ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KIŞLIK BUĞDAYIN (*Triticum* sp.) *IN VITRO* KOŞULLARDA VERNALİZASYONU

Halide ACAR

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2006

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

KIŞLIK BUĞDAYIN *(Triticum* sp.*) IN VITRO* KOŞULLARDA VERNALİZASYONU

Halide ACAR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN

Bu çalışmada, Türkiye florasında genetik materyal olarak ve yetiştiricilik açısından önem taşıyan makarnalık Çakmak-79 (*Triticum durum* Desf.) ve ekmeklik Gerek-79 (*Triticum aestivum* L.) buğday çeşitleri kullanılmıştır. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü biyoteknoloji laboratuvarı, seraları ve deneme parsellerinde gerçekleştirilen bu araştırmada, kullanılan çeşitlerde kallus ve rejenere bitkicik aşamasında *in vitro* vernalizasyonun sağlanma potansiyelleri belirlenmeye çalışılmıştır.

8 farklı vernalizasyon aralığının (K, 2, 4, 6, 10, 12 ve 15 hafta), 2 farklı gelişim aşamasında (kallus ve rejenere bitkicik) uygulamasından elde edilen sonuçlardan, her iki çeşidin de incelenen kültür özelliklerine farklı tepkiler verdiğini; ancak, her iki uygulama ve çeşit için de 6 ve 8 haftalık vernalizasyonun, en uygun venalizasyon süresi olduğu belirlenmiştir. Başaklı bitkiler ve tohumlar elde edilmesi, çalışmanın en önemli sonuçlarından biridir. Bu sonuç, aynı konuda yapılan benzer çalışmalara kıyasla, kullanılan genotiplerin biyoteknolojik çalışmalara uygunluğunu ve uygulanan yöntemin başarısını ortaya koymaktadır. Böylelikle, özellikle serin iklim tahıllarında *in vitro* çalışmalarda transgenik bitkilerin elde edilmesinde karşılaşılan vernalizasyon sorununun bu çalışmada uygulanan yöntem ile giderilebileceği belirlenmiştir.

2006, 76 sayfa

Anahtar Kelimeler: Buğday, vernalizasyon, *in vitro*, olgun embriyo, kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

IN VITRO VERNALIZATION OF WINTER WHEAT (*Triticum* sp.)

Halide ACAR

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

Supervisor: Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN

In this study, durum wheat genotype Çakmak-79 (*Triticum durum* Desf.) and common wheat genotype Gerek-79 (*Triticum aestivum* L.), which are highly important as genetic material and for the production in the flora of Turkey, are used. In the study carried out at the University of Ankara, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Field Crops, biotechnology laboratories, greenhouses and experimental fields, *in vitro* vernalization potentials of the fore-mentioned genotypes in the callus and regenerated plant phases are tried to be determined.

The results obtained from the application of 8 different vernalization intervals in 2 different development stages, it is concluded that both genotypes have reacted differently to the examined culture features; but it is also determined that the most proper vernalization duration for both of the applications and genotypes are 6 and 8 weeks. One of the most important results of the study is the production of the plants with spikes and grains. Compared with similar studies, this results shows the genotypes used are suitable for biotechnological studies and the success of the method used. Therefore, with the method applied in this study, it's determined that getting rid of the vernalization problem faced during the production process of transgenic plants in *in vitro* studies of the winter cereals is possible.

2006, 76 pages

Keywords: Wheat, vernalization, *in vitro*, mature embryo, callus induction, plant regeneration.

TEŞEKKÜR

"Kışlık buğdayın *(Triticum* sp.*) in vitro* koşullarda vernalizasyonu" konulu araştırmayı doktora tezi olarak veren ve lisansüstü öğrenimim süresince çalışmalarımı yönlendiren danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. A. Murat ÖZGEN'e; Tez İzleme Komitesi Üyeleri değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Sait ADAK ve Sayın Doç. Dr. Sertaç ÖNDE'ye; tüm akademik çalışmalarım süresince desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Günal AKBAY'a; uzun bir çalışma döneminin eseri olan tezimin her aşamasında yardımlarını gördüğüm değerli hocam Sayın Doç. Dr. Melahat AVCI BİRSİN'e; hayatım boyunca bana her yönden destek olan annem, babam ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

Halide ACAR
Ankara, Haziran 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **9**
3. MATERYAL ve YÖNTEM **25**
3.1 Materyal **25**
3.2 Yöntem **26**
3.2.1 Eksplant hazırlığı **26**
3.2.2 Yüzey sterilizasyonu **26**
3.2.3 Ortam hazırlığı **28**
3.2.4 Kallus oluşumu **30**
3.2.5 Kallus gelişimi **31**
3.2.6 Kallus vernalizasyonu **31**
3.2.7 Rejenerasyon **31**
3.2.8 Rejenere bitki vernalizasyonu **32**
3.2.9 Bitkilerin yetiştirilmesi **36**
3.2.10 Sera aşaması **36**
3.2.11 Fotoğraf çekimleri **37**
3.2.12 Verilerin elde edilmesi **37**
3.2.13 Verilerin değerlendirilmesi **38**
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **39**
4.1 Çakmak-79 Çeşidinin Kallus Aşamasındaki Vernalizasyona Tepkileri **40**
4.2 Gerek-79 Çeşidinin Kallus Aşamasındaki Vernalizasyona Tepkileri **44**
4.3 Çakmak-79 Çeşidinin Rejenere Bitkicik Vernalizasyonuna Tepkileri **47**
4.4 Gerek-79 Çeşidinin Rejenere Bitkicik Vernalizasyonuna Tepkileri **51**
4.5 Farklı Vernalizasyon Uygulamalarında Kültür Tepkileri Arası İlişkiler **54**
4.6 Çakmak-79 ve Gerek-79 Çeşitlerinde Kallus ve Rejenere Bitkicik Vernalizasyonu Uygulamalarından Elde Edilen Kallus Kültürlerinde Farklı Karakterler Arası İlişkiler **56**
5. SONUÇ **67**
KAYNAKLAR **70**
ÖZGEÇMİŞ **76**

SİMGELER DİZİNİ

AÖF	Asgari Önemli Fark
2,4D	2,4 Diklorophenoksiasetik asit
5CS	Cheng ve Smith Besi Ortamı
B	Blaydes Besi Ortamı
BAP	6-aminopürin
BBS	Başaklı bitki sayısı
B5	Gamborg Temel Besi Ortamı
°C	Celcius
CC	Potrykus Besi Ortamı
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
dm^3	Desimetreküp
DNA	Deoksiribonükleik asit
EBKA	Embriyo başına kallus ağırlığı
GA_3	Giberellik asit
GUS	β-glucuronidaz
KA	Kallus ağırlığı
kDa	Kilodalton
KE	Kültür etkisi
kg	Kilogram
KO	Kareler ortalaması
L	Litre
mg	Miligram
mm	Milimetre
µM	Mikromol
mRNA	mesajcı RNA
MS	Murashige ve Skoog Besi Ortamı
N	Norstog Besi Yeri
NAA	Naftalenasetik asit

PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Psi	pounds per square inch (basınç birimi)
RK	Rejenerasyon kapasitesi
RNA	Ribonükleik asit
SABS	Saksıya alınan bitki sayısı
SD	Serbestlik derecesi
Sec	saniye
SH	Shenk ve Hildebrandt Besi Ortamı
VK	Varyasyon kaynağı
X-Gluc	5-bromo 4-kloro 3-indolyl β-D-glukuronik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Çakmak-79 ve Gerek-79 çeşitlerinde endosperm destekli olgun embriyolarda kallus oluşumu yöntemiyle elde edilen kalluslar.....40

Şekil 4.2 Çakmak-79 çeşidinde kallus vernalizasyonu uygulamasında 8 hafta boyunca soğuk uygulanan kalluslar.....43

Şekil 4.3 Gerek-79 çeşidinde 6 hafta vernalizasyon uygulanmış kalluslarda rejenerasyon başlangıcı.....46

Şekil 4.4 Çakmak-79 çeşidinde 8 hafta boyunca vernalize edilmiş rejenere bitkicikler toprağa aktarılmadan önce.....49

Şekil 4.5 Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulamasında 4 (a), 6 (b), 8 (c), 10 (d) ve 15 hafta (e) vernalize edilmiş iklim odası aşamasındaki bitkicikler.....50

Şekil 4.6 Gerek-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulamasında 12 (a) ve 6 (c) hafta vernalize edilmiş kültürler ile kontrol (b) bitkisi iklim odası aşamasında.....53

Şekil 4.7 Çakmak-79 çeşidinde kallus ve rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulamasından elde edilen başaklar.....58

Şekil 4.8 Gerek-79 çeşidinde kallus ve rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulamasından elde edilen başaklar.....62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 MS ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları.....29

Çizelge 3.2 Rejenere bitkilerde vernalizasyon uygulanan dönemde Ankara'da en düşük ve en yüksek sıcaklıklar.....34

Çizelge 4.1 Çakmak-79 çeşidinde kallus vernalizasyonuna ilişkin varyans analizi sonuçları (Kareler Ortalaması).....41

Çizelge 4.2 Çakmak-79 çeşidinde kallus vernalizasyonuna ilişkin kültür tepkileri.....42

Çizelge 4.3 Gerek-79 çeşidinde kallus vernalizasyonuna ilişkin varyans analizi sonuçları (Kareler Ortalaması).....44

Çizelge 4.4 Gerek-79 çeşidinde kallus vernalizasyonuna ilişkin kültür tepkileri.....45

Çizelge 4.5 Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkiciklerde vernalizasyona ilişkin varyans analizi sonuçları (Kareler Ortalaması).....47

Çizelge 4.6 Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkiciklerde vernalizasyona ilişkin kültür tepkileri.....48

Çizelge 4.7 Gerek-79 çeşidinde rejenere bitkiciklerde vernalizasyona ilişkin varyans analizi sonuçları (Kareler Ortalaması) 51

Çizelge 4.8 Gerek-79 çeşidinde rejenere bitkiciklerde vernalizasyona ilişkin kültür tepkileri.....52

Çizelge 4.9 Kallus vernalizasyonu ve rejenere bitkicik vernalizasyonuna farklı çeşitlerin (Çakmak-79 ve Gerek-79) etkisine ilişkin χ^2 değerleri.....54

Çizelge 4.10 Farklı çeşitlerde (Çakmak-79 ve Gerek-79) kültür tepkilerine vernalizasyon uygulamalarının (kallus ve rejenere bitkicik) etkisine ilişkin $\chi 2$ değerleri.....55

Çizelge 4.11 Çakmak-79 çeşidinde kallus vernalizasyonundan elde edilen kültürlerde farklı karakterler arası ilişkiler.....57

Çizelge 4.12 Gerek-79 çeşidinde kallus vernalizasyonundan elde edilen kültürlerde farklı karakterler arası ilişkiler.....60

Çizelge 4.13 Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonundan elde edilen kültürlerde farklı karakterler arası ilişkiler.....63

Çizelge 4.14 Gerek-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonundan elde edilen kültürlerde farklı karakterler arası ilişkiler.....66

1. GİRİŞ

Günümüzde yaklaşık 250.000 bitki türünden, 3.000 kadarı kullanılmakta olup, sadece 150 türün düzenli olarak kültürü yapılmaktadır. Buğdaygiller (*Gramineae/Poaceae*) familyasından olan tahıllar da ilk kültüre alınan bitkilerdendir ve yeryüzünde ekilişi ve üretimi en yüksek ürün grubunu oluştururlar. Tahıllar grubunda yer alan buğday (*Triticum*), arpa (*Hordeum*), çavdar (*Secale*), yulaf (*Avena*), tritikale (*Triticosecale Wittmack*), mısır (*Zea*), çeltik (*Oryza*), darılar (*Sorghum, Panicum, Seteria*) ve kuşyeminden (*Phalaris*) ilk dördü "Serin İklim Tahılları"; diğerleri ise "Sıcak İklim Tahılları" adı altında toplanmaktadır (Kün 1988).

Tahıllar, dünyada insanların harcadıkları günlük kalorinin %50'den fazlasını karşılayan temel ürünlerdir. Yeryüzünün 1.4 milyar hektar olan işlenen alanlarının yarısında tahıl üretimi yapılmaktadır. Kurak ve yarı kurak bölgelerdeki nadas alanlarının da büyük çapta tahıllar için boş bırakıldığı göz önüne alındığında, dünya tarım alanlarının büyük çoğunlukla tahıl üretimine ayrılmış olduğu açıkça görülmektedir.

Serin İklim Tahılları içerisinde bulunan buğday, insan beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri arasında dünyada ekiliş ve üretim bakımından ilk sıralarda yer alır. 2005 yılı verilerine göre Dünyadaki üretimi 626 milyon ton, ekilişi 216 milyon ha olup, verimi 289 kg/da'dır. Türkiye'de ise üretim miktarı 21 milyon ton ve ekiliş alanı 9,3 milyon ha olup, 225 kg/da verime sahiptir (Anonymous 2006).

Tahıllar, özellikle bir hasat döneminden diğerine kadar depolanmalarının kolaylığı ve basit bir uygulama ile pek çok kültürde temel yiyecek olarak kullanılan ekmeğin hazırlanma kolaylığı nedenleriyle tarih boyunca hep tercih nedeni olmuş ve geniş alanlarda yetiştirilmiştir (Şehirali ve Özgen 2002).

Ülkelerin beslenmelerinde buğdaya bağlılıkları, coğrafi konumlarına göre değişmekle birlikte, buğday tanesinin uygun besleme değeri; taşıma, saklama ve işlenmesindeki kolaylık ile bitkisinin geniş adaptasyon sınırları, buğday yetiştiriciliğinin çok yaygın olarak yapılmasını sağlamaktadır.

Buğday bitkisinin taşıdığı önem nedeniyle gerek duyulan üretim artışı ekim alanlarının artırılmasıyla sağlansa da, zaman içerisinde en üst düzeylere ulaşan ekim alanlarından elde edilen ürün miktarı, artan nüfus karşısında yetersiz kalmış ve araştırıcıları, verimin artırılması yoluyla üretimin artırılmasına yöneltmiştir. Verim artışı, yetiştiriciler tarafından uygulanan tarım tekniklerinin geliştirilmesiyle bir miktar sağlanabilse de, esas olan bitkinin verimini doğrudan etkileyen özelliklerinin geliştirilmesidir.

Ekonomik yönden önemli olan bitkilerde, genetik ve sitogenetik esaslardan yararlanarak bitki cins, tür ve çeşitlerinin genetik yapısını, yetiştiricinin ve tüketicinin istekleri doğrultusunda planlı bir şekilde değiştirme ve geliştirmeye bitki ıslahı denilmektedir. Bitkilerde ıslah çalışmaları temel olarak verim ve kalite artışı üzerinde yoğunlaşmaktadır. Buğday yetiştiriciliği söz konusu olduğunda ise tane veriminin artırılması ile ürünün hitap ettiği kesime göre kalite artırıcı özellikler ön plana çıkmaktadır. Buğday bitkisinde yapılan ıslah çalışmalarının geçmişi çok eski yıllara dayanmaktadır.

Islah çalışmalarında araştırıcı genellikle, doğal olarak oluşan ve genetik yapı olarak karışıklık gösteren bitki popülasyonlarından, isteğe uygun bitki tiplerini seçer. Islahçının popülasyon içinde istediği değişim yoksa, melezleme, mutasyon ve poliploidi gibi klasik ıslah yöntemlerini kullanarak yapay değişim oluşturarak yeni popülasyondan istediği bitki tipini seçmeye çalışır. Günümüzde biyoteknolojik yöntemlerin, klasik ıslah yöntemleri olarak kabul edilen tekniklere kıyasla daha kısa sürelerde sonuç verdiği bilinmektedir (Şehirali ve Özgen 2002).

Bugüne kadar klasik ıslah yöntemleri uygulanarak birçok başarılı çalışma yapılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Buğday türleri arasında kromozom sayılarındaki farklılıklara karşın başarıyla melezleme yapılarak bir çok özellik aktarılmıştır. Örneğin, buğdayın önemli hastalıklarından olan karapas (*Puccinia graminis tritici*) ve kahverengipasa (*P. recontida*) karşı tetraploid buğdayların, hekzaploidlere oranla, daha dayanıklı olduklarının belirlenmesiyle, ilk gen aktarma çalışmaları 20. yüzyılın

başlarında, bu iki ploidi düzeyindeki buğday (*T. dicoccum* X *T. durum* ve *T.dicoccum* X *T.vulgare*) arasında yapılan melezlemelerle başlamıştır.

Melezleme, klasik ıslah çalışmaları arasında en çok kullanılan yöntem olmakla birlikte, bunun da bazı sorunları ortaya çıkmıştır. Bu sorunların başında kısırlık gelmektedir. Melezlemede karşılaşılan kısırlık, kromozomlar arası sayı ve yapı farklılığı ya da sitoplazma-kromozom uyuşmazlığı gibi birçok değişik nedenden kaynaklanabilmektedir. Klasik ıslahta karşılaşılan bu tür sorunlar köprü melezlemeler, "cholchicine" uygulamaları, mutasyon, geri melezlemeler gibi yöntemlerle giderilebilmektedir.

İstenilen genlerle birlikte istenmeyen genlerin de geçmesi, melezlemede karşılaşılan önemli bir sorundur. Alıcı türe büyük ya da küçük bir kromatinin girmesi ve bunların homolog olmaması, kromozomlar arasındaki parça değişimini (crossing-over) olumsuz etkileyerek, genler arasındaki bağlılığın kırılmasını zorlaştırabilmektedir (Özgen ve Akar 1993).

Melezleme yöntemi kullanılarak yapılan ıslah çalışmalarıyla ülkemizde birçok çeşit geliştirilmiştir. Ülkemiz tarımında önemli bir yere sahip olan Çakmak 79, Gökgöl 79, Gerek 79, Haymana 79, Kıraç 66 gibi çeşitler, melezleme yöntemi kullanılarak ıslah edilen çeşitlere örnek olarak verilebilir.

Klasik ıslah yöntemlerinin kullanılmasında karşılaşılan güçlükler, araştırıcıları yeni geliştirilen yöntemleri uygulamaya yöneltmiştir. Yeni geliştirilen yöntemler günümüzde iyice yaygınlaşan biyoteknolojik teknikler olarak adlandırılmaktadır.

Biyoteknolojik yöntemleri, doku kültürü ve genetik mühendisliği olarak iki kısma ayırmak mümkündür. Doku kültürü teknikleriyle bitkilerin genetik potansiyellerinin amaca uygun yönlendirilmesi bitki ıslahı çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Doku kültüründe, bitkilerin kendilenme ya da karşı döllenme ile eşeysel olarak çoğalabilmelerinin yanı sıra, gövde, dal, yaprak gibi herhangi bir parçalarından eşeysiz

olarak da çoğalabilme (totipotensi) özelliği, onların *in vitro* koşullarda uygun besi ortamında tüm bitki şeklinde geliştirilmelerini olası hale getirmektedir.

Doku kültürü, genetik mühendisliği çalışmalarına bir taban oluşturmasının yanı sıra çoğu zaman, genetik mühendisliği uygulamalarını tamamlayıcı rolü ile yapılan uygulama sonucunda elde edilen materyali, yeni döller verebilecek hale getiren uygulamalar zincirinin ortaya konulması ve optimizasyonuyla ön plana çıkmaktadır.

Farklı bir birey ya da türden alınan DNA parçalarının başka bir birey ya da türün DNA molekülüne taşınmasıyla yapılan gen aktarımı, genetik mühendisliğinin temelini oluşturmaktadır. Daha genel bir anlatım ile, genetik mühendisliği; organizmaların genetik materyalini işleyen geniş bir dizi tekniktir. Gene aktarımında çalışılan materyal genellikle buğday, mısır ve arpa gibi buğdaygiller familyasına ait bir bitki olduğunda, doğrudan gen aktarımı yöntemleri daha çok tercih edilmektedir.

Eksplant olarak embriyo, sürgün ucu, süspansiyon kültürü, kallus, polen ve mikrosporların kullanılabildiği buğdayda, DNA'nın hücre içerisine doğrudan sokulduğu doğrudan gen aktarımında biyolistik yöntem kullanılmaktadır. Gen aktarılmış eksplantlar doku kültürü teknikleri uygulanarak 7-8 ay gibi bir sürede transgenik bitki haline getirilebilmektedir. En önemlisi de çevresel baskıların söz konusu olmadığı *in vitro* koşullarda seçmelerin kolaylıkla ve hatasız biçimde yapılabilmesidir.

Bitki kısımlarına *in vitro* koşullarda uygulanan doku kültürü yöntemleri, bitkinin en kolay üretilebilme yöntemine ya da daha önceden uygulanmış olan genetik mühendisliği tekniğine göre belirlenmektedir. Dolayısıyla, bitki doku kültürleri, vejetatif bitki üretiminin yanı sıra genetik mühendisliği teknikleri uygulanmış hücre, doku ya da organlarının tüm bitki haline getirilmesi amacıyla bitki biyoteknolojisine hizmet etmektedir. Doku kültürleri, bu şekilde bitki elde etmenin tek yolu olarak görülmektedir. Bu nedenle, gen aktarımına ilişkin çalışmalara başlamadan önce bitki türlerinin doku kültürü teknikleriyle rejenerasyon ve çoğalma potansiyellerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar buğday eksplantlarına doku kültürü teknikleri uygulanarak kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve alıştırma (aklimatizasyon) aşamalarının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini ortaya koymaktadır. Özellikle olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslarda başarının daha yüksek olduğu birçok araştırıcı tarafından belirtilmiştir (Whelan and Shaalje 1992).

Ancak, kallus oluşumu ve rejenerasyon aşamaları başarılı bir şekilde tamamlansa bile, her zaman istenilen sonuçlara ulaşmak mümkün olamamaktadır. Özellikle serin iklim tahıllarında eksplant olarak seçilen bitki dokuları tüm bitki olarak büyütülebilmekle birlikte, tohum bağlamada sorunlar yaşanmaktadır. Sorunların en önemli nedeni ise vernalizasyona gereksinim duymalarıdır. Doğada, vejetatif dönem başında, çimlenme-kardeşlenme ve sapa kalkma arasında fotosentez minimumu yakınlarındaki sıcaklıklarda belli bir süre kalarak vernalize olan bitkiler sapa kalkar ve başak verirler. Düşük sıcaklıklı bu süreyi bulamayan bitkiler ise sapa kalkmaz ve başak veremezler. "Soğuklanma" adı da verilen bu istek, serin iklim tahıllarında çok belirgin olmakla birlikte, sıcak iklim tahıllarında belirgin değildir. Sıcak iklim tahılları kısa sürede ve serin iklim tahıllarına oranla daha yüksek sıcaklıkta vernalize olurlar. Serin iklim tahıllarında vernalizasyonun istenilen düzeyde gerçekleştirilememesi durumunda tohum oluşmamaktadır.

Buğday bitkisiyle yapılan çalışmalarda uygulaması kolay ve hızlı sonuç alınabilen bir doku kültürü yöntemi kullanılsa dahi kültürün başarısı vernalizasyonun sağlanıp sağlanmamasıyla doğrudan ilgilidir.

Serin iklim tahıllarında tarlada ve kontrollü sera koşullarında yapılan çalışmalarda vernalizasyonun aynı zamanda bu grup bitkilerdeki soğuğa adaptasyonla ilgili olduğu ortaya çıkmaktadır. Vernalizasyon ve soğuğa adaptasyon araştırmaları doku kültürüyle sınırlı kalmamış, moleküler bazda da çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sırasında soğuklanma gereksinimi duyan bitkilerde düşük sıcaklık koşullarında bir çok fizyolojik parametrenin değiştiği ve soğuk uygulamasının, vernalizasyonla ilgili genlerin çalışmasını da değiştirdiği belirlenmiştir. Ayrıca bir çok bitkide düşük fakat dondurucu olmayan sıcaklıkların belirli proteinlerin ve mRNA'ların varlığını artırdığını gösteren

kanıtlar da bulunmuştur (Lu *et al.* 1992, Tan 1992, Chong *et al.* 1994). Metzger *et al.* (1990)'da benzer şekilde; vernalizasyon sırasında, bitkinin ileri dönemlerinde çiçeklenmesine ve başaklanmasına imkan verecek ısının uygulanmasıyla, ilgili genlerin parametrelerinde değişikliklerin meydana geldiğini belirtmektedir.

Moleküler çalışmalar sırasında vernalizasyon parametreleri ve genlerinin fonksiyonları üzerinde durulmuş ve soğuğa adaptasyonla olan ilişkisinin de önemli olduğu görülmüştür. Vernalizasyon ve soğuğa adaptasyon aynı ortamdan etkilenmekle birlikte moleküler mekanizmaları birbirinden farklıdır. Bu fark, gen faaliyetlerinin meydana geliş sıralarının farklılığından kaynaklanmaktadır. Vernalizasyon, normal olarak yaşam döngülerinde soğuk isteyen bitkiler için önemli bir aşamadır. Ancak, soğuğa adaptasyon soğuk uyarısının zararla sonuçlanmasını engelleyen fizyolojik bir tepkidir. Bu durum her iki tepkinin de farklı genlerce oluştuğu anlamına gelebilmektedir (Chong and Tan 1994). Adaptasyon için belirli proteinlerin oluşması soğuk uygulamasından sonra 7. günde, vernalizasyonla ilgili belirli proteinlerin oluşması ise 14-21. günlerde gözlenebilmektedir. Bu durumda, vernalizasyonda olgunlaşmamış embriyonun içinde bulunduğu dönemin önemli bir faktör olduğu anlaşılmaktadır. Yapay soğuk uygulamasına buğdayda çiçeklenmeden (anthesisten) sonra 9-12. günde (Weibel 1958) ve çavdarda 14. günde (Gregory and Purvis 1938) başlanması önerilmekle birlikte bir çok araştırıcı tarafından, 30 gün boyunca 0-4°C uygulaması, buğdayda moleküler düzeyde çalışmalar yapmak için uygun görülmektedir.

Vernalizasyon sırasında, kışlık buğdayda oluşan proteinleri engelleyici maddelerin (inhibitörler) bulunması ve nükleik asit sentezi için duyarlı bir dönem olması da vernalizasyonun bazı özel genlerinin olduğunu göstermektedir (Chong and Tan 1994). Vernalizasyon gereksiniminin genetik analizi; *Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3*, *Vrn4* ve/veya *Vrn5* olmak üzere 4 ya da 5 temel *Vrn* geninin varlığını ortaya koymaktadır (Flood and Hallaron 1986). Bu genlerin kromozom üzerindeki yerleri ve birbirleriyle aynı ya da farklı olup olmadıkları hakkında çalışmalar yapılmaktadır (Law *et al.* 1975, Hoogendorn 1984, Nelson *et al.* 1995, Dubcovsky *et al.* 1998,).

Oldukça karmaşık ve etkileşimli bir yapıya sahip olan vernalizasyon mekanizmasını tam olarak belirleyebilmek amacıyla moleküler bazda ve tarla denemeleri şeklinde birçok araştırma yapılmakla birlikte, halen bilinmeyen yönleri bulunan bu mekanizmanın önemi genetik mühendisliği çalışmalarında daha da belirgin olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bildiğiniz gibi, genetik mühendisliği çalışmalarında doku kültürü aşamasının başarısını transgenik bitkiyi elde etmek ve gen aktarımı yönteminin optimizasyonu kadar, transgenik bitkiyi verecek olan eksplanta uygulanacak doku kültürü yönteminin optimizasyonu belirlemektedir.

Serin iklim tahıllarında laboratuvar ortamında *in vitro* koşullarda yapılan doku kültüründe, vernalizasyon genellikle kültür aşamasında vernalizasyon etkisi yapan kimyasallar kullanılarak ya da alıştırma aşamasında iklim odasında soğuk uygulayarak yapılmaktadır. Çimlenme minimumu 1-4°C, çimlenme optimumu 20-25°C, fotosentez minimumu 5-7°C ve toplam sıcaklık isteği 1750-2250°C olan bu grup bitkilerde, alıştırma aşamasında soğuk uygulaması hem maliyeti artırmakta hem de uygulama için uzun bir süreye gereksinim duyulmaktadır.

Bugün gelinen noktada laboratuvar koşullarında *in vitro* teknikler kullanılarak kışlık buğdayla yapılan bu tür çalışmalarda, embriyonun vernalizasyona verdiği tepkinin, embriyonun yaşına ve kullanılan besi ortamına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Sharma and Gill 1982). Ayrıca mutlak kışlık buğday çeşitlerinin, tohum bağlamaları için gereksinim duydukları vernalizasyon derecesinin ve süresinin çeşide bağlı olarak değişmekle birlikte, 0-10°C arasında olduğu bilinmektedir (Crofts 1989). Daha önceki çalışmalarda tohumlara vernalizasyon uygulanırken, *in vitro* tekniklerinin gelişmesiyle embriyolar kullanılmaya başlanmıştır. Laboratuvarda özellikle kallus oluşumu oranının daha yüksek düzeylerde olduğu olgunlaşmamış embriyo kültürleri, olgunlaşmış embriyolara tercih edilmiştir. Olgunlaşmamış embriyolarda vernalizasyon, kallus oluşumu aşamasında petri kapları içinde ve buzdolabında 6°C sıcaklıkta yapılabilmektedir (Whelan and Schaalje 1992). Ancak olgunlaşmamış embriyo kullanılan bu tür çalışmalarda embriyonun yılda sadece 1 kez alınabilmesi, araştırıcıları

zaman ve materyal bakımından sıkıntıya sokmaktadır. Bu nedenle, *in vitro* koşullarda, kallus aşamasında yapılan vernalizasyon çalışmalarında olgunlaşmış tohumlardan elde edilen embriyonik kallusların kullanılması, olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslara iyi bir alternatiftir. Böylece uygun kallus oluşumu yöntemi (Özgen vd. 1998) ile yüksek düzeyde kallus oluşumu sağlanırken, istenildiğinde bulunabilen olgun tohumlardan alınan olgun embriyolarla, zaman ve materyal bakımından herhangi bir sıkıntı yaşanmamaktadır.

Dolayısıyla, bugüne kadar bitkinin yapraklı döneminde yapılan vernalizasyonun zaman kaybına neden olduğu ve yapılan masrafı da artırdığı göz önünde bulundurulduğunda, serin iklim tahıllarında vernalizasyonun *in vitro* koşullarda, olgun embriyolarla ve kallus aşamasında yapılmasının önemi daha da belirginleşmektedir.

Günümüzde giderek geliştirilen doku kültürü yöntemleri, kaynakların optimum kullanımı ve gelecek araştırmalara yön verecek niteliklere sahip olması açısından, her zaman güncelliğini korumaktadır. Başarısı kanıtlanmış kallus kültürleri, vernalizasyonun *in vitro* koşullarda sağlanması için kullanılabilecek en uygun eksplantlardır. Vernalizasyonun bu kültürleri elde etme yöntemleriyle uyumunun sağlanarak uygulamaya koyulması, biyolistik gibi doğrudan gen aktarımı yöntemlerinin işlerliğini artırarak, bu tarzda yapılan çalışmalara kolaylık ve hız kazandıracaktır.

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de genetik materyal olarak önem taşıyan Çakmak-79 ve Gerek-79 buğday çeşitlerinde; olgunlaşmış embriyolardan endosperm destekli kallus oluşumu yöntemi uygulanarak elde edilen kalluslarda ve rejenere bitkiciklerde vernalizasyonun *in vitro* koşullarda sağlanma potansiyellerinin belirlenmesidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Serin iklim tahıllarında vernalizasyonla ilgili olarak günümüze kadar yapılan önemli bazı çalışmalar tarih sırasına göre aşağıda verilmiştir.

Wellensiek (1964), tek yıllık kışlık *Lunaria biennis* L. bitkisiyle yaptığı çalışmasında, eksplant olarak kesilmiş yaprak parçalarını kullanmıştır. Araştırıcı, yaprak ayasını (laminae)17.5 cm^2'lik ikizkenar üçgen şeklinde kesmiş, kumda köklendirmiş ve sürgün oluşumunu sağlayarak, 20°C'lik serada büyütmenin ardından yaprakları toprağa aktarmıştır. Vernalizasyonu 6, 8, 10, 12 ve 14 haftalık bitkilerin yaprak parçalarına 5°C sıcaklık ve 12 saatlik fotoperiyodda 250 $\mu/sec/cm^2$ yoğunluktaki ışık altında ve 0, 8, 12, 16 ve 20 hafta süresince uygulayan araştırıcı; çiçeklenme oranlarının uzun süreli soğuk uygulamalarında daha yüksek olduğunu ve en iyi tepkinin 12 haftalık bitkilerde oluştuğunu belirlemiştir. Kesilmiş yapraklarda vernalizasyon uygulamasının ardından petiollerin 0.5 cm'lik kısmını çıkaran araştırıcı, kesilen kısımların tekrardan rejenere hale geldiğini ancak bunlardan hiçbirinin çiçeklenmediğini ve rejenerasyon sırasında mitoz bölünmenin yer aldığı petiollerle vernalizasyonun sınırlı olduğunu vurgulamıştır. Araştırıcı, vernalizasyonun ancak soğuk uygulaması sırasında bölünen hücrelerde oluştuğunu, vernalizasyonun doğrudan etkisinin hücreden hücreye mitoz bölünmeyle geçmesinin mümkün olduğunu ve dolayısıyla vernalize olma halinin dokularla iletilebilen bitkisel bir dürtü olduğunu açıklamıştır.

Hoogendoorn (1984), vernalizasyonun etkisini ölçmek amacıyla başağın çıkış zamanını belirlemeye yönelik olarak yaptığı çalışmasında, Finlandiya, Fransa, Avustralya, İngiltere, Japonya vb. farklı ülke kökenli 8 buğday çeşidiyle çalışmıştır. Araştırıcı, birçok buğday çeşidinde vernalizasyon tepkilerini belirledikten sonra vernalizasyona daha duyarlı olan Sage çeşidinin tohumlarını başakta gelişirken vernalize etmiştir. Çalışmasında, Sage çeşidinin başakta vernalize edilmiş tohumlarını ve başakta vernalize edilmeyen normal tohumlarını, sıcaklık, zaman aralığı ve su kullanımı bakımından farklılık gösteren vernalizasyon uygulamalarına maruz bırakan araştırıcı, büyüyen tohumları başakta vernalize etmenin normal tohumlara uygulanan alışılagelmiş vernalizasyondan daha az yapraklı ve başaklanmada daha erkenci bitkiler elde etme

olanağı sağladığını belirlemiştir. Hoogendorn, bu araştırmasıyla olgun tohumların vernalizasyonunda başak-vernalizasyonunun büyümeyle ortaya çıkan karmaşıklıklara engel olan etkili bir yöntem olabildiğini kanıtlamıştır.

Major and Whelan (1985), çalışmalarında Rescue ve Cadet sert kırmızı yazlık buğdaylarının resiprok katlamalı hatlarında, vernalizasyon tepkisi, temel vejetatif dönem ve fotoperiyodik duyarlılık bakımından kromozomal farklılıkları belirlemeyi amaçlamışlardır. Araştırıcılar bu değişkenlere ilişkin tahminler yapabilmek için bitkileri serada 23/15°C gündüz/gece sıcaklığı düzeninde yetiştirmişler ve Kasım ayından Mart ayına kadar ilave ışık uygulamışlardır. Vernalizasyonu etkileyen genlerin 2A, 5A ve 5B kromozomu üzerinde bulunduğunu belirleyen araştırıcılar, 2A ve 5B kromozomlarının aynı zamanda temel vejetatif aşamanın uzunluğunu etkilediğini vurgulamışlardır.

Sharma and Mascia (1987), dört adet sert kışlık buğday genotipi (Newton, Wichita, Arkan ve B393) ve iki adet yumuşak kışlık buğday genotipini (Auburun, LB-30) kullanarak olgunlaşmamış embriyoların doğrudan vernalizasyonunun başaklanmaya etkisi üzerinde çalışmışlardır. Çalışmalarında toplam 7587 adet 14, 17 ve 20 günlük embriyoyu tohumlarından ayırmış ve 0-6 hafta boyunca *in vitro* ortamda vernalize etmişlerdir. Araştırıcılar çimlenen embriyo yüzdesinin yüksek olduğunu (%96.1), çeşitten etkilenmediğini belirlemiş ve embriyo vernalizasyonunun, en az geleneksel vernalizasyon kadar etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırıcıların elde ettikleri sonuçlara göre; 17-günlük embriyolar vernalizasyona en iyi tepkiyi verirken, 17 günlük embriyoların 5-haftalık vernalizasyonunda anterleri olgunlaşan bitki yüzdesinin 14 ve 20-günlük embriyolardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, 5 hafta boyunca vernalize edilmiş 17-günlük embriyoların kültüre alınmasından anter olgunlaşmasına kadar geçen gün sayısının, 6-haftalık vernalizasyondan, 14 ve 20-günlük embriyolardan ve kontrollerden daha kısa olduğu belirlenmiştir.

Brule-Babel and Fowler (1989), soğuğa en çok dayanabilen kışlık tahıl cinsi çavdarın 1 adet yazlık ve 2 adet kışlık çeşidinde soğuk zorlanması ve vernalizasyon ihtiyacının kalıtımını araştırmışlardır. Resiproklar dahil 6 melezleme yapan ve F_1, F_2 ve F_3 popülasyonlarıyla çalışan araştırıcılar, genetik kaynaklardan bulaşmayı engellemek için

üretim sırasında diğer çavdar popülasyonlarından fiziksel izolasyon uygulamışlardır. Araştırıcılar, çalışmalarıyla biyolojik farklılıklara ve dolayısıyla gen etkileşimlerinin farklılığına dikkat çekmişler ve yazlık bitkide büyüme tipi için bir dominant genin determinasyonunun sağlandığını, soğuk zorlanmasının da eklemeli etkisi olan genlerle yönetilmekle birlikte diğer faktörlerden de etkilenebileceğini belirtmişlerdir.

Roberts (1989), soğuğa dayanıklılık, kışlık-yazlık büyüme tipi, rozet devresi büyüme tipi, soğuğa maruz kalmış bitkilerin boyu ve soğuk uygulanmış bitkilerin yaprak uzunluğunun kalıtımı üzerine yaptığı araştırmada, Candet ve Candet-Rescue 5A ile Winalta ve Winalta-Rescue 5A buğday çeşitlerinin dölleriyle çalışmıştır. Araştırmasıyla kromozom 5A üzerinde 2 lokusun çok az bir bölümünün soğuk zorlanmasıyla oluştuğunu ortaya çıkaran araştırıcı, bu lokusun bir bölümüyle soğuk zorlanmasını kontrol ettiğini, bir bölümüyle de soğuktan zorlanmış bitkilerin yaprak uzunluğunu kontrol eden lokusa sıkıca bağlanmış durumda olduğunu ve diğer lokusun da kışlık-yazlık büyüme tipini gösteren *Vrn1*'e sıkıca bağlanmış olduğunu belirtmiştir. Bu lokusun aynı zamanda rozet devresindeki büyüme tipinin bir bölümünü de kontrol edebildiği üzerinde duran araştırıcı, *Vrn1*'in fark edilebilir sıcaklıklarda oluştuğunu ve bir şekilde vernalizasyonun, soğuk zorlanmasının ve rozet devresindeki büyüme tipinin gelişmesini hızlandırdığını vurgulamıştır.

Gardner and Barnett (1990), buğday çeşitlerinin (*Triticum aestivum* L.) güneydoğu Amerika'ya uyumlarının arttırılması amacıyla vernalizasyon tepkileri üzerinde çalışmışlardır. Çalışmalarında, buğday çeşitleri ile bir tritikale çeşidinin vernalizasyon tepkilerinin belirlenebilmesi için saksıya aldıkları bitkileri değişik periyotlarda doğal kış soğuğunun etkisine bırakan ve çimlenen tohumlara buzdolabı soğuğu uygulayan araştırıcılar, saksılara dikilmiş bitkileri ya da vernalize edilerek saksılara ekilmiş tohumları 18 saat/gün uzunluğunun uygulandığı sıcak seraya almışlardır. Araştırıcılar bu uygulama sonucunda 3 tipte vernalizasyon tepkisi gözlemlemişlerdir; (i) zorunlu soğuk (niteliksel): başaklanma için 6-8 hafta soğuklanma gereksinimi (Caldwell ve Coker 983 çeşitlerinde); (ii) uyarıcı soğuk (nicel): 2-4 haftalık soğuk uygulamalarıyla, kontrolden daha erken başaklanma (Florida 302, Hunter, Phoenix çeşitlerinde); (iii) doğal soğuk: soğuk uygulamalarıyla uyarılma (Owens, Beagle 82 ve Florida 301

çeşitlerinde). Doğal soğuğa bırakılmış çeşitlerde başaklanmayı sırasıyla Owens, Beagle 82 ve Florida 301'de gözlemleyen ve uygulanan soğuğun artırılmasıyla başaklanmanın geciktiğini belirleyen araştırıcılar, hem doğal olarak hem de buzdolabında soğuk uygulamasının etkili vernalizasyon yöntemleri olduğunu vurgulamışlardır.

Kato *et al.* (1990), kültür ortamına kükürtlü asit ekleyerek ve soğuk uygulayarak, ayrılmış başaklarda basit bir kültürleme yöntemi oluşturmuşlardır. Ayrılmış başakları, 100 g/L sukroz ve %0.075 kükürtlü asit içeren sıvı ortamda oda sıcaklığında sterilizasyon yapılmadan, kültüre alan araştırıcılar, olgunlaşmamış tohumlara düşük sıcaklık (5°C'de su banyosu) ya da vernalizasyon etkisi yarattığı bilinen kimyasalları uygulamışlardır. Araştırıcılar, fotoperiyodik tepkiyi ve (çevresel etkilerden erken etkilenme dolayısıyla) erken olgunlaşmayı, kinetin ve tripsin kullanarak azaltmışlardır. Kimyasal uygulamasının olgunlaşmamış embriyoların soğuklanma ihtiyacını etkilemediğini ancak, düşük sıcaklık uygulamasının soğuklanma ihtiyacını güçlü bir şekilde etkilediğini belirleyen araştırıcılar, kültüre alınmış ayrılmış başaklara çiçeklenmeden sonra 10. günde düşük sıcaklık uygulandığında, normal çimlenme yeteneğine sahip tamamen vernalize edilmiş olgunlaşmamış tohumlar elde edileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Arumunganathan *et al.* (1991), delicenin (*Lolium temulentum* L.) 2 yabani popülasyonu Ba 9735 ve Ba 92392 ile çalışmışlardır. Araştırıcılar eksplant olarak bütün tohumlar, çıkarılmış olgun embriyolar, başakta gelişen olgunlaşmamış embriyolar, çıkarılmış apikal meristem uçları ve olgunlaşmamış embriyo kallusları kullanarak, soğuk uygulamasının (2°C) etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çiçeklenmeden (anthesisten) 5 gün sonra, çıkarılmış embriyolar ve apikal meristem uçlarını, şişirilmiş tohumlar gibi vernalize etmeyi başaran araştırıcılar, başak içerisinde gelişen embriyolara soğuk uygulamasının vernalizasyon etkisi yapmadığını belirlemişlerdir. Çalışmalarının beklenmeyen bir sonucu olarak ayrılmış başaklara anthesisten sonra değişik zamanlarda soğuk uygulandığında ve ardından kültüre alındığında, embriyoların bu uygulamaya tepki göstermediğini belirleyen araştırıcılar, ayrıca, anthesisten 5 gün sonra, 8 hafta boyunca 2°C soğuk uygulanan başakların vernalizasyona az da olsa tepki verdiğini vurgulamışlardır.

Whelan and Schaalje (1992), "Norstar" kışlık buğday (*Triticum aestivum* L.) tohumlarını ve olgunlaşmamış "Norstar" embriyolarından elde ettikleri embriyonik kallusları vernalize etmişlerdir. Tohumların, 6°C'de 8 hafta (12 saat fotoperiyod) vernalizasyonun ardından 20°C'de 18 saatlik fotoperiyodda büyütüldükten 42 gün (6 hafta) sonra başaklandığını belirten araştırıcılar, embriyonik kallusların vernalizasyonu için 6°C'de 8-12 haftanın gerektiğini açıklamışlardır. Araştırıcılar, embriyonik kalluslardan elde edilmiş bitkilerin, toprağa aktarıldıktan sonra tekrar vernalizasyon uygulanmadan 8-9 haftada başaklandığını belirlemişlerdir. Araştırıcılar bu çalışmalarıyla, büyütme kabinlerinde ışıklı ortamda düşük sıcaklık uygulaması ihtiyacını ortadan kaldırarak, vernalize olmuş bitkiler elde etme yöntemini oluşturmuşlardır.

Dubert *et al.* (1993), bitkinin yaşına ve hormonlarına bağlı olarak vernalizasyonun, kışlık buğday çeşidi Grana'nın olgunlaşmamış embriyolarına etkisi üzerinde çalışan araştırıcılar, tozlanmadan itibaren 10. günden başlayarak, embriyoları izole etmiş ve 4-8 hafta arasında BAP (0.5 veya 20 mg/dm^3), NAA (0.5 veya 20 mg/dm^3), veya GA_3 (0.5 veya 20 mg/dm^3) içeren MS ortamında vernalize etmişlerdir. Vernalize tohumları serada yetiştiren araştırıcılar GA_3 uygulamasının 18 günden daha genç olan embriyolar için öldürücü olurken, daha yaşlı embriyolarda devamlılığı artırdığını, BAP uygulamasının ise genç embriyolardan oluşturulan bitkilerde başaklanma yüzdesini artırdığını belirlemişlerdir. Hormon uygulanmış bitkilerde vernalizasyonun etkisinin arttığını ve bitkilerin başaklanmasının hızlandığını ancak, kısa ve daha az sayıda başakçık oluştuğunu gözlemleyen araştırıcılar, çok genç embriyoların yeterli düzeyde depo oksine ve giberelline sahip olduğunu ve dışarıdan uygulanan GA_3'nin, bunların yarayışlılığını azalttığını ya da silici etki yaptığını açıklamışlardır. Ancak, embriyolar yaşlandıkça giberelline gereksinim artmıştır. Yeniden sentezlenme ya da giberellinin aktivasyonu, vernalizasyonun ikinci aşamasında olmuştur. Araştırıcılar elde ettikleri bu sonuçlarla olgunlaşmamış embriyonun vernalizasyon ihtiyacını giberellinle yerine koymanın mümkün olmasa da, dışarıdan hormon uygulamasının kısmi venalizasyon etkisini artırdığını açıklamışlardır.

Chong *et al.* (1994), vernalizasyon ve tarladaki kışlık buğdayın başak gelişiminde, fizyolojik ve biyokimyasal değişimler arasındaki ilişki üzerine yaptıkları çalışmada, kontrol / vernalize olmuş / vernalizasyon etkisinden kurtarılmış kışlık buğdayın, vernalizasyonun saptanması açısından güvenilir bir sistem olduğunu belirlemeye çalışmışlardır. Araştırıcılar kışlık buğday (*Triticum aestivum* L. cv. Jingdang No 1) tohumlarını çimlendirip, 0-4°C'de 30 gün boyunca büyütmüş ve vernalizasyon aşamasından çıkarılmalarını, bitkileri 35°C'de karanlıkta 5 gün boyunca tutarak sağlamışlardır. Kontrol materyalini ise vernalizasyonun ardından 2 gün süreyle 25°C'de tutan araştırıcılar, moleküler bazda yaptıkları bu çalışmalarında, v*erc 17* geninin bir bölümünün kışlık buğdayın vernalizasyonuyla yakından ilgili bir gen dizisi olabileceğini ve belki de v*er17*'nin buğday için yeni bir gen olabileceğini açıklamışlardır.

Ortiz-Ferrara *et al.* (1995), kontrollü çevre koşullarında ve yüksek hava sıcaklıklarına sahip tarla koşulları altında, 20 buğday hattının vernalizasyona ve fotoperiyoda tepkilerini araştırmışlardır. Vernalizasyona duyarlı-fotoperiyoda duyarsız Pitic 62, vernalizasyon ve fotoperiyoda duyarlı Kabir 1 çeşitlerini kontrol materyali olarak kullanan araştırıcılar, vernalize edilmiş veya edilmemiş tohumları saksılara aktarmış, 8, 12 ve 16 saatlik fotoperiyodlu kabinlerde seraya veya büyütme çemberlerine yerleştirmişlerdir. Artan fotoperiyodla birlikte anthesis'e olan gün sayısının azaldığını ve vernalize edilmiş bitkilerin, daha erken çiçeklendiğini belirleyen araştırıcılar, anthesis'e kalan gün sayısı bakımından serada ve büyütme çemberinde yetiştirilen bitkiler arasında (r=0.88) belirgin bir korelasyon olduğunu ve büyüme tipi, vernalizasyon ihtiyacı ve tarlada başaklanma günü, kontrollü çevrede vernalizasyon tepkisi için çok sayıda genotipte tarlada yüksek hava sıcaklıklarında seçmelerin yapılabileceğini ve ardından bu materyalin sera koşullarında fotoperiyodik tepkileri için gözlemlenebileceğini belirtmişlerdir.

Marcinska *et al.* (1996), Grana buğday çeşidinin izole edilmiş embriyolarını 25°C'de 0, 3 ve 6 haftalık periyodlarda sürekli ışıklı ortamda kültüre almış, ardından 17 haftalık kültürleme ve 5°C'de 9 haftalık vernalizasyon ile kültürün devamını sağlamışlardır. 9 haftalık vernalizasyonun, olgunlaşmamış embriyoların tam gelişimi için yeterli

olduğunu, embriyo dokusundan farklı olarak, kallus dokusunun uzun dönem kültürlenmesinin vernalizasyon uygulamasını etkilemediğini ve özellikle yeni izole edilmiş embriyolara soğuk uygulandığında kullanılabilir kallus miktarının azaldığını belirten araştırıcılar, kallus dokusunun oluşumunun bitkinin generatif gelişiminde etkili genlerin ekspresyonlarıyla ilgili olması nedeniyle vernalizasyon koşullarının kallusların büyüme hızını ve farklılaşmasını etkilediğini ancak, rejenere bitkilerin generatif gelişimlerini etkilemediğini vurgulamışlardır.

Sarhan *et al.* (1997), tahıllarda donmaya toleransı anlamak için kullanışlı bir model olan buğdayın *wcs120* gen ailesine ilişkin olarak yapılan çalışmaları derlemişlerdir. Araştırıcılar kışlık tahılların, kışı geçirmeleri ve dondurucu soğuklara dayanabilmelerinin iyi bir adaptasyon mekanizmasına sahip olmalarından kaynaklandığını, bu farklılığın genetik olarak düzenlendiğini ve karmaşık bir genetik sistemi içerdiğini vurgulayarak, bu sistemin doğasını ve düşük sıcaklıkla düzenlenmesini anlamak için buğdayda (*Triticum aestivum* L.) donmaya toleransla ilgili genlerin birçok araştırıcı tarafından yapılan çalışmalar sonucunda belirlendiğini ve bunların sınıflandırıldığını açıklamışlardır. *wcs120* gen ailesinin 12'den 200 kDa'ya kadar değişen büyüklükteki bir protein grubunu kodladığını ve biyokimyasal, moleküler ve genetik analizlerin bu genin, *Poaceae* familyasına özgü olduğunu ve düşük sıcaklıkla çalıştığını belirten araştırıcılar, WCS proteininin oluşturulmasının donma toleransıyla doğrudan ilgili olduğunu ve yapılan analizlerde kışlık tahıllarda düşük sıcaklık geninin çalışması üzerinde vernalizasyonun düzenleyici kontrolünün olduğunu ortaya koymuşlardır.

Holland *et al.* (1997), yulaf (*Avena sativa* L.) çeşitlerinin büyüme desenleri ve vernalizasyon uygulamasının (çimlenen tohumlara soğuk uygulaması) gelişmelerinde gösterdiği farklılığı belirlemek amacıyla, başaklanma (sapa kalkma) günü, bitki boyu ve kardeş sayısına ilişkin verilerle vernalizasyonu kontrol eden genomik bölgelerin, Kanota (vernalizasyona duyarlı) ve Ogle (vernalizasyona duyarsız) yulaf çeşitlerinin melezlenmesinden elde edilmiş kendilenmiş rekombinant (RI) popülasyonunda haritalanması üzerinde çalışmışlardır. Araştırıcılar F_6 generasyonundan alınmış 71 adet ıslah hattının bir tekrarına vernalizasyon uygulamış, diğer tekrarına vernalizasyon

uygulamadan büyütme çemberinde yetiştirerek, bitkilerdeki eğilimi belirlemek amacıyla 561. lokusun genetik bağlı haritasını kullanmış ve her uygulamaya ilişkin 9'dan 16'ya kadar bağlantı grubu ve bağlantısız lokus belirlemişlerdir.

Chong *et al.* (1998), vernalizasyona duyarsız transgenik buğday bitkisinde (*Triticum aestivum* L. cv. Jingdong No.1) Zeng *et al.* (1994)'nın belirlemiş olduğu yöntemi kullanarak, *ver* geninin fonksiyonel analizi üzerinde çalışmışlardır. Araştırıcılar kışlık buğdayda vernalizasyonla ilgili *ver203* geninin fonksiyonunu cDNA'nın transgenik bitkide duyarsız RNA olarak çalıştırılmasıyla belirlemeyi planlayarak, PBI221 içinde CaMV promotoru, GUS geni ve NOS-terminatörü içeren bir verc203-GUS füzyonu yaratan plasmid oluşturmuşlardır. Bu yapıyı daha sonra polen tüpü yoluyla bitkiye aktarmışlardır. Trangenik ve normal tohumları çimlendirip, 28 gün süreyle 2°C sıcaklıkta tutan araştırıcılar, başaklarının gözlenmesi için bütün bitkileri serada yetiştirmiş ve vernalizasyonla başaklanmanın baskı altına alınmış olduğu duyarsız transgenik buğday bitkilerini moleküler analize almışlardır. Araştırıcılar vernalize edilmiş kontrol bitkilerinde ve duyarlı transgenik bitkilerde olgunlaşma tamamlanana kadar 326 adet vernalize edilmiş transgenik kışlık buğday bitkisinden 6 tanesinde başaklanmanın engellendiğini ve kışlık buğdayda VER203 proteininin başaklanma ve başak gelişiminde önemli bir rol oynadığını belirlemişlerdir.

Ekmekçi ve Terzioğlu (1998), farklı biyolojik karakterdeki beş buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidinde (Çukurova-86, Atay-85, Lancer, Haymana-79 ve Bezostaya-1) ana sap yaprak sayısı ve bayrak yaprak alanı üzerine vernalizasyon, gün uzunluğu ve ışık şiddetinin birlikte etkilerini incelenmişlerdir. Vernalizasyonu 2±1°C'deki karanlık odada, %80 nemde 0, 15, 30, 45 ve 60 günde, ayrıca yalnız 14 saat gün uzunluğu ve 13.500 lüks ışık şiddetinde 90 günde gerçekleştiren araştırıcılar, Çukurova-86 ve Atay-85'de kontrol ve tüm vernalizasyon uygulamalarında, Lancer, Haymana-79 ve Bezostaya-1'de ise 30, 45 ve 60 gün vernalizasyon uygulamalarında yaprak çıkışının tamamlandığını vurgulamışlar ve yazlık çeşit ile vernalize olmuş kışlık çeşitlerde vernalizasyon süresinin artmasına bağlı olarak yaprak sayısı ve bayrak yaprak alanının azaldığını belirlemişlerdir.

Iwaki *et al.* (2000), Doğu Asya'daki eko-coğrafik farklılıkları belirlemek amacıyla Çin, Kore ve Japonya'da yetiştirilen yerel buğday çeşitlerinin büyüme tipleri, başaklanma günleri ve *Vrn* tiplerini araştırmışlardır. Yazlık tiplerin Ocak ayı ortalama sıcaklıklarının sırasıyla –7°C'nin altında ve 4°C'nin üzerinde olduğu kuzey ve güney Çin'e adapte olurken, kışlık tiplerin –7°C'den 4°C'ye kadar olan bölgelere adapte olduğunu belirleyen araştırıcılar, kuzey Çin'de yetiştirilen çeşitlerin geç başaklandığını açıklamışlardır. Araştırıcılar yazlık yerel çeşitlerin genetik analizinde, her birinde 4 *Vrn* geninin bulunma sıklığının da farklı olduğunu, *Vrn3* geninin diğerleri içerisinde en geniş ve en sık gözlenen gen olduğunu, onu *Vrn1* ve *Vrn2*'nin takip ettiğini belirlemişlerdir. *Vrn4* genini sadece 7 yerel çeşitte belirleyen araştırıcılar her lokasyonda kış soğuğuna adaptasyonun sonucu olarak büyüme tipi ve *Vrn* genotipi bakımından farklılık gösteren 3 ekotipin doğu Asya'ya allopatrik olarak (değişik bölgelerden köken alarak) dağıldığını açıklamışlardır.

Ekmekçi ve Terzioğlu (2000), farklı biyolojik karakterlerdeki buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinde (Çukurova-86, Atay-85, Lancer, Haymana-79 ya Bezostaya-1) ana sap uç (apeks) veya başak ve ana sap uzunlukları ve ana sap çapı üzerine vernalizasyon, gün uzunluğu ve ışık yoğunluğunun birlikte etkilerini incelemişlerdir. Vernalizasyon işlemini 2±1°C'deki karanlık soğuk odada, %80 nemde 0, 15, 30, 45 ve 60 günde, ayrıca yalnız kısa gün-düşük ışık yoğunluğunda 90 günde gerçekleştiren araştırıcılar, başaklanmanın Çukurova-86 ve Atay-85'de kontrol ve tüm vernalizasyon uygulamalarında; Lancer, Haymana-79 ve Bezostaya-1'de ise 30, 45 ve 60 gün vernalizasyon uygulamalarında tamamlandığını belirlemişlerdir. Araştırıcılar, yazlık çeşitlerde ana sap uç veya başak uzunluğu ve ana sap çapının, vernalizasyon süresinin artışına bağlı olarak artarken; kışlık çeşitlerde gereksinim duydukları vernalizasyon süresinin arttığını, bu süreden sonra vernalizasyon süresinin artışına bağlı olarak azaldığını vurgulamışlardır.

Xin and Browse (2000), bitkilerin dondurucu soğuklara uyumu (aklimatizasyonu) üzerine bir derleme yapmışlardır. Kışlık buğdayda vernalizasyonu ve donmaya toleransı kontrol eden 5 büyük lokustan 4'ünün kromozom 5A(*Vrn1*), 5D(*Vrn3*), 5B(*Vrn4*) ve 7B(*Vrn5*) üzerinde haritalandığını belirten araştırıcılar, *Vrn1*'in kromozom üzerindeki

yerinin, arpadaki *Sh2* geninin kromozom 7(5H) ve çavdardaki *Sp1* geninin 5R kromozomu üzerindeki yeriyle homolog olduğunu açıklamışlardır. Araştırıcılar vernalizasyon tepkisini kontrol eden genlerle donmaya toleransı kontrol edenlerin birbirine sıkı sıkıya bağlı olduğunu ancak, bu iki özelliğin farklı genlerle kontrol edildiğini ve önemli lokusların detaylı şekilde haritalanmasının donmaya toleransa yardımcı olan genlerin belirlenmesine ön ayak olacağını vurgulamışlardır.

Zamani *et al.* (2000), buğdayda (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* anter kültürünün ardından döl verimli doubled haploid bitkilerin üretimi için büyütme ortamına ilave edilen "cholchicine"in etkisi üzerine çalışmışlardır. Araştırıcılar, 1 kışlık ve 2 yazlık buğday çeşidinin tohumlarını 2 gün süreyle petri kaplarında oda sıcaklığında çimlendirip, 7 haftalık büyütmenin ardından bitkileri, buğday için geliştirilmiş olan büyütme çemberinde (Tischner *et al.* 1997) yetiştirmişlerdir. Anter kültürlerine cholchicine uygulayan araştırıcılar, vernalizasyonun ardından rejenere bitkileri T3 iklim programına almışlardır (Tischner *et al.* 1997). Araştırıcılar, kışlık buğday çeşidi kullanılarak "cholchicine" uygulamasıyla yüksek tohum oluşturma yeteneğine sahip bitki oluşturulmasının mümkün olduğunu, "cholchicine" uygulamasından sonra yüksek oranda tohum alındığını ve bu yöntemin geleneksel anter kültürü yöntemlerine göre daha iyi sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir.

Iwaki *et al.* (2001), çalışmalarında Dwarf A kışlık buğdayının monozomik hatlarını, oluşturucu *Vrn2* geninin kromozomal yerinin belirlenmesi amacıyla kullanmışlardır. Araştırıcılar *Vrn2*'yi taşıyan isogenik hat Triple Dirk (B)'yi Dwarf A ile melezlemiş, elde ettikleri monozomik F_1'leri kendilemiş ve F_2 popülasyonunu serada 24 saat sürekli ışıklı ortamda ısıtmadan yetiştirmişlerdir. Bayrak yaprağını başarılı bir şekilde çıkaran bitkileri yazlık, rozet devresinde kalanları ise kışlık olarak ayıran araştırıcılar, bekledikleri 3:1 oranını gözlemlemiş ve *Vrn2*'nin $5B^L$–$7B^L$ kromozomu üzerinde olması gerektiğini açıklamışlardır.

Karsai *et al.* (2001), 21'i yazlık, 17'si kışlık ve 1'i alternatif olmak üzere, değişik kökenli 39 arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşidinin vernalizasyon tepkilerini, fotoperiyodik duyarlılıklarını, erkenciliklerini ve eko-klimatik uyum tiplerini incelemişlerdir.

Araştırıcılar, yazlık arpa çeşidinde üç uygulamaya ilişkin herhangi bir korelasyon olmadığını, kışlık arpalarda ise fotoperiyoda duyarlılık ve vernalizasyon tepkisi ile fotoperiyoda duyarlılık ve erkencilik arasında negatif korelasyon olduğunu, vernalizasyona tepki ve erkencilik arasında ise pozitif korelasyon bulunduğunu, ayrıca kışlık arpa çeşitleri arasında fotoperiyoda duyarlılık, vernalizasyona tepki ve erkencilikte, başaklanma zamanı ve donmaya toleransta önemli farklılıklar belirlemişlerdir.

Kato *et al.* (2001), yazlık özellikli *Vrn-D1* geninin buğdayda tarlada başaklanma zamanına etkisi üzerinde çalışmışlardır. Araştırıcılar, bu geni taşımayan "Nanbukomugi" ve taşıyan "Nishikazekomugi" melezlerinin F_2 bitkilerinden Vrn1 genini içeren veya içermeyen rekombinant ıslah hatlarını elde etmiş ve başaklanmanın 3 bileşeni olan vernalizasyon gereksinimi, fotoperiyoda duyarlılık ve vernalize olmuş bitkilerin erkenciliğini bütün rekombinant ıslah hatlarında belirlemişlerdir. Araştırıcılar *Vrn-D1* geni olan E hatlarında erkenciliğin birçok koşulda kendini gösteren sabit (durağan) bir özellik olduğunu gösterir şekilde bütün lokasyonlarda E hatların L hatlardan önemli düzeylerde daha erken başaklandığını ve sonuç olarak da erkencilik gibi *Vrn-D1* geni ile sağlanan yazlık özelliğin tarladaki başaklanma zamanından sorumlu olduğunu açıklamışlardır.

Kole *et al.* (2001), çiçeklenme zamanındaki çeşitliliğin bitki türlerinin farklı doğal ve tarımsal çevreye adaptasyonundaki önemini göz önünde bulundurarak, *Brassica rapa*'daki *VFR2* ve *Arabidopsis thaliana*'daki *FLC* çiçeklenme zamanı genlerinin homologluğunu araştırmışlardır. Araştırıcılar *VFR2*'yi taşıyan bölgenin *Brassica napus* ve aynı özelliği kontrol eden bölgeye homolog olduğunu ve aynı zamanda *Arabidopsis thaliana*'nın bir çok çiçeklenme zamanı lokusunu taşıyan 5 no'lu kromozomu ile homolog olduğunu belirlemişlerdir. Geç allelin etkisinin neredeyse tamamen eklemeli olduğunu açıklayan araştırıcılar, *A. thaliana*'nın çiçeklenme lokusunu, cDNA klonu tarafından belirlenen RFLP'nin, inceledikleri 414 gamette (<0,24 cM) *VFR2* ile tam olarak örtüştüğünü gözlemlemişlerdir. Araştırıcılar, FLC'nin, çiçeklenmenin alıcısı olduğunu ve *A. thaliana*'nın geç-çiçeklenen kışlık-tek yıllık tipleri için gerekli

olduğunu, *VFR2*'nin *FLC*'ye homolog olduğunu ve *A. thaliana*'daki mekanizma gibi çiçeklenme zamanını kontrol edebileceğini vurgulamışlardır.

Limin and Fowler (2001), çevresel baskılara tepki olarak bitkide hücre çapının küçültülmesinin önemli bir uyum özelliği olmasından yola çıkarak, buğdayda hücre çapının kalıtımı ve vernalizasyon lokusu ile bağlantısı üzerinde çalışmışlardır. Kışlık ve yazlık tabiatlı birçok buğday çeşidini kullanan araştırıcılar, bekçi hücrelerinin çapının F_1, F_2 ve F_2'den elde edilen F_3 popülasyonlarında anaçlardan ve Chinese Spring/Cheyenne (CS/CNN) kromozom katlamalı dizilerinden oldukça farklılık gösterdiğini, F_1 melezlerinin hücre çaplarının anaçların ortalamasına benzerlik gösterdiğini açıklamışlardır. Araştırıcılar CS/CNN kromozom katlamalı serileri analizinde, CNN'nin 5A ve 5B kromozomunun her ikisinin de büyüme tipinin hücre çapından bağımsız olduğunu, 5. grup kromozomların buğdayda hücre çapı üzerine önemli etkileri olan homolog allelleri taşıdıklarını ve bu bölgelerin hücre çapını kontrol etme ve düşük sıcaklığa (LT) toleransla ilgili özelliklerinin 5. grup kromozomun *Vrn* bölgesine çok yakın olduğunu belirtmişlerdir.

Mahzoofi *et al.* (2001) Düşük sıcaklığa (LT) tolerans genlerinin, gelişmeyle düzenlenip düzenlenemeyeceği ile gelişme aşamaları ve düşük sıcaklığa (LT) tolerans genlerinin çalışması arasındaki ilişkinin belirlenmesini amaçlamışlardır. 4°C'de 112 güne kadar 8 saatlik kısa gün (SD) koşullarında ve 20 saatlik uzun gün (LD) koşullarında aklimatizasyonu sağlanan, fotoperiyoda duyarlı ve düşük sıcaklığa toleranslı 3 kışlık buğday (*Triticum aestivum* L. em Thell) çeşidini kullanan araştırıcılar, 4°C'de 49 günlük vernalizasyonun bütün çeşitlerde vernalizasyon için yeterli olduğunu belirlemişlerdir. Araştırıcılar vernalizasyonun ardından aklimatizasyonun LD bitkilerinde bozulmasının, üretken döneme geçişi hızlandırdığını ve tekrardan aklimatize olma kabiliyetini sınırlandırdığını açıklamışlardır.

Qian *et al.* (2001), Takhtajan sınıflandırma sisteminin bütün alt sınıflarını temsil eden *Oryza sativa* L., *Nicotiana tabacum* L., *Brassica chinensis* L., *Hordeum vulgare* Linn., *Brassica oleracea* L. ve *Raphanus sativus* L.'nin tohumlarını kullanarak, moleküler melezleme tekniğiyle *verc203*'e (vernalizasyonla ilgili cDNA klonu) denk gelen DNA

homologlarının varlığını araştırmışlardır. Southern blot analizinde çeltik, buğday, arpa ve Arabidopsis'te düşük kopya sayısı olduğunu; PCR ürünlerinin melezlenmesine ilişkin sonuçlarda ise bir çok bitkide *verc203*'e denk gelen genin korunduğunu belirleyen araştırıcılar *Verc203* geninin kışlık buğdayda kök yerine plumulada faaliyet gösterirken, *Arabidopsis thaliana*'da, *verc203*'e denk gelen genin 14 günlük düşük sıcaklıkta çalıştığını ve Giberellinin Arabidopsis'te düşük sıcaklıkta uygulanmasıyla *verc203* geninin çalışmasını hızlandırabileceğini açıklamışlardır.

Barrett *et al.* (2002) çalışmalarında yazlık (*Vrn-B1; TDB*) ve kışlık (*Vrn-B1; TDC*) allelleri taşıyan yakın-izogenik hatların melezlenmesinden elde edilen F_2 popülasyonlarını kullanarak başaklanmaya kadar olan gün sayısına resiprokların etkisini belirlemeyi ve *Vrn-B1*'e bağlı markörleri genetik-bağlantı analizi yoluyla tanımlamayı amaçlamışlardır. Çalışmalarında TDB/TDC ve TDC/TDB resiprok haritalama popülasyonlarından sırasıyla elde edilen 91 ve 89 progenin başaklanmaya ait verilerini kaydeden ve önemli düzeyde ($P<0,0001$) resiprokluk ve dominanslık etkisi belirleyen araştırıcılar, gözledikleri 207 AFLP primer çiftinden ve 7 buğday mikrosatelliti marköründen sırasıyla iki ve bir adetinin 5BL buğday kromozomu üzerindeki *Vrn-B1*'e uzaktan bağlantılı olduğunu belirleyen araştırıcılar, dişi anaç seçiminin resiprokların haritalanmasındaki önemini vurgulamış ve 3 VRN lokusunda da moleküler markörleri belirlediklerini açıklamışlardır.

Chauvel *et al.* (2002), tek yıllık kışlık çim bitkisi olan tilki kuyruğunun (*Alopecurus myosuroides*) gelişimi ve büyümesi üzerine vernalizasyonun etkisini çalışmışlardır. *A.myosuroides*'in 3 popülasyonunun doğal kış soğuğuna bırakıldığı 2 tarla denemesi ve buzdolabında soğuk uygulanan şişirilmiş tohumlarının kullanıldığı 2 sera denemesi yapan araştırıcılar, çimlenme öncesi aşamada soğuk bir dönemin, sonraki fizyoloji üzerinde önemli bir etkisi olduğunu, gerilemenin serada erken sürgün oluşumu nedeniyle vejetatif dönemdeki vernalizasyonun en önemli etkisi olduğunu, ayrıca kardeş sayısında bir azalmayla sonuçlanan biyolojik kütle azalması nedeniyle bitki morfolojisinin vernalizasyondan etkilendiğini açıklamışlardır. Salkımın çıkış zamanı ve ana başaktaki yaprak sayısının soğuk uygulamasıyla azaldığını belirten araştırıcılar, *A.myosuroides*'de kışlık tahıllarda gözlenen vernalizasyon ihtiyacının kısmi bir

gereksinim olarak ortaya çıktığını ve popülasyonlar içinde ve arasında vernalizasyon gereksiniminin polimorfizm gösterdiğini vurgulamışlardır.

Holland *et al.* (2002), yulaf çeşitlerinde vernalizasyonu ve fotoperiyodik tepkileri kontrol eden genomik bölgelerin belirlenmesi üzerinde çalışmışlardır. Araştırıcılar yulafta fotoperiyod ve vernalizasyon tepkilerinin genetik temellerini belirlemek için büyütme çemberine alınan Ogle X TAM O-301'in haritalama popülasyonlarında 4 fotoperiyod ve vernalizasyon uygulaması kombinasyonunda çiçeklenme zamanı için QTLs (Quantitative Trait Loci) haritalaması yapmışlardır. Birlikte uygulandığında uzun fotoperiyod ve vernalizasyonun genellikle aynı genomik bölge üzerinde sinerjik olarak birbirini etkilediğini belirten araştırıcılar, erken yazlık ekimin tohumlar üzerinde zayıf bir vernalizasyon etkisi yarattığını açıklamışlardır. Bu etkilerin hekzaploid yulafta kromozomal düzenlemelerle ilgili olabileceğini belirten araştırıcılar, yulaf ile diğer çim bitkileri arasındaki karşılaştırmalı haritalamayla yulafta vernalizasyonun moleküler analizinin daha da kolaylaşacağını vurgulamışlardır.

Appendino *et al.* (2003), Arjantin buğday çeşitlerinde vernalizasyon gereksinimi ve erkencilikteki varyasyonunun genişliğini belirlemek amacıyla 68 çeşit seçmiş ve Arjantin çeşitlerine ilave olarak vernalizasyon tepkileri açısından netlik kazanmış olan Bezostaja-1 (kışlık), Sonora-64 (yazlık) ve Chinese Spring'i (alternatif) kontrol materyali olarak kullanmışlardır. Araştırıcılar, inceledikleri çeşitlerde vernalizasyon gereksinimi ve erkencilikteki eğilimin son 20 yıllık dönemde tersine döndüğünü ve belirgin bir vernalizasyon tepkisi ile zayıf bir erkenciliğin oluştuğunu açıklamışlardır.

Soğutmaz (2003), Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünde yapmış olduğu "Makarnalık Buğdaya (*Triticum durum* Desf.) Partikül Bombardımanı Yöntemi ile Belirleyici Gen Aktarımı" çalışmasında, makarnalık buğdaya (*Triticum durum* Desf) partikül bombardımanı ile belirleyici gen aktarılmasına ve gen aktarılmış olgun embriyoların rejenerasyonuna olanak sağlayan yöntemleri araştırmıştır. Araştırıcı, değişik bombardıman atış mesafelerini ve basınçlarını, 1.0μm ve 1.6 μm altın parçacıkları kullanarak denemiştir. Bombardıman yapılmış embriyolar üzerindeki GUS aktivitelerinin ölçümünü, gen geçişlerindeki etkinliğin belirlenmesi için kullanan

araştırıcı, 650 psi ve 1100 psi bombardıman basınçlarının, 6 cm atış mesafesinden verimli sonuçlar almıştır. Araştırıcı, seçme ajanı, hygromisin-B antibiyotiğinin derece derece 30 mg/L yoğunluğa kadar yükseltilmesiyle yapılan seçmelere dayanıklılık gösteren bombardıman yapılmış dokulardan, toplam 5 adet rejenere bitki elde etmiş ancak, toprağa aktarılan bu bitkiler vernalizasyon eksikliği nedeniyle generatif devreye geçmemiştir.

Wang *et al.* (2003), vernalizasyona gereksinim duyan bir çim bitkisi olan kamışsı yumağın (*Festuca arundinecea*) tohumdan üretilmiş, doku kültürüyle elde edilmiş ve transgenik bitkilerini kullanmışlardır. İlk optimizasyon çalışmasından sonra rejenere bitkileri, transgenik bitkileri ve tohumdan-üretilmiş bitkileri, başaklanma tepkileri ile tohum oluşumlarının belirlenmesi için vernalize eden araştırıcılar, transgenik ve tohumdan-üretilmiş bitkilerin melezlenmesinden elde edilmiş döllerin moleküler analizi sonucunda, transgenlerin, transgenik uzun yumaklarda Mendel kalıtımını izleyen sabit mayotik geçiş gösterdiğini belirlemişlerdir.

Whitechurch and Snape (2003), buğdayla melezlendiğinde kromozom kırılmalarına neden olan *Aegilops cylindirca*'nın gametokidal kromozomunu kullanarak Chinese Spring varyetesinde geliştirilen delesyon hatları ile bu varyetede 5AL ve 5DL kromozom kollarında, vernalizasyonun sağlanması ve sağlanmaması durumlarında, delesyon hatlarının gelişimsel desenini ortaya koymayı hedeflemişlerdir. Araştırıcılar *Vrn-A1* ve *Vrn-D1*'in yokluğunda ana sapta başaklanmanın başlaması süresinin Chinese Spring çeşidinden uzun veya eşit olmakla birlikte, başakçık sayısının azaldığını ve VRN genlerinin bulunmadığı delesyon hatlarında vernalizasyona duyarlılığın daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Yong *et al.* (2003), farklılaştırarak izleme yaklaşımıyla, kışlık buğday (*Triticum aestivum* L.)'da vernalizasyonla bağlantılı *VER2* genini izole etmişler ve 300 amino asitten biri olan lektin benzeri bir protein olduğunu ve jakalin gibi GWG sahasını içerdiğini belirlemişlerdir. Vernalizasyonun kaldırılmasının *VER2* geninin çalışmasını durdurduğunu belirleyen araştırıcılar, transgenik buğdayda *VER2*'nin duyarsızlığının engellenmesiyle, başaklanma ve olgunlaşma zamanının, gen aktarımı yapılmamış ve

boş pBI121 vektörüyle gen aktarılmış buğdaylara kıyasla 6 hafta geciktiğini gözlemlemişlerdir. Duyarsızlığı engellenmiş transgenik buğdaylarda ayrıca başağın tepe noktasındaki doku bozulmasını fark eden araştırıcılar kışlık buğdayın vernalizasyonunu gösteren işaretlerin oluşumunda ve başak gelişiminde *VER2*'nin önemli bir rol oynadığını açıklamışlardır.

Van Der Valk *et al.* (2004), olgunlaşma sürecinin yemin besinsel içeriğini azalttığı çok yıllık yem bitkilerinden İngiliz çimi (*Lollium perenne* L.) ile çalışmışlardır. Araştırıcılar başaklı döneme geçişi geciktirmek için sırasıyla mısır ubiquitin promotoru, çeltik aktin promotoru ve mısır OSH1 promotoruyla taşınan Arabidopsis *ATH1* genini *Lollium perenne* L.'ye aktarmış ve *ATH1* aktarılan bitkilerde başaklanmanın geciktiğini ve bazı bitkilerde başaklanmanın hiç meydana gelmediğini belirlemişlerdir. Bu durumdaki bitkilerde normal büyüyen meristemlerden normal dışı ve yapraklı bir büyüme özelliği ile sonuçlanan bir yapı geliştiğini açıklayan araştırıcılar, çok az sayıda başakçık oluştuğunu ve *ATH1*'in yem bitkilerine aktarılmasıyla başaklanmanın gecikmesinin, çok yıllık yem bitkilerinin yemlik kalitesini artırmak için kullanışlı olabileceğini vurgulamışlardır.

Bernier and Perilleux (2005), başaklanma zamanının kontrolüne ilişkin olarak yapılan çalışmaları konu alan derlemelerinde bitkilerin bir çok çevresel faktörden etkilendiğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar gün uzunluğu ve vernalizasyon gibi tahmin edilebilen temel faktörler olmakla birlikte, tahmin edilmesi güç olan faktörlerin de mevcut olduğunu belirtmişlerdir. *Arabidopsis thaliana*'da başaklanma zamanını kontrol eden birçok genetik yol belirlendiğini açıklayan araştırıcılar artık çalışmaların temel kontrol faktörlerine ve hormonlarla (genel olarak giberellin) yapılan araştırmalara kadar genişletildiğini vurgulamışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde 2002-2004 yılları arasında 3 yıl süreyle yürütülen bu çalışmada bölümün biyoteknoloji laboratuvarı (TUBİTAK ve Ankara Üniversitesi Rektörlüğü tarafından desteklenen TOGTAG/1285 sayılı proje ile kurulan) kullanılmıştır. Deneme makarnalık Çakmak-79 (*Triticum durum* Desf.) ve ekmeklik Gerek-79 (*Triticum aestivum* L.) buğday çeşitleri ile kurulmuştur. Kullanılan çeşitlerden Çakmak-79 alternatif, Gerek-79 ise kışlık yapıdadır. Daha önce bir çok araştırmamızda bu çeşitler kullanıldığından ve bu çeşitlere ait *in vitro* teknikleri ile kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi parametreleri tarafımızca çok iyi bilindiğinden, bu araştırmada Çakmak-79 ve Gerek-79 çeşitleriyle çalışılmıştır. Çeşitlerin özellikleri aşağıda verilmiştir.

Çakmak-79: Orta Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1975 yılında melezleme yöntemiyle elde edilmiş ve 1979 yılında tescil edilmiştir. Alternatif gelişme tabiatlıdır. 65-75 cm uzunluğundaki kısa ve sağlam sapı sayesinde yatmaya dayanıklıdır. Özellikle sulanabilen alanlarda yüksek verim vermektedir. Gübreye reaksiyonu iyi olup, tane dökmez ve harman olma kabiliyeti iyidir. Rastık ve sarı pasa karşı orta hassas, diğer hastalıklara ise toleranslıdır. Taneleri camsı ve amber rengindedir. Bin tane ağırlığı 43-48 gramdır.

Gerek-79: Eskişehir Zirai Araştırma Enstitüsü tarafından melezleme yöntemiyle elde edilip, 1979 yılında tescil edilmiştir. Kışlık gelişme tabiatlı çeşit, soğuğa ve kurağa karşı dayanıklıdır. Kardeşlenmesi yüksektir. Gübreye reaksiyonu iyidir. Tane dökmez. Harman olma kabiliyeti iyidir. Yetişme şartlarının kısıtlı olduğu durumlarda da diğer çeşitlere göre verim oranı yüksektir. Sürmeye dayanıklı, paslara orta dayanıklı, rastığa karşı hassastır. Yumuşak beyaz taneli olup, bin tane ağırlığı 36 gramdır.

Çalışmada kullanılan Çakmak-79 ve Gerek-79 çeşitleri 2001-2002 ekim sezonunda yetiştirilen ve hasattan sonra temizlenerek Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü ambarlarında depolanan tohumlardan sağlandı ve eksplant hazırlığına alındı.

3.2 Yöntem

Kışlık buğdayın *in vitro* koşullarda vernalizasyonunun sağlanması amacıyla yapılan bu çalışmada, vernalizasyon, olgunlaşmış embriyolardan elde edilen kalluslar ve rejenere bitkiciklere uygulanmıştır. Bitki materyalinin sağlanması, eksplant hazırlığı, sterilizasyon, embriyo gevşetme, ortam hazırlığı, kallus oluşumu ve kallus gelişimi aşamalarının ardından, denemeye kallus vernalizasyonu ile devam edilmiş, rejenerasyon, bitkilerin yetiştirilmesi ve fotoğraf çekimi aşamalarıyla deneme sonuçlandırılmıştır. Rejenere bitkicik vernalizasyonu ise, kallus oluşumu ve kallus gelişiminin ardından, rejenerasyon ve rejenere bitkilerin vernalizasyonu ile kallus vernalizasyonuna benzer şekilde, bitkilerin yetiştirilmesi ve fotoğraf çekimi aşamalarından oluşmuştur.

3.2.1 Eksplant hazırlığı

Eksplant hazırlığı, laboratuvar çalışmalarının başlangıcı ve en önemli aşamalarından biri olarak *in vitro* kültürünün temelini oluşturmaktadır. Bunun için, araştırmada kullanılan Çakmak-79 ve Gerek-79 buğday çeşitlerinin iri tohumları seçildi (Sayar vd. 1999) ve yüzey sterilizasyonu aşamasına alındı.

3.2.2 Yüzey sterilizasyonu

In vitro çalışmalarda, kurulan denemenin başarılı bir şekilde sonuca ulaşmasını sağlayan en önemli aşama sterilizasyondur. Çalışmanın her döneminde sağlanan başarının içinde sterilizasyonun payı büyüktür. Bu çalışmada, sterilizasyon, kullanılan malzemelerin, sıvı ya da katı ortamların ve eksplantın sterilizasyonu olmak üzere üç şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1 Malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan malzemeler, kuru ya da buharlı sterilizasyona uygun malzemeler arasından seçildi. Cam malzemeler ısıya dayanıklı kağıtlara sarılarak kuru sterilizatörde 180°C sıcaklıkta 2 saat süreyle sterilize edildi. Bu malzemeler daha sonra, her steril kabin çalışması öncesi %70'lik etil alkolle silinerek temizlenmiş ve 10 dakika boş olarak çalıştırılmış steril kabine alınarak, kağıtlardan çıkarıldı ve kullanıldı (Özgen vd. 1998).

Steril koşullarda yapılan çalışmalarda, kuru sterilizatörde belirli bir süre bekletilerek sterilizasyonu sağlanan ısıya dayanıklı cam malzemeler dışında, steril kabin içerisinde kullanılan diğer malzemelerin de sterilizasyonu gereklidir. Bu amaçla, çalışma sırasında steril kabinde sürekli bulunan ve hemen her aşamada kullanılan pens ve bistüri gibi metal malzemelerin de yeteri kadar steril olması için bu aletler kabin içerisinde %70'lik etil alkol içeren kavanozda bekletilerek her kullanım öncesinde sürekli yanan doğalgaz alevinden geçirildi. Böylelikle metal malzemelerden eksplanta bakteri ve mantar çeşitlerinin geçişi engellenmiş oldu.

3.2.2.2 Ortamların sterilizasyonu

Steril koşullarda ve steril malzemelerle yapılan çalışmada gerek kullanılan saf su gerekse sıvı ya da katı ortamların da sterilizasyonu gereklidir. Laboratuvarda en çok kullanılan malzemelerden biri saf sudur. Çalışmanın yürütüldüğü laboratuvarda, suyun kaynatılıp buharının soğutulması ve bu yolla damıtılması esasına dayanan destilasyon yöntemiyle elde edilen saf su, ağzı kapatılabilen cam kavanozlara doldurularak otoklavda sterilizasyon için hazır hale getirildi. Otoklav, su buharı basıncıyla sterilizasyon yapmakta olup, saf su için 121°C ve 15 psi basınç altında 25 dakikalık bir süre yeterli olmaktadır. Bu çalışmada saf su gibi çokça kullanılan diğer sıvı ya da katı ortamların sterilizasyonu otoklav kullanılarak anlatıldığı şekilde yapıldı. Otoklavlanma işleminin ardından steril hale gelen sıvılar kapakları sıkıca kapatılarak soğumaya bırakıldı. Yeteri kadar soğuduktan sonra steril kabine alınan steril saf sular yüzey

sterilizasyonu, ortamlar ise kallus oluşumu, kallus gelişimi, vernalizayon ve rejenerasyon aşamalarında kullanıldılar (Özgen vd. 1998).

3.2.2.3 Eksplantların yüzey sterilizasyonu

Olgunlaşmış tohumlarda yüzey sterilizasyonu, steril kabin içerisinde ve daha önceden kuru sterilizatörde kullanıma hazır hale getirilen malzemeler kullanılarak yapıldı. Bu amaçla, steril kabin içerisine manyetik karıştırıcı, cam kavanoz içine %70'lik etil alkol ve pens-bistüri-kaşık, yeteri kadar steril saf su ve sürekli yanan doğalgaz alevi yerleştirildi. Yüzey sterilizasyonunun ilk aşamasında daha önceden hazırlanmış olan iri tohumlar manyetik karıştırıcı üzerinde %70'lik etil alkolde 5 dakika bekletildikten sonra birkaç kez durulandı. İkinci aşamada ise tohumlar ticari çamaşır suyu (Sodyum hipoklorit) içerisinde 20 dakika bekletildi ve yine birkaç kez durulandı. Tamamlanan yüzey sterilizasyonunun ardından tohumlar embriyo gevşetme işleminin kolaylıkla yapılabilmesi amacıyla yine steril saf su içerisinde 33°C'de 2 saat süreyle bekletildiler (Özgen vd. 1998).

3.2.3 Ortam hazırlığı

Hücre, doku ve organlar ancak uygun besin maddelerini içeren ortamda gelişebilmektedir. Bütün besin ortamlarının temeli gerekli makro ve mikro elementlerin mineral tuzları ile, karbon kaynağı olarak şekerin belirli miktarlarda karıştırılmasıdır. Ancak, her bitki ve uygulanacak kültür türü için bu temel elementlere çeşitli inorganik ve organik bileşiklerden ilave edilmektedir. Çeşitli araştırıcılar tarafından hazırlanmış olan ve onların adları ile anılan besin ortamları bulunmakta olup, 5CS, MS, B5, B, N, SH,ve CC bunlara örnek olarak verilebilir.

Bu ortamları laboratuvarda hazırlayıp kullanmak mümkün olsa da, ortamlarda kimyasal maddeler çok küçük miktarlarda kullanıldığından, her seferinde bunları hazırlamak sorun yaratmaktadır. Bu araştırmada kallus gelişimi ve rejenerasyon aşamalarında hazır paketler halinde MS (Murashige and Skoog 1962) ortamı kullanıldı. MS ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 MS ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

Ortamda Bulunan Maddeler		**Yoğunluk (mg/L)**
Makro Elementler	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$CaCl_2$. $2H_2O$	440
	$MgSO_4.7H_2O$	370
	KH_2PO_4	170
Mikro Elementler	Kl	0,83
	H_3BO_3	6,2
	$MnSO_4.4H_2O$	22,3
	$ZnSO_4.7H_2O$	8,6
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25
	$CuSO_4.5H_2O$	0,025
	$CoCl_2.6H_2O$	0,025
	$FeSO_4.7H_2O$	27,8
	$Na_2EDTA.2H_2O$	37,3
Vitaminler	Inisitol	100
	Nicotinic Asit	0,5
	Pridoksin-HCl	0,5
	Thiamine-HCl	0,1
	Glisin	2

3.2.3.1 Kallus oluşumu ortamının hazırlanması

Endosperm destekli olgun embriyolarda kallus oluşumu yönteminin uygulandığı araştırmada, kallus oluşumunun sağlanması amacıyla sıvı 2,4-D kullanıldı. Ortam, manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilen beher içerisinde hazırlandı. Kallus oluşumu için 8 mg/L 2,4-D kullanıldı ve ortamın pH'sı 5.8'e ayarlandı. Hazırlanan sıvı ortam

otoklavda 121°C'de, 15 psi basınç altında 25 dakikada steril edildi. Otoklavdan çıkarılan ortamdan kallus oluşumu için her bir petriye 7 ml kullanıldı.

3.2.3.2 Kallus gelişimi ortamının hazırlanması

Endosperm destekli olgun embriyo yöntemi uygulanarak oluşturulan kallusların rejenerasyon aşamasından önce gelişimlerinin sağlanması amacıyla belli bir süreyi kallus gelişimi ortamında geçirmeleri gerekmektedir. Denemede kallus gelişimi için, 2 mg/L glisin, 20 mg/L sukroz, 7 mg/L agar ve MS kullanıldı ve ortamın pH'sı 5.8'e ayarlandı. Ortam 121°C'de, 15 psi basınç altında 25 dakikada otoklavda steril edildi. Sterilizasyonu tamamlanan ortamlar, daha önceden steril edilmiş 10 cm'lik petri kaplarına döküldü ve katılaşmalarının ardından bu ortamlar kullanıldı (Özgen vd. 1998).

3.2.3.3 Rejenerasyon ortamının hazırlanması

Gelişimlerini tamamlayan kalluslarda, sürgün ve kök oluşumu ve gelişimini sağlamak amacıyla rejenerasyon ortamı hazırlandı. Rejenerasyon için yine 2 mg/L glisin, 20 mg/L sukroz, 7 mg/L agar ve MS kullanıldı ve daha önceki ortamlar gibi steril edildi. Hazırlanan rejenerasyon ortamı yine steril koşullarda olmak üzere ilk rejenerasyon için 10 cm'lik petri kaplarına, ikinci rejenerasyon için ise magenta kaplarına döküldü ve katılaşınca steril koşullarda kullanıldı.

3.2.4 Kallus oluşumu

Yüzey sterilizasyonu tamamlanan ve steril koşullarda, steril saf su içerisinde 2 saat süreyle 33°C'de tutulan tohumlar, kallus oluşumunun sağlanması için steril kabinde embriyo gevşetme işlemine alındılar. Endosperm destekli olgun embriyolardan kallus oluşumu için Özgen vd. (1998) tarafından geliştirilen yöntemden yararlanıldı. Bunun için, pens ve bistüri yardımıyla embriyo, kalkancık tabakasının hizasında endosperme yapışık olduğu yerden hafifçe kaldırıldı ancak embriyo tohumdan tamamen ayrılmadan tohum üzerinde bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan tohumlar karın kısmı aşağı gelecek şekilde petri kaplarına yerleştirildi ve kallus oluşumu için hazırlanan 2,4-D ilave edildi. Böylece ilave edilen 2,4-D ile kallus oluşumu gerçekleştirilirken, gereksinim duyulan

besin maddeleri, embriyo ile bağlantısı kesilmeyen tohumdaki endosperm tarafından sağlanmış oldu. Petri kapları karanlık inkübatöre alındı ve 11 gün süreyle 26°C'de tutuldu. Bu süre sonunda oluşan kalluslar, gelişimlerinin sağlanması için kallus gelişimi ortamına alındı.

3.2.5 Kallus gelişimi

Kallus aşaması oluşumu takip eden kallus gelişimi ile sürdürüldü. Bunun için kalluslar, (pens ve bistüri yardımıyla) oluştukları tohumlardan ayrılarak kallus gelişimi için daha önceden hazırlanan ortama yerleştirildiler. Petri kapları içindeki kalluslar, 26°C'deki karanlık inkübatörde 21 gün süreyle tutuldular.

3.2.6 Kallus vernalizasyonu

Tahılların sapa kalkmaları için gereksinim duydukları ve doğada vejetatif dönem başında, çimlenme-kardeşlenme ve sapa kalkma arasında fotosentez minimumu yakınlarındaki sıcaklıklarda kalmaları olarak açıklanan vernalizasyonun, *in vitro* koşullarda ve kallus aşamasında denenmesi amacıyla kalluslar vernalize edildi. Kallus vernalizasyonu için petri kapları içerisine kallus gelişimi amacıyla kullanılan ortama yerleştirilen kalluslar, ortamları tazelenerek 5°C sıcaklıktaki karanlık ortama (buzdolabı) alındılar. Burada farklı haftalar boyunca (K, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 15 hafta) tutuldular. 4 haftadan daha uzun süre vernalize edilen kalluslarda kullanılan ortamlar, her 4 haftada bir yenisiyle değiştirildi. Belirlenen sürelerde vernalizasyonları tamamlanan kalluslar rejenerasyon aşamasına alındılar.

3.2.7 Rejenerasyon

Oluşturulan kalluslarda sürgün ve kök oluşumu ve gelişiminin sağlanması amacıyla rejenerasyon uygulandı.

Eksplantlar kültür kapları içinde rejenerasyon ortamına yerleştirildikten sonra ısı, ışık ve nem bakımından kontrollü iklim odasında gelişmeye bırakıldı.

3.2.7.1 Vernalize edilen kalluslarda rejenerasyon

21 gün boyunca 26°C'deki karanlık inkübatörde tutularak gelişimlerini tamamlayan ve kallus vernalizasyonu için belirlenen sürelerde (K, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 15 hafta) vernalizasyonlarını tamamlayan kalluslar, rejenerasyonlarının sağlanacağı koşullara aktarıldılar.

Vernalize edilen kalluslar önce petri kaplarındaki taze ortamlara aktarılarak rejenere hale gelebilmeleri için 4 hafta süreyle 16 saatlik fotoperiyodda (1500 Lux) ve 25±1°C sıcaklıktaki kültür odasında büyütüldüler.

Dört haftanın sonunda 10-12 mm yüksekliğe ulaşan rejenere bitkiler, ikinci bir 4 haftalık süreyi yine aynı koşullardaki kültür odasında ancak taze ortam içeren magenta kapları içinde geçirdiler. Bu süre sonunda bitkicikler 10-15 cm yüksekliğe ulaştı ve rejenerasyon tamamlanmış oldu.

3.2.7.2 Vernalize edilmeyen kalluslarda rejenerasyon

Rejenere bitkicik vernalizasyonunda, 21 günlük kallus gelişiminin ardından kalluslar rejenerasyonun sağlanması amacıyla ortamları tazelenerek kültür odasına alındılar. 16 saatlik fotoperiyod ve 25±1°C'deki kültür odasında petri kapları içerisinde 4 hafta süreyle tutulan kalluslar, 10-12 mm uzunluğa ulaştı ve rejenere hale geldiler.

Dört haftalık bir sürenin ardından rejenere hale gelen kalluslar, bu defa içerisinde taze ortam bulunan magenta kaplarına aktarıldılar ve yine 16 saatlik fotoperiyod ve 25±1°C'deki kültür odasında tutularak 10-15 cm yüksekliğinde bitkicikler haline geldiler.

3.2.8 Rejenere bitki vernalizasyonu

Kallus gelişimi ile petri kaplarında ve magenta kaplarında 4'er haftalık rejenerasyonun ardından 10-15 cm yüksekliğe ulaşan bitkicikler, rejenere bitkilerde vernalizasyon için ortamları tazelenerek soğuk ortama alındılar. Magenta kapları içinde 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve

15 hafta boyunca Ankara'nın doğal iklim koşullarına (sıcaklık ve ışık) 22.01.2004 – 04.04.2004 tarihleri arasında maruz bırakılan rejenere bitkiler, sadece rejenere bitkilerin zarar görebileceği kadar düşük gece sıcaklıklarında, 4°C'ye ayarlanmış buzdolabına yerleştirildiler.

Bu vernalizasyon süreleri boyunca 4 haftanın üzerinde soğuğa maruz bırakılan (soğuklatılan) bitkiciklerin ortamları her 4 haftada bir tazelenerek bulundukları ortamdaki bitki besin maddelerinin sürekli olarak gerekli düzeyde tutulması sağlandı. Ayrıca deneme programı hem bitkilerin doğal gelişim sürecinde soğuklatılma dönemleri hem de Ankara'da vernalizasyon etkisi yaratacak sıcaklıkların oluştuğu dönemler dikkate alınarak yapıldı ve bitkiciklerde vernalizasyonun denendiği bu süre boyunca her gün Ankara'daki en yüksek ve en düşük sıcaklıklar kaydedildi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Rejenere bitkilerde vernalizasyon uygulanan dönemde Ankara'da en düşük ve en yüksek sıcaklıklar

TARİH	EN DÜŞÜK SICAKLIK (°C)	EN YÜKSEK SICAKLIK (°C)
22.01.2004	4,6	8,8
23.01.2004	-6,0	6,0
24.01.2004	-9,0	-3,1
25.01.2004	-8,2	-0,8
26.01.2004	-1,6	3,2
27.01.2004	-0,3	2,4
28.01.2004	-2,1	2,0
29.01.2004	0,8	11,7
30.01.2004	4,4	7,4
31.01.2004	1,2	6,2
01.02.2004	-2,0	5,2
02.02.2004	-1,9	3,6
03.02.2004	1,0	5,2
04.02.2004	-0,1	5,6
05.02.2004	-4,2	4,4
06.02.2004	2,0	8,5
07.02.2004	3,4	14,8
08.02.2004	2,6	17,5
09.02.2004	2,2	13,9
10.02.2004	0,1	9,5
11.02.2004	-5,0	1,6
12.02.2004	-4,2	7,4
13.02.2004	-5,9	5,5
14.02.2004	-9,3	-5,4
15.02.2004	-13,4	-4,6
16.02.2004	-5,6	0,0
17.02.2004	-9,8	0,2
18.02.2004	-6,0	2,0
19.02.2004	-3,4	3,0
20.02.2004	-1,4	1,9
21.02.2004	-6,6	1,7
22.02.2004	-8,3	0,2
23.02.2004	-6,0	-0,2
24.02.2004	-2,8	9,8
25.02.2004	2,8	12,6
26.02.2004	5,9	16,4
27.02.2004	5,2	14,0

Çizelge 3.2 Rejenere bitkilerde vernalizasyon uygulanan dönemde Ankara'da en düşük ve en yüksek sıcaklıklar (devam)

TARİH	EN DÜŞÜK SICAKLIK (°C)	EN YÜKSEK SICAKLIK (°C)
28.02.2004	12,2	19,1
29.02.2004	12,1	16,4
01.03.2004	8,5	16,0
02.03.2004	4,8	15,5
03.03.2004	2,0	14,0
04.03.2004	5,6	14,6
05.03.2004	-1,0	13,8
06.03.2004	-3,9	0,3
07.03.2004	-7,0	1,6
08.03.2004	-5,9	6,1
09.03.2004	-4,3	10,4
10.03.2004	1,6	10,0
11.03.2004	0,0	5,2
12.03.2004	-3,0	7,6
13.03.2004	1,0	6,8
14.03.2004	-2,2	6,6
15.03.2004	-3,2	9,2
16.03.2004	-0,4	13,0
17.03.2004	-1,6	10,7
18.03.2004	2,6	10,4
19.03.2004	-1,2	11,4
20.03.2004	-1,2	17,0
21.03.2004	0,6	19,4
22.03.2004	4,2	21,8
23.03.2004	2,8	23,0
24.03.2004	8,0	22,9
25.03.2004	7,8	17,8
26.03.2004	6,4	17,0
27.03.2004	11,2	18,2
28.03.2004	12,8	23,0
29.03.2004	5,4	17,9
30.03.2004	-0,2	12,4
31.03.2004	0,6	13,8
01.04.2004	1,8	16,0
02.04.2004	5,4	14,2
03.04.2004	-3,0	10,6
04.04.2004	-4,4	7,8

3.2.9 Bitkilerin yetiştirilmesi

Gerek kallus vernalizasyonu sonunda 16 saatlik fotoperiyod ve 25±1°C'de magenta kapları içerisinde, kültür odasında yetiştirilerek 10-15 cm yüksekliğe ulaşan bitkiciklerde, gerekse aynı koşullardaki kültür odasında yetiştirilerek 10-15 cm yüksekliğe ulaşan ve ardından vernalize edilen bitkiciklerde en önemli aşamalardan biri, bu bitkiciklerin yüzey sterilizasyonundan itibaren bulundukları yapay ve steril ortamlardan alınarak topraklı saksılara aktarılması ve yaşamalarının sağlanmasıdır.

Kültürdeki bitkilerin toprağa aktarılması ve yaşamını sürdürmesi oldukça güç olduğundan, kültürlerin sera ya da tarlaya aktarılmadan önce bir ara dönem ile alıştırılması (aklimatizasyonu) gerekmektedir. *In vitro* koşullarda yetiştirilen bitkilerde stomaların açık olması, birim alandaki stoma sayısının çok fazla olması ve kütikülar tabakada mumsu yapının olmaması gibi nedenlerle, normal koşullara alındığında aşırı derecede su kaybı olmaktadır. Bunu önlemek amacıyla bitki normal ortama alındığında aşırı nemli bir geçiş döneminde alıştırılması yapılmaktadır.

Dolayısıyla gerek kallus vernalizasyonu gerekse rejenere bitkicik vernalizasyonu sonunda iklim odasına aktarılacak hale gelen bitkicikler, 1:1:3 oranında kum, perlit ve turba toprağı karışımından oluşan saksılara aktarılarak 25±1°C'de 16 saatlik fotoperiyodda 30 gün süreyle büyütüldüler. %90'la başlayan ortam nemi periyodik olarak azaltılarak bitkiler alıştırıldı ve 30 günün sonunda yaşayan bitkiler seraya alındılar.

3.2.10 Sera aşaması

İklim odasında kum, perlit ve turba toprağı karışımı içeren saksılarda, 16 saatlik fotoperiyod ve 25±1°C'de yetiştirilerek belli bir büyüklüğe ulaşan bitkiler normal iklim koşullarına uyum sağlayabilecek hale geldiler. Bu aşamadan sonra bitkiler seraya alınarak burada 30 gün süreyle büyütüldüler. Seraya alınan bitkiler gövde ve kök gelişimlerini, dolayısıyla da uyumlarını sağladılar. Bu aşama sonunda bitkilerde başak oluşumları gözlendi.

3.2.11 Fotoğraf çekimleri

Denemenin de her aşamasında elde edilen sonuçların fotoğrafları çekildi. Çekimlerin bir kısmı Sony digital video camera recorder (Model no: DCR-IP220E) ile CarlZeiss Vario-Sonner 1,8/4,5-45 120xdigital zoom mercek kullanılarak 2,11 megapixels (Gross) ve 1,92 megapixels (effective/still) çözünürlükte yapıldı, bir kısmı ise standart fotoğraf makinesinde 100 asalık renkli film kullanılarak yapıldı.

3.2.12 Verilerin elde edilmesi

Çalışma sırasında her iki yönteme ilişkin olarak istatistiki değerlendirmelerin yapılabilmesi için çeşitli aşamalarda ölçümler yapıldı.

Kallus oluşum yüzdesi, kallus oluşumu aşaması sonunda her petride oluşan kalluslar sayılarak ve yüzde değerlere çevrilerek belirlendi.

Kallus ağırlığı, kallus vernalizasyonu uygulanan kalluslar için kallus gelişiminin sonu kallus vernalizasyonunun başlangıç aşaması olan 21. gün sonunda, rejenere bitkicik vernalizasyonu için ise yine kallus gelişiminin sonu olup, bu defa oluşan kallusların sürgün oluşumunu başlatmak amacıyla rejenerasyon ortamına aktarılmadan önceki 21. gün sonundaki taze ağırlık olarak belirlendi.

Rejenerasyon kapasitesi, rejenerasyon aşaması sonunda rejenere hale gelen kallusların, sürenin başında rejenerasyon ortamına yerleştirilen kalluslara olan oranı olarak hesaplandı. Kültür etkinliği ise rejenerasyon aşaması sonunda rejenere hale gelen kallusların, deneyde kullanılan embriyo sayısına oranı olarak belirlendi.

Uygulanan kültür aşamaları sonunda kök ve yaprak oluşturarak topraklı saksılara aktarılan bitki sayıları, saksıya aktarılan bitki sayısı; başak oluşturan bitkilerin sayısı ise başaklı bitki sayısı olarak belirlendi.

3.2.13 Verilerin değerlendirilmesi

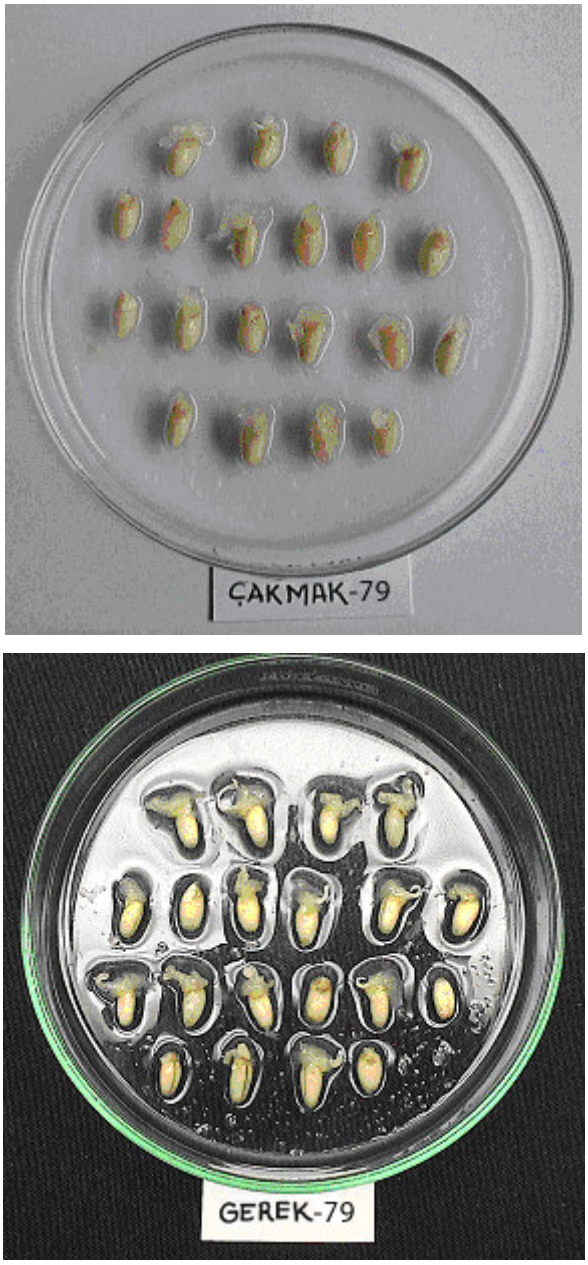
Çakmak-79 ve Gerek-79 çeşitlerinde iki farklı vernalizasyon yöntemi ve 8 farklı vernalizasyon süresi için 3 tekrarlamalı olarak yürütülen bu çalışmada, incelenen karakterler için ayrı ayrı elde dilen veriler MSTAT-C programı kullanılarak istatistiki analizleri yapıldı. Vernalizasyon haftaları arasındaki farkın belirlenmesinde varyans analizi ve Asgari Önemli Fark (AÖF) testinden, vernalizasyon yöntemleri arasındaki farklılığın belirlenmesinde ki-kare bağımsızlık testinden yararlanıldı (Düzgüneş 1983).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Ülkemiz tarımında hem yetiştiricilik hem de genetik materyal olarak önem taşıyan Çakmak-79 ve Gerek-79 buğday çeşitlerinde; olgunlaşmış embriyolardan endosperm destekli kallus oluşumu yöntemi uygulanarak elde edilen kalluslar ile bunlardan oluşan rejeneratif bitkilerin vernalizasyonlarının *in vitro* koşullarda sağlanma potansiyellerinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan gözlemlerden elde edilen sonuçlar ile tartışma ve değerlendirmeler bu bölümde sunulmuştur.

Araştırmada, Çakmak-79 ve Gerek-79 buğday çeşitlerinin olgun taneleri endosperm destekli kallus oluşumu yöntemi uygulanmak üzere, 2,4-D içeren sıvı ortama konulduktan 3-4 gün sonra kallus oluşumu başlamış ve 11 gün sonunda oluşumunu tamamlayan kalluslar (Şekil 4.1), kallus geliştirme ortamına alınmıştır. Kalluslar, kallus oluşum oranları ile kallus ağırlıkları belirlenerek, 5°C'de belirli sürelerde (K, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 15 hafta) uygulanan vernalizasyon sonrasında rejenerasyon ortamlarına alınmış ve 1 hafta sonunda rejenere hale gelmeye başlayan bitkicikler 1 ay süreyle petri kaplarında, 1 ay süreyle de magenta kaplarında uygun besi ortamı içerisinde kalarak rejenerasyon aşamasını tamamlamışlardır. İklim odasındaki alıştırma döneminden sonra seraya alınan bitkilerde, bitki gelişimi ile başak oluşumları gözlenmiştir.

Rejenere bitkiciklerde vernalizasyon uygulamasında ise, endosperm destekli kallus oluşumu yöntemi uygulanarak, 2,4-D içeren sıvı ortamda 3-4 gün içerisinde başlayan ve 11 gün sonunda oluşumları tamamlanan kalluslarda, yine uygun ortamda kallus gelişimi sağlanmış ve 21 gün sonunda, kallus oluşum oranları ile kallus ağırlıkları belirlenerek rejenerasyon ortamına yerleştirilmişlerdir. Bir ay süreyle petri kaplarında, 1 ay süreyle de magenta kapları içerisinde olmak üzere toplam 2 aylık sürede rejenerasyonlarını tamamlayan bitkiciklerde, uygulamaya vernalizasyonla devam edilmiştir. Belirli sürelerde (K, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 15 hafta) vernalize edilen ve iklim odası ile serada yetiştirilen bitkilerin vernalizasyonun etkisine bağlı olarak bitki gelişimi ile başak oluşumları incelenmiştir.



Şekil 4.1 Çakmak-79 ve Gerek-79 çeşitlerinde endosperm destekli olgun embriyolarda kallus oluşumu yöntemiyle elde edilen kalluslar.

4.1 Çakmak-79 Çeşidinin Kallus Aşamasındaki Vernalizasyona Tepkileri

Olgun embriyolarda endosperm destekli kallus oluşumu yöntemiyle Çakmak-79 çeşidinden elde edilen kalluslar, bu aşamada vernalize edildiğinde, kültürlerden elde edilen verilere uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Çakmak-79 çeşidinde kallus vernalizasyonuna ilişkin varyans analizi sonuçları (Kareler Ortalaması)

V.K.	S.D.	K.O.	K.A.	E.B.K.A.	R.K.	K.E.	S.A.B.S.	B.B.S.
Tekerrür	2	21,8	0,06	0,00	18,34	7,29	0,97	0,5
Vern.Süre. (Haftalar)	7	102,2*	0,49**	0,001**	1.526,89**	1.578,57**	10,09**	1,71*
Hata	14	29,1	0,06	0,00	55,47	33,48	0,327	0,643

(S.D.: Serbestlik Derecesi, K.O.:Kallus Oluşumu, K.A.: Kallus Ağırlığı, E.B.K.A.: Embriyo Başına Kallus Ağırlığı, R.K.: Rejenerasyon Kapasitesi, K.E.: Kültür Etkisi, S.A.B.S.: Saksıya Aktarılan Bitki Sayısı, B.B.S.: Başaklı Bitki sayısı)
*) Ortalamalara ilişkin olarak %5 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.
**) Ortalamalara ilişkin olarak %1 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi incelenen özellikler bakımından kallus oluşumu ve başaklı bitki sayısı %5 düzeyinde; kallus ağırlığı, embriyo başına kallus ağırlığı, rejenerasyon kapasitesi, kültür etkisi ve saksıya alınan bitki sayısı ise %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Benzer şekilde delice *(Lolium temulentum)* ile çalışan ve birçok eksplant kullanan Arumunganathan *et al.* (1991), olgunlaşmamış embriyolara 2°C'de uyguladığı vernalizasyonda başakçık sayısının etkilenmediğini ancak incelenen diğer özelliklerin vernalizasyon haftasına göre farklılıklar gösterdiğini belirlemişlerdir.

Kallus oluşumunda farklı grup sayısı %1'e göre 3 ve %5'e göre 6 olarak belirlenirken, kallus ağırlığı ve embriyo başına kallus ağırlığında vernalizasyon süreleri 5 farklı gruba düşmüştür. Bu süreler rejenerasyon kapasitesi için 6 olarak belirlenirken, kültür etkisinde %1'e göre 6 ve %5'e göre 5, saksıya alınan bitki sayısında ise %1'e göre 5 ve %5'e göre 6 farklı grupta toplanmıştır. Başaklı bitki sayısında ise farklı grup sayıları %1'e ve %5'e göre 3 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2'de kallus oluşumunun %80,00-96,67, kallus ağırlığının 1,06-2,48 g, embriyo başına kallus ağırlığının 0,07-0,13 g, rejenerasyon kapasitesinin %22,47-93,13, kültür etkisinin %20,00-90,00, saksıya alınan bitki sayısının 4-19 adet, başaklı bitki sayısının 3-9 adet arasında değiştiği görülmektedir.

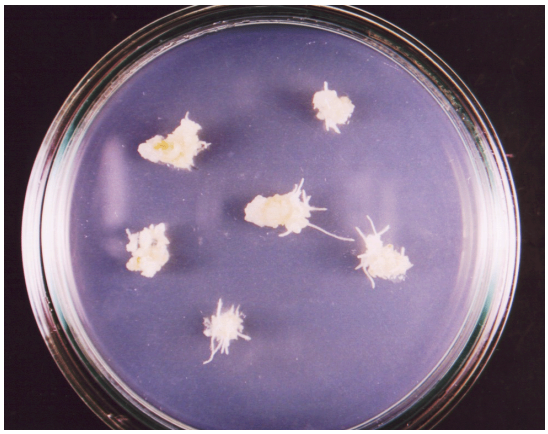
Çizelge 4.2 Çakmak-79 çeşidinde kallus vernalizasyonuna ilişkin kültür tepkileri

Vern. Süreleri (Haftalar)	Kallus Oluşumu (%)			Kallus Ağırlığı (g)			Embriyo Başına Kallus Ağırlığı (g)			Rejenerasyon Kapasitesi[1] (%)			Kültür Etkisi[2] (%)			Saksıya Alınan Bitki Sayısı			Başaklı Bitki Sayısı		
K	95,00	ab	1	2,02	b	12	0,11	bc	12	73,90	b	2	70,00	b	2	9,00	d	3	6,00	ab	12
2	95,00	ab	1	1,92	bc	12	0,10	bc	12	57,87	c	23	55,00	c	3	16,00	b	12	3,00	b	2
4	86,67	bcd	12	1,85	bc	2	0,11	ab	12	63,93	bc	2	55,00	c	3	19,00	a	1	9,00	a	1
6	80,00	d	2	1,57	c	23	0,10	bc	2	43,73	d	34	35,00	d	4	11,00	cd	3	6,00	ab	12
8	96,67	a	1	2,48	a	1	0,13	a	1	93,13	a	1	90,00	a	1	13,00	c	23	9,00	a	1
10	86,67	bcd	12	1,70	bc	2	0,09	bc	2	36,50	d	45	31,67	d	45	9,00	d	3	6,00	ab	12
12	90,00	abc	12	1,63	bc	23	0,09	c	23	22,47	e	5	20,00	e	5	4,00	e	4	3,00	b	2
15	85,00	cd	12	1,06	d	3	0,07	d	3	43,20	d	34	36,67	d	4	13,00	c	23	6,00	ab	12
Toplam				14,23			0,8									84			48		
Ortalama	89,37±2,06			1,78±0,14			0,10±0,006			54,34±7,97			49,17±8,11			11,75±1,63			6±0,80		
AÖF(%5)	9,434			0,4430			0,01751			13,04			10,13			4,17			4,21		
AÖF(%1)	13,09			0,6149			0,02431			18,10			14,06			3,01			5,85		

[1]) Rejenere olabilen kallusların sayısı (yeşil noktalı nodüler kallusların sayısı)/oluşan tüm kallusların sayısı *100

[2]) Rejenere olabilen kallusların sayısı/kültüre alınan embriyo sayısı*100

*)Ortalamalara ilişkin farklı harfler %5, farklı rakamlar ise %1 düzeyinde farklı grupları göstermektedir.



Şekil 4.2 Çakmak-79 çeşidinde kallus vernalizasyonu uygulamasında 8 hafta boyunca soğuk uygulanan kalluslar

Kallus aşamasında vernalize edilen Çakmak-79 çeşidinde, incelenen özellikler bakımından en yüksek değerler, 8 hafta kallus vernalizasyonu uygulanan kültürlerden elde edilmiştir (Şekil 4.2).

Benzer sonuçlar Sharma and Mascia (1987) tarafından da ortaya konulmuştur. Kışlık buğday genotiplerinde olgunlaşmamış embriyolarla çalışan araştırıcılar, vernalizasyonun sağlanma yüzdelerinin en yüksek 6 haftalık vernalizasyonda gerçekleştiğini ve bu oranın %48,7-100 arasında olduğunu, vernalizasyon tepkisinin genotiplere göre büyük farklılıklar gösterdiğini belirtmişlerdir (Sharma and Mascia 1987). Benzer çalışmalar yapan Gardner and Barnett (1990) de genotipe göre değişmekle birlikte, 6-8 haftalık soğuk uygulamasının genellikle vernalizasyon gereksiniminin karşılanması için yeterli olduğunu belirtmişlerdir. Bulgularımız, bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

4.2 Gerek-79 Çeşidinin Kallus Aşamasındaki Vernalizasyona Tepkileri

Gerek-79 çeşidinde endosperm destekli kallus oluşumu yöntemiyle olgun embriyolarda kallus aşamasında vernalize edilen kalluslardan alınan verilere uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3'de de görüldüğü gibi kallus oluşumu, kallus ağırlığı ve embriyo başına kallus ağırlığı açısından vernalizasyon haftaları arasındaki farklılığın önemli olmadığı ($P>0,05$) görülmektedir. Gerek-79 çeşidinde rejenerasyon kapasitesi, kültür etkisi, saksıya alınan bitki sayısı ve başaklı bitki sayısı bakımından uygulamalar arasındaki farklılıklar ise önemli ($P<0,01$) olarak belirlenmiştir.

Bu farklılıkların nedenini belirlemek için yapılan AÖF testi sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir. Gerek-79 çeşidinde kallus aşamasında vernalizasyon uygulamasında, rejenerasyon kapasitesine ilişkin vernalizasyon sürelerinin %1'e göre 7, %5'e göre 5 farklı gruba düştüğü görülmektedir. Vernalizasyon süreleri kültür etkisi açısından %1'e göre 6 ve %5'e göre 5 farklı grupta toplanırken, saksıya alınan bitki sayısı ve başaklı bitki sayısı açısından bu süreler %1 ve %5'e göre 4 farklı gruba düşmüştür.

Çizelge 4.3 Gerek-79 çeşidinde kallus vernalizasyonuna ilişkin varyans analizi sonuçları (Kareler Ortalaması)

V.K.	S.D.	K.O.	K.A.	E.B.K.A.	R.K.	K.E.	S.A.B.S.	B.B.S.
Tekerrür	2	38,54	0,06	0,00	12,13	7,87	0,125	1,625
Vern. Süre. (Haftalar)	7	99,40	0,31	0,001	1.117,26**	674,57**	60,708**	34,66**
Hata	14	123,06	0,26	0,001	74,12	56,45	0,89	2,339

*) Ortalamalara ilişkin olarak %5 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.
**) Ortalamalara ilişkin olarak %1 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.4 Gerek-79 çeşidinde kallus vernalizasyonuna ilişkin kültür tepkileri

Vern. Süreleri (Haftalar)	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Embriyo Başına Kallus Ağırlığı (g)	Rejenerasyon Kapasitesi[1] (%)			Kültür Etkisi[2] (%)			Saksıya Alınan Bitki Sayısı			Başaklı Bitki Sayısı		
K	82,00	1,815	0,11	61,27	ab	123	50,00	ab	12	17,00	c	3	3,00	c	3
2	88,00	1,780	0,10	63,33	a	12	51,67	ab	12	24,00	b	2	12,00	b	23
4	85,00	1,465	0,08	47,37	bc	23	40,00	bc	2	36,00	a	1	21,00	a	12
6	90,00	1,205	0,07	70,53	a	1	60,00	a	1	36,00	a	1	24,00	a	1
8	93,00	1,990	0,11	41,67	c	34	41,67	bc	2	39,00	a	1	27,00	a	1
10	93,00	1,883	0,10	22,27	d	45	21,67	d	34	10,00	d	4	6,00	bc	3
12	88,00	1,482	0,08	16,27	d	5	16,00	d	4	7,00	d	4	3,00	c	3
15	77,00	1,122	0,07	48,13	bc	23	35,00	c	23	8,00	d	4	3,00	c	3
Toplam		12,742	0,72	-			-			177			99		
Ortalama	87,00±1,95	1,593±0,11	0,09±0,017	46,36±6,82			39,50±5,30			22,13±4,77			12,38±3,61		
AÖF(%5)				15,08			13,16			4,95			8,04		
AÖF(%1)				20,93			18,26			6,87			11,15		

[1]) Rejenere olabilen kallusların sayısı (yeşil noktalı nodüler kallusların sayısı)/oluşan tüm kallusların sayısı *100

[2]) Rejenere olabilen kallusların sayısı/kültüre alınan embriyo sayısı*100

*)Ortalamalara ilişkin farklı harfler %5, farklı rakamlar ise %1 düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

Şekil 4.3 Gerek-79 çeşidinde 6 hafta vernalizasyon uygulanmış kalluslarda rejenerasyon başlangıcı

%1 ve %5'e göre farklılıklarının önemli olarak belirlendiği rejenerasyon kapasitesi %16,27-70,53, kültür etkisi %16-60, saksıya alınan bitki sayısı 7-39 adet, başaklı bitki sayısı 3-27 adet arasında değişmiştir.

En yüksek rejenerasyon kapasitesinin (%70,53) ve en yüksek kültür etkisinin (%60) 6 haftalık vernalizasyon uygulamasından (Şekil 4.3), en yüksek bitki sayısının ise ortalama 39 bitki ile, en fazla başaklı bitki sayısının 27 bitki ile 8. haftada olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4). Sharma and Mascia (1987), olgunlaşmamış embriyolarda 3 ve 4 haftalık vernalizasyonun bazı kışlık genotiplerde beklenen etkiyi yaratmadığını ve vernalizasyonun sağlanamadığını belirtmişlerdir. Vernalizasyon tepkisine etki eden faktörleri çeşit, uygulama süresi, uygulama yöntemi, bitkinin gelişmişlik devresi ve büyütme hormonları olduğunu belirten Whelan and Schaalje (1992)'de olgunlaşmamış embriyo kültürlerinden elde edilen bitkilerin başak oluşturabilmesi için 4 haftalık vernalizasyona gereksinim duyduğunu, ancak olgunlaşmış embriyolarda 6 haftanın gerektiğini belirtmişlerdir.

4.3 Çakmak-79 Çeşidinin Rejenere Bitkicik Vernalizasyonuna Tepkileri

Endosperm destekli kallus oluşumu yöntemiyle elde edilen kalluslardan geliştirilen rejenere Çakmak-79 bitkiciklerinde, bu aşamada vernalizasyon uygulamasında, elde edilen verilere yapılan varyans analizinin sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge'den incelenen özelliklerden kallus oluşumu, kallus ağırlığı, embriyo başına kallus ağırlığı, rejenerasyon kapasitesi ve başaklı bitki sayısı bakımından uygulama süreleri arasındaki farklılıkların istatistiki açıdan önemli olmadığı (P>0,05), kültür etkisi ve saksıya alınan bitki sayısının önemli olduğu (P<0,01) görülmektedir.

Bu farkların belirlenmesi için yapılan AÖF testi sonuçları ise Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelge'den kültür etkisi açısından vernalizasyon sürelerinin %1'e göre 3, %5'e göre 2 grupta toplandığı, saksıya alınan bitki sayısı bakımından ise bu sürelerin %1'e göre 3, %5'e göre 6 gruba düştüğü görülmektedir.

Çizelge 4.5 Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkiciklerde vernalizasyona ilişkin varyans analizi sonuçları (Kareler Ortalaması)

V.K.	S.D.	K.O.	K.A.	E.B.K.A.	R.K.	K.E.	S.A.B.S.	B.B.S.
Tekerrür	2	47,57	0,12	0,000	27,52	15,88	1,125	0,375
Vern. Süre. (Haftalar)	7	111,14	0,15	0,001	14,32	164,76*	2,89*	0,857
Hata	14	52,45	0,11	0,001	14,32	52,92	0,79	0,518

*) Ortalamalara ilişkin olarak %5 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

**) Ortalamalara ilişkin olarak %1 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.6 Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkiciklerde vernalizasyona ilişkin kültür tepkileri

Vern. Süreleri (Haftalar)	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Embriyo Başına Kallus Ağırlığı (g)	Rejenerasyon Kapasitesi[1] (%)	Kültür Etkisi[2] (%)	Saksıya Alınan Bitki Sayısı	Başaklı Bitki Sayısı
K	84,00	1,108	0,09	100	84,67 a 1	9,00 cd 12	6,00
2	78,00	1,127	0,10	100	78,00 a 12	12,00 abc 12	3,00
4	84,00	1,417	0,11	100	84,33 a 1	6,00 d 2	6,00
6	84,00	1,388	0,11	100	84,33 a 1	10,00 bcd 12	3,00
8	89,00	1,681	0,13	100	88,67 a 1	15,00 a 1	3,00
10	78,00	1,376	0,12	100	77,67 a 12	9,00 cd 12	6,00
12	69,00	0,978	0,09	94	64,67 b 2	14,00 ab 1	3,00
15	80,00	1,330	0,11	97	77,67 a 12	12,00 abc 12	6,00
Toplam		10,405	0,86	791		87	36
Ortalama	80,75±2,12	1,301±0,08	0,108±0,005	98,88±0,79	80,00±2,62	10,86±1,04	4,5±0,57
AÖF(%5)					12,74	4,67	
AÖF(%1)					17,68	6,49	

[1]) Rejenere olabilen kallusların sayısı (yeşil noktalı nodüler kallusların sayısı)/oluşan tüm kallusların sayısı *100

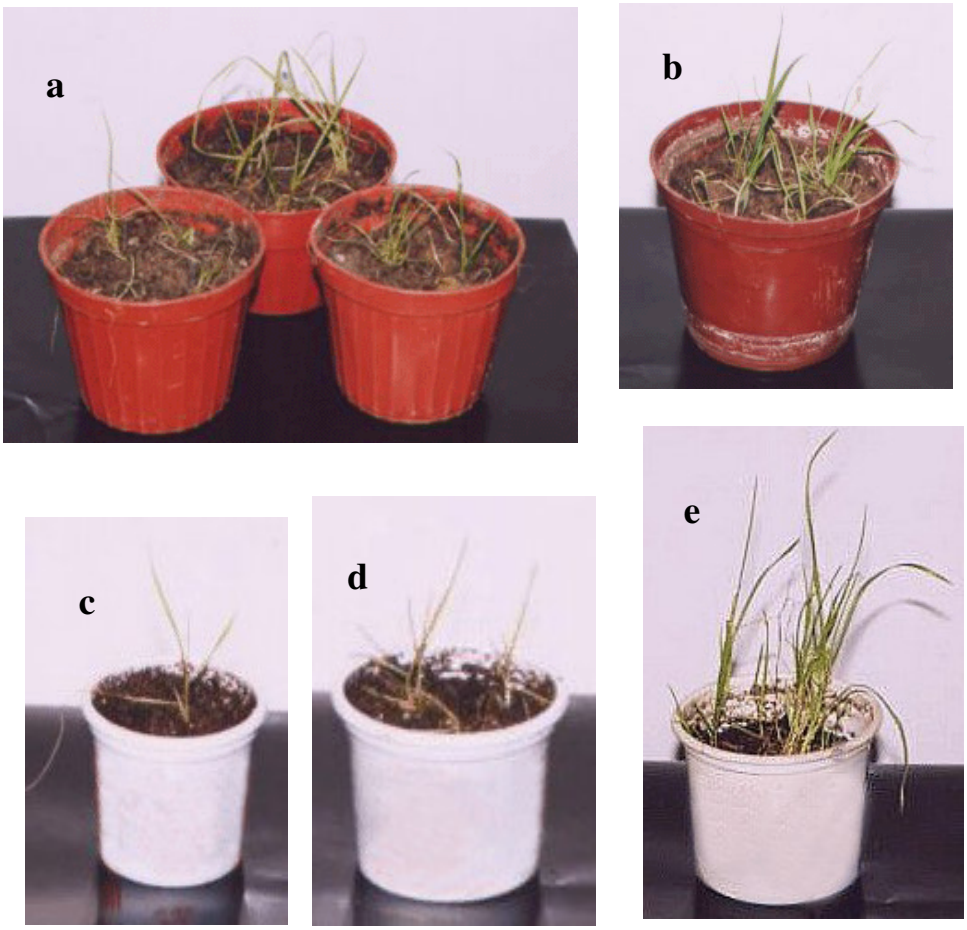
[2]) Rejenere olabilen kallusların sayısı/kültüre alınan embriyo sayısı*100

*)Ortalamalara ilişkin farklı harfler %5, farklı rakamlar ise %1 düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

Şekil 4.4 Çakmak-79 çeşidinde 8 hafta boyunca vernalize edilmiş rejenere bitkicikler toprağa aktarılmadan önce

Çizelge 4.6'da da görüldüğü gibi, soğuklama süreleri bakımından kültür etkisi ve saksıya alınan bitki sayıları sırasıyla %64,67-88,67 ve 6,00-15,00 adet arasında değişmiş ve en yüksek değerler 8 haftalık soğuklama uygulamasından elde edilmiştir (Şekil 4.4).

Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulamasında 4, 6, 8, 10 ve 15 hafta boyunca vernalize edilmiş ve iklim odası aşamasındaki rejenere bitkicikler Şekil 4.5'te görülmektedir.



Şekil 4.5 Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulamasında 4 (a), 6 (b), 8 (c), 10 (d) ve 15 hafta (e) vernalize edilmiş iklim odası aşamasındaki bitkicikler

Kamışsı yumakla (*Festuca arundinacea*) çalışan Wang *et al.* (2003), rejenere bitkilerde en iyi vernalizasyon sıcaklığını 6°C olarak belirleyerek, 11 haftada en iyi başaklanma sonuçlarını almış (%78), bu sonuca doğal vernalizasyon sisteminin benzerini uygulayarak ulaşmışlardır.

Hordeum murinum L.'nin protoplast kültüründen elde ettikleri rejenere bitkileri serada yetiştirmeden önce 8 hafta boyunca 4°C'de vernalize eden Wang and Horst (1994), araştırmalarında rejenere olan bitkiciklerden %33,3-85 oranında bitkiyi toprağa aktarmış ve rejenere hale gelen toplam 112 bitkiden 28'inin başaklandığını görmüşlerdir. Araştırıcılar 8 haftalık vernalizasyonda %25 oranında başaklanma oranı gözlerken, mevcut çalışmada benzer şekilde 8 haftalık vernalizasyon uygulamasından

%20 oranında başaklanma belirlenmiştir. Vernalizasyon uygulamasının tüm haftaları dikkate alındığında ise mevcut çalışmada bu oran %41 oranına çıkmaktadır.

4.4 Gerek-79 Çeşidinin Rejenere Bitkicik Vernalizasyonuna Tepkileri

Gerek-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonundan elde edilen verilere uygulanan varyans analizinin sonuçları Çizelge 4.7'de görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre; kallus oluşumu, kallus ağırlığı, embriyo başına kallus ağırlığı, rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkisi arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli değildir (P>0,05). Araştırılan diğer özellikler; saksıya alınan bitki sayısı ve başaklı bitki sayısı ise önemli (P<0,01) bulunmuştur.

Bu farkların belirlenmesinde kullanılan AÖF testi sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Vernalizasyon süreleri bakımından saksıya alınan bitki sayısında %1'e göre 2, %5'e göre 5 farklı grup belirlenirken, başaklı bitki sayısında bu süreler %1'e ve %5'e göre de 3 farklı gruba düşmüştür.

Çizelge 4.7 Gerek-79 çeşidinde rejenere bitkiciklerde vernalizasyona ilişkin varyans analizi sonuçları (Kareler Ortalaması)

V.K.	S.D.	K.O.	K.A.	E.B.K.A.	R.K.	K.E.	S.A.B.S.	B.B.S.
Tekerrür	2	14,29	0,085	0,001	2,042	51,125	0,125	0,500
Vern. Süre. (Haftalar)	7	193,52	0,048	0,000	2,042	179,661	9,405**	5,143**
Hata	14	128,44	0,071	0,000	2,042	104,554	0,458	0,214

**) Ortalamalara ilişkin olarak %1 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.8 Gerek-79 çeşidinde rejenere bitkiciklerde vernalizasyona ilişkin kültür tepkileri

Vern. Süreleri (Haftalar)	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Embriyo Başına Kallus Ağırlığı (g)	Rejenerasyon Kapasitesi[1] (%)	Kültür Etkisi[2] (%)	Saksıya Alınan Bitki Sayısı			Başaklı Bitki Sayısı		
K	87	1,097	0,08	100	87	8,00	cd	2	3,00	c	3
2	69	1,091	0,10	100	69	7,00	cd	2	6,00	b	2
4	82	1,074	0,09	100	82	16,00	b	1	6,00	b	2
6	78	944	0,08	100	78	20,00	a	1	12,00	a	1
8	71	1,164	0,11	100	71	16,00	b	1	12,00	a	1
10	87	1,009	0,08	98	84	10,00	c	2	3,00	c	3
12	87	1,333	0,10	100	87	7,00	cd	2	3,00	c	3
15	91	1,223	0,09	100	91	6,00	d	2	3,00	c	3
Toplam		8,935	0,73	-	-	90			48		
Ortalama	81,5±2,86	1,116±0,04	0,09±0,004	99,75±0,25	81,13±2,8	11,25±1,88			6±1,39		
AÖF(%5)						3,56			2,03		
AÖF(%1)						4,94			2,81		

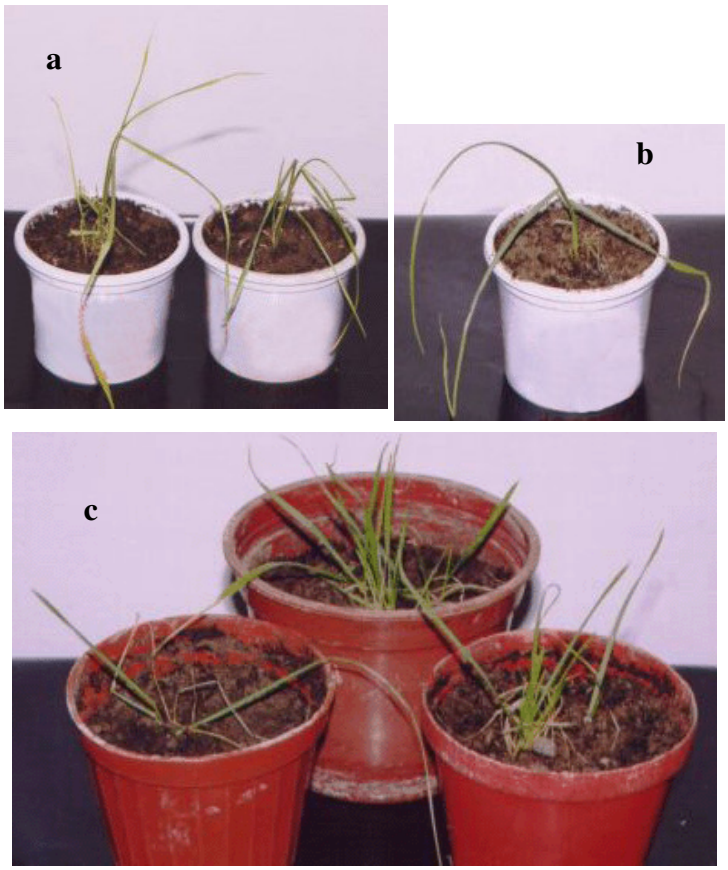
[1]) Rejenere olabilen kallusların sayısı (yeşil noktalı nodüler kallusların sayısı)/oluşan tüm kallusların sayısı *100

[2]) Rejenere olabilen kallusların sayısı/kültüre alınan embriyo sayısı*100

*)Ortalamalara ilişkin farklı harfler %5, farklı rakamlar ise %1 düzeyinde farklı grupları göstermektedir.

Çizelgeden, Gerek-79 çeşidinde soğuklama süreleri bakımından saksıya alınan bitki sayısının 7-20 arasında değiştiği ve en yüksek bitki sayısının 6 haftalık soğuk uygulamasından elde edildiği, başaklı bitki sayısı bakımından ise en yüksek değerlerin yine benzer şekilde 12 bitki ile 6 ve 8. haftalardan elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.6).

Vernalizasyon çalışmasında, kışlık buğday çeşidi Sage'yi 8 hafta boyunca vernalize eden Hoogendoorn (1984), vernalizasyon gereksiniminin tamamen karşılanmadığını ifade etmiştir. Olgunlaşmamış embriyolarda vernalizasyon uygulayan Sharma and Mascia (1987) da, sert kışlık buğday çeşidi Newton'un 4 haftalık vernalizasyona tepki verdiğini ancak, 5 ve 6 haftalık vernalizasyonda Newton dahil kullanılan sert buğday çeşitlerinde, bu çalışmada bulduğumuz sonuçlara benzer şekilde, daha yüksek oranda döllenme meydana geldiğini belirtmişlerdir.



Şekil 4.6 Gerek-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulamasında 12 (a) ve 6 (c) hafta vernalize edilmiş kültürler ile kontrol (b) bitkisi iklim odası aşamasında

4.5 Farklı Vernalizasyon Uygulamalarında Kültür Tepkileri Arası İlişkiler

Kallus vernalizasyonu ve rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulanması halinde kültür tepkilerine farklı çeşitlerin etkisine ilişkin ki-kare analizi sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir. Buna göre, kallus vernalizasyonu uygulandığında kallus oluşumu açısından kullanılan çeşitler arasında önemli bir fark olmadığı (χ^2 =0,305, P>0,05) görülmektedir.

Benzer şekilde, kallus vernalizasyonunda, kültür tepkilerinin elde edildiği çeşitler arasında bitki rejenerasyonu (χ^2 =1,28, P>0,05) ve kültür etkisi (χ^2 =1,26, P>0,05) bakımından da fark bulunmadığı belirlenmiştir.

Rejenere bitkicik vernalizasyonunda elde edilen değerler; kallus oluşumu (χ^2 =0,049, P>0,05), bitki rejenerasyonu (χ^2 =1,293, P>0,05) ve kültür verimi (χ^2 =0,070, P>0,05) için Çakmak-79 ve Gerek-79 çeşitleri karşılaştırıldığında çeşitler arasında önemli bir fark olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.9).

Farklı çeşitler kullanılarak kallus vernalizasyonu ve rejenere bitkicik vernalizasyonu tepkileri arasındaki ilişkiler incelendiğinde, kullanılan çeşitlerin vernalizasyon uygulama yöntemine etkisine ilişkin ki-kare analizi sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 Kallus vernalizasyonu ve rejenere bitkicik vernalizasyonuna farklı çeşitlerin (Çakmak-79 ve Gerek-79) etkisine ilişkin χ^2 değerleri

	Kallus vernalizasyonu	**Rejenere Bitkicik Vernalizasyonu**
Kallus oluşumu	0,305	0,049
Bitki rejenerasyonu	1,28	1,293
Kültür Etkisi	1,26	0,070

*) Ortalamalara ilişkin olarak %5 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.
**) Ortalamalara ilişkin olarak %1 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Çakmak-79 ve Gerek-79 çeşidi kullanılarak, kültür tepkilerinin elde edilmesinde uygulanan kallus ve rejenere bitkicik vernalizasyonları karşılaştırıldığında kallus oluşumu bakımından Çakmak-79 (χ^2 =2,96, P>0,05) ve Gerek-79 çeşitlerinde (χ^2 =1,175, P>0,05) önemli bir fark olmadığı Çizelge 4.10'da görülmektedir.

Çizelge 4.10'dan Çakmak-79 çeşidinden elde edilen kültür tepkileri her iki vernalizasyon yöntemi açısından incelendiğinde rejenerasyon kapasitesi (χ^2 =55,34**, P<0,01) ve kültür etkisinin (χ^2 =20,77**, P<0,01) farklı olduğu belirlenmektedir.

Gerek-79 çeşidinde kallus vernalizasyonu ve rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulanarak elde edilen kültür tepkileri incelendiğinde rejenerasyon kapasitesi (χ^2 =72,43**, P<0,01) ve kültür etkisinin (χ^2 =32,1**, P<0,01) önemli derecede farklılık gösterdiği Çizelgeden görülmektedir.

Çizelge 4.10 Farklı çeşitlerde (Çakmak-79 ve Gerek-79) kültür tepkilerine vernalizasyon uygulamalarının (kallus ve rejenere bitkicik) etkisine ilişkin χ^2 değerleri

	Çakmak-79	**Gerek-79**
Kallus oluşumu	2,96	1,17
Bitki rejenerasyonu	55,34**	72,43**
Kültür Etkisi	20,77**	32,10**

*) Ortalamalara ilişkin olarak %5 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.
**) Ortalamalara ilişkin olarak %1 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

4.6 Çakmak-79 ve Gerek-79 Çeşitlerinde Kallus ve Rejenere Bitkicik Vernalizasyonu Uygulamalarından Elde Edilen Kallus Kültürlerinde Farklı Karakterler Arası İlişkiler

Çakmak-79 çeşidinde kallus vernalizasyonundan elde edilen kültür tepkileri bakımından öğeler arasındaki ilişkiler incelendiğinde kallus oluşumu ve kallus ağırlığı (r = 0,738*), kallus ağırlığı ve embriyo başına kallus ağırlığı (r = 0,953**), kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi (r = 0,768*), embriyo başına kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi (r = 0,703*), kallus oluşumu ve kültür etkisi (r = 0,692*), kallus ağırlığı ve kültür etkisi (r= 0,803*), embriyo başına kallus ağırlığı ve kültür etkisi (r = 0,711*), rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkisi (r = 0,994**) ile saksıya alınan bitki sayısı ve başaklı bitki sayısı (r = 0,962**) arasında önemli ilişkiler bulunmuştur (Çizelge 4.11).

Yüksek oranda kallus oluşumu yeteneğine sahip olan, ancak düşük rejenerasyon kapasitesine sahip çeşitler doku kültürü programlarında tercih edilmemektedir. Diğer taraftan, birçok araştırıcı tarafından kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin farklı genlerle kontrol edilebildiği de bildirilmektedir (Sears and Deckard 1982; Chowdhury *et al.* 1991; Özgen vd. 1998). Benzer bir ilişki kallusların sahip olduğu ağırlık ile rejenerasyon kapasitesi arasında da görülmektedir. Ancak Özgen vd. 1996 yüksek kallus oluşumunun yüksek bitki rejenerasyonu ile sonuçlandığını ve bu iki öğe arasında pozitif bir korelasyon gözlendiğini (r = 0.890**) belirtmişlerdir.

Çizelge 4.11 Çakmak-79 çeşidinde kallus vernalizasyonundan elde edilen kültürlerde farklı karakterler arası ilişkiler

Karakterler	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
1 Kallus oluşumu (%)	-	0,738*	0,510	0,611	0,692*	-0,086	-0,054
2 Kallus Ağırlığı (g)	-	-	0,983**	0,768*	0,803*	0,262	0,362
3 Embriyo Başına Kallus Ağırlığı (g)	-	-	-	0,703*	0,711*	0,338	0,472
4 Rejenerasyon Kapasitesi (%)	-	-	-	-	0,944**	0,607	0,643
5 Kültür Etkisi (%)	-	-	-	-	-	0,545	0,577
6 Saksıya Alınan Bitki Sayısı	-	-	-	-	-	-	0,962**
7 Başaklı Bitki Sayısı		-	-	-	-	-	-

*) Ortalamalara ilişkin olarak %5 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.
**) Ortalamalara ilişkin olarak %1 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Şekil 4.7 Çakmak-79 çeşidinde kallus ve rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulamasından elde edilen başaklar

Kültürün incelenen özellikleri göz önünde bulundurularak, doku kültürü programları hazırlanırken, genotipler yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olanlar arasından seçilirler. Böylelikle özellikle serin iklim tahıllarında yapılan çalışmalarda temel amaç olan sağlıklı ve tohumlu bitkiye ulaşma olanağı elde edilmiş olur (Şekil 4.7). Araştırmadan elde edilen sonuçlara (r = 0,994**) benzer şekilde, Özgen ve Birsin (2002)'de kışlık yulaf bitkisinde endosperm-destekli kallus oluşumu yöntemi uygulamasından, yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip genotiplerde kültür etkisinin de yüksek olduğunu (r = 0,810**) belirlemişlerdir.

Kallus oluşumu ve embriyo başına kallus ağırlığı (r = 0,510), kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi (r = 0,611), kallus oluşumu ve saksıya alınan bitki sayısı (r = -0,086), kallus ağırlığı ve saksıya alınan bitki sayısı (r = 0,262), rejenerasyon kapasitesi ve embriyo başına kallus ağırlığı (r = 0,338), rejenerasyon kapasitesi ve saksıya alınan bitki sayısı (r= 0,607), kültür etkisi ve saksıya alınan bitki sayısı (r= 0,545), kallus oluşumu ve başaklı bitki sayısı (r = -0,054), kallus ağırlığı ve başaklı bitki sayısı (r = 0,362), başaklı bitki sayısı ve embriyo başına kallus ağırlığı (r = 0,472), rejenerasyon kapasitesi ve başaklı bitki sayısı (r = 0,643), kültür etkisi ve başaklı bitki sayısı (r = 0,577) arasında ise önemli bir ilişki olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.11).

Gerek 79 çeşidinde kallus vernalizasyonundan elde edilen kültür tepkileri arası ilişkiler incelendiğinde; rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkisi (r = 0,789*), saksıda bitki sayısı ve başaklı bitki sayısı (r= 0,951**) arasında önemli ilişkiler olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12).

Kültür tepkileri sonucunda elde edilen kallusların yapısı bize kültürün başarısı hakkında ip uçları verebilir. Nodular ve kompakt kallus tipi rejenerasyon kapasitesine sahip olur ve embriyonik kallus olarak nitelendirilir (Lu and Vasil 1981, Heyser and Nabors 1982, Wang and Vasil 1982). Dolayısıyla kompakt yapı kallusların rejenerasyon yeteneğinin en büyük göstergesidir (Mohanty and Ghosh 1988).

Kallusların rejenerasyon düzeyleri, doğrudan rejenerasyon kapasitesini ve kültürün başarısını da belirleyen birincil etkendir. Rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkisi arasındaki önemli düzeylerdeki ilişki Çizelge 4.12'den de görülmektedir. Her ne kadar benzer bir ilişki özellikle serin iklim tahıllarıyla yapılan çalışmalarda kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi arasında beklense de, bu yöndeki araştırmalar rejenerasyon kapasitesindeki artışın kallusların nodular kompakt yapısına bağlı olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.12 Gerek-79 çeşidinde kallus vernalizasyonundan elde edilen kültürlerde farklı karakterler arası ilişkiler

Karakterler	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
1 Kallus oluşumu (%)	-	0,555	0,295	-0,305	-0,123	0,332	0,504
2 Kallus Ağırlığı (g)	-	-	0,097	-0,383	-0,147	0,101	0,072
3 Embriyo Başına Kallus Ağırlığı (g)	-	-	-	0,454	0,337	0,159	-0,001
4 Rejenerasyon Kapasitesi (%)	-	-	-	-	0,789*	0,345	0,175
5 Kültür Etkisi (%)	-	-	-	-	-	0,632	0,459
6 Saksıya Alınan Bitki Sayısı	-	-	-	-	-	-	0,951**
7 Başaklı Bitki Sayısı	-	-	-	-	-	-	-

*) Ortalamalara ilişkin olarak %5 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.
**) Ortalamalara ilişkin olarak %1 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Kallus oluşumu ve kallus ağırlığı (r = 0,555), kallus oluşumu ve embriyo başına kallus ağırlığı (r = 0,295), kallus ağırlığı ve embriyo başına kallus ağırlığı (r= 0,097), kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi (r = -0,305), kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi (r = -0,383), embriyo başına kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi (r= 0,454), kallus oluşu ve kültür etkisi (r = -0,123), kallus ağırlığı ve kültür etkisi (r = -0,147), embriyo başına kallus ağırlığı ve kültür etkisi (r = 0,337), kallus oluşumu ve saksıya aktarılan bitki sayısı (r = 0,332), kallus ağırlığı ve saksıya alınan bitki sayısı (r = 0,101), embriyo başına kallus ağırlığı ve saksıya alınan bitki sayısı (r = 0,159), rejenerasyon kapasitesi ve saksıya alınan bitki sayısı (r=0,345), kültür etkisi ve saksıya alınan bitki sayısı (r = 0,632), kallus oluşumu ve başaklı bitki sayısı (r=0,504), kallus ağırlığı ve başaklı bitki sayısı (r = 0,072), embriyo başına kallus ağırlığı ve başaklı bitki sayısı (r = -0,001), rejenerasyon kapasitesi ve başaklı bitki sayısı (r = 0,175) ile kültür etkisi ve başaklı bitki sayısı (r = 0,459) arasında önemli bir ilişki bulunmadığı görülmektedir (Çizelge 4.12).

Öte yandan, kallus vernalizasyonu uygulanmış Gerek-79 kalluslarından elde edilerek saksıya alınan bitki sayısı ile başaklı bitki sayısı arasındaki ilişkinin önemli olduğu ($P<0,01$) görülmektedir. Rejenerasyon sonrası alıştırma aşamalarını başarılı bir şekilde tamamlayarak saksıya aktarılan bitkilerde, bu aşamaya ulaşabilen bitki sayısı arttıkça oluşan başak sayısının da artması doğaldır. Burada bitkilerin uyum yeteneklerinin de önemi büyüktür (Şekil 4.8).

Şekil 4.8 Gerek-79 çeşidinde kallus ve rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulamasından elde edilen başaklar

Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonundan elde edilen kültürlerde farklı karakterler arası ilişkiler incelendiğinde ise kallus oluşumu ve kallus ağırlığı (r = 0,768*), kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi (r = 0,774*), kallus oluşumu ve kültür etkisi (r = 0,989**), kallus ağırlığı ve kültür etkisi (r = 0,742*), rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkisi (r = 0,857**) arasında önemli ilişkiler belirlenmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonundan elde edilen kültürlerde farklı karakterler arası ilişkiler

Karakterler	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
1 Kallus oluşumu (%)	-	0,768*	0,467	0,774*	0,989**	-0,308	0,133
2 Kallus Ağırlığı (g)	-	-	0,217	0,516	0,742*	-0,070	0,031
3 Embriyo Başına Kallus Ağırlığı (g)	-	-	-	-0,529	-0,042	0,448	0,613
4 Rejenerasyon Kapasitesi (%)	-	-	-	-	0,857**	-0,566	0,108
5 Kültür Etkisi (%)	-	-	-	-	-	-0,382	0,160
6 Saksıya Alınan Bitki Sayısı	-	-	-	-	-	-	-0,630
7 Başaklı Bitki Sayısı	-	-	-	-	-	-	-

*) Ortalamalara ilişkin olarak %5 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.
**) Ortalamalara ilişkin olarak %1 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Kültür tepkilerinde dikkate alınan öğeler genellikle birbiriyle ilişkili olsa da, bazen öğelerin bağımsız şekilde davrandığı bilinmektedir. Kallus aşamasında vernalizasyon uygulaması ile rejenere bitki vernalizasyonundan elde edilen kültür tepkileri incelendiğinde kallus oluşumu ile rejenerasyon kapasitesi arasındaki ilişkinin kallus vernalizasyonunda önemli olmadığı görülmekte olup, benzer sonuçlar Sears and Deckard (1982), Chowdhury *et al.* (1991) ve Özgen vd. (1998) tarafından da alınmıştır. Diğer taraftan Çakmak-79 ve Gerek-79 çeşitlerinde bitkicik vernalizasyonunda, kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi ile kültür etkisi arasında önemli düzeylerdeki ilişki (r = 0,774*, r = 0,989**) bu araştırmacıların elde ettikleri sonuçlardan farklıdır.

Araştırmada vernalizasyonun etkilerinin kallus aşamasında ve rejenere bitkicik aşamasında uygulanmasının bitkinin gelişimi üzerine etkilerinin incelendiği göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen kültür tepkilerinde vernalizasyonun etkilerini ve genotipik farklılıkları görmek mümkündür.

Ayrıca kallus oluşumu ve embriyo başına kallus ağırlığı (r = 0,467), kallus ağırlığı ve embriyo başanı kallus ağırlığı (r = 0,217), kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi (r = 0,516), embriyo başına kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi (r = -0,529), embriyo başına kallus ağırlığı ve kültür etkisi (r = -0,042), kallus oluşumu ve saksıya alınan bitki sayısı (r = -0,308), kallus ağırlığı ve saksıya alınan bitki sayısı (r = -0,070), embriyo başına kallus ağırlığı ve saksıya alınan bitki sayısı (r = 0,448), rejenerasyon kapasitesi ve saksıya alınan bitki sayısı (r = -0,566), kültür etkisi ve saksıya alınan bitki sayısı (r = -0,382), kallus oluşumu ve başaklı bitki sayısı (r = 0,133), kallus ağırlığı ve başaklı bitki sayısı (r = 0,031), embriyo başına kallus ağırlığı ve başaklı bitki sayısı (r = 0,613), rejenerasyon kapasitesi ve başaklı bitki sayısı (r = 0,108), kültür etkisi ve başaklı bitki sayısı (r = 0,160), saksıya alınan bitki sayısı ve başaklı bitki sayısı (r = -0,630) arasında ilişki bulunmadığı görülmektedir (Çizelge 4.13).

Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonunda, kültürden elde edilen tepkiler incelendiğinde, rejenere olabilen kallus sayısı, elde edilen kallus sayısı ve kültüre alınan embriyo sayısı arasındaki ilişki bizi rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkisi arasındaki ilişkiye (r = 0,857**) götürmektedir. Ancak benzer ilişki Gerek-79

çeşidinde (Çizelge 4.14) görülmemektedir (r = 0,147). Bu da bize genotipik farklılıkların kültür tepkileri arasındaki ilişkiye etkisinin önemini göstermektedir.

Gerek-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonundan elde edilen kültürlerde farklı karakterler arası ilişkiler Çizelge 4.14'ten incelendiğinde kallus oluşumu ve kültür etkisi (r = 0,992**), kallus oluşumu ve başaklı bitki sayısı (r=-0,727*), kültür etkisi ve başaklı bitki sayısı (r = -0,706*) ile saksıya alınan bitki sayısı ve başaklı bitki sayısı (r = 0,827**) arasındaki ilişkilerin önemli olduğu belirlenmiştir.

Ancak, kallus oluşumu ve kallus ağırlığı (r = 0,401), kallus oluşumu ve embriyo başına kallus ağırlığı (r = -0,556), kallus ağırlığı ve embriyo başına kallus ağırlığı (r = 0,514), kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi (r = -0,274), kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi (r = 0,297), embriyo başına kallus ağırlığı ve rejenerasyon kapasitesi (r = 0,404), kallus ağırlığı ve kültür etkisi (r = 0,452), embriyo başına kallus ağırlığı ve kültür etkisi (r = -0,517), rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkisi (r = 0,147), kallus oluşumu ve saksıya alınan bitki sayısı (r = -0,348), kallus ağırlığı ve saksıya alınan bitki sayısı (r = -0,521), embriyo başına kallus ağırlığı ve saksıya alınan bitki sayısı (r = -0,180), rejenerasyon kapasitesi ve saksıya alınan bitki sayısı (r = 0,137), kültür etkisi ve saksıya alınan bitki sayısı (r = -0,340), kallus ağırlığı ve başaklı bitki sayısı (r = -0,385), embriyo başına kallus ağırlığı ve başaklı bitki sayısı (r = 0,291), rejenerasyon kapasitesi ve başaklı bitki sayısı (r = 0,309) arasında önemli bir ilişki bulunmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.14 Gerek-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonundan elde edilen kültürlerde farklı karakterler arası ilişkiler

Karakterler	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
1 Kallus oluşumu (%)	-	0,401	-0,556	-0,274	0,992**	-0,348	-0,727*
2 Kallus Ağırlığı (g)	-	-	0,514	0,297	0,452	-0,521	0,385
3 Embriyo Başına Kallus Ağırlığı (g)	-	-	-	0,404	-0,517	-0,180	0,291
4 Rejenerasyon Kapasitesi (%)	-	-	-	-	0,147	0,137	0,309
5 Kültür Etkisi (%)	-	-	-	-	-	-0,340	-0,706*
6 Saksıya Alınan Bitki Sayısı	-	-	-	-	-	-	0,827**
7 Başaklı Bitki Sayısı	-	-	-	-	-	-	-

*) Ortalamalara ilişkin olarak %5 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.
**) Ortalamalara ilişkin olarak %1 düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

5. SONUÇ

Günümüzde buğday bitkisi, biyoteknolojik çalışmaların çok fazla yapıldığı bir türdür. Hem partikül bombardımanı hem de Agrobakterium ile gen aktarımı yöntemleri kullanılarak başarılı bir şekilde gen aktarılmakta ve gen aktarılmış transgenik bitkiler yetiştirilmektedir. Bu çalışmaları kısıtlayan en önemli faktör gen aktarıldıktan sonra yetiştirilen transgenik bitkilerin başaklanmamaları ya da başaklansa dahi tane bağlayamamalarıdır. Bunun da en önemli nedeni, tüm in *vitro* çalışmaların 26°C sabit sıcaklıkta yapılması ve bitkilerin vernalize olamamasıdır. Bu da özellikle kışlık buğday çeşitlerinin vernalize olamamaları anlamına gelmektedir. Bu çalışmada amaçlanan *in vitro* koşullarda vernalizasyonun sağlanarak bu sorunun aşılmasıdır. Bu amaçla eksplant olarak alternatif gelişme yapılı makarnalık Çakmak-79 (*Triticum durum* Desf.) ve kışlık gelişme yapılı ekmeklik Gerek-79 (*Triticum aestivum* L.) buğday çeşitlerinin olgunlaşmış embriyolarından endosperm destekli kallus oluşumu yöntemi uygulanarak elde edilen kalluslar ve rejenere bitkicikler farklı sürelerde vernalize edilmiştir.

Bilindiği üzere; buğday tanesinin uygun besleme değeri; taşıma, saklama ve işlenmesindeki kolaylık ile geniş adaptasyon yeteneği, yetiştiriciliğinin çok yaygın olarak yapılmasını sağlamakta ve insan beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri arasında dünyada ekiliş ve üretim bakımından ilk sıralarda yer almasına neden olmaktadır.

Denemede kallus ve rejenere bitkicik vernalizasyonundan elde edilen kültür tepkileri kallus oluşumu, kallus ağırlığı, embriyo başına kallus ağırlığı, rejenerasyon kapasitesi, kültür etkisi, saksıya alınan bitki sayısı ve başaklı bitki sayısı bakımından değerlendirilmiştir. Bu öğeler bakımından elde edilen değerler incelendiğinde, uygulanan vernalizasyon süreleri bakımından, her iki buğday çeşidinde ve vernalizasyonun uygulanma dönemlerinde (kallus ve rejenere bitkicik) önemli farklılıklar olduğu saptanmıştır.

Kallus aşamasında vernalize edilen Çakmak-79 çeşidinde, incelenen özellikler bakımından en yüksek değerler, 8 hafta kallus vernalizasyonu uygulanan kültürlerden

elde edilmiş olmakla birlikte, 4 ve 6 haftalık kallus vernalizasyonunun da yüksek sayıda başaklı bitki oluşumuyla sonuçlandığı belirlenmiştir.

Gerek-79 çeşidinde ise kallus vernalizasyonu uygulamasından rejenerasyon kapasitesi, kültür etkisi, bitki sayısı ve başaklı bitki sayısı bakımından haftalar arasında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. En yüksek değerler rejenerasyon kapasitesi ve kültür etkisinde 6 haftalık, saksıya alınan bitki sayısı ve başaklı bitki sayısında ise 8 haftalık soğuklama uygulamasından elde edilmiştir.

Endosperm destekli kallus oluşumu yöntemiyle elde edilen kalluslardan geliştirilen rejenere Çakmak-79 bitkiciklerinde, bu aşamada vernalizasyon uygulamasında, kültür etkisi ve saksıya alınan bitki sayıları önemli düzeyde kültür tepkileri vermiş ve en yüksek değerler 8 haftalık soğuklama uygulamasından elde edilmiştir.

Gerek-79 çeşidinde vernalizasyon süreleri bakımından önemli düzeyde kültür tepkileri saksıya alınan bitki sayısı ve başaklı bitki sayısından alınmış ve saksıya alınan bitki sayısı bakımından en yüksek bitki sayısı 6 haftalık soğuk uygulamasından elde edilirken, başaklı bitki sayısı bakımından ise en yüksek değerler yine benzer şekilde 6 ve 8. haftalardan elde edilmiştir.

Bulgularımız aynı konuda çalışan araştırıcıların bazıları ile benzerlik gösterirken bazılarından farklıdır. Farlılıklar, vernalizasyon uygulanan genotiplerin farklılığı ile uygulama süresi, uygulama yöntemi ve bitkinin gelişmişlik devresindeki farklılıklardan kaynaklanmakta ise de, 6 ve 8 haftalık *in vitro* vernalizasyon uygulamasının genellikle en iyi sonucu verdiği diğer araştırıcılarca da belirtilmiştir.

Kallus vernalizasyonu ve rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulanarak gerçekleştirilen bu çalışmada kültür tepkilerine farklı çeşitlerin (Çakmak-79 ve Gerek-79) etkisine ilişkin ki-kare analizi sonuçları kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve kültür verimi açısından karşılaştırıldığında çeşitler arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Kullanılan çeşitlerin vernalizasyon uygulama yöntemine (Kallus vernalizasyonu ve rejenere bitkicik vernalizasyonu) etkisine ilişkin ki-kare analizi sonuçlarından kallus oluşumu bakımından bir farklılık olmadığı ancak bitki rejenersayonu ve kültür etkisinin farklı olduğu belirlenmiştir.

Çakmak-79 ve Gerek-79 çeşitlerinde kallus ve rejenere bitkicik vernalizasyonu uygulamalarından elde edilen kallus kültürlerinde farklı karakterler arası ilişkiler incelendiğinde; Çakmak-79 çeşidinde her iki aşamada yapılan vernalizasyon uygulamasında kallus oluşumu ve kallus ağırlığı arasındaki ilişkinin önemli olduğu, ancak Gerek-79 çeşidinde bu özellikler arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı belirlenmiştir. Çakmak-79 çeşidinde rejenere bitkicik vernalizasyonunda rejenerasyon kapasitesi ile kallus oluşumu arasındaki ilişki, rejenerasyon kapasitesi ile kallus ağırlığı arasında da gözlenmiştir. Kültür etkisi ve rejenerasyon kapasitesi arasında bulunan önemli düzeydeki ilişki Çakmak-79 çeşidinde kallus ve rejenere bitkicik vernalizasyonu ile Gerek-79 çeşidinde kallus vernalizasyonu uygulamasından belirlenmiştir.

Kallusların rejenerasyon düzeyleri doğrudan rejenerasyon kapasitesini ve de kültürün başarısını da belirleyen birincil etkendir. Elde ettiğimiz sonuçlardan rejenerasyon kapasitesindeki artışın kallusların nodular kompakt yapısına bağlı olduğu belirlenmiştir. Rejenerasyon sonrası alıştırma aşamalarını başarılı bir şekilde tamamlayarak saksıya aktarılan bitkilerde, bu aşamaya ulaşabilen bitki sayısı arttıkça oluşan başak sayısının da artması tabidir. Burada bitkilerin adaptasyon yeteneklerinin de önemi büyüktür.

Vernalizasyon uygulamalarına genotiplerin tepkileri arasında dikkate değer farklılıklar olduğu kadar, uygulama süresi bakımından aynı genotipte de değişkenlik görülebilmektedir.

Sonuç olarak, biyoteknoloji ve genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılarak yapılan bitki ıslahı çalışmaları ile elde edilen gen aktarılmış (transgenik) bitkilerin, vernalizasyon eksikliği nedeniyle tohum bağlayamama sorununun *in vitro* koşullarda vernalizasyonun uygulanması ile giderilebileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Anonymous. 2006. Web Sitesi. http://www.fao.org.tr, Erişim Tarihi: 23.03.2006

Appendino, M.L., Bartoloni, N. and Slafer, G.A. 2003. Vernalization response and earliness per se in cultivars representing different eras of wheat breeding in Argentina. Euphytica, 130; 61-69.

Arumunganathan, K., Dale, P.J. and Cooper, J.P. 1991. Vernalization in *Lolium temulentum* L.: responses of *in vitro* cultures of mature and immature embryos, shoot apices and callus. Annals of Botany, 67; 173-179.

Barrett, B., Bayram, M. and Kidwell, K. 2002. Identifying AFLP and microsatellite markers for vernalization response gene *Vrn-B1* in hexaploid wheat using reciprocal mapping populations. Plant Breeding, 121; 400-406.

Bernier, G. and Perilleux, C. 2005. A physiological overview of the genetics of flowering time control. Plant Biotechnology Journal, 3; 3-16

Brule-Babel, A.L. and Fowler, D.B. 1989. Genetic control of cold hardiness and vernalization requirement in rye. Genome, 32; 19-23.

Chauvel, B., Munier-Jolain, N.M., Grandgirard, D. and Gueritaine, G. 2002. Effect of vernalization on the development and growth of *Alopecurus myosuroides*. European Weed Research Society Weed Research 42; 166-175.

Chong, K. and Tan, K.H. 1994. Advances of molecular biology research on vernalization and cold acclimation of plants. Bot. Res., 7; 21-28.

Chong, K., Wang, L., Tan, K., Huang, H. and Liang, H. 1994. Molecular cloning and characterization of vernalization-related (*ver*) genes in winter wheat. Physiologia Plantarum, 92; 511-515.

Chong, K., Bao, S., Xu, T., Tan, K., Liang, T., Zeng, J., Huang, H., Xu, J. and Xu, Z. 1998. Functional analysis of the *ver* gene using antisense transgenic wheat. Physiologia Plantarum, 102; 87-92.

Chowdury, S.H., Kato, K., Yamamato Y. and Hayashi, K. 1991. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryo among common wheat cultivars. Jpn. J. Breed., 41; 442-450

Crofts, H.J. 1989. On defining a winter wheat. Euphytica, 44; 225-234.

Dubert, F., Marcinska, I., Beisaga-Koscielniak J. and Szmider, I. 1993. The effectiveness of vernalization of immature embryos of winter wheat var. Grana as related to age and exogenous phytohormones. J. Agronomy & Crop Science, 170; 234-242.

Dubcovsky, L., Lijavetzky, D., Appendino, L. and Tranquilli, G. 1998. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. Theor. Appl. Genet., 97; 968-975.

Düzgüneş, O., Kesici, T. ve Gürbüz, F. 1983. İstatistik Metotları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 861. Ders Kitabı, 229, Ankara.

Ekmekçi, Y. ve Terzioğlu, S. 1998. Interactive effects of vernalization, day length and light intensity on the number of leaves and flag leaf area in some wheat cultivars. Turkish Journal of Botany, 22; 303-312.

Ekmekçi, Y. ve Terzioğlu, S. 2000. Interactive effects of vernalization, photoperiod and light intensity on reproductive development of wheat cultivars. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 24; 475-486.

Flood, R.G. and Halloran, G.M. 1986. Genetics and physiology of vernalization response in wheat. N.C. Brady Advances in Agronomy Vol. 39, Academic Press, Inc. Orlando, FL. P, 87-125.

Gardner, F.P. and Barnett, R.D. 1990. Vernalization of wheat cultivars and a triticale. Crop Science, 30; 166-169.

Gregory, F.G. and Purvis, O.N. 1938. Studies in vernalization of cereals. II. The vernalization of excised mature embryos, and of developing ears. Ann. Bot., 5; 237-251.

Heyser, J.W. and Nabors, M.W. 1982. Regeneration of Prosomillets from embriyogenic calli derived from various plant parts. Crop Science, 22; 1070-1074.

Hoogendoorn, J. 1984. A comparison of different vernalization techniques in wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Plant Physiol., 116; 11-20.

Holland, J.B., Moser, H.S., O'Donoughue, L.S. and Lee, M. 1997. QTLs and epistasis associated with vernalization responses in oat. Crop Science, 37; 1306-1316.

Holland, J.B., Portyanko, V.A., Hoffman, D.L. and Lee, M. 2002. Genomic regions controlling vernalization and photoperiod responses in oat. Theor. Appl. Genet., 105; 113-126.

Iwaki, K., Nakagawa, K., Kuno, H. and Kato, K. 2000. Ecogeographical differentiation in east Asian wheat, revealed from the geographical variation of growth habit and *Vrn* genotype. Euphytica, 111; 137-143.

Iwaki, K., Nakagawa, K. and Kato, K. 2001. The possible candidate of *Vrn-B1* in wheat, as revealed by monosomic analysis of *Vrn* gene carried by Triple Dirk (B), the former *Vrn2*. Wheat Information Service, 92; 9-11.

Karsai, I., Meszaros, K., Lang, L., Hayes, P.M. and Bedo, Z. 2001. Multivariate analysis of traits determining adaptation in cultivated barley. Plant Breeding, 120; 217-222.

Kato, K., Tomo, S., Yamazaki, S. and Hayashi, H. 1990. Simplified culture method of detached ears and its application to vernalization in wheat. Euphytica, 49; 161-168.

Kato, H., Taketa, S., Ban, T., Irıkı, N. and Murai, K. 2001. The influence of a spring habit gene, *Vrn-D1*, on heading time in wheat. Plant Breeding, 120; 115-120.

Kole, C., Quijada, P., Michaels, S.D., Amasino, R.M. and Osborn, T.C. 2001. Evidence for homology of flowering-time genes *VFR2* from *Brassica rapa* and *FLC* from *Arabidopsis thaliana*. Theor. Appl. Genet., 102; 425-430.

Kün, E. 1988. Serin İklim Tahılları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1032. Ders Kitabı, 299s., Ankara.

Law, C.N., Worland, A.J. and Giorgi, B. 1975. The genetic control of ear emergence time by chromosomes 5A and 5D of wheat. Heredity, 36; 49-58.

Limin, A.E. and Fowler, D.B. 2001. Inheritance of cell size in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relationship to the vernalization loci. Theor. Appl. Genet., 103; 277-281.

Lu, B., Tan, K.H., Lin, B. and Huang, H.L. 1992. Low-temperature-regulated flowering-regulated mRNA and protein synthesis during vernalization of winter wheat. Acta Phytophysiol. Sin., 18; 113-120.

Lu, C. and Vasil, I.K. 1981. Somatic embriyogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. Theor. Appl. Genet., 59; 275-280.

Mahfoozi, S., Limin, A.E. and Fowler, D.B. 2001. Developmental regulation of low-temperature tolerance in winter wheat. Annals of Botany, 87; 751-757.

Major, D.J. and Whelan, E.D.P. 1985. Vernalization and photoperiod response characteristics of a reciprocal substitution series of Rescue and Cadet hard red spring wheat. Can. J. Plant Sci., 65; 33-39.

Marcinska, I., Biesaga-Koscielniak, J. and Dubert, F. 1996. Effect of vernalization conditions on growth and differentiation of callus from immature embryos and on generative development of regenerated plants of winter wheat. Acta Physiologiae Plantarum, 18 (1); 67-74.

Metzger, J.D., Burn, J., Dennis, E.S. and Peacock, W.J. 1990. DNA Methylation as the molecular basis for vernalization: A hypothesis. Plant Physiol., 94; 68-72.

Mohanty, B.D. and Ghosh, P.D. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Hordeum vulgare*. Annals of Botany, 61; 551-555.

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

Nelson, J.C., Sorrels, M.E., Van Deyne, A.E., Lu, Y.H., Atkinson, M., Bernard, M., Leroy, P., Faris, J.D. and Anderson, J.A. 1995. Molecular mapping of wheat: Major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5 and 7. Genetics, 141; 721-731.

Ortiz-Ferrara, G., Mosaad, M.G., Mahalakshmi, V. and Fischer, R.A. 1995. Photoperiod and vernalization response of wheat under controlled environment and field conditions. Plant Breeding, 114; 505-509.

Özgen, M. ve Akar, T. 1993. Yabani Gen Kaynaklarının Bitki Islahında Kullanımı. I. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 5-7 Ekim 1993, İzmir.

Özgen, M., Türet, M., Özcan, S. and Sancak, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter wheat genotypes. Plant Breeding, 115; 455-458.

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

Özgen, M. and Birsin, M.A. 2002. Callus induction and plant regeneration from immature and endosperm supported mature embryos of winter oat (*Avena sativa* L.). J. Genet. and Breed., 56; 00- 00.

Qian, J.S., Yong, W.D., Xu, W.Z., Xu, Y.Y., Wu, J.S., Chong, K., Tan, K.H. and Xu, Z.H. 2001. Existence of homologous sequences correnponding to cDNA of the *ver* gene in diverse higher plant species. Cell Research, 11(4); 265-271.

Roberts, D.W.A. 1989. Identification of loci on chromosome 5A of wheat involved in control of cold hardiness, vernalization, leaf length, rosette growth habit, and height of hardened plants. Genome, 33; 247-259.

Sarhan, F., Ouellet, F. and Vazquez-Tello, A. 1997. The wheat *wcs120* gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. Physiologia Plantarum, 101; 439-445.

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

Sears, R.G. and Deckard, E.L. 1982. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. Crop Science, 22; 546-550.

Sharma, H.C. and Gill, B.S. 1982. Effect of embryo age and culture media on plant growth and vernalization response in winter wheat. Euphytica, 31;629-634.

Sharma, H.C. and Mascia P.N. 1987. Vernalization of immature embryos of winter wheat genotypes. Euphytica, 36; 161-165.

Soğutmaz, B. 2003. Marker Gene Transfer To Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) By Microprojectile Bombardment Method. Master Degree Thesis Submitted To The Graduate School Of Natural and Applied Sciences Of Middle East Technical University.

Şehirali, S. ve Özgen, M. 2002. Bitki Islahı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1527. Ders Kitabı, 480, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 261 s.

Tan, K.H. 1992. Specific protein synthesis in the process of vernalization. Bot. Res., 6; 13-16.

Tischner, T., Köszegi, B. and Veisz, O. 1997. Climatic programmes used in the Martonvasar phytotron most frequently in recent years. Acta Agron. Hung., 45; 85-104.

Xin, Z. and Browse, J. 2000. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. Plant, Cell and Environment, 23; 893-902.

Van Der Valk, P. , Proveniers, M.C.G., Pertijs, J.H., Lamers, J.T.W.H., Van Dun, C.M.P and Smeekens, J.C.M. 2004. Late heading of perennial ryegrass caused by introducing an Arabidopsis homeobox gene. Plant Breeding, 123; 531-535.

Wang, D. and Vasil, I.K. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* Schum (Napier or elephant grass). Plant Science Letters, 25; 147-154.

Wang, X. and Horst, L. 1994. Plant regeneration from protoplast of barley (*Hordeum murinum* L.). Plant Cell Reports, 13; 139-144.

Wang, Z.Y., Bell, J. and Scottt, M. 2003. A vernalization protocol for obtaining progenies from regenerated and transgenic tall fescue plants. Plant Breeding, 122; 536-538.

Weibel, D.E. 1958. Vernalization of immature winter wheat embryos. Agron. J., 50; 267-270.

Wellensiek, S.J. 1964. Dividing cells as the prerequisite for vernalization. Plant Physiology, 39; 832-835.

Whelan, E.D.P. and Schaalje, G.B. 1992. Vernalization of embryogenic callus from immature embryos of winter wheat. Crop Science, 32; 78-80.

Whitechurch, E.M. and Snape, J.W. 2003. Developmental responses to vernalization in wheat deletion lines for chromosome 5A and 5D. Plant Breeding, 122; 35-39.

Yong, W., Xu, Y., Xu, W., Wang, X., Li, N., Wu, J., Liang, T., Chong, K., Xu, Z., Tan, K. and Zhu, Z. 2003. Vernalization-induced flowering in wheat is mediated by a lectin-like gene *VER2*. Planta, 217; 261-270.

Zamani, I., Kovacs, G., Gouli-Vavdinoudi, E., Roupakias, D.G. and Barnabas, B. 2000. Regeneration of fertile doubled haploid plants from colchicine-supplemented media in wheat anther culture. Plant Breeding, 119; 461-465.

Zeng, J.Z., Wang, D.J. and Wu, Y.Q. 1994. Transgenic wheat plants obtained with pollen-tube pathway method. Sci. China Ser. B., 37; 319-325.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Halide ACAR

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 19.06.1975

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : TED Ankara Koleji Vakfı Özel Lisesi (1981-1992)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü (1992-1996)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı (1996-2000)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar

T.C. Ziraat Bankası A.Ş. Genel Müdürlüğü (1998-)