

Buğday Doku Kültüründe Alternatif Eksplant Kaynağı: Olgun Embriyo

Murat AYDIN* Kamil HALİLOĞLU Metin TOSUN

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 25240 Erzurum.

*Yazışma yazarı: maydin25@hotmail.com

Geliş tarihi:24.06.2009,Yayına kabul tarihi: 12.10.2009

Özet: Buğday, dünyada ekim alanı en fazla olan ve insanlığın en önemli besin kaynağını oluşturan bir bitkidir. Buğdayda genetik mühendisliği çalışmaları etkili bir rejenerasyon sistemine bağlıdır. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla veya partikül bombardımanı ile buğdayda ve tahıllarda transgenik bitki elde edilebilmektedir. Olgunlaşmamış embriyolar bu amaçla en yaygın olarak kullanılan eksplant kaynağını oluşturmuştur. Olgunlaşmamış embriyoların elde edilmeleri için bazı koşulların sağlanması gerekmektedir ve kullanımı belli dönemlerle sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle olgun embriyolar genetik transformasyon çalışmaları için alternatif bir eksplant kaynağıdır. Bu makalede buğday olgun embriyo kültüründe yapılan çalışmalar incelenerek, olgun embriyo kültürü için uygulanan sistemler ve etkileyen faktörler sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Buğday, doku kültürü, olgun embriyo, kallus, bitki rejenerasyonu

Alternative Explants Source in Wheat Tissue Culture: Mature Embryo

Abstract: Wheat is the most important staple crop that has largest cultivation land among cereals. Genetic engineering of wheat is solely based on effective regeneration system. Transgenic wheat and cereal crops can be generated via *Agrobacterium tumefaciens* based transformation and particular bombardment. An immature embryo is the most widely used explants source for this purpose. In order to obtain immature embryo some requirements should be met and there are some factors restricting use of immature embryos as explants. Therefore, mature embryo is an alternative explants source which can be used for genetic transformation. This article reviewed mature embryo culture in wheat in detail and discussed different approaches and factors affecting the mature embryo culture.

Key words: Wheat, Plant tissue culture, mature embryo, callus, plant regeneration

Giriş

Günümüzde buğday ıslahında birçok yöntemden yararlanılmakta olup, her geçen gün yeni özellikler taşıyan çeşitlerle verim ve kalite artışına katkıda bulunmaktadır. Tarımın başlangıcından 19. yüzyıla kadar insanoğlunun verimi artırma çabaları daha çok üstün verimli genotiplerin doğal populasyonlardan seçilmesi ve yetiştirme koşullarının olabildiğince iyileştirilmesi şeklinde olmuştur. 19. yüzyılda ise bitkilerde beslenme esaslarının ortaya konması ve kalıtım prensiplerinin yeniden keşfi sonucu, bitkisel üretim daha bilinçli olarak yapılmaya başlanmış ve birim

alandan elde edilen verimde büyük artışlar sağlanmıştır. 20. yüzyılda modern tarım tekniklerinin ve bitki ıslahı yöntemlerinin uygulanması ile bitkisel üretimde önemli verim artışı gerçekleşmiştir. 1900'li yılların başında dekara 66 kg olan dünya ortalama buğday verimi, 1999 yılında 230 kg'a ulaşmıştır. Ancak, mevcut verim yine de dekara yaklaşık 1500 kg olduğu tahmin edilen potansiyel verimin oldukça altında bulunmaktadır (Altıntaş ve ark. 2005). Belirtilen bu potansiyel verim düzeylerine erişilebilmesi için bitkilerin genetik yapılarının ve çevrelerinin daha iyi bir

şekilde kombine edilmesi gerekir. Bu amaçla klasik bitki ıslahı çalışmalarından yararlanılarak üstün verimli ve kaliteli birçok çeşit geliştirilip, insanoğlunun hizmetine sunulmasına karşın, başta hastalık ve zararlı olmak üzere bazı biyotik ve abiyotik çevresel baskılara karşı dayanıklılıkta henüz istenilen sonuç tam olarak alınamamıştır. Bu sorunlar değişen ekolojik koşullar altında giderek büyümekte ve tür içi melezleme, varyasyon oluşturmada yetersiz kalmaktadır. Yeni bir çeşit geliştirmenin çok uzun bir zaman alması ve daha fazla maddi kaynağa ihtiyaç duyulması geleneksel ıslah yöntemlerinin en önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır. Hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere, bitkilerin diğer tarımsal özelliklerini iyileştirmede birçok engellemelerle karşılaşmaktadır. Aralarında melezleme yapılabilen tür sayısının azlığı, yapılan melezlemelerde istenen karakterlerle birlikte istenmeyen özelliklerin de birlikte geçişinin önlenememesi, arzu edilmeyen karakterlerin geri melezleme yoluyla elemine edilmesinin çok uzun zaman alması ve daha fazla işgücü gerektirmesi geleneksel bitki ıslahının diğer dezavantajlarıdır (Özcan ve Özgen 1996). Modern ıslah yöntemleri olarak da adlandırılabilir biyoteknolojik yöntemler veya bitki genetik mühendisliği uygulamaları sayesinde, geleneksel yöntemlerin olumsuzlukları ortadan kaldırılabilir, ıslah süresi kısaltılarak para ve zamandan tasarruf sağlanmakta, melezlemede karşılaşılan sorunların, genetik bağlılık (linkage) sorunlarının ve gen havuzundan yararlanmadaki sınırlamaların kolayca üstesinden gelinebilmektedir.

Biyoteknolojik yöntemlerin ilk uygulaması olan doku kültürü yöntemleriyle kültüre alınan bitki hücrelerine ya da dokularına gen aktarımı yapılabilmekte, daha sonra gen aktarılmış bitki kısımları uygun besin ortamında olgun bitki haline getirilerek, aktarılan geni taşıyan transgenik bitkiler elde edilebilmektedir. Yine, doku kültürü sırasında meydana gelen kalluslardan farklılaşan bitkiler arasında görülen somaklonal varyasyondan ıslah programlarında yararlanılabilmektedir.

Ayrıca, *in vitro* ortamda kimyasal ve fiziksel mutagen uygulamaları ile hastalıklara, antibiyotiklere, herbisitlere, tuza, düşük sıcaklığa ve kuraklığa toleranslı veya dayanıklı mutant hücre seçimleri yapılabilmektedir (Karaca ve Bürün 1997).

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

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

Buğdayda Olgun Embriyo Kültürüne Etki Eden Faktörler

Genotip

Buğdayda, genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılarak gen aktarmada önemli bir adım olan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında başarının büyük ölçüde genotipe bağlı olduğu bilinmektedir (Şehirli ve Özgen 1998). Nitekim Bregitzer (1992) ve Li et al. (2003), buğdayda kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etki eden en önemli

faktörün genotip olduğunu bildirmişlerdir. Yine, Mathias and Simpson (1986), doku kültüründe genotipin ortamdan daha önemli olduğunu kaydetmişlerdir.

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

Özgen et al. (1996), yedi kışlık durum buğday genotipinde (Çakmak 79, Kırmızı 5132, S. Bursa 7113, Kunduru 414/44, Berkmen 469, T-104, T-105) olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyoda yapmış oldukları çalışmada, olgunlaşmamış embriyoda en yüksek kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonun Kunduru 414/44 ve Kırmızı 5132 çeşitlerinde, olgunlaşmış embriyoda ise Berkmen 469 çeşidinde meydana geldiğini ve ayrıca her iki eksplant kültüründe de kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda genotipin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Yine Özgen et al. (1998), oniki kışlık buğday genotiplerinin (Gerek 79, Haymana 79, Bezostaja 1, Bolal 2973, Başak 95, Sadova 1, Tosun 21, Yayla 305, Yektay 406, Sivas 111/33, Kırac 66, T-115) olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarını kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda olgunlaşmamış embriyo kültüründe en yüksek kallus oluşumu (%93,3) ve rejenerasyon kapasitesinin (%96,6) Yayla 305 çeşidinde, olgunlaşmış embriyoda ise en yüksek kallus oluşumu (%98,3) ve rejenerasyon kapasitesinin (%96,6) T-115 genotipinde meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar her iki embriyo kültüründe kallus oluşum oranı, kallus ağırlığı, rejenerasyon kapasitesi arasındaki korelasyonun önemsiz olduğunu, kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin farklı genler tarafından idare edildiğini ve de kallus oluşum oranının ve bitki rejenerasyonunun genotipe ve eksplant kaynağına bağlı olduğunu kaydetmişlerdir.

Sarker and Biswas (2002), dört ekmeklik buğday genotipinin (Sourav, Gourav,

Kanchan ve Protiva) olgun embriyolarını, olgunlaşmamış embriyolarını, tohumlarını, endospermelerini ve kök uçlarını farklı ortamlarda kültüre almışlardır. Tüm eksplant kaynaklarında, kallus oluşumu ve rejenerasyon bakımından genotipler arasında farklılık bulunduğu belirlenmiştir. Yine bir başka çalışmada Li et al. (2003), on yazlık buğday genotipinin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyo kültüründe, kallus oluşum oranına ve bitki rejenerasyonuna genotipin etkisinin çok önemli olduğunu bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada, Bi et al. (2007), otuz bir buğday genotipinin olgun embriyolarını kullanarak genotipleri kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu bakımından karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar daha önceki çalışmalarda olduğu gibi kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu bakımından genotipler arasında farklılık bulunduğunu ve genotipin etkisinin önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Kışlık ve yazlık buğday çeşit ve hatlarının kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu yeteneğini belirlemek ve buğdayın projenitörleri olan *T. monococcum*, *T. tauschii* ve *Aegilops speltoides*'in doku kültürüne tepkilerini araştırmak amacıyla bir çalışma yapan Zale et al. (2004), kallus oluşumu, rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkinliği bakımından genotipler arasında farklılık bulunduğunu ve buğdayın projenitörleri içerisinde en iyi bitki rejenerasyonunun *Aegilops speltoides*'te meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Patnaik et al. (2006), üç ekmeklik (HD2329, CPAN1676 ve PBW343) ve üç makarnalık (PDW215, PDW233 ve WH896) buğday genotiplerinin olgun embriyolarını kullandıkları denemede en yüksek kallus oluşumunun %92,0 ile HD2329 genotipinde, en yüksek rejenerasyonun ise %68,5 ile CPAN1676 genotipinde meydana geldiğini saptamışlardır. Diğer taraftan Iraktan getirilen beş ekmeklik buğday genotiplerinin (Irak, Temmuz 2, Eliz 66, İba 99 Musaddak ve İba 99 Müseccel) olgun embriyo kültürüne tepkilerini belirlemek amacıyla bir çalışma yapan Ahmet ve Adak (2007), en iyi kallus oluşumu ve

rejenerasyonun İba 99 Musaddak genotipinde meydana geldiğini, en düşük kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonun ise Eliz 66 genotipinde elde edildiğini bildirmişlerdir.

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

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

Buğdayda translokasyon hatları ve kromozom ikame hatlar kullanılarak yapılan çalışmalarda doku kültürüne cevabın lokusların yapısına ve yerlerine bağlı olduğu belirlenmiştir (Henry and Buyser 1985; Galiba et al. 1986; Mathias and Fukui 1986; Felsenburg et al. 1987; Higgins and Mathias 1987; Kaleikau et al. 1989; Langridge et al. 1991). Henry and De Buyser (1985), buğdayın B genomunun 1 numaralı kromozomunun uzun kolunun yerine 1 numaralı çavdar kromozomunun kısa kolu yerleştirildiğinde, 1 numaralı çavdar kromozomunun kısa kolunun buğday anter kültüründe bitki rejenerasyon kapasitesini etkileyen genleri içerdiğini bildirmişlerdir. Langridge et al. (1991) ve Fennell et al. (1996) 1 numaralı çavdar kromozomunun kısa kolunun olgunlaşmamış embriyo kültüründe rejenerasyondan sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Farklı buğday genotipleri ile yapılan çalışmalarda 4B kromozomu üzerinde bulunan genlerin rejenerasyonda

önemli etkiye sahip olmaları yanında (Higgins and Mathias 1987), sitoplazmanın ve mitokondriyal genomun da (Rode et al 1998) etkili olabileceği bildirilmiştir. Yine Willman et al. (1989), mısırdaki somatik embriyogenesis oluşumunda en az bir genin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan Rode et al. (1998), embriyogenik olmayan hücrelerde 8 kb'lık mitokondriyal DNA segmentinin kaybolduğunu ve bu segmentin tersine farklılaşan (de-differentiation) hücrelerin rejenerasyon yeteneğinde özel bir role sahip olabileceğini ifade etmişlerdir.

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

Donör bitkinin yetiştirme koşulları

Carman (1990) ve Bhaskaran and Smith (1990), kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda genotipler arasındaki farklılığın içsel (bitki bünyesindeki) hormon seviyesindeki farklılıkla ilgili olabileceğini bildirmişlerdir. Eksplant alınacak bitkilerin yetiştirme koşulları kallus oluşumunda ve bitki rejenerasyonunda önemli rol almaktadır. Örneğin ışık, nem, toprağın

besin durumu ve mevsimsel faktörler etkili olabilmektedir. Buğdayda donör bitkiler yüksek sıcaklık, kuraklık, düşük ışık yoğunluğu ve besin noksanlığı gibi olumsuz çevre koşullarında yetiştirildiğinde ve fungal veya bakteriyel hastalıklarla enfekte olduğunda ya da böcekler tarafından istila edildiklerinde eksplanttaki ve dokulardaki içsel hormon seviyeleri değişmektedir (Hess and Carman 1998). Muhtemelen içsel hormon seviyelerindeki değişimler gerek kallus oluşumunu ve gerekse bitki rejenerasyonunu olumsuz yönde etkilemektedir. Eksplant kaynağının alınacağı bitkilerin tam kontrollü şartlarda yetiştirilmesi bitki gelişimini optimum düzeyde sağlamaktadır. Dolayısıyla yetiştirme koşullarının etkisi en aza inmiş olacaktır.

Kültür ortamının içeriği

Bitki doku kültüründe, bitki büyüme düzenleyicileri önemli bir yere sahiptir. Kültür ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinden hücre bölünmesini ve gelişimini uyarıcı etkiye sahip olan oksinler, somatik embriyo oluşumunu en fazla etkileyen bileşiklerdir. Öte yandan oksinler embriyogenesi teşvik etmek amacıyla kullanılmalarına karşın, ortamda oksinin sürekli bulunması somatik embriyoların gelişimini engellemektedir. Sitokininlerin ise besin ortamına ilave edilmesi genellikle somatik embriyo oluşumunu engellemektedir (Anonymous 2003).

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

Ozias-Akins ve Vasil (1983b), B5 (Gamborg et al., 1968) ortamında 2,4-D'nin farklı miktarlarının (0; 0,4; 1,0; 4,0 ve 8,0 mg/l) kallus oluşumu ve gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar 2,4-D miktarındaki artışla

birlikte eksplant başına kallus taze ağırlığının ve hücre sayısının arttığını, 2,4-D'nin 2 mg/l ve daha yüksek miktarlarında hücrelerin düzensiz büyüdüklarini, ancak hücre bölünmesinin arttığını, kallus oluşumu ve gelişimi için 2 mg/l 2,4-D miktarının optimum olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde Mc Kinon et al. (1987), olgun embriyo kültüründe 9 µM (2 mg/l) 2,4-D miktarının optimum olduğunu belirlemişlerdir.

Ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin kullanıldığı bir denemede (Varshney et al. 1999), olgun embriyolar 2,4-D'nin farklı dozlarına (0,5; 2,5 ve 5,0 mg/l) sahip MS (Murashige and Skoog, 1962) ortamında kültüre almış ve 25 mg/l 2,4-D'nin optimum olduğu belirlenmiştir.

Patnaik et al. (2006), üç ekmeklik (HD2329, CPAN1676 ve PBW343) ve üç makarnalık (PDW215, PDW233 ve WH896) buğday genotiplerinin olgun embriyolarını kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D içeren MSE ortamında (200 mg/l kazein hidrolizat ve 100 mg/l *myo*-inositol içeren MS ortamı) 3 hafta süreyle karanlıkta 25±1 °C'de kültüre almışlardır. Bu ortamda oluşan kallusları ise bitki rejenerasyonu için 2,22 µM (0,5mg/l) BAP (6- Benzil amino pürin) ve 0,1 µM (yaklaşık 0,02 mg/l) NAA (Naftalen asetik asit) içeren MSE ortamına aktarmışlardır.

Ahmet ve Adak (2007), buğday olgun embriyoları 8 mg/l 2,4-D, 20 g/l sakkaroz, 7 g/l agar içeren MS ortamında 14 gün süreyle, karanlıkta ve 25±1 °C'de kültüre almışlardır. Rejenerasyon için hormonsuz MS ortamında 30 gün süreyle 16 saatlik fotoperiyotta ve 25±1 °C'de tutularak sürgün gelişimi incelenmiştir.

Buğday hücre kültüründe 2,4-D yerine dikambanın (3,6-diklorobenzoik asit) kullanılabileceği ilk olarak Dutis et al. (1975) tarafından bildirilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda kallus oluşumunda dikambanın 2,4-D'den üstün olduğu kaydedilmiştir (Bhaieldin et al. 2000). Papenfuss and Carmen (1987), olgunlaşmamış embriyodan kallus oluşturmak için ortamda dikamba kullanıldığında meydana gelen kalluslardan rejeneren bitki sayısının 2,4-D'den fazla olduğunu ve dikambanın metabolizma

tarafından daha hızlı kullanıldığı için sürgün oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. Buna karşın, Redway et al. (1990), dikamba ve 2,4-D arasında herhangi bir fark olmadığını kaydetmişlerdir.

Zhou and Lee (1983), "Chinese spring" ve "Frederick" buğday çeşitlerinde 2,4-D ve diğer 12 oksin tipinin olgun embriyodan kallus oluşum oranına etkisini araştırmışlardır. Yazlık "Chinese spring" buğday çeşidinde kallus gelişimi üzerine 2,4-D ve dikambanın pikloramdan (4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit) daha üstün olduğu, buna karşın kışlık "Frederick" buğday çeşidinde dikambanın ve pikloramın kallus gelişimi üzerine etkisinin 2,4-D'ye eşit olduğu belirlenmiştir.

Mendoza and Kaepler (2002), Bobwhite buğday çeşidinin olgun embriyolarında 4 oksin tipinin [2,4-D, dikamba, pikloram, ve 2-MCPP (2-(2-metil-4-klorofenoksi) propionik asit)] 4,5; 9,0 ve 18,0 µM miktarlarını ve iki farklı şekerin (maltoz ve sakkaroz) farklı sterilizasyonlarının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine olan etkilerini araştırmıştır. Bitki rejenerasyon ortamında bitki büyüme düzenleyicileri olarak ise 0,1 mg/l oksin (kallus oluşumunda kullanılan oksin tipine göre) ve 0,5 mg/l BAP kullanılmıştır. Çalışma sonucunda kallus oluşumuna oksin tipinin ve dozunun etkisinin çok önemli olduğunu belirlemişlerdir. 2-MCPP hariç diğer oksinlerde kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Pikloram ve dikamba konsantrasyonunun artması kallus taze ağırlığını artırmış, buna karşın 2,4-D konsantrasyonunun artması azaltmıştır. Yine, aynı çalışmada en yüksek rejenerasyon oranının 18 µM (4 mg/l) dikamba içeren ve filtre sterilizasyonu yapılan sakkaroz içeren ortamda gözlemlenmiştir.

Yazlık ve kışlık buğday genotiplerinin olgun embriyolarından embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu üzerine farklı faktörlerin etkilerini araştıran Filippov et al. (2006), olgun embriyoları 3 farklı oksin tipinin [2,4-D, 2,4,5-T (2,4,5-Triklorofenoksi asetik asit) ve dikamba] 5 farklı dozunu (6, 8, 10, 12 ve 14 mg/l) içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda, embriyogenik kallus oluşumu bakımından dikambanın en iyi olduğunu ve en yüksek

bitki rejenerasyonunun 12 mg/l dikamba içeren MS ortamında meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Zale et al. (2004), buğdayda eksplant kaynağı olarak endospermsiz olgun embriyoları iki eşit parçaya bölmüşler ve kallus oluşumu için 30 g/l maltoz, 0,25 g/l *myo*-inositol, 1 mg/l tiamin-HCl, 1 g/l kazein hidrolizat, 2,5 mg/l dikamba ve 0,69 g/l L-prolin ve 3,5 g/l phytigel içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Kallus oluşum ortamında 54 gün süreyle karanlıkta tutularak her 15 günde bir yeni benzer ortama aktarılmıştır. 54 gün sonunda meydana gelen kalluslar 0,1 mg/l BAP içeren kallus oluşum ortamına aktarılarak 16 saat ışık koşullarında 14 gün süreyle bekletildikten sonra sürgün gelişimi için 62 g/l maltoz, 0,1 g/l *myo*-inositol, 0,4 g/l tiamin-HCl, 1 g/l kazein hidrolizat, 1 mg/l BAP, 0,75 g/l L-glutamin ve 3,5 g/l phytigel içeren MS ortamında kültüre alınmıştır.

Embriyogenesis oluşumunu teşvik etmek için NAA, pikloram ve dikamba gibi oksinler de tek başlarına veya 2,4-D ile birlikte kullanılmaktadırlar. Nitekim, Turhan and Baser (2004) endosperm destekli ve endospermsiz olgun embriyoları MS (kontrol), 8 mg/l 2,4-D, 2 mg/l NAA, 4 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA ve 4 mg/l 2,4-D + 2 mg/l NAA içeren 5 farklı MS ortamında kültüre almışlardır. En yüksek kallus oluşumunun 4 mg/l 2,4-D + 1 mg/l NAA içeren ortamda endosperm desteksiz olgun embriyoda meydana geldiğini saptamışlardır. Yine, aynı çalışmada en yüksek embriyogenik kallus oluşumunun endospermsiz olgun embriyoda gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Bi et al. (2007), otuz bir buğday genotipinin olgun embriyolarını kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l NAA, 500 mg/l kazein hidrolizat, 200 mg/l glutamin, 150 mg/l asparajin ve 30 g/l sakkaroz içeren MS ortamında kültüre almışlar, Daha sonra bu ortamda oluşan kallusları rejenerasyon için 5 mg/l kinetin içeren MS ortamına, kök oluşumu için ise hormonsuz ½ MS ortamına aktarmışlardır.

Tam bir embriyo olgunlaşması ve bitki gelişimi için içsel hormon seviyesine bağlı olarak çok düşük oranlarda sitokin ve

özellikle de BAP gerekli olmaktadır (Anonymous 2003). Ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde çalışan Kintzios et al. (1996), en yüksek kallus oluşumunu 2,4-D ve kinetin içeren MS ortamında elde etmişlerdir. Yine, Doğu 88 buğday çeşidinin kullanıldığı başka bir çalışmada (Karaca ve Bürün 1997) olgun embriyoların kültüründe kallus oluşumu için dört farklı ortam denenmiştir. Bu ortamlar MS tuzlarına ilave olarak, 2 mg/l 2,4-D; 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin; 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin + 1 mg/l NAA; 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin + 1 mg/l NAA + 150mg/l asparajin içermektedir. En yüksek kallus oluşumunun 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında gözlemlendiği kaydedilmiştir. Araştırmacılar kallus ağırlığı bakımından olgun embriyoların daha iyi sonuç verdiğini ve en yüksek kallus ağırlığının 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin içeren MS ortamında meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Besin ortamlarında bulunan mineral maddeler ve vitaminler diğer bir önemli öğedir. MS temel besin ortamı embriyogenesis çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Özcan ve ark. 2001). Bunun dışında B5 ve N6 (Chu et al. 1975) ortamları da birçok bitki türünde başarılı sonuç vermiştir. Nitekim, Rashid et al. (2002), 'Chakwal 86' ve 'Rawal 87' buğday genotiplerinin olgun embriyolarında kallus oluşumu ve rejenerasyon için ortamın, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve genotipin etkisini araştırmışlardır. Kallus oluşumu için MS ve N6 (ortamlarını kullanmıştır. Her iki ortamda 2 mg/l 2,4-D'yi tek başına veya BAP'ın 3 farklı miktarıyla (0,1; 0,5 ve 1,0 mg/l) birlikte kullanmışlardır. Kallus oluşumunda N6 ortamının (%73,50) MS ortamından (%61,9) daha iyi olduğunu kaydetmişlerdir. Kallus oluşum frekansı Rawal 87 çeşidinde MS ortamında %58,64 iken, N6 ortamında %79,9; Chakwal 86 genotipinde ise MS ortamında %63,4 iken N6 ortamında %67,11 olmuştur. Büyüme düzenleyicisi olan BAP'ın kallus oluşum oranına etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonu için MS + 1 mg/l IAA (İndol-3-asetik asit) ortamına ilave olarak BAP'ın 4 farklı

miktarı (0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0 mg/l) test edilmiştir. Rejenerasyon frekansı Rawal 87 genotipinde 0,5 mg/l BAP içeren ortamda en yüksek (%31,9) olurken, Chakwal 86 genotipinde 2,5 mg/l BAP içeren ortamda en yüksek (%15,27) olmuştur.

Li et al. (2003), mineral olarak MS tuzlarını, vitamin olarak ise B5 vitaminini kullanmışlardır. Araştırmacılar, on yıllık buğday genotipinin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyo kültüründe, olgunlaşmış embriyo kültürü için yüzey sterilizasyonu yaptıkları tohumları 25±1°C'de 1/2 MB ortamında (B5 vitamini + 2 mg/l glisin, 300 mg/l glutamin + 500 mg/l kazein hidrolizat + %3 sakkaroz + %0,7 agar + MS tuzları) 20-24 saat çimlendirdikten sonra aseptik koşullarda olgunlaşmış embriyoları elde etmişlerdir. Olgunlaşmış buğday embriyolarını olgunlaşmamış embriyolar için kullandıkları 2 mg/l 2,4-D içeren MB ortamında kültüre almışlardır. Meydana gelen kalluslar bitki rejenerasyonu için TDZ [1- Fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) üre] içeren MB ortamına aktarmışlardır. Yine Jia et al. (2007), buğdayın doku kültürüne cevabını belirleyen kantatif özellik lokuslarını tespit etmek amacıyla doku kültürüne cevabı iyi olan Nanda 2419 genotipi ile Wangshuibai melezlerinden oluşan rekombinant kendilenmiş hatların olgun embriyolarını, kallus oluşumu için MB ortamına (MS tuzları+ B5 vitaminleri) ilave olarak 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l ABA (Absisik asit) ve 40 g/l sakkaroz içeren ortamda, oda sıcaklığında ve karanlıkta kültüre almışlardır. Meydana gelen kalluslar 30 gün sonra 2 mg/l 2,4-D + 0,01 mg/l BAP ve 30 g/l sakkaroz içeren ortamda 30 gün süreyle alt kültüre alınmışlar, daha sonra rejenerasyon için 1 mg/l BAP, 2 mg/l kazein hidrolizat, 2 mg/l glutamin içeren MS ortamına konulmuştur.

Absisik asitin doku kültüründeki rolü henüz tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, somatik embriyoların olgunlaşmasında kullanılmaktadır. Ortama absisik asit ilavesinin anormal embriyo gelişimini engellendiği belirtilmektedir (Özcan ve ark. 2001).

Beş buğday genotipinin (Tabasi, Bolani, Shiraz, Shoaleh ve Azar) ve ABA'nın farklı

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

Kallus oluşumu için kullanılan 2,4-D, NAA ve IAA gibi oksinler ile zeatin, kinetin ve BAP gibi sitokinler kalluslardan bitki rejenerasyonu için kullanılmaktadır (Bhaskaran ve Smith 1990). En yaygın kullanılan sitokinler BAP, kinetin, zeatin ve TDZ'dir (Bhojwani and Razdan 1996). Bitki doku kültüründe ve çeşitli büyüme olaylarında hücre bölünmesini artırıcı bir faktör olan sitokinin (Marcinska et al. 2001) proembriyogenik yapıların gelişim oranını artırmaktadır (Ge et al. 2006). Embriyogenik kallus oluşumu için genellikle yüksek oksin/sitokin oranı kullanılırken, bitki rejenerasyonu için düşük oksin/sitokin oranı kullanılmaktadır (Ge et al. 2006).

Buğdayda sürgün rejenerasyonunda sitokin yüksek seviyeleri düşük seviyedeki oksin ile ya da oksinsiz olarak kullanılmaktadır (Jones 2005). Elena and Ginzo (1988), biri hibrit olmak üzere 10 buğday genotipinin skutellumlarından ayrılan olgun embriyolarından kallus oluşturmuşlardır. Meydana gelen kallusları oksin miktarı düşük ortama aktardıklarında kalluslardan sadece sürgünlerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Yine, Elena and Ginzo (1988) oksin miktarının azaltılmasının sürgün rejenerasyonunda etkili olduğunu belirlemişlerdir. Nitekim, Chawla and Wenzel (1987), sürgün rejenerasyonunun hormonsuz ortamda ya da 2,4-D'nin düşük

konsantrasyonlarında IAA ve BAP içeren ortamlardan daha iyi olduğunu kaydetmişlerdir. Bir başka çalışmada, Varshney et al. (1999), 17 ekmeçlik ve 3 makarnalık buğday genotipinin olgun embriyo kültüründe kalluslardan bitki rejenerasyonu için 0,2 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamını kullanmışlardır.

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

Sonuç

Buğdayda, genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılarak gen aktarımında önemli bir adım olan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında başarının büyük ölçüde genotipe bağlıdır ve hatta etki eden faktörler arasında en önemlisidir.

Eksplant alınacak bitkinin yetiştirme koşulları kallus oluşumunu ve bitki rejenerasyonunu etkileyen diğer bir faktördür. Bu nedenle eksplant kaynaklarının elde edileceği bitkilerin optimum şartlarda yetiştirilmesi gerekmektedir.

Olgun embriyo kültüründe temel besi ortamı olarak MS tuzları ve vitaminleri kullanılmaktadır. Ancak bazı çalışmalarda tuz olarak MS tuzları, vitamin olarak ise B5 vitaminlerinin kullanıldığı görülmektedir. MS ortamı ile N6 ortamının karşılaştırıldığı bir çalışmada ise N6 ortamının MS ortamına göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. Konu ile ilgili kaynaklardan elde edilen veriler dikkate alındığında, olgun embriyo kültüründe temel besi ortamı olarak MS ortamının kullanılması önerilebilir.

Bitki doku kültüründe bitki büyüme düzenleyicileri önemli bir yere sahiptir. Olgun embriyo kültüründe kallus oluşumu için en fazla kullanılan bitki büyüme

düzenleyicileri oksinlerdir. Buğday olgun embriyo kültüründe kallus oluşumu için 2,4-D, dikamba, pikloram ve NAA gibi oksinler kullanılmakta olup, bunlardan en yaygın kullanılanı 2,4-D'dir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda dikamba'nın kallus oluşumunda ve bitki rejenerasyonunda 2,4-D'ye göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle yapılacak çalışmalarda iyi bir bitki rejenerasyonu için kallus oluşum aşamasında oksin tipi olarak dikambanın kullanılması önerilebilir.

Etkili bir bitki rejenerasyonu için kallus oluşum ortamında kullanılacak oksin dozu, olgun embriyonun endosperm desteksiz veya endosperm destekli olmasına göre değişmektedir. Endosperm desteksiz olgun embriyo kullanıldığında kallus oluşumu için genellikle 2-4 mg/l dozları yaygın olarak kullanılmasına rağmen endosperm destekli olgun embriyo kültürlerinde 8-12 mg/l seviyelerine kadar çıkmaktadır.

Sitokininler buğday olgun embriyo kültüründe kallus oluşum ortamında fazla kullanılmamakla birlikte BAP, TDZ ve kinetin gibi sitokininlerin bitki rejenerasyon aşamasında düşük dozdaki oksinlerle birlikte veya tek başlarına 0,5-1,5mg/l dozlarda kullanılmaktadır.

Kaynaklar

- Ahmet, H. ve Adak, M.S. 2007. Irakta yetiştirilen bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. Tarım Bilimleri Dergisi, 13(3), 285-292.
- Altıntaş, S., Hatipoğlu R., Genç, İ. 2005. Donor bitkilerin yetiştirme koşulları ve anterlere farklı sürelerle soğuk uygulamasının ekmeklik buğdayda haploid bitki rejenerasyonuna etkileri üzerinde bir araştırma. Türkiye VI. Tarla bitkileri kongresi, Antalya.
- Anonymous, 2003. Plant tissue culture. <http://www.oup.com/uk/orc/bin/9780199254682/ch02.pdf> (25.05.2006).
- Bahieldin, A., W. E. Dyer and R. Qu, 2000. Concentration effects of dikamba on shoot regeneration in wheat. Plant Breeding, 119, 437-439.
- Bhaskaran, S. and Smith, R. H. 1990.

Regeneration in cereal tissue culture: a review. Crop science, 20, 1328-1336.

- Bhojwani, S. S. and Razdan M. K. 1996. Tissue culture. Plant tissue culture: Theory and practice, a revised edition. Elsevier science, 39-62p, Amsterdam, Netherlands.
- Bi, R.M., Kou, M., Chen, L.G. Mao S.R. and Wang, H.G. 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. Plant breeding, 126 (9), 9-12.
- Bregitzer, P. 1992. Plant regeneration and callus type in barley: Effect of genotype and culture medium. Crop Science, 32, 1108-1112.
- Carman, J. G. 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. In vitro Cell Dev. Biol., 26, 746-753.
- Chawla, H. S. and Wenzel, G. 1987. Regeneration potential of callus from wheat and barley. Archiv fur Zuchtungsforschung, 17 (6), 337-343.
- Dudits, D., Nemet, G. and Haydu, Z. 1975. Studies of callus growth and organ formation in wheat tissue cultures. Can. J. Bot., 53, 957-963.
- Elena, B. E. and Ginzo, H. D. 1988. Effect of auxin levels on shoot formation with different embryo tissues from a cultivar and a commercial hybrid of wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Plant Physiol., 132, 600-603.
- Fazelienasab, B., M. Omid And Amiritokaldani, M. 2004. Effects of abscisic acid on callus induction and regeneration of different wheat cultivars to mature embryo culture. www.bcpc.org/Seminars2004 (25.05.2006)
- Felsenburg, T., M. Feldman and Galun, E. 1987. Aneuploid and alloplasmic lines as tools for the study of nuclear and cytoplasmic control of culture ability and regeneration of scutellar calli from common wheat. Theor. Appl. Genet., 74, 802-810.
- Fennel, S., Bohorova, N., Ginkel, M., Crossa J. and A Hoisington, D. 1996. Plant regeneration from immature

- embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. *Theor Appl Genet.*, 92, 163–169.
- Filippov, M., Miroshnichenko, D., Vernikovskaya, D. and Dolgov, S. 2006. The effect of auxin and exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 84, 213-222.
- Galiba, G., Kovacs, G. and Sutka J. 1986. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breeding*, 97, 261–263.
- Ge, X., Chu, Z. and Lin Y. 2006. A tissue culture system for different germplasm of India rice. *Plant Cell. Report*, 25,392-402.
- Haliloglu, K. and Baenzinger, P.S. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated wheat transformation. *Cereal Research Communications*, 31(1-2),9-16.
- Henry, Y. and De Buyser, J. 1985. Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.*, 4, 307–310.
- Hess, J. R. and Carman, J. G 1998. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment and endogenous hormone levels. *Crop Science*, 38, 249–253.
- Higgins, P. and Mathias, R. J. 1987. The effect of the 4B chromosomes of hexaploid wheat on the growth and regeneration of callus cultures. *Theor. Appl. Genet.* 74: 439–444.
- Jia, H., Yi, D., Yu, J., Xue, S., Xiang, Y., Zhang, C., Zhang, Z. Zhang L. and Ma, Z. 2007. Mapping QTLs for tissue culture response of mature wheat embryos. *Mol. Cell.*, 23 (3), 323-330.
- Jones, H. D., 2005. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *Journal of Cereal Science* 41, 137–147.
- Kaleikau, E. K., Sears, R. G. and Gill, B.S. 1989. Control of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 78, 783–787.
- Karaca, Ö. ve Bürün, B. 1999. Buğdayda embriyo kültüründen kallus oluşumu. *Tr. J. Of agriculture and Forestry*, 23 (2), 269–274.
- Kintzios, S. E., Trantafyllou, M. and Drossopoulos, J. 1996. Effect of genotype and different growth regulator treatments on callus induction, proliferation and plant regeneration from mature wheat embryos. *Cereal Research communications*, 24(2),147-153.
- Langridge, P., Lazeri, P. and Lörz, H. 1991. A segment of rye chromosome 1 enhances growth and embryogenesis of calli derived from immature embryos of wheat. *Plant Cell Rep.*, 10, 148–151.
- Li, W., Ding, C. H., Hu, Z., Lu, W. and Guo, G. Q. 2003. Relationship between tissue culture and agronomic traits of spring wheat. *Plant science*, 164, 1079-1085
- Marcinska, I., M. Filek, J. Biesagakoscielniale, F. Sagi and T. Bortek, 2001. Cytokinin activities cells of wheat inflorescence in dependence of its developmental stage. *Cellular and Molecular Biology Letters*,6, 313-318.
- Mathias, R. J. and Fukui, K., 1986. The effect of specific chromosome and cytoplasm substitutions on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus. *Theor. Appl. Genet.*, 71, 797–800.
- Mathias, R. J. and Simpson, E. S. 1986. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. thell) callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 7, 31–37
- Mc Kinnon, C., Gunderson, G. and Nabors, M.W. 1987. High efficiency plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature wheat embryo explants of bread wheat (*Triticum aestivum*) and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 23, 443–448.
- Mendoza, M. G. and Kaeppler, H. F. 2002.

- Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of Wheat (*Triticum aestivum*). In vitro Cell. Dev. Biol.-plant 38: 39-45.
- Ozias-Akins P. and Vasil, I.K. 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): evidence for somatic embryogenesis. Protoplasma, 110, 95–105
- Ozias-Akins P. and Vasil, I.K. 1983a. Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat). Protoplasma 117: 40–44
- Ozias-Akins P. and Vasil, I.K. 1983b. Callus induction and growth from the mature embryo of wheat. Protoplasma, 115, 104–113.
- Özcan, S. ve Özgen, M. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği. Kükem Dergisi. s: 69-95.
- Özcan, S., Babaoğlu, M. ve Sancak, C. 2001. Somatik embriyogenesis. Bitki Biyoteknolojisi I, Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., S. Ü. Basımevi, 71-88s., Konya.
- Özgen M., Türet, M., Özcan, S. and Sancak, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. Plant Breed., 115, 455–458.
- Özgen, M., Türet, M., Altınok, S., Sancak, C. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat genotypes. Plant Cell reports, 18, 331-335.
- Özgen, M., Türet M., and Avcı M., 2001. Cytoplasmic effects on the tissue culture response of callus from winter wheat mature embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 64, 81–84.
- Papenfuss, J. M. and Carman J. G., 1987. Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin. Crop Science, 27, 588–593.
- Patnaik, D. and Khurana, P. 2003. Genetic transformation of indian bread (*Triticum aestivum*) and pasta (*Triticum durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-driven calli. BMC plant biology, 3(5), 1-11.
- Patnaik, D., Vishnudason, D. and Khurana, P. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. Current science, 91(3), 307-317.
- Peng, J. and Hodges, T. K. 1989. Genetic analysis of plant regeneration in rice. In vitro Cell Dev. Biol., 25, 91-94.
- Rashid, H., Ghani, R. A. and Chaudhry, Z. 2002. Effect of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). Biotechnology, 1 (1): 49-54.
- Redway, F. A., Vasil, V., Lu D. and Vasil, I. K. 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet, 79, 609–617.
- Rode, A., Hartman C., De Buyser, J. and Henry Y., 1998. Evidence for a direct relationship between mitochondrial genome organization and regeneration ability in hexaploid wheat somatic tissue cultures. Curr. Genet., 14, 387-394.
- Sarker, R.H. and Biswas, A. 2002. *In vitro* plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Tissue Cult., 12 (2), 155-165.
- Şehirali, S. ve Özgen, M. 1998. Bitki ıslahı, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi yayınları: 1059; Ders kitabı: 310. Ankara Üniv. Basımevi, Ankara, s261.
- Varshney, A., Jain, S. and Kothari, S. L. 1999. Plant regeneration from mature embryos of 20 cultivars of wheat. Cereal Research Communications, 27 (1-2), 163-170.
- Viertel, K. and Hess, D. 1996. Shoot tips as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 44, 183–188;
- Willman, M.R., Scroll S.M. and Hodges, T.K. 1989. Inheritance of somatic

- embryogenesis and plantlet regeneration from primary callus in maize. *In vitro cell. Dev. Biol.*,25,95-100.
- Zale, M. J., Borchardt-Wier H., Kidwell K. K. and Steber, C.M. 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant cell, Tissue organ culture*, 76, 227-281.
- Zhou, M. D. and Lee, T. T. 1983. Selectivity of auxin for induction and growth of callus from embryos of spring and winter wheat. *Can. J. Bot.*, 62, 1393–1397.
- Turhan, H. and Baser, I. 2004. Callus Induction from Mature Embryo of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*, 3 (1), 17-19.