

**T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AYÇİÇEĞİNDE (*Helianthus annuus* L.) ANTER
KÜLTÜRÜ YOLU İLE HAPLOİD BİTKİ ELDESİ
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

**Sergun DAYAN
Doktora Tezi**

**BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
Yönetici: Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
2011
EDİRNE**

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) Anter Kültürü Yolu ile
Haploid Bitki Eldesi Üzerine Araştırmalar

Sergun DAYAN

Doktora Tezi

Bu tez 26,12,2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Feruzan DANE
(Jüri Başkanı)

Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ
(Jüri Üyesi)

Doç. Dr. Çiler MERİÇ
(Jüri Üyesi)

Yrd. Doç Dr. Hayati ARDA
(Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Hayrettin BEYNEK
(Jüri Üyesi)

ÖZET**DOKTORA TEZİ**

Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) Anter Kültürü Yolu ile Haploid Bitki Eldesi Üzerine Araştırmalar

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİ DALI

Bu çalışmada ayçiçeğinin K3R-SN:10/2010 (G1) ve K3R-SN:4/2010 (G2) olarak isimlendirilen iki farklı ıslah hattında, genotip, ışık, NAA, BA, PVP ve kolşisinin anterden androgenesisin uyarılması üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmalarda MS temel besi yeri kullanılmıştır. İki farklı genotipin anterleri üzerindeki androgenetik tepkilerini test etmek için ışığın iki (sürekli karanlık ve fotoperiyot) farklı uygulaması ve NAA'nın dört (0, 0.5, 1, 2, mg/l), BA'nın dört (0, 0.5, 1, 2, mg/l) farklı konsantrasyonu kombine olarak kullanılmıştır. G1 için en iyi kallus oluşumu fotoperiyotta 2 mg/l NAA ve 0.5, 1 veya 2 mg/l BA içeren MS ortamda %100 olmuştur. Karanlıkta ise 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren MS ortamda %100 olarak bulunmuştur. G2 için en iyi kallus oluşumu fotoperiyotta 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren MS ortamda %87 olarak bulunmuşken karanlıkta yine aynı ortamda %90 olmuştur. En iyi embriyojenik kallus oluşumu G1 için fotoperiyotta 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren MS ortamda %47 iken G2 için yine aynı ortamda ve karanlıkta %43 olmuştur. Her iki genotip için de en çok %10 gibi düşük bir frekansta direk embriyo oluşumu gözlenmiştir. Sonuç olarak genotip, ışık, NAA ve BA'nın ayçiçeği anterlerinden androgenetik cevabın elde edilmesi üzerine etkisinin istatistik olarak önemli olduğu ve aralarında interaktif etkileşim olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen androgenetik yapıların hiç birinden tam bir bitki elde edilemese de anterlerden elde edilen kallus hücrelerinde hem haploid hem de diploid hücreler tespit edilmiştir. Bu gözlemlere dayanarak gelişen kallusların mikrospor kökenli olduğunu ve ayçiçeğinde etkili bir androgenesis uyartım protokolü geliştirdiğimizi düşünmekteyiz. Çalışmada kullanılan PVP (%0.1, %0.5) 'nin androgenesis veya kalluslardaki kahverengileşme üzerine etkili olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca direk anterlere veya kalluslara 3 gün süreyle kolşisin (0.1 ve 0.2 g/l) muamelesi yapılmış fakat bu kalluslardan kromozom sayımı yapılamamıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Ayçiçeği, *Helianthus annuus*, *in vitro*, haploid kültür, Anter kültürü, bitki doku kültürü.

SUMMARY

Ph. D. THESIS

Researches on the Sunflower (*Helianthus annuus* L) About Obtaining Haploid Plant via Anther CultureTRAKYA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

In this study, the effects of genotype, light, NAA, BA, PVP and colchicine on the induction of anther androgenesis from two sunflowers cultivars [K3R-SN:10/2010 (G1) and K3R-SN:4/2010 (G2)] are investigated. MS is used throughout the studies. To test the androgenetic response of two different genotypes' anthers, two light conditions (continuous dark, photoperiod), four NAA concentrations (0, 0.5, 1 and 2 mg/l) and four BA concentrations (0, 0.5, 1 and 2 mg/l) are used in combination. The best callus formation for G1 is 100% on MS medium containing 2 mg/l NAA and 0.5, 1 or 2 mg/l BA at photoperiod condition. In the dark conditions, the best callus formation for G1 is 100% on MS medium containing 2 mg/l NAA and 1 mg/l BA. The best callus formation for G2 is 87% on MS medium containing 2 mg/l NAA and 1 mg/l BA at photoperiod conditions and 90% for dark conditions on the same culture medium. The best embryogenic callus formation for G1 was 47% on MS medium containing 2 mg/l NAA and 1 mg / l BA at photoperiod, for G2 was 43% on the same environment in the dark. For each genotype, maximum direct embryo formation was observed at a frequency as low as 10%. As a result, effect of genotype, light, NAA and BA on androgenetic response of sunflower's anthers was found statistically significant, and was found interaction between them. Even though a complete plant couldn't be obtained from androgenetic structures obtained from the study, both haploid and diploid cells have been identified in calli obtained from anthers. Based on these observations, we think that the origin of callus obtained from this study was microspores, and we optimized an efficient androgenesis protocol for sunflower's anthers used in this study. It is observed that PVP (0.1% or 0.5%) used in this study had no effect on the androgenesis or on callus browning. In addition, anthers or callus are treated with colchicine (0.1 or 0.2 g/l) for three days but chromosomes could not be counted in that callus.

KEY WORDS: Sunflower, *Helianthus annuus*, *in vitro*, Haploid culture, Anther culture, Plant tissue culture.

EDİRNE-2011, 140 pages

ÖNSÖZ

Biyoloji 21. Yüzyılın bilimi olarak görülmekte, sağlık, beslenme ve ziraat başta olmak üzere birçok alanda insana hizmet etmektedir. Modern biyolojinin en önemli dallarından biri olan biyoteknolojinin sunduğu olanaklardan gün geçtikçe daha çok yararlanmaktayız. Doku kültürü çalışmaları ve genetik mühendisliği sayesinde, bitkisel üretimde verim ve kalite artışı sağlayan yeni çeşitlerin geliştirilmesi günümüz ıslahçıların başlıca ilgi alanını oluşturmaktadır. Dünya'daki gelişmelere paralel olarak ülkemizde de biyoteknolojik ıslah çalışmaları hızla artmaktadır. Hal böyle iken doktora tezimin çalışma alanını belirlerken bu gerçekleri göz önünde bulundurmamız kaçınılmaz olmuştur. Ülkemizde, ağırlıklı olarak Trakya bölgesinde tarımı yapılan ayçiçeğinin ıslahı çalışmalarında genellikle klasik tekniklerin kullanıldığını ve saf hatların bu şekilde elde edilmesinin çok zaman ve emek gerektirdiğini göz önünde bulundurarak danışmanımın da tavsiyesi ile bu yönde çalışmalara başladık. Dolayısı ile tez çalışma konumun belirlenmesi, bu konunun projelendirilmesi ve çalışma sırasında karşılaştığım güçlüklerin üstesinden gelmem konusundaki yardımlarından dolayı İpsala Meslek Yüksek Okulu Müdürü ve Danışmanım Sayın **Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA**'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarlarının kullanımı için verdiği izinlerden ötürü Botanik Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Feruzan DANE**'ye ayrıca teşekkür etmek isterim. Sitolojik çalışmalarım sırasında bana yol gösteren bilgiler için Trakya Üniversitesi Bitki Islahı Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü Sayın **Doç. Dr. Çiler MERİÇ**'e de teşekkür ederim. Manevi desteğini her zaman hissettiğim Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın **Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ**'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında gösterdikleri ilgi ve motivasyon desteğinden ötürü Havsa Meslek Yüksek Okulu Müdürü Sayın **Yrd. Doç. Dr. Ayhan AYTAÇ**'a ve Müdür Yardımcısı Sayın **Yrd. Doç. Dr. Hakan OKURSOY**'a teşekkür ederim. Bitkilerin

yetiştirilmesi ve bakımı sırasında seracılık konusundaki tecrübelerinden yararlandığım Sayın **Öğr. Gör. Adnan ÇOLAK**'a ayrıca teşekkür etmek isterim.

Çalışmamda kullanılan tohumların elde edilmesindeki katkılarından ötürü Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden Sayın **Dr. Göksel EVCİ**'ye ve istatistik analizlerdeki yardımlarından ötürü Havsa Meslek Yüksek Okulu'ndan Sayın **Öğr. Gör. Hüseyin ERDAŞ**'a teşekkür etmek isterim.

Eğitim-öğretim hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen Annem **Zekiye DAYAN**'a ve Babam **Fethi DAYAN**'a teşekkürü ayrıca borç bilirim. Son olarak **Sinem GÖK DAYAN**'a eşim olarak çalışmalarım sırasında gösterdiği sabır ve anlayıştan ötürü ve deneylerim ile tez yazımı sırasındaki sosyal hayatımın mağduriyetlerini paylaşmasından dolayı da teşekkürü borç bilirim.

Edirne, Aralık 2011

Sergun DAYAN

Bu doktora tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TÜBAP 2009-92 no'lu proje ile desteklenmiştir.

	ÖZET	I
	SUMMARY	II
	ÖNSÖZ	III
	İÇİNDEKİLER	V
	ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
	ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
	SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1.	GİRİŞ.....	1
1.1.	<i>Helianthus annuus</i> L. (Ayçiçeği).....	2
1.1.1.	Ayçiçeğinin botanik özellikleri.....	2
1.1.2.	Dünya'da ayçiçeği tarımı.....	5
1.1.3.	Türkiye'de ayçiçeği tarımı.....	6
1.2.	Ayçiçeğinde Islah Teknikleri.....	8
1.2.1.	Klasik ıslah teknikleri.....	8
1.2.2.	Biyoteknolojik ıslah teknikleri.....	9
1.3.	Haploid Kültür Tekniği.....	10
1.3.1.	Anter kültürü.....	14
1.3.2.	Mikrospor kültürü.....	29
1.3.3.	Ovül ve ovaryum kültürü.....	31
1.3.4.	Embriyo kurtarma tekniği	32
1.3.5.	Haploid bitkilerde kromozom katlanması.....	33
1.3.6.	Ploidi belirleme.....	35
2.	ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	37
2.1.	Haploid Bitki Elde Etme Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	37
2.1.1.	Anter kültürü çalışmaları.....	37
2.1.2.	Mikrospor kültürü çalışmaları.....	44
2.1.3.	Ovaryum kültürü çalışmaları.....	45
2.1.4.	Embriyo kurtarma tekniği çalışmaları.....	46
2.2.	Ayçiçeğinde <i>in vitro</i> Çalışmalar.....	47
2.2.1.	Ayçiçeğinde haploidizasyon çalışmaları.....	49
3.	MATERYAL VE METOD.....	55
3.1.	Materyal.....	55
3.2.	Metod.....	55
3.2.1.	Donör bitkilerin yetiştirilmesi ve kapitulum alımı.....	55
3.2.2.	Tek çekirdekli mikrospor eldesi için uygun çiçek boyunun belirlenmesi.....	57
3.2.3.	Kapitulumların sterilizasyonu ve anter izolasyonu	58
3.2.4.	Besi yerlerinin ve stok solüsyonların hazırlığı ve sterilizasyonu.....	61
3.2.5.	Anter kültürü başlangıç ortamlarının hazırlanması ve inkübasyonu.....	62
3.2.6.	PVP (Polivinilpirolidon) muamelesi.....	64
3.2.7.	Kolşisin muamelesi.....	65
3.2.8.	Rejenerasyon ortamlarının hazırlanması.....	67
3.2.9.	Kültür ortamı koşulları.....	68
3.2.10.	Sitolojik incelemeler ve ploidi seviyesi tespiti.....	70
3.2.11.	İstatistik analizler.....	70

4.	BULGULAR.....	72
4.1.	Donör Bitkilerin Çimlenme ve Gelişmesi.....	72
4.2.	Uygun Kapitulum ve Tomurcuk Büyüklüğünün Tespiti.....	73
4.3.	Anterden Androgenesis Uyarım Sonuçları.....	75
4.4.	PVP Muamelesi Sonuçları.....	91
4.5.	Kolşisin Muamelesi Sonuçları.....	93
4.6.	Rejenerasyon Sonuçları.....	95
4.7.	Sitolojik Gözlemler ve Ploidi Seviyesi Tespiti.....	97
5.	TARTIŞMA.....	100
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	123
	KAYNAKLAR.....	126
	ÖZGEÇMİŞ.....	138

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Ayçiçeğinde kapitulumun yapısı.....	5
Şekil 1.2	Haploid bitki üretim yöntemleri.....	13
Şekil 1.3	Anter kültürünün yapılışı.....	15
Şekil 1.4	Tütün mikrosporlarının <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> da gelişim seyirleri.....	31
Şekil 3.1	Sera koşullarında yetiştirilen ayçiçeği bitkileri.....	56
Şekil 3.2	Ayçiçeğinin henüz açmamış apikal kapitulumu.....	57
Şekil 3.3	Çalışmada kullanılan kapitulumlar.....	59
Şekil 3.4	Stereo mikroskop altındaki ayçiçeği anterleri.....	59
Şekil 3.5	Ayçiçeğinin açmamış tüp çiçek tomurcukları.....	60
Şekil 3.6	Kolşisin muamelesine alınan kalluslar.....	67
Şekil 3.7	İklim odası genel görünüşü.....	69
Şekil 3.8	Karanlık uygulamasındaki kültürler.....	69
Şekil 4.1	Ayçiçeği mikrospor ve polenleri.....	74
Şekil 4.2	Ayçiçeği kapitulumları.....	75
Şekil 4.3	MS kültür ortamındaki beş günlük anter.....	78
Şekil 4.4	Kültürün 6. haftasındaki kalluslar.....	78
Şekil 4.5	Kültürün 3. haftasındaki kalp şekilli embriyo.....	79
Şekil 4.6	Kültürün 2. haftasında anterlerden kallus oluşumu.....	79
Şekil 4.7	Oluşan embriyoların gelişim seyri.....	90
Şekil 4.8	Karanlık uygulamasında 2. hafta sonunda oluşan kırmızı renkli kallus dokusu.....	90
Şekil 4.9	0.2 g/l kolşisin muamelesi sonucu kalluslarda meydana gelen kahverengileşme.....	94
Şekil 4.10	Rejenerasyon denemesi sonundaki kalluslar.....	96
Şekil 4.11	Kallus dokularında gözlenen değişik ksilem elemanları.....	98
Şekil 4.12	2n=34 kromozoma sahip kallus hücresi.....	98
Şekil 4.13	n=17 kromozomlu haploid kallus hücresi.....	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Bu çalışmada kullanılan MS temel besin ortamı içeriği.....	62
Çizelge 3.2	Kullanılan besi yeri kombinasyonları.....	63
Çizelge 3.3	Anter başlangıç kültüründe kullanılan genotip, ışık ve hormon kombinasyonları ile toplam anter sayıları.....	64
Çizelge 3.4	PVP muamelesi uygulama şekli.....	65
Çizelge 3.5	Anterlere kolşisin muamelesi uygulama şekli.....	66
Çizelge 3.6	Kalluslara kolşisin muamelesi uygulama şekli.....	66
Çizelge 3.7	Kallus eksplantlarının rejenerasyon için yapılan uygulamalar	68
Çizelge 4.1	Ayçiçeği tohumlarının çimlenme sonuçları.....	72
Çizelge 4.2	Genotip, ışıklanma ve hormonların kallus, embriyojenik kallus, direk embriyo oluşumu ve kararına üzerine etkisi.....	76
Çizelge 4.3	Genotipin toplam kallus oluşumu üzerine etkisi.....	80
Çizelge 4.4	Genotipin toplam embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkisi	81
Çizelge 4.5	Genotipin direk embriyo oluşumu üzerine etkisi.....	81
Çizelge 4.6	Genotipin anter kararına üzerine etkisi.....	81
Çizelge 4.7	Işığın toplam kallus oluşumu üzerine etkisi.....	82
Çizelge 4.8	Işığın toplam embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkisi.....	83
Çizelge 4.9	Işığın direk embriyo oluşumu üzerine etkisi.....	83
Çizelge 4.10	Işığın anter kararına üzerine etkisi.....	83
Çizelge 4.11	NAA'nın toplam kallus oluşumu üzerine etkisi.....	84
Çizelge 4.12	NAA'nın toplam embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkisi.	84
Çizelge 4.13	NAA'nın direk embriyo oluşumu üzerine etkisi.....	85
Çizelge 4.14	NAA'nın anter kararına üzerine etkisi.....	85
Çizelge 4.15	BA'nın toplam kallus oluşumu üzerine etkisi.....	86
Çizelge 4.16	BA'nın embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkisi.....	86
Çizelge 4.17	BA'nın direk embriyo oluşumu üzerine etkisi.....	87
Çizelge 4.18	BA'nın anter kararına üzerine etkisi.....	87
Çizelge 4.19	Genotip ve Işıklanma durumu dikkate alınmaksızın, NAA ve BA'nın anterden kallus oluşturma yüzdesi (%) üzerine etkisi.	88
Çizelge 4.20	Genotip, ışıklanma ve PVP'nin kallus oluşumu ve kararına üzerine etkisi.....	92
Çizelge 4.21	PVP'nin anterden kallus oluşumu üzerine etkisi.....	92
Çizelge 4.22	PVP'nin anterlerde kararına üzerine etkisi.....	93
Çizelge 4.23	Genotip ve Kolşisin'in anterden kallus oluşumu ve kararına üzerine etkisi.....	94
Çizelge 4.24	Kalluslara Genotip, BA ve Kolşisin uygulaması.....	95
Çizelge 4.25	Rejenerasyon denemesi sonuçları.....	96

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

n	Haploid kromozom sayısı
2n	Diploid kromozom sayısı
kg	Kilogram
ha	Hektar
mm	Milimetre
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
Gy	Gray
mg/l	Miligram Bölü Litre
μM	Mikromolar
M	Molar
ml/l	Mililitre Bölü Litre
g/l	Gram Bölü Litre
mM	Milimolar
cm	Santimetre
N	Normal
dk	Dakika
μm	Mikrometre
~	Yaklaşık
lux	Birim alana düşen ışık akısı ölçü birimi

Kısaltmalar

GAP	Güneydoğu Anadolu Projesi
MÖ	Milattan önce
DNA	Deoksiribonükleik asit
RLFP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
IMI	İmidazolinone
F ₁	Filial (1. döl)
F ₂	Filial (2. döl)
F ₄	Filial (4. döl)
UV	Ultraviyole
BA	6-Benzilaminopürin
ABA	Absisik Asit
KN	Kinetin
BAP	6-Benzilaminopürin
NAA	Naftalen Asetik Asit
2,4-D	2,4- Diklorofenoksiasetik Asit
IAA	İndol-3 Asetik Asit
GA ₃	Giberellik Asit
TDZ	Thidiazuron

IBA	İndol-3 Bütirik Asit
AK	Aktif Karbon (Kömür)
AVG	Aminoethoxy-vinylglycine
ACC	1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid
CMS	Cytoplasmic Male Sterility (Sitoplazmik Erkek Kısır)
LS	Linsmair ve Skoog besi yeri
N6	Chu besi yeri
MN6	Modifiye N6 ortamı
MS	Murashige ve Skoog temel besin ortamı
NLN	Lichter besi ortamı
NN	Nitsch and Nitsch temel besin ortamı
B5	Gamborg's temel besin ortamı
W	White's temel besin ortamı
PEG	Polyethyleneglycol
SSR	Mikrosatellit marker
APM	Amiprofos-methyl
PAA	Phenylaseticacid
GM1	Geriye melezleme 1. jenerasyon
GM4	Geriye melezleme 4. jenerasyon
DH	Double-haploid
PVP	Polivinilpirolidon
SPSS	Statistical Package for Social Sciences

1. GİRİŞ

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) dünyada ve ülkemizde en önemli bitkisel yağ kaynaklarından biridir. Artan nüfusa paralel olarak insanlığın bitkisel yağ ihtiyacı giderek artmaktadır. Ülkemiz insanının bitkisel yağ tüketiminde çoğunlukla ayçiçeği yağını tercihi ve gerekli bitkisel yağın yarısını dışarıdan ithal etmek zorunda olmamız, son yıllarda ayçiçeğinin önemini giderek arttırmaktadır. Halen ayçiçeği tarımında genelde hibrit çeşitler üretimde kullanılmasına rağmen, aynı gen kaynakları kullanılması nedeniyle, geleneksel ıslah metotları kullanılarak elde edilen çeşitlerde genetik verimlilik kapasitesinin üst sınırına yaklaşılmıştır. Bu sorunun aşılması ancak biyoteknolojik metotların kullanılmasıyla mümkündür. Bu nedenle, son yıllarda bu çerçevede yapılan çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmakta ve her yıl yeni başarılar elde edilmektedir.

Biyoteknolojik metodlar genel olarak bitki doku kültürü ve moleküler biyoloji ile sitokimyasal yöntemlerin bir bileşkesini içermektedir. Bu çalışma daha çok bitki doku kültürü yöntemleri üzerine yoğunlaşacaktır. Ayçiçeği daha önceki bazı *in vitro* çalışmalar ile androgenesis veya ginogenesis yönünde uyarılmış ve hem haploid hem de dihaploid bitkiler elde edilmiştir. Bu çalışmalar aşağıda incelenmekle birlikte, ülkemizde henüz ayçiçeği ile yapılmış ve anter kültürü yöntemini içeren bir araştırma raporu mevcut değildir. Dolayısı ile bu tez çalışması Türkiye’de ayçiçeğinden haploid bitki elde etme üzerine ilk tez çalışmasıdır.

Bu doktora çalışmasında, geleneksel metodlar ile 7-8 kuşak sürececek ıslah sürecinin tek bir kuşağa indirilmesini sağlayacak biyoteknolojik yöntemlerden birisi olan haploid bitki elde edilmesi üzerinde çalışılmıştır. Bu bağlamda iki farklı ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) genotipinin anterlerinde androgenesis teşvik etmek amacı ile değişik hormon kombinasyonları ve ışığın etkisi, çalışma sonucu elde edilen yapıların (kallus ve embriyolar) rejenerasyonu için yine değişik hormonların etkisi araştırılmıştır. Ayrıca kromozom duplikasyonunun gerçekleşmesi için kolşisininin etkisi incelenmiş ve

elde edilen yapıların ploidi seviyelerinin belirlenmesi için sitolojik gözlemler gerçekleştirilmiştir.

1.1. *Helianthus annuus* L. (Ayçiçeği)

Helianthus'un Latince kökenine baktığımız zaman “Helios=Güneş”, “Anthos=çiçek” anlamı taşımaktadır. Yine bilindiği gibi İngilizce’de “sunflower” güneş çiçeği anlamına gelir. Türkçe’de ise “Günebakan, Gündöndü, gibi yerel isimleri bitkinin kapitulumunun güneşi takip etmesi sonucu yüzünü güneşe döndüğü anlamında kullanılmaktadır. Bununla birlikte zirai literatürde ve yaygın olarak kullanılan adının Güneş’le alakalı olmak yerine Ay’ı çağrıştırdığını görüyoruz. Ayçiçeği. Yine Latince “annuus=bir yıllık” demek olduğundan, *Helianthus annuus*’u bir yıllık güneş çiçeği olarak tanımlamak yanlış olmayacaktır.

1.1.1. Ayçiçeğinin botanik özellikleri

Ayçiçeğinin taksonomik yerini aşağıdaki gibi gösterebiliriz;

Regnum: Plantae

Divisio: Spermatophyta

Classis: Magnoliopsida

Subclassis: Asteridae

Ordo: Asterales

Familia: Asteraceae

Genus: *Helianthus*

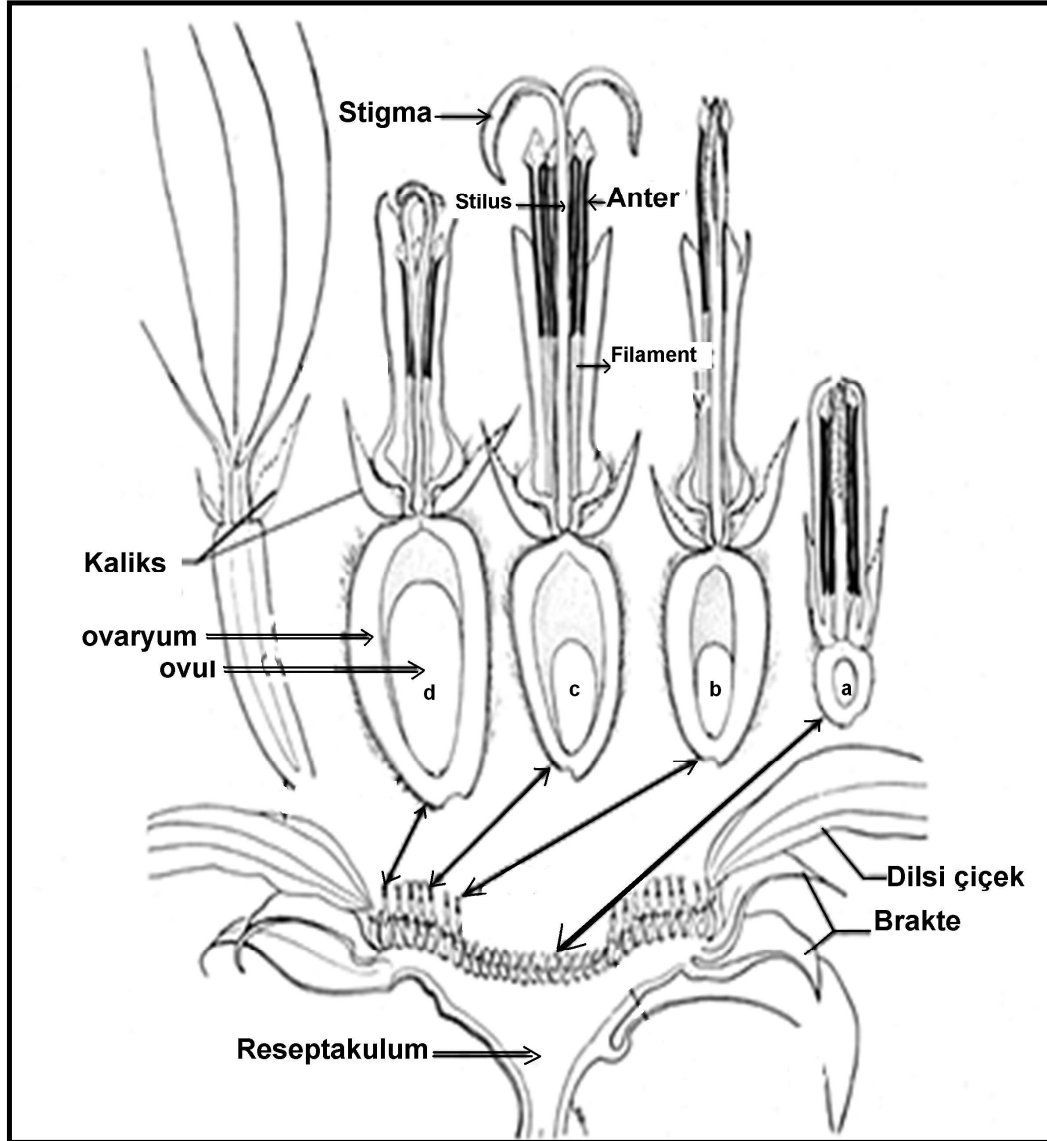
Species: *H. annuus* L. (Seçmen vd. 1992).

Asteraceae familyası üyesi olan *Helianthus* L. genusunun temel kromozom sayısı $n=17$ 'dir ve diploid ($2n=2x=34$), tetraploid ($2n=4x=68$) ve hexaploid ($2n=6x=102$) türleri vardır (Jan 1997). Genusun dünya yayılmış 67 kadar türü vardır ve kökenin Amerika kıtasıdır. Türlerin büyük bir kısmı tek veya çok yıllık otsu, nadiren çalimsıdır (Heiser 1978).

Kültüre alınmış olan iki türü mevcuttur. Bunlarda *Helianthus annuus* L. (Ayçiçeği) tek yıllıktır ve yağlı olan tohumları nedeni ile ekonomik değere sahiptir. *Helianthus tuberosus* L. (Yer elması) ise çok yıllık rizomlu bir bitkidir ve rizomları besin maddesi olarak kullanılır (Heiser 1978). Kupicha (1975)'ya göre Türkiye'de her iki türde bulunmaktadır.

Asteraceae familyasının karakteristik özelliği inflorosensinin kapitulum şeklinde olmasıdır (Şekil 1.1). Kapitulum ilk oluştuğu zaman braktelerle kaplıdır. Kapitulum geliştikçe brakteler açılır ve kapitulum kenarlarına iki sıra halinde dizilir. Kapitulum iç kısmında dilsel ve tüpsü çiçek olmak üzere iki tip çiçek içerir. Dilsel çiçekler kapitulumun çevresine dizilmişlerdir. Koyu sarı petaller şeritsi yapılar şeklinde birleşmiştir. Dilsel çiçekler sterildir; pistil, stigma ve stilus içerirler fakat anterleri yoktur. Tüpsü çiçekler disk şeklindeki kapitulumun (kafa) çevresi haricindeki kısma yerleşmişlerdir ve çiçekçik şeklinde isimlendirilirler. Tüpsü çiçekler fertildir, pistil ve stamenlerin her ikisini de içerir. Ayçiçeği çiçekleri epigin tiptedir, petaller ve stamenler ovaryumun üstünde yer alır. Her tüpsü çiçekçik dışta brakte ve tüy şeklinde modifiye olmuş iki sepal içerir. Korolla birleşiktir, beş petal uçları dışında birleşmiştir. İlk önce kapitulumun çevreye yakın kısmında bulunan tüpsü çiçekler açar ve bu durum merkeze doğru ilerler. Tüm çiçeklerin açışı 5 ila 10 gün içinde tamamlanır. Çiçeklenme periyodu kapitulum büyük ise veya hava soğuk ya da bulutlu ise uzayabilir. Sabahın erken saatlerinde stamenlerin filamentleri hızla uzar ve anter tüpü korolladan dışarı çıkar. Bu olay güneşli günlerde sabah 07.00'da meydana gelir. Bu evreden hemen sonra anter keseleri açılır, anter kesesi içindeki polenler serbest kalır. Aynı gün saat 17.00 civarında stilusun uzamasıyla iki lobu ayıramayan tüylü olan stigma anter tüpünün üzerine çıkar. Stigma bu evrede kabul edici değildir, çünkü iç yüzeyi tüylü olan iki lob birbirinden ayrılmamıştır. Stigma ertesi sabah tamamen kabul edici yüzeyi ile ortaya çıkar. Bu evrede stamenlerin filamentleri turgorlarını kaybederler ve anterler korolla içine

çekilmeye başlar. Bu olay esnasında polenler stigmanın yüzey tüyleri tarafından yakalanır. Polenler stigma yüzeyine temas edince gerçekleşen etkileşim sonucu tozlaşma ve akabinde döllenme meydana gelir. Çiçek açıldıktan sonra ikinci günün sabahı, anterler ve stigma kurur, büzülür ve korolla tüpü içine geri çekilir olmuşlardır (Seiler 1997). Ekzin yüzeyi dikenli olan polen tanelerinin yüzey morfolojisi rüzgar ile taşımaya elverişli değildir. Ayrıca su üzerinde durabilme özelliğinden de yoksundurlar. Bunun yanında böcekler yardımı ile taşınmak için iyi adapte olmuşlardır (Seiler 1997).



Şekil 1.1: Ayciçeğinde kapitulunun yapısı. Çiçeklerin değişik evreleri şekilde görülmektedir. a) kapitulum merkezindeki tomurcuk evresi, b) staminad evre, c) pistilat evre, d) solgun çiçek evresi.

1.1.2. Dünya’da ayciçeği tarımı

Dünya ayciçeği üretim miktarı 2001 ve 2003 yılları itibariyle incelendiğinde, dengeli bir seyir izleyerek arttığı görülmektedir. 2003 yılı verilerine göre Rusya dünya çapında en çok ayciçeği üreten ülke konumundadır ve toplam dünya ayciçeği üretiminin

%16'sını bu ülke karşılamaktadır. Rusya'da 1860 yılında başlayan yağ üretim miktarı %28'den %50'lere artmıştır. Daha sonra Ukrayna, Arjantin, Amerika ve Çin dünya ayçiçeği üretiminde en çok paya sahip ülkelerdir. Bu sıralamada Türkiye 8. sırada yer almaktadır. Ayçiçeği Dünya'da ve Türkiye'de en önemli yağ bitkilerinden biridir (Eken 2004).

1.1.3. Türkiye'de ayçiçeği tarımı

Eskiden ülkemizde tereyağı, kuyruk yağı, iç yağı ve zeytinyağı tüketimi yaygınken, daha sonraları insanların tüketim alışkanlıkları değişerek kullanılan yağın %69'unu bitkisel yağlar oluşturmuştur (Eken 2004). Artan nüfusa paralel olarak ülkemizin bitkisel yağ ihtiyacı giderek artmaktadır. Ülkemiz insanının bitkisel yağ tüketiminde çoğunlukla ayçiçeği yağını tercihi ve gerekli bitkisel yağın yarısını dışarıdan ithal etmek zorunda olmamız, son yıllarda ayçiçeğinin önemini giderek arttırmaktadır (Kaya 2004). Kullanılan bitkisel yağların %57'sini ayçiçeği yağı oluşturmaktadır. Ayçiçeğinin ülkemizdeki en önemli tüketim şekli yağlıktır. Ayçiçeğinin hem sıvı yağ hem de margarin sanayinde kullanılması değerini daha da arttırmaktadır. Türkiye'de yıllık kişi başı bitkisel yağ tüketimi 20 kg civarındadır. Türkiye'deki ayçiçeği ekiliş alanlarının %73'ü Trakya- Marmara, %13'ü İç Anadolu, %10'u Karadeniz, %3'ü Ege ve %1'i Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindedir (Eken 2004).

Ayçiçeği hemen her bölgemizde yetiştirilebilen ve tanelerinde yüksek oranda kaliteli yağ bulunduran, ekim alanı, üretimi ve yağ üretimi bakımından ilk sırada yer alan önemli bir yağ bitkisidir. Bu nedenle ayçiçeği üretiminin artırılması gerekmektedir. Üretim artışı ekim alanı veya birim alan verimi artışıyla gerçekleştirilebilir. Günümüzde ayçiçeği ekim alanını artırmada, I. ve II. ürün tarımı olarak, GAP (Güneydoğu Anadolu Projesi) ve Akdeniz bölgeleri potansiyel görülmektedir. Bunun dışında üretim deseninde meydana gelen değişikliklerle ayçiçeği ekim alanı artırılabilir. Verimi artırmada ise yeni geliştirilen hibrit ayçiçeği çeşitlerine uygun yetiştirme teknikleri

uygulamak etkili olacaktır. Ayçiçeği ekiliş alanları 1999 yılında 595 bin ha iken her yıl giderek azalan bir trend izleyerek 2001 yılında 510 bin ha'a kadar düşmüştür. 2002 yılında ekim alanı tekrar 550 bin ha'a yükselmiştir. 2003 yılında ekim alanı 545 bin ha olarak gerçekleşmiştir. Üretim ise 1999 yılında 950 bin ton iken, 2000 yılında 800 bin tona 2001 yılında ise 650 bin tona gerilemiştir. Bu azalmada en önemli neden ekim alanındaki ve verimdeki düşüşlerdir. 2002 yılında üretim tekrar 850 bin ton'a yükselmiştir. Bu yükselmenin ise bir önceki yıl ayçiçeği fiyatlarının iki kata yakın oranda artması ile ekim alanındaki ve verimdeki olumlu gelişmelerden kaynaklanmaktadır. 2003 yılında ise üretim 800 bin ton'a gerilemiştir. Ülkemizde ekimi yapılan yağlı tohumlu bitkiler arasında ekim alanı ve yağ üretimi bakımından (%73) ilk sırayı alan ayçiçeği, ağırlıklı olarak Trakya bölgemizde üretilmekte olup, bunda %30.8'ni tek başına Tekirdağ ili karşılamaktadır. Edirne % 20.1 ve Kırklareli % 11.2 ile diğer önemli ayçiçeği üretimi yapan illerdir. Ayçiçeği verimi bakımından Türkiye ortalaması 125 kg/da iken, bölgeler arasında en düşük verim 79.8 kg/da ile Orta Anadolu Bölgesi'nden elde edilmektedir (Kaya 2003).

Ayçiçeği kurağa fazla dayanıklı olmamakla birlikte diğer kültür bitkilerinin yetişemediği kurak koşullarda başarıyla yetişebilmektedir. Ayçiçeği bitkisi topraktaki suyu en iyi değerlendiren bitkilerden biridir. Yetiştirme süresi boyunca 500-600 mm'lik toplam yağışa gereksinim duymaktadır. Ancak yağışlarla alınan su miktarı yeterli değilse verim alınması için sulama gereklidir. Kurak koşullarda sulama ile % 100'e varan bir verim artışı sağlanabilmektedir (Kolsarıcı vd. 2000). Ayçiçeğinde su isteği toprak yapısına, sıcaklığa, nispi neme ve rüzgarın etkisine göre değişmektedir. Suya en fazla ihtiyaç duyduğu dönem çiçeklenmeden önceki ve sonraki 40 günlük dönemdir. Özellikle, çiçeklenme ve döllenmenin olduğu 10 günlük dönemde, bitki su stresine maruz kalırsa, verim çok fazla etkilenmektedir. Ayrıca, çiçeklenmeden sonraki 20 günlük dönemde bitkinin su stresine girmesi halinde, yağ verimi olumsuz yönde etkilenmektedir (Arıoğlu 1999). Bu periyotta yapılacak 1-2 sulama ile verim artışı sağlanabilmektedir. Özellikle Orta Anadolu Bölgesi ve Batı Geçit Bölgelerimizde daha çok kuraklıktan kaynaklanan verim düşüklüklerini minimize edebilmek için ayçiçeğinde özellikle sulama potansiyeli olan alanlarda sulamanın teşvik edilmesi hem üretici hem de ülke ekonomisi açısından bir kazanç olacaktır.

1.2. Ayçiçeğinde İslah Teknikleri

Ayçiçeği ekimi MÖ 3000 yılları dolaylarında Amerika kıtasında başlamıştır. Boya maddesi ve gıda olarak kullanımının yanında Avrupa'ya gelişi ile beraber süs bitkisi olarak da kullanılmıştır (Meriç 2002). Dolayısı ile bu kullanıma başlandığı zamandan itibaren en iyi tohumun elde edilmesi için ilkelde olsa ıslah çalışmalarının başladığını söyleyebiliriz. Ancak modern bilimin gelişmesi ve biyoteknoloji ile genetikteki atılımlar sayesinde günümüzde çok farklı ıslah yöntemleri mevcuttur. Bu yöntemler klasik ve biyoteknolojik yöntemler olarak iki başlıkta incelenecektir.

1.2.1. Klasik ıslah teknikleri

Kendine döllen ve yabancı dölenen bitkilerin klasik yöntemler ile ıslahı çalışmaları bazı açılardan farklılıklar gösterse de burada bu tarz bir ayrıma gidilmeden kısaca hepsinden bahsedilecektir. Bunun en önemli sebebi ise ayçiçeğinin hem kendine dölenen (Meriç 2002) hem yabancı dölenen (Önemli 2005) bir bitki olmasıdır.

Klasik ıslah yöntemleri seleksiyon ve popülasyon ıslahı, melezleme ıslahı, geriye melezleme, soy içi üreme ıslahı, dayanıklılık ıslahı, mutasyon ıslahı, tür ve genus melezleri, poliploidi ıslahı gibi değişik tekniklerden oluşmaktadır (Demir ve Turgut 1999). Bu tekniklerin hemen hepsinin ortak noktası istenilen özelliklerde bitkilerin elde edilmesi için çok uzun zaman dilimlerine ihtiyaç duymalarıdır. Bu nedenle bu çalışmanın esas konusu olan anter kültürünü de kapsayan biyoteknolojik yöntemlerin en önemli avantajı gerek duyulan bu uzun süreyi oldukça kısaltması olarak görülmektedir.

1.2.2. Biyoteknolojik ıslah teknikleri

Ayçiçeğinde bugüne kadar yapılan gerek klasik ıslah, gerekse biyoteknolojik metotlar ile üstün verim ve kalite özelliklerine sahip birçok hat ve çeşitler geliştirilmiş, hastalıklara, orobanşa ve zararlılara dayanıklı, yabancı ot ilaçlarına dominant olan hibritler elde edilmiştir. Yüksek yağ oranı, orobanşa, herbisitlere, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi önemli verim öğelerinde, moleküler marker metotları yardımıyla ayçiçeği ıslahında istenilen karakterlerin elde edilmesi, biyoteknolojinin ıslaha en önemli katkılarından. Moleküler marker yöntemlerinin ayçiçeği ıslahında ilk kullanımı ayçiçeği kendilenmiş hatlarının erken devrelerde izozim çeşitliliği (isozyme polymorphism) yoluyla tanımlanması ile başlamıştır (Quilet vd. 1992, Kirichenko vd. 1999). Yine bu genetik tanımlamada daha sonraları DNA markerleri kullanılmıştır (Tang vd. 2002, Yu vd. 2002). Bu çerçevede yapılan çalışmalar sonucunda: öncelikle ayçiçeğinde RLFP (Restriction fragment length polymorphism) analiziyle, Gentzbittel vd. (1992) 44 *Helianthus* türünü inceleyerek ayçiçeği cinsinin soy ağacı çıkarmışlar, Riseberg ve Seiler (1990), ribozomal RNA ve kloroplast moleküler markerleri kullanarak, kültürü yapılan ayçiçeğinin orijinini belirlemişlerdir. Bu çalışmalarını takiben, öncelikle yabancı türler incelenerek basit bir ayçiçeği genomik RFLP haritası hazırlanmış, daha sonra bu harita genişletilmiştir. Yine RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) teknikleriyle ayçiçeği çeşit ve hatların, ve yabancı türlerinin genetik farklılıkları ortaya çıkarılarak, ıslahta istenilen özelliklerin moleküler marker kullanılarak yapılan seleksiyon yoluyla belirlenmesine yönelik çalışmalara da olanak sağlanmaktadır.

Özellikle Avrupa Topluluğu ve ülkemizin halen karşı olduğu transgenik bitkiler, yani soya, mısır, pamukta olduğu gibi, başka bir organizmadaki genlerin ayçiçeğine aktarılmasıyla elde edilen çeşitler ABD’de ıslah edilmesine rağmen, henüz ticari olarak satışa sunulmamıştır. Ancak ayçiçeğinde özellikle yabancı ot ve orobanşı kontrol eden IMI (*Imidazolinone*) herbisit grubuna dayanıklı genler, klasik geriye melezleme yoluyla ve embriyo kültürü uygulanıp jenerasyon süresi kısaltılarak, yabancı türlerden elde edilip ticari çeşitlere aktarılmış, bu yıl içerisinde ülkemizde ve dünyada piyasaya sürülmüştür (Kaya vd. 2003).

Yukarıda sayılan birçok biyoteknolojik yöntem ayçiçeği ıslağında gün geçtikçe daha yaygın biçimde kullanılarak çeşitli başarılar elde edilmektedir. Bunun yanında bu tezin konusuna olan yakınlığı dolayısıyla daha çok doku kültürü yöntemleri içinde bulunan haploid kültürlerin tanımı üzerinde yoğunlaşılacaktır.

1.3. Haploid Kültür Tekniği

Genetik kromozom sayısını (n) taşıyan bitki haploid bitki, haploid bitki elde etme işlemi de haploidizasyon olarak tanımlanmaktadır. Haploid bir bitkinin kromozom sayısının (n) bazı kimyasal maddelerle katlanması yoluyla, türün normal kromozom sayısına ($2n$) yeniden kavuşturulması ve mutlak homozigot bitkilerin elde edilmesi işlemine ise dihaploidizasyon adı verilmektedir (Ellialtıoğlu vd. 2002).

Haploid bitkiler, diploid bir bitkideki tüm organlara sahiptirler ancak hücreleri daha küçük olduğundan morfolojik olarak zayıf, güçsüz, bodur ve daha küçük yapılı bitkiler olup gelişimleri daha yavaştır. Yaprakları dar ve küçük, gövde ve dallarda boğum araları kısa iken, çiçeklenme süresi daha uzundur. Küçük çiçek açarlar ancak sterildirler ve tohum bağlamazlar. Polenleri küçük, anormal şekilli ve içleri boş olup, bu polenlere sahip anterler çatlamaz. Plastid sayıları azdır. Ayrıca stomaları daha küçüktür ve birim alanda daha fazla stoma taşırlar (Emiroğlu 1982, Er 1992, Ellialtıoğlu vd. 2002).

Bu özelliklerinden dolayı normalde hiçbir tarımsal değer taşımayan haploid bitkiler; bitki ıslahı, genetik, sitolojik, fizyolojik, biyolojik ve biyokimyasal çalışmalar için son derece önemli ve değerli materyallerdir. Haploidi teknikleri özellikle ıslah çalışmalarında, yabancı döllenmiş türlerdeki 10-12, kendine dölenen türlerdeki 5-7 jenerasyonluk kendileme süresini tek jenerasyona indirerek mutlak homozigotluğu sağlar. Dioik türlerde veya kendileme depresyonu nedeniyle klasik yöntemlerle homozigotluğa ulaşmanın zor olduğu lahana, çilek, anemon gibi türlerde, bu sorun tek

bir jenerasyonda çözülebilirken, uzun gençlik kısırlığına sahip çok yıllık meyve ağaçları ve orman bitkilerinde homozigotluk elde etmede çok büyük avantajdır. F1 hibrit çeşit ıslahında, dihaploid bitkilerden elde edilen saf hatlar ebeveyn olarak kullanılabilir. Mikrosporlardan oluşan embriyolar yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip oldukları için direkt DNA transferi ve gen transferi çalışmalarında etkin şekilde faydalanılabilmektedir. Ayrıca, haploid hücre veya protoplastlar sayesinde farklı patojenler ve bunların fizyolojik ırklarına, antibiyotiklere, toksinlere, herbisitlere, tuza, soğuğa veya sıcağa dayanıklı mutantlar *in vitro* seleksiyon imkanı ile küçük bir alanda çok kısa sürede, ekonomik şekilde seçilebilmektedir. Bunların dışında; ıslah etkinliğinin artırılmasında, saf süper erkek bireyler elde edilmesinde, mutasyon ıslahında, süs bitkilerinin bodurlaştırılmasında, genom haritalarının çıkartılmasında, polijenik karakterlerin haritalanmasında haploid bitkiler özellikle ıslahçı ve genetikçiler için sonsuz avantajlar sunmaktadır (Abak 1986, Wenzel ve Foroughi - Wehr 1994, Ferrie ve Keller 1997, Hatipoğlu 1999, Ellialtıoğlu vd. 2002).

Bu çalışmaların etkin şekilde yürütülebilmesi için yeterli miktarda ve kolayca elde edilebilmeleri gereken haploidler 3 yolla meydana gelmektedir (Şekil 1.2):

A. Spontan yolla: ‘İlk doğal haploid, Blakeslee vd. (1922, Arı 2006’dan) tarafından *Datura stramonium*’da keşfedilmiştir. Doğada androgenesis, ginogenesis, semigami, poliembriyoni veya kromozom eliminasyonu yollarından birisi ile oluşan spontan haploidlerin oluşum frekansı % 0.001–0.01 gibi çok düşük düzeydedir ve bugüne kadar ancak 100 kadar türde rastlanmıştır’.

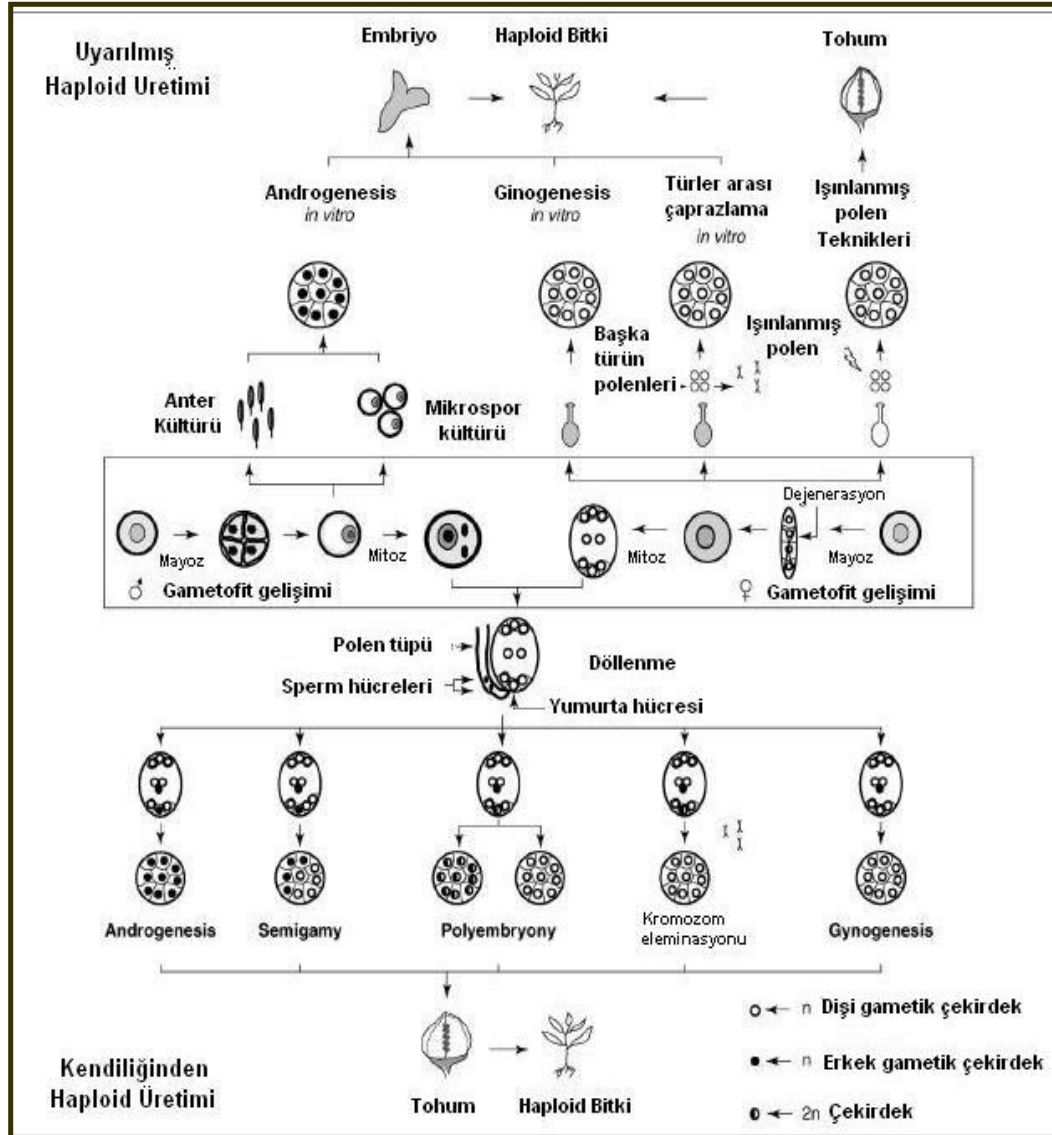
B. *In situ* uyarımla: Uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlamının geciktirilmesi, abortif veya ışınlanmış polenlerle tozlama, sıcaklık şokları, değişik kimyasallar, hormon uygulamaları, “X” veya “UV” ışınları ile haploid bitki elde edilebilir (Arı 2006).

C. *in vitro* uyarımla: Androgenesis (anter veya mikrospor kültürü) veya ginogenesis (ovül kültürü, ovaryum kültürü veya embriyo kurtarma) yöntemleri ile laboratuvar koşullarında da haploid bitki elde edilebilmektedir (Arı 2006).

In vitro uyartım metodlarından androgenesiste bitkinin erkek üreme organları (anter veya mikrospor), ginogenesiste ise bitkinin dişi üreme organları (ovül veya ovaryum) yapay ortamlarda kültüre alınmaktadır. Her iki yöntemde de temel prensip; normal koşullarda mikrospor veya megaspor hücresinin gametofitik gelişimini durdurarak, çeşitli uyartılar yardımıyla embriyojenik gelişmeye zorlamaktır. Androgenesis ve ginogenesisten başka, uzak akraba türleri arasındaki melezlemeler ve özel uygulamalara tabi tutulmuş polenlerin tozlamada kullanılması sonucunda embriyo kurtarma tekniği ile de haploidler elde edilmektedir (Bal 2002). Haploidi tekniklerinin kullanımı ile 37 familyanın 88 cinsine ait 247 türde haploid uyartımının sağlandığı bildirilmektedir (Pierik 1989). Ancak bu teknikler arasında en yaygın olarak kullanılan ve en fazla başarının sağlandığı yöntem anter kültürü olup, bu yöntemle 25 familyanın 134 türünden olumlu cevap alındığı kaydedilmiştir (Bhojwani ve Razdan 1996).

Totipotent özellikteki binlerce mikrospora sahip bir anterden, uygun *in vitro* koşullarda çok sayıda haploid bitkinin elde edilebildiği bu teknikte; elde edilen bitkilerin kromozom sayılarının katlanmasıyla dihaploid hale getirilen bitkiler %100 homozigot karakter kazanmakta ve F1 hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilme şansına sahip olmaktadır (Ellialtıoğlu vd. 2002).

Bu çalışmanın konusu gereği *in vitro* uyartım yöntemleri aşağıda daha detaylı ele alınacaktır.



Şekil 1.2: Haploid bitki üretim yöntemleri. Haploid oluşumu kendiliğinden ya da bitkinin erkek ya da dişi kısımlarını kullanarak çeşitli *in vitro* yöntemler aracılığıyla uyarılabilir (Forster vd. 2007'den uyarlanmıştır).

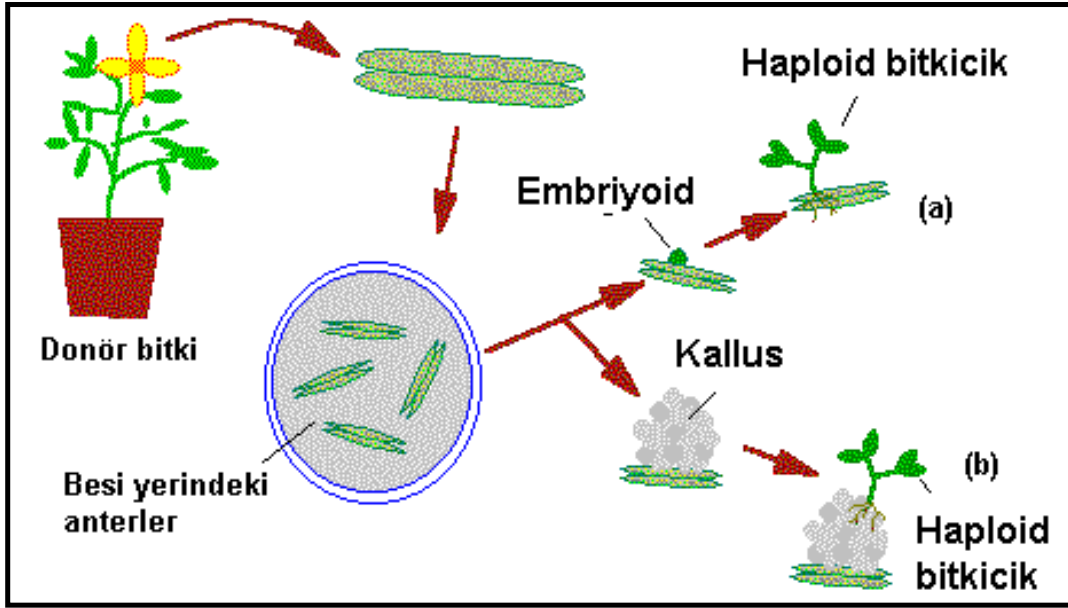
1.3.1. Anter kültürü

Anterlerin *in vitro* çalışmalarda eksplant olarak kullanımı 1953 yıllarına kadar dayanmakla birlikte anter kültürü yolu ile ilk haploid bitki *Nicotiana tabacum* türünde Bourgin ve Nitsch (1967) tarafından elde edilmiştir.

Anter kültürü esas olarak, içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrospor) bulunduran anterlerin, tomurcuklarından ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesi olayıdır. Anter kültürü yapılarak normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polen tanesinin gametik gelişme yönü, henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmekte ve böylece mikrospor androgenesis veya sadece androgenesis olarak adlandırılan oluşum gerçekleştirilmektedir (Ellialtıoğlu vd. 2002). Bununla birlikte haploid bitki oluşumu tek bir cins içerisinde dahi “çok kolay” olarak tanımlanabilecek bir düzey ile “imkansız” olarak nitelendirilebilecek bir durum arasında değişmektedir. Örneğin Asma (Ağaoğlu vd. 1998) ve Elma (Kösali 2000) türlerinde yapılan anter kültürü çalışmalarında kallus gelişimi ve embriyoid benzeri farklılaşmalar elde edilmiş fakat haploid bitkiye ulaşmak mümkün olmamıştır.

Anter kültürlerinin oluşturulması için olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler en uygun başlangıç materyalidir. Bu aşamadaki anterleri bulunduran çiçek tomurcukları yüzey sterilizasyonu işlemine tabi tutulduktan sonra aseptik şartlarda açılır ve anterler izole edilir. Ardından istenen özelliklere göre hazırlanmış olan steril besi ortamlarına aktarılır. Anterlerin izolasyon sırasında ezilmemesine ve filament kısmının anterden iyice ayrılmış olmasına dikkat edilmelidir. Ardından kültürler uygun inkübasyon koşullarının bulunduğu iklim odalarına alınmalıdır. Anterler normal koşullarda iki hafta içerisinde polen embriyogenesisine başlamaktadır. Bu aşamadan sonra gelişme iki farklı doğrultuda seyredebilmektedir. Ya doğrudan embriyo oluşumu gerçekleşmekte ve 6-8 hafta içerisinde doğrudan toprağa şaşırtılabilecek gelişme düzeyinde haploid bitkiler elde edilmekte ya da haploid kallus dokusu oluşmakta ve kallustan haploid bitki

rejenerasyonuna gidilmektedir. Bunlardan ilkinde direkt androgenesis ikincisine ise indirek androgenesis denmektedir (Şekil 1.3) (Ellialtıoğlu vd. 2002). Bu iki sürece ek olarak anter kültürlerinden diploid kallus, embriyo veya bitki elde etmek de olasıdır. Bunun iki sebebi olabilmektedir. Birincisi direk veya indirek bitki rejenerasyonu mikrosporlardan değil de anter duvarı veya tapetum hücreleri gibi haploid olmayan somatik kökenli hücrelerden meydana gelmektedir (Zhong vd. 1995). Anter kültüründe karşılaşılabilecek diploid kallus embriyo veya bitkilerin ikinci sebebi ise kendiliğinden (spontan) diploidizasyon olmaktadır. Bu kavram haploid mikrosporların somatik gelişime başladıktan sonra herhangi bir evrede kendiliğinden diploid hale geçtiği olgusunu karşılamaktadır. Todorova vd. (1997)'nin yaptığı çalışma bu gerçeği desteklemektedir.



Şekil 1.3: Anter kültürünün yapılışı. (a) direkt *in vitro* androgenesis, (b) dolaylı *in vitro* androgenesis.

Anter kültürünün en kritik aşamalarından biri mikrosporların sporofitik yönde gelişim için uyarılmasıdır. Mikrosporlar değişik gelişme modellerine sahip olabilmektedir. Doğal koşullarda normal bir mitoz ile bir jeneratif bir de vejetatif çekirdek oluşturması gereken mikrospor, *in vitro* koşullarda mitoz sonucu benzer görünümlü iki çekirdeğe sahip olabilmekte veya bazı polenlerde vejetatif çekirdek

bölünerek benzer görünümlü iki çekirdek oluşturabilmekte ve bölünmenin devam etmesi sonucu çok çekirdekli polen şekli ortaya çıkabilmektedir (Ellialtıoğlu vd. 2002). Hücre duvarı oluşmaksızın çekirdek bölünmeleri olması halinde bir polen tanesinin içerisinde 30 kadar çekirdek meydana gelebilmekte, ancak gelişmesine devam edemeyen bu tip polenlerin androgenesis olayında hiçbir önemi bulunmamaktadır (Bajaj 1983). Çok çekirdekli mikrosporların tersine bazı mikrosporlar birkaç çekirdek bölünmesinin ardından ayrılmaya başlamakta ve tam bir hücre bölünmesi geçirmekte, böylece 40-50 hücreli birer proembriyoya dönüşmektedir. Globüler aşamaya gelen embriyo polenin ekzin tabakasından dışarıya çıkarak şekillenmeye başlamakta ve zigotik embriyoya benzer bir biçimde değişik gelişme aşamalarını tamamlamaktadır. Kotiledon yaprak taslakları belirlemeye başlayan embriyo 5-6 hafta içerisinde anterin içerisinde çıkarak gözle görünme aşamasına ulaşabilmektedir (Ellialtıoğlu vd. 2002).

Elde edilen embriyolar uygun besin ortamlarına alınarak çimlendirilmekte ve tam bir bitki elde edilmektedir. Bunu takiben elde edilen bitki yeterli olgunluğa ulaştığında dış ortama şaşırtılarak ve ihtiyaç halinde dihaploid hale getirilerek süreç tamamlanmış olur.

Biyoteknolojik ıslah teknikleri içerisinde bulunan anter kültürünün klasik tekniklere göre sağladığı yararlar ise Demir ve Turgut (1999)'a göre şu şekilde sıralanabilir:

- 1- Melez popülasyonlardan kendileme ile saf hatların elde edilmesindeki uzun yol ortadan kalkmaktadır.
- 2- Haploidizasyon ile bir genomda bulunan letal ve yarı letal genler genomdan uzaklaştırılmış olur. Çünkü bu genler haploidlerde gizlenemeyeceğinden bu alleli taşıyan bitkiler yaşayamaz ve bu genler popülasyondan atılmış olur.
- 3- Eğer resesif bir özellik için seçme yapılıyorsa dihaploidler diploidlerin açılan jenerasyonlarına göre resesiflerin daha iyi değerlendirilmesini sağlar. Örneğın bir lokus bakımından heterozigot olan *Aa* bitkileri anter kültürü ile çoğaltılır ve sonra

dihaploidleştirilir ise teorik olarak elde edilen bitkilerin yarısı *aa* genotipinde olur. Oysa bu oran diploid bitkilerin kendileştirilmesi sonucu F₂ kuşağında ancak % 25 olur.

Androgenesi teşvik eden mekanizma hakkında fazla bilgi bulunmamakla birlikte anter kültüründen elde edilen haploid bitki sayısı üzerinde etkisi bulunan faktörlerle ilgili çok sayıda çalışma vardır. Anter kültüründen elde edilecek başarıyı etkileyen faktörlerin bir bölümü donör bitkiden kaynaklanmakta iken (genotip, donör bitkinin yetiştirme koşulları) bir bölümü de anter kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki koşullarla (anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı, inkübasyon ortamı) ilgilidir. Bu etkenleri kısaca aşağıdaki gibi inceleyebiliriz.

A-Genotip: Genotip anter kültürünün başarısını belirleyen en temel etkenlerdendir. Aynı cins içerisindeki farklı türler aynı kültür koşulları altında anter yanıtları bakımından farklılıklar göstermektedirler. Nitsch (1969) 12 tütün türünden 5 tanesinin polen embriyogenesi oluştuğunu bildirmiştir. Buna ek olarak tür içerisindeki farklı genotipik hatların da farklı cevaplar verdiği bilinmektedir. Ellialtıoğlu vd. (2002)'nin Gresshof ve Doy (1972b)'dan bildirdiğine göre '*Vitis vinifera* türüne ait 27 bitki klonunda anter kültürü yapmışlar ve bunlardan sadece 3 tanesinden sonuç alabilmişlerdir'. Haploid bitki vermesi istenen genotipten yüksek düzeyde androgenik yanıt alabilmek için başvurulacak iki yol vardır. Bunlardan birincisi her genotip için kültür koşullarını optimize etmektir. İkincisi ise anter kültüründe embriyo elde etme başarısı yüksek genotipler ile düşük olanları melezleyerek, melez döllerden az veya çok embriyo elde etmeyi sağlamaktır (Ellialtıoğlu vd. 2002). Yapılan genetik çalışmalar da polen embriyogenesisine yatkınlık özelliğinin genetik olarak kontrol edildiğini kanıtlaya da mekanizmanın genetik işleyişi tam olarak çözülebilmemiş değildir.

B-Donör bitkinin yetiştirme koşulları ve fizyolojik durumu: Donör bitkinin genotipi uygun dahi olsa anter kültüründe başarılı olabilmek için bu bitkilerin uygun koşullarda yetişmiş olması gerekmektedir. Uygun koşullardan kasıt bitkinin yetiştiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu ve günlük ışıklenme süresi, havada ki CO₂ konsantrasyonu, bitkinin beslenme koşulları gibi çevresel faktörlerin optimum düzeylerde olmasıdır (Ellialtıoğlu vd. 2002). Aynı tür hatta çeşitler ile yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar

alınması yetiştirme koşullarının etkisini gözler önüne sermektedir. Dumas de Vault ve Chambonnet (1982) "Dourga" adlı bir patlıcan çeşidinin anter kültüründe yüksek oranda haploid embriyo oluşturduğunu bildirdiği halde Tuberosa vd. (1987) ile Rotino vd. (1987) yaptıkları anter kültürü çalışmasında aynı çeşidin embriyo oluşturma yeteneği açısından düşük bir başarıya sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. Karakullukçu (1991)'nin çalışmasında ise aynı çeşit hiç embriyo oluşturmamıştır.

Hatipoğlu (1999), donör bitkilerin anterlerin alındığı döneme kadar çok iyi beslenmesi ve optimum ışık koşullarında muhafaza edilmesi gerektiğini ve suni ışığın güneş ışığının yerini alamayacağını belirtmiştir. Ayrıca polen gelişimi sırasında donör bitkilerin herhangi bir strese maruz kalmamaları ve anterlerin alınmasından 3-4 hafta öncesinden itibaren pestisid uygulamasından kaçınılması gerektiği kaydedilmiştir. Ellialtıoğlu vd. (2002)'ye göre genel olarak normal yetiştirme sezonunda ve açıkta yetiştirilen bitkilerin, yetiştirme dönemi dışında, serada veya iklim odasında yetiştirilen bitkilere oranla anter kültüründe başarı şanslarının yüksek olduğu düşünülmektedir. Buna karşın Wenzel ve Foroughi-Wehr (1994) buğdayda, Shtereva vd. (1998) domateste, Büyükalaca vd. (2004) ise biberde yaptıkları anter kültürü çalışmalarında; serada yetiştirilen bitkilerin, açıkta yetiştirilen bitkilere göre daha yüksek androgenik performans gösterdiğini kaydetmişlerdir.

Anter içerisinde bulunan polenlerin yapısal ve boyutsal açılarından farklılık gösterdiği bilinmektedir. Polen dimorfizmi olarak adlandırılan bu durum da polenlerin bir kısmı gametofitik yönde diğer bir kısmı ise sporofitik yönde gelişmektedir. Dolayısı ile dimorfik yapıdaki bu polenlerin sporofitik yönde gelişme eğilimi olanların sayısal değeri ile oluşacak embriyo sayısı arasında bir korelasyon bulunmaktadır (Ellialtıoğlu vd. 2002).

Yapılan araştırmalar, erken çiçeklenen genç çiçek tomurcuklarının en fazla androjenik kapasiteye sahip polen taneciklerini içerdiğini ve tomurcukların çiçeklenme periyodunun başında toplanması gerektiğini göstermiştir (Smykal 2000).

Son olarak bitkideki fizyolojik ve biyokimyasal olaylardan da bahsetmek gerekmektedir. Yetiştirildiği çevre koşullarının etkisi altında, aminoasitler ve büyüme

düzenleyiciler gibi içsel maddeler bakımından farklı kompozisyonlara sahip anterlerin kültüre alındıklarında androgenik olarak farklılık göstermeleri doğaldır (Ellialtıoğlu vd. 2002).

C- Anterlerin gelişme dönemi: Androgenesis etkileyen faktörlerin en önemlilerinden birisi mikrosporların gelişim safhasıdır. Çünkü uygun gelişim safhasındaki mikrosporlar kültüre alınmadıkça, diğer kültür şartları optimum olsa dahi polen embriyogenesisi gerçekleşmeyecektir.

Birçok türde bu uygun safha her ne kadar ‘tek çekirdekli mikrospor safhası’ olarak genelleştirilmişse de farklı türlerde yapılan detaylı çalışmalar bu kritik noktanın mayoz sonrası tetratların oluşumundan başlayan ve I. mitoz bölünme sonrasındaki nişasta depolanmasından hemen önceki döneme kadar süren bir zaman dilimi içinde olduğunu göstermiştir (Sunderland ve Dunwell 1977).

Anter safhasını belirlemek için genellikle tomurcuk şekli ve büyüklüğü ile anterin gelişme safhası arasında bir ilişki kurulmaktadır. Zamir vd. (1980)’lerine göre, mikrospor safhaları ile tomurcuk uzunluğu arasındaki ilişki, bazı bitkilerde bir anter içindeki mikrosporların aynı gelişim safhasında olmaması nedeniyle her zaman doğru olmayabilir. ‘Asenkronize’ mikrospor gelişimi olarak adlandırılabilir bu yapıyı gösteren türlerde daha ileri dönemde bulunan mikrosporlar ortama toksik madde salgılayarak genç mikrosporların androjenik gelişimlerini baskı altına alabilir (Kott vd. 1988, Kim vd. 2004). Nitekim Kott vd. (1988)’nin *Brassica napus*’da değişik mikrospor safhalarını aynı ortamda 24, 48 ve 72 saatten fazla süreyle birlikte kültüre aldıkları çalışmada, embriyojenik ve embriyojenik olmayan mikrosporların birlikte kültüre alınmasının, ortamda toksik etki oluşturduğu ve embriyo oluşumuna olumsuz etkide bulunduğu açıklanmıştır. Ayrıca, bu durumda mikrospor izolasyonundan 24 saat sonra ortamın yenilenmesi önerilmiştir. Ancak yine *Brassica napus*’da yapılan bir çalışmada, Percoll kullanımının mikrospor senkronizasyonunu sağlamada çok başarılı olduğu belirtilmiştir (Fan vd. 1988).

Yapılacak sitolojik bir ön çalışma ile anter içerisindeki mikrosporların hangi evrelerde bulunduğu ve bu mikrosporların hangi tomurcuk büyüklüğünde elde

edilebileceği tespit edilmelidir. Özellikle ilk defa çalışılacak türlerde bunu yapmak elzem olabilir. Bunun yanında çiçek tomurcuk büyüklüğünün, genotipe, tomurcuğun bitki üzerinde bulunduğu yere ve bitkinin yaşına bağlı olduğunu da unutmamak gerekir (Ellialtıoğlu vd. 2002).

D- Anterlere kültür öncesi uygulanan ön işlemler: Polen embriyogenesinin başlatılabilmesi için farklı türlerde birçok temel mekanizma ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalara göre bunlar arasından stres uygulamaları, embriyogenesi başlatmada tetikleyici bir faktör olarak gözükmektedir (Touraev vd. 1997). Bazı türlerde anterlerin tomurcuklarından ayrılması ve kültür ortamına yerleştirilmesi bile bu olayı başlatmak için yeterlidir. Bazı türlerde ise anter veya polen taneciklerinin kültüre alınmadan önce farklı sürelerde ısı şokları, santrifüjleme, γ -ışınlanması, düşük atmosfer basıncı, yüksek ozmotik basınç, açlık uygulamaları gibi fiziksel veya antimikrotübül ajanları, hormonlar, herbisitler, etanol uygulaması gibi kimyasal stres faktörlerine maruz bırakılmasının, *in vitro* androgenesis için teşvik edici hatta bazen zorunlu olduğu ispatlanmıştır. Bunlar arasında en yaygın uygulamalar sıcaklık şokları olup farklı sürelerde düşük veya yüksek sıcaklıkların uygulandığı pek çok çalışma mevcuttur. Bazı bitkilerde düşük (3-7 °C), bazı bitkilerde yüksek sıcaklıklar (28-32 °C) etkili olurken bazı bitkilerde ise hem sıcak hem de soğuk uygulaması sporofitik bölünmeyi başlatabilir (Arı 2006).

Heberle-Bors (1985)'un bildirdiğine göre, soğuk muamelesinin anter yaşlanmasını geciktirdiği (Pelletier ve Henry, 1974) ve anterlerdeki total serbest amino asitleri arttırdığı (Sangwan ve Camefort, 1978) ortaya konmuştur. Bu tür değişiklikler muhtemelen anter duvarı içinde polenler için bir tür mikroklima ortamı sağlamaktadır. Nitekim Bajaj (1983)'da soğuk uygulamasının dolaylı etkiye sahip olduğunu ve androgenesisdeki artışın; yaşlanmayı geciktirmesinden, düşük sıcaklığın polen canlılığını daha uzun süre korumasından ve polenin aborsiyonunu engelleyerek embriyo oluşturabilecek olan canlı polen sayısını arttırmasından kaynaklandığını belirtmiştir. Ellialtıoğlu vd. (2002)'ye göre ise soğuk uygulama sırasında zayıf ve yaşama gücü olmayan anter ve mikrosporlar hemen kahverengileşip ölmekte, dolayısı ile güçlü anter ve mikrosporlar seçilerek *in vitro* ortamda yüksek oranda rejenerasyon sağlanabilmektedir.

Mikrospor tanelerinde nişasta birikimi, anter kültürü için kritik bir önem taşımaktadır. Birinci polen mitozunu geçirdikten sonra mikrosporlarda nişasta birikimi artmakta ve artık bu aşamaya gelmiş mikrosporları sporofitik bölünmeye yönlendirme şansı kalmamaktadır. Düşük sıcaklıklarda birinci polen mitozu aşamasında tutuklanan mikrospor sayısında artış olmakta ve nişasta üretimi bloke edilmektedir. Bilindiği gibi nişasta içeriği düşük tek çekirdekli mikrosporlar kültür koşullarında embriyo oluşturmak üzere sporofitik gelişmeye daha kolay yönlendirilebilmektedirler (Foroughi-Wehr ve Wenzel 1993).

Soğuk ön muamelenin bir başka yönü de büyümeyi engelleyici bazı bitkisel hormonların etkisinin ortadan kaldırılması ile ilintili olabileceğinin düşünülmesidir. Bu duruma bir örnek ise soğuk uygulamaları ile anterde bulunan absisik asit (ABA) miktarının azaltıldığına bildirilmesidir (Johansson ve Eriksson 1977). Yine biber ve patlıcanda yapılan bir başka çalışmada soğuk ön uygulamanın anterlerdeki ABA miktarını azaltıcı etki yaptığı ortaya konmuştur. Bununla beraber anterdeki ABA miktarının azaltılmasının oluşan embriyo sayısını arttırma yönünde olumlu bir etki yaptığı söylenememektedir (Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz 1997, Özkum vd. 2000).

Sunderland ve Roberts (1979)'in tütünde yaptıkları çalışmada, anterlere uygulanan 10-20 günlük 5-7 °C soğuk uygulamaları ile vejetatif çekirdek bölünmesi 24 saat içinde gerçekleşirken, soğuk uygulanmayan anterlerde 6. günde başlamıştır. Rashid ve Reinert (1980), 8 gün boyunca 10 °C soğuk muamelesi uyguladıkları tütün tomurcukları içerisindeki embriyojenik polen taneciklerini belirlemek için yoğunluk gradiyenti santrifüjleme (density gradient centrifugation) yöntemini kullanmışlardır. 'Abinitio polen kültürü' adı verilen bu yöntemin ilk kez kullanımı ile % 2 oranında bir embriyogenesis başarısı elde edilmiştir.

Çiçek tomurcuklarına uygulanan soğuk şokları anter duvarı üzerinde de etkili olabilmektedirler. Kültürlerin inkübasyonu sonucu kahverengiye dönüşen ve yaşlanarak toksik maddeler salgılayabilen anter duvarı, kültür öncesi uygulanan soğuk şokları sayesinde daha geç yaşlanmakta ve olumsuz etkileri önemli düzeyde engellenebilmektedir. Biber ve patlıcanda soğuk uygulanan tomurcuklardan izole edilen anterlerin kültüre alınması sonucu, anterlerin inokülasyon süresi boyunca soğuk

uygulanmayan kontrol grubu anterlere oranla daha açık renkte kaldıkları, kontrol anterleri koyu kahve-siyah renk alırken özellikle patlıcanda soğuk uygulanan anterlerin sarımsı kahverengi görünümünü uzun süre korudukları bildirilmektedir (Ellialtıoğlu vd. 2002).

Yüksek sıcaklık şoku uygulamaları konusunda Bhojwani ve Razdan (1996)'ın bildirdiğine göre Pechan vd. (1991) ile Fabijanski vd. (1991), *Brassica oleracea* ve *B. napus* mikrosporlarında sıcaklık uygulaması sırasında ortaya çıkan ve androgenesinin başlatılması ile ilgili olduklarını düşündükleri bazı yüksek moleküler ağırlıklı proteinler tespit etmişlerdir. Hamaoka vd. (1991) ise 35 °C de 24 saat bekletilen *B. campestris* anterlerindeki polen embriyogenesisi etkinliğinin, uygulama yapılmayan kontrol ortamından 20 kat fazla olduğunu ortaya koymuştur.

Bazı bitkilerde düşük doz ışınlama uygulamalarının androgenesisi teşvik ettiği bilinmektedir. Bu konuda Shtereva vd. (1998)'nin domateste, sıcaklığın tek başına veya düşük doz (2-8 Gy) gama ışını ile birlikte uygulamasının etkilerini görmek için yaptıkları çalışmada, 4 Gy gama ışını ile birlikte 10 °C'de 9 gün sıcaklık uygulaması kombinasyonunun anterlerde en yüksek kallus oluşumunu (% 72.7) sağladığı bildirilmiştir.

Mikrotübüllerin mitoz sırasında oynadıkları rolün öneminin anlaşılması üzerine androgenesis çalışmalarında 1990'lı yıllardan itibaren antimitotik etkili kimyasallar kullanılmaya başlanmıştır. Eady vd. (1995)'ye göre, bir mikrotübül inhibitörü olan kolşisinle muamele edilmiş mikrosporlardaki jeneratif hücre farklılaşması bloke edilebilir. Düşük konsantrasyonda (% 0.001) kolşisinle muamele edilen polen taneciklerinde, türlere göre farklı oranlarda birbirinin aynı büyüklükte, merkezde 2 kardeş hücrenin oluştuğu ve bunların fark edilir bir hücre duvarı ile ikiye ayrıldıkları simetrik bölünme teşvik edilmiştir. Ancak, yüksek konsantrasyondaki (% 0.05) kolşisin uygulaması ise I. polen mitozunun karakteristiği olan karyokinesis ve sitokinesis etkili şekilde bloke ederek, jeneratif hücre oluşumu ve hareketini engellemiştir. Bunun sonucu olarak, merkezde bölünmemiş tek bir büyük çekirdek ortaya çıkmıştır.

Açlık stresi konusunda yapılan başka bir çalışmada Kyo ve Harada (1985), tütün polen taneciklerini ilk 24-48 saat glutamine açlığına maruz bırakarak daha sonra glutamine içeren ortama transfer ettiklerinde androgenik gelişimin başladığını görmüşlerdir. Polen taneciklerinin glutamin içeren bazal ortamda, direkt olarak kültüre alınması durumunda ise gametofitik gelişim desteklenmiştir.

E- Besin ortamının bileşimi ve yapısal özellikleri: Normal bir mikrospor polen olma yolunda sadece 2 mitotik bölünme geçirirken, androgenik mikrosporlarda tekrarlanan bölünmeler söz konusudur. Bu nedenle, ilave bölünmeleri teşvik etmek için besin ortamına eklenen çok sayıdaki bileşen ve bunların miktarı büyük önem taşımaktadır. Besin ortamındaki karbonhidrat ve nitrojen kaynakları ve bunların konsantrasyonları, büyüme düzenleyiciler, katılaştırıcı maddenin tipi yanında ortamın tipi (katı, sıvı veya 2 fazlı) ve pH'sı, üzerinde önemle durulması gereken konulardır.

Besin ortamıyla ilgili en önemli faktörlerden biri ortamın ozmotik basıncıdır. '*In vitro* androgenesis için besin ortamına eklenecek şekerin zorunlu olduğu, ilk kez Nitsch (1969)'in tütünde, daha sonra da Sunderland (1974)'in *Datura innoxia*'da yaptıkları çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu nedenle bütün ortamlarda şeker yer verilirken, bunun oranı çoğunlukla bazı grup bitkilerde % 2-4, bazılarında ise % 8-12'dir. Türlerin bu ayrımının, bunların olgun polenlerinin *Solanaceae* ve *Liliaceae*'deki gibi iki hücreli veya *Gramineae* ve *Cruciferae*'deki gibi üç hücreli olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. İlk grup düşük ozmotik basınca, ikinci grup ise yüksek ozmotik basınca gerek duymaktadır (Alpsoy 1999'a göre Dunwell 1991'den)'.

Arı (2006)'ya göre 'androgenesis çalışmalarındaki besin ortamlarında, sakkarozdan başka galaktoz (Kyo ve Harada 1985), mannitol (Cistue vd. 1994), maltoz (Dolcet- Sanjuan vd. 1997, Kiviharju ve Pehu 1998, Guo vd. 1999, Holme vd. 1999), laktoz (Rihova ve Tupy 1999), glikoz (Saji ve Sujatha 1998, Guo ve Pulli 2000), pikloram (Bishnoi vd. 2000) gibi maddeler de kullanılmaktadır'.

Nicotiana tabacum ve *Datura innoxia*'da yapılan çalışmalarla, globular embriyo safhasına kadar sadece şeker ve agardan oluşan bir ortamın bile yeterli olabileceği, ancak embriyoların daha ileri gelişimi için besin ortamında mutlaka mineral tuzların

bulunması gerektiği ispatlanmıştır. Bu tuzlar içinden demirin embriyo gelişimi için hayati öneme sahip olduğu Bhojwani ve Razdan (1996)'a göre Nitsch (1972) tarafından tütün anter kültüründe ortaya konmuştur. Bu çalışmada hiç demir içermeyen veya sınır değerinin altında demir içeren ortamlarda, embriyo gelişiminin globular safhada durduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Fe-EDTA (Nitsch 1969) ve Fe-EDDHA (Rashid ve Street 1973)'nın ferrik sitrattan daha etkili olduğu kaydedilmiştir.

Ozias-Akins ve Vasil (1985)'e göre, besin ortamlarındaki mineral maddeler arasında, hücre büyümesi ve morfogenezisi üzerinde en önemli etkiye sahip element muhtemelen azottur. Besin ortamındaki özellikle amonyum formundaki düşük inorganik nitrojenin androgenesis ve bazı tahıllarda ise yeşil bitki oluşumunu teşvik ettiği bilinmektedir (Chu vd. 1975). Son yıllarda rastlanan androgenesis çalışmalarına göre kültür ortamlarının $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ oranları embriyogenesis üzerinde çok önemli role sahiptir. Ancak bu noktada öncelikle; bitkiler açısından hayati öneme sahip olan azotun, bitkiler tarafından NH_4^+ (amonyum) formunda kullanılmasına rağmen, doku kültürü çalışmalarında niçin NO_3^- (nitrat) kullanımından vazgeçilemiyor sorusunun cevaplandırılması gerekir ki bunun iki nedeni bulunmaktadır: Birincisi; ortamdaki fazla NH_4^+ iyon konsantrasyonu eksplanta toksik etki yapmaktadır. İkincisi ise NO_3^- iyonu ortamın pH'sını kontrol etmektedir. Dolayısıyla besin ortamlarında dengeli bir NO_3^- ve NH_4^+ kullanımı gereklidir (George 1996). Bu nedenle birçok androgenesis çalışmasında, temel besin ortamlarındaki azot bileşiklerinde farklı modifikasyonlar yapılarak farklı bitki türlerinde embriyo teşviki ve rejenerasyonu için son derece başarılı ortamlar geliştirilmiştir. Daha sonra bu ortamlarda da modifikasyonlara gidilerek androgenesiste başarılar sağlanmıştır. Örneğin Chu ve Hill (1988), *Triticum aestivum*'da yaptıkları anter kültürü çalışmasında geliştirdikleri MN6 (modifiye edilmiş N6 ortamı) ortamında, kontrol ortamı olan N6 ortamına göre % 23-76 oranında embriyogenesis artışı sağlamışlardır. Hatta 100 anter başına düşen embriyo oranı % 62'den % 105'e çıkartılmıştır.

Ortam modifikasyonlarından başka, temel besin ortamlarındaki belirli azot bileşiklerinin sadece belirli bir orana yükseltildiği veya düşürüldüğü birçok çalışma da mevcuttur. Bu konuyla ilgili olarak, Bante vd. (1990)'nın *Lolium perenne* ve *L. multiflorum*'da yaptıkları çalışmada, LS ortamındaki NH_4/NO_3 konsantrasyonunun

1/10'a düşürülmesi sonucu, kültürdeki tüm eksplantlardan androjenik cevap aldıkları bildirilmiştir.

Anter kültürü çalışmalarının büyük çoğunluğunda kültür ortamlarına ilave edilen hormonların, anterlerden embriyo oluşumunu teşvik ettiği bilinmektedir. Hormonların bu etkisi; anterlerin içerisinde bulunan mikrosporların gametofitik safhadan sporofitik safhaya yönlendirilmeleri şeklinde gelişmektedir. Anter kültürünün ilk çalışılmaya başlandığı yıllarda embriyo uyartımı için ortamlara sadece oksin ilave edilirken, zamanla 'inatçı' türlerde yapılan çalışmaların olumsuz sonuçları, araştırmacıları oksinlerle beraber sitokinin kullanımına yöneltmiştir. Çünkü hücrel farklılaşma birçok yönden bu iki grup büyüme düzenleyiciler arasındaki interaksiyonla kontrol edilmektedir. Nitekim George (1996)'nin da bildirdiğine göre embriyogenesis başlangıcı için oksinlere ilave olarak sitokinin kullanımı da gerekmektedir.

Kültür ortamlarında bazen yer verilen diğer bir madde aktif kömürdür. Alpsoy (1999)'a göre Dunwell (1991), bu maddenin kültür ortamını birçok yolla değiştirdiğini, özellikle de hormonları, vitaminleri, demiri ve kültürdeki yaşlanan dokular tarafından salınan fenolik bileşikler absorbe ettiğini bildirmiştir. Etki şekli tam olarak bilinmeyen bu bileşiğin anter başına elde edilen bitki sayısını arttırdığını ve anterlerden bitkiciklerin rejenerasyonunu hızlandırdığını bildiren araştırmacılar olduğu gibi (Bajaj 1983), aktif kömürlü ortamdaki anterlerin kararır canlılığını yitirdiğini (Karakullukçu 1991) belirten araştırmacılar da vardır. Mensuali-Sodi vd. (1993) ise *Anemone coronaria*'nın gelişimi ve Lavantin'in aksillar kardeşlenmesi üzerinde aktif karbonun (AK) etilen düzeyini etkileme durumuyla ilgili yaptıkları çalışmada, kültür ortamındaki AK'un aksillar tomurcuk kardeşlenmesini arttırırken, kök oluşumunu negatif yönde etkilediğini saptamışlardır. Bu çalışmada ayrıca AK'un pozitif etkisinin etilen adsorbsiyonu ile ilgili olmayıp, muhtemelen kültür ortamındaki tanımlanmamış inhibitör maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz (2000), Kemer patlıcan çeşidinde tomurcuklara uygulanan soğuk şoku ve besin ortamına katılan aktif kömürün, anterlerdeki içsel absisik asit (ABA) miktarı üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada; uygulanan soğuk şokları (+ 4 °C de 80 saat ve + 9 °C de 9 gün) ve aktif kömürün (% 0.1, 1 ve 2), patlıcan anterlerindeki ABA miktarını azaltırken, embriyogenesisise olumlu etki yapmadığını ve embriyoların sadece kontrol ortamlarından

elde edildiğini rapor etmişlerdir. Kösali (2000) ise elmada androgenesis üzerine aktif kömürün etkilerini belirlemek üzere yaptığı çalışmasında, aktif kömürün % 0.1, % 0.15, % 0.3'lük konsantrasyonlarını denemiştir. Çalışmanın sonucunda elde edilen 2 embriyoidten birinin aktif kömürsüz ortamda, diğzerinin de % 0.1 dozunda elde edildiği, bununla birlikte % 0.3 gibi nispeten daha yüksek dozda ise embriyoid oluşmadığı ve kallus oluşturan anter oranının düşük bulunduğu açıklanmıştır.

Son yıllarda anter kültürü çalışmalarında olumlu etkisi nedeniyle kullanımı yaygınlaşan bir diğzer katkı maddesi bir etilen inhibitörü olarak bilinen gümüş nitrattır. Bilindiği gibi bitki doku kültürleri eksplantın kesilip çıkartılması sırasındaki stres koşulları ve ortamda oksin bulunması nedeniyle etilen üretirler ve üretilen bu etilen somatik embriyogenesis, sürgün oluşumu ve kallus gelişimi gibi farklı oluşumları engellemektedir (Çömlekçioğlu 2001). Besin ortamlarına eklendiğinde tıpkı başka bir etilen sentezi inhibitörü olan AVG (aminoetoksi-vinilglisin) gibi hareket eden gümüş nitratin bu etki mekanizması, etilen biyosentezinde rol oynayan ACC (1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit) sentezini bloke etmesine dayanmaktadır (Heidstra vd. 1997). Dias ve Martins (1999)'in *Brassica oleracea*'da yaptıkları çalışmada, gümüş nitrat embriyo oluşumunu arttırmış, diğzer bazı *Brassica* türlerinde ise gümüş nitratin kullanılmadığı ortamlarda haploid embriyo oluşumu gerçekleşmemiştir. Malik vd. (2001), *Brassica juncea*'nın 2 hibrit çeşidine, bunların sitoplazmik erkek kısır hatları (CMS) ve ebeveynlerine ait anterleri kültüre aldıkları çalışmada, 30, 60 ve 70 µM gümüş nitrat dozlarına 30 mg/l glutasyon eklemişlerdir. Çalışmada özellikle CMS hatları için gümüş nitrat kullanımının zorunlu olduğu bulunmuştur. Nitekim gümüş nitratsız ortamlarda, hiç embriyo oluşmazken, en fazla başarının elde edildiği 60 µM gümüş nitrat dozunda % 22.8'e kadar androgenesis elde edilmiştir. Gümüş nitratin bir etkisi de kullanıldığı tüm ortamlarda kallus oluşumuna izin vermemiş olmasıdır. Ortamlara ilave edilen glutasyon ise, anter başına embriyo sayısını arttırmakla kalmamış aynı zamanda CMS hatlarında da hücre bölünmesini arttırmıştır. Kabakta yapılan bir anter kültürü çalışmasında Achar (2002), 4 ayrı genotip için 0, 0.02, 0.01, 1, 1.1, 1.5 ve 2 mg/l gümüş nitratin embriyogenesis üzerine etkisini incelemiştir. Çalışmada en yüksek başarı 2 mg/l'lik dozdan elde edilmekle birlikte diğzer tüm dozlardan da embriyo elde edilmiştir. Embriyo verimi yönünden, en yüksek doz en düşük dozdan 3-4 kat daha fazla artış sağlamıştır. Ancak kontrol ortamında da embriyo elde edilmesi, gümüş

nitratın kabak embriyogenesisi için zorunlu olmadığını fakat embriyo verimi üzerine yüksek oranda etkili olduğunu göstermiştir. Çömlekçioğlu vd. (2001) Şanlıurfa ve Kahramanmaraş yerel biber popülasyonunda yaptıkları anter kültüründe, gümüş nitratın embriyo oluşumuna etkisini araştırmışlardır. MS temel besin ortamına 30 mg/l sakkaroz, 4 mg/l NAA (Naftalen Asetik Asit), 0.1 mg/l BAP (Benzilaminopürin), % 0.25 aktif kömür ve 10 mg/l gümüş nitratın eklendiği denemede, Şanlıurfa çeşidinden % 51.6, Kahramanmaraş çeşidinden ise % 35.7 oranında embriyo oluşumu sağlanırken, gümüş nitratsız ortamdan embriyo elde edilememiştir. Yine biberdeki başka bir çalışmada Büyükalaca vd. (2004), gümüş nitratın farklı konsantrasyonlarının (5, 10, 15 ve 20 mg/l) embriyo verimi üzerine etkilerini incelemiştir. Test edilen tüm gümüş nitrat dozlarından farklı oranlarda embriyo oluşumu sağlanmakla birlikte en yüksek embriyo verimi (45.7 embriyo / 100 anter) 15 mg/l gümüş nitrat dozundan elde edilmiştir.

Androgenesis çalışmalarında özellikle hücre bölünmesinde olumlu etkisi tespit edilen bir diğer grup madde organik asitlerdir. Bu konuyla ilgili olarak, Svensson ve Johansson (1994)'un *Fragaria x ananassa*'da yaptıkları anter kültürü çalışmasında, glutaminin (500 mg/l) hem mikrospor bölünmesinde, hem de kallus oluşumunda çok etkili olduğu, buna karşılık soğuk uygulamasının (5 °C'de 4 gün) kallus oluşumunda olumsuz etkide bulunduğu bildirilmiştir. Bazı genotiplerin içsel olarak bazı aminoasitleri içerdikleri ve bu aminoasitler yardımıyla embriyojenik gelişimin ortaya çıktığı düşünülebilir. Embriyogenesis esnasında aminoasit düzeyleri değişmekte ve bu düzeylerin manipülasyonu embriyo oluşumu için önem taşımaktadır (Bal 2002'ye göre Collins ve Genovesi 1982'den). Bal (2002)'in domateste yaptığı çalışmada ise tek çekirdekli mikrosporları içeren tomurcuklar 10 °C'de 7 gün 0.3 M mannitol içeren kültür ortamında ön muameleye tabi tutulduktan sonra, mikrosporlar izole edilmiş ve sıvı NLN kültür ortamında, BAP ve NAA varlığındaki 2 ve 4 ml/l lactalbumin hidrolizat ile 5 ve 10 g/l kazein hidrolizat içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Denemelerde simetrik çekirdek bölünmesi ve çok çekirdekli yapıların oluşumu uyarılırken, hiçbir ortam ve koşulda mikrospordan rejenerasyon gerçekleştirilememiştir. Arı (2006)'nın aktardığına göre 'androgenesis oluşumunu sağlamak için ön uygulamalarda veya normal besin ortamlarında yukarıdaki katkı maddelerinden başka; patates ekstraktı, hindistan cevizi sütü, asparagin (Nitsch ve

Nitsch 1969), serin (Keller ve Armstrong 1976, Zhang vd. 1994), prolin (Cho ve Zapata 1988, Chu ve Hill 1988, Wan vd. 1989), thiamin hydrochloride (Chen vd. 1998a, b), askorbik asit (Guo ve Pulli 2000), phenylaseticacid (PAA) (Ingram vd. 2000), Ficoll (Charmet ve Bernard 1984, Cistue vd. 1994, Kiviharju ve Pehu 1998, Castillo vd. 2000), Percoll (Fan vd. 1998, Herrera vd. 2002), polyethyleneglycol (PEG) (Ilic-Grubor vd. 1998) gibi pek çok katkı maddesi de kullanılmaktadır’.

Besin ortamının yapısı da anterlerin androgenik uyartımını sağlama açısından önemlidir. Anter kültüründe en fazla kullanılan ortam yapısı agar ilave edilerek jel kıvamına getirilmiş yarı katı ortamlardır. Genel olarak % 0.7 -0.8 oranlarda agar kullanımı yeterlidir. Bunun dışında sıvı besi ortamında anterlerin yüzdürülmesi (Wernicke ve Kohlenbach 1976) veya çift fazlı ortamların anter kültürlerinde kullanılması da mümkündür (Morrison vd. 1986).

F- İnkübasyon ortamı: Anter veya mikrospor kültürlerinin inkübe edildiği ortamın ışık tipi ve değeri ile sıcaklığı kallus veya embriyo oluşumu üzerinde büyük öneme sahiptir. Abak (1983), biber anterlerine kültür öncesi düşük sıcaklık uygulaması yerine, 8 günlük kültürleri karanlıkta ve 35 °C’de bekletmenin embriyo ve bitki oluşumunu yüksek düzeyde teşvik ettiğini ve bu şekilde 100 anterden elde edilen bitki sayısının bazı genotiplerde 50’ye kadar yükseltildiğini bildirmiştir. Todorovic vd. (1991), şeftalide yaptıkları anter kültürü çalışmasında farklı hormon konsantrasyonlarının etkisini 20 °C’de sürekli karanlık koşullarda incelemişlerdir. Çalışmada karanlıkta inkübasyonun kallus oluşumunda önemli başarı sağladığı bildirilmiş ve en yüksek kallus oranı (% 95) karanlıkta kültüre alınan 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l Zeatin kombinasyonuna sahip ortamdan elde edilmiştir. Mythili ve Thomas (1995)’ın biber anter kültüründe kallus oluşumunu etkileyen faktörler üzerine yaptıkları çalışmada, sürekli karanlıkta bekletilen kültürlerde, fotoperiyotta bekletilenlere oranla kallus oluşum yüzdesi önemli ölçüde artış göstermiştir. Anterler genellikle karanlıkta ve 20-30 °C’ler arasında kültüre alınmakta, rejenere olan bitkiler ise 3000-10000 lux yoğunlukta ışıklandırılan koşullara aktarılmaktadır (Ellialtıoğlu vd. 2002).

1.3.2. Mikrospor kültürü

Androgenesisin bir diğ er yolu ise mikrospor kültürüdür. Bu teknikte anterlerden izole edilen mikrosporlar kullanılmaktadır. İzole edilen mikrosporlar *in vitro* koşullarda özel olarak hazırlanmış besin ortamlarında geliştirilerek embriyolar elde edilir (Şekil 1.4). Bu teknik izole mikrospor kültürü veya polen kültürü olarak da adlandırılır (Elliialtıoğ lu vd. 2002).

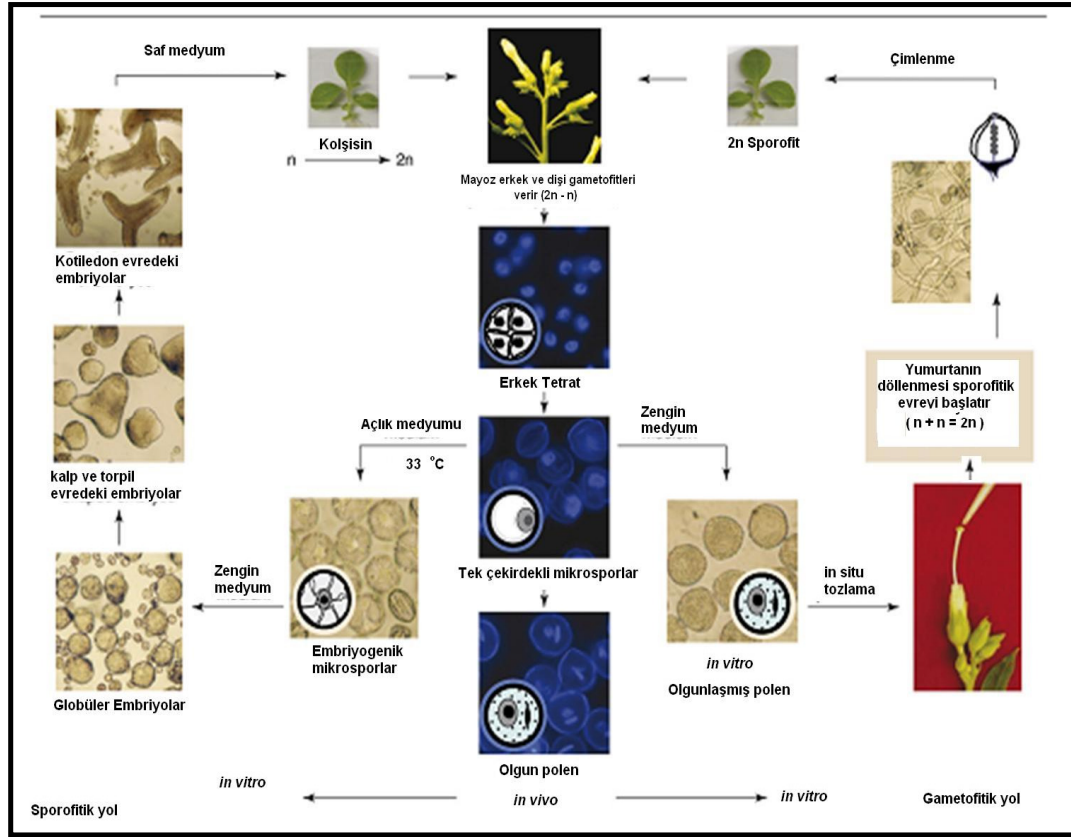
Anter kültürüne göre bazı avantajlara sahip olması sebebi ile geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu avantajları şu şekilde sıralamak mümkündür (Pierik 1989, Foroughi-Wehr ve Wenzel 1993, Hess 1992).

- Anter kültüründe, mikrosporlardan başka anter duvarı, septum veya tapetum gibi diploid yapıya sahip anter dokularından da embriyo oluşması gibi durumlar ile karşı karşıya kalılabilmektedir. Oluşan diploid embriyoların yaşama kuvvetleri haploidlere oranla daha fazla olmakta ve haploid embriyolar ile istenmeyen bir rekabete girmektedirler. Mikrospor kültüründe diploid yapıya sahip dokular ortamdaki uzaklaştırıldığı için donör bitki yapısına sahip embriyo olasılığı ortadan kalmaktadır.
- Anter kültüründe mikrosporlar besin ortamındaki maddeleri anter duvarından geçtikten sonra alabilmektedirler. Mikrospor kültüründe ise mikrosporlar besin ortamı ile doğrudan temas etmektedirler.
- Anter dokusunda bulunan bazı engelleyici maddeler (ABA ve toksik maddeler) ortamdaki uzaklaştırılmış olmaktadır.
- Tek bir polen tanesinden doğrudan embriyoya dönüşüm sağlanabildiğ inden gen transferi çalışmaları için uygun bir kültür şeklidir.
- Biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanıklılık amaçlandığında *in vitro* seleksiyon için çok uygun bir yöntemdir.
- Polen taneleri, mutasyon araştırmaları ve genetik manipülasyonlar için antere göre daha uygun başlangıç materyalidir
- Kültür koşullarında embriyo oluşumunu izlemek anter kültürüne oranla daha kolay olmaktadır.

- Daha fazla sayıda homojen materyalle çalışma olanağı sağlar ve sayısal olarak haploid embriyo verimi anter kültürüne oranla daha yüksektir.

Mikrosporların kültüre alınabilmesi için öncelikle anter dokusundan izole edilmeleri gereklidir. Tek çekirdekli dönemde oldukları belirlenen mikrosporlar, anterlerden ya mekanik olarak ayrılırlar ya da bir süre sıvı besin ortamı içerisinde bekletilen anterlerden ortam içerisine dökülmeleri sağlanır (Ellialtıoğlu vd. 2002).

Mikrospor kültürünün yukarıda açıklanan avantajlarına rağmen, bu yolla polenlerden haploid bitki rejenerasyonu günümüzde hala zordur ve polenin *in vitro* koşullarda gelişerek farklılaşması çok özelleşmiş tekniklere gereksinim duyar. Anter kültürüne göre çok daha komplike besin ortamlarının kullanılmasına gerek duyulur. Başarılı sonuçlar alınan bitki türleri olduğu gibi hala bitki türlerinin çoğunluğu için başarısız bir yöntemdir. (Ellialtıoğlu vd. 2002).



Şekil 1.4: Tütün mikrosporlarının *in vitro* ve *in vivo* da gelişim seyirleri (Forster vd. 2007).

1.3.3. Ovül ve ovaryum kültürü

Döllenmemiş yumurtalığın ya da yumurta hücrelerinin kültüre alınmasıyla haploid embriyo ve bitki oluşumuna ovaryum veya ovül kültürleri adı verilmektedir. Ovül ve ovaryum kültürlerinde başarı elde edilmesi için dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan birisi, yumurtalığın alındığı çiçeğin büyüklüğü, yani yumurtalığın fizyolojik olarak içinde bulunduğu gelişme dönemidir. Yumurtalığın gelişme dönemini pratik olarak belirlemek için kullanılacak en etkili yol, aynı çiçek içerisinde bulunan anterlerdeki mikrosporların gelişme dönemlerinin incelenmesidir. Arpa'da yapılan bir çalışmada antesisten önce polenlerin tek çekirdekli, iki çekirdekli ve üç çekirdekli olduğu aşamalarda aynı çiçekte bulunan ovaryumlar kültüre alınmıştır. Haploid embriyo

uyartımı için en elverişli dönemin iki veya üç çekirdekli polenlere sahip çiçeklerden izole edilen yumurtalıkların içinde bulunduğu dönem olduğu bildirilmiştir (San Noeum 1976). Buna karşılık buğday ve tütünde aynı çiçeğin polenlerinin tek çekirdekli olduğu dönemde alınan yumurtalıkların haploid bitkiler oluşturduğu belirtilmiştir (Zhu ve Wu 1979).

1.3.4. Embriyo kurtarma tekniği

Ovül ve ovaryum kültürleri üzerinde yapılan çalışmalar çoğu bitki türünde dişi gametlerin *in vitro* koşullarda kültüre alınması yolu ile düşük frekansta haploid embriyoların elde edildiğini göstermiştir. Bu nedenle polenlere yapılacak bazı uygulamalar ile partenogenetik embriyo oluşumunu uyararak haploidlerin elde edilme oranını arttıracak çalışmaları gündeme gelmiştir.

Partenogenetik embriyo oluşumunu uyarmak üzere kullanılacak eksik veya yetersiz polenleri elde etmek için değişik kimyasal maddeler ile radyoaktif ışın uygulamalarından yararlanılmaktadır. Ayrıca uzak akraba türler arası melezlemeler, tozlamaların geciktirilmesi, sıcaklık şokları da uygulanan teknikler arasında yer almaktadır. Polenlere yapılan bu uygulamalar sayesinde polen jeneratif çekirdeği inaktif hale getirilmekte, bununla birlikte çimlenme yeteneğini koruyan polenler dişik tepesi üzerinde çimlendiklerinde oluşturdukları uyartım sonucunda partenogenetik olarak haploid embriyolar meydana gelmektedir. Daha sonra elde edilen bu embriyoların bitkiye dönüştürülmesi gerekmektedir. İşte bu noktadan sonra embriyo kurtarma tekniği devreye girer. Embriyo kesesi içerisinde gelişen haploid embriyo normal bir döllenme sonucu oluşmadığı için endosperm taşımaz. Dolayısı ile canlılığını koruması ve kendi başına bir bitkiye dönüşmesi söz konusu olmaz. Bunun için embriyo kültürüne gerek duyulur. Oluştugu tohum içerisinden kurtarılarak *in vitro* koşullarda kültüre alınan embriyoların bitkiye dönüşümü birkaç gün gibi oldukça kısa bir sürede gerçekleştirilebilmektedir (Ellialtıoğlu vd. 2002).

1.3.5. Haploid bitkilerde kromozom katlanması

Haploid bitkilerin elde edilmesindeki temel amaç kuşkusuz bu bitkilerin kromozom setlerinin iki katına çıkarılması (katlanması) ve %100 homozigot saf hatların hızla geliştirilmesidir. Haploid bitkilerin kromozom sayıları 2 yolla diploid hale getirilebilir:

- **Spontan olarak:** *Nicotiana tabacum* gibi bazı türlerde, vejetatif çekirdeğin ilk bölünmesi sonrasında, sitoplazmik organellerde dejenerasyon oluşabilir (Hu ve Zeng 1984). Böyle durumlarda haploid hücreler genellikle kültür sırasında endomitosis yoluyla kromozom sayılarını iki katına çıkartma eğilimindedir. Spontan katlanmanın bir diğer yolu ‘polen çekirdeklerinin füzyonu’dur. Mikrospor içindeki vejetatif ve jeneratif çekirdekler bazen birleşerek diploid bir çekirdek oluştururlar ve bu yolla da diploid bitkiler meydana gelebilmektedir (Hatipoğlu 1999). Bu tip hücrelerden oluşan bitkilerin gövde parçalarının kültüre alınması ile spontan diploid bitkileri çoğaltmak mümkündür (Alpsoy 1999). Bu yöntemle tütün, kolza, çeltik, *Datura* ve *Atropa* anter kültürlerinden doğrudan doğruya katlanmış bitkiler elde edilebilmiştir (Er 1992).

Ancak bu yöntemin güvenilirliği için elde edilen diploid bitkilerin kökenini iyi belirlemek gerekmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi anter kültürü sonucu elde edilen embriyoların anter dokusundaki diploid hücrelerden köken alması da söz konusudur. Hal böyle olunca elde edilen diploid embriyo ve dolayısı ile bitkiler donör bitkinin klonu olacak ve % 100 homozigot bitki elde edilmesi amacına hizmet etmeyecektir. Bu tip durumlarda elde edilen diploid embriyonun orjinini belirlemek için bir takım moleküler tekniklerden faydalanmak gerekmektedir. Bu tekniklere kısaca izozim analizi (Nurhidayah vd. 1996) ve mikrosatellit marker (SSR)’ler (Drumeva vd. 2005) yardımı ile yapılan analizleri örnek olarak verebiliriz.

- **Antimitotik özellikli kimyasal maddeler kullanılarak:** Mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyen ve dolayısıyla replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek kromozom sayısının 2 katına çıkmasını sağlayan antimitotik etkili kimyasalların, haploid kültür veya bitkiciklere göre değişen

süre ve dozlarda uygulanması ile de haploidlerin kromozom sayısı $2n$ 'e katlanabilmektedir. Arı (2006)'nın aktardığına göre 'bu amaçla kullanılan en yaygın kimyasal kolşisin olmakla birlikte, kafein, kloral hidrat, asenaften, sulfinilamid, etil merkuriklorid, azot protoksit, heksaklorosikloheksan, amiprofos-methyl (APM), pronamid, fenridazonpottasium, 2-hydroxynicotinic asit, trifluralin ve oryzalin gibi mutagenler ve herbisitler ile 2,4-D ile NAA gibi hormonlar da kullanılabilir (Picard vd. 1987, Bouvier vd. 1994, Ellialtıoğlu vd. 2001, Zheng vd. 2001, Rey vd. 2002, Han vd. 2003)'. Yine Arı (2006)'ya göre 'antimitotik etkili bu kimyasalların uygulama şekli ise hücre süspansiyonuna, besin ortamına (Barnabas vd. 1999) veya eksplantın içinde bulunduğu ön besin ortamı gibi farklı ortamlara (Nitsch 1981, Zhao vd. 1996, Rudolf vd. 1999, Köksal 1999, Zheng vd. 2001, Zamani vd. 2000, Herrera vd. 2002), kallus dokusuna (Wan vd. 1989), aksiller tomurcuğa (Abak, 1986), tepe tomurcuğuna ya da *in vitro* bitkicik (Sarı vd. 1994, Abak vd. 1996) veya çeliklere (Bouvier vd. 1994, Sarı ve Abak 1995), bitki köküne (Arzani ve Darvey 2001) gibi bitkinin çeşitli organlarına göre değişmektedir'.

Bu yöntemlerin birbirlerine göre üstünlüklerini belirlemek için yapılan bir çalışmada Chen vd. (1994), *Brassica napus* mikrospor kültürlerinde 3 kromozom katlama yöntemini kıyaslamışlardır. Mikrospordan oluşan bitkilerin, mikrospordan oluşan embriyoların ve izole edilmiş mikrosporların farklı doz ve sürelerde kolşisine tabi tutulduğu denemede en iyi sonuç, izole edilmiş mikrosporların doğrudan kolşisinle muamelesinden elde edilmiştir. Kromozom katlanma etkinliğinin % 70'e çıkartıldığı bu yöntem aynı zamanda mikrospor embriyogenesisini de uyartmıştır. Hansen ve Andersen (1998) ise buğdayda yaptıkları çalışmada, kromozom katlaması amacıyla trifluralin ve amiprofos-methyl (APM) kullanmışlardır. Çalışmada bu iki kimyasal maddenin kolşisinden daha etkili olduğu bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda kolşisinle % 53 fertilité sağlanırken, bu oran bu kimyasallar ile % 74'e çıkartılmıştır. Trifluralin ve APM'in molar konsantrasyon şeklindeki kullanımları, kolşisinden 300 kat daha düşük dozdadır. Dolayısıyla bu yüksek etkinliğe rağmen, insan ve çevre sağlığına çok daha az zararlıdır.

1.3.6. Ploidi belirleme

Haploidi teknikleri sonucu elde edilen haploid bitkilerin ploidi düzeylerini yani kromozom seviyelerini tespit etmek için şu yöntemlerden yararlanılmaktadır.

- **Fenotipik gözlemler:** Bitkilerin kromozom sayısı arttıkça (poliploidi) bitkinin tüm organlarında bir irileşme meydana gelmekte, buna karşılık haploid bitki organlarında ise diploid bitkiye oranla boyut azalması gözlenmektedir (Ellialtıoğlu vd. 2002). Kurtar (1999) Urfa yerli kabak çeşidinin diploid ve haploid bireylerini karşılaştırdığı çalışmada yaprak en ve boyunda haploid bitki aleyhine yaklaşık yarı yarıya bir farklılık olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada haploid bitkilerin diploidler gibi çiçek açtıklarını fakat çiçeklerin morfolojik ve biyolojik olarak farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur. Haploid bitkilerde hem dişi hem erkek çiçekler daha küçük yapılmış, erkek çiçeklerin polen taşımadıkları ve açmadan kuruyup öldükleri, dişi çiçeklerin çok küçük bir stigma ve ovaryuma sahip oldukları ancak normal polenler ile tozlandıklarında hiçbir şekilde meyve bağlamadıkları görülmüştür. Tüm bunlar diğer bitki türlerinde de elde edilen ortak bulgulardır. Bu özelliklerin gözlemlenmesi hızlı ve masrafsız olmasına karşılık, güvenilirliği azdır. Bu nedenle, fenotipik gözlemlerin mutlaka farklı ploidi belirleme yöntemlerinden birisi ile de desteklenmesi gerekir.

- **Kromozom sayımları:** Özellikle kök uçları gibi hızlı büyüyen doku ve organlarda yapılan kromozom sayımları en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, preparat hazırlığı sırasındaki hidroliz veya boyamaların zaman alması ve tecrübe gerektirmesi, yöntemin dezavantajlarıdır (Arı 2006).

- **Flow sitometri:** Hücrelerin tek tek floresans dedektörden geçerken emdikleri ışığın analizine dayanan bu yöntemde, floresans boyalarla boyanan hücre çekirdeklerinde çekirdek DNA miktarı belirlenmektedir. Her bitki türü için yöntemin optimize edilmesi bir dezavantaj olsa da, kolay, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi, bu yöntemi en fazla tercih edilen yöntem haline getirmiştir (Arı 2006).

- **Stomatal incelemeler:** Haploid bitkilerin stoma yoğunluğu ve bu stomalardaki plastidlerin sayısı diploid veya poliploid bitkilerden farklıdır. Ploidi düzeyi arttıkça, stoma uzunluğu ve plastid sayısı da artmaktadır. Farklı bitki türlerinde stomaların iriliği, dolayısıyla birim alanda bulunan stoma sayısı ile ploidi düzeyi arasında güvenilir ilişkilerin saptanması üzerine, bu yöntem ploidi tespitinde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak çeşitli çalışmalar, bu gözlemlerin kesinlikle kromozom sayımı ile de desteklenmesi gerektiğini ortaya koymuştur (Arı 2006).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Haploid Bitki Elde Etme Üzerine Yapılan Çalışmalar

Daha önce belirtildiği gibi ilk kez 1953 yılında başlayan kültür ortamında haploid bitki elde edilmesi çalışmaları günümüze kadar oldukça çeşitlenmiştir. Burada gerek ülkemizde gerek dünyada bu konu ile yapılan bazı çalışmalara uygulanan tekniğin çeşidine göre sınıflayarak aşağıda değinilecektir.

2.1.1. Anter kültürü çalışmaları

Ülkemiz araştırmacıları tarafından yapılan bazı anter kültürü çalışmaları aşağıda kronolojik olarak verilmiştir.

Baba (1992)'nin yaptığı bir çalışmada anter kültürü ile çeşitli yerli arpa çeşitlerinde N6 ortamında 15 ve 30 günlük +4 °C'de soğuk ön muamele sonucu kallus ve embrioid eldesi araştırılmıştır. 15 günlük ön uygulamada Tokak, Yerçil ve Gem çeşitlerinden kallus, Gem çeşidinden ise embrioid elde edilmiştir

Yapılan başka bir çalışmada tütün anter kültüründe genotip ve besi ortamının haploid bitki oluşumuna etkisi araştırılmıştır. 20 farklı genotipten alınan anterler MS ve N6 ortamlarında kültüre alınmıştır. Reaksiyon gösteren anter oranının büyük oranda genotipe bağlı olduğu görülmüştür. Yine reaksiyon gösteren anter oranı açısından MS ortamının N6 ortamına göre daha iyi olduğu fakat rejenere olan bitki oranı açısından iki ortamın arasında önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir (Sakin 1994).

Başka bir çalışmada haploid keten bitkilerinin elde edilmesi ile ilgili, 8 keten çeşidinin anterleri katı ve sıvı kültür ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucu her iki ortamda da kallus teşekkül oranının düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, kallus teşekkül oranı bakımından her iki ortamda da çeşitler arasında farklılık bulunmuştur. Katı kültür ortamında Blue-Chip keten çeşidi, sıvı kültür ortamında ise Antares keten çeşidi en yüksek kallus teşekkül oranına (sırasıyla, %3.67 ve 3.35) sahiptir. Norman keten çeşidinin sadece katı kültür ortamında kallus oluşumu sağladığı, McGregor keten çeşidinin ise her iki kültür ortamında da kallus oluşumu sağlamadığı belirlenmiştir. Soğukla muamele edilmiş olan anterlerin kallus oluşum oranı katı kültür ortamında kontrole göre dört kat azalmasına karşın sıvı kültür ortamında ise istatistiki anlamda önemli olmamakla beraber, %25.8 oranında artmıştır. Genel olarak, her iki kültür ortamında da kallus oluşumu sağlanmış ise de farklılaşma ortamına transfer edilen kalluslardan herhangi bir farklılaşma elde edilmemiştir (Kurt ve Evans 1998).

Gencer (2002), Ege Bölgesi tütün üretim alanlarında görülen külleme hastalığına karşı dayanıklı çeşit geliştirmek için, klasik ıslah metotları ile anter kültürü tekniğini birlikte kullanmış, bu amaçla, iki tütün çeşidine geriye melezleme metodu ile bir genitörden külleme dayanıklılık aktarmıştır. GM1 döllerinin anterleri kültüre alınarak önce haploid bitkiler, daha sonra da asenaften veya kolşisin uygulamasıyla dihaploid bitkiler elde edilmiştir. Elde edilen 67 dihaploid hattan 14'ü külleme dayanıklı bulunarak verim, kalite ve morfolojik özellikler bakımından standart çeşitlerle karşılaştırılmak üzere tarla denemesine alınmışlardır. İncelenen özelliklerden kuru yaprak verimi bakımından üç hat her iki standardı, yedi hat ise sadece Karabağlar 6265 standart çeşidini geçmiştir. Kalite özelliklerinden indirgen şeker ve toplam alkaloid içerikleri bakımından dört hat, bir standart çeşide göre daha iyi değerler vermiştir. Sonuç olarak, külleme dayanıklı, verim ve kalite bakımından standart çeşide yakın veya onu aşan değerler veren 8 dihaploid hat makro verim ve kalite denemesine alınmak üzere seçilmiştir. Bu çalışma anter kültürü tekniği ile istenilen özelliklere sahip dihaploid bitkiler elde etme açısından önemli bir başarı elde etmiştir.

Altındal (2005), çavdarda anter kültüründe önemli bir problem olan rejenerasyon kapasitesinin farklı uygulamalarla artırılmasını amaçlamıştır. Diploid ve tetraploid kültür çavdarına ait anterlerin *in vitro* kültüründe, farklı uygulamaların kallus

oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Denemede kültür ortamı olarak modifiye edilmiş N6 ortamı kullanılmıştır. Faktör olarak soğuk ön işlem (1 hafta +4 °C'de karanlıkta bekletme), ploidi (diploid ve tetraploid), karbon kaynakları (120 g/l maltoz ve 90 g/l sakaroz) ve hormonlar (2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin ve 1 mg/l IAA) uygulanmıştır. Anterler 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık olacak şekilde 2000-2200 lux arasında değişen aydınlatma koşullarında 22 °C'de tutulmuştur. Soğuk uygulaması anter tepki oranı ve kallus büyüklüğünü azaltmış, kallus oranını ise arttırmıştır. Yine, soğuk uygulanmış anterlerden oluşan kalluslarda kök gelişiminin soğuk uygulanmayanlara göre daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Ploidi seviyesinin anter tepki oranı üzerine istatistiksel olarak önemsiz, kallus oluşumu ve kallus büyüklüğü üzerine ise önemli etkileri belirlenmiştir. Nitekim tetraploidlerde kallus büyüklüğü ve kallus oluşturan anter oranı diploidlerden daha fazla, tepki gösteren anter oranı ise daha düşük bulunmuştur. Karbon kaynaklarının incelenen üç özellik (anter tepki oranı, kallus oranı ve kallus büyüklüğü) üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve maltoz kullanıldığında kallus oranı ve kallus büyüklüğü artmış, anter tepki oranı ise azalmıştır. İncelenen özellikler (anter tepki oranı, kallus oranı ve kallus büyüklüğü) üzerine 2,4-D ve IAA in etkileri benzer olmuş ve aralarında önemli fark tespit edilmemiştir. İncelenen tüm faktörlerin (ön işlem x ploidi x karbon kaynakları x hormon) birbirleriyle olan etkileşimi istatistiksel olarak önemli olmuştur. Buna göre, araştırmada transforme olmayan değerler dikkate alındığında, tepki gösteren anter oranı % 27.00-97.50, kallus oluşturan anter oranı % 13.00-28.00, kallus büyüklüğü ise 1.03-6.03 mm arasında değişmiştir.

Taşkın (2005), biberde yaptığı çalışmada üç defa kendilenmiş düşük sıcaklığa tolerant olarak belirlenen A71, A269, A313 nolu genotipler, orta derecede tolerant olarak belirlenen A109 nolu genotip ve duyarlı olarak belirlenen A74 nolu genotip ile yaptığı anter kültürü çalışmasında dört farklı kültür ortamı kullanmıştır. Denenen 5 farklı genotip için en yüksek embriyo uyartımı ve bitkiye dönüşümün belirlenmesi amacıyla anterler farklı zamanlarda kültüre alınmıştır. Ayrıca kültüre alınan ortamlarda gelişmesini tamamlayamayan embriyolar 10 gün süresince 0.5 mg/l absisik asit içeren besin ortamına alınarak absisik asitin embriyo olgunlaşmasına etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Denemenin sonucunda gerek embriyo oluşumu gerekse oluşan embriyoların bitkiye dönüşümü genotiplere, anter alma dönemlerine ve besin

ortamlarına göre değişmiştir. Genotipler arasında en yüksek embriyo verimi soğuğa tolerant olarak belirlenmiş olan 269 nolu genotipten elde edilmiştir. Anter alma dönemlerinden ise en başarılı sonuçlar Nisan ve Mayıs aylarından elde edilmiştir. Besin ortamları arasında ise III nolu besin ortamı (Murashige ve Skoog + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l naftalen asetik asit + 1 mg/l benzil amino pürin) ve IV nolu besin ortamından, (modifiye edilmiş Murashige and Skoog + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l naftalen asetik asit + 0.1mg/l benzil amino pürin) diğer ortamlara göre daha fazla sayıda embriyo elde edilmiştir. Olgunlaşmamış embriyolara absisik asit uygulamasından olumlu bir sonuç alınamamıştır. Bitkiye dönüşüm, hormonsuz Murashige and Skoog ortamına alınan olgun embriyolardan sağlanmıştır.

Bir başka çalışmada 6 biber kùltivarı kullanılmıştır. Çiçek tomurcukları üç boyutta gruplandırılmıştır. Anterler 4 mg/L NAA+ 0.1 mg/L BA içeren ve aktif kömür ile havuç ekstraktı eklenen MS ve N besi ortamında kùltüre alınmıştır. En iyi sonuçlar aktif kömür ve havuç ekstraktının her ikisinin de eklendiği, yalnız birinin eklendiği veya hiç birinin eklenmediği MS+ 4 mg/L NAA+ 0.1 mg/L BA ortamından elde edilmiştir. En iyi embriyo verimi Çarliston Bağcı çeşidinden alınan 5-6 mm'lik tomurcuklardaki anterlerin MS+4 mg/L NAA+ 0.1 mg/L BA ortamına alınması ile elde edilmiştir. Kömür tek başına pozitif etki göstermemiştir. . N + 4 mg/l NAA + 0.1mg/l BA + %0,1 aktif kömür +200ml havuç ekstraktı da iyi sonuçlar vermiştir (Sayılır ve Özzambak 2005).

Engin Özü (2006), ekmeklik buğday anter kùltüründe genotip, donör bitki yetiştirme koşulları ve anter kùltür sıcaklığının haploid bitki rejenerasyonu üzerine etkisini saptamak amacı ile, tarla veya sera koşullarında yetiştirilen üç farklı ekmeklik buğday genotipinden (Seri 82, Genç 99, Balatilla) alınan anterleri P2 ortamında dört farklı sıcaklıkta (25 °C, 27 °C, 30 °C, 32 °C) kùltüre almıştır. Araştırma sonuçları, donör bitki yetiştirme koşullarının anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmadığını, genotip ve anter kùltür sıcaklığının anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli farklılık yarattığını göstermiştir. Anter reaksiyon oranı ortalaması genotiplere bağlı olarak % 0.4 ile % 2.4 arasında değişmiş ve Seri 82 çeşidi incelenen diğer iki çeşide göre daha yüksek anter reaksiyon oranı ortalaması

göstermiştir. Kültür sıcaklığının 25 °C'den 30 °C'ye kadar artırılması anter reaksiyon oranında artışa neden olmuş ve 30 °C'de kültür edilen anterler 25 °C'de kültür edilen anterlere göre istatistiksel olarak daha yüksek anter reaksiyon oranı ortalaması göstermişlerdir. 32 °C'de kültür edilen anterler 30 °C'de kültür edilen anterlere göre istatistiksel olarak önemli derecede daha düşük reaksiyon oranı ortalaması göstermişlerdir. Donör bitkilerin yetiştirme koşulları ve anter kültür sıcaklığı bitki rejenerasyon oranı, yeşil bitki rejenerasyon oranı ve albino rejenerasyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilememiştir. Bitki rejenerasyon oranı, yeşil bitki rejenerasyon oranı ve albino bitki rejenerasyon oranı genotiplere bağlı olarak önemli derecede farklılık göstermiş ve Seri 82 çeşidinin söz konusu özellikler açısından incelenen diğer iki çeşide göre daha üstün olduğu ortaya çıkmıştır. Araştırmadan elde edilen bulgulara dayanarak, ekmeleklik buğday anter kültüründe, haploid bitki rejenerasyonunu etkileyen en önemli faktörün genotip olduğu sonucuna varılmıştır.

Arı (2006), Manisa lalesi olarak bilinen doğal *Anemone coronaria* var. *coccinea*'da anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde edilmesi üzerine çalışmıştır. Bu amaçla, Adana'da doğal yayılış gösteren bir popülasyondan sağlanan eksplantlar, farklı temel besin ortamları ile farklı hormon konsantrasyonları ve ön uygulamalara tabii tutulmuşlardır. Ortam denemelerinde; NN ve B5 temel besin ortamlarına, farklı konsantrasyonlardaki hormonların tek başlarına veya farklı dozlardaki aktif karbon, gümüş nitrat, L-glutamin ile bunların karışımına eklenmesiyle oluşturulan farklı uygulamaların embriyo oluşturma performansları saptanmıştır. Hormon denemelerinde, IAA (0, 0.1, 0.5, 1 ve 2 mg/l) tek başına veya 0.1 mg/l BAP ile birlikte kombinasyon halinde kullanılmıştır. NN ve B5 ortamlarında gerçekleştirilen bu uygulamalar arasında en yüksek embriyo oluşum oranı % 12.7 ile NN ortamındaki 1 mg/l IAA + 0.1 mg/l BAP hormon kombinasyonundan sağlanırken, bunu % 9.3 oran ile B5 ortamındaki 0.5 mg/l IAA + 0.1 mg/l BAP kombinasyonu takip etmiştir. Gümüş nitrat denemeleri (kontrol, 2.5, 5, 10 ve 15 mg/l) içerisinde en yüksek embriyo oluşumu, % 3.3 ile B5 ortamındaki 5 mg/l gümüş nitrat + 0.5 mg/l IAA + 0.1 mg/l BAP içerikli uygulamadan elde edilmiş olup, aynı içerikli NN ortamındaki anterlerden meydana gelen embriyo oluşumu % 2.5 oran ile ikinci sırada yer almıştır. L-Glutamin denemelerindeki (800 mg/l) tek olumlu tepki, oldukça düşük bir oran (% 0.7) ile B5 ortamındaki 800 mg/l L-glutamin + 2 mg/l IAA + 0.1 mg/l BAP uygulamasından elde edilmiştir. Aktif karbon

denemelerinin (kontrol, % 0.1, % 0.5 ve % 1) hiçbirisinden olumlu cevap alınamamış, bununla birlikte ortama girdiği aktif karbon + gümüş nitrat + L-glutamin karışım denemelerinde de yine tüm ortamlarda polen embriyogenesisine olumsuz etkide bulunmuştur. Çalışmanın başlangıcında uygulanan soğuk muameleleri (kontrol, + 7 °C'de 2, 7 ve 21 gün) arasında fark bulunamamıştır. Yapılan sitolojik incelemelerde ise embriyojenik bölünmelerin simetrik, jeneratif ve vejetatif çekirdek bölünmelerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Direkt polen embriyogenesisinin amaçlandığı bu araştırmada ayrıca, organogenesis ve oldukça yüksek oranlarda kallus oluşumu meydana gelmiştir. Ancak elde edilen embriyo ve kalluslarda tam bir bitki rejenerasyonu gerçekleşmemiştir.

Ülkemizde ekonomik önemi olan *Triticum durum* Desf. (makarnalık buğday) (*Gramineae*)'un 'Kundurdu 1149', 'Berkmen 469' ve 'DH-Berkmen' genotipleri ile yapılan anter kültürü çalışmasında farklı süreli önışlem koşullarının genotiplerin kallus oluşum miktarına olan etkisi araştırılmış ve en uygun önışlem süresi ve genotip belirlenmiştir. Berkmen 469 genotipi % 0.62 kallus üretimi ile anter kültürüne en iyi cevap vermiş ve en iyi soğuk önışlem süresi her genotip için 15 gün olarak bulunmuştur. Oluşan kalluslar tuzlu koşullar için genotipler geliştirilebilmesi amacı ile MS kültür ortamına transfer edilmişlerdir (Duran 2007).

Ayçiçeği dışındaki başka türler ile yapılan ve bu çalışmanın konusu kapsamına girdiği düşünülen, yabancı araştırmacıları tarafından yapılan bazı anter kültürü çalışmaları aşağıda kronolojik olarak verilmiştir.

Brassica campestris L., ile yapılan anter kültürü çalışmasında kültürün ilk üç günü uygulanan yüksek sıcaklığın (35°C) polen kökenli embriyoid verimini stimüle ettiği bildirilmiştir. Geç tek çekirdekli evredeki polenleri içeren anterler modifiye B5 ortamında kültüre alınmıştır. İlk 24 saatte uygulanan yüksek sıcaklık normal polen gelişimini inhibe etmiş ve anormal simetrik bölünmeyi teşvik etmiştir. Bu simetrik bölünme *in vivo* da gelişen polenlerde çok nadir gözlenmektedir. Yüksek sıcaklık uygulanmadan kültüre alınan anterlerde polen gelişimi *in vivo* ya eş durumdadır. Bu durum yüksek sıcaklığın normal polen gelişimini bloke ettiğini ve sporofitik gelişimi teşvik ettiğini destekler niteliktedir. Bunun yanında ne bitki büyüme düzenleyici ne de

başka bir nutrient gerekli olmasına rağmen sükrözün (0.29 M) bu tarz bir simetrik bölünme için zorunlu olduğu bildirilmiştir (Hamaoka vd. 1991).

Amaury vd. (1997) farklı ışık koşulları, farklı besi yerleri ve soğuk ön uygulamanın *Lilium longiflorum*'un anter kültürü üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. En uygun ortam karanlıkta ve soğuk ön uygulaması altındaki N6 medyumu olarak bulunmuştur. Karanlıkta artan kallus uyartımının ışıkta inhibe olduğu bildirilmiştir. 30 ve 46 mm uzunluğundaki anterlerden alınan erken ve orta tek çekirdekli evredeki mikrosporlar kallus oluşturmuştur. Toplamda 132 soğanlı ve yapraklı bitkicik rejenera olmuştur. Rejenera olan bitkilerde albino ve morfolojik çeşitlilik bulunmamaktadır. Rejenera olan bitkilerin aynı kök uçlarında hem haploid hem de diploid hücrelere rastlanması kromozom duplikasyonunun kendiliğinden olduğunu göstermektedir. Kültüre alınan anterlerin Mikrosporlarının mikroskopik incelemelerinde değişik evrelerdeki çok hücreli tanelerin varlığına rastlanmıştır. Bu gözlemler mikrospor kökenli bitkilerin androgenik kökenli olduğunu desteklemektedir. Bu durum izozim analizi ile de teyit edilmiştir.

Quercus suber L. ile yapılan bir çalışmada anter kökenli embriyoların çekirdek DNA'sın duplikasyonunun uyarılması amaçlanmıştır. Bunun için kolşisin, oryzalin ve amiprofos-methyl (APM) gibi üç antimitotik ajanın farklı konsantrasyonları *in vitro* da 6 farklı genotipte denenmiştir. Bu türün anter kültürünün %7.78 gibi düşük bir yüzde ile spontan diploidler verdiği bilinmektedir. 48 saat süre ile 0.01 mM oryzalin kullanımının yaklaşık %50 oranında diploid embriyo eldesi ile en etkili uyarımı yaptığı bildirilmiştir. 0.01mM APM kullanımı orizaline göre düşük olmakla birlikte kabul edilebilir bir artış sağlamışken, 1.3 veya 8.8 mM kolşisin kullanımının nekroz ve düşük DNA duplikasyonu oluşturması ile en az etkili kimyasal olduğu bulunmuştur (Pintos vd. 2007).

2.1.2. Mikrospor kültürü çalışmaları

Androgenesisin bir diğer yolunun mikrospor kültürü olduğu ve anter kültürüne göre farklı avantajlara sahip olduğu yukarıda verilmiştir. Birkaç çalışma ile kısaca bu yöntem incelenecektir. Örneğin Herrera vd. (2002) *Coffea arabica* cv. *Caturra* (kahve)'da yaptıkları çalışmada izole edilen mikrosporları *in vitro* ortamda kolşisin ön muamelesine tabi tutmuşlardır. Mikrospolar mekanik olarak izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Kolşisin uygulamasından önce mikrosporlar daha fazla gelişim ve rejenerasyon için yarı katı ortamda kültüre alınmıştır. Araştırmacılar mikrosporları değişik süre ve konsantrasyonlarda kolşisine maruz bırakmışlardır. En iyi androgenik cevap 48 saat süre ile 100 mg/l kolşisin uygulamasında görülmüştür. Geç tek-çekirdekli ve erken çift-çekirdekli evredeki mikrosporlar kolşisine karşı duyarlı bulunmuştur. Flow sitometrik ve morfolojik analizler rejeneren olan bitkilerin % 95'inin dihaploid ($2n=2x=22$) olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak bir miktar double-dihaploid bitki ($2n=4x=44$) de elde edilmiştir. Bu durum, mikrosporların kolşisine maruz kalması sonucu sadece androgenik uyartımın değil aynı zamanda kromozom duplikasyonunun da beklenebileceğini önermektedir.

Başka bir çalışmada *Brassica napus* L. mikrospor kültüründe kolşisinin embriyogenesis ve kromozom katlaması üzerine etkisi araştırılmıştır. 50 ve 500 mg/L kolşisinin 15 saat süre boyunca mikrospora doğrudan uygulanmasının embriyogenesisi uyardığı ve sağlıklı görünüme sahip çok sayıda embriyo oluştuğu görülmüştür. Bu normal görünüşlü embriyoların 24 °C'de katı ortama transferi sonucu direk ve hızlı bir şekilde bitkiye rejeneren olduğu bildirilmiştir. En yüksek kromozom katlanmasının %83-91 oranına 15 saat süreyle 500 mg/L kolşisin uygulaması sonucu, düşük miktarda poliploid ve kimerik bitki oluşumu ile birlikte olduğu gözlenmiştir. Bu denemeler 30 saatlik muamelenin özellikle 1000 mg/L gibi yüksek kolşisin miktarında daha az pozitif etkili olduğunu göstermiştir. Kolşisin uygulaması olmayan ve indüksiyon ortamının değiştirilmediği sıradan mikrospor kültürünün, zayıf embriyogenesis ve embriyo çimlenmesi ile sonuçlandığı ve bitki rejenerasyonu için birçok alt kültürün gerektiğinin altı çizilmiştir (Zhou vd. 2002).

2.1.3. Ovaryum kültürü çalışmaları

Ovaryum ya da ovül kültürleri ise ginogenetik haploid bitki oluşumu için kullanılan tekniklerdendir. Bu kapsamda Gürel ve Gürel (1998) diploid erkek kısır bir şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) ıslah hattından alınan döllenmemiş yumurtalıklardan elde edilen bitki rejenerasyonuna ait yöntem tanımlamıştır. Yumurtalık eksplantları, 2.0 mg/l benzilaminpürin (BAP) içeren Murashige & Skoog (MS) ortamında kültüre alınmıştır. İki farklı muamele denenmiş olup; eksplantların tamamı 15 gün karanlıkta tutulduktan sonra, yarısı normal ışık ortamına aktarılırken, diğer yarısı da bütün kültür boyunca karanlık ortamda bırakılmıştır. Her iki ortamda kültüre alınan eksplantlarda aşağı yukarı aynı oranlarda kallus oluşmuştur. Ancak, muameleler arasında eksplantların sürgün-oluşturma kapasiteleri bakımından önemli farklar meydana gelmiş olup; karanlıktaki ön inkübasyon döneminden sonra ışığa aktarılanlar, sürekli karanlıkta tutulanlara göre daha fazla sayıda sürgün oluşturmuştur (% 14.6'ya karşın % 4.2). Ayrıca, eksplantların kallus ve sürgün-oluşturma kapasiteleri arasında ters orantılı bir ilişki gözlenmiştir. Sürgünler 2.0 mg/l naftelenasetik asit (NAA) ve 2.0 mg/l gümüş nitrat ($AgNO_3$) içeren MS ortamına aktarıldıklarında, iki hafta içerisinde köklenme başlamıştır. Elde edilen bitkilerin ploidi seviyeleri, rejenerantların yaprak örneklerinde yapılan kromozom sayımları ile belirlenerek, elde edilen bütün bitkilerin diploid olduğu gözlenmiştir.

Başka bir araştırmada ise kabakta (*Cucurbita pepo* L.) döllenmemiş ovaryumlardan haploid embriyoların elde edilmesi ve bunların bitkiye dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Sakız ve Zeybek F1 çeşitlerinin döllenmemiş ovaryumları antesisten 1 gün önce, antesis dönemi ve antesisten 1 gün sonraki dönemlerde toplanmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra steril koşullarda dış kabukları soyulan ovaryumlar 4, 6, 8 dilime bölünerek 0.01, 0.1 ve 1 mg/l TDZ ilave edilmiş embriyo teşvik ortamlarına dikilmiştir. Karanlık koşullarda yaklaşık 3 hafta bekletilmiştir. 0.1 TDZ içeren ortamlarda antesisten 1 gün önce ve antesis döneminde alınan ovaryumlardaki ovüllerde gelişme görülmüştür. Daha sonraki denemelerde ovaryumlar enine disk şeklinde ve boyuna dilim şeklinde kesilmiştir. Embriyo teşvik ortamında gelişme gösteren eksplantlar 7–14 gün sonra NAA'nın 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.5 mg/l konsantrasyonları ile

0.1, 0.5 ve 1 mg/l BA' nın farklı konsantrasyonlarının ilave edildiği Rejenerasyon ortamlarına transfer edilmiştir. Rejenerasyon ortamında bazı eksplantlarda ovüllerin şişmesi şeklinde gelişme devam ederken bazılarında kallus gelişimi görülmüş, ancak bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir (Yılmaz 2005).

2.1.4. Embriyo kurtarma tekniği çalışmaları

Yetersiz polenler ile dölleme sonucu oluşan embriyonun kurtarılması tekniğine göre yapılan bir araştırmada hıyarda ışınlanmış polenlerle *in situ* uyartım sonucu elde edilen değişik gelişme safhalarındaki haploid embriyolar *in vitro* kültüre alınarak bitkiye dönüştürülmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yılın değişik mevsimlerinde dört değişik hıyar genotipinden elde edilen embriyolar steril koşullar altında E20 A ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. Embriyoların bitkiye dönüşüm oranları ile bitkiye dönüşme süreleri ve elde edilen bitkiciklerin *in vitro* gelişimleri incelenmiştir. Ayrıca bu bitkiciklerin *in vitro* klonlamayla çoğaltım olanakları araştırılmış ve çoğaltım katsayıları belirlenmiştir. İleri gelişim safhalarındaki haploid embriyolar, globüler safhadakilere göre daha kısa sürede (3.5 günde) ve daha yüksek oranda (1. yıl % 60, 2. yıl % 80) bitkiye dönüşmüşlerdir. Mayıs–eylül ayları *arasında in vitro* kültüre alınan embriyolardan yılın öteki dönemlerine göre daha fazla sayıda haploid bitki elde edilmiştir. İkinci yıl haziran ayında embriyoların bitkiye dönüşümleri % 80'e ulaşmıştır. Elde edilen bitkicikler kullanılan besin ortamı üzerinde sağlıklı bir şekilde gelişmişler ve klonlamayla kolayca çoğaltılmışlardır. Arka arkaya yapılan çoğaltımlar arasında geçen süre yaklaşık 30'ar gün olmuş ve bitki başına elde edilen çelik sayısı da 3–12 arasında değişmiştir. Meyve başına haploid bitki sayısı çok yüksek olmamakla beraber, iki yılın sonunda 4 genotipten toplam olarak 190 adet haploid bitki elde edilmiştir (Çağlar ve Abak 1999).

Başka bir çalışma ise daha sonra *in vitro* da kültüre almak üzere *in situ* olarak elde edilen embriyoların daha kolay, hızlı, etkili şekilde ayrılması ve çıkartılabilmesi için kullanılabilecek yöntemlerin üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada, kontrol

uygulaması olarak “tohumların tek tek açılarak embriyoların kurtarılması” yöntemi kullanılmıştır. Bu yöneme alternatif olarak “tohumların hepsinin doğrudan besin ortamına ekimi”, “tohumlara ışıktaki bakarak embriyolu tohumların ayrılması” ve “tohumların hepsinin sıvı ortama ekimi” olmak üzere 3 yeni yöntem denenmiştir. Çalışmada bitkisel materyal olarak, *Fusarium oxysporum*'un farklı ırklarına dayanıklı GM4 kademesindeki ıslah materyali kullanılmıştır. 300 Gy gama ışınıyla ışınlanmış çiçek tozu kullanılarak yılın ilkbahar aylarında yapılan denemeler sonucunda, meyve başına elde edilen ortalama embriyo sayıları tek tek açma yönteminde 7.7 ile en yüksek çıkmış, bunu daha sonra sırayla 6.8 adet ile tohumların hepsinin besin ortamına ekimi, 5.7 adet ile tohumlara ışıktaki bakarak embriyolu tohumların ayrılması izlemiştir; fakat bu üç uygulama arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Tohumların hepsinin sıvı ortama ekimi uygulamasında ise embriyo gelişimi sağlanamamış ve yüksek oranda enfeksiyon sorunu meydana gelmiştir. Gerekli süre ile birlikte değerlendirildiğinde en iyi uygulamanın tohumların hepsinin besin ortamına ekimi yöntemi olduğu görülmüştür (Baktemur vd. 2010).

2.2. Ayçiçeğinde *in vitro* Çalışmalar

Bu bölümde ayçiçeği ile ilgili *in vitro* çalışmalar verilmiştir. Daha sonraki alt başlıkta ise yine ayçiçeğinde yapılan ve haploid bitki elde etme amacını güden çalışmalara değinilecektir.

Özyiğit vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada Türkiye için ekonomik önemi olan Trakya 80, Trakya 129, Trakya 259, Trakya 2098, and Viniimk 8931 adlı beş farklı ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L.) kallus gelişimi ile sürgün ve kök organogenesisi elde edilmiştir. Olgun embriyolar çeşitli bitki büyüme düzenleyiciler ile desteklenen MS besisi yerinde kültüre alınmıştır. Kallus başlatımı için MS + 1 mg/l 2,4-D, sürgün rejenerasyonu için MS + 1 mg/l benziladenine ve 0.5 mg/l α -naftalenasetik asit kullanılmıştır. Tüm genotiplerde kallus uyarım oranı %80-92 civarındadır. Trakya 259 genotipi en iyi sürgün rejenerasyonunu (%44) vermiştir. Tüm rejenerantlar 1 mg/l indol-

3-bütirik asit içeren ve hiç hormon içermeyen MS besi yerlerinde köklenmiştir. Bu sonuçlar olgun embriyoların indirek bitki rejenerasyonu için alternatif bir kaynak olabileceğini göstermiştir.

Bir başka çalışmada, ayçiçeği bitkisinden embriyo kültürü yöntemi kullanılarak elde edilmiş olan bitkilerin soğukta muhafaza edilerek korunmasına ve bu bitkilerde oluşan anatomik ve karyolojik değişimlerin belirlenmesine çalışılmıştır. Kontrol grubu bitkileri kum ortamında çimlendirilerek elde edilmiştir. Deney grubu bitkileri ise, MS besi ortamında embriyo kültür yöntemiyle yetiştirilen bitkiler ve bunların bir kısmının düşük ısıda muhafaza edilmesiyle elde edilen bitkilerden oluşmuştur. Yapılan anatomik değerlendirmede, deney grubu bitkilerinin epiderma, korteks parankimasi, parankima, iletim demetleri gibi yapılarının kontrol grubuna göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Mitotik indeks değerleri kontrol grubunda %22.98, deney grubu kültür ortamında yetişen bitkilerde %60.00, soğukta muhafaza edilmiş bitkilerde ise %10.15 olarak belirlenmiştir (Akpınar 2006).

Türkiye'nin Trakya bölgesinde yetişen 16 farklı ayçiçeği hibritinin kullanıldığı bir çalışmada üç farklı metod kullanılarak (i- çimlenme sırasında testayı ayırmadan yüzey sterilizasyonu, ii- testayı ayırarak yüzey sterilizasyonu, iii- ıslak pamuk üzerinde çimlenme sırasında testayı ayırmadan) elde edilen bitkilerin değişik eksplantları çeşitli hormon konsantrasyonları içeren farklı kültür ortamlarına transfer edilmiştir. Kotiledon ve hipokotil eksplantları verimli sonuçlar vermiştir. Eksplant bazında incelendiğinde doğal ve hibrit türler arasında rejenerasyon ve kallus oluşumu açısından farklar bulunmuştur (Arda 2004).

Gürel ve Kazan (1998) tarafından ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) hücre veya dokularından etkin bir bitki rejenerasyon sistemi geliştirmek amacıyla, farklı eksplant tipleri ve hormon kombinasyonlarının kullanıldığı değişik rejenerasyon protokolleri karşılaştırılmıştır. Özellikle bazal kısımlardan olmak üzere, kotiledon eksplantlarından somatik embriyogenesis elde edilmiş, fakat genotipik varyasyonunun hem somatik embriyo hem de kök üretimi için en kritik faktör olduğu gözlenmiştir. Sürgün-ucu eksplantlarından sürgün üretimi bakımından 10 farklı ayçiçeği çeşidi karşılaştırıldığında, söz konusu varyasyon çok daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır.

Somatik embriyo üretimini artırmak amacıyla kültür şartlarının geliştirilmesi gerekli görülebilir. Hipokotil segmentlerinden elde edilen ince hücre katmanları ise bitki rejenerasyonu açısından başarılı bulunmamıştır.

2.2.1. Ayçiçeğinde haploidizasyon çalışmaları

Bu bölümde gerek *in vitro* androgenesis gerekse *in vitro* ginogenesisi kapsayan ve ayçiçeği ile yapılan bazı çalışmalara yer verilecektir. Böylelikle bu çalışmada takip edilen yolun literatür açısından alt yapısına göz atılacaktır.

Öncelikle Coumans ve Zhong (1995)'un bildirdiğine göre önceki girişimlerin, rutin olarak onaylı double haploid ayçiçeği üretiminde kullanışlı olmadığı yönündedir. Kendi yaptıkları çalışmada anter duvarı, anter sapı, parankimatik vasküler demetler ve çok hücreli tüy tipi yapılar gibi somatik dokuların yüksek reaktivitesinin üstesinden gelmek için izole mikrosporları test etmişlerdir. Sıvı kültürde (1 mg/l NAA, 0.2 mg/l BA ve 0.44 M maltoz içeren N6 ortamı) filtrasyon ve yoğunluk gradiyenti kullanarak asimetrik ve simetrik mikrospor bölünmeleri elde etmişlerdir. Ancak tüy benzeri yapılardan gelen kontamine edici hücre ya da hücre grupları oldukça reaktif olduğundan kallus oluşturmaya daha yatkın olduğunu bulmuşlardır. Dolayısı ile kültürün ikinci gününden sonra son derece canlı ve şişkin olan mikrosporların bir popülasyonunu elde etmek için ikinci bir saflaştırma gerekli görülmüştür. Bu prosedürü kullanarak somatik kontaminantlardan kaçınmanın yanı sıra, canlılık ve başlangıç bölünme oranı açısından mikrospor cevabının artırılması ve bir etilen öncülü olan aminosiklopropan karboksilik asit eklenmesinin ardından sürekli bölünme ve mikrokallus oluşumu eldesi mümkün kılınmıştır.

Ayçiçeği ile yapılan başka bir çalışmada ginogenik double haploidlerin tekrarlanabilir rejenerasyonu için gerekli koşullar araştırılmıştır. 4 donör ve 4 alıcı hibrit bitki içeren 48 uygulama gerçekleştirilmiştir. Polenler 300 Gy, 600 Gy ve 900 Gy dozlarında ışınlanmıştır. Kendileme sonucu toplamda 1107'si bitki oluşturan 2279

embriyo elde edilmiştir ve bu bitkilerin 582'si tohum oluşturmuştur. Rejenerantların ploidi seviyeleri iki-üç yapraklı aşamada incelenmiş ve 296'sının haploid olduğu bildirilmiştir. Bu bitkilerin bazıları kendiliğinden dihaploid olmuşken diğerleri kromozom duplikasyonu için kolşisinle muamele edilmiştir. Diploidler ginogenik kökeninin tespiti için genetik ve biyokimyasal yöntemler ile kontrol edilmiştir. Metodun etkinliği -tarımsal olarak kullanışlı olarak ifade edilen DH (Double-haploid) hatlarının sayısı (Fertil ve mildiyöye dayanıklı, dallı ve dallanmamış bitkilerin ortalama sayısı)- % 8,6 dolayındadır (Todorova vd. 1997).

Yine başka bir çalışmada çiçek morfolojisi ve gelişim evreleri arasındaki korelasyonu belirlemek için ayçiçeğinin tüp çiçeklerindeki yumurtalıklar seri kesitler ile histolojik olarak incelenmiştir. Bu veriler temelinde embriyo kesesi izolasyonu için gözle görülen stigma ve uygun kıvrımlı yüzeye sahip çiçekler seçilmiştir. Bu çiçeklerdeki yumurtalıkların ~%20'si döllememiş iken, ~%75'i döllemiş zigot aşamasındaki embriyo kesesi oluşturmuş ve geri kalan yumurtalıklarda ise iki hücreli proembriyo içeren embriyo keseleri oluşmuştur. Embriyo keseleri stereo mikroskop altında elle iğne yardımı ile disekte edilmiş veya elle izolasyondan sonra 4-5 saat süreyle enzimlerle muamele edilmiştir. Enzim olmaksızın izole edilen embriyo keselerinin canlılığı floresan diasetat boyamaya göre % 90'dan fazla olmuştur ve kültürün 72. saatinden sonra ~%3 dolayına inmiştir. İzolasyon sırasında enzim kullanımı, yumurta hücrelerini koruyan dokuların uzaklaştırılmasının sorunun bir parçası olduğunu destekler şekilde embriyo kesesi canlılığını azaltmıştır. Embriyo kesesi canlılığını etkileyen diğer faktör ise ortamın osmolalitesidir. Canlı kalan embriyo keseleri *in vitro* da kültüre alınmıştır. %9 sükröz içeren sıvı ortamda zigot evresindeki embriyo keselerinin yaklaşık %10'u globular embriyo geliştirmiş fakat embriyoların sonraki büyümeleri anormal olmuş ve kallus oluşturmuştur. Embriyo kökenli kallusların NAA ve kinetin içeren katı MS ortama transferi sonucu organogenesis meydana gelmiştir. Embriyo keseleri, *Brassica napus*'un androgenik mikrosporları ve mikrospor kökenli embriyoları ile birlikte kültüre alındığında embriyo keselerinin yaklaşık % 11'i büyüme ve gelişme göstermiştir. Kültüre alınan embriyo keselerinin embriyolojik araştırmasında endotelyum dışı büyüme ortaya çıkmıştır. (Popielarska ve Przywara 2003).

Todorova vd. (2004) tarafından, partenogenetik uyartım için başlangıç dışı materyali olarak kullanılan hibritlerin ve *Helianthus annuus* L. hatlarının partenogenetik reaksiyonu karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Hibritlerin ortalama partenogenetik yanıtı bu hatlara oranla oldukça yüksek bulunmuştur. Başlangıç dışı materyali olarak kullanılan hatların (2607 A, 2607 B, 1607 A, 1607 B, 1234 A ve 1234 B) ortalama partenogenetik yanıtı, hibritlerin (Albena, Viki, Euroflor, Perla and San Luka) ortalama yanıtından düşüktür. İncelenen hatlar içinde, hibritlerde gözleendiği gibi, partenogenetik indüksiyon ile ilgili spesifik bir genotipik reaksiyon tespit edilememiştir. San Luka ve Perla hibritleri göreceli olarak yüksek bir partenogenetik yanıt vermiştir. Sonuçların analizi göstermiştir ki dışı genotiplerin partenogenetik cevabının en uygun ifadesi ağırlıklı olarak polen kaynağı ile etkileşimine bağlıdır. Rf 673 kodlu polen kaynağı, partenogenetik reaksiyon açısından hat Rf 147'ye kıyasla Perla, San Luka ve Viki hibritlerinde ortalama 3.4 defa daha iyi bulunmuştur. Sonuç olarak polen kaynağının partenogenesis-uyarıcı yeteneği üzerindeki etkisi sayesinde dışı genotipin partenogenetik cevabının ifadesi açısından γ -ışınımı etkili bulunmuştur.

Başka bir çalışmada hibrit bir ayçiçeği olan Albena çeşidinde mikrosatellit markerler (SSR) kullanılarak gama ışını ile uyarılmış partenogenesis metodu ile geliştirilmiş diploid bitkilerin, double haploid kökeni incelenmiştir. Diploid bitkilerin soy analizinde iki kodominant lokasyon karakterize edilmiştir. Polen kaynağı olarak fertil restorer hat olan 937 R kullanılmıştır. Polenler 700 Gy gama ışınına maruz bırakılmıştır. Bu bitkilerin oluşum ve gelişim sürecine, polenlerin kendi genetik materyali ile katılmadığının bir kanıtı olarak analiz edilen hatta incelenen her iki lokusta, polen kaynağı için spesifik olan alel gözlenmemiştir. Paralel olarak SSR analizi göstermiştir ki incelenen bitki soyları her iki lokus içinde homozigottur. Bu veriler, hibrit Albena'da elde edilen diploid bitkilerin double-haploid kökeninin embriyo kültürü ile kombine edilen ışınlanmış polen kullanımının sonucu olduğunu desteklemektedir (Drumeva vd. 2005).

Bu ginogenesis temelli araştırmalara ek olarak aşağıda verildiği üzere androgenesis esasına dayanan çalışmalar da mevcuttur. Günümüzde, kültüre alınan anterlerden mikrospor kökenli embriyo üretimi birçok tarımsal bitkide homozigot hatlar izole etmek için kullanılan ve iyi bilinen bir tekniktir. Thengane vd. (1994) yaptıkları

çalışmada dört ayçiçeği genotipinde anterlerden embriyo üretimi ve bitki rejenerasyonu için bir kültür yöntemi tanımlamıştır. Başlangıç denemeleri için, tek çekirdekli mikrosporları içeren anterler 1.0 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BA ve 40 g/l sükröz içeren MS, Gamborg's B5, Nitsch and Nitsch ve White's W olmak üzere dört farklı tip temel besi yerinde kültüre edilmiştir. Embriyo uyartımı daha iyi olan MS temel ortamı sonraki denemeler için kullanılmıştır. Kültürün gereklerini optimize etmek için MS temel ortamı 0.2-2.0 mg/l 2,4-D ve 0.5 ile 1.0 mg/l BA ile desteklenmiştir. Embriyojenik verim için soğuk ön uygulama, hormon rejimi ve sükröz konsantrasyonunun etkisi test edilmiştir. Embriyo uyartımı kapasitesi üzerinde genotipin önemli bir etkisi bulunmuştur. Bir etilen inhibitörü olan gümüş nitrat (2.5 mg/l) ilavesi embriyo çimlenmesini stimüle etmiştir. Sadece tek bir genotipten oluşan embriyolardan bitki (10-15%) elde edilebilmiştir.

Başka bir çalışmada katı ortama konulan ayçiçeği anterleri 12 gün sonra kallus ve embriyo oluşturmuştur. Embriyogenesis, anter ve besi yerindeki kahverengileşmeyi azaltan 0.1% oranında PVP (Polivinilpirolidon) eklenmesi sonucu daha iyi olmuştur. Diğer türlerde olduğu gibi anter cevabında genotipik varyasyon önemli bir parametredir ve besi yeri genotip etkileşimi genotipe bağlı farklı PVP etkisiyle birlikte önerilmektedir. Embriyo çimlenmesi, sükröz konsantrasyonunun azaltıldığı (%10 => %6 => %3) çimlenme ortamında büyük oranda artmıştır. Kültürün ilk on günü süresindeki anterlerin histolojik incelemesi göstermiştir ki bu araştırmanın koşulları altında, elde edilen embriyolar ya direk olarak anterin iç veya dış kısmından ya da indirek olarak anter duvarından veya koruyucu doku kökenli kalluslardan köken almış ve dolayısıyla somatik kökenli olmuştur. Sonuç olarak 78 embriyo kökenli bitkinin Feulgen boyama veya flow sitometrik analizleri göstermiştir ki tüm bitkiler diploid ($2n=34$)'tir (Zhong vd. 1995).

H. annuus ile *H. tuberosus*, *H. laetiflorus* ve *H. resinosus*'un türler arası hibritlerinin anter kültüründen kallus oluşumu ve direk embriyogenesisi için altı farklı indüksiyon ve dört rejenerasyon ortamı kullanılarak optimizasyon elde edilmiştir. farklı kültür koşulları (30°C/35°C ve farklı karanlık denemeler) altında kullanılan bir medya kombinasyonu (MS-I3, MS-R3 ve MS-R4), anter başına embriyo ortalaması 8.5 olmak kaydıyla % 92.7 civarında embriyojenik anterler vermiştir. Ancak kallus oluşumunun

yanı sıra direk embriyogenesis oluşumu genotipe ve denemeye özgü güçlü bir reaksiyon göstermiştir. Kullanılan 4 genotipin 5600 anterinden 2000 den fazla bitki rejenerasyon olmuştur. Elde edilen rejenerantların androgenik kökeni, morfolojik özellikleri ve izozim analizleri ile karakterize edilmiştir (Nurhidayah vd. 1996).

Saji ve Sujatha (1998) ise ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) anterlerinden yüksek frekanslı kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu elde edilen bir protokol tanımlamıştır. Anterlerin kallus oluşumu ve devamında embriyogenesis yeteneğinin artırılması için 2.0 mg/l NAA ve 1.0 mg/l BA ile desteklenmiş MS ortamında farklı değişkenler test edilmiştir. Bunlardan agar konsantrasyonu, sükröz konsantrasyonu ve karbonhidrat kaynağı kallus oluşumu üzerinde önemli bir etkiye sahip iken, ışıklı ve karanlık koşullarda inkübasyon, anter inokulasyonundan önce 1-6 gün süreyle kapitulanın soğuk ön muameleye tabi tutulması ve genotipin kallus oluşumu üzerinde önemli bir etkisi gözlenmemiştir. Ancak çeşitli ortamlardaki kallusların 0.1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren ortama transferi sonucu uygulanan her faktör, embriyogenesis üzerinde hayli önemli bir etkiye sahip olmuştur. Geliştirilen prosedürle hemen hemen %100 kallus oluşumu ve %44 embriyo oluşumu elde edilmiştir. Tam gelişmiş embriyolar oluşmasına rağmen bunların tam bir bitkiye dönüşüm sıklığı düşüktür (14.3%). Bu nedenle çoklu sürgünler elde etmek için, embriyo oluşturan embriyojenik kalluslar 0.5 mg/l BA içeren MS ortama transfer edilerek embriyojenik yol baypas edilmiştir. Uzayan sürgünler 0.5 mg/l NAA içeren ½ MS ortamında köklenmiştir. Sitolojik analizler ortaya koymuştur ki köklenen bitkilerdeki haploidi oranı % 8.3 iken embriyojenik kallusların ve embriyoların haploidi oranı % 30 civarındadır. Yine de araştırmacılar, elde edilen haploid bitkilerin frekansının, rejenerantların nodal eksplantları kullanılarak yapılan kitle çoğaltımı ile arttırılabileceğini bildirmişlerdir.

Bir başka çalışma ise ayçiçeğinde yabani *Helianthus* ile yapılan türdışı hibritlerin kültür bileşenlerini optimize etmek için yapılmıştır. Tek çekirdekli mikrosporları içeren anterler farklı hormon kombinasyonlarını içeren temel MS ortamda kültüre alınmıştır. 2,4-D varlığında kallus uyartımı hızlı ve çoğalma yüksek iken, ortam sitokinin ve oksin içerdiğinde ise düşük olmuştur. Fazla sitokinin ve oksin kallus uyartımında önemli olmamıştır. BA ve kazein hidrolizatın arttırılmış/uygun miktarıyla Rejenerasyon potansiyeli artmıştır. Kinetin, kallus rejenerasyon frekansı üzerinde

spesifik bir etki göstermemiştir. Genotip ise kallus uyarımı ve bitki oluşum kapasitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. *H.annuus* × *H.tuberosus* optimum kültür ortamında bitki oluşumu açısından çok iyi cevap vermiştir. *H.annuus* × *H.tuberosus*'un türler arası hibritinin androgenesis embriyo aşamasını geride bırakarak bitkiler oluşturmuştur (Vijaya Priya vd. 2003).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkisinin iki farklı ıslah hattı kullanılmıştır. Tohumlar 2010 yılında Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. K3R-SN:10/2010 (Bu çalışmada G1 olarak adlandırılacaktır) ve K3R-SN:4/2010 (Bu çalışmada G2 olarak adlandırılacaktır) kod numarasına sahip bu hatlar orabaş ve mildiyöye dayanıklılık geni taşıyan hatların melezleridir ve melezleme işleminden sonra üç defa kendilenmişlerdir (F₄). Enstitüden alınan tohumlar Trakya Üniversitesi Havsa Meslek Yüksek Okulu'ndaki doku kültürü laboratuvarına getirilmiş ve çimlendirilmeleri buradaki iklim odasında yapılmıştır. Elde edilen fideler yine bu okulun uygulama seralarında yetiştirilmiş ve çalışmanın devamının bir kısmı buradaki doku kültürü laboratuvarında bir kısmı ise Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü doku kültürü, sistematik araştırma ve mikroskopik görüntüleme laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Donör bitkilerin yetiştirilmesi ve kapitulum alımı

Her iki genotipin tohumları, 2010 ve 2011 Nisan ayından başlamak üzere ve her aybaşında bir kez olmak koşulu ile Mayıs, Haziran ve Temmuz ayları boyunca, 28 gözlü viyollerde ve torf içerisinde, her göze bir tohum gelecek şekilde çimlendirilmeye bırakılmıştır. Dolgun ve sağlıklı görünüme sahip tohumların kullanımına dikkat edilmiştir. Çimlendirme işlemi ortalama nemin yaklaşık %60 olduğu, 25 ± 2 °C

sıcaklıktaki, 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyot koşullarındaki iklim odasında gerçekleştirilmiştir. Tohumlar her gün musluk suyu ile sulanmış ve torfun kurumamasına dikkat edilmiştir. Beş gün bu ortamda bekletilen viyoller çimlenen tohum sayısı kaydedilerek sera koşullarına alınmıştır. Sera koşullarındaki bitkiler haftada bir defa musluk suyu ile sulanmış ve mekanik olarak yabancı ot mücadelesi yapılmıştır (Şekil 3.1). Çimlendirme işleminden itibaren iki ay süresince bu süreç aynen devam etmiştir. Bitkilerde kapitulum oluşumu başlamasına müteakip, sabah saat 9:00 sıralarında uygun tomurcuklar makas yardımı ile kesilerek laboratuvara getirilmiştir. Denemelerde yalnızca apikal kapitulumlar kullanılmış (Şekil 3.2), yan dallardaki kapitulumlardan örnek alınmamıştır. Ayrıca donör bitkilerin yetiştirme koşulları üzerindeki mevsimsel etkileri en aza indirmek için her dört ay içerisinde yetiştirilmiş bitkilerden alınan anterler her deneme gurubu için karışık olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1: Sera koşullarında yetiştirilen ayçiçeği bitkileri



Şekil 3.2: Ayçiçeğinin henüz açmamış apikal kapitulumu

3.2.2. Tek çekirdekli mikrospor eldesi için uygun çiçek boyunun belirlenmesi

Literatürdeki bilgilere ek olarak, tek çekirdekli evredeki mikrosporların bulunduğu anterlerin hangi boydaki tomurcuklarda bulunduğunu ve bu tomurcukların hangi büyüklükteki kapitulumlarda mevcut olduğunu belirlemek için bazı incelemeler yapılmıştır. Bu incelemelerde 3, 4, 5 ve 6 cm çapındaki kapitulumlar ayrı gruplar halinde toplanarak laboratuvara getirilmiş ve içlerinden 3, 4, 5 ve 6 mm boyundaki çiçek tomurcukları izole edilmiştir. Bu tomurcuklardan, bistüri ve iğne yardımı ile stereo mikroskop altında çıkarılan anterler aşağıdaki metoda göre boyanarak Olympus marka fotomikroskopta incelenmiş ve mikrosporlar fotoğraflanmıştır. Aynı zamanda mikrosporların boyları ölçülmüştür. Her bir çiçek tomurcuğundan üç anter incelenmiştir.

Aseto-karmin ezme metodu;

- Anterler 1 N HCl'de 60 °C'lik etüvde 10 dk. hidroliz edildi

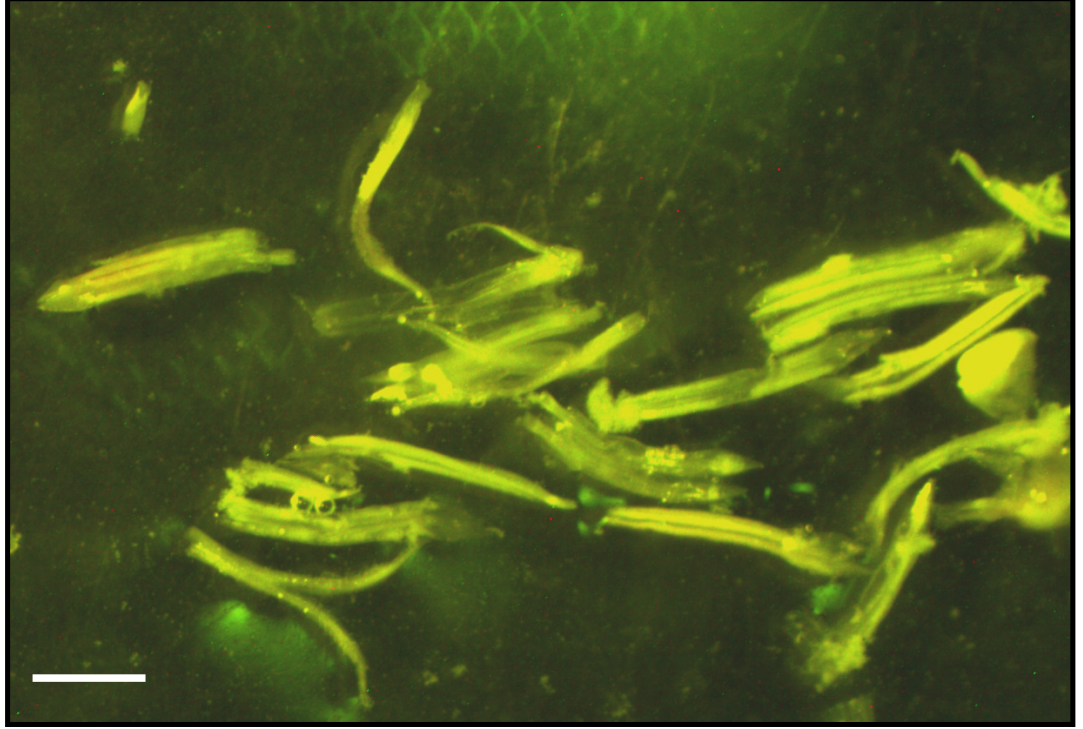
- Anterler distile su ile yıkanarak lam üzerine alındı
- Jilet yardımı ile bir miktar parçalanan anterlerin üzerine bir damla % 1'lik aseto-karmin damlatıldı
- Üzerlerine lamel kapatılarak lam ve lamel arasında ezildi
- Daimi hale getirilmeden mikroskopta incelendi

3.2.3. Kapituluların sterilizasyonu ve anter izolasyonu

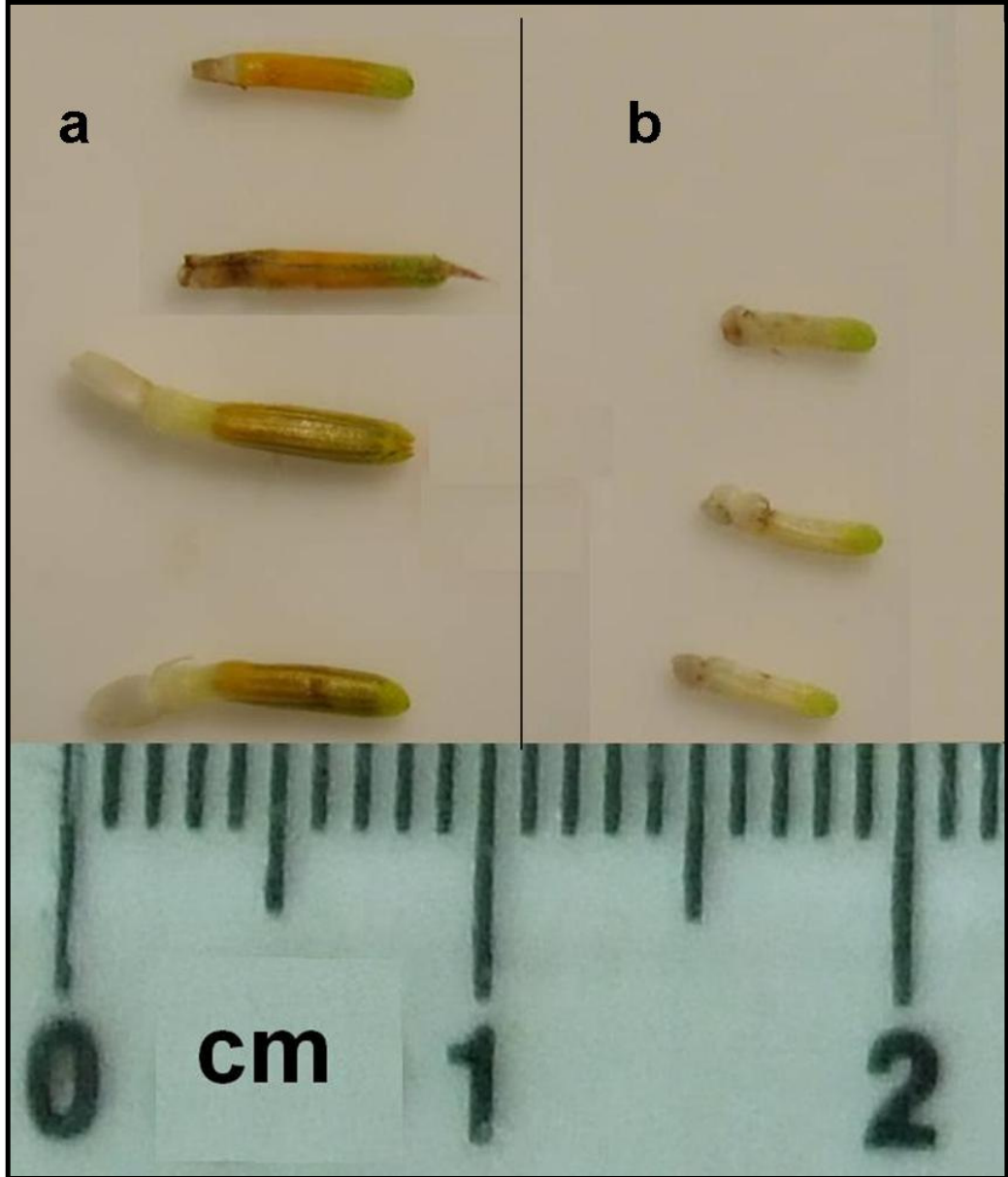
Yapılan incelemeler sayesinde tek çekirdekli mikrosporların bulunduğu uygun anterleri içeren tomurcukların 3-4 cm'lik çapa sahip olan kapitulularda daha fazla bulunduğu tespit edilmiş ve çalışmada bu boydakiler kullanılmıştır (Şekil 3.3). Kapitulular steril gazlı bezlere sarılarak steril cam bir huni içerisinde bir saat süre ile musluk suyu altında bekletilmiştir. Bunu takiben dış yüzeyindeki braktelerin uçları kesilerek (Şekil 3.3), steril kabinde %15'lik ticari Domestos çamaşır suyunda 20 dk. süre ile bekletilmiştir. Kapituluların içinde bulunduğu beherler sık sık çalkalanarak çamaşır suyunun iyice nüfuz etmesi sağlanmıştır. Ardından farklı bir steril beher içinde üç defa steril distile su ile yıkanan kapitulular, % 70'lik alkol çözeltisinde 2 dk. süre ile çalkalanmıştır. Son olarak tekrar üç defa steril distile su ile durulanan kapitulular anter izolasyonu için hazırlanmıştır. Steril kapitululardan stereo mikroskop altında çiçek tomurcukları izole edilmiştir. Henüz açılmamış, rengi sarıya dönmemiş ve 3-4 mm boyundaki çiçek tomurcukları (Şekil 3.5) bistüri ile kesilerek ayrılmıştır. Sarı renkli tomurcuklar polenlerin olgunlaşmış olması dolayısıyla çalışmada kullanılmaya uygun görülmemiştir. Kapituludan ayrılan çiçek tomurcukları steril iğne ve bistüri yardımı ile yine stereo mikroskop altında açılarak stamenler çıkarılmış ve anterler filament kısımlarından arındırılarak izole edilmiştir (Şekil 3.4). Bu anterler hiç bekletilmeden besi yeri üzerine aktarılmıştır.



Şekil 3.3: Çalışmada kullanılan kapitulular. Solda 4 cm çapında ve brakte uçları kesilmemiş, sağda ise 3 cm çapında ve brakte uçları kesilmiş ayçiçeği kapituluları.



Şekil 3.4: Stereo mikroskop altındaki ayçiçeği anterleri (Bar =1mm)



Şekil 3.5: Ayçiçeğinin açmamış tüp çiçek tomurcukları. (a) 5-6 mm boyundaki rengi sarıya dönmüş tomurcuklar, (b) 3-4 mm boyundaki yeşilimsi beyaz renkli tomurcuklar.

3.2.4. Besi yerlerinin ve stok solüsyonların hazırlığı ve sterilizasyonu

Bu çalışmada kullanılan stok solüsyonlar hazırlandıktan sonra en çok 15 gün boyunca kullanılmış sonra tekrar tazelenmiştir. Besi yerlerinin pH'ını ayarlamak için kullanılan NaOH (Sodyum hidroksit) 1 N olarak 50 ml hazırlanmıştır. HCl (Hidroklorik asit) ise % 10'luk çözelti halinde 50 ml hazırlanmıştır. pH metrenin kalibrasyonu için pH 4 ve pH 7 bufferleri 50 ml olarak hazırlanmıştır. Her çalışmadan önce pH metrenin kalibrasyonu yapılmıştır. Besi yerinde kullanılan hormonlar (NAA ve BA) 1 mg/ml'lik stoklar halinde hazırlanmıştır.

Araştırmada katı MS (Murashige ve Skoog 1962) temel besi yeri kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Özellikle bu besi yerinin seçilme sebebi literatürde ayçiçeğinin anter kültürü çalışmalarında en verimli besi yeri olmasındandır (Thengane vd. 1994, Saji ve Sujatha 1998, Vijaya Priya vd. 2003). Ayrıca ön denemelerde bu durum tespit edilmiştir. MS besin çözeltisine sükröz (30 g/l) eklendikten sonra bitki büyüme düzenleyicilerinin değişik kombinasyonları ile desteklenmiştir (0, 0.5, 1, 2 mg/l NAA ve/veya 0, 0.5, 1, 2 mg/l BA). Ortamın pH'sı NaOH ve HCl kullanılarak 5.8'e ayarlanmış ve ardından agar (7 g/l) eklenmiştir. Daha sonra besi yerleri 1 atmosfer basınçta ve 121 °C'de 15 dk. süre ile otoklavlanmıştır.

Çizelge 3.1: Bu çalışmada kullanılan MS (Murashige Ve Skoog 1962) temel besin ortamı içeriği

Makro Elementler	mg/l
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Vitaminler	
Pyrodoxine HCl	0.5
Glycine	2.0
Nicotinic Acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Myo-inositol	100
Karbonhidratlar	
Sükroz	30 000

3.2.5. Anter kültürü başlangıç ortamlarının hazırlanması ve inkübasyonu

Yukarıda tarif edildiği şekilde izole edilen anterler temel MS ortamına aktarılmıştır. Bu amaçla bitki büyüme düzenleyiciler 16 farklı kombinasyonda ortamlara eklenmiştir (Çizelge 3.2). Toplamda her kombinasyondan 24'er petri (90 mm çaplı) hazırlanmış ve her petriye 35 ml besi yeri dökülmüştür. 16 kombinasyon bulunduğu için toplamda 16x24=384 petri hazırlanmıştır. Her bir petriye 15'er adet anter transfer edilmiş ve petrilerin etrafı parafilm ile kapatılmıştır. Denemeler 2010 ve 2011 yıllarında birer kez tekrarlanmıştır. Denemelerde iki farklı genotip ve iki farklı ışık uygulaması mevcuttur. Her iki genotipe ait anterlerin yarısı sürekli karanlıkta

(alüminyum folyo ile petriler kapatılmıştır) yarısı ise 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyot koşullarında inkübe edilmiştir. Denemede kullanılan toplam anter sayıları, genotip çeşidi ve ışıklandırma durumu Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Anter kültürü başlangıcı için hazırlanan ortamlara alınan anterler, aynı besin ortamında iki haftada bir alt kültüre alınmış ve 6 hafta süre ile inkübe edilmiştir. Direk embriyo oluşturan anter sayısı, kallus (embriyojenik veya nonembriyojenik) oluşturan anter sayısı, embriyojenik kallus oluşturan anter sayısı, kararına gözlenen anter sayısı altı hafta boyunca her hafta kaydedilmiştir.

Çizelge 3.2: Kullanılan besi yeri kombinasyonları

Besi yeri kodu	BA miktarı	NAA miktarı	Oksin/Sitokinin Oranı
A1	0	0	-
A2	0.5 mg/l	0	-
A3	1 mg/l	0	-
A4	2 mg/l	0	-
A5	0	0.5 mg/l	-
A6	0.5 mg/l	0.5 mg/l	1
A7	1 mg/l	0.5 mg/l	1/2
A8	2 mg/l	0.5 mg/l	1/4
A9	0	1 mg/l	-
A10	0.5 mg/l	1 mg/l	2
A11	1 mg/l	1 mg/l	1
A12	2 mg/l	1 mg/l	1/2
A13	0	2 mg/l	-
A14	0.5 mg/l	2 mg/l	4
A15	1 mg/l	2 mg/l	2
A16	2 mg/l	2 mg/l	1

Çizelge 3.3: Anter başlangıç kültüründe kullanılan genotip, ışık ve hormon kombinasyonları ile toplam anter sayıları

Genotip çeşidi	Işık uygulaması	Besin ortamı çeşidi	Toplam petri sayısı	Toplam anter sayısı
G1 (K3R-SN:10/2010)	Karanlık	16 hormon	3x2x16=96	96x15=1440
G2 (K3R-SN:4/2010)	Karanlık	kombinasyonu	3x2x16=96	96x15=1440
G1 (K3R-SN:10/2010)	Fotoperiyot	içeren besi	3x2x16=96	96x15=1440
G2 (K3R-SN:4/2010)	Fotoperiyot	ortamlarının her birinden 3x2 (tekrar sayısı) adet petri kullanılmıştır	3x2x16=96	96x15=1440
Toplam			384	5760

3.2.6. PVP (Polivinilpirolidon) muamelesi

Kültür süresince eksplantlarda meydana gelen kahverengileşme üzerindeki etkisini ölçmek üzere bir anti-oksidan olan PVP ile de denemeler kurulmuştur. Anter başlangıç ortamlarında en iyi sonucu veren hormon kombinasyonu (1 mg/l BA, 2 mg/l NAA) seçilerek bu çalışmada sadece o kullanılmıştır. MS besi yerine hormonlar ve sükroz (30 g/l) eklenmiş, pH 5.8'e ayarlanmış ve ardından agar (7 g/l) ile PVP'nin değişik konsantrasyonları (0, % 0.1, % 0.5 ve %1) eklenerek yukarıda tarif edildiği gibi otoklav ile steril edilmiştir. Hazırlanan besi yerleri petri kaplarına 35'er ml dökülmüştür. Her petri kabına 15 anter konulmuş ve her deneme için 2 petri kullanılmıştır. Deneme iki kez tekrar edilmiştir. Kültürler iklim odasında inkübasyona alınmıştır. Her uygulama için kullanılan genotip çeşidi, ışıklandırma durumu, PVP konsantrasyonu, hormon içeriği, kullanılan petri ve anter sayısı Çizelge 3.4'te verilmiştir.

İki hafta da bir anterler aynı ortamlarında alt kültüre alınmış ve 6 hafta süre ile inkübasyon ortamında tutulmuştur. Haftalık olarak besi yerlerinde kallus oluşturan ve kararlı anterler kaydedilmiştir.

Çizelge 3.4: PVP muamelesi uygulama şekli

Uygulama kodu	Genotip çeşidi	Işık	Hormon çeşidi ve miktarı	PVP konst.%	Petri sayısı	Anter sayısı
P1	G1	Fotoperiyot		0	2x2=4	4x15=60
P2	G1	Karanlık		0	2x2=4	4x15=60
P3	G2	Fotoperiyot		0	2x2=4	4x15=60
P4	G2	Karanlık		0	2x2=4	4x15=60
P5	G1	Fotoperiyot		0,1	2x2=4	4x15=60
P6	G1	Karanlık		0,1	2x2=4	4x15=60
P7	G2	Fotoperiyot		0,1	2x2=4	4x15=60
P8	G2	Karanlık	2mg/l NAA	0,1	2x2=4	4x15=60
P9	G1	Fotoperiyot	1mg/l BA	0,5	2x2=4	4x15=60
P10	G1	Karanlık		0,5	2x2=4	4x15=60
P11	G2	Fotoperiyot		0,5	2x2=4	4x15=60
P12	G2	Karanlık		0,5	2x2=4	4x15=60
P13	G1	Fotoperiyot		1	2x2=4	4x15=60
P14	G1	Karanlık		1	2x2=4	4x15=60
P15	G2	Fotoperiyot		1	2x2=4	4x15=60
P16	G2	Karanlık		1	2x2=4	4x15=60
Toplam					64	960

3.2.7. Kolşisin muamelesi

Bu denemede MS temel besi yeri kullanılmıştır. Gerekli hormonlar besi yerine eklendikten sonra önce sükröz (30 g/l) daha sonrada aşağıda miktarları verildiği şekli ile kolşisin eklenmiştir. pH 5.8'e ayarlandıktan sonra agar (4 g/l) eklenmiş ve daha önce anlatılan koşullarda otoklavlanmıştır.

Kolşisin uygulaması iki aşamada yapılmıştır. İlkinde anterler doğrudan değişik konsantrasyonlarda (0, 0.1, 0.2 g/l) kolşisin içeren ve 2mg/l NAA, 1mg/l BA ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmış ve 3 gün süre ile bu ortamda inkübe edilmiştir. Ardından kolşisin içermeyen ve yukarıdaki hormonları ihtiva eden ortama alınarak 6 hafta kültüre edilmiştir. Her uygulama için 3 petri kullanılmış ve her petri kabına 15'er anter konulmuştur. Deneme iki kez tekrar edilmiştir. Anterler iki haftada bir aynı ortamda alt kültüre alınmış ve haftalık olarak kallus oluşturan, embriyo oluşturan ve kararan anter sayıları kaydedilmiştir. Bu denemede yalnızca fotoperiyot uygulaması yapılmıştır. Her uygulama için kullanılan genotip çeşidi, ışıklandırma durumu,

kolşisin konsantrasyonu, hormon içeriği, kullanılan petri ve anter sayısı Çizelge 3.5'te verilmiştir.

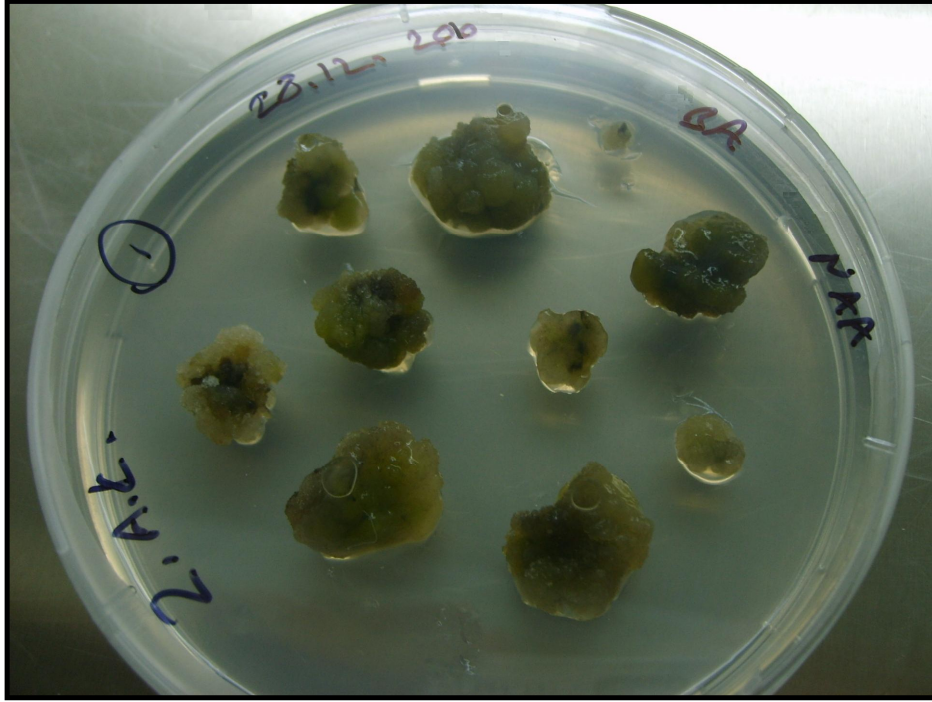
Çizelge 3.5: Anterlere kolşisin muamelesi uygulama şekli

Uygulama kodu	Genotip çeşidi	Işık	Hormon çeşidi ve miktarı	Kolşisin konst. g/l	Petri sayısı	Anter sayısı		
K1	G1			0	3x2=6	6x15=90		
K2	G2			0	3x2=6	6x15=90		
K3	G1	Fotoperiyot	2mg/l NAA 1mg/l BA	0.1	3x2=6	6x15=90		
K4	G2			0.1	3x2=6	6x15=90		
K5	G1			0.2	3x2=6	6x15=90		
K6	G2			0.2	3x2=6	6x15=90		
Toplam							36	540

İkinci aşamada ise anter başlangıç kültüründe elde edilen 6 haftalık kalluslara hangi ortamda oluştuğuna bakılmaksızın kolşisin uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.6). Anterlere kolşisin uygulamasında bahsedildiği şekli ile aynı ortamlarda ve aynı kolşisin konsantrasyonlarında 3 gün süre ile bekletilen kalluslar daha sonra rejenerasyon denemesine alınmıştır. Her uygulamadan bir miktar kallus ise sitolojik incelemeler için ayrılmıştır. Her uygulama için kullanılan genotip çeşidi, ışıklandırma durumu, kolşisin konsantrasyonu, hormon içeriği, kullanılan petri ve kallus sayısı Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6: Kalluslara kolşisin muamelesi uygulama şekli

Uygulama kodu	Genotip çeşidi	Işık	Hormon çeşidi ve miktarı	Kolşisin Kons. g/l	Petri sayısı	Kallus sayısı		
KK1	G1			0	3	3x15=45		
KK2	G2			0	3	3x15=45		
KK3	G1	Fotoperiyot	2mg/l NAA 1mg/l BA	0.1	3	3x15=45		
KK4	G2			0.1	3	3x15=45		
KK5	G1			0,2	3	3x15=45		
KK6	G2			0,2	3	3x15=45		
Toplam							18	270



Şekil 3.6: Kolşisin muamelesine alınan kalluslar

3.2.8. Rejenerasyon ortamlarının hazırlanması

Yukarıda anlatılan tüm denemelerden elde edilmiş kalluslardan tam bir bitkiye ulaşmak için rejenerasyon ortamları hazırlanmış ve elde edilen tüm yapılar bu ortamlara aktarılmıştır. Öncelikle 0.5 BA ve 0.1 NAA içeren MS ortama aktarılan tüm kalluslar bu ortamda ve fotoperiyotta (hem karanlık hem fotoperiyot uygulamasından elde edilen kalluslar) iki hafta bekletilmiş ve ardından yalnızca sitokinin (0.5, 1 veya 2 mg/l BA) veya sitokinine ek olarak 0.1 mg/l NAA içeren MS besi ortamlarına aktarılmıştır. Rejenerasyon ortamlarında agar konsantrasyonu 4 g/l olarak kullanılmıştır. Her bir uygulama için iki petri kabı kullanılmış ve her petriye 15 kallus konulmuştur. Kullanılan genotip çeşidi, hormon miktarı, eksplant tipi ve sayısını Çizelge 3.7’de görebilirsiniz.

Çizelge 3.7: Kallus eksplantlarının rejenerasyon için yapılan uygulamalar

Uygulama kodu	BA mg/l	NAA mg/l	Genotip	Eksplant tipi	Petri sayısı	Kallus sayısı
R1	0.5	0	G1		2	2x15=30
R2	0.5	0.1	G1		2	2x15=30
R3	0.5	0	G2		2	2x15=30
R4	0.5	0.1	G2		2	2x15=30
R5	1	0	G1		2	2x15=30
R6	1	0.1	G1	Kallus	2	2x15=30
R7	1	0	G2		2	2x15=30
R8	1	0.1	G2		2	2x15=30
R9	2	0	G1		2	2x15=30
R10	2	0.1	G1		2	2x15=30
R11	2	0	G2		2	2x15=30
R12	2	0.1	G2		2	2x15=30
Toplam					24	360

3.2.9. Kültür ortamı koşulları

Ayçiçeği tohumlarının çimlenmesi ve yapılan tüm kültürlerin inkübasyonu, Havsa Meslek Yüksek Okulu doku kültürü laboratuvarındaki iklim odasında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7). Soğuk floresan lambalar ile aydınlatılan iklim odasında ortalama nem % 60 civarındadır. Sıcaklık ise tüm uygulamalarda 25 ± 2 °C olarak ayarlanmıştır. Karanlık uygulaması yapılacak olan petri kapları alüminyum folyo ile sarılarak ışık alması engellenmiş (Şekil 3.8), gözlem yapılacağı zaman loş ışığa sahip bir odada folyolar açılarak kısa sürede tekrar geri kapatılmıştır. Fotoperiyot uygulamasında ise kültürler 16 saat aydınlık (2000-2200 lux), 8 saat karanlıkta tutulmuştur.



Şekil 3.7: iklim odası genel görünüşü



Şekil 3.8: Karanlık uygulamasındaki kültürler

3.2.10. Sitolojik incelemeler ve ploidi seviyesi tespiti

Elde edilen kalluslardan bir kısmı hücrelerin ploidi seviyelerini belirlemek amacıyla sitolojik incelemeler için ayrılmıştır. Sitolojik incelemeye alınan kalluslar, genotip çeşidine göre, karanlık ya da ışıktaki oluşmuş olmasına göre veya kolşisin uygulanıp uygulanmamış olmasına göre gruplandırılmıştır. Boyama işleminden 5 gün önce kalluslar birkaç parçaya bölünerek taze besi ortamına (2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren temel MS ortamı) aktarılmış ve kallus gelişimi hızlandırılmış, böylece bölünen hücre sayısı arttırılmaya çalışılmıştır. Beş günün sonunda çoğunlukla kallusların kesim yüzeyinde oluşan yeni kallus dokuları denemelerde kullanılmıştır. Boyama yöntemi olarak aşağıdaki yol izlenmiştir;

- kalluslar 1-2 mm boylarında küçük parçalara ayrıldı
- 1 N HCl'de 60 °C'lik etüvde 10 dk. hidroliz edildi
- distile su ile yıkanarak lam üzerine alındı
- Jilet yardımı ile bir miktar parçalanan kallusların üzerine bir damla % 1'lik aseto-karmin damlatıldı
- Üzerlerine lamel kapatılarak lam ve lamel arasında ezildi
- Daimi hale getirilmeden mikroskopta incelendi ve fotoğraflandı

3.2.11. İstatistik analizler

Anter kültürü başlangıç uygulamasında iki farklı genotip, iki farklı ışıklandırma, dört farklı NAA ve dört farklı BA'nın tüm kombinasyonları kullanılmış ve $2 \times 2 \times 4 \times 4 = 64$ farklı uygulama grubu ortaya çıkmıştır. Deneyin sonunda bu her grubun içindeki;

- oluşan kallus (Embriyojenik veya nonembriyojenik) / anter oranı, (TK/A)
- oluşan embriyojenik kallus / anter oranı (EK/A)
- direk embriyo oluşturan anter / toplam anter oranı (DE/A)
- kararlı anter / anter oranı (K/A)

kaydedilmiş ve SPSS 15 Paket programında ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Ardından tüm grupların ortalamaları arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi ile test edilmiştir. Bu testte farklar, 0,05 önem düzeyinde Tukey testi ile karşılaştırılmıştır.

PVP uygulamasında iki farklı genotip, iki farklı ışıklandırma, dört farklı PVP'nin tüm kombinasyonları kullanılmış ve $2 \times 2 \times 4 = 16$ farklı uygulama grubu ortaya çıkmıştır. Deneyin sonunda bu her grubun içindeki oluşan kallus ve kararan anter sayılarının ortalamaları kaydedilmiş yukarıda anlatıldığı haliyle istatistik analize tabi tutulmuştur.

Anterlere ve kalluslara kolşisin muamelesinde ise genotip (2) ve kolşisinin değişik konsantrasyonları (3), $2 \times 3 = 6$ değişik kombinasyon oluşturmuş ve deneme sonunda anterden oluşan kallus sayıları ile kararan anter ve kahverengileşen kallus sayılarının, SPSS 15 Paket programında ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Ardından tüm grupların ortalamaları arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi ile test edilmiştir. Bu testte farklar, 0,05 önem düzeyinde Tukey ve Duncan testleri ile karşılaştırılmıştır.

Rejenerasyon denemesinde, kahverengileşen kallusların kullanılan kalluslara oranı, ve deneme sonunda kallus başına ortalama ağırlık artışı yüzdesi yukarıda anlatıldığı şekliyle istatistik analize tabi tutulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Donör Bitkilerin Çimlenme ve Gelişmesi

2010 ve 2011 nisan, mayıs, haziran ve temmuz aylarında 28 gözlü viyollerde, torf içerisine ekilen tohumların hemen hemen tamamı (%98) 4 gün içinde çimlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1: Ayçiçeği tohumlarının çimlenme sonuçları

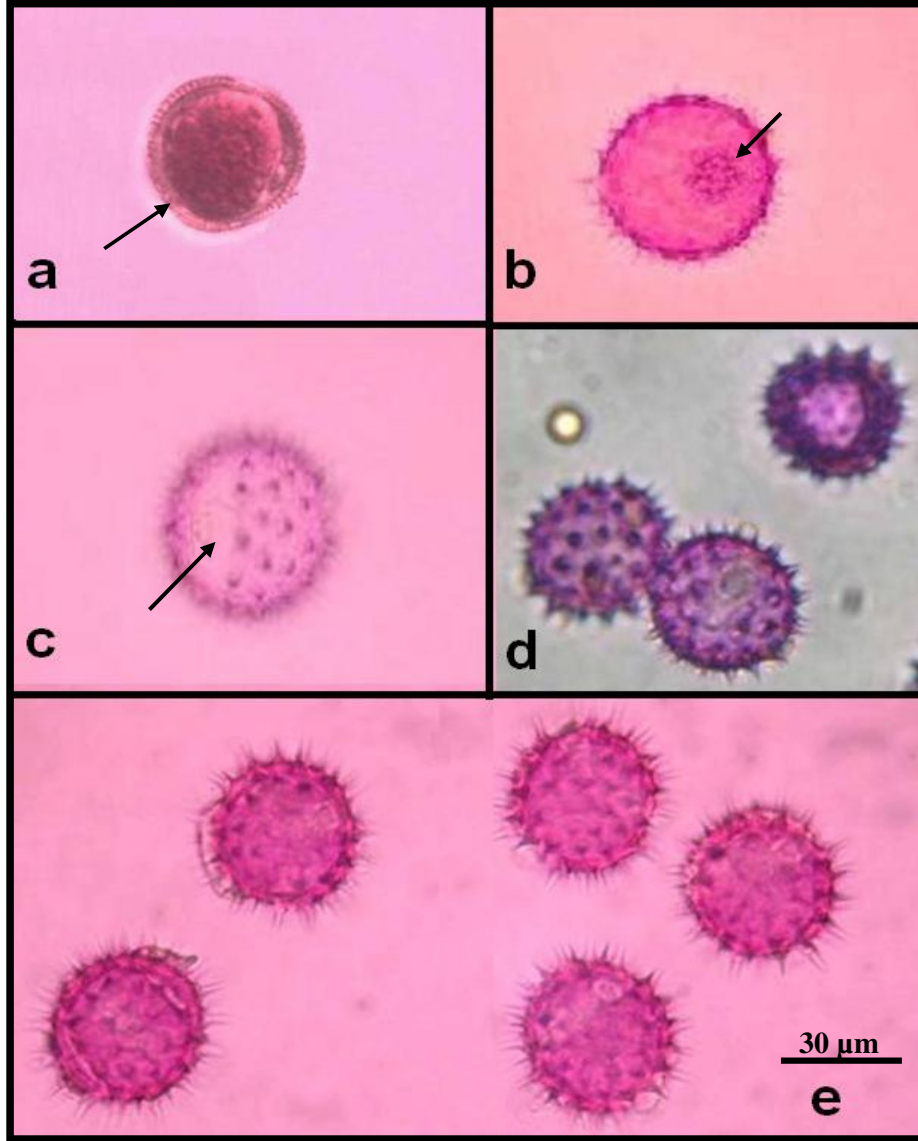
Genotip çeşidi	Ekim zamanı	Ekilen Tohum sayısı	Çimlenen tohum sayısı
G1	Nisan 2010	28	28
G1	Mayıs 2010	28	28
G1	Haziran 2010	28	27
G1	Temmuz 2010	28	28
G2	Nisan 2010	28	27
G2	Mayıs 2010	28	28
G2	Haziran 2010	28	28
G2	Temmuz 2010	28	27
G1	Nisan 2011	28	26
G1	Mayıs 2011	28	27
G1	Haziran 2011	28	28
G1	Temmuz 2011	28	28
G2	Nisan 2011	28	28
G2	Mayıs 2011	28	27
G2	Haziran 2011	28	27
G2	Temmuz 2011	28	28
Toplam		448	440

Çimlenmeyi takiben fideler viyoller ile birlikte sera ortamına alınmış ve 2. hafta 15 cm boya ulaşmışlardır. Bu aşamadan sonra 35 cm aralıklar ile toprağa ekilen fideler çimlenmeyi takiben 25. günde ortalama 35 cm boya ulaşmışlardır. Ortalama 60. günde

ise çiçeklenme başlamış ve uygun kapitulumlar 65-70 günlük bitkilerden temin edilmiştir. Bu süre içerisinde bitkilerde herhangi bir hastalık gözlenmemiştir.

4.2. Uygun Kapitulum ve Tomurcuk Büyüklüğünün Tespiti

Bu bölümde ise önce tek çekirdekli mikrosporların hangi boydaki çiçeklerde bulunduğu tespit edilmiştir. Bu amaçla 3, 4, 5 ve 6 cm boyundaki kapitulumlar (Şekil 4.2) ayrı gruplar halinde toplanarak laboratuvara getirilmiş ve içlerinden 3, 4, 5 ve 6 mm boyundaki çiçek tomurcukları çıkarılarak ayrı ayrı incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucu 3 ve 4 mm boyundaki çiçek tomurcuklarının tek çekirdekli evredeki uygun mikrosporları taşıdığı görülmüştür (Şekil 4.1). Tek çekirdekli mikrosporların ortalama çapı 36 μm 'dir.



Şekil 4.1: Ayçiçeği mikrospor ve polenleri. a) 3 mm'lik tomurcuktan (ekzin süsleri henüz belirgin değil, erken tek çekirdekli evre), b-c) 4 mm'lik tomurcuktan (ekzin süsleri gelişmeye başlamış, geç tek çekirdekli evre, oklar çekirdek ve poru göstermektedir), d) 5 mm'lik tomurcuktan e) 6 mm'lik tomurcuktan.



Şekil 4.2: Ayçiçeği kapitulumları

Uygun çiçek tomurcuğu boyunun tespitinden sonra bu çiçeklerin hangi büyüklükteki kapitulumlarda daha yoğun olduğu araştırılmıştır. Gözlendiği üzere tüp çiçekler kapitulum çevresinden olgunlaşmaya başlamakta ve merkeze doğru devam etmektedir. Henüz açmamış halde bulunan tüm boylardaki kapitulumların, hemen her evredeki çiçek tomurcuklarını bulundurduğu görülmüştür. Ancak 3 ve 4 cm çapa sahip kapitulumların daha fazla 3-4 mm boyunda tomurcuk içerdiği gözlenmiştir. 5 cm ve üzeri çapa sahip olan kapitulumlardaki çiçek tomurcuklarının çoğunda anterlerin sarı renge dönmüş olduğu ve uygun mikrosporları bulundurmadığı gözlenmiştir.

4.3. Anterden Androgenesis Uyarım Sonuçları

Genotip, ışıklandırma, NAA ve BA'nın anterden androgenesis uyarımı üzerine etkisinin araştırıldığı denemede elde edilen ortalama veriler ve bu veriler arasındaki $P < 0.05$ düzeyde önemli farklılıklar Çizelge 4.2'de verilmiştir. Tüm grupların ortalamaları birbiri ile tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmış ve $P < 0.05$ düzeyde farklı olan ortalamalar üstel harfler ile işaretlenmiştir. Elde edilen bulguların

değerlendirilmesi sonucunda, gerek toplam kallus oluşumu ve gerekse embriyojenik kallus oluşumu için her iki genotipte de 2 mg/l ve 1 mg/l BA ile desteklenmiş MS temel ortamının en başarılı sonuçları verdiği söylenebilir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6).

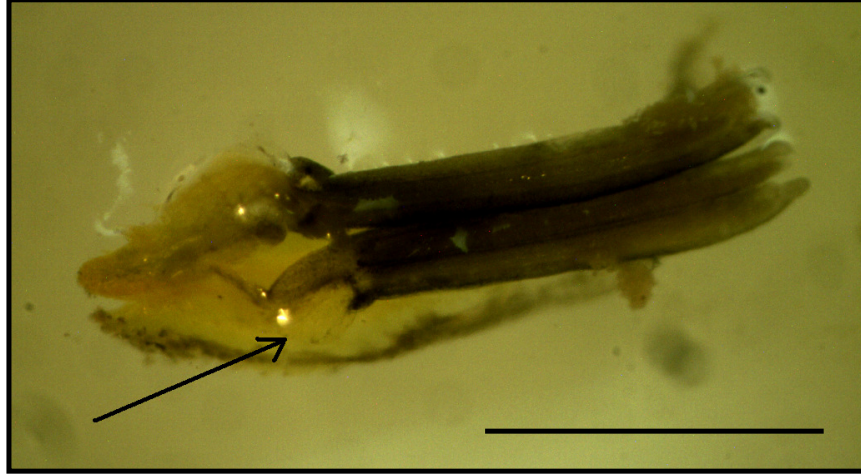
Çizelge 4.2: Genotip, ışıklandırma ve hormonların kallus, embriyojenik kallus, direk embriyo oluşumu ve kararma üzerine etkisi. Aynı sütundaki üstel harflerden en az biri aynı ise bu, ortalamalar arasındaki farkın Tukey testine göre 0,05 önem düzeyinde anlamsız olduğunu gösterir. (**TK/A**=oluşan kallus (Embriyojenik veya nonembriyojenik) / anter oranı, **EK/A**=oluşan embriyojenik kallus / anter oranı, **DE/A** direk embriyo oluşturan anter / toplam anter oranı, **K/A** kararan anter / anter oranı).

Genotip	Işıklanma	NAA mg/l	BA mg/l	TK/A %	EK/A %	DE/A %	K/A %
G1	Fotoperiyot	0	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Fotoperiyot	0	0,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Fotoperiyot	0	1	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Fotoperiyot	0	2	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Fotoperiyot	0,5	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Fotoperiyot	0,5	0,5	20 ^{abc}	10 ^{abcd}	7 ^a	80 ^{hij}
G1	Fotoperiyot	0,5	1	40 ^{bcde}	13 ^{abcd}	0 ^a	60 ^{fghi}
G1	Fotoperiyot	0,5	2	53 ^{defgh}	17 ^{abcde}	0 ^a	47 ^{cdefg}
G1	Fotoperiyot	1	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Fotoperiyot	1	0,5	7 ^a	0 ^a	0 ^a	93 ^j
G1	Fotoperiyot	1	1	63 ^{efghi}	10 ^{abcd}	7 ^a	37 ^{bcdef}
G1	Fotoperiyot	1	2	80 ^{ghij}	0 ^a	0 ^a	20 ^{abcd}
G1	Fotoperiyot	2	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Fotoperiyot	2	0,5	100 ^j	30 ^{bcdef}	0 ^a	0 ^a
G1	Fotoperiyot	2	1	100 ^j	47 ^f	7 ^a	0 ^a
G1	Fotoperiyot	2	2	100 ^j	33 ^{cdef}	10 ^a	0 ^a
G1	Karanlık	0	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Karanlık	0	0,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Karanlık	0	1	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Karanlık	0	2	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Karanlık	0,5	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Karanlık	0,5	0,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Karanlık	0,5	1	10 ^{ab}	0 ^a	0 ^a	90 ^{ij}
G1	Karanlık	0,5	2	23 ^{abcd}	0 ^a	0 ^a	77 ^{ghij}
G1	Karanlık	1	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Karanlık	1	0,5	27 ^{abcd}	0 ^a	0 ^a	73 ^{ghij}
G1	Karanlık	1	1	40 ^{bcde}	3 ^{ab}	0 ^a	60 ^{fghi}
G1	Karanlık	1	2	30 ^{abcd}	13 ^{abcd}	0 ^a	70 ^{ghij}
G1	Karanlık	2	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G1	Karanlık	2	0,5	83 ^{hij}	23 ^{abcdef}	0 ^a	17 ^{abc}
G1	Karanlık	2	1	93 ^{ij}	43 ^{ef}	3 ^a	7 ^{ab}

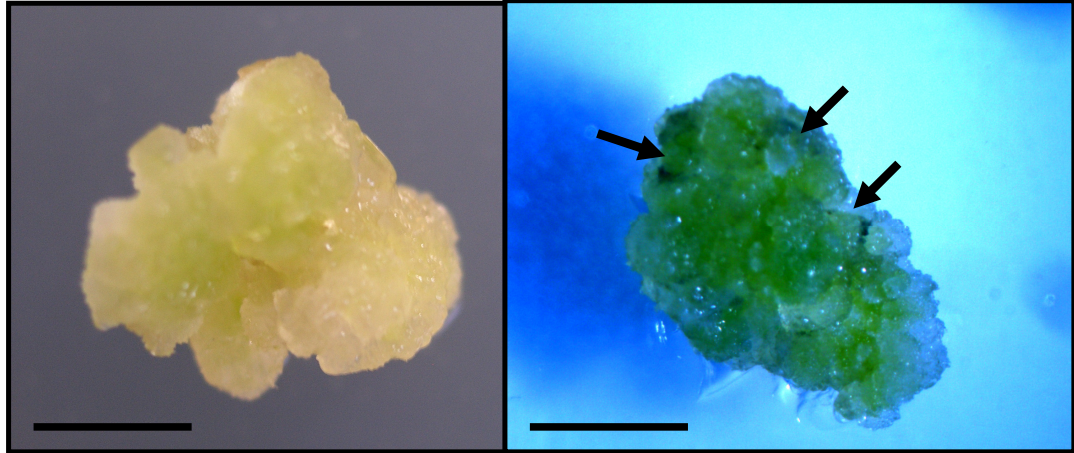
G1	Karanlık	2	2	100 ^j	30 ^{bcdef}	3 ^a	0 ^a
G2	Fotoperiyot	0	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Fotoperiyot	0	0,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Fotoperiyot	0	1	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Fotoperiyot	0	2	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Fotoperiyot	0,5	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Fotoperiyot	0,5	0,5	7 ^a	3 ^{ab}	3 ^a	93 ^j
G2	Fotoperiyot	0,5	1	27 ^{abcd}	10 ^{abcd}	0 ^a	73 ^{ghij}
G2	Fotoperiyot	0,5	2	47 ^{cdef}	17 ^{abcde}	0 ^a	53 ^{efgh}
G2	Fotoperiyot	1	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Fotoperiyot	1	0,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Fotoperiyot	1	1	47 ^{cdef}	7 ^{abc}	7 ^a	53 ^{efgh}
G2	Fotoperiyot	1	2	50 ^{cdefg}	20 ^{abcdef}	0 ^a	50 ^{defgh}
G2	Fotoperiyot	2	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Fotoperiyot	2	0,5	73 ^{ghij}	27 ^{abcdef}	0 ^a	27 ^{abcde}
G2	Fotoperiyot	2	1	87 ^{ij}	37 ^{def}	10 ^a	13 ^{ab}
G2	Fotoperiyot	2	2	77 ^{ghij}	30 ^{bcdef}	3 ^a	23 ^{abcde}
G2	Karanlık	0	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Karanlık	0	0,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Karanlık	0	1	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Karanlık	0	2	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Karanlık	0,5	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Karanlık	0,5	0,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Karanlık	0,5	1	20 ^{abc}	0 ^a	0 ^a	80 ^{hij}
G2	Karanlık	0,5	2	20 ^{abc}	0 ^a	0 ^a	80 ^{hij}
G2	Karanlık	1	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Karanlık	1	0,5	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Karanlık	1	1	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Karanlık	1	2	7 ^a	0 ^a	0 ^a	93 ^j
G2	Karanlık	2	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^j
G2	Karanlık	2	0,5	40 ^{bcde}	10 ^{abcd}	0 ^a	60 ^{fghi}
G2	Karanlık	2	1	90 ^{ij}	43 ^{ef}	0 ^a	10 ^{ab}
G2	Karanlık	2	2	13 ^{ab}	7 ^{abc}	0 ^a	87 ^{ij}

6 hafta süren denemeler sırasında androgenik cevap oluşturan anterlerin 5. günden itibaren genişledikleri ve çatladıkları gözlenmiştir (Şekil 4.3). Bu aşamayı takiben anterlerde iki farklı tepki gözlenmiştir. Bazı anterler 2. haftadan itibaren direk embriyo oluşumu göstermişler (Şekil 4.5) fakat bu oran her iki genotip içinde genelde çok düşük kalmıştır (max. %10). Anterlerin gösterdiği bir başka tepki ise kallus oluşumudur. Elde edilen kallusların bazıları embriyo veya embriyoid benzeri globüler yapılar taşır iken (embriyojenik kallus), bazıları ise düz kallus dokusundan ibaret olmuştur (Şekil 4.4). Bu iki kallus tipi birbirinden ayrılmış ve Çizelge 4.2’de toplam

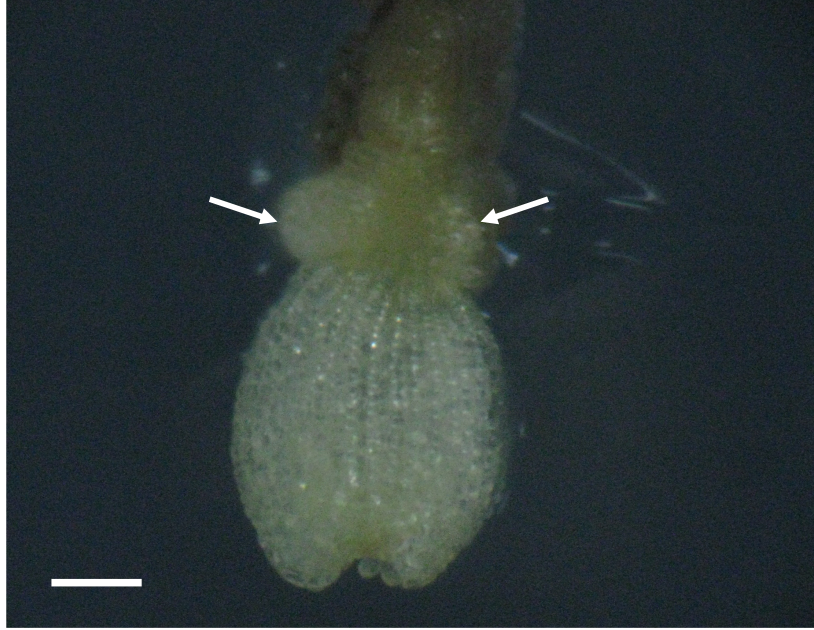
kallus oluşum oranı ile embriyojenik kallus oluşum oranları ayrı ayrı verilmiştir. Oluşan kalluslar fotoperiyot uygulamasında yeşilimsi sarı, karanlık uygulamasında ise sarı renkli olmuştur (Şekil 4.4). Embriyojenik kalluslar sert ve kırılgan yapıda iken nonembriyojenik kalluslar yumuşak dokulu olmuştur.



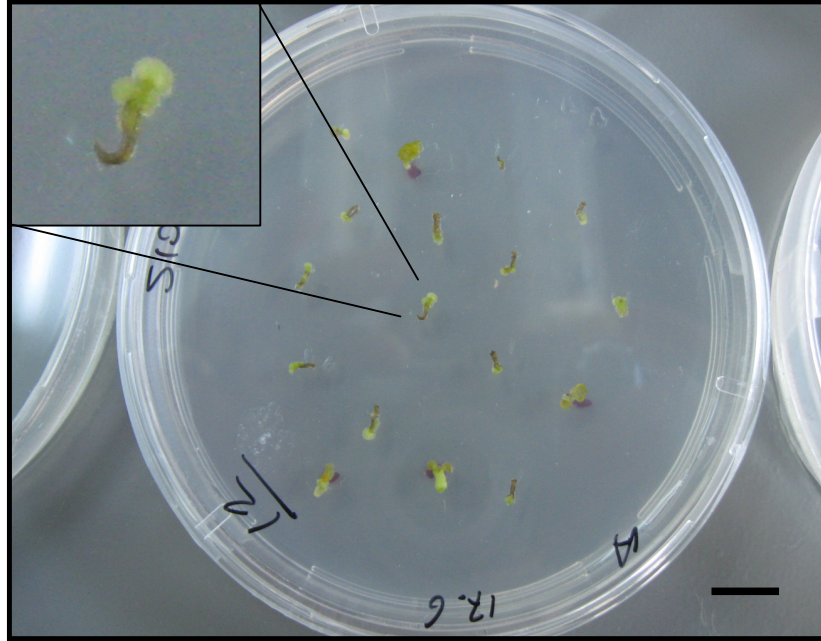
Şekil 4.3: 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren MS k¼lt¼r ortamındaki beş g¼nl¼k anter. Ok ęatlayan anterden kallus dokusunun oluşumunu g¼stermektedir. Bar=1 mm.



Şekil 4.4: 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren MS k¼lt¼r ortamının 6. haftasındaki kalluslar. Solda karanlık ortamda oluşan sarı renkli nonembriyojenik kallus, sağda fotoperiyot altında oluşan yeşilimsi renkli embriyojenik kallus (oklar glob¼ler yapıları g¼stermektedir). Bar =1 cm.



Şekil 4.5: Kültürün 3. haftasındaki kalp şekilli embriyo. Oklar globüler yapıdaki embrioidleri göstermektedir. Bar =0.1 mm.

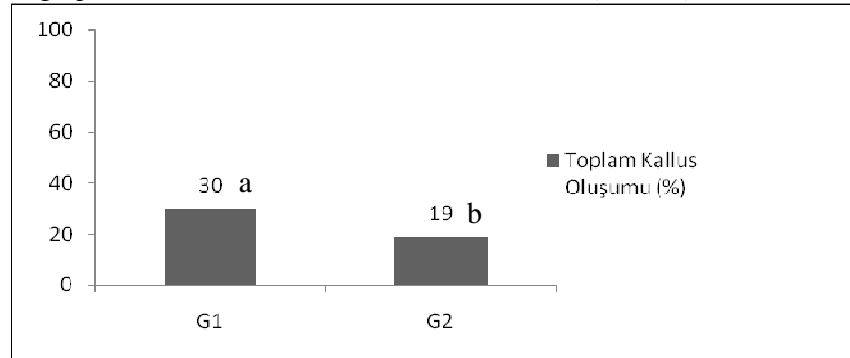


Şekil 4.6: Kültürün 2. haftasında anterlerden kallus oluşumu. 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA ile desteklenmiş temel MS ortamı. Bar = 1 cm.

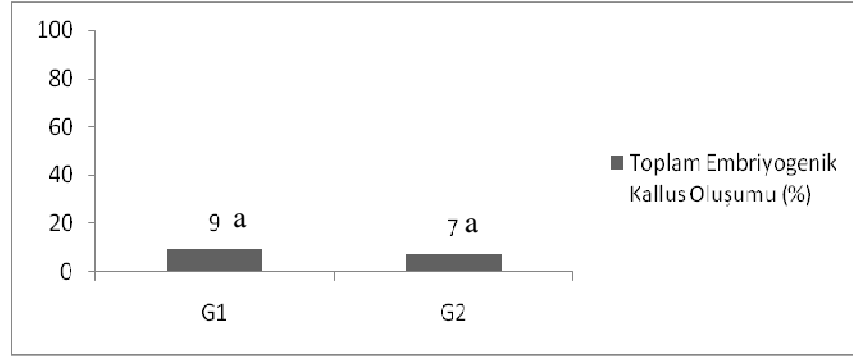
Genotipin etkisi:

Denyde kullanılan tüm anterler üzerine yalnızca genotipin etkisini belirlemek üzere yapılan istatistik analizde dört parametre için değerlendirmeler yapılmıştır. Öncelikle oluşan toplam kallus miktarına genotipin etkisi incelenmiştir (Çizelge 4.3). G1'e ait anterlerin %30'u kallus oluşturmuşken G2'de bu oran %19 olarak gerçekleşmiştir. Bu iki genotipin kallus oluşum oranları arasındaki fark önemli ($P<0.05$) bulunmuştur. Bunun yanında anterlerden embriyojenik kallus oluşumu ve direk embriyo oluşumu G1 için sırasıyla %9 ve %1 iken, G2 için sırasıyla %7 ve %1 olmuştur (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5). Bu karakterler açısından G1 ve G2 arasındaki farklar ise önemli bulunmamıştır ($P<0.05$). Son olarak kültür ortamında kararlan ve hiçbir tepki vermeyen anterlerin oranları açısından G1 ve G2 karşılaştırıldığında sırasıyla % 71 ve %81 oranları elde edilmiştir (Çizelge 4.6). Genotipler arasındaki bu fark önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

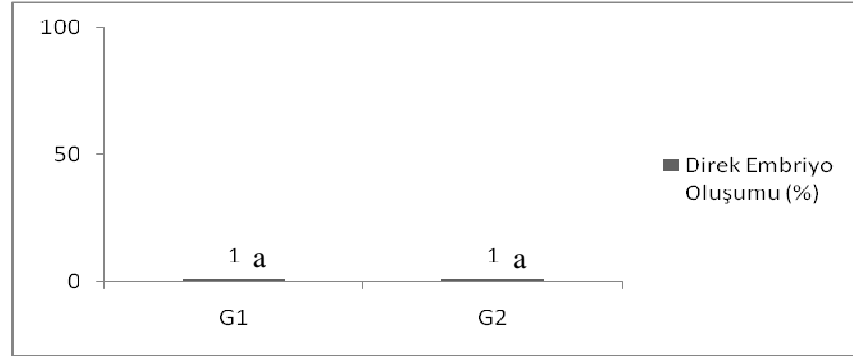
Çizelge 4.3: Genotipin toplam kallus oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



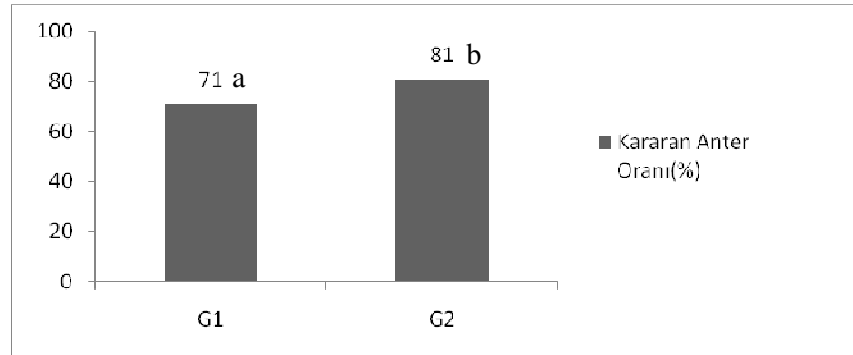
Çizelge 4.4: Genotipin toplam embriyogenik kallus oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P < 0.05$).



Çizelge 4.5: Genotipin direk embriyo oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P < 0.05$).



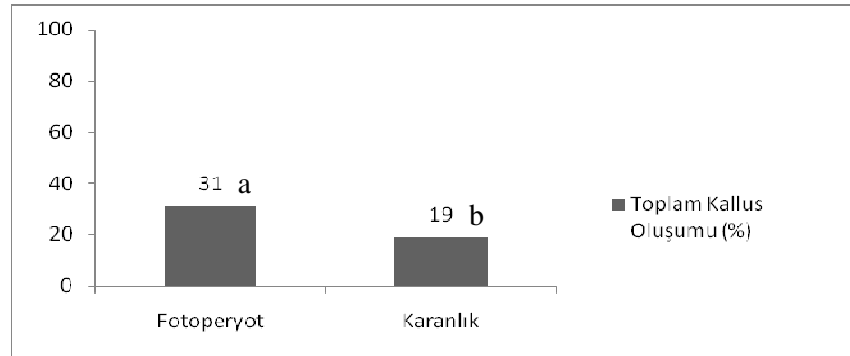
Çizelge 4.6: Genotipin anter kararması üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P < 0.05$).



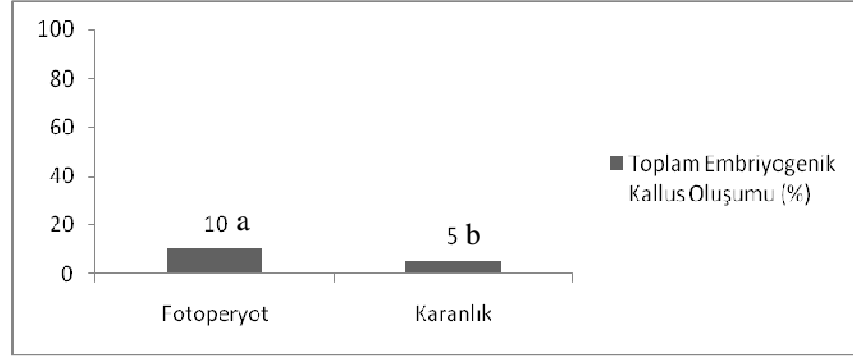
Işığın etkisi:

Anterlerdeki androgenik cevap üzerine ışığın etkisi incelenirken iki farklı ışık seçeneği kullanılmıştır. Anterler 6 hafta boyunca ya sürekli karanlıkta bekletilmiştir ya da 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyot altında tutulmuştur. Işığın toplam kallus oluşumu üzerindeki etkisi Çizelge 4.7’de verilmiştir. Fotoperiyot ortamındaki anterlerin %31’i kallus oluşturmuşken karanlık ortamda bu oran %19’dur. Her iki grup arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Işığın embriyojenik kallus oluşumu üzerindeki etkisinde fotoperiyot uygulaması anterlerin %10’unda, karanlık uygulaması ise %5’inde embriyojenik kallus oluşumuna neden olmuştur (Çizelge 4.8). Bu iki oran arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Benzer şekilde fotoperiyot uygulaması direk embriyo oluşumunda da etkili olmuştur. Direkt embriyo oluşumu oldukça düşük olsa da fotoperiyotta %2 ve karanlıkta %0,2 olarak tespit edilmiş ve bu ikisi arasındaki fark önemli ($P<0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.9). Hiçbir tepki vermeyen ve kararak ölen anterlerin oranları karşılaştırıldığında fotoperiyotta %69 ve karanlıkta %81 olarak bulunmuş (Çizelge 4.10) ve bu iki grup arasındaki fark önemli ($P<0.05$) çıkmıştır. Sonuç olarak fotoperiyot uygulamasının karanlığa kıyasla tüm karakterler açısından daha başarılı olduğu tespit edilmiştir.

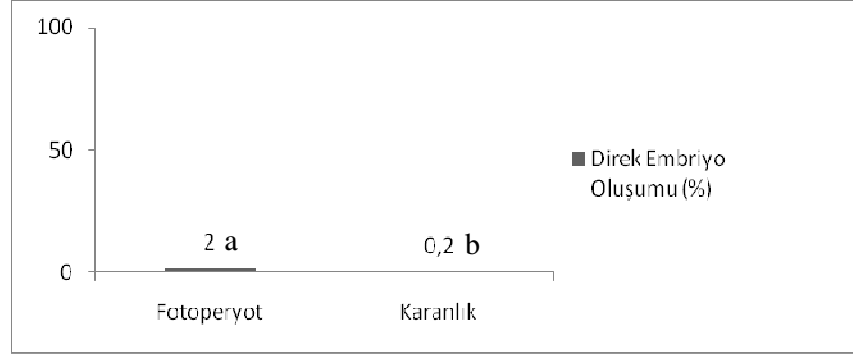
Çizelge 4.7: Işığın toplam kallus oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



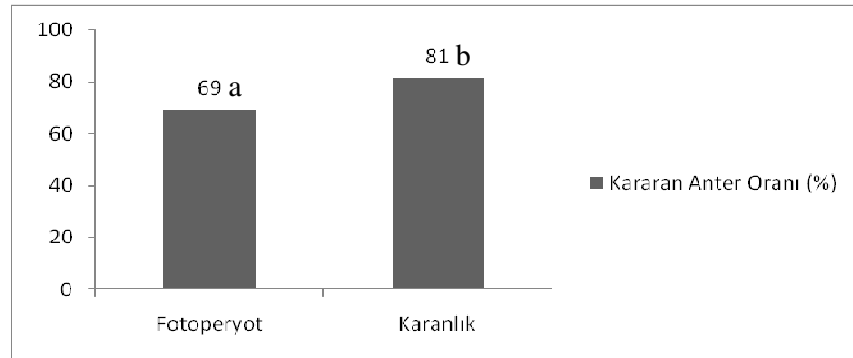
Çizelge 4.8: Işığın toplam embriyogenik kallus oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



Çizelge 4.9: Işığın direk embriyo oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



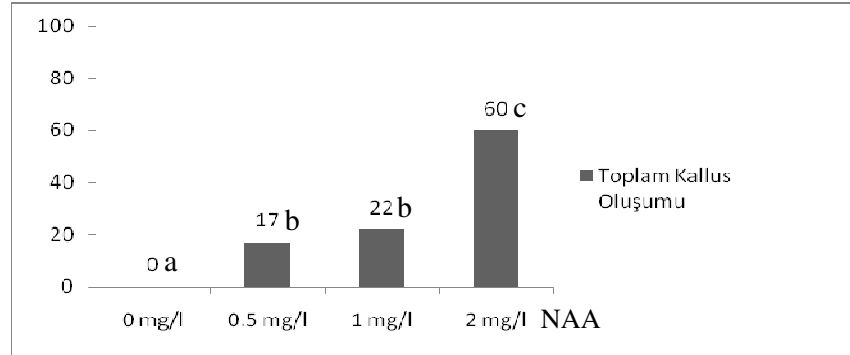
Çizelge 4.10: Işığın anter kararması üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



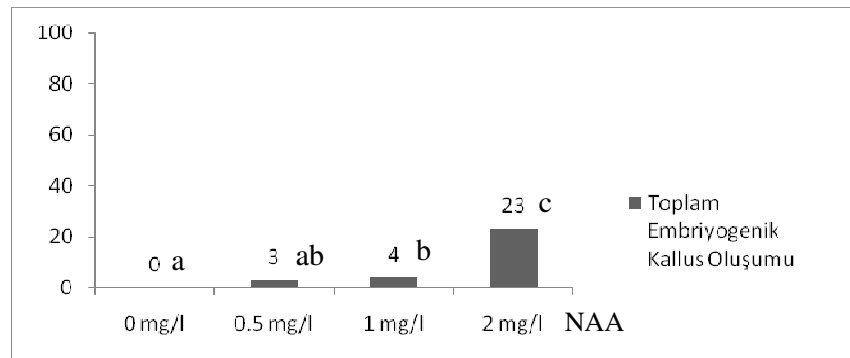
NAA'nın etkisi:

Bir oksin olan naftalen asetik asit (NAA)'in androgenik cevap üzerindeki etkisi incelendiğinde önemli bulgular elde edilmiştir. Öncelikle şunu belirtmek gerekir ki tek başına NAA kullanıldığından hiçbir konsantrasyonda androgenik cevap alınamamış ancak beraberinde bir sitokin olan BA kullanıldığında androgenik cevap oluşmuştur. Yine de İstatistik testler sırasında tüm gruplar üzerinde yalnız NAA'nın etkisi ölçülebilmştir (Çizelge 4.11, 4.12, 4.13, 4.14).

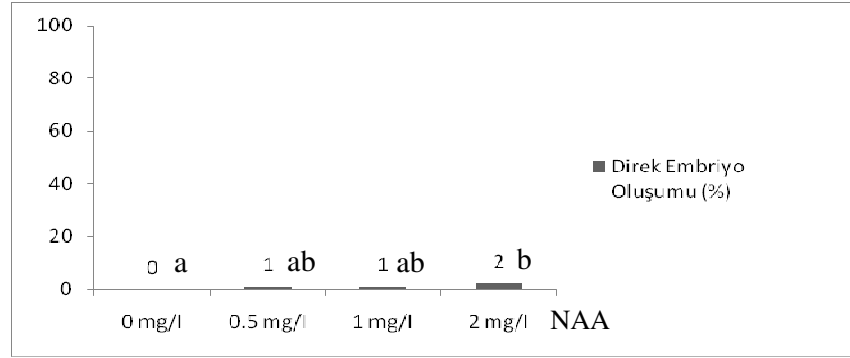
Çizelge 4.11:NAA'nın toplam kallus oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



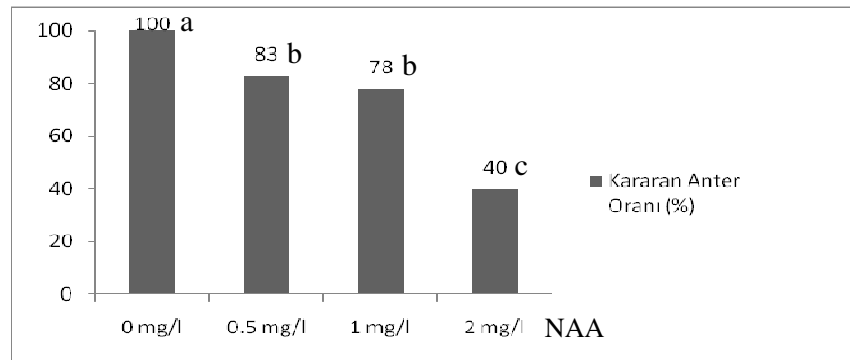
Çizelge 4.12: NAA'nın toplam embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



Çizelge 4.13:NAA'nın direk embriyo oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



Çizelge 4.14:NAA'nın anter kararması üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



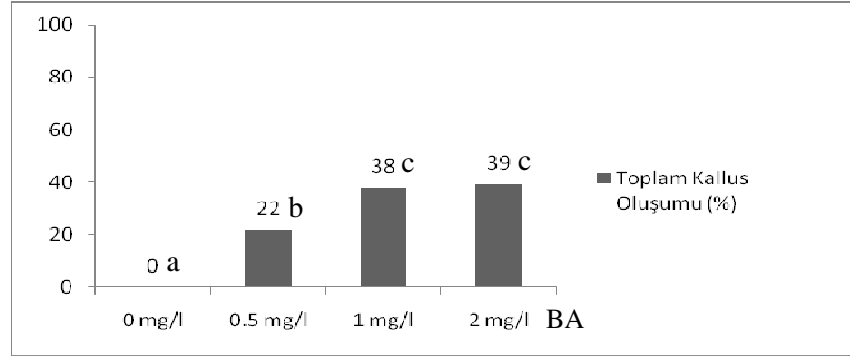
NAA bulunmayan ortamlarda kallus oluşumu gerçekleşmemiştir. 0,5 ve 1 mg/l NAA kullanıldığında sırasıyla anterlerin %17 ve %22'si kallus oluşturmuştur (Çizelge 4.11). Bu iki konsantrasyon arasında önemli ($P<0.05$) bir fark yok iken, her iki konsantrasyonda 0 mg/l NAA kullanımına kıyasla önemli ($P<0.05$) derecede farklıdır. 2 mg/l NAA kullanıldığında ise anterlerin %60'ı kallus oluşturmuştur. Bu oran diğer NAA uygulamalarında önemli ($P<0.05$) derecede farklıdır. Embriyojenik kallus oluşumunda da NAA etkili bulunmuştur. 0, 0,5, 1 ve 2 mg/l NAA konsantrasyonlarında sırasıyla %0, %3, %4 ve %23 oranlarında embriyojenik kallus elde edilmiştir (Çizelge 4.12). 2 mg/l NAA'nın etkisi diğer tüm konsantrasyonlardan önemli ($P<0.05$) derecede

farklı bulunmuştur. Direk embriyo oluşumunda yine 2 mg/l NAA kullanımı etkili olmuştur (Çizelge 4.13). Kararan ve ölen anterlerin oranları üzerine de NAA etkili bulunmuştur. NAA'nın bulunmadığı ortamlardaki anterlerin hepsi kararırken, kullanılan ortamlarda konsantrasyon arttıkça anterlerin kararma oranı %40'a kadar düşmüştür (Çizelge 4.14).

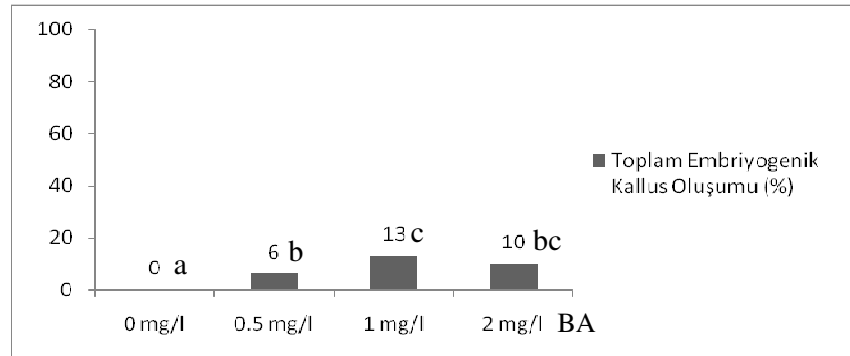
BA'nın etkisi:

Benzilaminopürin (BA) tek başına kullanıldığında hiçbir konsantrasyonda androgenik cevap oluşturmamıştır. Etkisi ancak NAA ile birlikte kullanıldığında görülmüştür. Çizelge 4.15, 4.16, 4.17, 4.18'de bu etkiler verilmiştir.

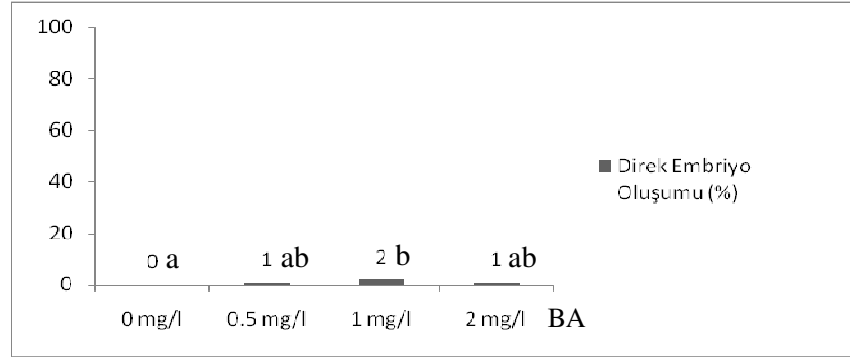
Çizelge 4.15: BA'nın toplam kallus oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



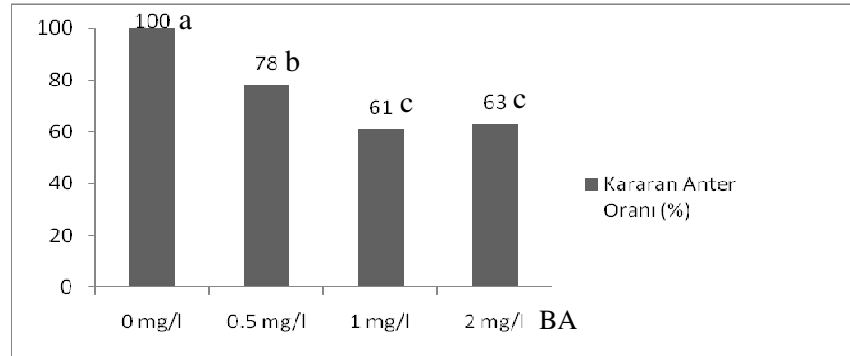
Çizelge 4.16: BA'nın embriyogenik kallus oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



Çizelge 4.17: BA'nın direk embriyo oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



Çizelge 4.18: BA'nın anter kararması üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P<0.05$).



0 mg/l BA kullanımında kallus oluşumu gözlenmez iken 0.5, 1 ve 2 mg/l BA konsantrasyonlarında sırasıyla %22, %38 ve %39 oranlarında kallus oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 4.15). 1 veya 2 mg/l BA kullanımı arasındaki fark istatistik açıdan önemli değildir. Embriyojenik kallus oluşumu üzerinde de 1 mg/l BA kullanımının en etkili konsantrasyon (%13) olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.16). Yine direk embriyo oluşumunda 1 mg/l BA kullanımı %2 ile en iyi sonuçları vermiştir (Çizelge 4.17). BA'nın hiç kullanılmadığı gruplarda tüm anterler kararmış ve devamında ölmüştür. BA'nın kademeli konsantrasyon artışı ise kararma ve ölüm oranını %61'e kadar düşürmüştür (Çizelge 4.18).

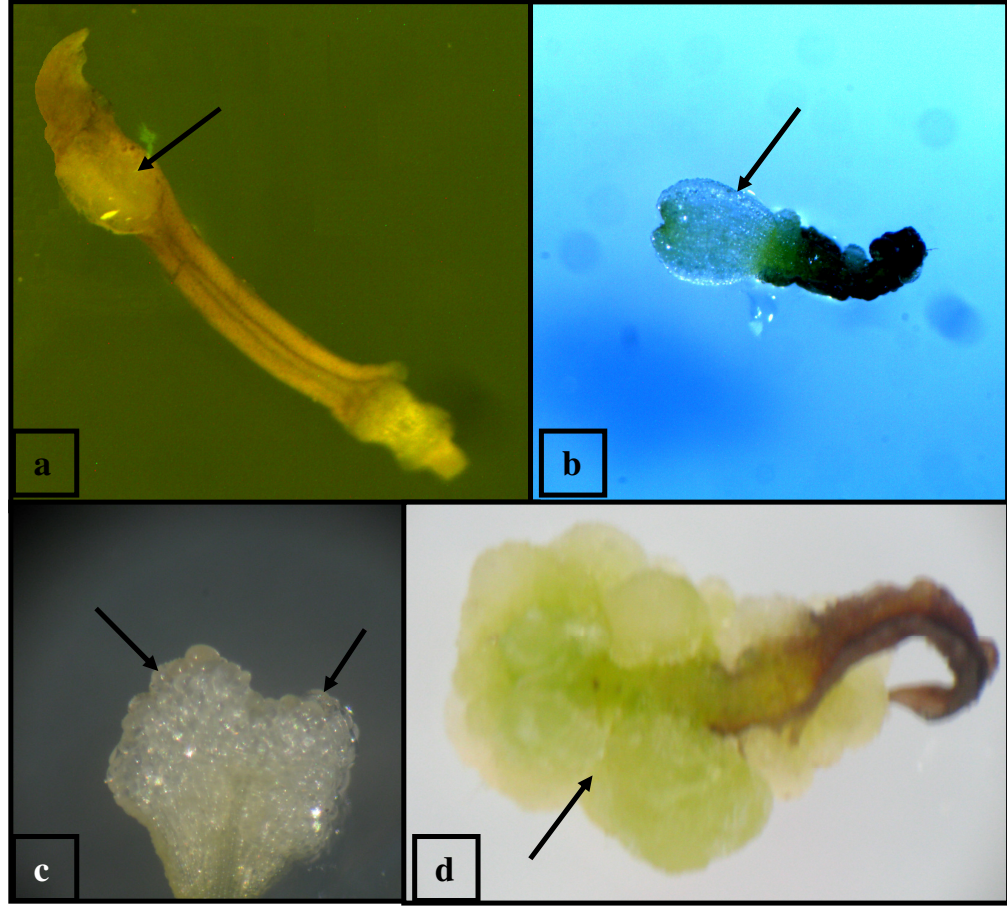
Yukarıda tek tek ele alınan genotip, ışık, NAA ve BA'nın ayçiçeği anterlerindeki androgenik etkilerinin yanı sıra özellikle bitki büyüme düzenleyicilerin interaktif etkisi de gözlenmiştir. Daha önce Çizelge 4.2'de görüldüğü üzere tek başına BA veya NAA kullanımında anterlerde hiçbir cevap oluşmamıştır. Ancak bu hormonlar birlikte kullanıldıklarında anterlerde androgenik cevap gözlenmiştir. İki hormon çeşidinin birlikte etkisi ise genotip ve ışıklanma durumuna göre farklılıklar içermektedir. Örneğin, 2 mg/l BA ve 2 mg/l NAA'nın birlikte kullanıldığı denemelerde Genotip 1 anterleri için hem fotoperiyot hem de karanlık uygulamalarında %100 kallus elde edilmiş iken Genotip 2 anterleri için bu oran fotoperiyotta %77 iken karanlıkta %13'tür. Genotip 2'de en başarılı kallus verimi %90 ile 2 mg/l BA ve 2 mg/l NAA'nın birlikte kullanıldığı karanlık denemesinde alınmıştır. Aynı genotip ve hormon kombinasyonundaki anterler fotoperiyotta % 87 oranında anter oluşturmuştur ve bu iki grup istatistik olarak farklı değildir. Çizelge 4.2 incelendiğinde buna benzer örnekler görülmektedir. Genotip ve ışıklanma durumuna bağlı olarak değişen optimum hormon düzeyleri arasındaki bu fark akılda tutulmak kaydı ile genotip ve ışıklanma durumu görmezden gelinerek yalnızca NAA ve BA kombinasyonlarının kallus oluşumu üzerindeki etkisini görmek üzere tüm deney grupları üzerinde bir analiz yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.19'da verilmiştir. Buna göre en yüksek kallus verimi 1 mg/l BA ve 2 mg/l NAA ortamında olmuş olmasına rağmen, 2 mg/l NAA'nın kullanıldığı tüm koşullarda BA konsantrasyonu 0 haricinde ne olursa olsun elde edilen sonuçlar arasındaki fark anlamlı değildir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19: Genotip ve Işıklanma durumu dikkate alınmaksızın, NAA ve BA'nın anterden kallus oluşturma yüzdesi (%) üzerine etkisi.

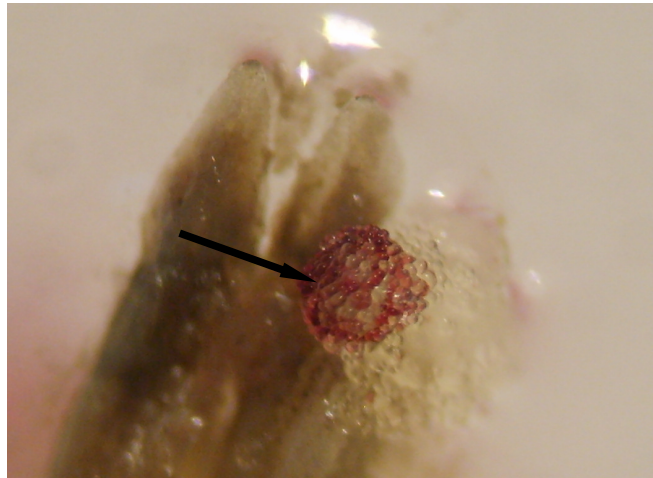
		BA			
		0	0.5	1	2
NAA	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	0.5	0 ^a	5 ^b	24.2 ^c	35.7 ^c
	1	0 ^a	6.8 ^b	37.7 ^c	40 ^c
	2	0 ^a	74 ^d	92.5 ^d	72.5 ^d

Daha önce de belirtildiği üzere doğrudan embriyo oluşumu oldukça düşük seviyede kalmıştır. Buna ek olarak kültürün 2. haftasından itibaren oluşan embriyolar kısa sürede kallus oluşturma yoluna gitmiş ve çimlenme gerçekleşmemiştir. Dolayısı ile bunlardan tam bir bitki elde edilememiştir. Embriyoların gelişme seyri Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

Kültürde karşılaşılan bir başka durum ise karanlık ortamda gelişmeye başlayan kallus dokularında ikinci hafta içinde gözlenen kırmızı renk oluşumudur (Şekil 4.8). Oluşan bu kırmızı renkli kallus dokusu hemen hemen tüm karanlık denemelerinin yarısında gözlenmiştir. Fakat takip eden günlerde bu kırmızı renk oluşumu kaybolmuş ve kallusların hepsi açık sarı renkte olmuştur.



Şekil 4.7: Oluşan embriyoların gelişim seyri. a) kültürün 1. haftasındaki globüler yapıli embriyo, b) Kültürün 3. haftasındaki yürek şekilli embriyo, c) kültürün 4. haftasındaki kallus dokusu oluşturmaya başlayan embriyo, d) kültürün 6. haftasındaki embriyo kökenli kallus. Bar=1 cm.



Şekil 4.8: Karanlık uygulamasında 2. hafta sonunda oluşan kırmızı renkli kallus dokusu.

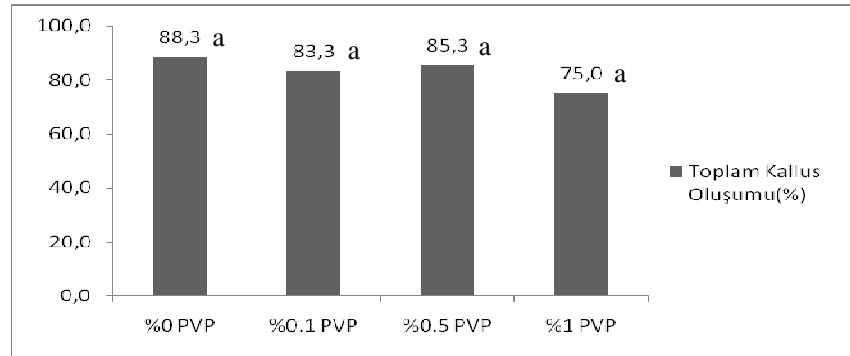
4.4. PVP Muamelesi Sonuçları

G1 ve G2 genotiplerinde ve sabit bitki hormonu konsantrasyonunda (2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA) dört farklı PVP konsantrasyonunun ışık faktörü ile kombine olarak anterlerden kallus oluşumu ve kalluslarda kararmayı engelleyici etkisi araştırılmıştır. G1 için yapılan denemede gerek karanlık gerekse fotoperiyot ortamda PVP'nin kararmayı engelleyici etkisi önemli ($P<0.05$) bulunmamıştır (Çizelge 4.20). G2'de ise kallus oluşturma oranı maksimum %97, minimum % 47 olmuştur (Çizelge 4.20). Ancak genotip ve ışık faktörlerinden bağımsız bir değerlendirme yapıldığında PVP konsantrasyonundaki artış kontrole göre kallus oluşum oranını azaltmış olsa da bu azalma önemsiz ($P<0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.21). Sonuç olarak besi yerine PVP eklenmesi kallus oluşumu oranlarını etkilememiştir. PVP'nin anter kararması üzerindeki etkisinde ise ışık ve genotipe bağlı olmaksızın tüm deneme grubu değerlendirildiğinde kontrol grubunda %11.7 oranında kararma varken %0.1, 0.5 ve 1'lik PVP konsantrasyonunda sırasıyla %16.7, %14.7 ve %25 kararma gözlenmiştir (Çizelge 4.22). İlk üç oran arasındaki farklar önemsiz iken son oran önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

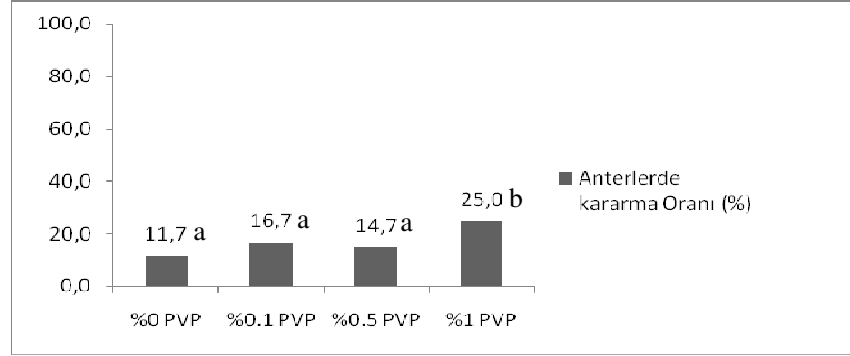
Çizelge 4.20: Genotip, ışıklanma ve PVP'nin kallus oluşumu ve kararma üzerine etkisi. Aynı sütundaki üstel harflerden en az biri aynı ise bu, ortalamalar arasındaki farkın Tukey testine göre 0,05 önem düzeyinde önemsiz olduğunu gösterir. (**PVP**, polivinilpirolidon, **TK/A**=oluşan kallus (Emriyojenik veya nonembriyojenik) / anter oranı, **K/A** kararan anter / anter oranı).

Genotip	Işıklanma	PVP %	TK/A %	K/A %
G1	Fotoperiyot	0	100 ^e	0 ^a
G1	Fotoperiyot	0,1	90 ^{cde}	10 ^{abc}
G1	Fotoperiyot	0,5	97 ^{de}	3 ^{ab}
G1	Fotoperiyot	1	93 ^{cde}	7 ^{abc}
G1	Karanlık	0	93 ^{cde}	7 ^{abc}
G1	Karanlık	0,1	100 ^e	0 ^a
G1	Karanlık	0,5	100 ^e	0 ^a
G1	Karanlık	1	87 ^{cde}	13 ^{abc}
G2	Fotoperiyot	0	90 ^{cde}	10 ^{abc}
G2	Fotoperiyot	0,1	63 ^{abc}	37 ^{cde}
G2	Fotoperiyot	0,5	47 ^a	53 ^e
G2	Fotoperiyot	1	67 ^{abcd}	33 ^{bcde}
G2	Karanlık	0	70 ^{abcde}	30 ^{abcde}
G2	Karanlık	0,1	80 ^{bcde}	20 ^{abcd}
G2	Karanlık	0,5	97 ^{de}	3 ^{ab}
G2	Karanlık	1	53 ^{ab}	47 ^{de}

Çizelge 4.21: PVP'nin anterden kallus oluşumu üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir (P<0.05).



Çizelge 4.22: PVP'nin anterlerde kararma üzerine etkisi. Sütun üzerindeki harflerden yalnız biri aynı ise grupların ortalamaları arasındaki fark önemsizdir ($P < 0.05$).



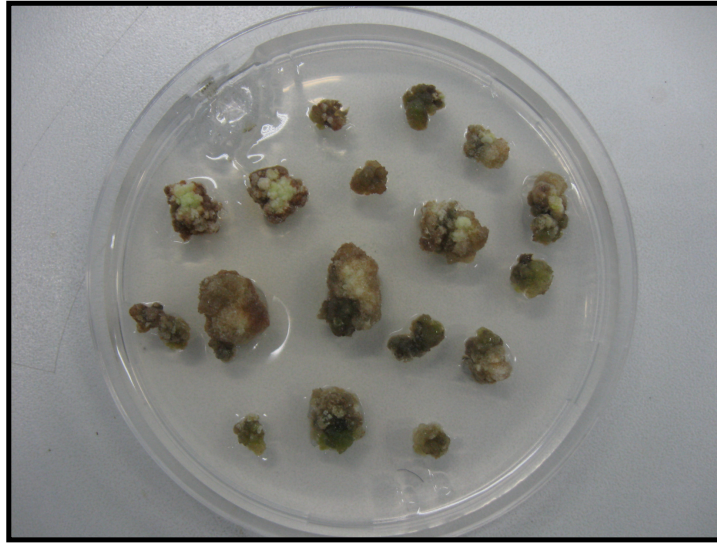
4.5. Kolşisin Muamelesi Sonuçları

Kolşisinin, anter ve kallusta kromozom katlaması üzerine etkisini görmek için hem direk anterlere uygulanmış hem de anterlerden elde edilen kalluslara uygulanmıştır. Anterlere yapılan uygulamada, 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren besi yerlerine 0, 0.1, 0.2 g/l olarak eklenen kolşisine 3 gün süre ile maruz bırakılan anterle kolşisin içermeyen aynı bileşimdeki ortama alınıp gelişimleri 6 hafta izlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.23'de gösterilmiştir. Bu uygulama sırasında anterlerden yalnızca nonembriyojenik kallus oluşumu gözlenmiştir. Kolşisin konsantrasyonu arttıkça kallus oluşum oranı düşmüş ve anterlerde kararma (ölüm) oranı artmıştır (Çizelge 4.23). Ayrıca bu uygulamada embriyojenik kallus oluşumu ve direk embriyo oluşumu gözlenmemiştir.

Kalluslara kolşisin uygulaması yine yukarıdaki konsantrasyonlarda yapılmış fakat Çizelge 4.24'deki hormonlar ile kombine edilmiştir. Bu uygulama sonunda kalluslarda herhangi bir gelişme gözlenmezken bazılarının kahverengileştiği görülmüştür (Şekil 4.9). Kolşisin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kahverengileşme oranı %61'lere kadar çıkmıştır. Bu denemede elde edilen karyolojik sonuçlar sitolojik gözlemler bölümünde verilecektir.

Çizelge 4.23: Genotip ve Kolşisin'in anterden kallus oluşumu ve kararma üzerine etkisi. Aynı sütundaki üstel harflerden en az biri aynı ise bu, ortalamalar arasındaki farkın Tukey testine göre 0,05 önem düzeyinde önemsiz olduğunu gösterir. (**TK/A**=oluşan toplam kallus (Emriyojenik veya nonembriyojenik) / anter oranı, **K/A** kararan anter / anter oranı).

Genotip	Kolşisin g/l	TK/A %	K/A %
G1	0	100 ^c	0 ^a
G1	0,1	71 ^{abc}	29 ^{abc}
G1	0,2	53 ^a	47 ^c
G2	0	90 ^{bc}	10 ^{ab}
G2	0,1	76 ^{abc}	24 ^{abc}
G2	0,2	67 ^{ab}	33 ^{bc}



Şekil 4.9: 0.2 g/l kolşisin muamelesi sonucu kalluslarda meydana gelen kahverengileşme

Çizelge 4.24: Kalluslara Genotip, BA ve Kolşisin uygulaması. Aynı sütundaki üstel harflerden en az biri aynı ise bu, ortalamalar arasındaki farkın Duncan testine göre 0,05 önem düzeyinde önemsiz olduğunu gösterir. (**Kh/K** = Kahverengileşen kallusların, toplam kalluslara (Emriyojenik veya nonembriyojenik) oranı).

Genotip	BA %	Kolşisin g/l	Kh/K %
G1	0,5	0	9 ^a
G1	0,5	0,1	25 ^{abcd}
G1	0,5	0,2	44 ^{abcde}
G1	1	0	23 ^{abc}
G1	1	0,1	24 ^{abcd}
G1	1	0,2	33 ^{abcde}
G1	2	0	28 ^{abcde}
G1	2	0,1	27 ^{abcde}
G1	2	0,2	21 ^{ab}
G2	0,5	0	10 ^a
G2	0,5	0,1	20 ^{ab}
G2	0,5	0,2	40 ^{abcde}
G2	1	0	25 ^{abcd}
G2	1	0,1	57 ^{cde}
G2	1	0,2	61 ^e
G2	2	0	30 ^{abcde}
G2	2	0,1	53 ^{bcde}
G2	2	0,2	59 ^{de}

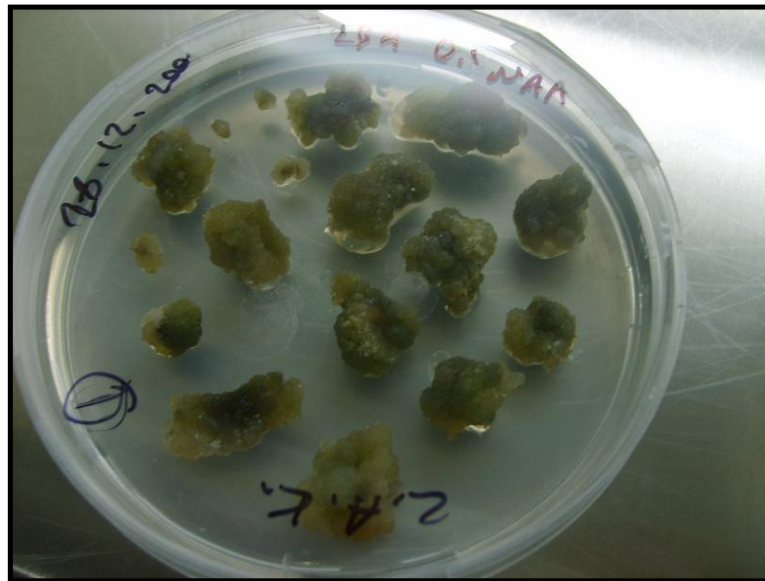
4.6. Rejenerasyon Sonuçları

Anterde androgenesisin uyartımı için yapılan deneyler sonucu elde edilen kalluslar hangi hormon kombinasyonunda ve ışık koşullarında elde edildiğine bakılmaksızın yalnızca genotipe göre ayrılarak Çizelge 4.25'teki ortamlarda rejenerasyon denemesine alınmıştır (Şekil 4.10). Bu deneme için BA tek başına veya 0.1 mg/l NAA ile kombine şekilde kullanılmıştır ve kalluslar bu ortamda 15 günde bir alt kültüre almak şartı ile 8 hafta bekletilmiştir. MS temel ortamına 30 g/l sükröz ve % 0.4'lik agar eklenerek yapılan deneylerde hem embriyojenik hem nonembriyojenik kalluslar karışık olarak ortama transfer edilmiştir. Hiçbir deneme grubunda kalluslardan rejenerasyon sağlanamamıştır. Deneme sırasında kallusların yaş ağırlıklarında artış tespit edilmiş ve başlangıca göre artış oranları arasındaki farklar Çizelge 4.25'te

gösterilmiştir. 8 hafta sonunda bazı kalluslarda kahverengileşme gözlenmiş ve oranları Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.25: Rejenerasyon denemesi sonuçları. Aynı sütundaki üstel harflerden en az biri aynı ise bu, ortalamalar arasındaki farkın Tukey testine göre 0,05 önem düzeyinde önemsiz olduğunu gösterir. (**Kh/K** = Kahverengileşen kallusların, kullanılan kalluslara oranı, **BKA**: Başlangıç aşamasında kallus başına ortalama ağırlık, **DSKA**: Deneme sonunda kallus başına ortalama ağırlık, **OAA**: Deneme sonunda kallus başına ortalama ağırlık artışı, **OAA%**: Deneme sonunda kallus başına ortalama ağırlık artışı yüzdesi).

Genotip	NAA	BA	Kh/K %	BKA	DSKA	OAA	OAA%
G1	0	0,5	10 ^a	0,08	0,12	0,04	50 ^{ab}
G1	0	1	15 ^a	0,06	0,1	0,04	66,7 ^{abc}
G1	0	2	20 ^a	0,14	0,26	0,12	85,7 ^{cd}
G1	0,1	0,5	0 ^a	0,08	0,15	0,07	87,5 ^{cd}
G1	0,1	1	0 ^a	0,12	0,22	0,1	84 ^{cd}
G1	0,1	2	5 ^a	0,15	0,31	0,16	106,7 ^d
G2	0	0,5	15 ^a	0,08	0,11	0,03	37,5 ^a
G2	0	1	15 ^a	0,07	0,1	0,03	42,7 ^{ab}
G2	0	2	25 ^a	0,09	0,17	0,08	88,8 ^{cd}
G2	0,1	0,5	5 ^a	0,08	0,12	0,04	49,6 ^{ab}
G2	0,1	1	0 ^a	0,11	0,18	0,07	63,8 ^{abc}
G2	0,1	2	5 ^a	0,12	0,21	0,09	74,7 ^{bcd}



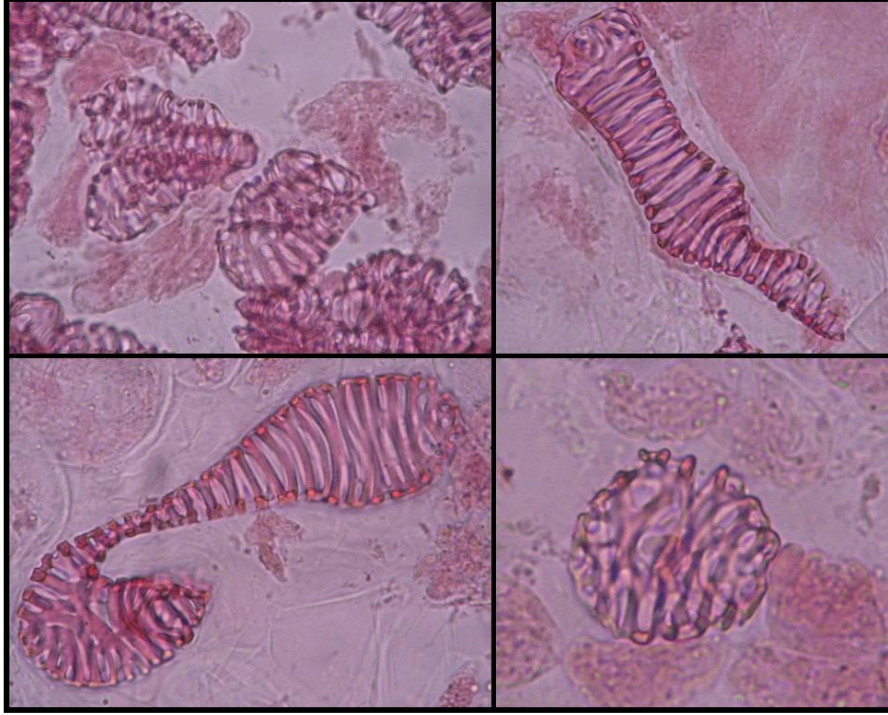
Şekil 4.10: Rejenerasyon denemesi sonundaki kalluslar. 8. haftada büyüme dışında başka bir tepki vermemişlerdir.

4.7. Sitolojik Gözlemler ve Ploidi Seviyesi Tespiti

Çalışma boyunca elde edilen kalluslardan örnekler alınarak ploidi seviyelerinin tespiti için karyolojik incelemelere tabi tutulmuştur. Kallus hücrelerinde kromozom sayımı yardımı ile ploidi seviyesi belirlemek, bölünen hücre sayısının azlığı nedeni ile güç olmuştur. Her gruptan toplamda 200 kadar farklı kallus incelenmiş fakat kromozom sayısının belirlenebileceği kadar net görüş çok az hücrede gözlenmiştir. Anter başlangıç ortamlarında incelenen kalluslarda her iki genotip için hem haploid hücrelere (Şekil 4.12) sahip olan kallus hem diploid hücrelere (Şekil 4.13) sahip olan kallus gözlenmiştir. Yani bazı kallusların haploid bazılarının ise diploid olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak gözlenen hücre sayısının azlığı sebebiyle uygulamalar arasındaki farkları belirleyecek ve sağlıklı bir istatistik analiz yapabilecek veriler elde edilmemiş olsa da anterlerde bulunan mikrosporların androgenik yönde uyarıldığı ve haploid hücre oluşturmalarının sağlandığı görülmüştür.

Buna karşın 3 gün boyunca 0.1 g/l veya 0.2 g/l kolşisin uygulanan kalluslarda kromozom sayımı yapmak mümkün olmamıştır. Kromozom sayıları belirlenemediği için ploidi seviyeleri hakkında bir veri elde edilememiştir.

Sitolojik gözlemler sonucu ortaya çıkan bir başka durum ise kallus dokusu içerisinde ksilem elemanlarının varlığı olmuştur (Şekil 4.11). Mikroskop altında gözlenen kallusların hemen hemen hepsinde bu durum ile karşılaşmıştır.



Şekil 4.11: Kallus dokularında gözlenen değişik ksilem elemanları.



Şekil 4.12: $2n=34$ kromozoma sahip kallus hücresi



Şekil 4.13: $n=17$ kromozumlu haploid kallus hücresi

5. TARTIŞMA

Bourgin ve Nitsch'in 1967 yılında *Nicotiana tabacum*'un anterlerini kültüre alarak ilk haploid bitkiyi ürettikleri günden bu yana insanlığın önünde tüm genotipik karakterler açısından saf ırklar elde edecekleri ve bu yolla bitki ıslah çalışmalarında hızla ilerleyecekleri uzun fakat yorucu bir yol açılmıştır. Tekniğin tüm bitkilere uygulanmasında bir takım zorluklar olmasına ve prosedürün her bitki için ayrı ayrı optimize edilme ihtiyacının yarattığı sorunlara rağmen anter kültürü yöntemi ile 25 familyanın 134 türünden olumlu cevap alındığı kaydedilmiştir (Bhojwani ve Razdan 1996).

Dünya'daki bu çalışmalara paralel olarak ülkemizde de haploid bitki elde etme amacı ile bazı bitkilerde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında haploid veya dihaploid bitkilerin elde edilmesi mümkün olmuş iken (Hıyarda embriyo kültürü ile Çağlar ve Abak 1999, tütünde anter kültürü ile Gencer 2002, biberde anter kültürü ile Taşkın 2005, tütünde anter kültürü ile Sakin 1994 ve buğdayda anter kültürü ile Engin Özü 2006) bazılarında ise haploid bitki elde edilememiş (Şeker pancarında ovaryum kültürü ile Gürel ve Gürel 1998, yazlık kabakta ovaryum kültürü ile Yılmaz 2005, Manisa lalesinde anter kültürü ile Arı 2006, arpada anter kültürü ile Baba 1992, çavdarda anter kültürü ile Altındal 2005, ketende anter kültürü ile Kurt ve Evans 1998 ve buğdayda anter kültürü ile Duran 2007), fakat sonraki çalışmalara ışık tutacak ve temel oluşturacak önemli bilgilere ulaşılmıştır.

Ayçiçeği gerek Dünya'da gerekse ülkemizde önemli bir yağ bitkisidir. Ülkemizde, özellikle Trakya bölgesinde yoğun tarımı yapılan bu bitkinin tohum ihtiyacının neredeyse tamamına yakını yurt dışından sağlanmaktadır. Bazı Tarımsal Araştırma Enstitüleri ve üniversitelerin ziraat fakültelerinde ayçiçeğinin klasik metodlar ile ıslahı çalışmaları yapılmakla birlikte henüz ülkemizde ayçiçeği ile ilgili bir haploid kültür çalışması mevcut değildir. Bilindiği üzere geleneksel ıslah teknikleri en az 6 jenerasyon sonra homozigota yakın hatlar elde edilmesini ancak sağlar. Klasik ıslah tekniklerinden farklı olarak ayçiçeğinin haplo-diploidizasyon potansiyeli ilk kez

Bohorova vd. (1980) tarafından test edilmiştir. Ayçiçeğinde haploidlerin elde edilmesi girişimleri ginogenesis yoluyla (Yang vd. 1985, Gelebart ve San 1987), anter kültürü yoluyla (Bohorova vd. 1985, Gürel vd. 1991a, Pugliesi vd. 1993, Thengane vd. 1994, Zhong vd. 1995) ve mikrospor kültürü yoluyla (Gürel vd. 1991b, Coumans ve Zhong 1995) olmuştur. Bu girişimler yapılmış olmasına rağmen çok düşük uyarılma oranı, zayıf tekrar üretim ve şüpheli ploidi seviyeleri gibi nedenlerden ötürü mikrospor kökenli bitkilerin ayçiçeği ıslağında başarılı kullanımı yolunda çok ilerleme olmamıştır. Ovül kültürünün rutin uygulaması prosedürün zorluğu dışında düşük ginogenetik embriyo verimi sebebi ile başarısız olmuştur (Yang vd. 1985, Gelebart ve San 1987).

Ayçiçeğinde optimum androgenesis için en iyi ortamı belirlemek amacıyla yapılan bir çalışma yalnızca kısmen başarılı olmuştur. Bohorova vd. (1985) % 70-100 civarında anter kallusu elde etmiş fakat sürgün rejenerasyonu sağlayamamıştır. Gürel vd. (1991a) ayçiçeği ve bazı türler arası hibritlerinin anter kültüründe düşük frekanslı direk embriyo formasyonu ve sürgün üretimi (%0.47 ile %3.4 arası) elde ettiğini fakat tam bir bitkiye ulaşamadığını rapor etmiştir. Thengane vd. (1994) embriyodan bitkiye dönüşümdeki zorlukları rapor etmişlerdir. Bu çalışma düşük rejenerasyon potansiyeli bir yana, üretilen embriyoların ploidi seviyesi ile ilgili yeterli bilgi sağlamamaktadır. Gürel vd. (1991b) ile Coumans ve Zhong (1995) izole mikrospor kültürünü test etmiş ve sürekli hücre bölünmesi ve mikrokallus oluşumu elde etmişse de sürgün rejenerasyonunda başarı yakalayamamıştır. Ayçiçeğinden haploid veya dihaploid bitki elde edilmesi üzerine yapılan tüm bu çalışmalarda hala alınacak yollar olduğu aşikardır. Dolayısı ile bu çalışmada, ayçiçeğinde haploid kültür çalışmaları yönünden gerek dünya genelindeki çalışmalara katkı sağlama ve gerekse ülkemizde bulunan bir eksiğin kapatılması ve bazı temel bilgilere ulaşılması açısından araştırmalar yapılması amaçlanmıştır.

Anter kültürü çalışmalarının ilk ayağını donör bitkilerin yetiştirilmesi ve uygun anterlerin hangi evrede alınacağı oluşturmaktadır. Donör bitkinin genotipi uygun dahi olsa anter kültüründe başarılı olabilmek için bu bitkilerin uygun koşullarda yetişmiş olması gerekmektedir. Uygun koşullardan kasıt bitkinin yetiştiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu ve günlük ışıklenme süresi, havadaki CO₂ konsantrasyonu, bitkinin beslenme koşulları gibi çevresel faktörlerin optimum düzeylerde olmasıdır (Ellialtıoğlu

vd. 2002). Aynı tür hatta çeşitler ile yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar alınması yetiştirme koşullarının etkisini gözler önüne sermektedir. Hatipoğlu (1999), donör bitkilerin anterlerin alındığı döneme kadar çok iyi beslenmesi ve optimum ışık koşullarında muhafaza edilmesi gerektiğini ve suni ışığın güneş ışığının yerini alamayacağını belirtmiştir. Ayrıca polen gelişimi sırasında donör bitkilerin herhangi bir strese maruz kalmamaları ve anterlerin alınmasından 3-4 hafta öncesinden itibaren pestisid uygulamasından kaçınılması gerektiği kaydedilmiştir. Ellialtıoğlu vd. (2002)'ye göre genel olarak normal yetiştirme sezonunda ve açıkta yetiştirilen bitkilerin, yetiştirme dönemi dışında, serada veya iklim odasında yetiştirilen bitkilere oranla anter kültüründe başarı şanslarının yüksek olduğu düşünülmektedir. Buna karşın Wenzel ve Foroughi-Wehr (1994) buğdayda, Shtereva vd. (1998) domateste, Büyükalaca vd. (2004) ise biberde yaptıkları anter kültürü çalışmalarında; serada yetiştirilen bitkilerin, açıkta yetiştirilen bitkilere göre daha yüksek androgenik performans gösterdiğini kaydetmişlerdir. Bu iki durumu değerlendirdiğimizde donör bitkilerin ekolojik ve fizyolojik isteklerinin optimum seviyede tutulmasının önemini göz önüne alarak ayçiçeği tohumları iklim odasında ve sabit sıcaklıkta (25 °C) çimlendirilmiştir. Böylece çimlenmede senkronizasyon ve dolayısı ile bitkilerin büyüme ve gelişmelerinin birbirine paralel olması sağlanmıştır. Nisan, mayıs, haziran ve temmuz ayları içerisinde yapılan çimlendirme işlemleri sonucu 4 günde neredeyse tüm tohumlar çimlenmiş ve fideler sera koşullarına aktarılmıştır. Böylece dış ortamın ışık şiddeti altında gelişmeleri sağlanmıştır. Seralarda hiçbir kimyasal gübre ve ilaç kullanmadan sadece musluk suyu ile sulanan bitkilerde yabancı ot mücadelesi mekanik olarak yapılmış ve ayçiçeği bitkilerinde hiçbir hastalık gözlenmemiştir.

Taşkın (2005), biberde yaptığı çalışmada mayıs ayından itibaren ocak ayına kadar 9 ay boyunca aldığı biber anterlerini kültüre almış ve elde edilen embriyo sayıları açısından nisan, mayıs ve haziran aylarının yüksek verim oluşturduğu geri kalan aylarda ise verimin düştüğünü bildirmiştir. Bu çalışma, donör bitkinin yetiştirme döneminin uygun anter temini için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda anterlerin alınma döneminin yaratacağı bu etkiyi ortadan kaldırmak için nisan, mayıs, haziran ve temmuz aylarında yetiştirilen ayçiçeği bitkilerinden elde edilen anterler eşit oranlarda karıştırılarak tüm deneme gruplarında karışık kullanılmıştır. Bu sayede 2010 ve 2011 yılında elde edilen verilerde herhangi bir sapma gözlenmemiştir.

Yapılan araştırmalar, erken çiçeklenen genç iek tomurcuklarının en fazla androjenik kapasiteye sahip polen taneciklerini içerdiğini ve tomurcukların çiçeklenme periyodunun başında toplanması gerektiğini göstermiştir (Smykal 2000). Bu sonuçlar da desteklemektedir ki bu araştırmada ilk olgunlaşan apikal kapitulumun kullanılması androjenik cevabın yüksek çıkmasına katkı sağlamıştır.

Donör bitkinin yetişme koşullarından başka bir diğer kritik evre de uygun mikrospor safhasının tespiti dir. nk uygun safhadaki mikrosporlar kültüre alınmadıkça, diğer kültür şartları optimum olsa dahi polen embriyogenesi gerçekleşmeyecektir. Birçok türde bu uygun safha her ne kadar tek çekirdekli mikrospor safhası olarak genelleştirilmişse de farklı türlerde yapılan detaylı çalışmalar bu kritik noktanın mayoz sonrası tetratların oluşumundan başlayan ve I. mitoz bölünme sonrasındaki nişasta depolanmasından hemen önceki döneme kadar süren bir zaman dilimi içinde olduğunu göstermiştir (Sunderland ve Dunwell 1977). Ancak ayeğinde anter kültürü ile ilgili yapılan çalışmalarda mikrosporların erken, orta veya geç tek çekirdekli evrede olduğu açılmamış tp çiçeklerden temin edildiği ve başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Saji ve Sujatha 1998, Thengane vd. 1994, Nurhidayah 1996, Vijaya Priya vd. 2003). Bu çalışmada da mikrosporların tek çekirdekli evrede iken kullanılması uygun görülmüştür. Bazı deneme gruplarında %100 kallus verimi oluşması da göstermiştir ki tek çekirdekli mikrosporlar androjenik gelişme için uygun bir evredir.

Uygun anter safhasını belirlemek için genellikle tomurcuk şekli ve büyüklüğü ile anterin gelişme safhası arasında bir ilişki kurulmaktadır. Zamir vd. (1980)'ye göre, mikrospor safhaları ile tomurcuk uzunluğu arasındaki ilişki, bazı bitkilerde bir anter içindeki mikrosporların aynı gelişim safhasında olmaması nedeniyle her zaman doğru olmayabilir. 'Asenkronize' mikrospor gelişimi olarak adlandırılabilen bu yapıyı gösteren türlerde daha ileri dönemde bulunan mikrosporlar ortama toksik madde salgılayarak genç mikrosporların androjenik gelişimlerini baskı altına alabilir (Kott vd. 1988, Kim vd. 2004). Ayrıca anter içerisinde bulunan polenlerin yapısal ve boyutsal açılardan farklılık gösterdiği bilinmektedir. Polen dimorfizmi denen bu durumda polenlerin bir kısmı gametofitik yönde diğer bir kısmı ise sporofitik yönde

gelişmektedir. Dolayısı ile dimorfik yapıdaki bu polenlerin sporofitik yönde gelişme eğilimi olanların sayısal değeri ile oluşacak embriyo sayısı arasında bir korelasyon bulunmaktadır (Ellialtıoğlu vd. 2002). Yapılacak sitolojik bir ön çalışma ile anter içerisindeki mikrosporların hangi evrelerde bulunduğu ve bu mikrosporların hangi tomurcuk büyüklüğünde elde edilebileceği tespit edilmelidir. Özellikle ilk defa çalışılacak türlerde bunu yapmak elzem olabilir. Bunun yanında çiçek tomurcuk büyüklüğünün, genotipe, tomurcuğun bitki üzerinde bulunduğu yere ve bitkinin yaşına bağlı olduğunu da unutmamak gerekir (Ellialtıoğlu vd. 2002).

Tek çekirdekli mikrosporların hangi evredeki çiçeklerde bulunduğunu tespit etmek amacı ile 3, 4, 5 ve 6 mm uzunluğundaki henüz açmamış tüp çiçeklerden alınan anterler üzerinde mikroskopik incelemeler yapılmıştır. Tek çekirdekli uygun mikrosporların 3 ve 4 mm uzunluğundaki çiçeklerde görüldüğu, 5 ve 6 mm uzunluğundaki çiçeklerde bulunan çiçeklerin ise çift çekirdekli evreye geçtiği gözlenmiştir. Meriç (2002) ayçiçeğinin fertil HA 89 “B” hattında mikrogametogenezi incelediği çalışmada 3, 4 ve 4.5 mm boyundaki tüp çiçeklerin henüz tek çekirdekli evrede olduğunu, 5.5 cm ve üzerinde ise çift çekirdekli evreye geçtiğini bildirmiştir. Dolayısı ile bu çalışmada tek çekirdekli evredeki mikrosporları elde etmek amacı ile 3 ve 4 mm boyundaki çiçeklerden anter temini yapılmıştır. Her iki boydaki çiçeklerden alınan anterler karışık olarak deneme gruplarında kullanılmış ve eşit oranda kullanımına dikkat edilmiştir. Böylece anterin gelişme durumunun deney sonucuna etkisinin minimize edildiği düşünölmektedir.

Yapılan incelemeler sırasında henüz açmamış olan kapitulumların değişik evrelerde çiçekler bulundurduğu gözlenmiştir. Keza bu gözlem Meriç (2002) tarafından da bildirilmiştir. Kapitulumun çevresinde bulunan çiçekler daha önce olgunlaşmaya başlamışlardır. Merkeze doğru gidildikçe daha genç çiçeklere rastlanmaktadır. 3 ve 4 mm boylarında uygun mikrospor evresini barındıran çiçeklerin daha çok 3 ve 4 cm çapa sahip kapitulumlarda yer aldığı gözlenmiştir. Bunun üzeri çaptaki kapitulumlar uygun çiçekleri bulundursa da çiçeklerin çoğunun sarı renk aldığı ve 4 mm üzerinde boya sahip oldukları gözlenmiştir. Bulgular kısmında da değinildiği gibi sarı renk almış çiçekler değil de yeşilimsi krem renkli çiçekler uygun anterleri bulundurdıkları için bu

çalışmada kullanılmıştır. Vijaya Priya vd. (2003)'de ayçiçeği ile yaptığı çalışmada krem renkli çiçeklerin anter temininde kullanıldığını bildirmiştir.

Kültüre alınan ayçiçeği anterlerinin androgenik cevapları üzerinde genotip, ışık, NAA ve BA'nın etkileri bulgular kısmında verilmiştir. Bu faktörlerin etkileri aşağıda ayrı ayrı tartışılacaktır.

Çalışmamızda genotipin etkisini görmek için iki farklı ayçiçeği hattı kullanılmıştır. Işık ve kullanılan hormon kombinasyonlarına bağlı olarak hem G1'de hem G2'de maksimum %100 kallus oluşumu sağlanmıştır. Işık ve hormon kombinasyonları dikkate alınmadan tüm deney grupları üzerinde yapılan analizde ise G1'in kullanılan tüm anterlerinin %30'u kallus oluşturmuş iken G2'de bu oran %19 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). İki genotip arasındaki bu fark 0.05 önem düzeyinde önemli bulunmuştur. Bir çalışmada, *Helianthus annuus* L. cv. Morden ve üç farklı hibrit çeşit, genotipin androgenik cevap üzerindeki etkisini ölçmek için karşılaştırılmıştır. Genotipler arasındaki fark kallus oluşturma açısından önemli bulunmamış iken embriyo oluşumu açısından önemlidir (Saji ve Sujatha 1998). Ayçiçeğinin Morden, Russian, Super Start ve Albena çeşitleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada en yüksek embriyojenik cevap Russian çeşidinde elde edilmiş ve genotipin anterden kallus oluşumunu ciddi şekilde etkilediğine değinilmiştir (Thengane vd. 1994). Başka bir çalışmada keten bitkisinin sekiz ayrı genotipi kullanılmış, bu genotiplerden biri hiç tepki oluşturmamışken, diğer yedi genotip %0.5 ve %3.6 gibi düşük bir değer aralığında kallus oluşumu tepkisi vermiştir (Kurt ve Evans 1998). Duran (2007), *Triticum durum* Desf. türü ile yaptığı çalışmada 'Kundurur 1149', 'Berkmen 469' ve 'DH-Berkmen' genotiplerinin anter kültürüne kabiliyetlerini araştırmış ve en iyi kallus oluşumunun % 0.62 ile Berkmen 469 genotipinde bulunduğunu bildirmiştir. Literatürdeki bilgiler ile bu çalışmanın bulguları karşılaştırıldığında, genotipin anter kültürü çalışmalarını çok farklı evrelerde (kallus oluşumu ve embriyo oluşumu gibi) etkilediğini söylemek mümkündür. Ayrıca bu çalışmada bazı deneme gruplarında elde edilen %100'lük kallus veriminin başarılı bir sonuç olduğu düşünülmektedir.

Anterlerden embriyojenik kallus oluşumu açısından genotipin etkisine baktığımızda yine diğer faktörlere bağlı olmak kaydı ile Genotip 1 için en çok % 47

(fotoperiyotta ve 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren MS ortamda) oranında ve Genotip 2 için en çok % 43 (karanlıkta ve 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren MS ortamda) oranında tepki oluşmuştur. Bu iki grup arasındaki farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir. Keza diğer faktörlerden bağımsız olarak genotipin tüm deney gruplarındaki anterlerin embriyojenik kallus oluşturma oranları üzerindeki etkisine bakıldığında, genotip 1 için %9 ve genotip 2 için %7 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4). Bu oranlar arasındaki fark da önemli bulunmamıştır. Genotipin direk embriyo oluşumu üzerindeki etkisine baktığımızda diğer faktörlere bağlı olmak koşulu ile her iki genotipte en çok %10'luk başarı sağlanmıştır. Tüm deneme gruplarındaki anterlerden direk embriyo oluşumunda da her iki genotipin başarı oranı %1 civarındadır. Her iki durumda da ortalamalar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Biberde yapılan bir anter kültürü çalışmasında kullanılan 6 genotipten yalnızca üç tanesinde %0.2, %0.2 ve %1.5 oranında embriyo oluşumu elde edilmişken, diğer üç genotip hiç embriyo oluşturmamıştır (Sayılır ve Özzambak 2005). Gürel vd. (1991a) ayçiçeği ve bazı türeler arası hibritlerinin anter kültüründe düşük frekanslı direk embriyo formasyonu (%0.47 ile %3.4 arası) elde ettiğini rapor etmiştir. Bu çalışmada her iki genotipte direk embriyo oluşumu gerçekleşmişse de oranlar yukarıdaki çalışmalarda değinildiği gibi düşüktür. Her iki genotip içinde anterlerin hiç kararmadan ve canlılığını yitirmeden kültüre devam ettikleri deneme grubu bulunmasının yanında, kullanılan tüm anterler diğer etkenlerden bağımsız düşünüldüğünde genotipten anlamlı derecede etkilenmiştir. Genotip 1'de ortalama kararma oranı %71 iken Genotip 2'de %81'dir.

Yukarıda tartışılan bulgular ışığında bu çalışmada kullanılan G1 ve G2 ıslah hatlarının anterleri arasında kallus oluşturma potansiyeli ve kararma açısından önemli farkların bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda genotipin anter androgenesisini etkilediği yöndeki literatür bilgileri (Thengane vd. 1994, Tomes 1990, Razdan 1992, Saidi vd. 1997) bizce de desteklenmektedir. Ayrıca genotipin androgenik potansiyel üzerindeki bu etkisinin Saji ve Sujatha (1998)'nın dediği gibi farklı içsel hormon seviyelerinden kaynaklanmış olabileceği görüşüne katılmaktayız. Çalışma basitçe genotipin diğer tarım bitkilerinde olduğu gibi ayçiçeği anter kültüründe de önemli bir rolü olduğunu fakat genetik kontrolün doğasını anlamak ve androgenik kapasite lehine gen rekombinasyonu çalışmaları için detaylı araştırmaların gerektiğini önermektedir.

Ayçiçeğinin anter kültüründe ışığın androgenik cevaba etkisini test etmek için anterler 6 hafta boyunca ya sürekli karanlıkta tutulmuş ya da 16/8 saat fotoperiyotta inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda karanlıkta oluşan kalluslar sarımsı renkte iken fotoperiyotta muhafaza edilen anterlerden oluşan kalluslar ise yeşilimsi sarı renkte olmuştur. Saji ve Sujatha, (1998) kendi çalışmalarında karanlıkta elde edilen kallusların beyaz veya açık sarı renkli olduğunu, ışıktaki ise yeşil renkli olduğunu bildirmişlerdir. Bizim sonuçlarımızda bu bulgularla örtüşmektedir.

Işık diğer faktörler ile birlikte toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oluşumu, direk embriyo oluşumu ve kararlı canlılığını yitiren anter oranı üzerindeki etkisi Çizelge 4.7'de verilmiştir. Diğer faktörlerden bağımsız olarak tüm deneme grupları üzerinde yapılan analizde fotoperiyot ortamındaki anterlerin %31'inin kallus oluşturduğu gözlenmişken karanlık ortamda bu oran %19'dur. Işık embriyojenik kallus oluşumu üzerindeki etkisine baktığımızda ise fotoperiyot uygulamasında anterlerin %10'u, karanlıkta ise %5'i embriyojenik kallus oluşturmuştur (Çizelge 4.8). Aynı şekilde ışık direk embriyo oluşumunda da etkili olmuştur. Direk embriyo oluşumu oldukça düşük olsa da fotoperiyotta %2 ve karanlıkta %0,2 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). Hiçbir tepki vermeyen ve karararak ölen anterlerin oranları karşılaştırıldığında fotoperiyotta %69 ve karanlıkta %81 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). Yukarıda verilen tüm değerler arasındaki fark istatistik açıdan önemlidir. Sonuç olarak görüldüğü üzere fotoperiyot uygulamasının karanlığa kıyasla tüm karakterler açısından daha başarılı olduğu tespit edilmiştir.

Nurhidayah, (1996) ayçiçeğinin farklı genotipleri ile yaptığı anter kültürü çalışmasında anterlerin karanlıkta kalma süresinin 0'dan 18 güne kadar artmasının, anterden kallus oluşumunu önemli derecede azalttığını bildirmiştir. Ayrıca tüm genotiplerde 18 günlük karanlık uygulamasının direk embriyogenesis üzerinde negatif etkisi olduğunu bildirmiştir. Yine karanlık uygulamasında rejenerasyon ortamında organogenesis meydana gelmediğini bildirmiştir. Buna karşın sürekli aydınlığın belirgin bir pozitif etkisi olduğunu söylemiştir. Öte yandan Amaury vd. (1997) *Lilium longiflorum* ile yaptıkları anter kültürü çalışmasında karanlığın kallus oluşumunu desteklediği fakat ışığın inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Yine bir başka araştırmada

karanlık inkübasyonunun etkisinin ayçiçeği anterlerinde embriyoid oluşumunda, kallus indüksiyonuna oranla daha belirgin olduğu bildirilmiştir. Karanlıkta gelişen kalluslar embriyoidlere farklılaşırken, aydınlıktakiler morfogenik yeterliklerinden yoksun kalmışlardır. Bu durum, kallus gelişimine kadar anterlerin karanlıkta kültüre alınmasının ayçiçeğinde androgenesis oluşumu lehine önemli bir faktör olarak görülmektedir (Saji ve Sujatha 1998).

Yukarıda bahsedilen bu çelişkili sonuçlar çalışmalarda kullanılan farklı hormon, genotip ve diğer başka faktörlere bağlı olabilir. Nitekim bizim çalışmamızdaki deneme grupları tek tek incelendiğinde bu durum gözler önüne serilmektedir. Örneğin Çizelge 4.2’te verildiği üzere, 2 mg/l NAA ve 2 mg/l BA ile desteklenmiş MS temel besi ortamında kültüre alınan Genotip 1’in anterleri hem fotoperiyot hem de karanlık inkübasyon ortamında %100 oranında kallus oluşturmuşlardır. Genotip 2’den alınan anterler ise aynı hormon kombinasyonlarında fotoperiyot ortamında %77 oranında kallus oluştururken, karanlık ortamda sadece %13 oranında kallus oluşturmuştur (ortalamalar arası fark önemlidir). Görüldüğü gibi yalnız genotip 1 ele alındığında ışığın herhangi bir etkisi yok iken Genotip 2 ele alındığında fotoperiyot ortamındaki anterlerin, sürekli karanlık ortama kıyasla daha başarılı olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak bazı araştırmacılar anterden kallus indüksiyonu üzerinde sürekli aydınlığın belirgin bir pozitif etkisi olduğunu bildirirken (Nurhidayah 1996), birçok araştırmacı tarafından ışığın tek başına indüksiyon süreci için bir ön koşul olmamasına rağmen ileriki gelişim safhasında önemli olduğu rapor edilmiştir. (Sangwan-Norreel 1977, Sunderland ve Roberts 1977, Nair vd. 1983). Bu çalışma ise ışığın ayçiçeği anterlerinden androgenesis uyartımı üzerinde pozitif yönde etkili olduğunu fakat bu etkinin kullanılan genotipe göre farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Cho (1991), androgenesisin başarıya ulaşması için, anter dokularının fizyolojik durumuna göre hormonlara optimum seviyelerde ihtiyaç duyulduğunu ileri sürmüştür. Anter kültüründe belirli birkaç bitki büyüme regülatörü kullanılmaktadır. Genellikle başlangıç ve rejenerasyon ortamlarında 2,4-D, IAA, IBA, NAA gibi oksinler ya da alternatif olarak kinetin, zeatin ve ribozit gibi sitokininler kullanılmıştır (Luckett ve Darvey 1992).

Bu çalışmada bir oksin olan NAA ve bir sitokin olan BA'nın farklı miktarları (0, 0.5, 1 ve 2 mg/l) kombine olarak kullanılmıştır. Toplamda 16 farklı hormon kombinasyonunun anterden androgenesis uyartımı üzerindeki etkisi incelenmiş ve toplu sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çalışmamızın en belirgin sonuçlarından biri genotip ve ışık durumu ne olursa olsun NAA ve BA içermeyen temel MS ortamlarında hiçbir androgenik cevap oluşmamıştır. Bu ortamlarda bulunan tüm kalluslar önceleri bir miktar şişme göstermişse de 2. haftadan sonra kararip canlılıklarını yitirmeye başlamışlardır. Vijaya Priya vd. (2003), 6 farklı ayçiçeği genotipi üzerinde yaptıkları çalışmada bizim bulgularımıza benzer şekilde hormonsuz MS temel ortamında kallus oluşumu gözlenmediğini bildirmişlerdir. Bu durumu anter içindeki mevcut endojen hormonların kallus teşvikinde yeterli olmadığı fikri ile açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda da hormonsuz ortamda androgenik tepki oluşmamasının sebebi olarak bu fikir akla gelmektedir.

Aynı çalışmada, MS temel ortamına 0.1 mg/l NAA ve 0.2 mg/l BA eklendiğinde genotipe bağlı olarak %77-%97 arasında değişmek kaydı ile kallus oluşumu gözlenmiştir. Hormon oranları 2.0 mg/l NAA ve 1.0 mg/l BA şeklinde arttırıldığında yine genotipe bağlı olarak %74 ile %90 arasında değişen oranlarda kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Ancak görüldüğü üzere oksin ve sitokin miktarlarındaki artışın (NAA ve BAP) kallus üretimi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (Vijaya Priya vd. 2003). Bizim çalışmamızda ise Çizelge 4.19'da verildiği üzere hem NAA'nın hem de BA'nın artışı, 0'dan farklı bir konsantrasyonda kullanıldığı sürece kallus oluşum oranını önemli düzeyde arttırmıştır (NAA ve BA miktarına bağlı olarak %5'ten %92.5'e kadar). Bu duruma sadece 2 mg/l NAA için BA'nın 1 mg/l'den, 2 mg/l'ye arttırılması sonucu meydana gelen düşüş istisna teşkil etmekle birlikte bu düşüş istatistik yönden önem arz etmemektedir. Bir başka araştırmada ayçiçeğinin 5 farklı genotipinden alınan anterlerden yalnızca üç genotip için kallus cevabı oluşmuştur. 0.5 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren modifiye MS (I1) ortamında genotipe göre değişmek kaydı ile %72 ile %96 arasında kallus cevabı elde edilmişken, 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren modifiye MS (I2) ortamında yine genotipe göre değişmek kaydı ile %75 ile %95 arası kallus

cevabı oluşmuştur. NAA ve BA miktarındaki artışın önemli bir kallus oluşumu artışına sebep olmadığı görülmektedir (Nurhidayah 1996). Bu bulgular bizim bulgularımızla çelişmektedir. Bu çelişkinin sebebi olarak genotip farklılığı akla gelen ilk sebeptir. Her ne kadar Vijaya Priya vd. (2003) kallus teşviki için büyüme düzenleyicilerin kritik öneme sahip olmadığını, sadece embriyojenik kallus eldesi için büyüme düzenleyicilerin optimum dozuna gereksinim olduğunu savunuyorsa da biz kendi bulgularımız doğrultusunda en azından bizim kullandığımız ayçiçeği genotipleri için büyüme düzenleyicilerin kallus oluşumunun teşvik edilmesinde de önemli bir etkisi olduğunu savunmaktayız. Bu durum embriyojenik kallus oluşumunun teşviki için de geçerlidir. NAA ve BA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen embriyojenik kallus oranları Çizelge 4.2 de verildiği gibi %3 ila %47 arasında değişmektedir. NAA ve BA miktarlarındaki artış embriyojenik kallus oluşumunu önemli düzeyde arttırmıştır. Nurhidayah vd. (1996), ayçiçeğinin 5 farklı genotipinden alınan anterlerinden yalnızca bir genotipte embriyojenik kallus cevabı verdiğini, bu cevabın da 0.5 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren modifiye MS (I1) ortamında %13 olduğunu, fakat kullanılan hormonlar 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BA şeklinde artırılınca morfogjenik kallus oluşturma açısından başarı elde edilemediğini bildirmiştir. Bu sonucun bizim bulgularımız ile çeliştiği söylenebilirse de, embriyojenik kallus elde edilmesi üzerine hormonların etkisine bakıldığında bu farkın iki çalışmada kullanılan genotiplerdeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Öte yandan Gürel ve Kazan, (1998) ayçiçeğinin farklı bir genotipinde değişik somatik dokulardan aldıkları eksplantlardan kallus gelişimi açısından tüm NAA konsantrasyonları için BAP konsantrasyonunun attırılmasının kallus oluşum miktarını sürekli artırdığını ve eksplant tipi ne olursa olsun NAA bulunmayan ortamlarda kallus oluşumunun daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmadan anlaşıldığı kadarı ile BA'nın kallus oluşumunu teşvik ettiği fakat NAA'nın etkili olmadığı söylenmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi farklı genotip ve farklı inkübasyon koşulları (sürekli ışık-karanlık- fotoperiyot), büyüme düzenleyicilerin anterden kallus veya embriyojenik kallus oluşumunu değişik şekillerde etkilemektedir. Bu faktörler arasındaki interaksyon göz önüne alındığında bizim önerimiz, ayçiçeğinde anterlerinde androgenesis uyarımı isteniyorsa her genotip için ayrı ayrı hormon miktarlarının ve kombinasyonlarının optimize edilmesi gerekmektedir.

Gürel vd.(1991a) ayçiçeği ve bazı türler arası hibritlerinin anter kültüründe düşük frekanslı direk embriyo oluşumu (%0.47 ile %3.4 arası) elde etmiştir. Saji ve Sujatha, (1998) ayçiçeğinde yaptığı çalışmada genotipe bağlı olarak %0 ila %44 oranında embriyo oluşumu elde etmiştir. Bizim çalışmamızda, genotip, ışık ve hormon çeşidine bağlı olarak %0 ila %10 arasında değişik oranlarda direk embriyo oluşumu gerçekleşmiştir. Bu oran Gürel vd. (1991a)'den yüksek iken, Saji ve Sujatha (1998)'dan düşüktür. Bu farklılığın sebebi olarak bahsedilen çalışmalarda farklı genotiplerin kullanılmış olması düşünülmektedir.

Çalışmamızda embriyo oluşumun düşük olmasının yanında kültürün ikinci haftasını takiben oluştuğu ortamda alt kültüre alınan embriyolar bozularak kallus oluşturmuş ve zamanla kallus dokusu içerisinde kalmıştır. Thengane vd. (1994), 0.1 mg/l ABA, 0.2-1.0 mg/l GA₃ ya da hormonsuz farklı ortamlarda test ettikleri ayçiçeği anteri kökenli embriyoların çimlenmediğini ve sadece kallus artışı gözlendiğini rapor etmiştir. Buna ek olarak, Arı (2006) Manisa lalesinde yaptığı anter kültürü çalışmasında elde edilen globular embriyoların hiçbirisinin bitkiye dönüştürülemediğini bildirmiştir. Bu sonuç üzerine, elde edilen globular embriyoların çoğunlukla diğer bazı türlerdeki embriyolar gibi anter içerisinde serbest halde gelişmemiş olmasının etkili olduğunu düşünmektedir. Çünkü oluşan embriyo veya embriyoidlerin başlangıç aşaması olan globular embriyolar, ilk görünmeye başladıklarında teksel yapıda olmalarına rağmen daha sonra globular embriyolarla birlikte bunların çevresindeki kallus hücrelerinin de aynı anda çoğalmaya başlaması sonucu, embriyo veya embriyoidler genellikle kallus içerisine gömülü hale gelmiştir. Elde edilen globular embriyoların sayısının az olması, bir embriyo olgunlaştırma veya embriyo çimlendirme denemesi kurulmasına izin vermemiştir. Bununla birlikte elde edilen globular embriyolar yine de oluştukları ortamın bazal ortamına aktarılarak çimlendirilmeye çalışılmış, ancak sonuç alınamamıştır. Benzer bir sonuca göre, Karakullukçu (1991)'nin patlıcanda yaptığı anter kültürü çalışmasında da özellikle başlangıçtaki globüler oluşumlardan çoğunun gelişimleri sonradan bloke olmuş, bazıları kök oluşturup sürgün ucu vermemiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmalara benzer olarak bizim elde ettiğimiz embriyolarında gelişimleri bloke olmuş ve kallus dokusu tarafından çevrelenmiştir (Şekil 4.7). Tüm denemelerde az sayıda direkt embriyo oluştuğu için bunların farklı ortamlarda

çimlenmelerini sağlayacak koşulların araştırılması mümkün olmamıştır. Fakat embriyogenik kalluslarda bulunan embriyoid benzeri globüler yapılar ile böyle bir deneme kurulmuş yine de başarılı sonuç alınamamıştır. Bu deneme sonuçları ileride tartışılacaktır.

Kültür ortamında meydana gelen kalluslarda karşılaşılan bir başka durum ise karanlık uygulamasındaki kallusların neredeyse yarısında kırmızı renk oluşumudur (Şekil 4.8). Bu durum ikinci hafta civarında gözlenmiş ve takip eden günlerde ortadan kaybolmuştur. Ardından kalluslar açık sarı-krem renk almıştır. Literatürde böyle bir duruma rastlanamamıştır. Sadece Arı (2006)'nın Manisa lalesinde yaptığı anter kültürü çalışmasındaki bazı kallus resimlerinde benzer durum görülmüştür. Fakat yazar bu durumdan çalışmasında bahsetmediği için güvenilir bir bilgi olarak görülmemektedir. Sonuç olarak bu renk oluşumunun özellikle kültürün ilk döneminde strese bağlı meydana geldiği ve antosiyanin birikiminin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Nitekim Merzlyak ve Chivkunova (2000), antosiyaninin elmada, hem ışık kaynaklı strese hem de hasara karşı koruyucu fonksiyonu olduğunu önermiştir. Antosiyoninlerin görünür ışık spektrumunun yeşil-turuncu bölgesinde klorofil absorpsiyonunun boşluğunu doldurmada etkili bir iç ışık yakalayıcısı olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir. Dolayısı ile bizim çalışmamızın erken evresinde karanlık ortamda ışık stresine maruz kalan kalluslar klorofil yokluğunu antosiyaninin sentezi ile kapatmaya çalıştığı için kırmızı renk oluşumu gözlenmiş olabilir.

Önceki çalışmalar PVP gibi antioksidanların besi yerine eklenmesiyle kahverengileşmenin önüne geçilebileceği bildirilmiştir (Roy ve Sarkar 1991, Sudripta vd. 1999). Dayan (2006), 0.6 g/l PVP kullanılan eksplantlarda çok fazla kahverengileşme sorununa rastlanmadığını rapor etmiştir. Liao vd. (2004) *Aloe vera* L. var. *chinensis* ile yaptıkları çalışmada besi yerine 0.6 g/l PVP sonucu çok nadir kahverengileşme sorunu yaşadıklarını belirtmişlerdir. Besi yerinde veya ayçiçeği anterlerinde meydana gelen kahverengileşme sorunu aşmak sebebi ile bu çalışmada PVP'nin dört farklı konsantrasyonu genotip ve ışık faktörü ile kombine olarak denemeye alınmıştır. Genotip 1 için yapılan denemede gerek karanlık gerekse aydınlık ortamda PVP'nin etkisi istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.20). Genotip 2'de ise kallus oluşturma oranı maksimum %97 (karanlık ortamda, %0.5'lik PVP

konsantrasyonunda), minimum % 47 olmuştur (fotoperiyot ortamda, %0.5'lik PVP konsantrasyonunda). Ancak genotip ve ışık faktörlerinden bağımsız bir değerlendirme yapıldığında PVP konsantrasyonundaki artış kontrole göre kallus oluşum oranını düşürür gibi görünse de fark istatistik açıdan önemsizdir (Çizelge 4.21). Sonuç olarak besi yerine PVP eklenmesi kallus oluşumu oranlarını etkilememiştir. PVP'nin anter kararması üzerindeki etkisine baktığımızda ışık ve genotipe bağlı olmaksızın tüm deneme grupları değerlendirildiğinde kontrol grubunda %11.7 oranında karar varken %0.1, 0.5 ve 1'lik PVP konsantrasyonunda sırasıyla %16.7, %14.7 ve %25 Kararma gözlenmiştir (Çizelge 4.22). İlk üç oran arasındaki fark anlamsız iken son oranın farkı istatistik olarak diğerlerinden önemlidir. Yani kısaca %1'lik PVP kullanımı kararma oranını arttırmıştır. Zhong vd. (1995)'nin aktardığına göre ayçiçeği anter kültüründe, anter ve besi yeri kahverengileşmesini azaltan PVP'den % 0.1 oranında eklenmesi sonucu embriyogenesis artmıştır. Diğer türlerde olduğu gibi, genotipik çeşitlilik anter tepkisinde önemli bir parametredir ve genotipe bağlı farklı PVP etkisi bulunması sonucu besi ortamı ile genotipin interaktif bir etkileşim içinde olduğu önerilmektedir. Bizim sonuçlarımıza baktığımızda PVP kullanımının embriyogenesis üzerinde olumlu bir etkisi olmadığı görülmüştür. Tam tersi Genotip 2'de PVP kullanımı kallus oluşumunu kötü yönde etkilemiştir. Dolayısı ile literatür bilgileri ile çelişen bir durum söz konusudur. Ancak Zhong vd. (1995)'nin dediği gibi PVP'nin etkisinin genotipe bağlı olduğu sonucu bizim çalışmamızca da desteklenmektedir.

Haploid bitkilerin dihaploid hale getirilmesi ve homozigot saf hatlar elde edilmesi, haploidizasyon çalışmalarının son ayağını oluşturmaktadır. Bu amaçla kuvvetli bir mutajen olan kolşisin kullanımı yaygındır ve ayçiçeğinde de kullanılmaktadır (Downes ve Marshall 1983). İğ iplikleri oluşumunu engelleyen kolşisin, mitoz sırasında kromozomların kutuplara çekilmesini engelleyerek genetik materyalin aynı hücrede iki katına çıkmasını sağlar. Kolşisin muamelesi, gerek *in vitro* gerek *in vivo* olarak yapılabildiği gibi çok farklı bitki kısımlarına uygulanabilir. Örneğin, *in vitro* ortamda kahve mikrosporlarına (Herrera vd. 2002), *in vitro* ortamda buğday anterlerine (Navarro-Alvarez vd. 1994), *in vitro* ortamda çoğaltılmış *Miscanthus* çim sürgünlerine (Glowacka vd. 2010), *in vitro* ortamda *Colophospermum mopane* tohumlarına (Rubuluza vd. 2007), *in vivo* ortamda ayçiçeği fidelerine (Downes ve Marshall 1983) ve *in vitro* ortamda partenogenetik olarak üretilen embriyolardan elde

edilmiş haploid bitkilerin apikal meristemlerine (Todorova vd. 1997) uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Bizim çalışmamızda kolşisin, anter ve kallusta kromozom katlaması üzerine etkisini görmek için hem direk anterlere uygulanmış hem de anterlerden elde edilen kalluslara uygulanmıştır. Bu uygulamada, 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren besi yerlerine 0, 0.1, 0.2 g/l olarak eklenen kolşisine 3 gün süre ile maruz bırakılan anterler, kolşisin içermeyen aynı bileşimdeki ortama alınıp gelişimleri 6 hafta izlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.23'de gösterilmiştir. Bu uygulama sırasında anterlerden yalnızca nonembriyojenik kallus oluşumu gözlenmiştir. Kolşisin konsantrasyonu arttıkça kallus oluşum oranı düşmüş, anterlerde kararma (ölüm) oranı artmıştır ve bu durum her iki genotip içinde benzer olmuştur. (Çizelge 4.23). Ayrıca bu uygulamada embriyojenik kallus oluşumu ve direk embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilen sağlıklı nonembriyojenik kalluslar ise rejenerasyon ortamlarında tepki vermemiş ve bitki oluşturmaları söz konusu olmamıştır. Kalluslara kolşisin uygulaması yine yukarıdaki konsantrasyonlarda yapılmış fakat Çizelge 4.24'deki hormonlar ile kombine edilmiştir. Bu uygulama sonunda kalluslarda herhangi bir gelişme gözlenmezken bazılarının kahverengileştiği görülmüştür (Şekil 4.9). Kolşisin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kahverengileşme oranı %61'lere kadar çıkmıştır. Anterlere yapılan uygulamada olduğu gibi kalluslara yapılan kolşisin uygulamasında da herhangi bir bitki oluşturmak mümkün olmamıştır.

Kahvede androgenesis uyartımı ve bitki rejenerasyonu için mikrosporlara *in vitro* ortamda kolşisin muamelesini yapıldığı çalışmada, 100 mg/l kolşisinin 48 saat süreyle uygulanması en iyi androgenik cevabı vermiştir. Rejenerantların %95'inin dihaploid olduğu bildirilmiştir. Ancak bazı double-dihaploid bitkilerde elde edilmiştir. Dolayısıyla kahve mikrosporlarına kolşisin uygulanması sonucu sadece androgenik uyarılma değil aynı zamanda kromozom duplikasyonunun da meydana geldiği rapor edilmiştir (Herrera vd. 2002). Bir başka çalışmada belirtildiği gibi, yaygın kromozom katlama metodu bitkilere kolşisin muamelesi olduğu halde, kolşisin fitotoksik olduğu için yüksek oranda bitki ölümüne sebep olmaktadır. Dolayısı ile bahsi geçen çalışmada farklı buğday genotipinin anterlerini üç farklı kolşisin konsantrasyonu (0.0, 0.1, ve 0.2 g/l) içeren 9 farklı embriyoid uyartım ortamında inkübe etmişlerdir. Üç gün sonra

anterler yıkanarak taze ve kolşisin içermeyen ortama alınmıştır. Kolşisin konsantrasyonundaki artış embriyo oluşma oranını %77.4'ten % 29.9'a düşürmüştür fakat bitki rejenerasyon frekansını önemli düzeyde etkilememiştir (0.49 yeşil bitki/embriyoid'ten 0.40 yeşil bitki/embriyoid'e düşmüştür) ve double haploid bitki oluşum frekansını arttırmıştır (19.0 doubled-haploid bitki/100 yeşil bitki'den 72.3 doubled-haploid bitki/100 yeşil bitki'ye çıkmıştır). Oluşan double-haploid bitki sayılarına bakarak düşük konsantrasyondaki kolşisin başlangıç ortamlarına eklenmesinin etkili olduğu söylenmiştir (Navarro-Alvarez vd. 1994). *Miscanthus* çim türleri ile yapılan bir çalışmada genotip, kolşisin konsantrasyonu ve uygulama süresinin etkileri incelenmiştir. 4 kolşisin konsantrasyonu (156.5, 313, 626 ve 1252 μ M) ve üç uygulama zamanının kombinasyonu (6, 18 ve 24 saat) diploid ve triploid genotiplerde test edilmiştir. Tüm denemelerden toplamda 448 poliploid bitki elde edilmiştir. Poliploidizasyonun etkisi bir genotipte 18 saat ve 313 μ M kolşisin uygulaması ile %55'e ulaşmıştır. Genotip ne olursa olsun 18 saat ve 313 μ M kolşisin uygulaması poliploidi oluşturmak için en etkili kombinasyon olarak görülmüştür (14.9%) ve 6 saat 313 μ M uygulaması da optimum sürgün canlılığı için uygun bulunmuştur (Glowacka vd. 2010). Yine başka bir araştırmada kolşisinin, *Colophospermum mopane* tohumları üzerine etkisi *in vitro* ortamda çalışılmıştır. Tohumlar %0.05, 0.1 ve 1.0 kolşisin solüsyonuna 24, 48 ve 96 saat süreler ile gömülüp, 1/8 MS temel ortamına aktarılmıştır. Hayatta kalan 45 fidenin %44'ü tetraploid, bir tanesi kimerik ve diğerleri diploid olarak bulunmuştur. Tetraploid oluşumu 48 saat %0.05 ve % 0.1'lik kolşisin uygulaması sonucu olmuştur. %0.1'den yüksek konsantrasyonlar ve 48 saat üstü uygulamalar bitki gelişimi ve canlılığında ciddi zararlar oluşturmuştur.

Yukarıda ki farklı bitkiler ile yapılan çalışmalara ek olarak ayçiçeğine kolşisin uygulaması yapılan deneylerde vardır. Böyle bir çalışmada ayçiçeği fideleri *in vivo* ortamda % 0.5 kolşisin ile muamele edilmiştir. 100 bitkinin 54'ü yaşamış ve çiçek oluşturmuştur. Elde edilen bitkilerin genellikle kimerik olduğu görülmüştür. Ve sonuç olarak kolşisinin birçok bitki türünün en azından bazı genotipleri için güçlü bir mutajen olduğu bildirilmiştir (Downes ve Marshall 1983). Başka bir deneyde, ayçiçeğinde partenogenetik olarak üretilen embriyolardan elde edilmiş haploid bitkilerin apikal meristemleri 5 saat boyunca % 0.15'lik kolşisine maruz bırakılmıştır. 912 bitkiden 296'sı haploid diğerleri diploiddir. 20 gün sonra bu bitkilerin ploidi durumları tekrardan

kontrol edilmiş ve 239'u diploid, 25'i haploid ve 32'si miksoploid olarak gözlenmiştir. Bu sonuçların ayçiçeğinde çok yüksek frekanslı spontan diploidizasyona işaret ettiği bildirilmiştir (Todorova vd. 1997).

Yukardaki literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda karşılaşılan kolşisin konsantrasyonu arttıkça kallus oluşum oranının düşmesi ve anterlerde kararma (ölüm) oranının artması kolşisinin fitotoksik etkisini gözler önüne sermiştir. Keza kalluslara kolşisin uygulaması sonunda kalluslarda herhangi bir gelişme gözlenmezken bazılarının kahverengileştiği ve kolşisin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kahverengileşme oranının %61'lere kadar çıktığı gerçeği de bu durumu desteklemektedir. Sonuç olarak en azından bizim uygulamada kullandığımız kolşisin konsantrasyonu ve uygulama süresi başarılı sonuçlar vermemiştir. İleriki çalışmalarda farklı uygulama süresi ve farklı kolşisin konsantrasyonları ile denemeler yapılarak bu prosedürün geliştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca etkin bir rejenerasyon protokolü geliştirmedikçe bitkiye ulaşmak söz konusu olmayacaktır. İleride tartışılacağı gibi bu tez çalışmasının tamamında olduğu gibi, hem anterlere hem de kalluslara yapılan kolşisin uygulamasında da herhangi bir bitki oluşturmak mümkün olmamıştır.

Haploidizasyon çalışmalarında asıl amacın, çalışma sonucunda elde edilen haploid yapılardan dihaploid saf homozigot bitkiler elde etmek olduğu bilinen bir gerçektir. Dolayısı ile elde edilen haploid yapıların rejenerasyonu kritik bir evredir. Bu amaçla ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda daha önce de söylendiği gibi haploid veya dihaploid bitkilerin elde edilmesi mümkün olmuş iken (Hıyarda embriyo kültürü ile Çağlar ve Abak 1999, tütünde anter kültürü ile Gencer 2002, biberde anter kültürü ile Taşkın 2005, tütünde anter kültürü ile Sakin 1994 ve buğdayda anter kültürü ile Engin Özü 2006) bazılarında ise haploid bitki elde edilememiştir (Şeker pancarında ovaryum kültürü ile Gürel ve Gürel 1998, yazlık kabakta ovaryum kültürü ile Yılmaz 2005, Manisa lalesinde anter kültürü ile Arı 2006, arpada anter kültürü ile Baba 1992, çavdarda anter kültürü ile Altındal 2005, ketende anter kültürü ile Kurt ve Evans 1998 ve buğdayda anter kültürü ile Duran 2007).

Biz de çalışmamızda elde ettiğimiz nonembriyojenik kallus, embriyojenik kallus ve embriyolardan yukarıda verilen bazı çalışmalarda olduğu gibi tam bir bitki elde etme

konusundan başarılı olmuş sayılmayız. Çalışmamızda anterde androgenesisin uyartımı için yapılan deneyler sonucu elde edilen kalluslar hangi hormon kombinasyonunda ve ışık koşullarında elde edildiğine bakılmaksızın yalnızca genotipe göre ayrılarak, 0.5, 1, 2 mg/l BA veya buna ek olarak 0.1 mg/l NAA içeren temel MS ortamlarında rejenerasyon denemesine alınmıştır. Kalluslar bu ortamda 15 günde bir alt kültüre almak şartı ile 8 hafta bekletilmiştir. MS temel ortamına 30 gr/l sükröz ve %0.4'lük agar eklenerek yapılan deneylerde hem embriyojenik hem nonembriyojenik kalluslar karışık olarak ortama transfer edilmiştir. Hiçbir deneme grubunda kalluslardan rejenerasyon sağlanamamıştır. Deneme sırasında kallusların yaş ağırlıklarında artış tespit edilmiş ve başlangıca göre artış oranları arasındaki fark istatistiki olarak Çizelge 4.25'de gösterilmiştir. 8 hafta sonunda bazı kalluslarda kahverengileşme gözlenmiş ve oranları Çizelge 4.25'te verilmiştir. Rejenerasyon denemesi sırasında %0 ile %25 arasında değişen oranlarda kahverengileşme oluşmuş olmasına rağmen gruplar arasındaki fark istatistik açıdan önemli bulunmamıştır. Kahverengileşmenin sebebi olarak uzayan kültür süresi boyunca kalluslarda meydana gelen fenolik bileşiklerin sentezi görülmektedir. Nitekim Llyod ve Mc Cown (1980), *Kalmia latifolia*'nın sürgün uçlarını dikimden 12 ve 24 saat sonra taze ortamlara transfer etmişlerdir. Bunlar bir hafta boyunca eksplantları her gün taze ortamlara almışlar, kontrolleri yapıldığında renklenme görülmeyene kadar bu işlemi sürdürmüşlerdir. Yöntem eksplant yaşama oranını artırmada başarılı olsa da, dezavantajı fazla zaman alıcı olması ve laboratuvarında iş yoğunluğuna neden olmasıdır. Bizim denememizde ise 2 haftada bir alt kültür yapılmıştır. Buna rağmen kahverengileşme oranı %25'i geçmemiştir.

Ayçiçeğinde yapılan bir çalışmada embriyojenik kalluslardan elde edilen embriyoların 0.5 mg/l BA içeren ortama alınarak embriyo başına 4-6 sürgün elde edildiği bildirilmiştir. Ardından 0.2 mg/l BA içeren ortama alınan sürgünlerde hızlı bir uzama gözlenmiştir. Uzayan sürgünler köklenme ortamına aktarılmıştır ve köklenen sürgünler dış ortama şaşırtılmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada %90 kallus oluşumu, %44 embriyo oluşumu ve %14.3 oranında tam bitki elde edilmiştir (Saji ve Sujatha 1998). Bizim çalışmamızda ise 0.5 mg/l BA içeren ortamda hiçbir kallus bitkiye dönüşmemiştir. Ayrıca BA konsantrasyonunun arttırılması veya ek olarak ortama 0.1 mg/l NAA ilavesi de bu durumu değiştirmemiştir. Rejenerasyon denemesinde tam bir bitkiye ulaşılamasa da %100 kallus oluşumu ve %47 embriyojenik kallus oluşumu ile

yukarıdaki çalışmaya benzer sonuçlar alınmıştır. Anterlerin verdiği androgenik tepki ile elde edilen androgenik yapıların tam bir bitkiye dönüşmesi birbirinden ayrı iki kalıtsal süreç olarak görülmüştür. Nitekim benzer şekilde Thengane vd. (1994). anterlerde kültür cevabının birbirinden ayrı iki kalıtsal mekanizma içeren karmaşık bir karakteri olduğunu, bunlardan ilkinin mikrosporların bölünme ve kallus oluşturma yeteneği olduğunu ve ikincisinin de kallusun bitkiye farklılaşma yeteneği olduğunu bildirmiştir. Nitekim bizim çalışmamızda kullanmış olduğumuz genotiplerin ilk söylenen yeteneği başarılı bulunmuşken ikincisi yani tam bitkiye dönüşme yeteneği yetersiz görülmüştür. Ancak sonraki çalışmalarda daha farklı uygulamalar ile tam bir bitki rejenerasyonu elde edilebilir. Nitekim ayçiçeğinde yapılan bir çalışmada 0.5 mg/l KN ve 0.5 mg/l BAP kombinasyonu içeren, kazein hidrolizat ve gümüş nitrat ile desteklenmiş MS besi ortamında Russian ayçiçeği çeşidinin anter kökenli embriyolarının %10-15 oranında çimlendiğini bildirilmiştir (Thengane vd. 1994). İleriki çalışmalarda kazein hidrolizat ve gümüş nitrat gibi maddelerin kullanımı embriyo olgunlaşmasını ve çimlenmesini sağlayabilir.

Anter kültürlerinden bitkisel üretimde düşük verimin yaygın olduğunu akıldan çıkarmamak gerekir Thengane vd. (1994). Bohorova vd. (1985) % 70-100 civarında anter kallusu elde etmiş fakat sürgün rejenerasyonu sağlayamamıştır. Gürel vd. (1991a) ayçiçeği ve bazı türeler arası hibritlerinin anter kültüründe düşük frekanslı direk embriyo formasyonu ve sürgün üretimi (%0.47 ile %3.4 arası) oluşturduğunu fakat tam bir bitkiye ulaşamadığını rapor etmiştir. Gürel vd. (1991b) ile Coumans ve Zhong (1995) izole mikrospor kültürünü test etmiş ve sürekli hücre bölünmesi ve mikrokallus oluşumu elde etmişse de sürgün rejenerasyonunda başarı yakalayamamıştır.

Sonuç olarak literatürde görüldüğü üzere değişik genotiplerden alınan anterlerden oluşan androgenik yapılar, değişik rejenerasyon başarısı ile sonuçlanmıştır. Biz çalışmamızda kullandığımız genotiplerin anterlerinden yüksek androgenik cevap olarak bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tuttuğumuzu düşünmekte ancak rejenerasyon prosedürü üzerinde önemle durulması ve bu sorunun çözülmesi için daha değişik uygulamalara ihtiyaç duyulduğunu önermekteyiz.

Çalışmamızın son aşamasında yapılan sitolojik gözlemler ile oluşan kallusların ploidi seviyeleri belirlenmeye çalışılmıştır. Kallus hücrelerinde bölünme hızı düşük olduğu için kromozom sayımı yapabilmeye uygun hücre görüntüsü almak kolay olmamıştır. Kalluslar incelemeye alınmadan önce taze ortamlara aktararak hücre bölünmesi hızlandırılmaya çalışılmış ve yeni oluşan kallus dokularından gözlemler yapılmıştır. Toplamda 200 kadar kallus incelenmiş fakat az sayıda hücrede kromozom sayımı yapılabilmektedir.

Yine de her iki genotipte hem haploid hem de diploid kallus hücrelerine rastlanmıştır. Haploid hücrelerin gözlenmiş olması, oluşan kallus dokusunun mikrospor hücrelerinden köken aldığını göstermektedir. *Nicotiana tabacum* gibi bazı türlerde, vejetatif çekirdeğin ilk bölünmesi sonrasında, sitoplazmik organellerde dejenerasyon oluşabilir (Hu ve Zeng 1984). Böyle durumlarda haploid hücreler genellikle kültür sırasında 'endomitosis' yoluyla kromozom sayılarını iki katına çıkartma eğilimindedir. Spontan katlanmanın bir diğer yolu 'polen çekirdeklerinin füzyonu'dur. Mikrospor içindeki vejetatif ve jeneratif çekirdekler bazen birleşerek diploid bir çekirdek oluştururlar ve bu yolla da diploid bitkiler meydana gelebilmektedir (Hatipoğlu 1999). Buna istinaden çalışmamızda diploid hücrelerin gözlenmesi akla iki farklı durumu getirmektedir. Bunlardan ilki kallus dokusunun mikrospor hücrelerinden değil de anterdeki diğer somatik dokulardan (anter duvarı, tapetum hücreleri veya konnektif doku) oluştuğu varsayımdır. İkincisi ise mikrospor kökenli kallus hücrelerinin yukarıda anlatıldığı şekilde kendiliğinden diploidizasyon ile dihaploid hale geldiği varsayımdır. Bunun tespiti için daha ileri tekniklere gerek duyulmaktadır. Ancak çalışmamızda görülen haploid hücre varlığı, diploid hücrelerin spontan diploidizasyon ile oluştuğu fikrini akla getirmektedir. Nitekim bir çalışmada, ayçiçeğinde partenogenesis ile elde edilen embriyolardan rejenere olan bitkilerden 912 tanesi incelenmiş ve 296'sının ilk ölçümde haploid olduğu gözlenmiştir. 20 gün sonra bu haploid bitkiler tekrar kontrol edildiğinde 239 bitkinin diploid, 25'inin haploid ve 32'sinin miksploid olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar çok yüksek miktarda spontan diploidizasyonu destekler niteliktedir (Todorova vd. 1997). Benzer şekilde ayçiçeği anterlerinden elde edilen kallusların incelendiği başka bir çalışmada, ilk kültür aşamasında %30 olan haploid oranının köklenen sürgünlerde %8.3'e düştüğü görülmüştür. Buna ek olarak haploid olduğu tespit edilen kallusların aynı zamanda %2.3 ile %68.2 arasında değişen

oranlarda diploid hücre içerdiği tespit edilmiştir. Diploid hücrelerin varlığı, yalnız mikrospordan değil de diğer anter kısımlarından farklılaşma olduğunun işareti olabilir denmiştir (Saji ve Sujatha 1998). Görüldüğü üzere somatik anter dokularından diploid bitki rejenerasyonu anter kültürleri için ciddi bir problemdir. Örneğin Zhong vd. (1995) ayçiçeği anterlerinden elde edilen embriyo kökenli bitkilerin hepsinin diploid ($2n = 34$) olduğunu bildirmiştir. Ancak elde edilen bitkilerin orjini ile ilgili bir bilgi verilmemiştir. Sonuç olarak rejenerantların orjininin kesin bir tespiti zorunludur. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri izozim testleridir (Nurhidayah vd. 1996).

Nihayetinde çalışmamızda hem haploid hücre içeren kallus hem de diploid hücre içeren kallus gözlenmiştir. Haploid hücrelerin mikrospordan oluştuğu su götürmez bir gerçek iken diploid hücrelerin orjini şüphelidir. Bu hücrelerin kökenini tespit etmek için ileri düzeyli moleküler araştırmalar ihtiyaç vardır. Fakat elde edilen haploid hücrelere dayanarak, yaptığımız çalışmada ayçiçeği anterlerinden androgenesisin uyarımında başarılı olduğumuzu düşünmekteyiz.

Mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyen ve dolayısıyla replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek kromozom sayısının 2 katına çıkmasını sağlayan antimitotik etkili kimyasalların, haploid kültür veya bitkiciklere göre değişen süre ve dozlarda uygulanması ile de haploidlerin kromozom sayısı katlanabilmektedir. Bu amaçla kullanılan en yaygın kimyasal kolşisin'dir (1937'den itibaren poliploid bitki üretiminde kullanılmaktadır). Bizim çalışmamızda kolşisin muamelesi yapılan anterlerden elde edilen kalluslar ve direk kolşisin uygulanan kalluslarda yapılan sitolojik incelemeler sonucu kromozom sayımı yapmak mümkün olmamıştır. Dolayısı ile bu kallusların ploidi seviyeleri ile ilgili yorum yapmaktan uzak olduğumuzu söyleyebiliriz. Ayçiçeğine kolşisin uygulaması yapılan başka bir çalışmada ayçiçeği fideleri *in vivo* ortamda % 0.5 kolşisin ile muamele edilmiştir. 100 bitkinin 54'ü yaşamış ve çiçek oluşturmuştur. Elde edilen bitkilerin genellikle kimerik olduğu görülmüştür. Ve sonuç olarak kolşisinin birçok bitki türünün en azında bazı genotipleri için güçlü bir mutajen olduğu bildirilmiştir (Downes ve Marshall 1983).

Kahvede androgenesis uyartımı ve bitki rejenerasyonu için mikrosporlara *in vitro* ortamda kolşisin muamelesini yapıldığı çalışmada, 100 mg/l kolşisinin 48 saat süreyle uygulanması sonucu rejenerantların %95'inin dihaploid olduğu bildirilmiştir. Ancak bazı double-dihaploid bitkilerde elde edilmiştir (Herrera vd. 2002).

Bir başka çalışmada farklı buğday genotipinin anterlerini üç farklı kolşisin konsantrasyonu (0.0, 0.1, ve 0.2 g/l) içeren 9 farklı embriyoid uyartım ortamında inkübe etmişlerdir. Üç gün sonra anterler yıkanarak taze ve kolşisin içermeyen ortama alınmıştır. Kolşisin konsantrasyonundaki artış double-haploid bitki oluşum frekansını arttırmıştır (19.0 doubled-haploid bitki/100 yeşil bitki'den 72.3 doubled-haploid bitki/100 yeşil bitki'ye çıkmıştır). Oluşan double-haploid bitki sayılarına bakarak düşük konsantrasyondaki kolşisinin başlangıç ortamlarına eklenmesinin etkili olduğu söylenmiştir (Navarro-Alvarez vd. 1994). *Miscanthus* çim türleri ile yapılan bir çalışmada tüm denemelerden toplamda 448 poliploid bitki elde edilmiştir. Poliploidizasyonun etkisi bir genotipte 18 saat ve 313 µM kolşisin uygulaması ile %55'e ulaşmıştır. Genotip ne olursa olsun 18 saat ve 313 µM kolşisin uygulaması poliploidi oluşturmak için en etkili kombinasyon olarak görülmüştür (14.9%) ve 6 saat 313 µM uygulaması da optimum sürgün canlılığı için uygun bulunmuştur (Glowacka vd. 2010). Yine başka bir araştırmada kolşisinin, *Colophospermum mopane* tohumları üzerine etkisi *in vitro* ortamda çalışılmıştır. Tohumlar %0.05, 0.1 and 1.0 kolşisin solüsyonuna 24, 48 ve 96 saat süreler ile gömülüp, 1/8 MS temel ortamına aktarılmıştır. Hayatta kalan 45 fidenin %44'ü tetraploid, bir tanesi kimerik ve diğerleri diploid olarak bulunmuştur. Tetraploid oluşumu 48 saat %0.05 ve % 0.1'lik kolşisin uygulaması sonucu olmuştur. %0.1'den yüksek konsantrasyonlar ve 48 saat üstü uygulamalar bitki gelişimi ve canlılığında ciddi zararlar oluşturmuştur.

Sitolojik gözlemlerimizde karşılaştığımız şaşırtıcı bir sonuç ise, kallus dokuları içinde serbest halde ksilem elemanlarına rastlanması olmuştur. Hemen hemen incelenen tüm kalluslarda bu ksilem elemanları gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada soya fasulyesi kallusları üzerinde Kinetin ve NAA etkisi denenmiş ve bu hormonların hücre çoğalmasını hızlandırmasına paralel olarak ortamda trake elemanlarının görülme sıklığının da arttığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada oksinlerin ksilem farklılaşması için önemli olduğu, yara ksilemi oluşması, birincil vasküler farklılaşma, ikincil ksilem

farklılaşması ve kültürdeki kallus dokularında trake elemanları oluşumunda kısıtlayıcı bir faktör olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sitokinlerinde ksilem farklılaşmasını tetiklediği bildirilmiştir. Sitokin etkilerinden birisinin oksinler ile uyum içinde hücre bölünmesini teşvik etmesi olduğu ve yara ksilemi farklılaşması için mitotik aktivitenin önemli olduğu bildirilmiştir. Dolayısı ile ksilem oluşumunda hücre bölünmesi önemli ise sitokin hücre bölünmesini arttırması sebebi ile dolaylı etkisi olduğu düşünülmektedir (Fosket ve Torrey 1969). Çalışmamızda gözlenen ksilem elemanlarının oluşma sebebine gelince, yukarıda anlatılan iki etkinin birlikte ortaya çıkardığı bir durum olarak görülmektedir. Yani bir oksin olan NAA kullanımının kallus hücrelerinin ksilem elemanlarına farklılaşmasını sağladığı ve sitolojik gözlemler öncesi taze besi yerine alınan kalluslarda meydana gelen hücre bölünmesi artışının da bu duruma katkı sağladığı düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Donör bitkilerin yetiştirme dönemi ve şartlarının iyi ayarlanması, senkronize bir gelişme imkanının yaratılması gerektiği önerilmektedir.
2. Tek çekirdekli mikrosporların bulunduğu antenlerin kullanımı sonucu %100'e varan androgenik cevap oluşmuştur. Dolayısı ile ayçiçeğinde androgenik cevap elde etmek için tek çekirdekli mikrosporların kullanımı uygun bir metottur.
3. Tek çekirdekli mikrosporları içeren anterlerin 3-4 mm boyundaki tüp çiçeklerde bulunduğu, bu çiçeklerinde 3-4 cm çapındaki kapitulumlarda daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir. Yine de genotipe ve çevresel şartlara göre değişen morfolojik karakterlere güvenmeden, her çalışma öncesinde sitolojik bir gözlem yapılması önerilmektedir.
4. Genotip 1 ve Genotip 2 arasında kallus oluşturma açısından önemli düzeyde fark bulunmuştur. Dolayısı ile genotipin ayçiçeğinde androgenik cevap oluşturmada önemli bir faktör olduğu önerilmektedir.
5. Genotip 1 için 2 mg/l NAA ve 0.5, 1, 2 mg/l BA içeren MS ortamlarının fotoperiyot koşullarında, Genotip 2 için ise 2 mg/l NAA ve 2 mg/l BA içeren MS ortamlarının sürekli karanlık koşullarda %100 kallus oluşumu ile oldukça başarılı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.
6. Genotip 1 için 2 mg/l NAA ve 1mg/l BA içeren MS ortamlarının fotoperiyot koşullarında, Genotip 2 için ise 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA içeren MS ortamlarının sürekli karanlık koşullarda sırasıyla %47 ve %43 oranlarında embriyojenik kallus oluşumu ile orta derecede başarılı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

7. Işığın çalışmamızda kullanılan ayçiçeği anterlerinden androjenik uyartım üzerinde karanlığa kıyasla daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Ancak bu etkinin genotipe bağlı olduğu akıldan çıkarılmamalıdır.
8. NAA ve BA içermeyen hormonsuz MS temel besi yerinde ayçiçeği anterlerinin hiçbir androjenik cevap vermediği gözlemiştir. Bundan yola çıkarak anterlerin içsel hormon seviyelerinin androjenik cevap oluşturmaya yetmediği ve mutlaka bitki büyüme düzenleyicilerin ortama eklenmesi gerektiği düşünülmektedir.
9. Direk embriyo oluşumu maksimum %10 gibi düşük bir seviyede kaldığı için bir olgunlaştırma ve çimlendirme çalışması yapılamamıştır. İleriki çalışmalarda daha detaylı araştırmalara gereksinim vardır.
10. Karanlıkta gelişen kalluslarda ışık stresinin yarattığı bir etki olduğunu düşündüğümüz kırmızı renk oluşumu gözlenmiştir. Dolayısı ile bu bulgunun, ışığın yarattığı stresin etkisini *in vitro* da gözlemek isteyen araştırmacılara yön göstermede kullanılabileceği düşünülmektedir.
11. Besi yerinde PVP kullanımının kahverengileşme üzerinde olumlu bir etkisi saptanamamıştır.
12. Kolşisin uygulaması anterden embriyojenik kallus oluşumunu ve direk embriyo oluşumunu engellemiştir. Ayrıca kolşisin konsantrasyonu artışı anter kararmasını ve ölümünü arttırmış, aynı zamanda kallus oluşumunu azaltmıştır.
13. Çalışmamızda maksimum %100 kallus, %47 embriyojenik kallus ve %10 direk embriyo oluşumu elde edilmiş olsa da hiçbir androjenik yapı tam bir bitkiye dönüşmemiştir. İleriki çalışmalarda farklı hormon bileşimleri, farklı karbon kaynakları ve farklı kimyasal uyarınlar kullanılarak rejenerasyon prosedürünün geliştirilmesine ihtiyaç vardır.
14. Sitolojik gözlemler sonucu kültürlerde haploid kallus hücrelerine rastlanması, androjenik uyartımı amaçladığımız bu çalışmada başarıya ulaşıldığını göstermiştir.

Ancak diploid hücrelerinde var olması, elde edilen androgenik yapıların orjininin ileri moleküler teknikler yardımı ile şüpheyeye yer vermeden belirlenmesini gereğini düşündürmektedir.

15. İleriki çalışmalarda ploidi seviyesinin belirlenmesinde flow sitometrik yöntemin kullanılmasının daha güvenilir sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

16. Kallus dokusu içerisinde gözlenen trake elemanları, ayçiçeği anterlerinden oluşan kallusların hücre farklılaşmasını konu alan çalışmalara iyi bir deneme materyali oluşturacağını ve ayçiçeğinin model bitki olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

Abak, K. 1983. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Etme Üzerinde Araştırma. Ankara Ü. Ziraat F. Yıllığı. Cilt:33 s:155-163.

Abak, K. 1986. Biber Islahında Anter Kültüründen Yararlanma. Tübitak Bitki Islahı Sempozyumu Bildiri Özetleri. 15-17 Ekim, İzmir. Sayfa:64.

Achar, P.N. 2002. A Study of Factors Affecting Embryo Yields From Anther Culture of Cabbage. Plant Cell, Tissue And Organ Culture, V:69 p:183-188.

Ağaoğlu, Y. S. Ellialtıoğlu, Ş. Marasalı, B. Kalyon, D. 1998. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Androgenetik Kallus Oluşumu Üzerine Araştırmalar. II. Uluslar Arası Kızıllırmak Fen Bilimleri Kongresi, S:89-99, 20-22 Mayıs, Kırıkkale.

Akpınar, G. 2006. Embriyonik Kültür Yöntemiyle Yetiştirilen ve Soğukta Muhafaza Edilen Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Bitkilerinde Karyolojik ve Anatomik İncelemeler, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Hayati Arda, Edirne.

Alpsoy, H.C. 1999. Bazı Patlıcan Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Elde Edilmesi Üzerinde Araştırmalar. Uludağ Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa. 78 Sayfa.

Altındal, N. 2005. Çavdarda (*Secale cereale* L.) Anter Kültüründe Ploidi, Ön İşlem ve Besi Ortamı İçeriğinin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 70 S.

Amaury, M. Fernandez, A. Nakazaki, T. Yamagata, H. Tanisaka, T. 1997. Production of Doubled-Haploid Plants From *Lilium longiflorum* Thunb. Anther Culture. Plant Science, 123:179-187.

Arda, H. 2004. *In vitro* Regeneration and Callus Formation of Different Hybrid of the (Sunflower) *Helianthus annuus* L. Yielding in Turkish Trakya Region. Asian Jr. of Plant Sci., 3(6): 747-751.

Arı, E. 2006. Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*’da Anter Kültürü Çalışmaları. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 169 Sayfa, Adana.

Arıoğlu, H. H. 1999. Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı. Ç.Ü. Ziraat Fak. Yayın No:220, Ders Kitapları Yayın No: A-70, 204 S. Adana.

Baba, B. 1992. *Hordeum vulgare* L. (Arpa) Üzerine Anter Kültürünün Uygulanabilirliği. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir. Danışman. Prof. Dr. Günnehir Oğuz.39 S.

Bajaj, Y. P. S. 1983. *In vitro* Production of Haploids. In: Evans D. A., Sharp V.R., Ammirato P.V., Yamada Y., (Eds), Handbook of Plant Cell Culture, Mc. Millan Publ. Co. Vol.I Chapter 6, P. 228-287.

Baktemur, G. Yıldız, M. Büyükalaca, S. Abak, K. 2010. Kavunda (*Cucumis melo* L.) Uyarılmış Haploid Embriyoların Ayrılmasında Kullanılabilecek Yöntemler. Alatarım, 9 (1): 15-21.

Bal, U. 2002. Domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill.) İzole Edilmiş Mikrospor Kültürü, Ovaryum Kültürü Ve *Solanum sisymriifolium* Lam. İle Tozlama Yöntemleri İle Haploid Embriyo Oluşumunun Uyarılması. Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ. 157 Sayfa.

Bante, I. Sonke, T. Tandler, R.F. Van Den Bruel, A. M. R. Meyer, E. M. 1990. Anther Culture Of *Lolium perenne* And *Lolium multiflorum*. (R.S. Sangwan, B.S. Sangwan-Norreel, Eds.), The Impact Of Biotechnology In Agriculture. Kluwer Acad. Dordrecht. P.105-127.

Bhojwani, S. S. Razdan, M. K. 1996. Haploid Production. Studies in Plant Science, 5. Plant Tissue Culture: Theory And Practice, A Revised Edition. Elsevier.

Bohorova, N. Atanassov, A. Antonova, G. 1980. *In vitro* isolation of anthers from interspecific hybrids in the *Helianthus* genus. CR Acad. Sci. Bulg. 33: 1545–1548.

Bohorova, N. Atanassov A. Georgieva-Todorova J. 1985. *In vitro* organogenesis, androgenesis and embryo culture, in the genus *Helianthus* L. Z Pflanzenzüchtg 95: 35–44.

Bourgin, J. P. Nitsch, J. P. 1967. Obtention De *Nicotiana* Haploides A Partir D'etamines Cultivees In Vitro. Ann. Pysiol. Veget., 9: 377-382.

Büyükalaca, S. Çömlekçioğlu, N. Abak, K. Ekbiç, E. Kılıç, N. 2004. Effect of Silver Nitrate and Donor Plant Growing Conditions on Production of Pepper (*Capsicum annuum* L.) Haploid Embryos Via Anther Culture. Europ. J. Hort. Sci., 69 (5): 206-209.

Chen, Z. Z. Synder, S. Fan, Z. G. Loh, W. H. 1994. Efficient Production of Doubled Haploid Plants Through Chromosome Doubling of Isolated Microspores in *Brassica napus*. Plant Breeding. 113: 217-221.

Cho, U. H. 1991. Hormonal Aspects of Androgenetic Induction in Barley (*Hordeum vulgare* L.). Ph D Thesis, University of Guelph, Canada.

Chu, C. C. Hill, R. D. 1988. An Improved Anther Culture Method for Obtaining Higher Frequency of Pollen Embryoids in *Triticum aestivum* L. Plant Science, 55: 175-181.

Chu, C. C. Wang, C. C. Sun, C. S. Hsu, C. Yin, K. C. Chu, C. Y. Bi, F. Y. 1975. Establishment of an Efficient Medium for Anther Cultures of Rice Through Comparative Experiments on The Nitrogen Sources. Sci. Ein. 16: 659-668.

Coumans, M. Zhong, D. 1995. Doubled Haploid Sunflower (*Helianthus annuus*) Plant Production By Androgenesis: Fact Or Artifact? Part 2. *In vitro* Isolated Microspore Culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41: 203-209.

Çağlar, G. Abak, K. 1999. Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) *in situ* Uyartım Sonucu Elde Edilen Haploid Embriyolardan *in vitro* Haploid Bitki Oluşturma Tr. J. of Agriculture and Forestry 23:283–290.

Çömlekçiöğlü, N. 2001. Güneydoğu Anadolu Biber Populasyonlarının Dihaploidizasyon Yöntemiyle Islahı Ve Geleneksel Yöntemlerle Karşılaştırılması. Çukurova Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi), 349 Syf.

Çömlekçiöğlü, N. Büyükalaca, S. Abak, N. 2001. Effect of Silver Nitrate on Haploid Embryo Induction By Anther Culture in Pepper (*Capsicum annuum*). Xth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant. 9-13 April, Antalya. P: 133-136.

Dayan, S. 2006. Endemik ve Tehlike Altındaki *Thermopsis turcica* (Fabaceae)'nın *in vitro* Çimlenmesi ve Mikroçoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi, Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Danışman Yrd. Doç. Dr. Süleyman Cencki Afyon. 58 S.

Demir, İ. Turgut, İ. 1999. Genel Bitki Islahı, III. Basım, Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Yayınları, No: 496, Bornova, İzmir.

Dias, J. S. Martins, M. G. 1999. Effect of Silver Nitrate on Anther Culture Embryo Production of Different *Brassica oleracea* Morphotypes. Scientia Hort. 82 (299-307).

Downes, R. W. Marshall, R. 1983. “Colchicine-Induced Variants in Sunflower“ Euphytica 32: 757-766.

Drumeva, M. Berville, A. Ivanov, P. Nenova, N. Encheva1, J. 2005. Molecular Investigations on The Doubled Haploid Origin of Sunflower Lines (*Helianthus annuus* L.) Developed Through Gamma-Induced Parthenogenesis Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 19-3.

Dumas De Vault, R. Chambonnet, D. 1982. Culture *in vitro* D'antheres D'aubergine (S. Melongena L.) Stimulation De La Production De Plantes Qu Moyen De Traitements A +35 °c Associes A De Faibles Teneurs En Substances De Croissance. Agronomie 2, 10: 983-988.

Duran, R. E. 2007. Tuzlu Koşullar İçin Geliştirilebilecek Buğday Genotiplerinin Anter Kültürüne Cevabı. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Danışman Prof. Dr. Çiğdem Savaşkan, Isparta.

Eady, C. Lindsey, K. Twell, D. 1995. The Significance of Microspor Division and Division Symmetry for Vegetatif Cell-Specific Transcription and Generatif Cell Differentiation. The Plant Cell. Vol: 7: 65-74.

Eken, H. 2004. “Ayçiçeği” Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, T.E.A.E.– Bakış, Nüsha:11, Sayı:5.

Ellialtıoğlu, Ş. Sarı, N. Abak, K. 2002. Haploid Bitki Üretimi (M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan, Editörler), Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü Ve Uygulamaları. S.Ü.Vakfi Yayınları, Iı. Baskı, Konya, Syf:137-189.

Ellialtıoğlu, Ş. Tıpırdamaz, R. 1997. Soğuk Uygulamaları Ve Aktif Kömürün Patlıcan Ve Biberde İn Vitro Androgenesis Üzerine Etkileri. Tübitak- Togtag 87 No’lu Proje Sonuç Raporu, 70 Sayfa, Ankara.

Ellialtıoğlu, Ş. Tıpırdamaz, R. 2000. Patlıcan Anter Kültüründe İçsel Absizik Asit Miktarını Azaltıcı Uygulamaların Androgenetik Embriyo Oluşumuna Etkisi. Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi.24(1):23-32.

Emiroğlu, Ü. 1982. Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. Ege Ü.Z.F. Yayınları, Yardımcı Ders Kitabı. Yayın No: 450. Bornova, İzmir.38 Sayfa.

Engin Özü, M. 2006. Donör Bitkilerin Yetiştirme Koşulları ve Farklı Kültür Sıcaklıklarının Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Anter Kültüründe Haploid Bitki Rejenerasyonuna Etkileri Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Danışman: Prof. Dr. Rüştü Hatipoğlu, 57 Sayfa Adana.

Er, C. 1992. Bitki Islahında Doku Kültürleri. Tarım Ve Köyişleri Bakanlığı Yayını, Ankara. 83 Syf.

Fan, Z. Armstrong, K. C. Keller, W. A. 1988. Development of Microspores *in vivo* And *in vitro* in *Brassica napus*. Protoplasma,147:191-199.

Ferrie, A. M. R. Keller, W. A. 1997. Production of Haploids in *Brassica* Spp. Via Microspor Culture. Plant Tissue Culture Manuel, E6: 1-17. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Forster, B. P. Heberle-Bors, E. Kahsa, K. J. Touraev, A. 2007. “The Resurgence of Haploids in Higher Plants” Trends in Plant Science, v:12-8, p:368-375.

Foroughi-Wehr, B. Wenzel, G. 1993. Andro- And Parthenogenesis. In: Hayvard, M. D. Bosemark, N. O., Ramagosa, I., (Eds) Plant Breeding: Principles And Prospect. Chapman And Hall, London, Pp. 261-277.

Fosket, D. E. Torrey, J. G. 1969. “Hormonal Control of Cell Proliferation and Xylem Differentiation in Cultured Tissues of *Glycine max* var. Biloxi” Plant Physiol. 44. 871-880.

Gelebart, P. San, L. H. 1987. Production of haploid plants by *in vitro* culture of unfertilized ovaries and ovules of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Agronomie (Paris) 7: 81–86.

- Gencer, A. S. 2002.** Anther Kültürü Tekniği Kullanarak Ege Bölgesi İçin Küllemeye (*Erysiphe cichoracearum* L.) Dayanıklı Tütün Hatlarının Geliştirilmesi, Turk. J. Agric. For. 26: 63-69.
- Gentzbittel, L. Perrault, A. Nicolas, P. 1992.** Molecular Phylogeny of The *Helianthus* Genus Based on Nuclear Restriction-Fragment-Length Polymorphism (Rflp). Mol. Biol. Evol. 9: 872-892.
- George, E. 1996.** Plant Propagation By Tissue Culture. Part 2: In Practice. 2. Edition. Exegetics Limited.
- Glowacka, K. Jezowski, S. Kaczmarek Z. 2010.** "In vitro induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species" Industrial Crops and Products, 32: 88–96.
- Gürel, A. Nichterlein K. Freidt, W. 1991a.** Shoot regeneration from anther culture of sunflower (*Helianthus annuus*) and some interspecific hybrids as affected by genotype and culture procedure. Plant Breed 106: 68–76.
- Gürel, A. Kontowski, S. Nichterlein, K. W. Freidt, 1991b.** Embryogenesis in microspore culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Helia 14: 123–128.
- Gürel, E. Gürel S. 1998.** Plant Regeneration From Unfertilized Ovaries of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Cultured *in vitro*. Tr. J. Of Botany 22:233-238.
- Gürel, E. Kazan, K. 1998.** Development of an Efficient Plant Regeneration System in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Tr. J. of Botany 22:381-387.
- Hamaoka, Y. Fujita, Y. Iwai, S. 1991.** Effects of Temperature on The Mode of Pollen Development in Anther Culture Of *Brassica campestris*, Physiologia Plantarum, Volume 82, Pages 67–72.
- Hansen, N. J. P. Andersen, S. B. 1998.** Efficient Production of Doubled Haploid Wheat Plants By *in vitro* Treatment of Microspores With Trifluralin or Apm. Plant Breeding, 117: 401-405.
- Hatipoğlu, R. 1999.** Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü.Ziraat Fakültesi, Genel Yayın No:190, Ders Kitapları Yayın No: A-58, Adana. 178 Sayfa.
- Heberle-Bors, E. 1985.** *In vitro* Haploid Formation From Pollen: A Critical Review. Theoretical And Applied Genetics. 71: 361-374.
- Heidstra, R. Yang, W. C. Yalcın, Y. Peck, S. Emons, A. Kammen, A. Bisseling, T. 1997.** Ethylene Provides Positional Information on Cortical Cell Division But Is Not Involved in Nod Factor-Induced Root Hair Tip Growth in *Rhizobium*-Legume Interaction. Development (127): 1781-1787.

Heiser, C. B. 1978. Taxonomy of *Helianthus* and Origin of Domesticated Sunflower. In: Sunflower Science and Technology. Ed. Carter, J.F. No:19. Asa, Cssa, Sssa, Inc. Publisher Madison, Wisconsin, Usa. P.31-53.

Herrera, J. C. Moreno, L. G. Acuña, J. R. De Peña, M. Osorio, D. 2002. Colchicine-Induced Microspore Embryogenesis in Coffee Plant Cell, Tissue and Organ Culture Volume 71, Number 1, 89-92.

Hess, D. 1992. Biothecnologie Der Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, P.173.

Hu, H. Zeng, J. Z., 1984. Development of New Varieties via Anther Culture Ammirato, Evans, Sharp And Yamada, Editors). Handbook Of Plant Cell Culture, Crop Species. Vol:3. Mc Millan Publishing Company. P: 65-89.

Jan, C. C. 1997. Cytology and Interspecific Hybridization. In: Sunflower Technology and Production. Ed. Schneiter, A.A. P. 497-558. American Society Of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, Usa.

Johansson, L. Eriksson T. 1977. Induced Embryo Formation in Anter Culture of Several *Anemone* Specis. *Physiol. Plant.*, 40: 172-174.

Karakullukçu, Ş. 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerine Araştırmalar. A.Ü. Fen Bil. Enst. Doktora Tezi. Ankara 131 S.

Kaya, M. D. 2003. Orta Anadolu'da Ayçiçeği Yetiştirme Tekniği. Türk-Koop. Ekin Dergisi, Yıl:7, Sayı:24, Sayfa:20-25.

Kaya, Y. 2004. "Ayçiçeği Biyoteknolojisinde Son Gelişmeler ve Islahında Kullanım Olanakları" Trakya University Journal Of Science, 5(2):141-147.

Kaya, Y. Evcı, G. Demirci, M. 2003. Broomrape (*O. Cernua* Loeffl.) and Herbicide Resistance Breeding in Sunflower (*H. Annuus* L.) in Turkey. The Proc. Abstracts Of 6th European Sunflower Biotechnology Conf. October 6-10. Sevilla, Spain.

Kim, M. Kim, J. Yoon, M. Choi, D-II., Lee, K-M. 2004. Origin of Multicellular Pollen and Pollen Embryos in Cultured Anthers of Pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*, 77: 63-72.

Kirichenko, V. V. Sharopova, N. R. Popov, V. N. Maklyak, E. N. Berville, A. Tersac, M. 1999. Potential Use of Polymorphism of Isoenzymes in Selective-Genetical Programs for Sunflower (*H. annuus* L.). *Helia*, 22:149-154.

Kolsarıcı, Ö. Başlama, D. İşler, N. Arioğlu, H. Gür, A. Olhan, E. ve Sağlam, C. 2000. Yağ Bitkileri Üretimi. Türkiye Ziraat Mühendisliği 5.Teknik Tarım Kongresi, S: 485-503,17-21 Ocak, Ankara.

Kott, L. S. Polsoni, L. Ellis, B. Beverdorf, W. D. 1988. Autotoxicity in Isolated Microspore Cultures of *Brassica napus*. *Canadian Journal Of Botany*, 66: 1665-1670.

Köseali, N. 2000. Stark Spur Golden Delicious Elma Çeşidinde Şeker, Aktif Kömür ve Işığın *in vitro* Androgenesis Üzerine Etkileri. A.Ü. Fen. Bil. Enst. Yüksek Lisans Tezi.47 S.

Kupicha, F. K. 1975. *Helianthus* L. In: Flora of Turkey and The East Aegean Island. Ed. Davis, P.H. Edinburh Univ. Pres. P. 44-45.

Kurt, O. Evans, G. M. 1998. Anther Culture Potential of Linseed (*Linum usitatissimum* L.):Effects of Genotypes and Pretreatment on Callus formation and Differentiation. Tr. J. Of Agriculture And Forestry. 22: 553-560.

Kurtar, E. S. 1999. Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Haploid Embriyo Uyartımı ve Bitki Oluşturma Üzerine Araştırmalar. Ç. Ü. Fen Bilimleri Ens. Doktora Tezi, Adana, 203 S.

Kyo, M. Harada, H. 1985. Studies on Conditions for Cell Division and Embryogenesis in Isolated Pollen Culture of *Nicotiana rustica*. Plant Physiology, 79: 90-94.

Liao, Z. Chen, M. Tan, F. Sun, X. Tang, K. 2004. “Micropropagation of endangered chinese aloe” Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76: s.83-86.

Lloyd, G. McCown, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*). Comb. Proc. Inter. Plant Prop. Soc. 30:421-427.

Luckett, D. J. Darvey, N. L. 1992. Utilisation of Microspore Culture in Wheat and Barley Improvement. Australian Journal of Botany, 40, 807-828.

Malik, M. R. Rangaswamy, N. S. Shivanna, K. R. 2001. Induction of Microspor Embryos in A Cms Line Of *Brassica juncea* and Formation of The Androgenic Plantlets. Euphytica, 120: 195-203.

Mensuali-Sodi, A. Panizza, M. Serra, G. Tagnoni, F. 1993. Involvement of Activated Charcoal in The Modulation of Abiotic and Biotic Ethylene Levels in Tissue Cultures. Scientia Horticulturae, 54: 49-57.

Meriç, Ç. 2002. “Erkek Fertil Ve Sitoplazmik Erkek Steril *Helianthus annuus* L. Üzerinde Sitolojik Ve Sitoembriyolojik Araştırmalar” Danışman: Prof.Dr. Göksel Olgun. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Doktora Tezi).

Merzlyak, M. N. Chivkunova, O. B. 2000. Light-stress-induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Volume 55, Issues 2-3, 30 Pages 155-163.

Morrison, R. A. Köning, R. E. Evans, D. A. 1986. Anther Culture of Interspecific Hybrid of *Capsicum*. J. Plant Physiol., 126, 1: 1-9.

Murashige, T. Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant.15: 473- 497.

- Mythili, J. B. Thomas, P. 1995.** Some Factors Influencing *in vitro* Establishment and Callusing of Anthers in Capsicum (*Capsicum annuum* L. Var. *grossum* Sendt.). Indian Journal of Plant Physiology, 38(2): 126-130.
- Nair, S. P. Gupta, K. Mascarenhas, A. F. 1983.** Haploid plants from *in vitro* anther culture of *Annona squamosa* Linn. Plant Cell Rep. 2: 198–200.
- Navarro-Alvarez, W. Baenziger P. S. Eskridge, K. M. Hugo, M. Gustafson V. D. 1994.** “Addition of Colchicine to Wheat Anther Culture Media to Increase Doubled Haploid Plant Production”. Plant Breeding v:112, i:3, p:192–198.
- Nitsch, J. P. 1969.** Experimental Androgenesis in Nicotiana, Phytomorphology, 19: 389-404.
- Nurhidayah, T. Horn, R. Riicher, T. Friedt, W. 1996.** High Regeneration Rates in Anther Culture of Interspecific Sunflower Hybrids, Plant Cell Reports 16:L 67-173.
- Ozias-Akins, P. Vasil, I. K. 1985.** Nutrition of Plant Tissue Culture. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol:2, İK Vasil, Ed. Academic Press Inc.
- Önemli, F. 2005.** Ayçiçeğnin (*Helianthus annuus* L.) Kendilenmesinde ve Melezlemede Kullanılan Tabla İzolasyon Materyallerinin Verim Unsurlarına Etkisi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi/Journal Of Tekirdağ Agricultural Faculty, 2:(1).
- Özkum, D. Tıprıdamaz, R. Ellialtıoğlu, Ş. 2000.** Relationship Between Endogenous Abscisic Acid Content of Anthers And *in vitro* Androgenesis in Pepper (*Capsicum annuum* L.) 4th Int. Symp On *in vitro* Culture And Horticultural Breeding, 2-7 July, Tampere, Finland.
- Özyiğit, I. I. Gözükırmızı, N. Semiz, B. D. 2006.** Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Embryos of Sunflower. Russian Journal of Plant Physiology, Vol. 53, No. 4, pp. 556–559.
- Pierik, R. L. M. 1989.** *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 344 Pages.
- Pintos, B. Manzanera, J. A. Buena, M. A. 2007.** Antimitotic Agents Increase The Production of Doubled-Haploid Embryos From Cork Oak Anther Culture. Journal of Plant Physiology 164:1595-1604.
- Popielarska, M. Przywara, L. 2003.** *In vitro* Culture of Isolated Living Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Embryo Sacs. Sex Plant Repord 16:23–33.
- Pugliesi, C. Mecale, P. Cecconi F. Baroncelli, S. 1993.** Organogenesis and embryogenesis in *Helianthus tuberosus* and in the interspecific hybrid *Helianthus annuus* X *Helianthus tuberosus*. Plant Cell Tiss Org Cult 33: 187–193.

Quilet, M. C. Vear, F. Branlard, G. 1992. The Use of Polymorphism For Identification of Sunflower (*H. annuus* L.) Inbred Lines. J. Genet. Breed. 46: 295-304.

Rashid, A. Reinert, J. 1980. Selection of Embryogenic Pollen From Cold-Treated Buds of *Nicotiana tabacum* Var. Badischer Burley and Their Development Into Embryos in Cultures. Protoplasma, 105: 161-167.

Rashid, A. Street, H. E. 1973. The Development of Haploid Embryoids From Anther Culture of *Atropa belladonna* L., Planta, 113:263-270.

Razdan, M. K. 1992. Haploid Production. An Introduction to Plant Tissue Culture. Oxford and IBH. Pub. s:105-124.

Rieseberg, L. H. Seiler, G. 1990. Molecular Evidence and The Origin and Development of The Domesticated Sunflower (*H. annuus* L.). Econ. Bot. 44 (3) : 79-91.

Rotino, G. Falavigna, A. Fiume, F. Nervo, G. Restaino, F. 1987. Possibility of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Improvement Through *in vitro* Techniques. Genetica Agraria, Vol:XII, N:3, 314-315, Roma.

Roy, S. C. Sarkar, A. 1991. *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. Sci. Hort. 47: 107–113.

Rubuluza, T. Nikolova, R. V. Smith, M. T. Hannweg, K. 2007. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine”South African Journal of Botany 73:259–261.

Saidi, N. Cherkaoui, S. Chlyah, A. Chlyah, H. 1997. Embryo Formation and Regeneration in *Triticum turgidum* ssp. *durum* Anther Culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51, 27-33.

Saji, K. V. Sujatha, M. 1998. Embryogenesis and Plant Regeneration in Anther Culture of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Euphytica 103: 1–7.

Sakin, M. A. 1994. Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Anter Kültüründe Genotip ve Besi Ortamının Haploid Bitki Oluşumuna Etkileri Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana, 56 s.

San Noeum, L. H. 1976. Haploides D’*Hordeum vulgare* L. Par Culture *in vitro* D’ovaries Non Fécondés. Ann. Amélior. Plantes, 26, 4: 751-754.

Sangwan-Norreel, B. S. 1977. Androgenic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain culture of *Datura innoxia* Mill. J Exp Bot 28: 843–852.

Sayılr, A. Özzambak, E. 2005. Biber Anter Kültüründe Uygun Tomurcuk Büyüklüğü İle Besin Ortamı İçeriklerinin Embriyo Verimine Etkileri Üzerine Bir Araştırma. Ege Üniv. Ziraat. Fak. Derg. 42(3):1-11.

Seçmen, Ö. Gemici, Y. Leblebici, E. Görk, G. Bekat, L. 1992. Tohumlu Bitkiler Sistematiği. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:116 İzmir.

Seiler, G. J. 1997. Anatomy and Morfology of Sunflower. In sunflower Technology and Production. Ed. Schneiter, A.A. No: 35 Asa, Cssa, Sssa, Inc. Publisher Madison, Wisconsin, Usa. P. 67-111.

Shtereva, L. A. Zagorska, N. A. Dimitrov, B. D. Kruleva, M. M. Oanh, H. K. 1998. Induced Androgenesis in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). II. Factors Affecting Induction of Androgenesis. Plant Cell Reports. 18: 312-317.

Smykal, P. 2000. Pollen Embriyogenesis – The Stress Mediated Switch From Gametophytic to Sporophytic Development. Current Status And Future Prospects. Biologia Plantarum, 43 (4): 481-489.

Sudripta D, Timir B. J. Sumita J. 1999. Factors affecting *in vitro* development of embryonic axes of cashewnut. Sci. Hort. 82: 135–144.

Sunderland, N. 1974. Anther Culture as a Means of Haploid Production. (K. J. H. Kasha, Editor). Haploids in Higher Plants. Advances And Potential. Univ. Of Guelph, Guelph. Pp. 91-122.

Sunderland, N. Dunwell, J. M. 1977. Anther and Pollen Culture (H.E. Street Editor). Botanical Monographs, Volume:11: Plant Tissue and Cell Culture, Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford. P: 223-266.

Sunderland, N. Roberts, M. 1977. New approach to polen culture. Nature (London) 270: 236–238.

Sunderland, N. Roberts, M. 1979. Cold-Pretreatment of Excised Flower Buds in Float Culture of Tobacco Anthers. Annual Botany 43:405-414.

Svensson, M. Johansson, L. B. 1994. Anther Culture Of *Fragaria X ananassa*: Environmental Factors and Medium Components Affecting Microspore Divisions and Callus Production. Journal Of Horticultural Science, 69 (3): 417-426.

Tang, S. Yu, J. K. Slabaugh, M. B. Shintani, D. K. Knapp, S. J. 2002. Simple Sequence Repeat Map of The Sunflower Genome. Theor. Appl. Genet. 105 (8) : 1124-1136.

Taşkın, H. 2005. Bazı Biber Genotiplerinde Anter Kültürü İle Haploid Embriyo Uyarımında Embriyo Kalitesinin Artırılmasına Yönelik Bazı Uygulamalar. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Adana, Danışman: Prof. Dr. Saadet Büyükalaca, 72 sayfa.

Thengane, S. R. Joshi, M. S. Khuspe, S. S. Mascarenhas A. E. 1994. Anther Culture in *Helianthus annuus* L., Influence of Genotype and Culture Conditions On Embryo Induction And Plant Regeneration. Plant Cell Reports 13:222-226.

Todorova, M. Ivanov, P. Nenova N. Encheva, J. 2004. Effect of Female Genotype on The Efficiency of γ -Induced Parthenogenesis In Sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Helia*, 27, Nr. 41, p.p. 67-74.

Todorova, M. Ivanov, P. Shindrova, P. Christov M. Ivanova I. 1997. Doubled Haploid Production of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Through Irradiated Pollen-Induced Parthenogenesis *Euphytica* 97: 249–254.

Todorovic, R. R. Mistic, P. D. Petrovic, D. M. Mirkovic, M. A. 1991. Anther Culture Of Peach Cultivars ‘Cresthaven’ and ‘Vesna’. *Acta Horticulturae*, 300: 331-333.

Tomes, D. T. 1990. Current research in biotechnology with application to plant breeding. In: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, 23-32.

Touraev, A. Vicente, O. Heberle-Bors, E. 1997. Initiation Of Microspor Embryogenesis By Stress. *Trends In Plant Science* Vol:2 (8): 297-302.

Tuberosa R. Sanguinetti, M. C. Conti, S. 1987. Anther Culture Of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Lines And Hybrids, *Genetica Agraria*, 41: 267- 274.

Vijaya Priya, K. Sassikumar, D. Sudhagar, R. Gopalan, A. 2003. Androgenetic Response Of Sunflower In Different Culture Environments. *Helia*, 26, Nr. 38, p.p. 39-50.

Wenzel, G. Foroughi-Wehr, B. 1994. Production And Use Of Isogenic Lines (I.K. Vasil and T.A.Thorpe, Editör). *Plant Cell And Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda, P:153-172.

Wernicke, W. Kohlenbach, H. W. 1976. Investigations On Liquid Culture Medium As A Means Of Anther Culture In *Nicotiana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 79: 189-198.

Yang, H. Y. Zhou, C. Cai, D. Yan, H. Wu Y. Chen, Y. M. 1985. *In vitro* culture of unfertilized ovules in *Helianthus annuus* L. In: H. Hu & H.Y. Yang (Eds.), *Haploids of Higher Plants In vitro*, pp. 182–191. China Academic Publishers, Beijing, Springer,Verlag, Berlin.

Yılmaz, Ö. E. 2005. Yazlık Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Ovaryum Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Prof. Dr. Gülat Çağlar, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 57 sayfa.

Yu, J. K. Mangor, J. Thompson, L. Edwards, K. J. Slabaugh M. B. Knapp, S. J. 2002. Allelic Diversity Of Simple Sequence Repeat Markers Among Elite Inbred Lines In Cultivated Sunflower. *Genome* 45: 652–660.

Zamir, D. Jones, R. A. Kedar, N. 1980. Anther Culture Of Male-Sterile Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Mutants. *Plant Science Letters* 17: 353-361.

Zhong, D. Michaux-Ferrere, N. Coumans, M. 1995. Assay For Doubled Haploid Sunflower (*Helianthus annuus*) Plant Production By Androgenesis : Fact Or Artifact? Part 1. *In vitro* Anther Culture Plant Cell, Tissue And Organ Culture 41: 91-97.

Zhou, W. J. Hagberg, P. Tang, G. X. 2002. Increasing Embryogenesis And Doubling Efficiency By Immediate Colchicine Treatment Of Isolated Microspores In Spring Brassica Napus Euphytica 128: 27-34.

Zhu, Z. Wu, H. 1979. *In Vitro* Production Of Haploid Plantlets From The Unpollinated Ovaries Of *Triticum aestivum* And *Nicotiana Tabacum*. Acta Genet. Sin. 6: 181-183.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Keşan'ın Kılıçköy'ünde dünyaya geldim. İlk okulu bu köyde, orta okul ve liseyi Keşan'da bitirdim. 1999 yılında başladığım Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimimi 2003 yılında tamamladım. Aynı yıl, aynı üniversitede başladığım yüksek lisans eğitimimi "Endemik ve Tehlike Altındaki *Thermopsis turcica* (Fabaceae)'nın *in vitro* Çimlenmesi ve Mikroçoğaltımı" adlı tez ile 2006 yılında tamamladım. 2007'de Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladığım doktora eğitimimi bu tez ile tamamladım. 2009 yılından bu yana Trakya Üniversitesi Havsa Meslek Yüksek Okulu Park ve Bahçe Bitkileri Bölümü'nde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim.

A- ULUSAL HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

A1. Mustafa KARGIOĞLU, Süleyman CENKÇİ, **Sergun DAYAN** "Endemic Plant Species and Their Endangered Categories Vegetated in the Boundary of Afyonkarahisar Province in Turkey" Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi, Cilt:7 Sayı:1 287-311 (2007).

B- ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

B1. Süleyman CENKÇİ, Mustafa KARGIOĞLU , **Sergun DAYAN** and Muhsin KONUK "Endangered Status and Propagation of Endemic Plant Species, *Thermopsis turcica* (Fabaceae)" Asian Journal of Plant Sciences 6 (2): 288-293, (2007)

B2. Süleyman CENKÇİ, Mustafa KARGIOĞLU , **Sergun DAYAN** and Muhsin KONUK "In Vitro Propagation Of An Endangered Plant Species, *Thermopsis Turcica*" Biologia 63 (5): 652-657,2008. (SCI Expanded)

B3. Ciler MERİC, Necmettin GULER, Hayati ARDA, **Sergun DAYAN** "Nuclear DNA content of an endemic taxon from Turkey; *Trachelium jacquini* (Sieber) Boiss. subsp. *dalgiciorum* N. Özhatay & Dane (Campanulaceae)" Biotechnology, 7 (3): 595-598, 2008.

B4. Süleyman CENKÇİ, Mehmet TEMEL, Mustafa KARGIOĞLU, **Sergun DAYAN** "Propagation of Endangered *Thermopsis turcica* Tan, Vural & Küçüköyük Using Conventional and In Vitro Techniques" Turkish Journal of Biology, Turkish Journal of Biology.(33), 327-333 (2009). (SCI Expanded)

B5. Çiler Meriç, Hayati Arda, Necmettin Güler & **Sergun Dayan** “Chromosome number and nuclear DNA content of *Centaurea kilaea* (Asteraceae), an endemic species from Turkey” *Phytologia Balcanica* 16 (1): 11 – 16 Sofia, 2010.

C-ULUSAL KONGRELERDE SUNULAN BİLDİRİ VE POSTERLER

C1. Süleyman CENKÇİ, Mustafa YILDIZ, **Sergun DAYAN**, Mustafa KARGIOĞLU, Muhsin KONUK “Endemik ve Tehlike Altındaki *Thermopsis turcica*’nın Kallus Oluşumu ve Bitki Rejenerasyonu” XIV. Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos – 2 Eylül 2005, ESKİŞEHİR (Poster).

C2. Süleyman CENKÇİ, Mustafa KARGIOĞLU, **Sergun DAYAN**, Cennet ÖZAY, Muhsin KONUK “Türü Tehlike Altında Olan *Thermopsis turcica*’nın Klasik Ve Bitki Doku Kültürü Yöntemleri İle Çoğaltımı” “VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi” 10-13 Eylül 2007, Malatya (Bildiri).

C3. **Sergun DAYAN**, Cennet ÖZAY, Mehmet TEMEL, Musa TÜRKER, Mustafa KARGIOĞLU, Süleyman CENKÇİ “Tehlike Altındaki *Sideritis akmanii*’de (Lamiaceae) Tohum Çimlenmesi” “VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi” 10-13 Eylül 2007, Malatya (Poster).

C4. Hayati ARDA, **Sergun DAYAN**, Çiler MERİÇ, Necmettin GÜLER “Doku Kültürü Yöntemiyle Çoğaltılan Ve Soğukta Muhafaza Edilen Endemik *Centaurea Kilaea* Boiss. Bitkisi Üzerinde Morfolojik Ve Anatomik İncelemeler” 19. Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2008, Trabzon (Poster).

C5. Hayati ARDA, Umut ERDOĞAN, **Sergun DAYAN** “Endemik Ve Tehlike Altındaki *Silene Sangaria* (Coode Et Cullen)’nın İn Vitro Koşullarda Tohum Çimlenmesi Ve Fide Gelişimi” 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, DENİZLİ.

D-ULUSLARARASI KONGRELERDE SUNULAN BİLDİRİ VE POSTERLER

D1. Mustafa KARGIOĞLU, Süleyman CENKÇİ, **Sergun DAYAN** “Endemic Plant Species And Their Endangered Categories Vegetated In The Boundary Of Afyonkarahisar Province In Turkey” II. International Environmental Protection Symposium, 8-10th September 2005, KÜTAHYA (Poster).

D2. Hayati ARDA, Çiler MERİÇ, Necmettin GÜLER, **Sergun DAYAN** “Effect Of Low Temperature On Morphological And Anatomical Features Of *Dianthus İngoldbyi* Turrill Shoots Propagated Via Tissue Culture Techniques” 5th Balkan Botanical Congress, Belgrade, Serbia, September, 07-11,2009.

F-DİĞER YAYINLAR

F1.Sergun DAYAN “Endemik ve Tehlike Altındaki *Thermopsis turcica* (Fabaceae)’nın in vitro Çimlenmesi ve Mikroçoğaltımı” Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ABD, Ocak 2006, AFYONKARAHİSAR. (Danışman: Yrd. Doç. Dr Süleyman CENKÇİ, Yüksek Lisans Tezi).

F2. Sergun DAYAN “Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus*) Anter Kültürü Yolu ile Haploid Bitki Eldesi Üzerine Araştırmalar” Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Botanik ABD, EDİRNE, (Danışman: Yrd. Doç. Dr Hayati ARDA, Doktora Tezi).

E-PROJELER

E1. Hayati ARDA, Çiler MERİÇ, Necmettin GÜLER, **Sergun DAYAN**, “ Trakya Bölgesinde Yetişen Bazı Endemik ve Nadir Bitkilerin Doku Kültürü Yöntemleri ile Çoğaltılması ve Korunması” Trakya Üniversitesi, Araştırma Fonu, TUBAP No: 763, (2006- 2009), EDİRNE.

E2. Hayati ARDA, **Sergun DAYAN** “Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus*) Anter Kültürü Yolu ile Haploid Bitki Eldesi Üzerine Araştırmalar” Trakya Üniversitesi, Araştırma Fonu, TUBAP No: 2009-92, (2009- Devam ediyor), EDİRNE.

E3. Ayhan AYTAÇ, Hakan OKURSOY, Adnan ÇOLAK, **Sergun DAYAN** ““Ekonomik Öneme Sahip Bazı Süs Bitkilerinin Doku Kültürü Yöntemleri ile Çoğaltılması ve Maliyetinin Hesaplanması Üzerine Araştırmalar” Trakya Üniversitesi, Araştırma Fonu, TUBAP No: 2010-148, (2010- Devam ediyor), EDİRNE.

E4. Hakan OKURSOY, Ayhan AYTAÇ, Talat GÜLER, Adnan ÇOLAK, **Sergun DAYAN** ve Serdar ERDOĞAN. "Havsa Meslek Yüksekokulunun Eğitim Öğretiminin Geliştirilmesi" Proje Yöneticisi. TÜBAP 2011-83. Proje Devam Ediyor.