters, Volume:9 Pages: 353-361.
- Borril, M., 1977. Evolution and genetic resources in cocksfoot. Report of Welsh Plant Breeding Station for 1977, Aberistwyth, 190-209.
- Can, E., Tükel, T. ve Hatipoğlu, R. 1994. Domuz ayrığı bitkisinin genç salkımlarının *in vitro* kültüründe eksplant olarak kullanım olanakları üzerine bir araştırma. V. Tarla Bitkileri Kongresi, E.Ü.Z.F.
- Can, E., Çeliktas, N. ve Hatipoğlu, R. 2008. Effect of auxin type of concentrations in different media on the callus induction and shoot formation of cherted wheastgrass (*Agropyron cristatum* L. Gaertn). Biotechnol & Biotechnol. EQ.
- Chaudhury, A. and Qu, R. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 113-120.

- Chen, J.Y., Yue, R.Q., Xu, H.X. and Chen, X.J., 2006. Study on plant regeneration of wheat mature embryo under endosperm supported culture. *Agric. Sci. China*, 5, 572-578.
- Christensen, J.R., Borrino, E., Olesen, A. and Andersen S.B. 1997. Diploid, tetraploid and octoploid plants from anther culture of tetraploid orchardgrass, *Dactylis glomerata* L. *Plant Breeding*, 116, Pages:267-270.
- Christie, B.R. 1973. Performance of hybrids in orchardgrass. *Can. J. Plant Sci.* 53: 783-789.
- Chu, C.-C. (1978) The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In *Proc. Syrup. Plant Tissue Culture*. Peking: Science Press, pp. 43-50.
- Conger, B.V. and Carabia, J.V. 1977. Callus induction and plantlet regeneration in orchardgrass. *Dep. of Plant and Soil Sci., Univ. Of Tennessee, Knoxville, TN* 37916.
- Dale, P.J. and Dalton, S.J. 1983. Immature inflorescences Culture in *Lolium*, *Festuca*, *Phleum* and *Dactylis*. *Z. Pflanzphysiol.* 111:39-45.
- Dalton, S.J. and Dale, P.J. 1985. The application of in vitro tiller induction in *Lolium multiflorum*. *Euphytica* 34:897-904.
- Demir, İ., 1975. Genel bitki ıslahı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, N o:212, İzmir.
- Denchev, P.D., Songstad, D.D. and McDaniel, K.J., 1997. Transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata*) plants by direct embryogenesis from microprojectile bombarded leaf cells. *Plant Cell Perorts*, 16: 813-819.
- EunKyung, B., InAe, L., KiYong, K., ByungHyun, L., Daeyoung, S., Hyoshin, L. MinSup, C. and Jinki, J. 2002. Comparison of callus formation ratios from seed explants, callus sizes and regeneration efficiency among several orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) varieties. *Journal of the Korean Society of Grassland Science*, Volume: 22 Issue: 2 Pages: 93-100.
- Falistooco, E., Mariani, A. 1984. Cytogenetic behaviour of some Italian populations of *Dactylis glomerata* L., *Genet. Agr.* 38, 101-114.
- Filippov, M., Miroshnichenko, D., Vernikovskaya, D. and Dolgov, S., 2006. The effect of auxin and exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 212-222.
- Ge, X., Chu, Z. and Lin, Y., 2006. A tissue culture system for different germplasm of India rice. *Plant Cell. Report*, 25, 392-402.
- Ge, Y., Norton, T. and Wang, Z.Y. 2006. Transgenic zoysiagrass (*Zoysia japonica*) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep*, 25: 792-798.
- Geçit, H.H., Çiftçi, C.Y., Emeklier, H.Y., İkincikarakaya, S., Adak, M.S., Kolsarıcı, Ö., Ekiz, H., Altınok, S., Sancak, S., Sevimay, C.S. ve Kendir, H., 2009. Tarla Bitkileri, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi
- Gençkan, S., 1983. Yem Bitkileri Tarımı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No : 467.
- Gözen, A., Abak, K., Kasnakoğlu, H., Çetiner, S. ve Güzel, A., 1995. Türkiye’de bitki biyoteknolojisi öncelikleri. *Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı Yayınları*, 2.
- Haliloğlu, K. Şengül, S. ve Aydın, M. 2011. Yem bitkileri tarımında transgenik bitkiler. Uluslararası katılımlı I. Ali Numan Kırac Tarım Kongresi ve Fuarı. Eskişehir.

- Hatipoğlu, R. 1997. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190, Ders kitapları Yayın No: A-58. Çukurova Üniversitesi Yayınları No: 197.
- Hatipoğlu, R., Avcıoğlu, R., Karadağ, Y., 2009. Yem bitkileri, 'Genel Bölüm', Bölüm 1.1, Yem bitkilerinin Tanımı ve Tarihçesi - TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, TÜGEM, Cilt 1, s: 5-10.
- He, T. and Jia, J.F., 2008. High frequency plant regeneration from mature embryo explants of highland barley (*Hordeum vulgare* L. nudum Hk.f.) under endosperm supported culture. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 95, 251-310.
- Henson, P.R. and Schoth, H.A. 1955. Vetch culture and uses. USDA Farm. Bull.No: 1740.
- Horn, M.E., Conger, B.V. and Harms, C.T. 1988. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension cultures of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Plant Cell Reports, 7:371-374.
- HyoShin, L., YongSham, K., ByungHyun, L., SungHye, W., KiYong, K. and Jinki, J. 2000. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Journal of the Korean Society of Grassland Science, Volume: 20 Issue: 1 Pages: 7-12.
- Jung, G.A. and Baker, B.S. 1985. Orchardgrass. In: Forages, M.E. heath, R.F. Barnes, D.S. Metcalfe (eds), pp: 224-232, Iowa State University Pres, Iowa.
- Karp, A. 1994. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. p. 139-151.
- Kılınç, M. 2004. Effect of dicamba concentration on the embryo cultures of some bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Biotechnol& Biotechnol. Eq.
- Koç, A., Gökkuş, A., Serin, Y., Tan, M. ve Çomaklı, B., 1998. Hay yield and quality of orchardgrass, alfalfa and red clover mixtures in relation to nitrogen application. 2. Balkan Symposium on Field Crops, 16-20 June 1998, Novi Sad, Yugoslavia, Pp. 465-468.
- Koç, A., Tan, M. ve Erkovan, H.İ. 2012. An overview of fodder resources and animal production in Turkey.
- Kuklin, A.I. and Conger, B.V., 1995. Enhancement of somatic embryogenesis in orchardgrass leaf cultures by epinephrine. Plant Cell Reports, 14:641-644.
- Last, L., Widmer, F., Fjellstad, W., Stoyanova, S. and Kölliker, R. 2013. Genetic diversity of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations in three regions in Europe.
- Lee, K.W., Choi, G.J., Kim, K.Y., Ji, H.C., Park, H.S., Seo, S., Kim, M.J. and Lee, S.H. 2012. Comparison of callus induction and plant regeneration from twenty tall fescue varieties. African Journal of Biotechnology Vol. 11(15), pp. 3553-3557.
- Lentz, E.M., Crane, C.F., Slaper, D.A., Loegering, W.Q., 1983. An assesment of preferential chromosome pairing at meiosis *Dactylis glomerata* L., Can. J. Genet. Cytol., 25, 222-232.
- Liu, G.S., Liu, J.S., Qi, D.M., Chu, C.C and Li, H.J. 2004. Factors affecting plant regeneration from tissue culture of *Chinensis Leymus* (*Leymus Chinensis*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76: 175-178.
- Lowe, W.K. and Conger, B.V. 1979. Root and Shoot from Callus Cultures of Tall Fescue.
- Mantell, S.H., Matthews, J.A. and Mckee., R.A., 1985. Principles of Plant Biotechnology. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

- McDonnell, R. E. and Conger, B.V. 1984. Callus induction and plantlet formation from mature embryo explant of Kentucky bluegrass. Inst. of Agriculture, Dep. of Plant & Soil Science, P. O.Box 1071, Knoxville, TN 7901-1071.
- Mendoza, M.G. and Kaeppler, H.F., 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of Wheat (*Triticum aestivum*). In vitro Cell. Dev. Biol., 38, 39-45.
- Mizianty, M., 1990. Biosystematic studies on *Dactylis* L. 1. Review of the previous studies. 1.2. Cytology, genetics, experimental studies and evolution. Acta Soc. Bot. Pol. 59: 105-118.
- Mohering, D.M. and Rowles, I.W. 1970. Detrimental effects of weather logging. Journal of Forestry, 68, 166-167.
- Moore, T.C., 1989. Biochemistry and physiology of plant hormone. Springer, New York.
- Murashige, T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15, 473-497.
- Muhumuza, J.B. and Okori, P. (2013). Development of highly efficient *in vitro* culture system for Ugandan adapted Sorghum genotypes. International Research Journal of Plant and Crop Sciences. Vol. 1 (1), pp. 001-011.
- Neibaur, I., Gallo, M. and Altpeter, F. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segment of seashore paspalum. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 44:480-486.
- Özgen, M., Türet M., Özcan S. and Sancak C., 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. Plant Breed., 115, 455-458.
- Özgen, M., Türet M., Altınok S., Sancak C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat genotypes. Plant Cell reports, 18, 331-335.
- Papenfuss, J.M and Carman, J.G., 1987. Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin. Crop. Sci., 27, 588-593.
- Pedrosa, L.P. and Vasil, I.K. 1996. Optimization of somatic embryogenesis and long-term regeneration in callus cultures of diploperennial teosinte (*Zea diploperennis* Iltis, Doebley and Guzman). Maydica 41:333-348.
- Plazek, A., Filek, M. and Wedzony, M. 1999. Improvement of regeneration ability in *Phleum pratense* L. *in vitro* culture by dicamba. Acta Physiologiae Plantarum, Vol. 21, No. 4 : 397-403.
- Poehlman, M.J. 1978. Breeding field crops. Avi. Publ. Comp. Inc. Westport, USA. P. 353-386.
- Redway, F. A., Vasil V., Lu D. and Vasil I.K., 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet, 79, 609-617.
- Robinson, R.R. and Sprague, V.G., 1952. Responses of orchardgrass-ladino clover to irrigation and nitrogen fertilization. Agron J. 44: 244-247.
- SangHoon, L., DongGi, L. and ByungHyun, L. 2004. Effects of medium supplements on seed-derived callus culture and regeneration of orchardgrass. Korean Journal of Crop Science, Volume: 49 Issue: 3 Pages: 232-236.

- Serin, Y. ve Tan, M. 2011. Yem Bitkileri K lt r ne Giri . Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 206, Erzurum.
- Serin, Y. ve Tan, M. 2012. Buğdaygil Yem Bitkileri Kitabı. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 859, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 334, Ders Kitapları Serisi: 81. Erzurum.
- Schenk R.U., Hildebrand C. (1972) Can. J. Bot., 50, 199-204.
- Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O., 1982. Selection for yield and quality in Orchardgrass. Journal Series of The Pennsylvania Agric. Exp. Stn. Contribution No, 8111.
- Somleva, M., Kapchina, V., Alexieva, V. and Golovinsky, E. 1995. Anticytokinin effects on in vitro response of embryogenic and nonembryogenic genotypes of *Dactylis glomerata* L. Plant Growth Regulation, Volume: 16 Issue: 2 Pages: 109-112.
- Spangenberg, G., Wang, Z.Y., Wu, Z.L., Kaul V, and Garret R. 1997. Biotechnology in pasture plant improvement: Methods and prospects. Proc. XVIII. Grassland Congr. Vol 3:79-96. Winnipeg and Saskatoon.
- Sprague, V.G. and Barber, R.J., 1950. Effect of time and height of cutting and nitrogen fertilization on the persistence of the legume and production of orchardgrass-ladino and brome grass-ladino associations. Agron. J. 42: 586-593.
- S le, R., 2005. Farklı Oksin  e itlerinin Yonca (*Medicago sativa* L.)’da Somatik Embriyo Oluşumuna Etkisi  zerinde Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Hatay.
-  ahin, E., 2008. Doğal Domuz Ayrığı (*Dactylis glomerata* L.) ekotiplerinde seleksiyon. Y. Lisans, A. . Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
-  ahin, E., Tosun, M. ve Haliloğlu, K., 2010. Domuz Ayrığında (*Dactylis glomerata* L.) Olgun Embriyodan Bitki Rejenerasyonu, S leyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 5 (2):15-21.
- Thurrow, T.L., Blackburn, W.H., Warren, S.D. and Taylor Jr, C.A. 1988. Infiltration and interrill erosion responses to selected livestock grazing strategies, Edwards Plateau, Texas, J. Range Management, 40:455-460.
- Tomaszewski, Z., Kuklin, A.I. Sams, C.E. and Conger, B.V., 1994. Influence of low-temperature preincubation on somatic embryogenesis and ethylene emanation from orchardgrass leaves. Plant Growth Regulation, Vol:14, Issue:3, Pages:229-234.
- Tosun, M., Akgün,  ., Sağsöz, S., 1999. Erzurum yöresinde yetişen yabani domuz ayrığı (*Dactylis glomerata* L.) bitkilerinde bazı sitolojik özelliklerin belirlenmesi. Tr. J. of Agriculture and Forestry, Ek Sayı 1, 219-227.
- Tosun, M., Sağsöz, S., Akgün,  ., 1996. Yabani domuz ayrığı (*Dactylis glomerata* L.) bitkilerinde ot ve tohum verimi ile otun bazı kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Türkiye 3. Çayır- Mer’a ve Yem bitkileri Kongresi, Erzurum.
- Tosun, M., Aygün,  . ve Sağsöz, S. 1999. Erzurum yöresinde yetişen yabani Domuz Ayrığı (*Dactylis glomerata* L.) bitkilerinde bazı sitolojik özelliklerin belirlenmesi. Tr. J. of Agriculture and Forestry, Ek Sayı: , 219-227.
- Trigiano, R.N., Conger, B.V. and Songstad, D. D. 1987. Effect of mefluidide and dicamba on *in vitro* growth and embryogenesis of *Dactylis glomerata*. J. Plant Growth Regul. 6: 133-146.

- Tükel, T. ve Hatipoğlu, R., 1997. Çayır-Mer'a Amenajmanı. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Kitapları, Yayın No : A-59.
- Wang, Z.Y. and Ge, Y., 2005a. Rapid and efficient productions of transgenic bermudagrass and creeping bentgrass bypassing the callus formation phase. Functional plant Biol., 32, 769-776.
- Wang, Z.Y. and Ge, Y., 2005b. *Agrobacterium* mediated high efficiency transformation of tall fescue (*Festuca arundinavea* Schreb.). J. Plant Physiol 162, 103-113.
- Wang, Z.Y. and Ge, Y., 2006. Recent advances in genetic transformation of forage and turf grasses. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 42, 1-18.
- Watson, L. and Dallwitz M.J. 1992. The grass genera of the World. Wallingford, UK, CAB International.
- Whyte, R., Moir T. and Cooper J. 1975. Grasses in Agrticulture. FAO Agricultural Studies. No: 42.
- YongWoo, R., KiYong, K., KeeJun, C., ByungRyul, S. and JeongSheop, S. 2000. Callus induction from seeds of Italian ryegrass and plant regeneration. Journal of Korean Society of Grassland Science, Vol:20, No:1, pp: 25-30.

ÖZGEÇMİŞ

Konya İli Karatay İlçesinde 1989 yılında doğdu. İlkokul eğitimini Hatay'da, ortaokul ve lise eğitimini ise Konya'da tamamladı. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında mezun olup aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2012 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen bu göreve devam etmektedir.