



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AYÇİÇEĞİNDE (*Helianthus annuus* L.)
MİKROSPOR İZOLASYONU VE *IN VITRO*
KÜLTÜR KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

Ecem DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Yıldız AYDIN

İSTANBUL, 2017



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AYÇİÇEĞİNDE (*Helianthus annuus* L.)
MİKROSPOR İZOLASYONU VE *IN VITRO*
KÜLTÜR KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU**

Ecem DOĞAN

520114007

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Yıldız AYDIN

İSTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Ecem Doğan'ın "Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) Mikrospor İzolasyonu ve in vitro Kültür Koşullarının Optimizasyonu" başlıklı tez çalışması, 26 Mayıs 2017 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Yıldız AYDIN (Danışman)

Marmara Üniversitesi (İMZA)

Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCULOĞLU (Üye)

Marmara Üniversitesi (İMZA)

Doç.Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT (Üye)

Gebze Teknik Üniversitesi (İMZA)

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06.07.2017 tarih ve 2017/14-02 sayılı kararı ile Ecem DOĞAN'ın Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Uğur YAHSİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek bu çalışmayı yapmama fırsat veren ve yapıcı, yönlendirici fikirleri ile beni daima pozitif şekilde destekleyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Yıldız AYDIN'a ve çalışmanın her adımındaki destekleriyle bu çalışmayı ortaya koymamda katkı sağlayan hocam sayın Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasındaki materyalleri elde etmemi sağlayan Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü ayçiçek ıslah programı koordinatörü sayın Göksel EVCİ'ye, sitolojik çalışmalarda bilgi ve yardımlarıyla bana büyük destek veren hocam sayın Doç. Dr. Filiz VARDAR'a, bu çalışmayı ortaya koymamda çok büyük katkı ve yardımları olan laboratuvar arkadaşlarım Elif ÇAKMAK, Ezgi ÇABUK ŞAHİN, Nilay YÖNET, Zeyneb Nur ŞAHİN ve Nilüfer AKGÜL'e, Marmara Üniversitesi'ne ve tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK (1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı -Proje No: 214O274)'a teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getirip, bugün buralarda olmamı sağlayan ve hem maddi hem de manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli annem Şehriban DOĞAN'a ve kardeşim Emrecan DOĞAN'a sonsuz teşekkürler. Hayatımın her anında ve bu tez çalışmam boyunca tecrübeleri ve maddi, manevi desteğiyle her zaman yanımda olup bana inanan, desteğini ve inancını halen hissettiğim çok kıymetli babam Hanefi DOĞAN'ın aziz ruhuna sonsuz kere teşekkür ederim.

Ecem DOĞAN

Mayıs, 2017

| <u>İÇİNDEKİLER</u> | <u>SAYFA</u> |
|---|---------------------|
| TEŞEKKÜR | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| SEMBOLLER | vi |
| KISALTMALAR | vii |
| ŞEKİL LİSTESİ | viii |
| TABLO LİSTESİ | x |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Ayçiçeğinin (<i>Helianthus annuus</i> L.) Genel Özellikleri ve Tarımı | 1 |
| 1.1.1. Ayçiçeği ıslahı | 6 |
| 1.2. Haploid Bitki Üretimi | 10 |
| 1.2.1. Androgenesis (erkek gamet) yoluyla haploid bitki eldesi | 13 |
| 1.2.1.1. Androgenesis etkileyen faktörler | 14 |
| 1.2.1.2. Anter kültürü | 18 |
| 1.2.1.3. Mikrospor kültürü | 20 |
| 1.2.2. Ginogenesis (dişi gamet) yoluyla haploid bitki eldesi | 23 |
| 1.2.2.1. Ovul ve ovaryum kültürleri | 23 |
| 1.2.2.2. Eksik veya yetersiz polenlerle tozlama | 24 |
| 1.2.3. Kromozom eliminasyonu | 25 |
| 1.3. Ploidi Belirleme | 26 |
| 2. MATERYAL VE YÖNTEM | 28 |
| 2.1. Bitki Materyali | 28 |
| 2.2. Bitki Materyalinin Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi | 30 |
| 2.3. Kapitulum Eldesi | 32 |
| 2.3.1. Bitki yetiştirme odasından kapitulum eldesi | 32 |
| 2.3.2. Tarladan kapitulum eldesi | 33 |
| 2.4. Kapitulumların Boyutlarının Belirlenmesi | 33 |
| 2.4.1. Ezme preparat yöntemi | 34 |
| 2.5. Mikrospor Kültürü Çalışmaları | 35 |

| | |
|--|----|
| 2.5.1. Mikrospor izolasyonu | 35 |
| 3. BULGULAR ve TARTIŞMA | 49 |
| 3.1. Bitki Materyali | 49 |
| 3.2. Bitki Materyalinin Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi | 49 |
| 3.3. Kapitulum Eldesi | 50 |
| 3.3.1. Bitki yetiştirme odasından kapitulum eldesi | 50 |
| 3.3.2. Tarladan kapitulum eldesi | 50 |
| 3.4. Kapitulumların Boyutlarının Belirlenmesi | 51 |
| 3.4.1. Bitki yetiştirme odasında yetiştirilen kapitulumların boyutlarının belirlenmesi | 51 |
| 3.4.2. Tarladan temin edilen kapitulumların boyutlarının belirlenmesi | 52 |
| 3.5. Mikrospor Kültürü Çalışmaları | 53 |
| 3.5.1. Mikrospor izolasyonu | 53 |
| 4. SONUÇLAR | 61 |
| KAYNAKLAR | 64 |
| ÖZGEÇMİŞ | 76 |

ÖZET

AYÇİÇEĞİNDE (*Helianthus annuus* L.) MİKROSPOR İZOLASYONU VE *IN VITRO* KÜLTÜR KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

İzole mikrospor kültürü, bitki ıslah programlarında yararlanılan embriyogenesis ve dihaploid bitki eldesi için önemli bir kaynak oluşturur.

Bu tez çalışmasında ayçiçeğinde mikrospor kültürü için uygun koşulların belirlenmesi farklı protokoller uygulandı. Bu amaçla, kapitulum yüzey sterilizasyon prosedürü, kapitulumlar için en uygun yaş ve büyüklük, anterden mikrospor izolasyonu ve farklı ayçiçeği genotiplerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlardaki besin ortamlarındaki yanıtları denenilen dört protokol için değerlendirildi.

Protokol 1 ve Protokol 2’de NLN besin ortamı, Protokol 3’de sukroz (30 g/l) ve jelrit (7 g/l) eklenmiş MS besin ortamı, Protokol 4’de ise 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l kinetin hormonlarını içeren B5 besin ortamı kullanılmıştır. Protokol 4’de diğer protokollerden farklı olarak çiçekçiklerden izole edilen anterlere ilk 7 gün boyunca 32 °C sıcaklık ve 0,3 M mannitol içeren ortamda ön uygulama yapılmıştır.

Orta-geç safhada tek nukleuslu mikrospor içeren anterler ezme preparat yöntemiyle seçilerek mikrospor izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm protokollerdeki örnekler kültüre alındıktan sonra inkübatörde kültüre alınmış ve düzenli aralıklarla incelenmişlerdir. Protokol 1’de inkübatöre alınan kültür örnekleri bir gün sonra ek santrifüjleme işleminden geçirilerek tekrar inkübasyona bırakılmışlardır. Protokol 2 ile yapılan çalışmada kallus elde edilmiştir.

Kullanılan ayçiçeği genotiplerinde mikrospor izolasyonu kallus eldesi sağlanmasına rağmen, kültürlerde görülen kontaminasyon probleminin, kallus gelişimini engellediği görülmüştür ve bitki rejenerasyonu elde edilememiştir, planlanan çalışmalarla sözü edilen problemlerin çözülmesi hedeflenmektedir.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF MICROSPORE ISOLATION AND *IN VITRO* CULTURE CONDITIONS IN SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.)

An isolated microspore culture provides an excellent system for the study of microspore induction and embryogenesis, and can produce doubled haploid plants, which are used to accelerate plant-breeding programs.

The present study has been an attempt to develop a suitable protocol for microspor culture of sunflower. For this purpose, capitulum sterilization procedure, the most suitable capitula along with their suitable age and size, microspore isolation from anther tissues and the callus induction and regeneration responses different genotypes were investigated under different concentrations and combinations of phytohormones in four protocol of the attempted.

NLN nutrient medium in Protocol 1 and Protocol 2, MS medium supplemented with sucrose (30 g/l) and gelrite (7 g/l) in Protocol 3, B5 nutrient medium containing 0.2 mg/l kinetin and 0.1 mg/l 2,4-D hormones in Protocol 4 was used. In protocol 4, anthers isolated from florets, unlike other protocols, were pretreated for the first 7 days in medium containing 32 °C temperature and 0.3 M mannitol.

In the mid-late phase, anthers containing single nucleus microspores were selected by crushing preparation method and microspor isolation was performed. The samples in all protocols were incubated after culturing and were examined at regular intervals. In protocol 1, culture samples taken from the incubator were subjected to additional centrifugation one day later and then allowed to incubate again. Callus was obtained in study with protocol 2.

Although microspore isolation and callus from microspores were induced, the presence of contamination in cultures usually results in reduced callus proliferation and could not be achieved plant regeneration.

SEMBOLLER

| | |
|-----------------------|---------------------------|
| % | : Yüzde |
| °C | : Santigrat derece |
| cm | : Santimetre |
| g | : Gram |
| L | : Litre |
| Mg | : Miligram |
| n | : Haploid kromozom sayısı |
| 2n | : Diploid kromozom sayısı |
| CO₂ | : Karbondioksit |
| mm³ | : Milimetre küp |
| g/l | : Gram/litre |
| mg/l | : Miligram/litre |
| M | : Molar |
| Mm | : Milimetre |

KISALTMALAR

2,4-D : 2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit

B5 : Gamborg besi ortamı

BA : Benzil Adenin

DAPI : 4', 6-diaminido-2-phenylindole

IAA : İndol-3 Asetik Asit

MS : Murashige ve Skoog besin ortamı

NAA : Naftalen Asetik Asit

NLN : Litcher besin ortamı

CMS : Sitoplazmik erkek kısırlık

MAS : Marker assisted selection

N6-MS: Chu besin ortamı- Murashige ve Skoog besin ortamı

EMS : Etil metanosülfat

DH : Dihaploid

DNA : Deoksiribo nükleik asit

HCl : Hidroklorik asit

NaOH: Sodyum hidroksit

pH : Power of hydrogen

SEKİL LİSTESİ

SAYFA

| | |
|--|----|
| Şekil 1. 1 Ayçiçeği bitkisi. | 1 |
| Şekil 1. 2 Ayçiçeğinin çiçek yapısını gösteren anatomik çizim. | 2 |
| Şekil 1. 3 Ülkeler bazında 2010-2014 yılları ortalama ayçiçeği üretim miktarı. | 4 |
| Şekil 1. 4 2010-2014 yılları arasında dünyada ayçiçeği üretiminde (ton) ilk on sırada yer alan ülkeler. | 5 |
| Şekil 1. 5 2010-2014 yılları arasında Türkiye'deki ortalama ayçiçeği üretim miktarları ve ayçiçeği ekim alanları. | 6 |
| Şekil 1. 6 Bitkilerde kendiliğinden ve uyartı yoluyla haploid oluşum yolları. | 12 |
| Şekil 1. 7 Anterlerden haploid bitki oluşum yolları. | 19 |
| Şekil 1. 8 Anter içerisindeki mikrosporlar ve oluşum aşamaları. | 20 |
| Şekil 1. 9 Mikrospor kültürünün uygulanışı. | 21 |
| Şekil 1. 10 Kabakta ışınlanmış polenle haploid embriyo uyartımının gerçekleşmesi. | 25 |
| Şekil 2. 1 Çalışmada kullanılan genotiplerin (a) tarla ve (b) bitki yetiştirme odasındaki görüntüleri. | 28 |
| Şekil 2. 2 Mikrospor kültürü çalışmasında izlenen adımlar. | 29 |
| Şekil 2. 3 Fiksasyon aşamaları. | 30 |
| Şekil 2. 4 Fiksatiften alınan kök ucu dokularında ezme preparat yapımı. | 31 |
| Şekil 2. 5 Tohumların ekimi ve yetiştirilmesi. | 32 |
| Şekil 2. 6 Bitki yetiştirme odasına ait otomasyon programı ekran görüntüsü ve kültür koşullarına ait değerler. | 32 |
| Şekil 2. 7 Bitki yetiştirme odasında yetiştirilmiş uygun evrede mikrospor içeren kapitulum. | 33 |
| Şekil 2. 8 Kapitulumların eldesi. | 33 |
| Şekil 2. 9 Ezme preparat yöntemi. | 34 |
| Şekil 2. 10 Thoma lamında sayım yapılan kareler. | 36 |
| Şekil 2. 11 Mikrospor kültürü adımları (Protokol 1). | 37 |
| Şekil 2. 12 Mikrospor izolasyon aşamaları (Protokol 1). | 38 |
| Şekil 2. 13 Mikrospor kültürü adımları (Protokol 2). | 40 |
| Şekil 2. 14 Mikrospor izolasyon aşamaları (Protokol 2). | 41 |
| Şekil 2. 15 Mikrospor kültürü adımları (Protokol 3). | 42 |
| Şekil 2. 16 Mikrospor izolasyon aşamaları (Protokol 3). | 44 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Şekil 2. 17 | Mikrospor kültürü adımları (Protokol 4). | 45 |
| Şekil 2. 18 | Mikrospor izolasyon aşamaları (Protokol 4). | 46 |
| Şekil 3. 1 | Çalışmada kullanılan altı genotipe ait metafaz kromozomları. | 49 |
| Şekil 3. 2 | Bitki yetiştirme odası koşullarında bitkilerin çimlenme ve çiçeklenme aşamaları. | 50 |
| Şekil 3. 3 | Tarladan elde edilen kapitulumların görüntüsü. | 50 |
| Şekil 3. 4 | Farklı boyut ve safhalardaki ayçiçeği kapitulumları. | 51 |
| Şekil 3. 5 | Farklı boyutlardaki çiçekçikler, mikrospor safhaları ve polen. | 51 |
| Şekil 3. 6 | Tarladan temin edilen ve uygun boyutta çiçekçik içeren kapitulum. | 52 |
| Şekil 3. 7 | SURES-K2-R-SN-9/15 genotipinde protokol 1 uygulaması sonucu izole edilen yeterli yoğunluktaki mikrosporların Thoma lamındaki görüntüsü. | 53 |
| Şekil 3. 8 | Kontaminasyondan dolayı kaybedilen IMI-K2-R-SN-7/15 genotipine ait bir örnek. | 54 |
| Şekil 3. 9 | IMI-K2-R-SN-7/15 genotipine ait kallus yapısı. | 55 |
| Şekil 3. 10 | Charcoal içeren besiyerinde bulunan farklı genotiplerdeki kültürlerin alüminyum folyoya sarılı halde inkübatördeki görüntüsü. | 56 |
| Şekil 3. 11 | IMI-K2-R-SN-22/15 genotipine ait mikrospor kültürü örnekleri. | 57 |

TABLO LİSTESİ**SAYFA**

| | |
|---|----|
| Tablo 1. 1 Dünya yağlı tohumlar üretimi. | 4 |
| Tablo 1. 2 Ülkeler itibariyle ayçiçek yağı üretimi. | 5 |
| Tablo 2. 1 Kromozom analizinde kullanılan çözeltiler, hazırlanışları ve içerikleri. | 30 |
| Tablo 2. 2 Farklı boyar maddelerin kullanıldığı Feulgen reaksiyonunun uygulanişı. | 31 |
| Tablo 2. 3 Aseto-orsein solusyonunun hazırlanması. | 34 |
| Tablo 2. 4 Çalışmada kullanılan NLN besin ortamına ait makro-mikro elementler ve konsantrasyonları. | 38 |
| Tablo 2. 5 Çalışmada kullanılan yarı katı MS temel besin ortamına ait makro-mikro elementler ile vitamin ve karbonhidrat kaynaklarına ait miktarlar. | 43 |
| Tablo 2. 6 Yarı katı MS temel besin ortamı ile charcoal ve gelrite kullanılarak hazırlanan besiyeri çeşitleri. | 43 |
| Tablo 2. 7 B5 temel besi ortamının içeriği. | 46 |
| Tablo 2. 8 Bu tez çalışmasında optimizasyonu gerçekleştirilen protokoller ve ana adımları. | 47 |
| Tablo 2. 9 Bu tez çalışmasında optimizasyonu gerçekleştirilen protokollerin ana adımları ile sonuçları. | 59 |

1. GİRİŞ

1.1 Ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L.) Genel Özellikleri ve Tarımı

Ayçiçeği bitkisi hem ülkemizde hem de dünyada yağ ve süs bitkisi ile sanayi gibi alanlarda kullanımı oldukça yaygın olan bir bitkidir (İlisulu, 1973). *Helianthus* cinsine ait 67 tür bulunmaktadır. Bunlardan; *Helianthus annuus* ve *Helianthus tuberosus* beslenme ve sanayi amaçlı olarak kültüre alınan iki önemli türdür. Diğer türler ise genellikle süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. *Helianthus* cinsine ait türlerde temel kromozom sayısı (n) 17 olup, tetraploid ve heksaploid türleri de bulunmaktadır (Heiser, 1978).



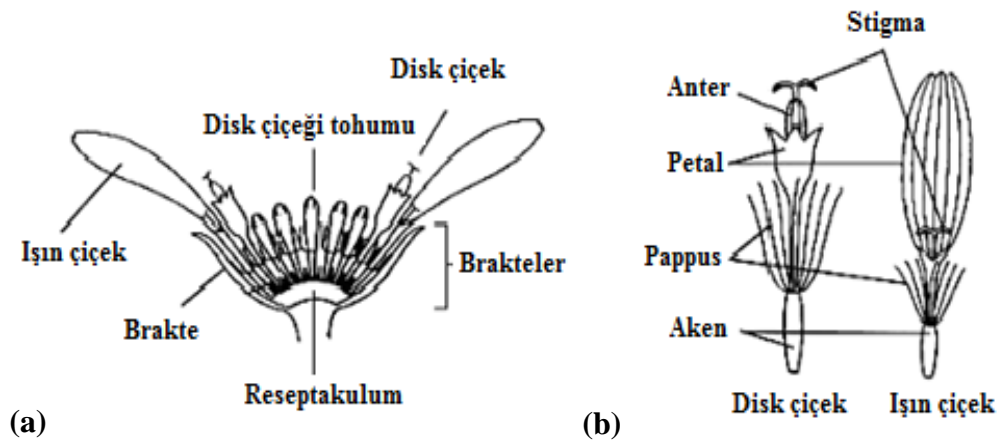
Şekil 1. 1 Ayçiçeği bitkisi (Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü).

Ayçiçeğinin sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir (Heiser, 1978).

| | |
|-------------|-------------------------------|
| Alem | : Plantea |
| Bölüm | : Magnoliophyta |
| Sınıf | : Magnoliopsida |
| Takım | : Asterales |
| Familya | : Asteracea |
| Alt familya | : Asteroideae |
| Cins | : <i>Helianthus</i> |
| Tür | : <i>Helianthus annuus</i> L. |

Ayçiçeği bitkisi adını Yunanca “helios” güneş ve “anthus” çiçek anlamlarına gelen kelimelerden almıştır (Heiser ve ark., 1969). Anavatanı Peru ve Meksika olarak bilinmektedir (İlisulu, 1973). Ayçiçeği bitkisi, Hindistan’dan Fransa’ya, Çin’den Ukrayna ve Tanzanya’ya, tropikal ve ılıman iklimlerde yetişen bir bitkidir (Winter ve Ravi, 2003). Ayçiçeği bitkisi ilk defa Kuzey Amerika Kızılderilileri tarafından yiyecek ve ilaç amacıyla kullanılarak evcilleştirilmiş ve boya hammaddesi olarak da kullanılmıştır. Arkeolojik kanıtlar ayçiçeği bitkisinin kültüre alınmasının mısır, fasulye ve kabaktan önce olduğunu göstermektedir. Ayçiçeği bitkisi, İspanyol kâşifler tarafından Avrupa’ya götürülmüş ve yaygın olarak süs bitkisi olarak ve tıbbi amaçlar için kullanılmıştır. Yirminci yüzyılın ortalarında Rusya’da, yağ içeriğini arttırmak için yapılan çalışmalar sonucunda ayçiçeği, ilk kez bir yağ bitkisi olarak kullanılmıştır (Heiser ve ark., 1969). Ülkemizdeki ayçiçeği tarımı ise 1945-1950’li yıllarda Bulgaristan’dan ülkemize göç eden insanların getirdiği tohumlarla başlamıştır. Esas üretimi ise, 1980’lerden sonra hibritlerin ülkemize girmesi ile olmuştur (Kaya, 2014).

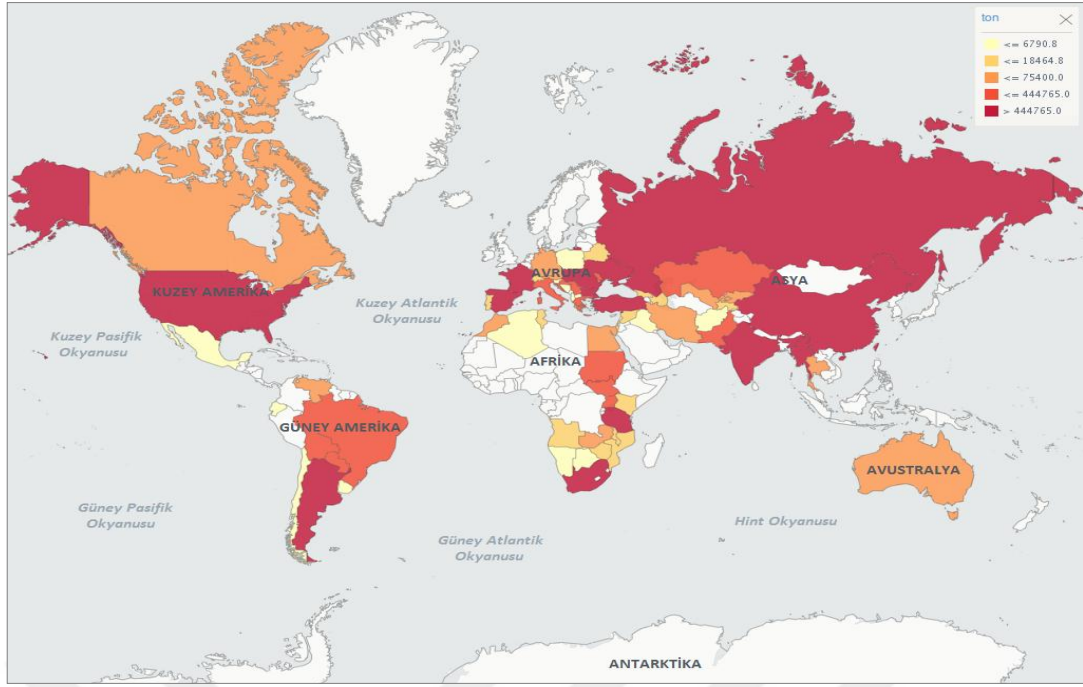
Helianthus annuus L. kazık köklü bir bitkidir. Yan köklerinin üzerinde demet halinde ince kökler oluşur (Duke, 1983). Gövdesi çok kuvvetli olan bitkinin yaprakları iri ve gösterişlidir. *Helianthus annuus* L.’de çiçek durumu **kapitulum** olarak tanımlanır. Yani çiçekler bir tabla içerisinde oluşurlar. Bu çiçek durumu ayçiçeğinin ait olduğu Compositae (Asteraceae) familyasının karakteristik çiçek durumudur. Tablalar, gövde tepesinin ucunda, çiçek sapının ucunda veya yan dalların ucunda oluşurlar (Heiser, 1978; Seiler, 1997). Baş kısmındaki büyük diski kapsayan çiçeklere **disk çiçekleri** denir. Disk üzerindeki her disk çiçeğine çiçekçik denir (Hu ve ark., 2010).



Şekil 1. 2 Ayçiçeğinin çiçek yapısını gösteren anatomik çizim. (a) ayçiçeği kapitulum yapısı, (b) ayçiçeğinin erkek ve dişi organları (<https://pbiosunflowers.wordpress.com/>).

Ayçiçeği normalde uzun bir bitkidir. Bazı yabancı tipleri 4- 5 metreye ulaşabilirken, kültüre alınan türleri 150-200 cm uzunluğundadır. Bitkilerin boyu iklim ve toprak koşullarına oldukça bağlıdır ve kuraklık veya kötü toprak koşulları bitki boyunu olumsuz etkilerken, sulama ve daha az su stresi bitki boyunu olumlu yönde etkiler. Standart boy (150- 180 cm) hibritlerine ek olarak, yarı cüce (100-150 cm) ve cüce (50-100 cm) boyları da dünyada üretilmektedir. Kısa bitkilerin bazı hastalıklara dirençli olma gibi avantajları olmasına rağmen, yüksek boyun verimi pozitif olarak etkilemesi birçok çalışmada gösterilmiştir (Dagustu, 2002; Kaya ve Atakisi, 2003; Kaya ve ark., 2003, 2005; Hladni ve ark., 2004; Dusanic ve ark., 2004). Ana verim karakterlerinden biri olan kafa yarıçapları, bitki boyunda olduğu gibi çevresel durumlardan oldukça etkilenirler. Kafa boyutu 5-50 cm (en büyüğü 82 cm) arasında değişebilir ve normal kafa boyutu 18-25 cm arasındadır. İdeal tipteki ayçiçeği kafası orta büyüklükte (20-25 cm) olarak tarif edilebilir (Miller ve Fick, 1997). Kafa büyüklüğü, şekli ve eğimi kantitatif niteliklerdir. Ayçiçeği verimini arttırmak için optimum bitki yoğunluğu, kafa büyüklüğü ve baş biçimi dikkate alınan özelliklerdir (Kaya ve Atakisi 2003; Kaya ve ark., 2003; Joksimovic ve ark., 2004; Sridhar ve ark., 2005; Goksoy ve Turan, 2007).

Temel besin maddelerinden biri olan yağlar, insanların yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesi için gerekli ve oldukça önemlidir (Gürbüz ve ark., 2003). Dünyada birçok ülkede tarımı yapılan ayçiçeği bitkisel yağ sanayisinin başlıca hammaddesi olup, ekonomik değeri oldukça yüksek bir yağ bitkisidir (Anonim, 2007). Dünyada yağlı tohumlu bitkiler denildiğinde akla soya fasulyesi, yerfıstığı, ayçiçeği, kanola (kolza), mısır, zeytin, susam, palmye tohumu, yağ keteni, aspir, hindistan cevizi ve hintyağı bitkileri gelmektedir. Dünya genelindeki üretim miktarlarına bakıldığında en yoğun üretilen yağlı tohumların soya fasulyesi, kanola, pamuk tohumu, yer fıstığı, ayçiçeği ve palm çekirdeği olduğu görülmektedir. Bugün bitkisel yağ ve mamulleri sektörü incelendiğinde sorunların küresel, bölgesel, ulusal ve yerel olarak farklılık gösterdiği ancak bütünde birbirleri ile etkileşim içerisinde oldukları görülmektedir (Tüik, 2015). Ülkeler bazında 2010-2014 yılları ortalama ayçiçeği üretim miktarı **Şekil 1. 3'**de gösterilmiştir.



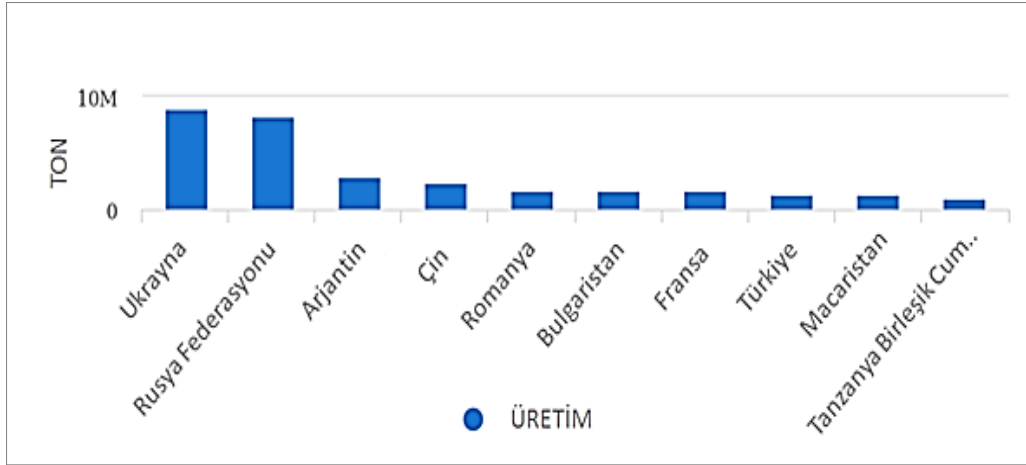
Şekil 1. 3 Ülkeler bazında 2010-2014 yılları ortalama ayçiçeği üretim miktarı (www.fao.org).

Ülkemizde tarımı yapılan yağlı tohumlar grubuna giren ürünler, ayçiçeği, çigit, soya, yerfıstığı, haşhaş, susam, kolza ve aspir olarak sıralanabilir (Tüik, 2015). Dünyadaki yağlı tohumlara ait veriler **Tablo 1.1**'de verilmiştir.

Tablo 1. 1 Dünya yağlı tohumlar üretimi (milyon ton) (USDA *Tahmin).

| →Yıllar ↓Yağlı tohumlar | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Soya tohumu | 260 | 264 | 240 | 268 | 282 | 318 | 319 |
| Kolza tohumu | 61 | 61 | 61 | 63 | 71 | 72 | 67 |
| Pamuk tohumu | 40 | 44 | 48 | 46 | 45 | 44 | 38 |
| Ayçiçek tohumu | 32 | 34 | 39 | 35 | 42 | 40 | 39 |
| Diğer tohumlar | 54 | 58 | 57 | 61 | 62 | 61 | 62 |
| Toplam | 447 | 461 | 447 | 475 | 505 | 536 | 527 |

2010- 2014 yılları arasında dünya ayçiçeği üretiminde Ukrayna birinci sırada, Rusya Federasyonu ikinci sıradadır. Türkiye ise bu yıllar arasında ayçiçeği üretiminde sekizinci sırada yer almaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 2010-2014 yılları arasında dünyada ayçiçeği üretiminde (ton) ilk on sırada yer alan ülkeler (www.faostad.org).

Ülkeler itibariyle ayçiçek yağı üretimi **Tablo 1.2**'de verilmiştir.

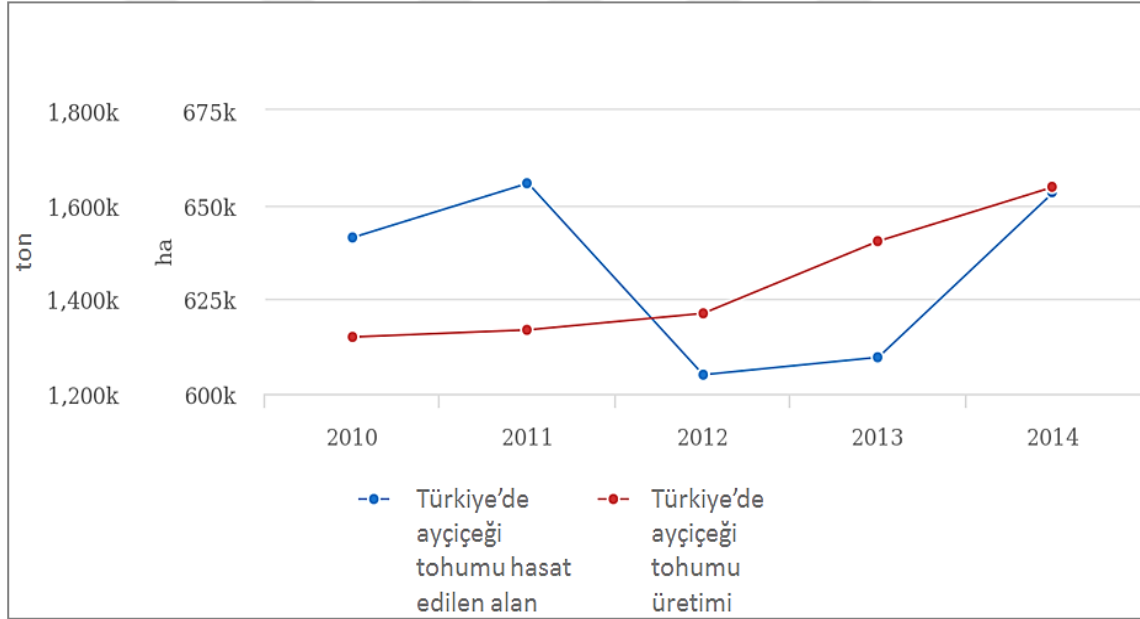
Tablo 1.2 Ülkeler itibariyle ayçiçek yağı üretimi (bin ton) (Oil World Monthly, 29 Ocak 2016. (*) Tahmini).

| ÜLKELER | 2009/10 | 2010/11 | 2011/12 | 2012/13 | 2013/14 | 2014/15 | 2015/16* |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Ukrayna | 3.022 | 3.209 | 3.935 | 3.597 | 4.717 | 4.157 | 4.701 |
| Rusya | 2.692 | 2.280 | 3.741 | 3.265 | 4.057 | 3.672 | 3.953 |
| AB-28 | 2.419 | 2.570 | 2.284 | 2.555 | 3.181 | 3.210 | 2.872 |
| Arjantin | 1.156 | 1.414 | 1.578 | 1.181 | 898 | 1.116 | 1.115 |
| Türkiye | 596 | 680 | 705 | 691 | 792 | 650 | 596 |
| Güney Afrika | 330 | 243 | 311 | 236 | 318 | 345 | 290 |
| Hindistan | 330 | 209 | 195 | 192 | 185 | 123 | 110 |
| ABD | 320 | 216 | 147 | 194 | 195 | 146 | 220 |
| Çin | 180 | 183 | 171 | 180 | 254 | 245 | 237 |
| Diğer ülkeler | 1.498 | 1.219 | 1.301 | 1.308 | 1.323 | 1.214 | 1.154 |
| DÜNYA | 12.543 | 12.418 | 15.161 | 13.554 | 16.097 | 15.078 | 15.428 |

Ayçiçeği, ekim alanı ve üretim kriterleri açısından ülkemizde ekimi en çok tercih edilen yağlı tohum bitkisidir. Ülkemizde üretilen bitkisel yağların yaklaşık % 50'si de ayçiçeğinden sağlanmaktadır (2015 Yılı Ayçiçeği Raporu, 2015). TÜİK verilerine göre

2016 yılında ülkemizde 6.167.800 dekarlık alana yağlık ayçiçeği ekimi yapılmıştır (TÜİK, 2016). Ülkemizde ayçiçeği tarımı en çok Trakya-Marmara Bölgesinde yapılmakta olup Tekirdağ (% 17,8), Edirne (% 14,9), Kırklareli (% 11,4) illerinde üretilmektedir. Bu illeri sırasıyla Adana (% 6,6), Çorum (% 3,9), Tokat (% 3,4), Aksaray (% 2,9), Amasya (% 2,3) ve Eskişehir (% 2,1) illeri takip etmektedir. Marmara-Trakya Bölgesini, % 29,2 ile Orta Anadolu Bölgesi takip etmektedir. Geriye kalan ülkemiz ayçiçeği üretiminin % 12'si Karadeniz, % 8,7 si Akdeniz ve % 2,8'i Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde gerçekleştirilmektedir (2015 Yılı Ayçiçeği Raporu).

Ülkemizde 2013 yılında 609,622 hektarlık alana ayçiçeği tarımı yapılmıştır. 1,523,000 ton ayçiçeği üretilmiştir. 2014 yılında ise; 653,323 hektarlık alana ekim yapılarak, 1,637,900 tonluk ayçiçeği üretimi gerçekleştirilmiştir (www.fao.org).



Şekil 1. 5 2010-2014 yılları arasında Türkiye'deki ortalama ayçiçeği üretim miktarları ve ayçiçeği ekim alanları (www.faostad.org).

1.1.1 Ayçiçeği ıslahı

Tarım yapılabilecek alanların hem Türkiye'de hem de dünyada üst sınırlara ulaşmış olması sebebiyle birim alandan elde edilen ürün veriminin en yüksek düzeye çıkarılmak istenmesi üreticilerin ilk hedefi olmuştur. Artan nüfusla birlikte bu nüfusun beslenme ihtiyaçlarını karşılayabilmek amacıyla verimin daha da yükseltilmesi gerekmektedir (Ahmet ve Adak, 2007). Ülkemizde kullanımı oldukça yaygın olan ayçiçeğinde yüksek olan talep ancak üretim artışı ile karşılanabilir. Kültürel tekniklerin iyileştirilmesiyle

oluşacak üretim artışının yanı sıra ıslah çalışmalarının yapılmasıyla da yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesi başarılabilir (Alvarez ve ark., 1992; Marinkoviç, 1992; Chaudhary ve Anand, 1993; Punia ve Gill, 1994; Narayana ve Patel, 1998). Başarılı bir üretimin ön şartı, birim alanda istenen bitki sıklığının elde edilmesidir. Bunun için de ekilen tohumun çimlenerek çıkması gerekmektedir (Munsuz ve ark., 2001). Islah çalışmalarında başarıya ulaşabilmek için, önce ıslah amacının iyi belirlenmesi ve ıslah edilecek karakter ya da karakterlerin özelliklerinin iyi bilinmesi gerekir. Tohum verimini artırmak için gerçekleştirilen ıslah programlarında, farklı agronomik karakterlerin verimle olan ilişkilerinin bilinmesiyle ıslah program ve seleksiyonun doğru bir şekilde ilerlemesi sağlanır (Alvarez ve ark., 1992; Marinkoviç, 1992; Chaudhary ve Anand, 1993; Punia ve Gill, 1994; Narayana ve Patel, 1998). Islah edilmiş kültür bitkilerinin yabani formlarıyla karşılaştırıldıklarında birçok mantar, bakteri ve virüs hastalıkları ile zararlılara karşı daha duyarlı olduğu ve bu durumun genelde uygulanan ıslah yöntemlerinin eksikliğinden kaynaklandığı görülmüştür. Islah programlarında, seleksiyon çalışmalarında ürün kalitesi ve miktarı gibi özellikler ön planda tutulmaktadır (Özcan ve Özgen, 1996). Ayçiçeği ıslahına ilk olarak MÖ 3000 yılında ayçiçeğinin Amerika'da üretilmesiyle başlanmıştır (Meriç, 2002). Ayçiçeği bitkisinde, tohum verimi ile bitki boyu, tabla çapı, tablada tane sayısı, 1000 tane ağırlığı ve tabla başına tohum ağırlığı gibi verim komponentleri arasında pozitif ve önemli ilişkilerin var olduğu bir çok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır (Alvarez ve ark., 1992; Marinkoviç, 1992; Chaudhary ve Anand, 1993; Punia ve Gill, 1994; Narayana ve Patel, 1998). Ayçiçeğinde verim ve kalite açısından melez çeşitlerin daha üstün özelliklere sahip oldukları ve iki kat daha fazla verim verdikleri bildirilmiştir (Fick, 1978; Kaya, 2003). Bundan dolayı Türkiye'de halen ayçiçeği ekim alanlarında üretilen çeşitlerin tamamına yakınının hibrit çeşitler olduğu bilinmektedir (Kaya, 2003). Bu nedenle ülkemizde ve dünyada ayçiçeğinde ıslah programları genelde, hibrit ıslahına yöneliktir (Kaya ve ark., 2009). Yabancı dölleme özelliğinden dolayı hibrit çeşitlerin tohumluklarının her yıl yenilenmesi gerekmektedir. Bunun yanında, ayçiçeği tarımında başarı aynı zamanda uygun ekim zamanının belirlenmesiyle birlikte her yıl sertifikalı tohumluğun kullanılmasını da gerektirmektedir (Kaya, 2003). Ayçiçeği tarımında genelde hibrit çeşitler üretimde kullanılmasına rağmen, aynı CMS (sitoplazmik erkek kısırılık) gen kaynakları kullanılması nedeniyle, geleneksel ıslah metotları kullanılarak

elde edilen çeşitlerde, genetik verimlilik kapasitesinin üst sınırına yaklaşmıştır. Gerek ayçiçeğinde, gerekse hibrit ıslahının uygulandığı diğer türlerdeki yüksek verimin elde edildiği hibritlerde, kullanılan ebeveynler arasındaki akrabalık derecesi ne kadar düşük, yani birbirleri arasında genetik uzaklık ne kadar fazla ise, özellikle tane veriminde heterosis olarak adlandırdığımız melez azmanlığı o kadar yüksek olmaktadır (Miller ve Fick, 1997). Bu nedenle ayçiçeğinde yüksek verim için mutlaka farklı genetik kaynaklara sahip kendilenmiş ebeveyn hatlara ihtiyaç vardır. Bu farklı genler, ayçiçeğinde çok sayıdaki tek veya çok yıllık yabancı ayçiçeği türlerinde mevcut olup, bu yeni genotip kaynakların kültürü yapılan tek yıllık *Helianthus annuus* L. türüne bir an önce aktarılması gerekmektedir. Ancak bu gen kaynaklarının kullanılması, türler arası melezlemeler ile mümkün olup, bunların klasik ıslah metotlarını kullanarak elde edilmesine olanak yoktur (Bidney ve Scelonge, 1997). Bu genlerin, yabancı türlerden tarımı yapılan kültür bitkilerine aktarılması, ancak biyoteknolojik metotların kullanılmasıyla mümkündür (Kaya, 2004).

Biyoteknoloji; doku kültürü teknikleri (somatik embriyogenesis, mikroçoğaltım, anter kültürü, protoplast kültürü) ile çoğaltım, DNA parmak izi çalışmaları, markör yardımıyla seleksiyon, gen seçimine dayalı seleksiyon, gen anlatımı, genetik modifikasyonlar, rekombinant DNA teknolojisi ve bunlarla bağlantılı genetik mühendisliği uygulamalarını kapsamaktadır (Wheeler, 2004). Klasik ıslah ve biyoteknolojide ortak amaç, aynı uygulama ve prensiplere sahip olabilmekle birlikte, klasik ıslahta çaprazlamalar fenotipik gözlemlere dayanmaktadır. Biyoteknolojik çalışmalarda ise laboratuvar ve sera çalışmaları daha çok kullanılmaktadır. Klasik ıslah çalışmalarında genetik markörler seleksiyon süresini oldukça hızlandırmaktadır. Markör yardımıyla genetik ıslah (MAS: Marker Assisted Selection) yaklaşımının genetik çalışmaların ilerlemesinde katkısı bulunmaktadır (Merkle ve Dean, 2000). ıslah çalışmalarında agronomik özelliklerin fenotipik seleksiyonu zaman alan bir yöntemdir. Markörlerin azlığı, pleiotropik ve epistatik etkilerin bulunması ve çevresel etmenlerin sabit olmaması gibi olumsuz durumlarla, morfolojik markörler yardımıyla seleksiyon gibi geleneksel metotlarda karşılaşılmaktadır. Bu sorunlarla karşılaşmamak için moleküler markörler yardımıyla seleksiyon bir alternatif olmaktadır (Melchinger, 1990). İstenilen genlerle bağlantılı markörleri belirleyerek ıslah çalışmalarında erken seleksiyon kıstası olarak kullanmak ya da bu markörlerden hareketle bağlantılı genlerin

çoğaltılmasını sağlamak, iki ebeveynin çaprazlanmasıyla meydana gelen bitki populasyonlarından yararlanarak gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılmaktadır (Knapp, 1994). Moleküler işaretleyici sistemler, ekonomik olarak önemli tarımsal türler için yüksek yoğunluklu DNA markör haritalarının oluşturulmasını ve böylelikle MAS'ın nihai uygulamaları için gerekli olan çerçeveyi sağlar (Kumar ve Shekhawat, 2009). Ayrıca MAS ile kantitatif özelliklerin seleksiyonu ve kalıtım mekanizmasının araştırılmasında, moleküler bağlantı haritalarının oluşturulmasında ve tamamlanmasında da seçenek olarak karşılaşılmaktadır (Knapp, 1994).

Geleneksel ıslah yöntemi için olumsuz durum oluşturan bir faktör, bitkilerin uzun jenerasyon süresidir. Kontrollü çaprazlama yöntemiyle uygun ebeveynlerin kolayca bulunamaması ıslah yöntemlerinin önünde büyük bir engel oluşturmaktadır. Genetik olarak aynı özellikleri barındıran üstün genotiplerin üretimi ile genetik kaynaklar korunabilmektedir (Bonga ve Von Aderkas, 1993; Çavuşoğlu, 2001). Aseptik koşullar altında gerçekleştirilen doku kültürü yöntemi, araştırma ve iyileştirilmiş ürünlerin geliştirilmesinde oldukça önemlidir (Maliro ve Lemeck, 2004). Doku kültürü tekniği, bitkilere istenilen özellikleri kazandırarak, vejetatif çoğaltım metodlarına karşı bir seçenek olarak kullanılmaktadır (Kim ve ark., 1985). Doku kültüründe başarı öncelikle genotipe bağlıdır. Kullanılan besiyeri, eksplant tipi ve diğer kültür koşulları bu yöntemde başarılı olmak için önemli olan diğer parametrelerdir (Merkle ve Trigiano, 1992). Doku kültürü çalışmalarının ana hedeflerinden biri, aynı zamanda verimli bir transformasyon sistemi için bir ön şart olan yüksek frekanslı sürgün yenilenmesini elde etmektir (Jordan ve McHughen, 1988; Dong ve McHughen, 1993). Bitkilerdeki doku kültürü çalışmalarının temeli, ilk olarak Schwann ve Schleiden'in 1838 yılında totipotensi teorisini öne sürmeleri ile atılmıştır (Pierik, 1987).

Sonuç itibariyle, klasik ıslah yöntemlerinde ortaya çıkan olumsuzluklar haploid bitki üretimi ile aşılarak dihaploidizasyon çalışmasıyla dihaploid verimli hatlar elde edilebilir (Priya ve ark., 2003). Bu tez çalışmasında, *in vitro* mikrospor kültürü ile haploid ayçiçeği eldesine yönelik protokollerin optimizasyonu yönünde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

1.2 Haploid Bitki Üretimi

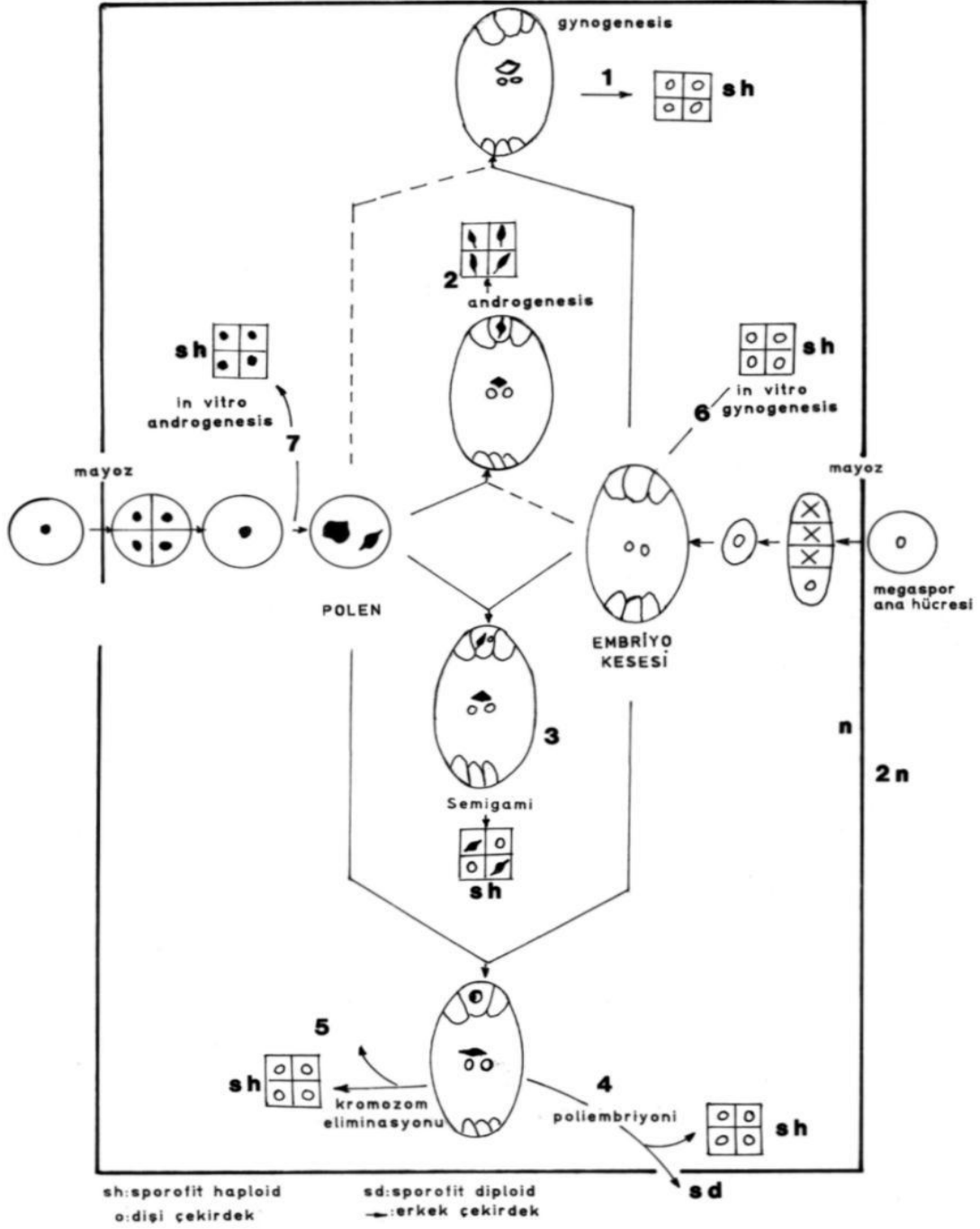
Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere *haploid bitkiler* adı verilmektedir. Haploid bitki elde etme işlemine *haploidizasyon* adı verilmektedir. (n) kromozom sayısındaki haploid bir bitkinin kimyasal madde aracılığıyla türün normal kromozom sayısına (2n) ulaştırılıp mutlak homozigot hatların elde edilmesine *dihaploidizasyon* adı verilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001). *In vitro* androgenesis esnasında veya rejenerasyon haploidlerde genom diploidizasyonu ile elde edilen çift haploidler (DH) ıslah programlarında kullanılmaktadır (Ślusarkiewicz-Jarzina ve ark., 2017). Diploid bitkilerle aynı organlara sahip olan haploid bitkiler, morfolojik olarak zayıf, güçsüz, bodur ve daha küçük yapılı 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 ve ark., 2001). Bu özelliklerinden dolayı normalde hiç bir tarımsal değer taşımayan haploid bitkiler; bitki ıslahı genetik, sitolojik, fizyolojik, biyolojik ve biyokimyasal çalışmalar için son derece önemli ve değerli materyallerdir (Abak, 1986; Wenzel ve Foroughi - Wehr, 1994; Ferrie ve Keller, 1997; Hatipoğlu, 1999; Ellialtıoğlu ve ark., 2001). Haploid bitkiler, verimli diploid bitkilere dönüştürülerek ıslah programında kullanılabilirler. Haploid bitkiler, her bir lokustaki allelerin yalnızca bir serisini içerirler ve bu özelliklerinden dolayı ıslah çalışmalarında büyük önem taşımaktadırlar. Haploid bitkiler homolog kromozomların sadece bir takımını içerdiği için resesif mutasyonlar açığa çıkabilmektedir. Ayrıca haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması sayesinde %100 homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir. Bu sayede uzun yıllar alan saflaştırma işlemi, birkaç ay gibi kısa bir sürede yapılabilmektedir. Böylece kombinasyon ıslahı ve F₁ hibrit çeşit ıslahı programlarında zaman yönünden oldukça kazanç sağlanabilmektedir. 1922 yılında Blakeslee tarafından *Datura stramonium* bitkisi ile çalışma yapılmış ve kendiliğinden meydana gelen ilk haploid bitki tanımı yapılmıştır. İkinci olarak, 1929 yılında Kostoff tarafından yapılan çalışmada iki farklı türe ait tütün bitkisinin çaprazlanmasıyla (*Nicotiana tabacum* x *Nicotiana langsdorfii*) doğal yollarla ortaya çıkan haploid bitki oluşturulduğu rapor

edilmiştir. Türden türe ve tür içerisindeki genotiplere göre değişkenlik göstermekle birlikte, doğada kendiliğinden haploid bitki oluşma olasılığı % 0.1- 0.001 gibi oldukça düşük seviyede kalmaktadır (Pocard ve Dumas de Vaulx, 1971).

Haploidlerin oluşum yolları beş ana grupta toplanabilir:

Bunlardan ilki olan *ginogenesis* yönteminde, yumurta hücresi döllenme gerçekleşmeden zigot gibi bölünme işlemini başlatır. Bunun sonucunda haploid yapıda bir embriyo oluşturur. Dişi eşey hücresi ile erkek eşey hücresi birleşmediği halde; embriyo kesesi sekonder çekirdekleri ile polen generatif çekirdeği birleşir. Bu birleşme sonrasında embriyonun çimlenebilmesi için gerekli olan endospermi meydana getirirler (Sauton, 1987).





Şekil 1. 6 Bitkilerde kendiliğinden ve uyarı yoluyla haploid oluşum yolları (Ellialtıoğlu ve ark.,2001).

Homozigoti oldukça kısa sürede elde edilerek genetik ve ıslah çalışmalarını yapmak kolay hale gelmekte ve birkaç jenerasyon beklemek yerine homozigot hatlara bir jenerasyonda ulaşılabilir;

Klasik yöntemlerle homozigot hatlara ulaşmanın kolay olmadığı bitkilerde, dihaploidizasyon yöntemiyle bir jenerasyonda bu hatlara ulaşılabilir;

Çok yıllık meyve ve bitkilerde, homozigot hatların elde edilmesi uzun bir süreç almaktadır. Bundan dolayı bu türlerde haploidizasyon büyük önem taşımaktadır;

Haploidinin hibrit çeşidi ıslahında, F₁ hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde homozigot hatlar arasında üstün kombinasyon yeteneği verenlerinin belirlenmesinde öneme sahip olması; Haploidi sayesinde F₁ aşamasındaki melez bitkilerden haploid olanlar seçilerek farklı genotiplerde bulunan ve tek bir genotipte birleşmesi istenen özelliklere sahip bitkiler elde etmek mümkün olabilmektedir;

Resesif mutasyonların ortaya çıkmasında haploidizasyon uygulanabilecek en etkili yöntemdir. Haploid bitkilerde dominant genler resesif genleri baskılayamadığı için diploid hatlarda genetik açılımı izlemek mümkün olabilmektedir;

Protoplast kültürü ile yapılan somatik hibridizasyon tekniğinin var olan dezavantajları, haploid bitkiler ile ortadan kaybolmaktadır;

Haploid ve dihaploidler, sitolojik, fizyolojik ve genetik alanlarında kullanılan oldukça değerli materyallerdir;

Haploidizasyon ile ıslah etkinliği artmaktadır (Gallais, 1978; Demarly ve Sibi, 1989). Bu ıslah etkinliğinin artması, dihaploid bitkilerin döllerinde bir açılım bulunmadığından genotipler arasında etkili eliminasyon yapılarak ve dominansi etkisinin kalkarak eklemeli gen etkisinin ikiye katlanmasıyla gerçekleşmektedir;

Diploid bitkilerin üretilmesi için tetraploid bitkilerin haploidizasyonundan yararlanılması;

Haploid uyartımı ve sonrasında kromozom katlamasıyla, kendilemenin mümkün olmadığı dioik türlerde saf erkek bitkiler elde etmek mümkün olmaktadır;

Haploid bitkiler, çeşitli patojenlere ve bunların ırklarına karşı *in vitro* seviyede tercih olanağı sağlamaktadırlar;

Dihaploid hatlar gen haritalarının çıkartılmasında kullanılabilir. Dihaploid hatların markör çalışmalarında, heterozigotiden kaynaklanan, intermediyer ekspresyonlar olmayacağı için çalışılmak istenen gen oranı 1:1 olacaktır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

1.2.1 Androgenesis (erkek gamet) yoluyla haploid bitki eldesi

Androgenesis, haploid hücre kaynağı olan mikrospor varlığına dayanmaktadır. Androgenesis ile normal şartlar altında erkek gameti oluşturacak olan mikrospor hücresinin gametofitik gelişimi durdurularak, çeşitli uyartılar vasıtasıyla embriyojenik oluşuma zorlanır. Polen gelişimi mikrosporogenesis ve mikrogametogenesis olmak

üzere iki evrelidir. Mikrospor ana hücrelerinin oluşumu ve bunu izleyen mayoz bölünme sonucunda haploid mikrosporların oluşmasına **mikrosporogenesis**, mikrospordan çekirdek ve hücre bölünmeleri ile sperm hücrelerinin oluşumuna da **mikrogametogenesis** adı verilmektedir (Emiroğlu, 1982). İlk kez 1953 yılında Tulecke tarafından *Ginkgo biloba* bitkisiyle yapılan çalışmada, bu bitkiye ait polenlerin kültür ortamında haploid kallus meydana getirmek için uyarılabileceği sonucuna varılmıştır (Guha ve Maheshwari, 1966). 1964 yılında *Datura stramonium* bitkisi ile yapılan çalışmada, bu bitkiye ait anterler *in vitro* ortamda kültüre alınarak ilk haploid bitki Guha ve Maheshwari tarafından elde edilmiştir. Bunun ardından tütün bitkisinde aynı yöntemle haploid embriyolar elde edilmiştir (Bourgin ve ark. 1967). Başarıyla sonuçlanan bu çalışmalardan sonra birçok farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalarda haploid bitki eldesi sağlanmıştır (Bajaj, 1983; George ve Sherrington, 1984; Pierik, 1989). Haploid bitki eldesi için *Helianthus* cinsinde mikrospor kültürü ile yapılan çalışmalarda, bu teknik geliştirilmiş ancak haploid bitki eldesinin güç olduğu saptanmıştır (Gürel ve ark., 1991; Todorova ve ark., 1993).

Yin Lu ve arkadaşlarının 2016 yılında beş farklı Çin lahanası (*Brassica rapa*) genotipleri ile yaptıkları çalışmada, farklı sürelerde ve konsantrasyonlarda etil metanosülfat (EMS)'e batırılmış örneklerin mikrospor gelişimi ve embriyo üretim hızını gözlemlemiş ve EMS ile muamele edilmiş tomurcuklardan elde edilen mikrospordan elde edilen dihaploidlerin hızlı bir şekilde homozigot Çin lahanası mutantlarının oluşumunda etkin bir yaklaşım olduğu belirlenmiştir.

Androgenesis yoluyla haploid bitki eldesinde anter ve mikrospor kültürü önemli iki yoldur. Bu tez çalışmasında, ayçiçeğinde mikrospor kültürü optimizasyonu çalışması yapılarak haploid bitki eldesine yönelik uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

1.2.1.1 Androgenesis etkileyen faktörler

Androgenik anter sayısı ve her bir anterden sağlanan embriyo sayısı çeşitli faktörlerden etkilenerek değişebilir. Anter kültürünün başarıya ulaşması, anterlerin elde edildiği donör bitkiden ve anter kültürü işleminin uygulanması sırasındaki koşullardan etkilenerek değişebilir. Anter kültüründen elde edilen haploid bitki sayısını etkileyen faktörler şu şekilde sıralanabilir;

Anter verici (donör) bitkiden kaynaklanan faktörler

Genotip

Anter kültürüyle haploid bitki elde etme başarısı yüksek oranda anterlerin alındığı bitkilerin genotiplerine bağlıdır. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda; genotiplerin, aynı kültür koşullarında işlem görmesine rağmen anter yanıtlarının genotipler arasında farklılık gösterdiği bilgisine ulaşılmıştır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001). Nitsch (1969), 12 tütün türünden 5 tanesinin; Gresshof ve Doy (1972), 18 farklı *Arabidopsis* hattından 3 tanesinin, Irikura (1975), 118 farklı *Solanum* genotipi içerisinde sadece 19 tanesinin polen embriyogenesi oluşturduğunu belirtmektedir. Haploid bitki elde edilmek istenen genotipten yüksek oranda androgenetik cevap alabilmek için, her genotipin kültür koşulları optimize edilmelidir (Dunwell, 1981). Bir diğer yol olarak ise; embriyo oluşturma ihtimali fazla olan genotiplerle, embriyo oluşturma başarısı yüksek olmayan genotiplerin çaprazlanarak melez döllerden az veya çok embriyo elde edilmesi önerilmiştir (Jacobsen ve Sopory, 1978).

Donör Bitkinin Yetiştirme Koşulları

Mikrospordan *in vitro* koşullarda haploid embriyo uyartımından olumlu sonuç alabilmek için, bitkilerin genotipleri kadar yetiştirilme koşulları da son derece önem taşımaktadır. Bitkilerden elde edilen anterlerde başarılı olmak için sıcaklık, ışık yoğunluğu, günlük ışıklandırma süresi, havadaki CO₂ konsantrasyonu ve bitkinin beslenme şartları gibi çevresel faktörler oldukça önemlidir. Bu koşulların önemi ilk defa Dunwell ve Perry (1973) tarafından yapılan çalışmada ortaya konulmuştur. Bu çalışmada, bitkilerin yetiştikleri ortamın ışıklandırma süresinin; tütündeki anter kültüründe haploid embriyo oluşumundaki etkisi gözlemlenmiştir. Bitkideki haploid embriyo oluşumunu etkileyen diğer değişken ise anterlerdeki mikrospordan yapıları ve kaliteleridir. Sunderland (1971), gerçekleştirdiği çalışmada, kültürdeki tütün anterlerinin farklı büyüklüklere sahip ve boyandıklarında daha açık renkte görünen polenler içerdiğinden söz etmiştir. Sonrasında çavdar (Wenzel ve Thomas, 1974) ve arpada (Dale, 1975), tüm polenlere ait morfolojilerin benzer olmadığını, aralarında değişik morfolojik yapı gösterenlerin olduğu sonucuna varılmıştır. Bu duruma *polen dimorfizmi* adı verilmektedir. Bu durumda bulunan polenlerin bir kısmı gametofitik yöndeki

gelişmesini devam ettirerek normal polenleri oluştururlar. Geride kalanlar ise sporofitik gelişme yönünde ilerleyerek embriyo oluşturma yeteneği kazanırlar. Anterlerin içerisinde oluşan embriyojenik polenlerin oranına bağlı olarak donör bitkilerin yetiştirilme koşullarının anter kültürü üzerindeki etkisi hakkında yorum yapılabilir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler

Anterlerin gelişim dönemleri

Anter kültürü tekniğinin başarılı olması için dikkat edilemesi gereken bir nokta da, anterlerin donör bitkiden izole edildiği anda içerisindeki mikrosporların hangi gelişme döneminde olduklarıdır. Anter kültürlerinde en etkili sonuçlar, tek çekirdekli mikrospor evresinin erken veya geç aşamasındaki mikrosporların bulunduğu anterlerden elde edilmektedir. Anterlerde bulunan polenlerin gelişme evrelerini belirlemek için sitolojik gözlemler yapmak gereklidir. Bu evre asetokarmin ile hızlı boyama yapılarak belirlenebileceği gibi, DAPI boyası kullanılarak florasan mikroskopu altında da mikrosporların gelişme evreleri saptanabilir. Mikrosporogenesis aşamalarını izleyebilmek için uygulanabilecek bir başka yol ise; parafine gömerek kesit almaktır. Bu işlem sonrasında preparatlar metilen mavisi ya da hematoksilin gibi boyalarla boyanarak net görüntüler elde edilir. Fakat bu yöntem uzun zaman almaktadır. Bundan dolayı anter kültürü yapılmasına karar verildiğinde ilk olarak parafin yöntemi kullanılarak mikrosporogenesis aşamaları belirlenir. Daha sonra laboratuvar çalışması esnasında taze anter materyalinin incelenmesi için anterleri asetokarmin ile boyayıp ezme preparat hazırlamak oldukça hızlı ve kolay bir yoldur.

Anterlere yapılan ön uygulamalar

Çiçekçiklere gerçekleştirilen ön uygulamalar, kültürdeki mikrosporların gelişmelerine olumlu yönde katkıda bulunur. Bu uygulamalardan en etkili olanı da soğuk uygulamasıdır. 4-10 °C arasında 72 saat ile 4 hafta arası ön uygulama yapılan çiçekçikler rejenerasyon açısından pozitif cevaplar vermiştir. Soğuk uygulamasının anter kültürlerinde kallus ve bitkiye dönüşüm aşamasında yaptığı olumlu katkının nedeni henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu olumlu etkinin nedenleri üzerine

birkaç görüş bulunmaktadır. Bu görüşlere göre; soğukta bekletme esnasında güçsüz ve hayatta kalma şansı düşük olan anter ve mikrosporlar hemen kahverengiye dönerek ölmektedirler. Böylelikle geride kalan güçlü anterler kültüre alınarak *in vitro* koşullarda yüksek oranda rejenere olabilmektedirler (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Sunderland ve Roberts (1979)'un çalışmasında, sıcaklık süresinin ve derecesinin, soğuk şok ön uygulamasında önemli olduğu ortaya konmuştur. Çok soğuk olmayan sıcaklıklarda uzun süre yapılan soğuk uygulamanın, daha düşük derecede, daha kısa sürede yapılan uygulamadan daha etkili olduğu sonucunu bulmuşlardır.

Anter kültürü için oldukça önemli bir diğer nokta da; mikrospor tanelerindeki nişasta birikimidir. Birinci polen mitozundan sonra mikrosporlarda nişasta birikimi artmakta ve mikrosporların embriyo oluşturmak için sporofitik gelişmeye yönelme şansları yok olmaktadır. Nişasta içeriği az olan tek çekirdekli mikrosporların embriyo oluşturması kültür şartlarında çok daha kolay bir şekilde gerçekleşmektedir (Foroughi-Wehr ve Wenzel, 1993).

Çiçekçiklere uygulanan soğuk şokunun anter duvarında da etkisi gözlenmiştir. Anter duvarı, inkübasyon süresi boyunca kahverengiye dönüşerek yaşlanıp kültür ortamına toksik madde salgılayabilirler. Kültüre alınmadan önce uygulanan soğuk şoku sayesinde anter duvarı daha geç yaşlanarak olumsuz etkileri önemli oranda engellenmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Nitsch (1974)'ün yaptığı çalışmada, ethrel uygulaması ile santrifüj işlemi gerçekleştirme ön uygulamalarının da anterlerden embriyo oluşmasına olumlu katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Besin ortamının bileşimi ve yapısı

Bütün bitki türlerinin olumlu yanıt vereceği bir anter kültür ortamı bulmak oldukça zordur. Anter kültürü yanıtı, çeşitli türlerde ve hatta aynı türün genotipleri arasında bile farklılık göstermektedir. Anter kültüründe ilk olarak gametofitik dokuları sporofitik gelişmeye dönüştürme aşamasında uyaracak oksin gereklidir. Bitkiciğe dönüşüm evresinde sitokinlere ihtiyaç vardır. Anter kültürlerinde oksin kaynağı olarak 2,4-D, NAA ve IAA kullanılmakta olup sitokinin kaynağı olarak ise, çoğunlukla kinetin, sonrasında ise BA ve zeatin yaygın olarak kullanılmaktadır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Murashige ve Skoog, White ve Nitsch besin ortamları anter kültürlerinde en sık kullanılan besin ortamlarıdır (Sink ve Padmanabhan, 1977). Bazı türlerde ise B5 besin ortamının daha olumlu sonuçlar verdiği ortaya konmuştur (Keller ve Armstrong, 1979).

Anter kültürlerinde karbon kaynağı olarak genellikle sakkaroz kullanılmakla birlikte, glukoz ile glukoz ve sakkaroz karışımları da kullanılmaktadır. Agar ilave edilerek oluşturulan yarı-katı haldeki ortam anter kültürlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

İnkübasyon koşulları

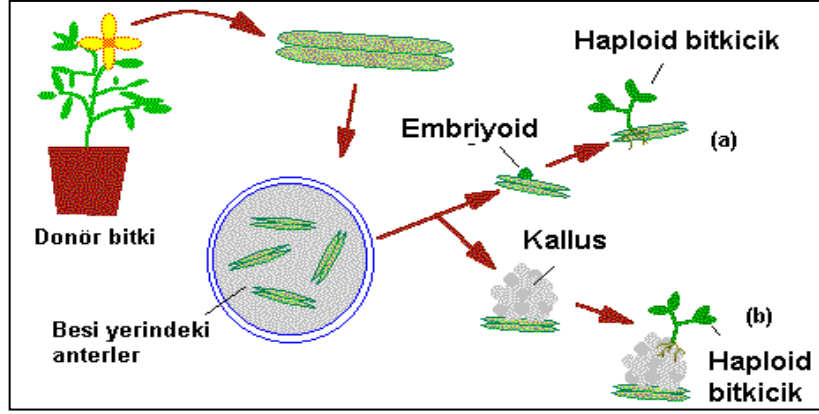
İnkübasyon sırasında kullanılan ışığın nitelik ve niceliği ile sıcaklık gibi çevresel etmenler anter kültürünün başarılı olmasında etkili olan faktörlerdendir. Başlangıç aşamasında anterler 20 ile 30 °C'ler arasında kültüre alınır ve sonra anterlerde düşük sıcaklık ve farklı ışık zamanlarında bekletilen anterlerden embriyo oluşur. Sonrasında rejenere olan bitkicikler daha yüksek ışık yoğunluğuna aktarılmaktadırlar. İnkübasyon esnasında uygulanan sıcaklık ile ışık yoğunluğu arasında sıkı bir bağlantı bulunmaktadır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

1.2.1.2 Anter kültürü

Olgunlaşmamış polenleri içeren anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesi olayına '*anter kültürü*' adı verilmektedir. 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 androgenesi*' veya sadece '*androgenesi*' olarak adlandırılan oluşum gerçekleşmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Anterlerden haploid bitki oluşumu başlıca iki yolla olmaktadır (Bajaj, 1990a).

1. Direkt androgenesi: Polen tanesinden yani mikrospordan bir embriyo farklılaşması oluşmaktadır (embriyogenesi).
2. İndirekt androgenesi: Önce polen tanesinden bir kallus gelişimi olmakta ve daha sonra embriyo ya da sürgün rejenerasyonu gerçekleşmektedir (organogenesi).



Şekil 1.7 Anterlerden haploid bitki oluşum yolları. (a) doğrudan *in vitro* androgenesis, (b) dolaylı *in vitro* androgenesis (<https://www.slideshare.net>).

Anter kültürü ile ilgili ülkemizde ve başka ülkelerde birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. 1921 yılında ilk doğal haploid bitki, *Datura stramonium* L. bitkisi ile keşfedilmiştir.

Bohorova'nın (1985)'de iki farklı ayçiçeği genotipi ile yaptığı çalışmada direkt gövde gelişimi elde etmişlerdir.

Mix'in (1985)'de yaptığı çalışmada 6 adet androgenik ayçiçeği bitkisi elde edilmiş ve bunların 2 tanesinin haploid oldukları saptanmıştır.

Sakin (1994) yaptığı çalışmada 20 farklı genotip ve farklı besin ortamları (N6-MS) kullanılmıştır. Genotipin haploid bitki üretiminde önemli bir etken olduğunu ortaya koymuştur.

Irikova ve Rodeva (2004) yapmış oldukları çalışmada, farklı besin ortamlarında kültüre alınan Bulgar biberlerine ait 4 hat, 5 varyete ve 2 F1 hibritin anter kültürlerinin *in vitro* tepkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda *in vitro* biber anter kültürünün tepkisinin büyük oranda donör bitki genotipi, ortam kompozisyonu ile eklenenler ve büyüme düzenleyicilere dayandığını bildirmişlerdir.

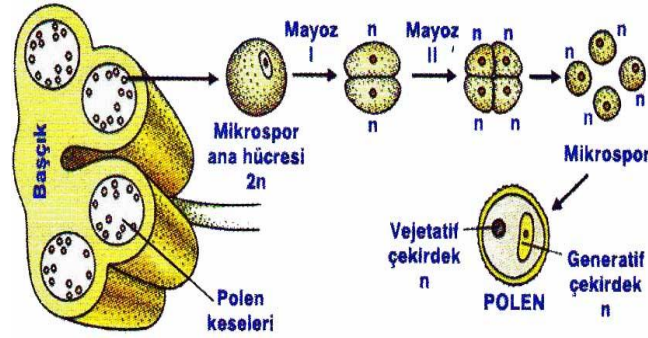
Koleva Gudeva ve Trajkova (2012), biber bitkisinin *in vitro* anter kültüründe androgenesis etkinliğinin artırılmasını amaçlamış ve buna bağlı olarak da embriyogenesisin başarılması, oluşan embriyoların bitkiciklere dönüşmesi, bitkiciklerin steril koşullardan sera koşullarına başarılı adaptasyonu ve dış ortama alıştırılması ve plastik tünel koşullarında elde edilen androgenetik biber hatlarının ıslah süreçlerinde kullanılması bu çalışmanın hedefleri arasında olmuştur. Sonuçta anter kültürünün

devam ettiği süreçte androgenesis etkinliğinin genotipe ve yetiştirme koşullarına bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Luitel ve Kang (2013) yapmış oldukları çalışmada, haploid üretiminde androgenesisin etkinliğini belirlemek için Dumas de Vaulx (CP) ve Murashige ve Skoog (MS) kültür ortamlarını kullanarak mini paprika F1 hibridinin Vine sweet çeşidinin (kırmızı, sarı ve turuncu tipleri) *in vitro* androgenik tepkisini araştırmışlardır. Buldukları sonuçlara göre kullandıkları her iki ortamda da tüm mini paprika tiplerinin anter kültüründe kallus ve embriyo oluşum sıklıkları değişiklik göstermiştir. Her iki kültür ortamındaki anterler tüm paprika tiplerinde rejenerasyon olmaksızın kallus oluşturarak tepki vermiştir.

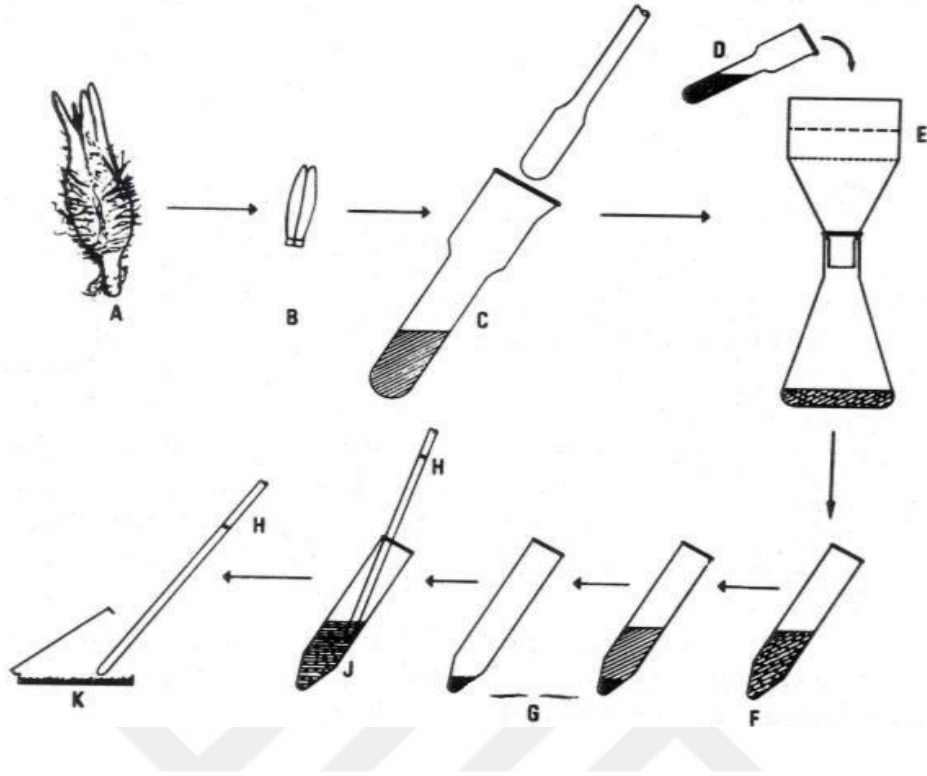
1.2.1.3 Mikrospor kültürü

Mikrospor kültürü, anter kültürü ile birlikte androgenesis yoluyla haploid bitki eldesinde kullanılan önemli bir yöntemdir. Olgunlaşmamış mikrosporların, anter içerisinde izole edilerek *in vitro* koşullarda besin ortamlarında geliştirilmesi ve bunlardan haploid embriyoların elde edilmesi işlemi ‘mikrospor kültürü’ olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 1.8 Anter içerisindeki mikrosporlar ve oluşum aşamaları (<http://www.biyolojiterimleri.com>).

Mikrosporlar kültüre alınmadan önce anterlerden izole edilirler ve tek çekirdekli dönemde olduklarına karar verilen mikrosporlar, anterlerden mekanik olarak ayrılırlar. Mikrospor kültürü aşamaları Şekil 1.9’da gösterilmiştir.



Şekil 1. 9 Mikrospor kültürünün uygulanışı. (A) tomurcuktan (B) çıkartılan olgunlaşmamış anterlerin (C) mekanik olarak homojenize edilmesi (D) polen süspansiyonunun (E) filtreden geçirilmesi (F) süspansiyon, süzme işleminden sonra santrifüj edilmesi (G) mikrospordan oluşan çökelti elde edilerek üzerindeki sıvının boşaltılması (H,J) mikrosporumların besin ortamıyla yeniden süspansiyon haline getirilerek pipet yardımıyla (K) petri kutularındaki kültür ortamının üzerine inoküle edilmesi (Pierik, 1989).

Mikrospor kültürü, anter kültüründe var olan olumsuz durumları ortadan kaldırarak haploid embriyo sayısını çoğaltmak için geliştirilmiş bir metottur.

Mikrospor kültürünün avantajları şu şekildedir (Pierik, 1989; Hess, 1992; Foroughi-Wehr ve Wenzel, 1993);

Anter kültüründe mikrospora ek olarak diploid yapıya sahip olan anter duvarı, tapetum ya da septum gibi anter dokulardan da embriyo oluşabilir. Oluşan diploidlerin yaşama ihtimali haploidlere göre her zaman daha fazladır. Mikrospor kültürü ile bu durum ortadan kalkmaktadır;

Anter kültüründe mikrosporumlar anter duvarını aştıktan sonra besin maddelerini alabilirken mikrospor kültüründe polenler besin ortamı ile direk olarak temas kurabilirler;

Anter kültüründe ABA ya da toksik maddeler gibi engelleyici maddeler söz konusu iken mikrospor kültüründe bu maddeler anterle birlikte ortamdan uzaklaştırılmaktadır;

Bir polen tanesinden direk olarak embriyoya dönüşümü mümkün olduğundan gen transferi çalışmaları için bu yöntem oldukça uygundur ve *Agrobacterium* vasıtasıyla genetik transformasyon ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda büyük avantaj sağlamaktadır;

Abiyotik veya biyotik stres durumlarına dayanıklılık hedeflendiğinde *in vitro* seleksiyon için elverişli yöntemdir;

Kültüre alındıktan sonra embriyo oluşumunu takip etmek, anter kültürüne göre daha kolaydır;

Mutasyon ve genetik çalışmalarında başlangıç materyali olarak polen taneleri anterlere göre daha çok tercih edilmektedir.

Homojen materyal ile çalışma imkanı ve haploid embriyo evrimi anter kültürü yöntemine göre daha fazladır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Mikrospor kültürü çalışması, Guha ve Maheshwari (1964)'nin *Datura innoxia* bitkisiyle yaptıkları çalışma ile gelişmiştir. Bu çalışmada, *Datura innoxia* bitkisinin gelişmemiş polenlerini içeren anterlerinden, spesifik çevresel faktörleri fark edip, haploid bitkilerin kolayca üretilmesi işlemi gerçekleştirilmiştir.

Nitsch (1974), mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki eldesini başarıyla gerçekleştirmiştir.

Bu gelişmeden sonra Lichter (1982) *Brassica sp.* bitkisinde mikrospor izolasyonunu gerçekleştirerek haploid bitki eldesi amacıyla besi ortamına almıştır. Bu adım, dihaploid bitki üretimi için önemli bir noktadır.

Miyoshi (1996)'nin *Solanum melongena* L. ile yaptığı çalışmada kallus elde edilmiş, elde edilen rejenerantlardan rastgele seçilen 12 tanesinin birinin haploid, yedi tanesinin diploid, üçünün triploid ve bir tanesinin tetraploid olduğu sonucu rapor edilmiştir.

Bal ve arkadaşları (2009), tütün bitkisinde mikrospor embriyogenesi başlatmak için kullanılan protokolün bir modifikasyonunu patlıcanda çalışmışlardır. Bu çalışmada, simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapıların üretiminde tütün için uygulanan protokolün patlıcan için de uygulanarak tepki alınabildiği sonucunu ortaya koymuşlardır.

Yin ve arkadaşları (2010), biberden izole edilen mikrosporların embriyoid başlatımını ilerletebilmek için bir araştırma yapmış ve düşük sıcaklık ön uygulaması, büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları ve aktif karbon konsantrasyonlarının *in vitro*'da izole edilen biber mikrosporlarının embriyoid oluşumunu etkileyen kritik faktörler olduğunu belirlemişlerdir. Bu protokolün biber ıslahı açısından dihaploid bitkileri üretmek için potansiyel bir araç olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Ayçiçeğinde mikrospor kültürü ile ilgili ilk çalışma Gürel tarafından 1991 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 3 hibrit ve 1 inbred hat kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan çiçekçikler ezilerek mikrosporlar elde edilmiştir. Elde edilen bu mikrosporlar NLN besiyerine alınmışlardır. Bir hibrit ve bir inbred hattan embriyolar elde edilmiş ancak MS besin ortamına alındıktan sonra bu embriyolar kaybedilmiştir.

Todorova (1993)'nın yaptığı çalışmada, canlı ve saf mikrosporlar elde edebilmek için yeni bir sistem geliştirilerek 8 türler arası hibrit ve 3 ayçiçeği hibriti kullanılmıştır. Farklı besin ortamlarına alınan mikrosporların gelişimleri takip edilmiştir.

1.2.2 Ginogenesis (dişi gamet) yoluyla haploid bitki eldesi

Dişi gametofit haploid hücrelerinin partogenesise benzer şekilde embriyo oluşturmaları için yönlendirilmeleri ginogenesis yoluyla haploid bitki eldesinde izlenen yoldur. Soğan (*Allium cepa* L.), şeker kamışı (*Beta vulgaris* L.) ve bazı ağaçlarda ginogenesis kullanılmıştır (Michalik ve ark., 2000).

1.2.2.1 Ovul ve ovaryum kültürleri

Döllenmemiş yumurtalığın veya yumurta hücrelerinin kültüre alınmasıyla haploid embriyo ve bitki oluşumuna 'ovaryum' veya 'ovül kültürleri' adı verilmektedir (Aalders, 1958). Ovül veya ovaryum kültürlerinden başarılı olabilmek için önem verilmesi gereken önemli noktalardan birisi, yumurtalığın fizyolojik olarak içinde bulunduğu gelişme dönemidir. Bunu kesin olarak belirlemek için aynı çiçek içerisinde bulunan anterlerdeki uygun gelişme evresini bulmak gerekir (San Noeum, 1976).

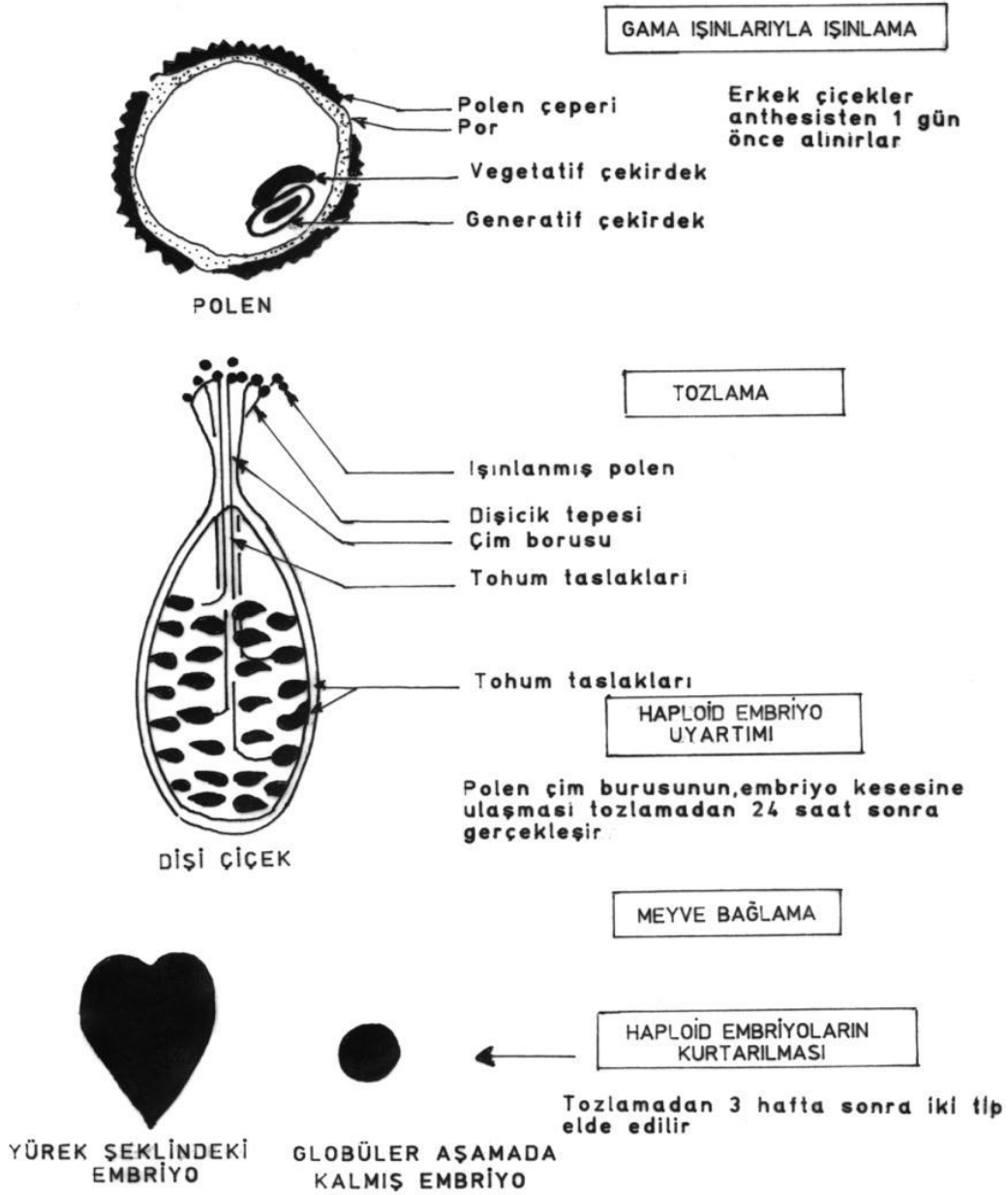
1.2.2.2 Eksik veya yetersiz polenlerle tozlama

Birçok bitki türünde dişi gametlerin *in vitro* kültüre alınmasıyla yalnızca düşük frekansta haploid embriyoların oluşabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sebeple, haploidlerin elde edilme oranını yükseltecek çalışmalar gündeme gelmiştir. Bu gelişmeye bağlı olarak, 1965 yılından sonra eksik ya da yetersiz polenler kullanılarak embriyo oluşturma ve bu embriyoları bitkiye dönüştürme çalışmaları başlamıştır.

Partenogenetik embriyo oluşumunu uyarmak üzere kullanılacak eksik veya yetersiz polenleri elde etmek için, değişik kimyasal maddeler ile radyoaktif ışın uygulamalarından yararlanılmaktadır. Ayrıca, uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlamaların geciktirilmesi, sıcaklık şokları da uygulanan diğer tekniklerdir. Polenlere yapılan bu uygulamalar sayesinde polen generatif çekirdeği inaktif hale getirilmekte, bununla birlikte çimlenme yeteneğini koruyan polenler dişik tepesi üzerinde çimlendiklerinde oluşturdukları uyartım sonucunda, partenogenetik olarak haploid embriyolar meydana gelmektedir.

Tozlamada kullanılacak aktif olmayan polenler, farklı kimyasallar aracılığıyla da elde edilebilmektedir. Bu amaç için kolşisin ve tolidin mavisini en fazla kullanılan maddelerdir (Sarı ve ark., 1995; Kurtar, 1999).

1980'li yıllarda polen ışınlanması ve ışınlanmış polenlerle dişi çiçeklerin tozlanması yöntemleriyle haploid embriyoların meydana getirilmesi çalışmaları başlamış ve bu yöntemle birçok bitki türünde başarılı olunmuştur. Işınlanmış polenlerle yapılan tozlama yoluyla partenogenetik embriyo uyartımı, başta *Cucurbitaceae* familyasına ait türler olmak üzere, şeker pancarı, çilek, kivi, petunya, havuç ve lahana gibi bitki türlerinde başarılı sonuçlar vermiştir. Polen ışınlanması sonucu embriyo elde ettikten sonra bu embriyoların bitkiye dönüştürülmesi gerekmektedir (Sarı ve ark., 1992b). Normal bir döllenme sonucunda oluşmayan embriyo endospermden yoksundur, bu nedenle embriyonun kurtarılmasını sağlamak amacıyla haploid embriyoların embriyo kültürüne alınması gerekmektedir. Embriyo kültürüne alınan embriyoların gelişimi birkaç günde tamamlanmaktadır. Ancak bu yöntem düşük oranda haploid bitki eldesi sağladığı için ıslahçılar tarafından tercih edilmemektedir (Ferrie ve ark., 2011).



Şekil 1. 10 Kabakta ışınlanmış polen ile haploid embriyo uyartımının gerçekleşmesi (Cuny, 1992).

1.2.3 Kromozom eliminasyonu

Dişi gametten haploid bitki elde etme yollarından bir diğeri de *kromozom eliminasyonu* adı verilen yöntemdir. Bu yöntemin diğeri adı *Bulbosum* tekniğidir. *Hordeum* cinsi ile gerçekleştirilen türler arası çaprazlamalar sonucunda meydana gelen embriyoda, ebeveynlerden birine ait kromozomların kaybolması prensibine dayanmaktadır (Kasha ve Kao, 1970). *Bulbosum* tekniği ana ebeveyn olan *Hordeum vulgare* ($2n=14$) ile baba

ebeveyn olan *Hordeum bulbosum*'un ($2n=14$) melezlenmesi olmak üzere iki aşamalıdır. İlk aşamada zigot oluşur fakat embriyodaki *bulbosum* kromozomları yok olmaya başlar ve sonrasında sadece *Hordeum vulgare*'nin kromozomlarına sahip olan haploid embriyo bulunur. Sonrasında ikinci evre başlar ve normal şartlarda gelişimi duracak olan haploid embriyo, kültüre alınarak kurtarılır. Sonrasında tam arpa bitkisi elde edilir. Bu şekilde elde edilen arpa bitkisinin tamamına yakını haploid ($n=7$) kromozom sayısındadır (Bajaj, 1990; Hess, 1992).

1.3 Ploidi Belirleme

Bitkilerde ploidi düzeyini belirlemek amacıyla farklı yöntemlerden yararlanılmaktadır. Kök uçları başta olmak üzere, hızlı büyüyen doku ve organlarda kromozom sayımı yapılması, ploidi belirlemede kullanılan en eski ve güvenilir yöntemdir. Son yıllarda kromozom sayımına ek olarak farklı yöntemler geliştirilmiştir. Stoma hücreleri ve flow sitometride yapılan incelemelere göre geliştirilen yöntemler, günümüzde ploidi seviyesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Fenotipik gözlemler

Bitkilerde kromozom sayısı çoğaldıkça bitkinin tüm organlarında bir irileşme meydana gelmektedir. Haploid bitkiler, tüm organları tam olmasına rağmen diploidlere göre daha küçük olmaktadır. Haploid bitkilerin belirlenmesinde fenotipik gözlem hızlı ve masrafsızdır ancak güvenilir olması için diğer yöntemlerden biri ile bu gözlemi doğrulamak gereklidir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Kromozom analizleri

Bitkilerin kök uçlarından alınan örneklerle yapılan kromozom analizleri preparat hazırlarken işlemin uzun sürmesi ve deneyimli kişilerin yapmasının daha iyi sonuç vereceğinin belirtilmesi sebebiyle zaman alan ancak en güvenilir olan yöntemdir. Bölünmenin en hızlı olduğu sabah saatlerinde kök uçlarından örnek alınır. Örnekleri 3-4 saat boyunca monobromonaftalin veya kolşisin gibi amitotik bir ajanla muamele ederek hücrelerin metafaz safhasında iğ iplikçiklerin oluşumunu engelleyip kromozomları ekvatorial tabakada tutarak kromozomların dağılması engellenir. Daha sonra bitkiler çözüldükten arındırılır. Glisial asetik asit içerisinde tespit işlemi yapılarak fiksasyon

sağlanır. Hücrelerin birbirinden ayrılması için, doku 60 °C'de 10-20 dakika 1 N HCl içerisinde hidroliz edilir, bu sayede hücreler daha net bir şekilde görülebilir. Metafaz evresindeki bölünmenin yoğun olduğu kök ya da yaprak uçları, Feulgen boyası ile boyanır, doku lam üzerine yerleştirildikten sonra %1'lik asetokarmin uygulanır ve kromozomların net görülmesi sağlanıp kromozom sayımları gerçekleştirilir (Ashok ve ark., 2003).

Flow Sitometri

Hücrelerdeki kromozom sayılarının belirlendiği ploidi ölçümleri, bazı bitki bilimciler tarafından '*flow sitometri*' olarak adlandırılmaktadır (Galbraith ve ark., 1983; Ulrich ve Ulrich, 1986).

Diğer ploidi belirleme yöntemlerinin uygun olmadığı durumlarda flow sitometri güvenilir yöntem olarak kullanılabilir. Flow sitometri, hücrelerin tek tek floresans dedektörden geçerken emdikleri ışığın analizine dayanan bir yöntemdir. Serbest bırakılan hücre çekirdekleri, H 33258 veya DAPI gibi floresans boya ile boyanır ve çekirdekteki DNA miktarı saptanır. Bu yöntem her bitki için optimize edilmelidir. Ancak hızlı, kolay ve güvenilir bir yöntemdir (Arı, 2006).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekilen örneklerden 6 farklı ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) genotipine (IMI-K2-R-SN-7/15, IMI-K2-R-SN-22/15, IMI-K2-R-SN-25/15, IMI-K2-AD-SN-2/15, SURES-K2-R-SN-9/15, SURES-K2-AD-SN-2/15) ait kapitulumlar bitki materyali olarak kullanıldı. Bu bitki materyallerine ek olarak Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında mevcut bitki yetiştirme odasında aynı genotiplere ait tohumlar çimlendirilerek elde edilen kapitulumlar kullanıldı(Şekil 2. 1).

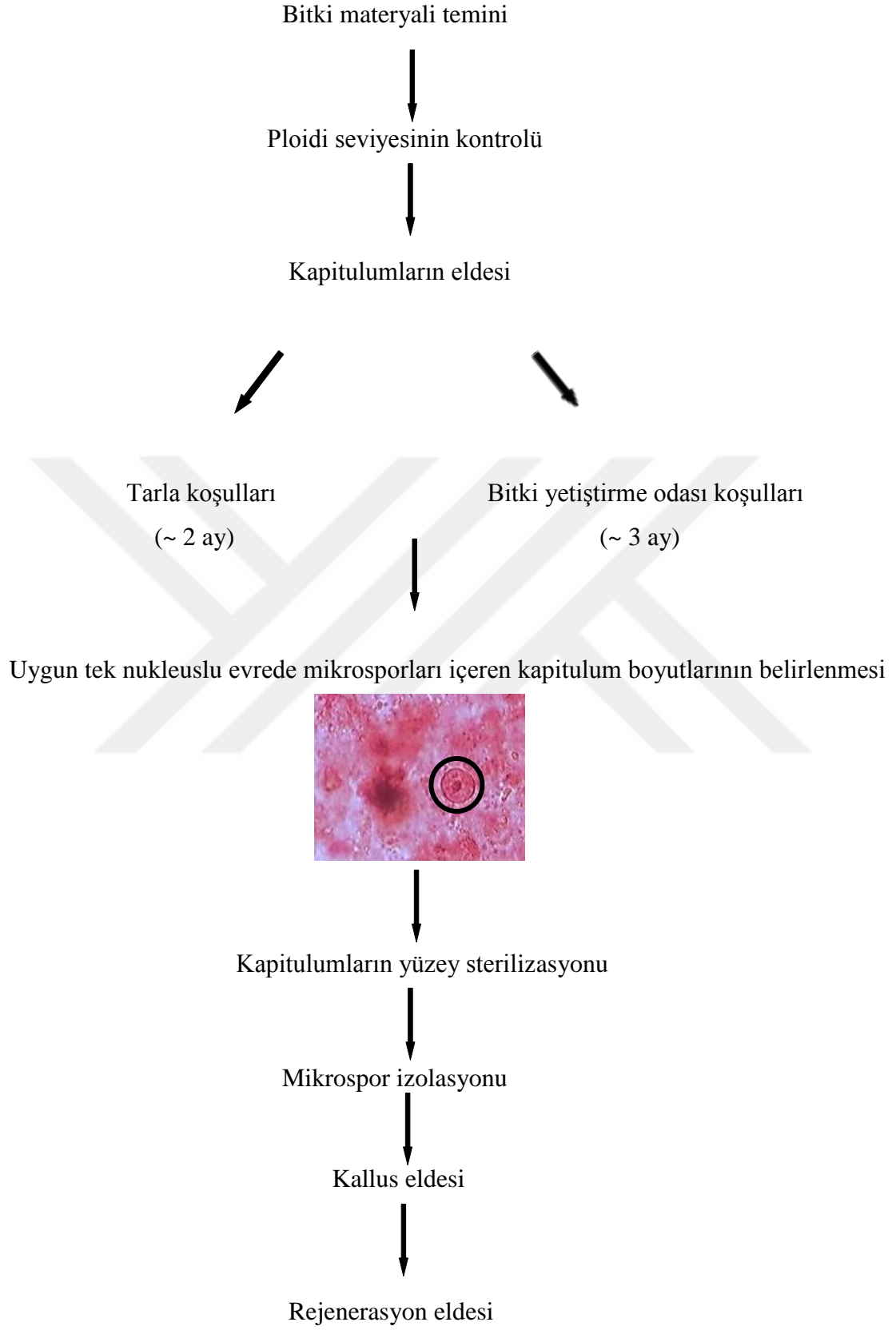


(a)

(b)

Şekil 2. 1 Çalışmada kullanılan genotiplerin (a) tarla ve (b) bitki yetiştirme odasındaki görüntüleri.

Elde edilen bu bitki materyalleriyle farklı protokoller uygulanarak gerçekleştirilen mikrospor kültürü çalışmalarında izlenen adımlar Şekil 2. 2'de verilmiştir.



Şekil 2. 2 Mikrospor kültürü çalışmasında izlenen adımlar.

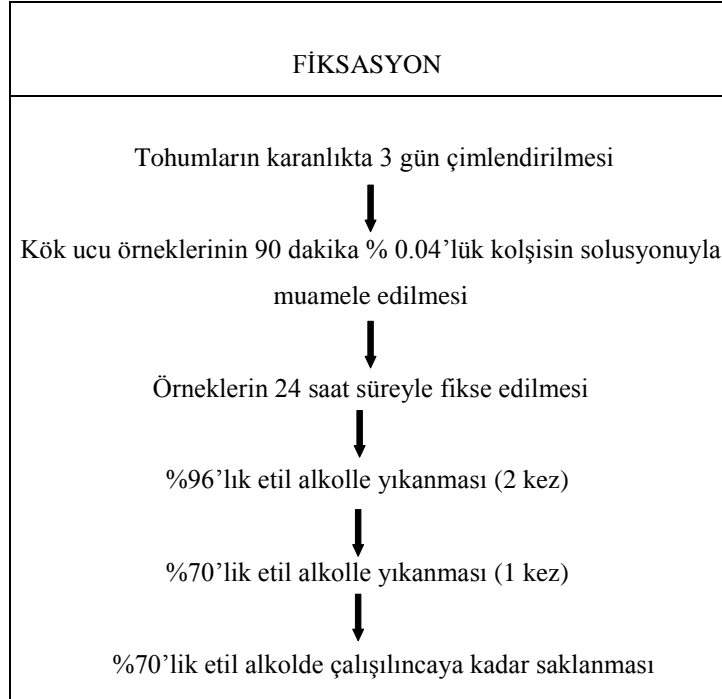
2.2 Bitki Materyalinin Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi

Bitki materyali olarak kullanılan genotiplerin mikrospor izolasyonu için kullanılmaya başlanmasından önce ploidi seviyelerinin kontrolü yapıldı. **Tablo 2.1**'de içerik ve hazırlanışları verilen çözeltiler kullanıldı.

Tablo 2. 1 Kromozom analizinde kullanılan çözeltiler, hazırlanışları ve içerikleri (Cuellar ve ark.,1996).

| Çözeltinin adı | İçeriği | Hazırlanışı |
|-----------------|---|--|
| Fiksatif | Absolü etil alkol Glasiyal asetik asit | 3 Absolü etil alkol : 1 glasiyal asetik asit oranında olacak şekilde taze olarak hazırlandı. |

Petri kaplarında 3 gün çimlendirilen ayçiçeği tohumlarına ait kök ucu dokuları 90 dakika %0.04'lük kolşisin çözeltisi ile ön muamele edildiler. Daha sonra dokular asetik alkolde 24 saat fikse edildiler. Fiksatiften alınan dokular 2 kez %96, 1 kez de %70'lik etil alkol ile çalkalanarak yıkandılar. Fikse olan kökler %70'lik etil alkolde +4°C'de saklandılar (**Şekil 2. 3**) (Cuellar ve ark., 1996).

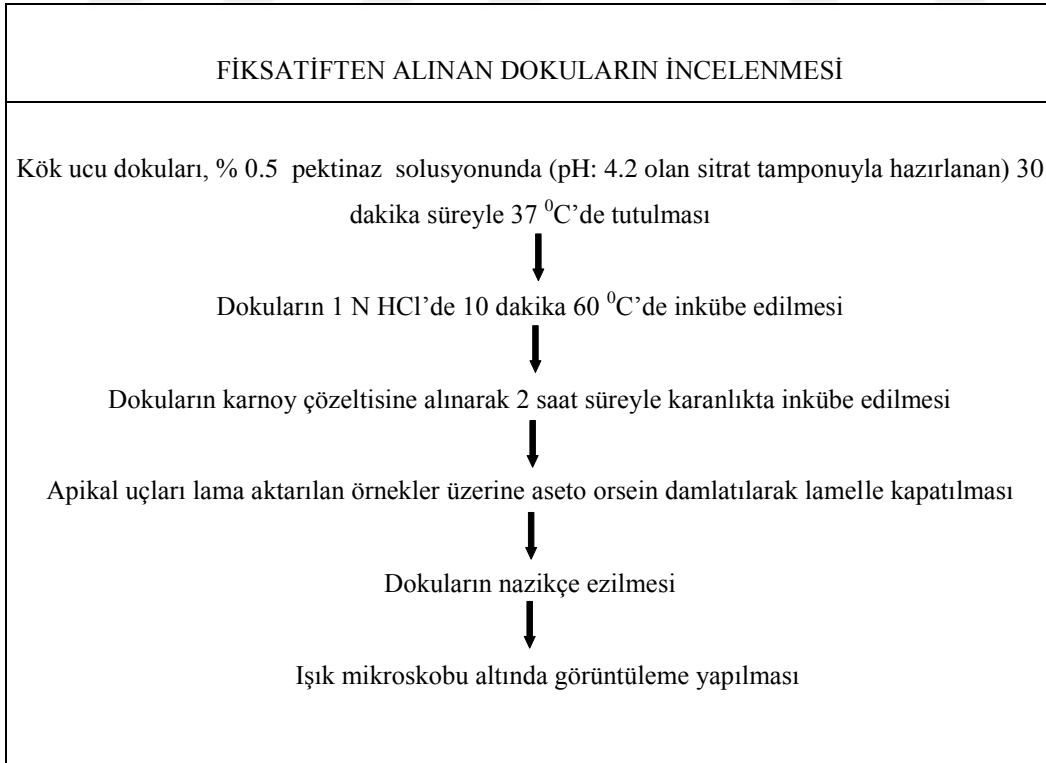


Şekil 2. 3 Fiksasyon aşamaları (Cuellar ve ark., 1996).

Fikse edilen kökler daha kolay ezilebilmesi için % 0.5 pektinaz solusyonunda (pH: 4.2 olan sitrat tamponuyla hazırlanan) 30 dakika süreyle 37 °C'de tutuldular. Süre sonunda kökler 60 °C'de 1N HCl ile hidroliz edildiler. Hidroliz sonrasında farklı kromozom boyar maddelerinin kullanıldığı Feulgen reaksiyonunda kökler bazik fuksin ile boyandı ancak arka planda kalan boya artığı ve kromozomların iyi boyanmaması sebebiyle Schiff reaktifi tercih edildi (**Tablo 2. 2**). 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında kökler Schiff reaktifinde bekletildi. Daha sonra % 0.5 sodyum metabisülfid çözeltisinde çalkalanan kökler filtre edilmiş % 2'lik asetoorsein'de ezildiler. Ezilen kök ucu hücreleri Olympus BX-51 mikroskobunda incelendi. Kameram dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflanıp, Kameram yazılım programında analiz edildi (**Şekil 2. 4**).

Tablo 2. 2 Farklı boyar maddelerin kullanıldığı Feulgen reaksiyonunun uygulaması (Cuellar ve ark.,1996).

| Boyar madde | Uygulama koşulları |
|-----------------|---|
| Schiff reaktifi | 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında tutulan kökler Schiff reaktifinde bekletildi. Daha sonra % 0.5 sodyum metabisülfid çözeltisinde çalkalanan kökler % 2'lik asetoorsein'de ezildiler. |

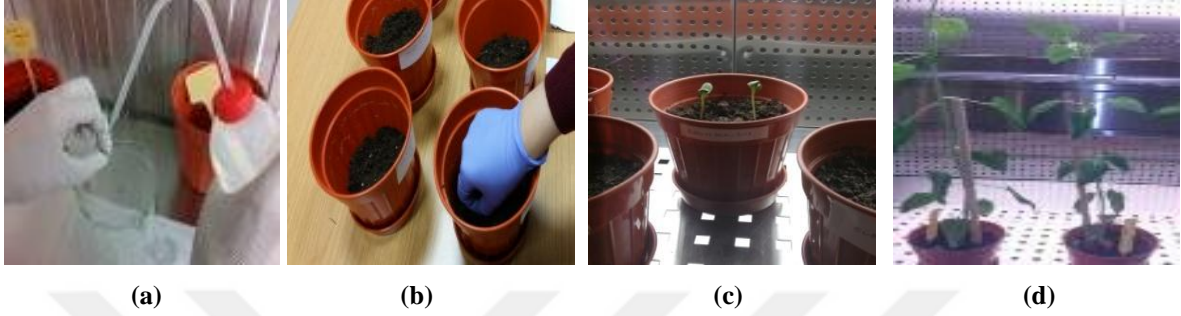


Şekil 2. 4 Fiksatiften alınan kök ucu dokularında ezme preparat yapımı (Cuellar ve ark.,1996).

2.3 Kapitulum Eldesi

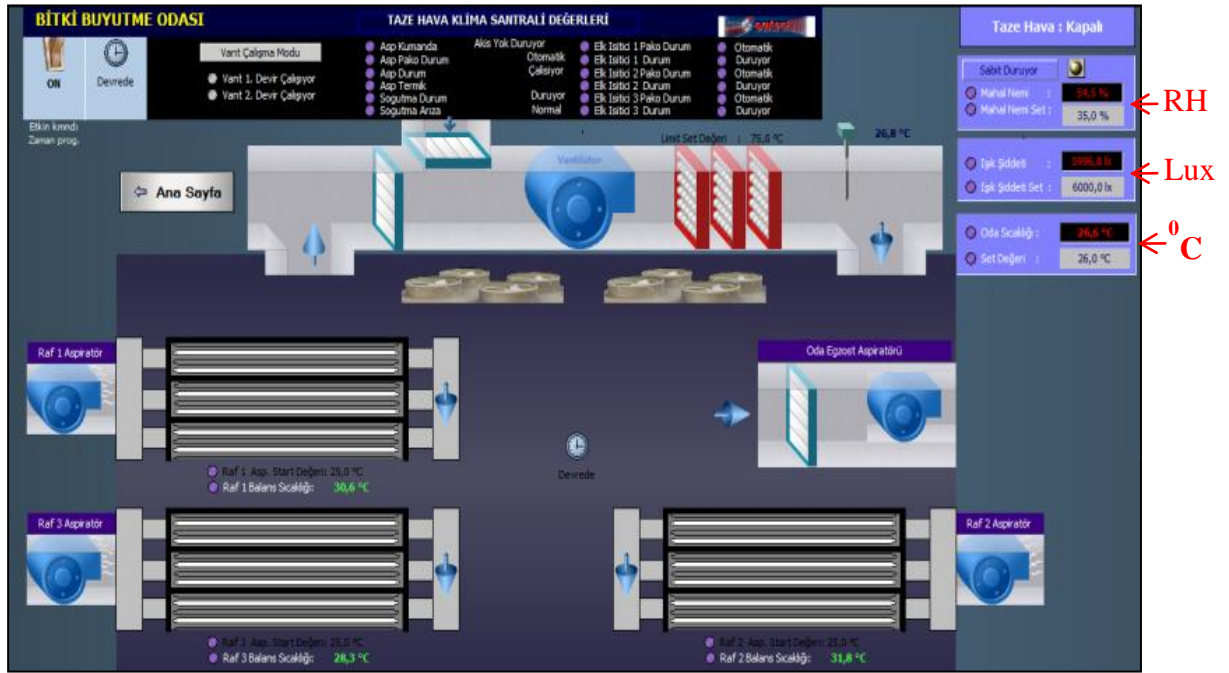
2.3.1 Bitki yetiştirme odasından kapitulum eldesi

Ayçiçeği tohumları her bir genotip için her bir saksıda 5'er tane tohum olacak şekilde toprak içeren saksılara ekilerek bitki yetiştirme odasında çimlendirildi (Şekil 2. 5).



Şekil 2. 5 Tohumların ekimi ve yetiştirilmesi. (a-b) ayçiçeği tohumlarının distile su ile yıkanıp saksıya ekilmesi, (c-d) ortalama 60 gün, kapitulum oluşuncaya kadar ayçiçeği tohumlarının yetiştirilmesi.

Ortam ışıklandırması 6000 lux ve ortam sıcaklığı 25 °C olacak şekilde kontrol paneli aracılığıyla ayarlandı (Şekil 2. 6). Ortalama 2,5 - 3 ayda istenilen büyüklüğe gelen kapitulumlara mevcut bitki yetiştirme odasında 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyod uygulandı (Şekil 2. 7).

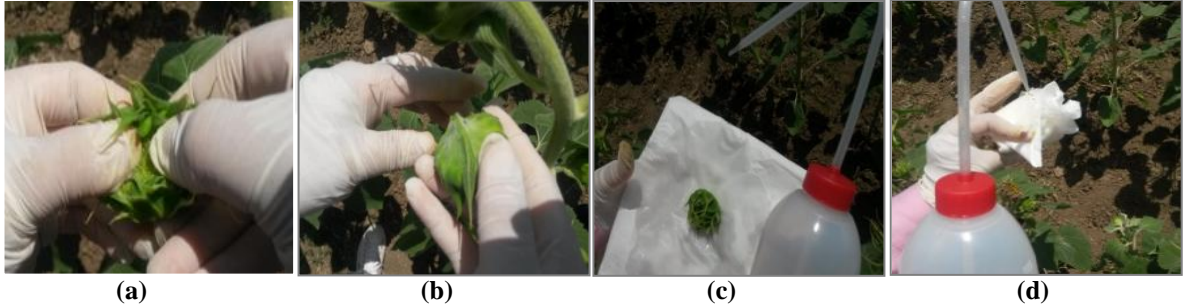




Şekil 2. 7 Bitki yetiştirme odasında yetiştirilmiş uygun evrede mikrospor içeren kapitulum.

2.3.2 Tarladan kapitulum eldesi

Tarlada yetişen ayçiçekleri kapitulumları belli zaman aralıklarında incelendi ve yaklaşık iki ayda uygun büyüklüğe gelen kapitulumlar alınarak laboratuvara çalışmak üzere getirildi. Tarladan alındıktan sonra laboratuvara getirme süresine kadar içerisinde buz bulunan saklama kutularında muhafaza edildi. Çalışmada kullanılacak kapitulumların içerisindeki çiçekçiklerin mikrospor izolasyonu için uygun evreyi geçmemiş olmasına dikkat edilerek ayçiçek kapitulumları seçildi (Şekil 2. 8).



Şekil 2. 8 Kapitulumların eldesi. (a-b) uygun büyüklükte olduğuna karar verilen kapitulum ve alınması, (c-d) kapitulumun önceden ıslatılan kurutma kağıdına yerleştirilip saklanması.

2.4 Kapitulum Boyutlarının Belirlenmesi

Mikrospor izolasyonunda anterlerin hangi gelişme evresinde olduğunun incelenmesi büyük önem taşır. Bu evrenin belirlenmesi için sitolojik çalışmalar yapılır. Bundan dolayı morfolojik olarak uygun büyüklüğe geldiğine karar verilen kapitulumlar toplanarak bunlardan elde edilen çiçekçikler incelenir. Bu tez çalışmasında da tarla ve bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulumlarda farklı boyuttaki çiçekçikler, ezme preparat yöntemiyle incelenerek orta-geç tek nukleuslu safhadaki mikrosporları içeren uygun anter boyu saptandı.

Bitki yetiştirme odasında yaklaşık 2,5- 3 ayda yetiştirilerek elde edilen kapitulumlarda 1-2 cm çapındaki örneklerde uygun safhada mikrospor içeren çiçekçikler bulundu.

Tarladan temin edilen ve ortalama 2 aylık yetiştirme süresinden sonra elde edilen kapitulumlarda 3-4 cm çapındaki örneklerde uygun safhada mikrospor içeren çiçekçikler bulundu.

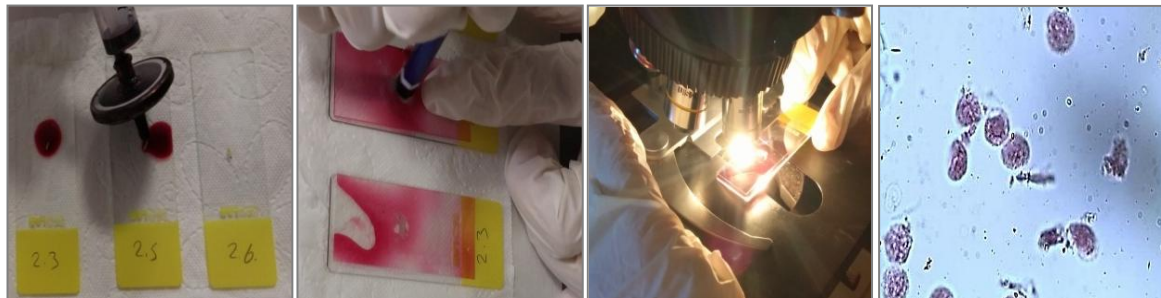
2.4.1 Ezme preparat yöntemi

Binoküler mikroskop altında incelenen kapitulumlardan farklı boyutlardaki çiçekçikler izole edilerek lam üzerine alındı. Üzerlerine birer damla %2'lik aseto orsein çözeltisi damlatılarak lamelle kapatılarak ezildi. Aseto orsein çözeltisinin hazırlanışı **Tablo 2. 3**'de verilmiştir.

Tablo 2. 3 Aseto-orsein solüsyonunun hazırlanması.

| Boyar madde | Hazırlanma koşulları |
|--------------|---|
| Aseto-orsein | 2 gr orsein tartılarak üzerine kaynatılan 45 ml asetik asit döküldü, çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Tamamen çözülene kadar çözelti manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, karanlık ortamda oda sıcaklığında saklandı. |

Çiçekçikler ışık mikroskobu (Olympus BX 51) altında incelenerek uygun safhada mikrospor içeren anter boyutu belirlendi (**Şekil 2. 9**).



Şekil 2. 9 Ezme preparat yöntemi. (a) farklı boyutlardaki çiçekçiklerin lam üzerine alınarak üzerlerine aseto orsein damlatılması, (b) çiçekçiklerin lamelle kapatılıp ezilmesi, (c) preparatın ışık mikroskobunda incelenmesi, (d) ezme preparat hazırlanarak mikrosporların mikroskopta gözlenmesi.

2.5 Mikrospor Kültürü Çalışmaları

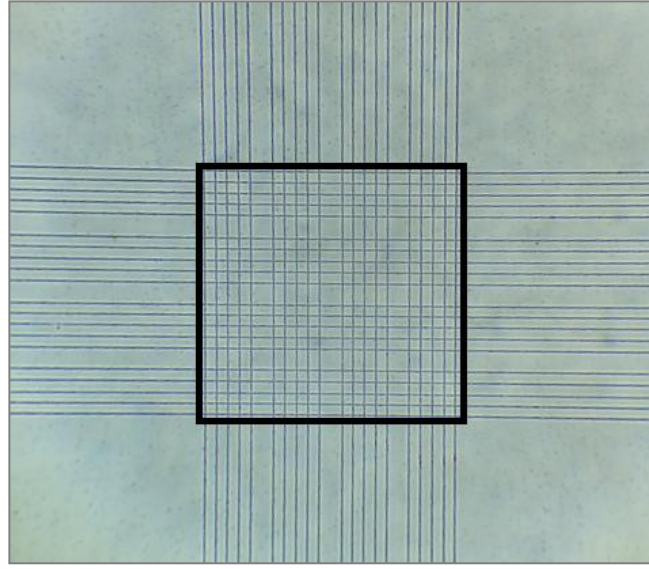
2.5.1 Mikrospor izolasyonu

Bu tez çalışmasında mikrospor kültürü optimizasyonu çalışmaları kapsamında **Gürel, A. ve ark. (1991)**, **Mohammadi, P. P. ve ark. (2011)**, **Todorova, M. ve ark. (2014)**, ve **Özsan, T. (2014)**'nin izlediği protokoller uygulandı. İzole edilen mikrosporlar kültüre alınmadan önce yoğunluklarının belirlenmesi amacıyla thoma lamı ile sayıldı.

Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi

Kültüre alınan mikrosporların belirli yoğunlukta olmaları mikrospor kültürünü etkileyen önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle son santrifüjleme (yıkama) işleminden sonra santrifüj tüpünde bulunan mikrospor süspansiyonundan bir damla örnek alınarak thoma lamında sayım yapıldı ve mikrospor yoğunluğu belirlendi. Ayçiçeğinde mikrospor kültürü yoğunluğu daha önceki kaynaklarda belirtildiği gibi her bir ml için 40.000 birimdir (Gürel, ve ark., 1991).

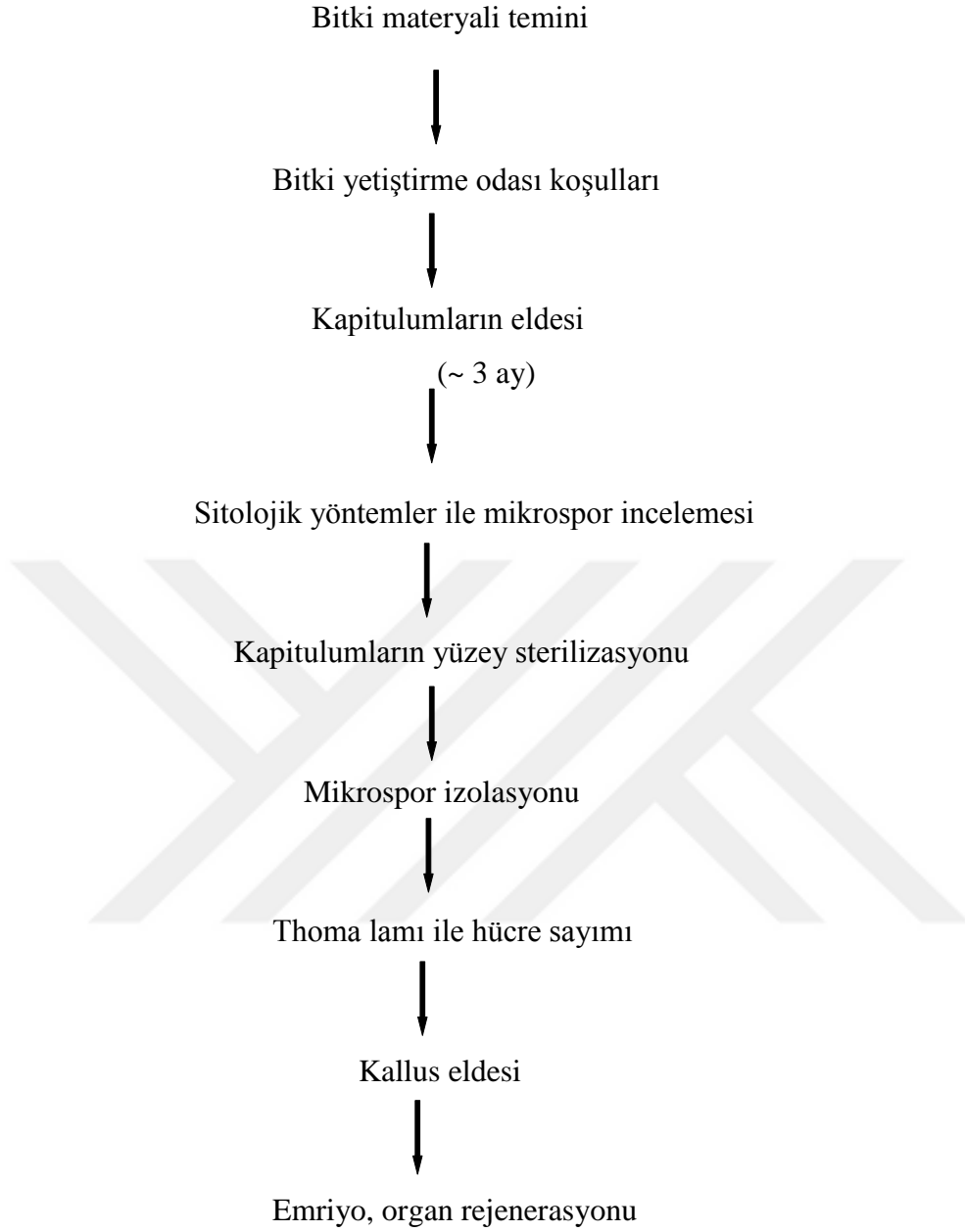
Thoma lamında 0.1 mm^3 hacimde sayım yapılır. Süspansiyondan alınan kültür örneği thoma lamının ortasında bulunan çukur kısma aktarılır ve üzeri lamel ile kapatılır. Cam yüzeydeki çizgilerle belirlenmiş alanda sayım yapılır. Thoma lamında 16 büyük kare, her bir büyük karede ise 25 adet küçük kare olmak üzere toplam 400 adet küçük kare bulunmaktadır. Sayım bu karelerde yapılır (**Şekil 2. 11**). Bir küçük karenin kenarları $1/20 \text{ mm}$ (0.05 mm) olup derinliği $1/10 \text{ mm}$ (0.1 mm)'dir. Buna göre; bir küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi $= 0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.00025 \text{ mm}^3 = 1/4000 \text{ mm}^3$ 'dür. Bir sayım alanında $16 \times 25 = 400$ küçük kare olduğuna göre toplam sayım alanının hacmi $= 400 \times 0.00025 \text{ mm}^3 = 0.1 \text{ mm}^3$ olmaktadır (Tuncer, 2010).



Şekil 2. 10 Thoma lamında sayım yapılan kareler.

Protokol 1 (Gurel, A., S. Kontowski, K. Nichterlein, W. Friedt, 1991. Embryogenesis In Microspore of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Helia, 14 (14): 123-128)

Ayçiçeğinde mikrospor kültürü optimizasyonu amacıyla uygulanan bu protokolda NLN (Gland ve ark., 1988) temel besin ortamı kullanıldı (**Tablo 2. 2**). NLN besin ortamına sukroz (130 g/l) eklendikten sonra ortamın pH'si NaOH ve HCl kullanılarak 6.0'a ayarlandı (Mettler Toledo Seven Compact™). Hazırlanan besiyeri steril kabin (EscoLabculture Plus Class II Biological Safety Cabinet, Model LP2-4S) içerisinde filtreden geçirilip cam şişelere konularak +4 °C'de muhafaza edildi. Öncelikle bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulumlarla deney çalışması gerçekleştirildi. Uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu 1,8-2 mm olarak belirlendi. Bu protokolda 30 adet çiçekçik kullanıldı. Mikrospor kültüründe izlenen adımlar **Şekil 2. 11**'de verilmiştir.

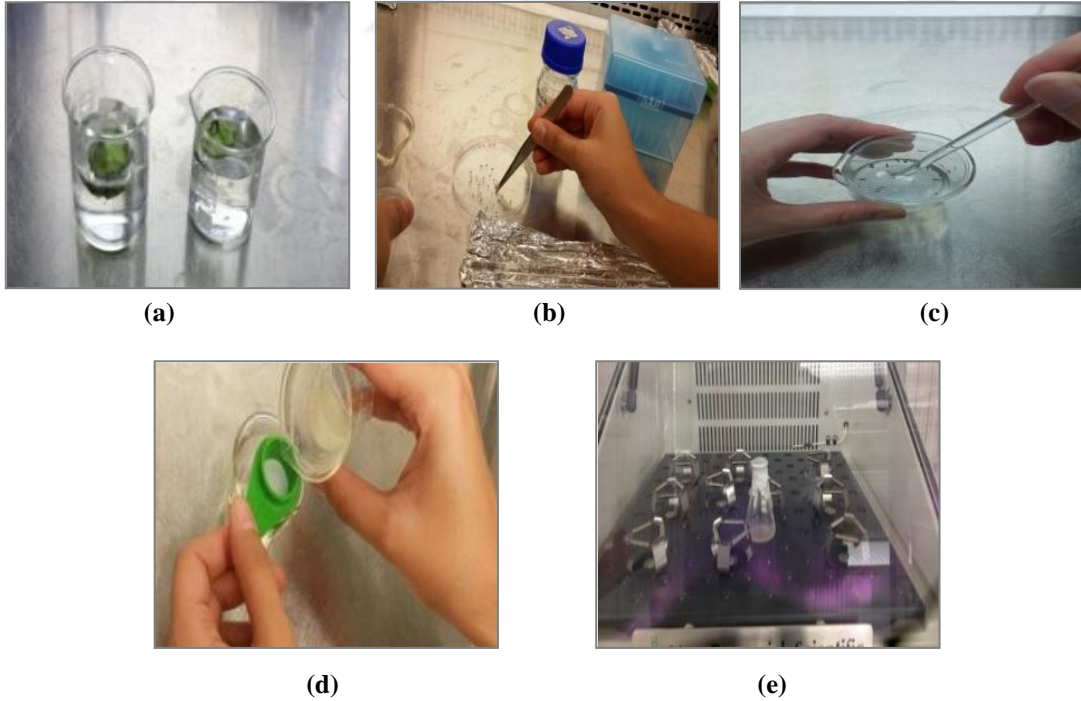


şekil 2. 11 Mikrospor kultişu adımları (Protokol 1) (Gürel, A. ve ark., 1991).

Tablo 2. 4 Çalışmada kullanılan NLN besin ortamına ait makro-mikro elementler ve konsantrasyonları.

| Makro element | Konsantrasyon (mg/l) |
|--|-----------------------------|
| Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O | 500 |
| KH ₂ PO ₄ | 125.00 |
| KNO ₃ | 125.00 |
| MgSO ₄ | 61.00 |
| Mikro element | |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 0.025 |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 0.025 |
| FeNaEDTA | 36.70 |
| H ₃ BO ₃ | 10.00 |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 18.95 |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0.25 |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 10.00 |

Mikrospor izolasyonunda gerçekleştirilen adımlar **Şekil 2. 12**'de verilmiştir.



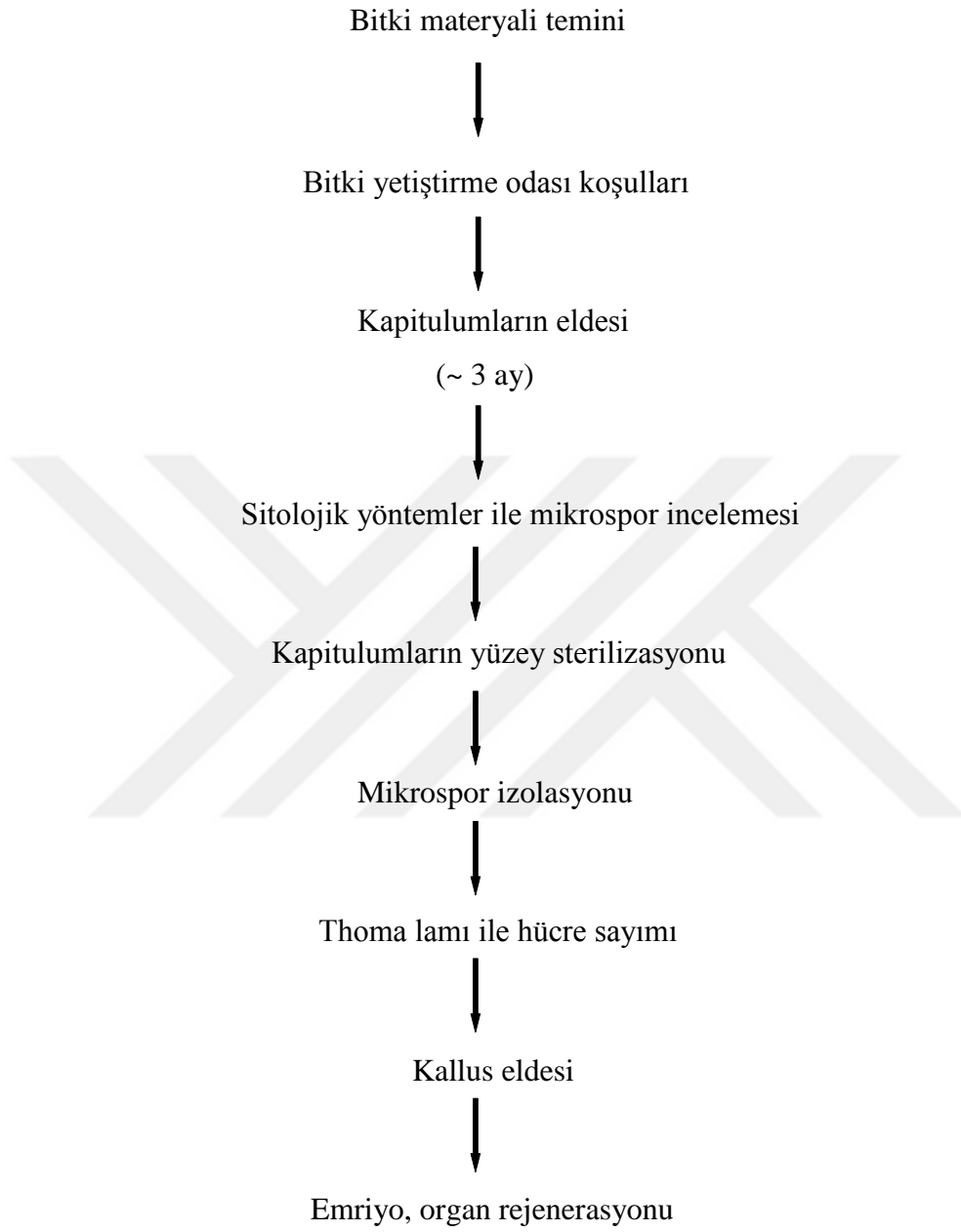
Şekil 2. 12 Mikrospor izolasyon aşamaları (Protokol 1). (a) kapitulumların yüzey sterilizasyonu, (b) uygun boyuttaki çiçekçiklerin belirlenmesi, (c) mikrospor izolasyonu ve çiçekçiklerin ezilmesi, (d) filtreden geçirilmesi (e) son santrifüj işleminden sonra kulture alınan örneklerin inkübatöre yerleştirilmesi (Gürel ve ark., 1991).

Bitki yetiştirme odasında yetiştirilen kapitulumlarla uygulanan protokol 1 sonrasında tarladan temin edilen kapitulumlarla da denenmiştir. Uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu 2 mm olarak belirlendi.

Protokol 2 (Mohammadi, P. P., Moieni, A., Ebrahimi, A., Javidpar, F., 2011.

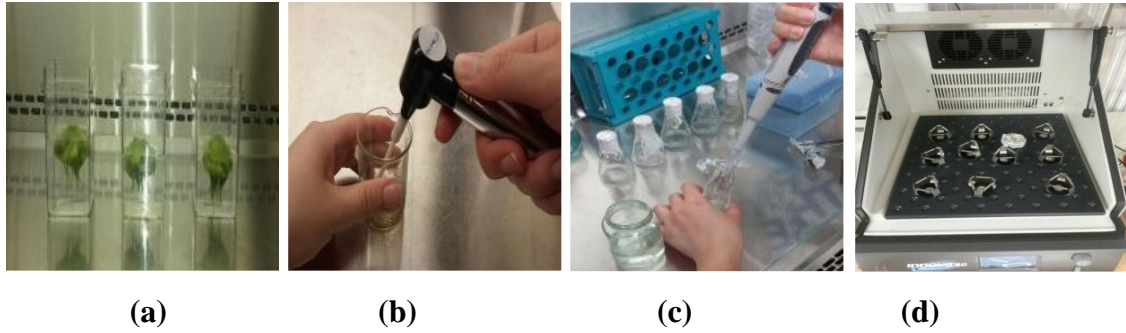
Doubled Haploid Plants Following Colchicine Treatment of Microspore-Derived Embryos of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture)

Ayçiçeğinde mikrospor kültürü optimizasyonu amacıyla uygulanan bu protokolle Litcher (1982) tarafından modifiye edilen filtre ile sterilizasyonu yapılmış ve Protokol 1’de kullanılan NLN-13 (%13 sakkaroz, patates özü ve büyümeyi düzenleyici içermeyen, PH: 6.0) temel besin ortamı kullanıldı. Bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulumlarla gerçekleştirilen deneyde uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu 1,8-2 mm olarak belirlendi. Bu protokolle 40 adet çiçekçik kullanıldı. Mikrospor kültüründe izlenen adımlar **şekil 2. 13**’de verilmiştir.



Şekil 2. 13 Mikrospor kültürü adımları (Protokol 2) (Mohammadi, 2011).

Mikrospor izolasyonunda gerçekleştirilen adımlar **Şekil 2. 14**'de verilmiştir.

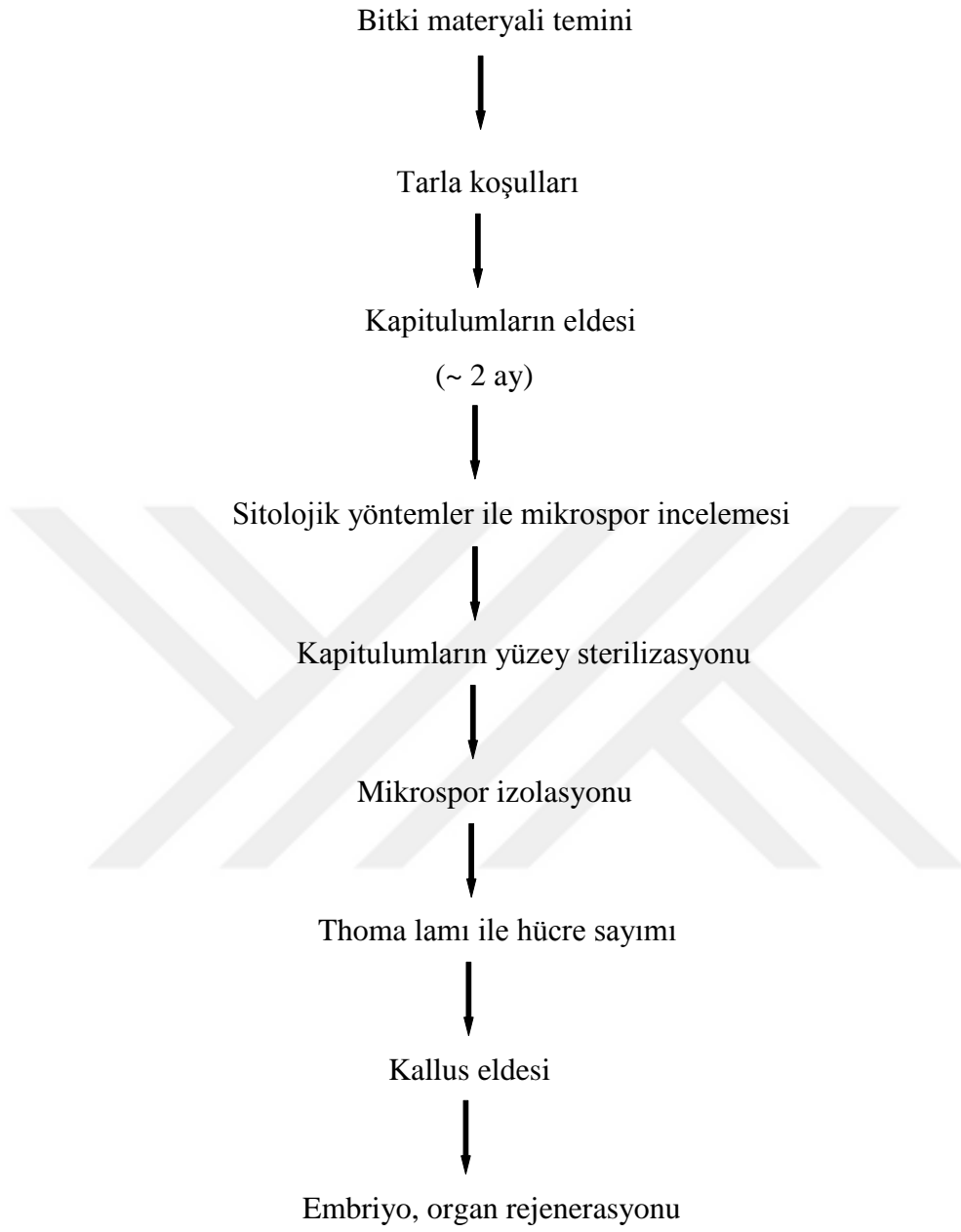


Şekil 2. 14. Mikrospor izolasyon aşamaları (Protokol 2). **(a)** kapitulumların yüzey sterilizasyonu, **(b)** mikrospor izolasyonu ve uygun boyuttaki çiçeklerin ezilmesi, **(c)** izole edilen mikrosporların kültüre alınması, **(d)** inkübatöre yerleştirilmesi (Mohammadi, 2011).

Bitki yetiştirme odasında yetiştirilen kapitulumlarla uygulanan protokol 2, aynı şekilde tarladan temin edilen kapitulumlarda da denendi. Uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu 2 mm olarak belirlendi.

Protokol 3 (Todorova, M., Dahlhoff, M., Friedt, W. (1993) Microspore culture in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Biotechnol. Biotechnol. Eq. 7: 83–90.)

Ayçiçeğinde mikrospor kültürü optimizasyonu amacıyla uygulanan bu protokolde yarı katı MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel besin ortamı kullanıldı (**Tablo 2. 3**). MS besin ortamı çözeltilisine sukroz (30 g/l) ve gelrite (7 g/l) ile mikrospor kültüründe pozitif etkisi olduğu belirlenmiş charcoal (8 g/l) eklenerek farklı besin ortamları hazırlandı (**Tablo 2. 5**). Ortamın pH'si NaOH ve HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandı ve besin ortamları 1 atmosfer basınçta ve 121 °C'de 20 dakika süre ile otoklavlandı (Systec- DB 45). Tarladan temin edilen kapitulumlarla deney çalışması gerçekleştirildi. Uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu 2 cm olarak belirlendi. Bu protokolde 30 adet çiçekçik kullanıldı. Mikrospor kültüründe izlenen adımlar **Şekil 2. 15**'te verilmiştir.



Şekil 2. 15 Mikrospor kültürü adımları (Protokol 3). (Todorova ve ark., 2014).

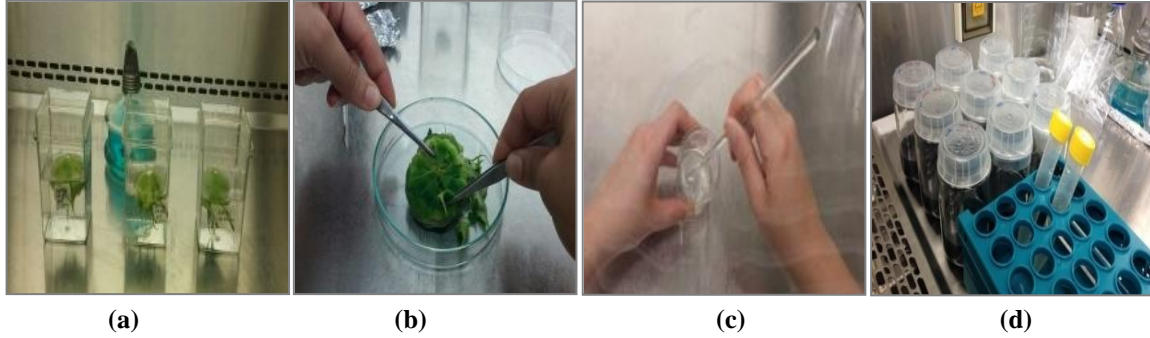
Tablo 2. 5 Çalışmada kullanılan yarı katı MS temel besin ortamına ait makro-mikro elementler ile vitamin ve karbonhidrat kaynaklarına ait miktarlar.

| Makro Elementler | Konsantrasyon (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 | 27,08 |
| Na ₂ EDTA | 37.3 |
| Vitaminler | |
| Pridoksin hidroklorid | 0.5 |
| Glisin | 2.0 |
| Nikotinik asit | 0.5 |
| Tiamin hidroklorid | 0.1 |
| Myo-inositol | 100 |
| Karbonhidratlar | |
| Sukroz | 30.000 |

Tablo 2. 6 Yarı katı MS temel besin ortamı ile charcoal ve gelrite kullanılarak hazırlanan besiyeri çeşitleri.

| MS 1 | MS 2 | MS 3 |
|------------------|-----------------|-----------------|
| Gelrite (7 g/l) | Gelrite (7 g/l) | Sukroz (30 g/l) |
| Charcoal (8 g/l) | Sukroz (30 g/l) | |
| Sukroz (30 g/l) | | |

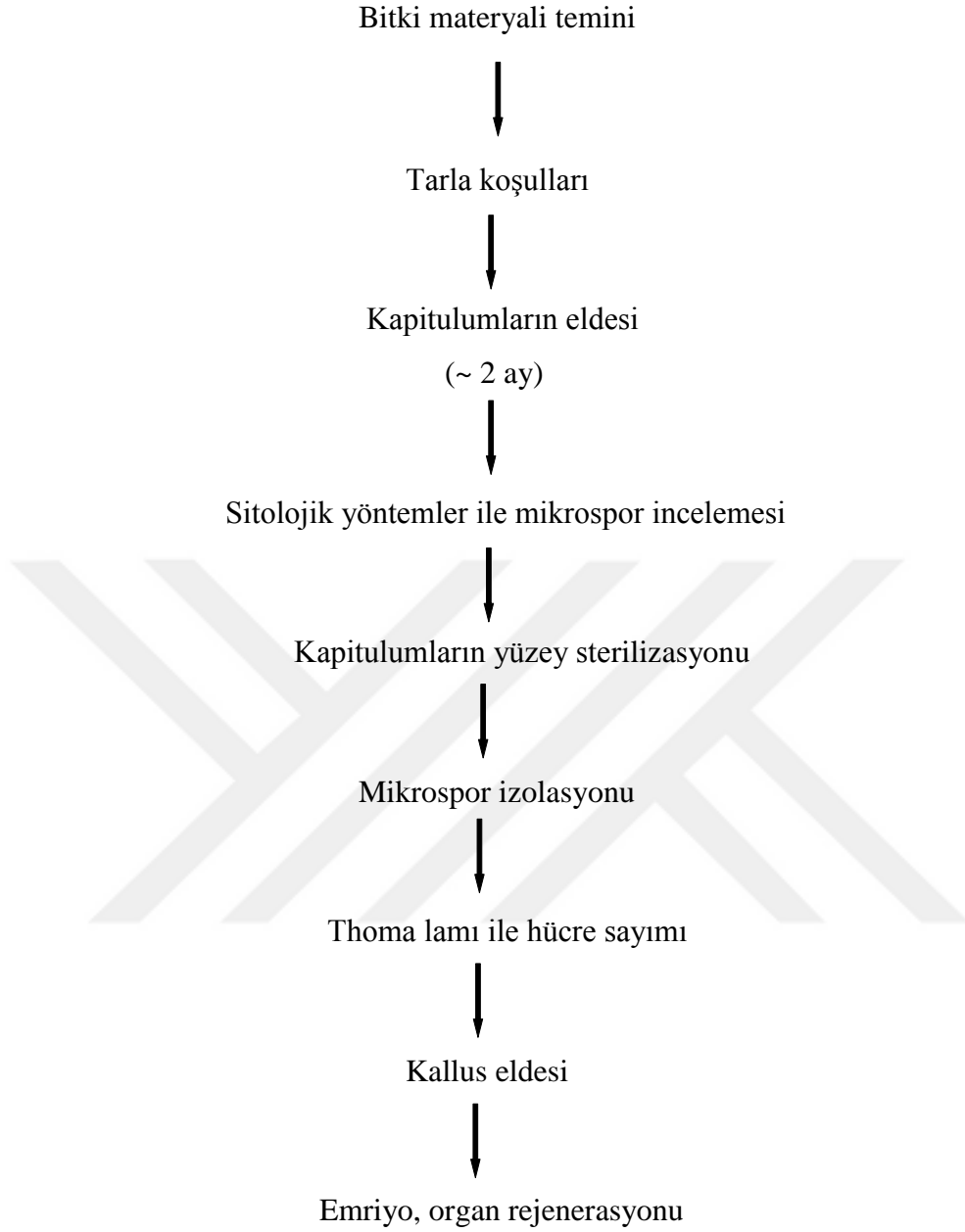
Mikrospor izolasyonunda gerçekleştirilen adımlar **Şekil 2. 16**'da verilmiştir.



Şekil 2. 16 Mikrospor izolasyon aşamaları (Protokol 3). (a) kapitulumların yüzey sterilizasyonu, (b) uygun boyuttaki çiçekçiklerin izole edilmesi, (c) mikrospor izolasyonu ve uygun boyutta olduğu belirlenen çiçekçiklerin ezilmesi, (d) mikrospor kültürünün charcoal içeren besiyerine aktarılması (Todorova ve ark., 2014).

Protokol 4 (Özsan, T., 2014. Farklı Genetik İlerleme Seviyesinde Bitki Kullanımının Biber (*Capsicum annuum* L.) Anter ve Mikrospor Kültüründe Haploid Bitki Eldesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı)

Ayçiçeğinde mikrospor kültürü optimizasyonu amacıyla uygulanan bu protokolde Lantos ve ark. (2012)'nin yaptıkları çalışmada kullandıkları ve 0.1 mg l^{-1} 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) (Duchefa D0911) ve 0.2 mg l^{-1} kinetin (Duchefa K0905) içeren Gamborg ve ark. (1968) tarafından geliştirilen B5 ortamı kullanıldı (**Tablo 2. 7**). 1 litre steril distile saf suya, 3.2 g/l B5 temel besi ortamı ve 30 g/l sükroz tartılarak eklendi ve magnetik karıştırıcıda karışmaları sağlandı. Besi ortamı steril distile saf su ile 1litreye tamamlandı ve 1 N HCl ve 1 N NaOH ile pH 5.7-5.8'e ayarlandıktan sonra otoklavlandı. Daha sonra hazırlanan hormon stoklarından 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l kinetin hormonları mikropipetler yardımıyla eklendi. Diğer protokollerden farklı olarak bu protokolde çiçekçiklerden izole edilen anterlere ilk 7 gün boyunca $+ 32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 0,3 M mannitol (Duchefa M0803) içeren ortamda ön uygulama yapıldı. Tarladan temin edilen kapitulumlarla deney çalışması gerçekleştirildi. Uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu 2 cm olarak belirlendi. Bu protokolde 30 adet çiçekçik kullanıldı. Mikrospor kültüründe izlenen adımlar **Şekil 2. 17**'de verilmiştir.

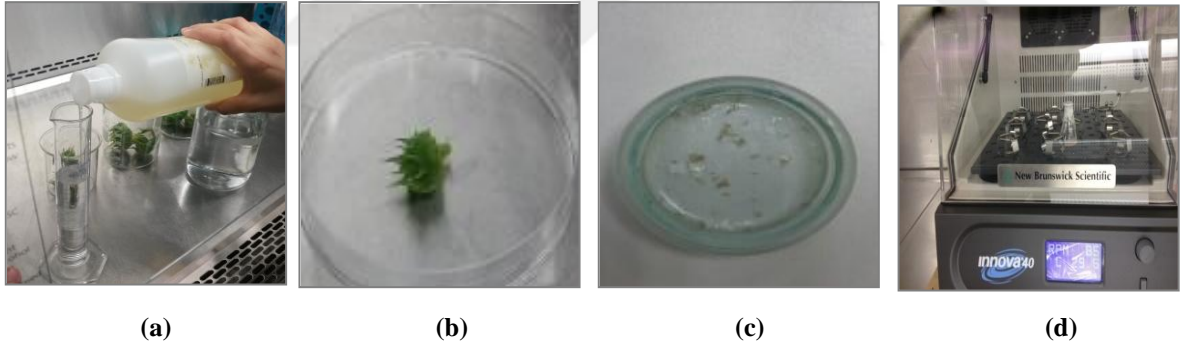


Şekil 2. 17 Mikrospor kültürü adımları (Protokol 4) (Özsan, 2014).

Tablo 2. 7 B5 temel besi ortamının içeriği (Gamborg ve ark., 1968).

| Makro Elementler | Konsantrasyon (mg/l) |
|--|-----------------------------|
| NaH ₂ PO ₄ | 130.44 |
| CaCl ₂ | 113.23 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 134.00 |
| MgSO ₄ | 121.56 |
| KNO ₃ | 2500.00 |
| Mikro Elementler | |
| FeNaEDTA | 36.70 |
| KI | 0.75 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 10.00 |
| H ₃ BO ₃ | 3.00 |
| ZnSO ₄ .7 H ₂ O | 2.00 |
| Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O | 0.25 |
| CuSO ₄ .5 H ₂ O | 0.025 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.025 |
| Vitaminler | |
| Nikotinik asit | 1.00 |
| Tiamin hidroklorid | 10.00 |
| Pridoksal hidroklorid | 1.00 |
| Myo-inositol | 100.00 |

Mikrospor izolasyonunda gerçekleştirilen adımlar **Şekil 2. 18**'de verilmiştir.



Şekil 2. 18 Mikrospor izolasyon aşamaları (Protokol 4). (a) kapitulumların yüzey sterilizasyonu, (b) uygun evrede mikrospor içeren kapitulum (c) ön uygulama yapılmış anterler, (d) ön uygulamadan sonra izolasyonu yapılarak kültüre alınan mikrosporların inkübatöre yerleştirilmesi (Özsan, T., 2014).

Mikrospor izolasyonu için optimizasyonu gerçekleştirilen protokoller ile ana adımları **Tablo 2. 8**'de verilmiştir.

Tablo 2. 8 Bu tez çalışmasında optimizasyonu gerçekleştirilen protokoller ve ana adımları.

| Deneysel Adımlar | İzlenen Protokoller | | | |
|-------------------------------------|---|--|--|--|
| | Protokol 1 (Gürel ve ark., 1991) | Protokol 2 (Mohammadi, 2011) | Protokol 3 (Todorova ve ark., 2014) | Protokol 4 (Özsan, 2014) |
| Bitki materyalinin temini | Tarla + Bitki yetiştirme odası koşulları | Tarla + Bitki yetiştirme odası koşulları | Tarla koşulları | Tarla koşulları |
| Kapitulumların yüzey sterilizasyonu | Uygun evredeki kapitulumlar sırasıyla % 70'lik etanolde ve % 2.5 NaOCI'de 2 dakika bekletildiler. Sonrasında iki kez distile sudan geçirildiler. | Uygun evredeki kapitulumlar %5.25 sodyum hipokloritte 10 dakika bekletildi ve iki defa beşer dakika olmak üzere steril distile suda bekletilerek yıkandılar. | Uygun evredeki kapitulumlar sırasıyla %96'lık etanolde 30 saniye ve %2.5'luk NaOCI (çamaşır suyu)'de 25 dakika tutuldu ve üç defa beşer dakika olmak üzere steril distile su ile yıkandılar. | Uygun evredeki kapitulumlar 100 ml'sine bir iki damla Tween-20 damlatılan % 10 ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 15 dakika bekletildi ve üç kez her seferinde beşer dakika olmak üzere steril distile su ile yıkandı. |
| Ön uygulama | - | - | - | Anterler kültüre alınmadan önce ilk 8 gün boyunca + 35°C sıcaklık ve 0,3 M mannitol içeren ortamda bekletildi. |
| Mikrospor izolasyonu | Çiçekçikler 1 ml NLN ile 10 ml'lik santrifüj tüplerine alındı ve cam bagele ezildiler. Süspansiyon filtreden geçirildi. Tüp ve filtre 7 ml NLN besiyeri ile yıkandı ve yeni santrifüj tüpüne konularak 350 rpm'de santrifüj edildi (Heraeus Medifuge). Bu adım modifiye edilerek 1000 rpm'de 15 dakika ve 3000 rpm'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Santrifüjden sonra 30 çiçekçiğin pelleti 3 ml NLN içinde çözüldü ve cam petriye alındı. Üzerine miktar besiyeri eklendi ve kültür sürekli ışık altında 30°C'de inkübe edildi. Bir günlük kültürden sonra | Çiçekçikler %13 sukroz içeren ve pH'ı 6 olan soğuk izolasyon besiyerinde blenderdan geçirildi ve oluşan süspansiyon filtreden geçirildi. Elde edilen süspansiyon tüplere dağıtılarak 1300 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Bu adım modifiye edilerek bir kere daha tekrarlandı. Oluşan pellete 25 ml mikrospor izolasyon sıvısı eklendi. Bu adım iki kere tekrarlandı. Her bir litreye 40.000 mikrospor olacak şekilde yoğunluk kontrol edildi ve mikrospor süspansiyonu küçük petrilere aktarıldı. Sonrasında kültürler 30 °C'de 14 gün süre ile inkübasyona | Binoküler mikroskopta mikrospor gözlenen boyutta çiçekçikler behere alınıp 5 ml %12'lik sukroz ve 1.9 g/l askorbik asit çözeltisinde cam bagele ile ezildi. Sonrasında 20 mm'lik filtreden geçirilerek örnekler 18 ml'lik tüplere alındı. Tüplere alınan örneklere 3 ml %12'lik sukroz ve 1.9 g/l askorbik asit çözeltisi eklenerek 750 rpm'de 10 dakika, bu adım modifiye edilerek sonrasında 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatant döktüldü ve pellet 6 ml kültür besiyerinde çözülerek 3000 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi. Daha sonra Charcoal içeren katı | Ön uygulama görmüş anterler 10 ml besiyerinde ezilerek filtreden geçirildi. Süspansiyon 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu adım modifiye edilerek 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Oluşan pellet bir miktar besiyerinde çözülüp cam petriye aktarıldı ve üzerine besiyeri eklenerek 5 ml'ye tamamlandı. Petriler 25 °C'de karanlık koşulda çalkalayıcı üzerinde bekletildiler. |

| | | | | |
|----------------------|--|--|--|--|
| | yukarıda tarif edilen ek santrifüjlemeyle besiyeri değiştirildi. | bırakıldı. Bu 14 günden sonra çalkalayıcı açık halde 25°C'ye transfer edildi. | besiyerine ekildi ve petriler alüminyum folyoya sarılıp 30 °C 'deki etüvde 3 gün boyunca bekletildi. Bu 3 günden sonra 2 günde bir besiyerlerine 2 ml kültür besiyeri eklendi. | |
| Kolsişin uygulaması | - | % 0.1 ve kolsişin içeren NLN besiyeri hazırlanır ve kotiledon evresindeki haploid embriyolar dört kolsişin konsantrasyonu (125, 250, 500 ve 1000 mg/l), üç zaman uygulaması (12, 24, 36 saat) ve iki sıcaklık (8 ve 25 °C) uygulamalarından geçirilir. Sonrasında embriyolar kolsişin içermeyen NLN besiyerlerine transfer edildi. | - | - |
| Kallus rejenerasyonu | NLN besiyeri | NLN besiyeri | MS + Gelrite + Charcoal + Sukroz MS + Gelrite + Sukroz MS + Sukroz | B5 + 0.1 mg/l 2,4 D + 0,2 mg/l kinetin |
| Organ rejenerasyonu | MS besiyeri | Sıvı MS (% 2 sukroz, yarı MS ve 0.1 mg/l giberellik asit, % 0.7 agar-agar, pH: 5.8) | MS + Glutamine + Serine | B5 + % 0.8 agar + % 3 sukroz |

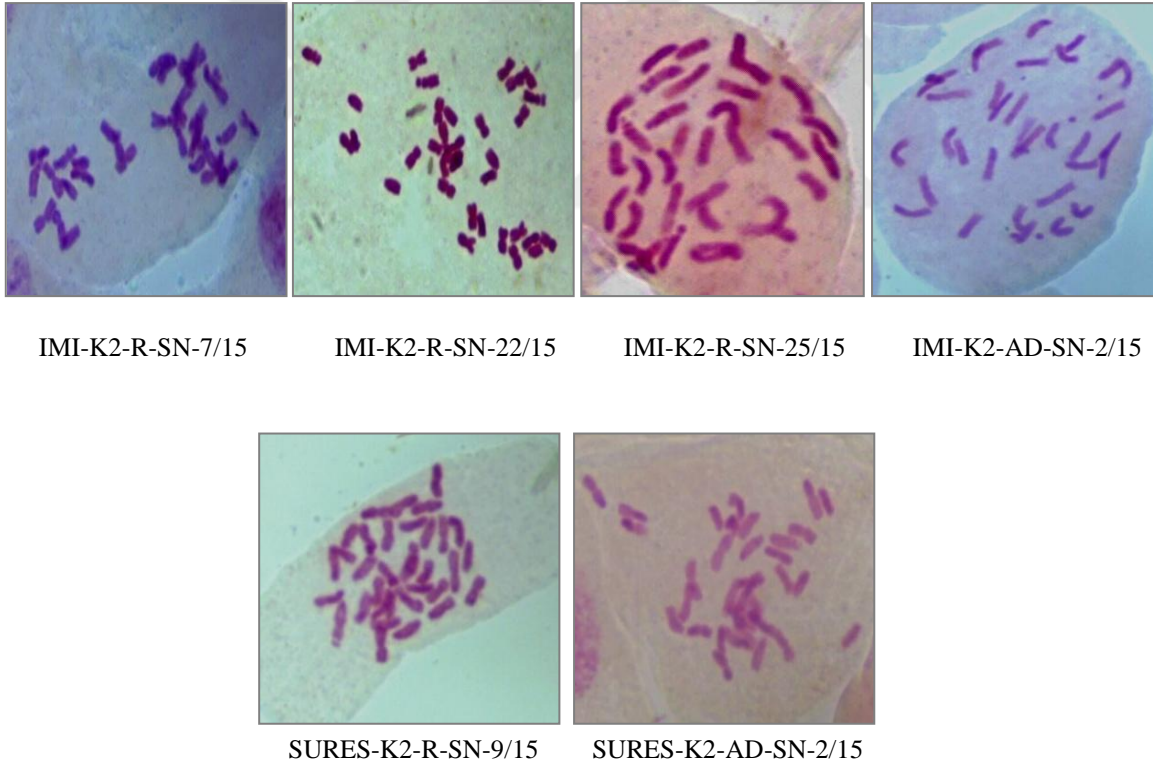
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında kullanılan bitki materyalleri Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde bulunan Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarındaki bitki yetiştirme odasında yetiştirilen tohumlardan ve Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekilen ayçiçeği tohumlarından elde edilmiştir.

3.2 Bitki Materyalinin Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi

Bitki materyali olarak kullanılacak genotiplerin tohumları çimlendirilerek sitolojik olarak incelenmiş ve çalışılacak tüm genotiplerin $2n=34$ kromozomlu yani diploid oldukları belirlenmiştir (Şekil 3. 1).



Şekil 3. 1 Çalışmada kullanılan altı genotipe ait metafaz kromozomları (100X).

3.3 Kapitulum Eldesi

3.3.1 Bitki yetiştirme odasından kapitulum eldesi

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden elde edilen tohumlar saksılara ekilerek bitki yetiştirme odası koşullarında yetiştirilmiştir. Tohumlar ortalama 1 hafta içerisinde çimlenmiş ve yaklaşık 2,5-3 ay içerisinde çiçeklenmeye başlamışlardır (**Şekil 3. 2**). Çiçeklenmeye başladıktan sonra uygun büyüklüğe gelen kapitulumlar belirlenmiş ve bu kapitulumlardan elde edilen çiçekçiklerde uygun boyut saptaması yapılmıştır.



(a)



(b)

Şekil 3. 2 Bitki yetiştirme odası koşullarında bitkilerin çimlenme ve çiçeklenme aşamaları. (a) bir haftalık çimlenmiş bitki, (b) uygun çiçekçik boyutuna sahip bitki.

3.3.2 Tarladan kapitulum eldesi

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekilen ayçiçeği genotipleri yaklaşık 2 ay sonunda uygun boyutta kapitulumlar vermiştir (**Şekil 3. 3**).



(a)



(b)

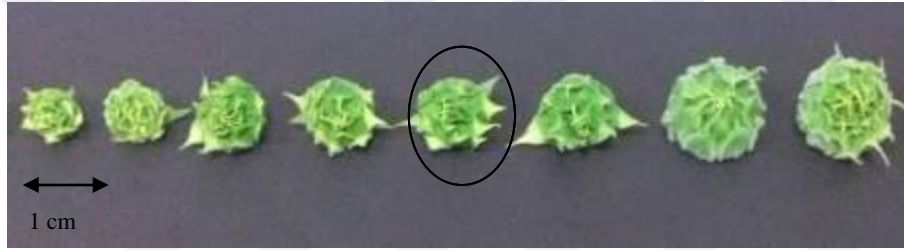
Şekil 3. 3 Tarladan elde edilen kapitulumların görüntüsü. (a) uygun büyüklükte kapitulum içeren yaklaşık 2 aylık bitkilerin tarla görüntüsü, (b) uygun boyutta çiçekçik içeren kapitulum.

3.4 Kapitulumların Boyutlarının Belirlenmesi

Orta-geç tek nukleuslu safhadaki mikrosporları içeren anterlerin hangi çiçekçik boyutunda olduğunun saptanması için ezme preparat yöntemi kullanıldı. Farklı boyutlardaki çiçekçikler alınarak bu yöntemle incelendi ve uygun anter boyu saptandı.

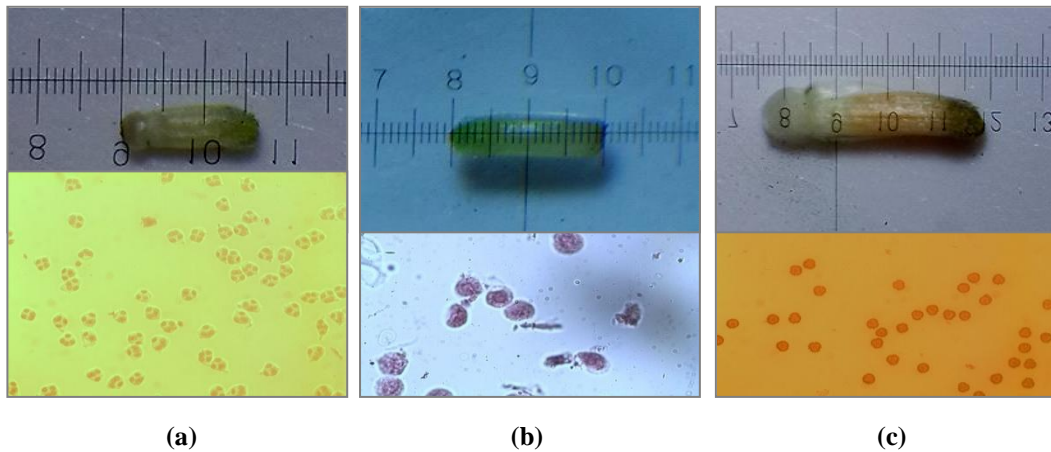
3.4.1 Bitki yetiştirme odasında yetiştirilen kapitulumların boyutlarının belirlenmesi

Bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulumların farklı boyutları incelenerek uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu belirlendi. Bu çiçekçiklerin 1-2 cm aralığındaki kapitumlarda bulunduğu saptandı (Şekil 3. 4).



Şekil 3. 4 Farklı boyut ve safhalardaki ayçiçeği kapitulumları.

Kapitulumlar incelendiğinde 1,8-2 mm boyutundaki çiçekçiklerde uygun safhada mikrospor bulunduğu belirlendi. 1.8 mm'den daha küçük boyuttaki çiçekçiklerde tetrat, 2 mm'den daha büyük çiçekçiklerde ise polen olduğu saptandı (Şekil 3. 5).



Şekil 3. 5 Farklı boyutlardaki çiçekçikler, mikrospor safhaları ve polen. (a) 1.8 mm'den küçük çiçekçik ve tetrat görüntüsü, (b) 2 mm büyüklüğündeki çiçekçik ve mikrospor görüntüsü, (c) 2 mm'den büyük çiçekçik ve polen görüntüsü.

Uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu her genotipte ve her genotipin farklı kapitulumlarda değişkenlik göstermektedir. Bundan dolayı uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu bu çalışma için ortalama değer aralığında verilmiştir. Bitki yetiştirme odasından yetiştirilen kapitulumlarda, tarladan temin edilen kapitulumlara göre daha uzun sürede yetişirler. Bitki yetiştirme odasında yetiştirilerek elde edilen kapitulumlarda çiçekçik sayısı azdır. Bundan dolayı mikrospor izolasyonu istenilen düzeyde yapılamaz ve gerekli mikrospor yoğunluğuna ulaşılamaz. Bu durumlar mikrospor kültürü açısından olumsuzluk oluştururlar. Bundan dolayı mikrospor kültürlerinde başarılı olabilmek için tarladan temin edilen kapitulumlardan kullanılması önerilmektedir.

3.4.2 Tarladan temin edilen kapitulumlardan boyutlarının belirlenmesi

Tarladan temin edilen kapitulumlardan farklı boyutları incelenerek uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu belirlendi. Bu çiçekçiklerin 2-5 cm arasındaki kapitulumlarda olduğu saptandı (Şekil 3. 6).



Şekil 3. 6 Tarladan temin edilen ve uygun boyutta çiçekçik içeren kapitulum.

Kapitulumlardan incelendiğinde 2 mm boyutundaki çiçekçiklerde uygun safhada mikrospor bulunduğu belirlendi. Uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu her genotipte ve her genotipin farklı kapitulumlarda değişkenlik göstermektedir. Bundan dolayı uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik boyutu bu çalışma için ortalama değer aralığında verilmiştir.

3.5 Mikrospor Kùltürü Çalışmaları

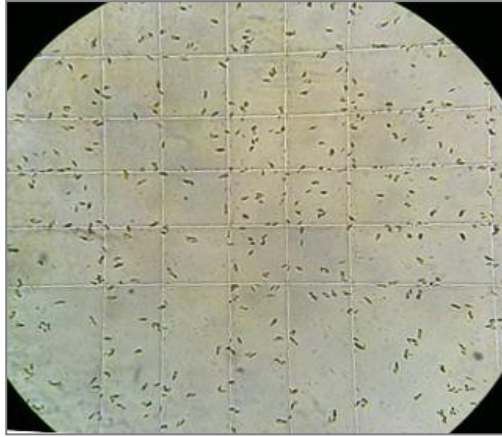
3.5.1 Mikrospor izolasyonu

Bu tez çalışmasında Gürel, A. ve ark. (1991), Mohammadi, P. P. ve ark. (2011), Todorova, M. ve ark. (2014) ve Özsarı, T. (2014)'nin izlediği protokoller uygulandı ve izole edilen mikrosporlar kùltüre alınmadan önce thoma lamında sayımları yapıldı.

Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi

Mikrosporlar kùltüre alınmadan önce yoğunluklarını belirlemek amacıyla thoma lamında sayıldı. Bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulumlarla uygulanan dört protokol sonucunda yeterli sayıda mikrospor yoğunluğuna ulaşılamadığı görüldü.

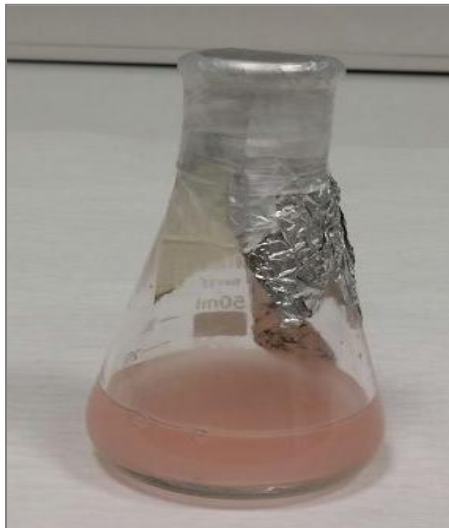
Uygun safhada mikrospor içeren çiçekçik sayısının az olması, mikrosporların yeterli yoğunluğa ulaşamamasının sebebi olarak belirlendi. Tarladan elde edilen kapitulumlarla uygulanan dört protokol sonucunda ise gerekli mikrospor yoğunluğuna yine çiçekçik sayısının az olması sebebiyle ulaşılamadığı sonucuna varıldı. Ancak bazı örneklerde literatürde belirtilen çiçekçik sayısına ulaşılarak gerekli mikrospor yoğunluğu elde edilip izolasyon gerçekteştirildi (Şekil 3. 7).



Şekil 3. 7 SURES-K2-R-SN-9/15 genotipinde protokol 1 uygulaması sonucu izole edilen yeterli yoğunluktaki mikrosporların Thoma lamındaki görüntüsü.

Protokol 1 (Gurel, A., S. Kontowski, K. Nichterlein, W. Friedt, 1991. Embryogenesis In Microspore of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 14 (14): 123-128)

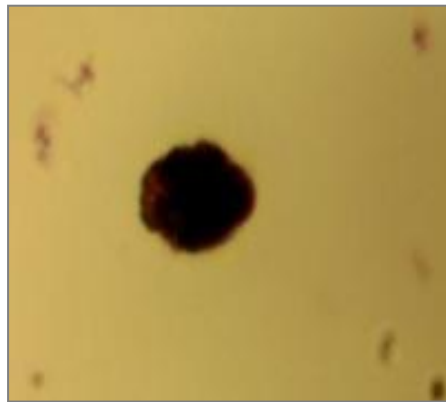
Ayçiçeğinde mikrospor kültürü optimizasyonu için uygulanan ve hem bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulumlara hem de Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekilen tohumlardan elde edilen kapitulumlara bu protokol gerçekleştirilmiştir. Ancak her iki durumda da bazı örnekler ilk birkaç günden sonra kontaminasyondan dolayı kaybedilmiştir. Bitki yetiştirme odasında büyütülen bitkilerde gelişen kapitulumlardan elde edilen uygun evredeki çiçekçiklerin sayısının az olması ve bu çiçekçiklerden izole edilen mikrosporlarda gerekli yoğunluğa ulaşamaması hedeflenen sonuçlara ulaşmada kontaminasyon etkeniyle birlikte olumsuz katkıda bulunmuştur. Yüksek miktarda sukroz içeren NLN besiyerinin sekonder metabolit oluşmasına sebep olabileceği ve bundan dolayı besiyerinde kontaminasyon görüldüğü düşünülmüştür (**Şekil 3. 8**). Tarladan elde edilen kapitulumlara çalışılarak elde edilen kültür örnekleri düzenli aralıklarla kontrol edilmiş ve kontaminasyon görülmeyen kültürlerden örnek alınarak mikroskopta incelenmiştir. Ancak bu örneklerde kallus yapısı gözlenememiş ve deney sonlandırılmıştır. Gürel tarafından 1991 yılında gerçekleştirilen mikrospor kültürü çalışmasında ise, bir hibrit ve bir inbred hattan embriyolar elde edilmiş ancak MS besin ortamına alındıktan sonra ölmüşlerdir.



Şekil 3. 8 Kontaminasyondan dolayı kaybedilen IMI-K2-R-SN-7/15 genotipine ait örnek.

Protokol 2 (Mohammadi, P. P., Moieni, A., Ebrahimi, A., Javidpar, F., 2011. Doubled Haploid Plants Following Colchicine Treatment of Microspore-Derived Embryos of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture)

Ayçiçeğinde mikrospor kültürü optimizasyonu için uygulanan ve hem bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulularla hem de Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekilen tohumlardan elde edilen kapitulularla bu protokol gerçekleştirilmiştir. Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekilen tohumlardan elde edilen kapitulularla yapılan çalışmada yeterli sayıda çiçekçik elde edilmesine rağmen örnekler kontaminasyondan dolayı kaybedilmiştir. Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekilen tohumlardan elde edilen IMI-K2-R-SN-7/15 genotipine ait kapitulularla yapılan mikrospor kültürü düzenli aralıklarla incelenmiş, ilk aylarda hiçbir yapı gözlenmemiştir. Ancak bir süre sonra kültürden örnek alınarak mikroskopta incelenmiş ve kallus yapısına rastlanmıştır. Ancak bu örnek birkaç gün sonra kontaminasyondan dolayı kaybedilmiştir (**Şekil 3. 9**). Mohammadi tarafından 2011 yılında gerçekleştirilen çalışmada, kotiledon evresindeki haploid embriyolar, dört farklı kolsişin uygulamasına (125, 250, 500 ve 1000 mg/l), üç farklı uygulama zamanına (12, 24 ve 36 saat) ve sıcaklığına (8 ve 25 °C) tabi tutularak kontrol grubu (kolsişin uygulanmamış) ile karşılaştırılmışlardır. Kontrol grubundan haploid bitki elde edilmemiş ancak kolsişin uygulaması yapılmış embriyolardan dihaploid bitkiler elde edilmiştir. Bu çalışma, mikrospordan elde edilen embriyolarda kolsişin uygulamasının, dihaploid bitkilerin oluşumu için etkili bir uygulama olduğunu göstermektedir.



Şekil 3. 9 IMI-K2-R-SN-7/15 genotipine ait kallus yapısı.

Protokol 3 (Todorova, M., Dahlhoff, M., Friedt, W. (1993) Microspore culture in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Biotechnol. Biotechnol. Eq. 7: 83–90.)

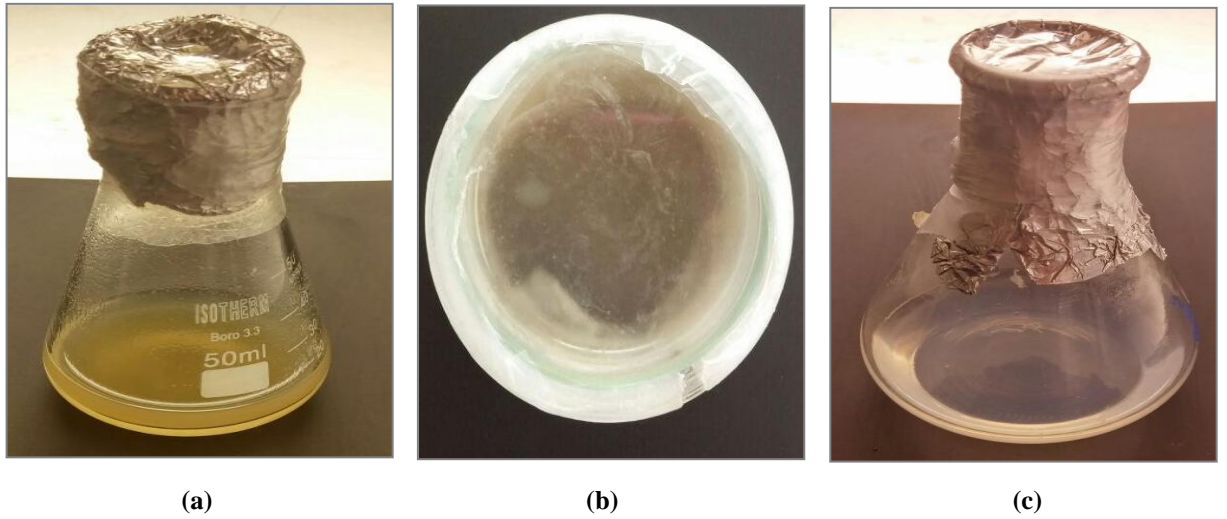
Ayçiçeğinde mikrospor kültürü optimizasyonu için uygulanan bu protokolda Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekilen tohumlardan elde edilen kapitulumlarla çalışılmıştır. MS besin ortamına, sukroz ve gelrite ile birlikte, mikrospor kültüründe pozitif etkisi olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmiş charcoal eklenerek hazırlanan besin ortamları kullanılmıştır. Ancak bu besin ortamları kullanılarak yapılan kültür örnekleri birkaç günden sonra kontaminasyondan dolayı kaybedilmiştir (**Şekil 3. 10**). Todorova'nın 1993 yılında yaptığı çalışmada, saf ve canlı mikrosporlar elde etme amacıyla yeni yöntemler denenmiştir. 8 türler arası hibrit ve 3 ayçiçeği hibriti kullanılmış ve farklı besin ortamlarına alınan mikrosporların gelişimleri takip edilmiştir. pH'ı 6,2, sukroz oranı %12 olan ve 800 mg/l glutamin, 100 mg/l serin eklenen modifiye edilmiş MS besin ortamının, mikrosporların önemli oranda artmasına yol açarak androjenik gelişim gösterdiği sonucu elde edilmiştir.



Şekil 3. 10 Charcoal içeren besiyerinde bulunan farklı genotiplerdeki kültürlerin alüminyum folyoya sarılı halde inkübatördeki görüntüleri.

Protokol 4 (Özsan, T., 2014. Farklı Genetik İlerleme Seviyesinde Bitki Kullanımının Biber (*Capsicum annuum* L.) Anter ve Mikrospor Kültüründe Haploid Bitki Eldesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı)

Ayçiçeğinde mikrospor kültürü optimizasyonu için uygulanan bu protokolda Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekilen tohumlardan elde edilen kapitulumlarla çalışılmıştır. Diğer üç protokolden farklı olarak bu protokolda, uygun büyüklüğe gelen kapitulumlardan elde edilen uygun boyuttaki çiçekçikler belirlenerek bu çiçekçiklerden anterler izole edilmiş ve kültüre alınmadan önce bu anterlere ön uygulama uygulanmıştır. Bu ön uygulamada kültüre alınan mikrosporlar, embriyo oluşumunu arttırmak amacıyla mannitol içeren ortama alınarak sıcaklık uygulanmıştır. Örneklere 7 gün, 8 gün ve 12 gün olmak üzere üç farklı gün süresince ön uygulama gerçekleştirilmiştir. Ön uygulama muamele edilmiş anterlerle yapılan mikrospor kültür ortamında, 12 günlük uygulama haricinde, kahverengi renk değişimi gözlenmiştir. Gün geçtikçe kültür ortamının renginde koyulaşma görülmüştür (Şekil 3. 11).



Şekil 3. 11 IMI-K2-R-SN-22/15 genotipine ait mikrospor kültürü örnekleri (a) 7 günlük + 32 °C sıcaklık ve 0,3 M mannitol ile ön uygulama yapılmış mikrospor kültürü örneği, (b) 8 günlük + 32 °C sıcaklık ve 0,3 M mannitol ön uygulama yapılmış mikrospor kültürü örneği, (c) 12 günlük + 32 °C sıcaklık ve 0,3 M mannitol ön uygulaması ile muamele edilmiş mikrospor kültürü örneği.

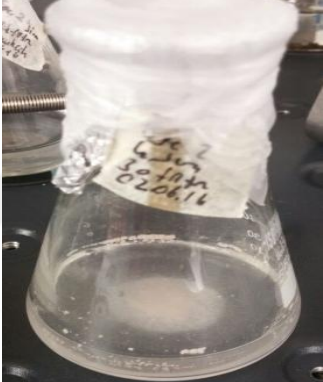



Bu örnekler düzenli aralıklarla incelenmiş fakat kontaminasyondan dolayı kaybedilmişlerdir. Özsan'ın 2014 yılında yaptığı çalışmada, dört farklı biber genotipi kullanılarak, bu genotiplerin genetik ilerleme seviyelerinin birbirlerinden farklı olmasının anter ve mikrospor kültürlerinde haploid embriyo eldesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada sıcaklık ön uygulamalarının ve açlık ön uygulamasının herhangi bir etkisi gözlemlenmemiş olup, elde edilen sonuçlarda kallus, embriyo benzeri yapılar ve embriyoların oluştuğu saptanmıştır. Çalışılan genotipler arasında anter ve mikrospor kültürüne gösterdikleri tepki bakımından farklılıklar gözlenmiş ve çalışmada rapor edilmiştir.

Mikrospor izolasyonu için optimizasyonu gerçekleştirilen protokoller ve ana adımları ile bu protokollere ait sonuçlar **Tablo 2. 9**'da verilmiştir.



Tablo 2. 9 Bu tez çalışmasında optimizasyonu gerçekleştirilen protokollerin ana adımları ile sonuçları.

| DeneySEL Adımlar | İzlenen Protokoller | | | |
|-------------------------------------|---|--|--|--|
| | Protokol 1 (Gürel ve ark., 1991) | Protokol 2 (Mohammadi, 2011) | Protokol 3 (Todorova ve ark., 2014) | Protokol 4 (Özsan, 2014) |
| Bitki materyalinin temini | Tarla + Bitki yetiştirme odası koşulları | Tarla + Bitki yetiştirme odası koşulları | Tarla koşulları | Tarla koşulları |
| Kapitulumların yüzey sterilizasyonu | Uygun evredeki kapitulumların etanol ve NaOCl (çamaşır suyu) ile distile suda sterilizasyon işlemleri gerçekleştirildi. | Uygun evredeki kapitulumların sodyum hipoklorit ve steril distile suda sterilizasyon işlemleri gerçekleştirildi. | Uygun evredeki kapitulumların etanol ve NaOCl ile steril distile suda sterilizasyon işlemleri gerçekleştirildi. | Uygun evredeki kapitulumların Tween-20 içeren sodyum hipoklorit çözeltisi ve steril distile su ile sterilizasyon işlemleri gerçekleştirildi. |
| Ön uygulama | - | - | - | Anterler kültüre alınmadan önce ilk 8 gün boyunca + 35 °C sıcaklık ve 0,3 M mannitol içeren ortamda bekletildi. |
| Mikrospor izolasyonu | Çiçekçikler NLN ile ezilerek filtreden geçirildi. Örnekler santrifüj edildi. Pellet NLN içinde çözüldü ve cam petriye alınarak inkübasyona bırakıldı. | Çiçekçikler izolasyon besiyerinde blenderdan geçirildi ve süspansiyon filtreden geçirildi. Elde edilen süspansiyon santrifüj edildi. Oluşan pellete mikrospor izolasyon sıvısı eklendi. Her bir litreye 40.000 mikrospor olacak şekilde yoğunluk kontrol edildi ve mikrospor süspansiyonu küçük petrilere aktarıldı. Sonrasında kültürler inkübasyona bırakıldı. | Çiçekçikler behere alınıp 5 ml %12'lik sukroz ve 1.9 g/l askorbik asit çözeltisinde cam baget ile ezildi. Örnekler tüplere alındı ve 3 ml %12'lik sukroz ve 1.9 g/l askorbik asit çözeltisi eklenerek santrifüj edildi. Daha sonra Charcoal içeren katı besiyerine ekildi ve inkübasyona bırakıldı. | Ön uygulama görmüş anterler besiyerinde ezilerek filtreden geçirildi. Süspansiyon santrifüj edildi. Oluşan pellet bir miktar besiyerinde çözülüp cam petriye aktarıldı ve inkübasyona bırakıldı. |

| | | | | |
|----------------------|---|--|---|---|
| Sonuçlar |  |  |  |  |
| Kolsişin uygulaması | - | <p>% 0.1 ve kolsişin içeren NLN besiyeri hazırlanır ve kotiledon evresindeki haploid embriyolar dört kolsişin konsantrasyonu (125, 250, 500 ve 1000 mg/l), üç zaman uygulaması (12, 24, 36 saat) ve iki sıcaklık (8 ve 25 °C) uygulamalarından geçirilir. Sonrasında embriyolar kolsişin içermeyen NLN besiyelerine transfer edilir.</p> | - | - |
| Kallus rejenerasyonu | NLN besiyeri | NLN besiyeri | <p>MS + Gelrite + Charcoal + Sukroz MS + Gelrite + Sukroz MS + Sukroz</p> | <p>B5 + 0.1 mg/l 2,4 D + 0,2 mg/l kinetin</p> |
| Organ rejenerasyonu | MS besiyeri | <p>Sıvı MS (% 2 sukroz, yarı MS ve 0.1 mg/l giberellik asit, % 0.7 agar-agar, pH: 5.8)</p> | MS + Glutamine + Serine | B5 + % 0.8 agar + % 3 sukroz |

4. SONUÇLAR

Ayçiçeğinde mikrospor kültürü optimizasyonu için yapılan bu tez çalışmasında; ayçiçeği ve diğer bitkilerde daha önce uygulanmış dört farklı mikrospor kültürü protokolü uygulanarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu dört farklı protokolden yalnızca **Protokol 4 (Özsan, 2014)**'de diğer protokollerden farklı olarak anterlere ön uygulama yapılmıştır. Çalışılan bu protokollerde mikrospor izolasyonu için yeterli sayıda çiçekçiklerin izole edilebilmesi, kapitulum büyüklükleri, besiyeri içerikleri, uygun mikrospor safhası, genotip, embriyo oluşumunu uyarıcı sıcaklık ve mannitol ön uygulamaları gibi farklı parametreler optimize edilmeye çalışılmış ve bunların mikrospor kültürü sonuçlarına etkileri incelenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda sadece **Protokol 2 (Mohammadi, 2011)** ile yapılan çalışmada kallus elde edilmiştir. Ancak bu kallusun bulunduğu kültür ortamı kontaminasyondan dolayı daha sonra kaybedilmiştir. Uygulanan diğer üç protokolda ise kallus yapısı gözlenememiştir. Kallus yapısı gözlenen **Protokol 2 (Mohammadi, P. P., 2011)**'nin uygulandığı kültür örneği dahil olmak üzere tüm örnekler kontaminasyondan dolayı kaybedilmiştir. **Protokol 1 (Gürel ve ark., 1991)** ve **Protokol 2 (Mohammadi, 2011)** uygulanarak yapılan kültürlerde kontaminasyon görülen örneklerde pembe renk değişimi gözlenmiştir. Bu protokollerde kullanılan NLN besiyerinde bulunan yüksek oranda sukrozun sekonder metabolitlerin oluşumuna sebep olarak kültürlerde kontaminasyona sebep olabileceği düşünülmüştür. Diğer protokollerde kullanılan besiyerlerindeki sukroz oranının da yüksek olmasının aynı şekilde kontaminasyona sebep olduğu düşünülmektedir.

Mikrospor kültürü çalışmalarında genotipin kritik bir değişken olduğu yapılan çalışmalar sonucu söylenebilir. Aynı protokollerin uygulandığı ve başka hiçbir değişkenin bulunmadığı çalışmalarda her genotipin farklı sonuç verdiği daha önceki çalışmalarda da belirtilmiştir. Cistue ve arkadaşları (2006), makarnalık buğday genotipleri ile gerçekleştirdikleri mikrospor kültürü çalışmasında, 5 çeşit, 1 seçilmiş hat ve 20 F1 melezinden elde ettikleri embriyo ve yeşil bitki oranları arasında önemli farklılıklar elde ederek, bu farklılıkların genotipe bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında da genotipin kültür çalışmasını etkileyen en önemli faktör olduğu söylenebilir.

Tarladan ve bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulumlarla yapılan kültür çalışmaları da optimizasyon çalışmasında farklılık gösteren önemli faktörlerden biri olmuştur. Hem kapitulumların büyüklüğü hem de bu kapitulumlardan elde edilen çiçekçik sayısının farklı olması ve hem de tarladan elde edilen kapitulumların daha hızlı gelişmesi bu iki kapitulum çeşidi arasında önemli farklılıklar ortaya koymuştur. Tarladan elde edilen kapitulumların boyutları bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulum boyutlarına göre daha büyüktür. Dolayısıyla tarladan elde edilen kapitulumlardan elde edilen çiçekçik sayısı daha fazla olmaktadır. Uygulanan protokollerde mikrospor izolasyonu için istenilen ortalama 30-40 çiçekçik tarladan elde edilen kapitulumlarda sağlanmıştır. Ancak bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulumlarda çiçekçik sayısı, genotipe göre değişkenlik göstermekle birlikte, ortalama 10 çiçekçik kadardır. Bu sonuçlar doğrultusunda daha hızlı gelişen, daha çok çiçekçik elde edilen ve daha büyük boyuta sahip kapitulumlar elde edilen tarlada yetiştirilmiş ayçiçeği bitkilerinden bundan sonraki çalışmalarda yararlanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Uygun mikrospor safhasının belirlenmesi mikrospor kültüründe başarıyı sağlayan önemli faktörlerden biridir. Bir çok araştırmacı, mikrospor kökenli embriyo elde edebilmek için en uygun mikrospor safhasının, geç tek nukleuslu safha ile %10-30 çift çekirdekli polen yani birinci polen mitozunu geçirmiş dönem olarak bildirmişlerdir (Duijs ve ark., 1992; Carlos ve Dias, 1999; Carlos ve Dias 2001; Dias ve Correia, 2002). Bunun yanısıra, Sarıkamış ve arkadaşları (2000) ile Ellialtıoğlu ve arkadaşları (2001) ise birinci polen mitozundan hemen önceki dönemdeki tek çekirdekli mikrosporların kültür koşullarında embriyo oluşturmak üzere sporofitik gelişmeye doğru daha kolay yönlendiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, orta-geç tek nukleuslu safhadaki mikrosporlar kültür çalışmalarında kullanılmıştır. Bu evreden daha erken veya daha geç evredeki mikrosporların kullanılmasının kültür sonucunu olumsuz etkilediği belirlenmiştir.

Sıcaklık ve mannitol uygulanarak gerçekleştirilen ön uygulamalı mikrospor çalışmasında diğer protokollerden farklı bir sonuç elde edilememiştir. Mikrospordan embriyo oluşumunun uyarılmasında kültürlerin 1-3 gün süre ile kültürde tutulmaları gereklidir. Optimum inkübasyon sıcaklığı ve süresi türlere göre değişim göstermekle birlikte 30 - 33°C birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir. (Takahata ve Keller 1991;

Duijs ve ark., 1992; Barro ve Martin 1999; Carlos ve Dias 2001; Sato ve ark., 2005; Wei ve ark., 2008). Bu çalışmada, 7, 8 ve 12 gün olmak üzere + 32 °C sıcaklık ön uygulaması yapılmıştır. Mannitol uygulamasının hücre duvarı oluşumunu durdurarak normal mikrospor gelişimini engellediği görülmüştür (Kasha ve ark, 2001; Shim ve ark., 2006). Kasha ve arkadaşları (2003), petri kaplarına aldığı başaklara 0.4 M mannitol ve 4°C'de buzdolabında muhafaza ederek mikrospor kültüründen iyi sonuçlar almıştır. Mejza ve arkadaşları (1993), 0.3 M mannitol ile soğuk ön işlem uygulamalarını karşılaştırdıklarında mannitolün embriyo oluşumunu daha fazla artırdığını tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasındaki sıcaklık ve mannitol ön uygulamaları değerlendirildiğinde herhangi bir embriyo oluşumuna olumlu etki etmediği belirlenmiştir. İleriki çalışmalarda sıcaklık ve uygulanan mannitol oranı değiştirilerek optimizasyon çalışmalarının yapılabileceği öngörülmektedir.

Sonuç olarak; bitki yetiştirme odasında yetiştirilen ayçiçeği kapitulumları yerine, daha büyük kapitulum boyutlarına sahip, daha çabuk gelişen ve daha fazla çiçekçik sayısına sahip tarladan elde edilen ayçiçeği kapitulumları ile çalışılabilir. Bahsedilen koşul ve ortamlar ise daha sonra yapılacak çalışmalarda kallus oluşumu için optimize edilerek bu yapının devamlılığı sağlanabilir. Böylece bitki ıslahı çalışmalarında kullanımı yaygınlaşabilir.

KAYNAKLAR

2015 Yılı Ayçiçeği Raporu (2015) T.C Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Koperatifçilik Genel Müdürlüğü.

Aalders LE. (1958) Monoploidy in cucumbers. J. Hered., 49: 41-44.

Abak, K. (1986). Biber Islahında Anter Kültüründen Yararlanma. TUBITAK Bitki Islahı Simpozyumu Bildiri Özetleri. 15-17 Ekim, İzmir. Sayfa:64.

Ahmet, H., Adak, M. S. (2007) Irak'ta Yetiştirilen Bazı Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Kallus Oluşumu ve Bitki Rejenerasyonu. Tarım Bilimleri Dergisi 2007, 13 (3), 285-292.

Alvarez, D., P.Luduena., and E.Frutos. (1992). Correlation and causation among sunflower traits. Proceeding of the 13 th. International Sunflower Conference. Pisa, Italy. 7-11 September 1992, Vol., 2: 957-962.

Anonim (2007). FAO Database. <http://www.fastat.fao.org/site/340/>

Arı, E. (2006) Türkiye'de Dogal Olarak Yetisen *Anemone coronaria* var. *coccinea*'da Anter Kültürü Çalışmaları. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Adana.169.

Ashok Kumara, H.G., Murthya, H.N., Paekb, K.Y. (2003). Embryogenesis And Plant Regeneration From Anther Cultures Of Cucumis sativus L. Scientia Horticulturae, 98, 213–222.

Bajaj Y.P.S (1983) *In vitro* production of haploids. In: Evans DA, Sharp VR, Ammirato PV, Yamada Y (eds), Handbook of Plant Cell Culture, Mc Millan Publ. Co. Vol.I Chapter 6, pp. 228-287.

Bajaj, Y.P.S. (1990a) *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Volume 12. Haploids in Crop Improvement I., pp. 3-44.

Bal, U., Ellialtıoğlu, Ş., Abak, K. (2009) Induction of Symmetrical Nucleus Division and Multi-Nucleate Structures in Microspores of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Cultured *In Vitro*. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 66(4): 535-539.

Barro, F. and Martin, A. (1999) Response of different genotype of *Brassica carinata* to microspore culture. *Plant Breeding*, 118, 79-81.

Bidney, D L, Scelonge C J. (1997) Sunflower Biotechnology. In A. A. SCHNEITER (ed.) Sunflower Technology and Production. Agron. Monogr. 35. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI, USA. 559-593. 1997.

<http://www.biyolojiterimleri.com>

Bohorova, N.E., Atanassov, A., Georgieva-Todorova, J. (1985) *In Vitro* Organogenesis, Androgenesis And Embryo-Culture İn The Genus *Helianthus* L.. Z. Pflanzenzchtg, 95, 34-44.

Bonga, J.M., Von Aderkas, P. (1993) Rejuvenation of tissues from mature conifers and its implications for clonal propagation *in vitro* In Clonal Forestry: Genetics, Biotechnology and Application, Eds. M.R. Ahuja and W.J. Libby. Springer Verlag, New York, pp. 182-199.

Bourgin, J.P., Nitsch, J.P. (1967) Obtention de *Nicotiana* haploïdes à partir d'étamines cultivées *in vitro*, *Ann. Physiol, vég.*, 9: 377–382.

Carlos, J. and Dias, S. (1999) Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. *Euphytica*, 108, 65-69.

Carlos, J. and Dias, S. (2001) Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. *Euphytica*, 119, 389–394.

Chaudhary, S.K. (1993) Correlation and path- coefficient analysis in F1 and F2 generations in sunflower (*H.annuus* L.) *International Journal of TropicalAgriculture*, 11 (3):204- 208.

Cistue, L., Soriano, M., Castillo, A.M., Valles, M.P., Sanz, J.M., Echavarri, B. (2006) Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 25, 257-264.

Cuellar, T., Belhassen, E., Fernandez-Calvin, B., Orellana, J., Bella, J. (1996) Chromosomal differentiation in *Helianthus annuus* var. *Macrocarpus*: heterochromatin characterization and rDNA location. *Heredity* 76. 586- 591.

Cuny, F. (1992) Processus d'induction d'embryons haploïdes par du pollen irradié chez le melon (*Cucumis melo* L.). Response du pollen a l'irradiation gamma. These de Docteur, Spécialité: Biologie et Cytologie Végétales, Univ. D'Avignon et des Pays de

Vaucluse, Avignon, 139 p.

Çavuşoğlu, A. (2001) Kavak (*Populus ssp.*) Doku Kültürü Sistemlerinin Kurulması ve Somatik Embriyogenez, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 72 s.

Dagustu, N. (2002) Correlations and path coefficient analysis of seed yield components in sunflower (*Helianthus annuus L.*). Turkish J Field Crop 7(1):5–19.

Dale, P.J. (1975) Pollen dimorphism and anther culture in barley. Planta (Berlin), 127: 213-220.

Demarly Y, Sibi M (1989) Amélioration des Plantes et Biotechnologies. John Libbey and Company Ltd., Paris. 6.

Dias, J.S. and Correia, M.C. (2002) Effect of medium renovation and incubation temperature regimes on tronchuda cabbage microspore culture embryogenesis. Scientia Horticulturae, 93, 205-214.

Dong J & McHughen A (1993) An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science 88: 61-71.

Duijs, J.G., Voorrips, R.E., Visser, D.L. and Custers, J.B.M. 1992. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea L.* Euphytica, 60, 45-55.

Duke, J. (1983) 'Handbook of energy crops *Helianthus annuus L.*', Purdue University, Center for New Crops and Plants Products.

Dunwell J.M., Perry E (1973) The influence of *in vivo* growth conditions of *N. tabacum* plants on the *in vitro* embryogenetic potential of their anthers. John Innes Inst. Rep., 64: 69-70.

Dunwell JM (1981) Influence of genotype and environment on growth of barley embryos *in vitro*. Ann. Bot., 48: 535-542.

Dusanic N., Miklic V., Joksimovic J., Atlagic, J. (2004) Path coefficient analysis of some yield components of sunflower. In: Proceedings of the 16th international sunflower conference, Fargo, vol II, pp 531–537.

Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K. (2001) Haploid Bitki Üretimi (Babaoğlu, M., Gürel, E. Ve Özcan, S. editörler), Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü ve

Uygulamaları. S.Ü.Vakfı Yayınları, Konya, syf:137-189.

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

Er, C. (1992) Bitki Islahında Doku Kültürleri. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayını, Ankara. 83 syf.

<http://Fao.Org>, 27 Mart 2017.

<http://Faostad.Org>, 27 Mart 2017.

Ferrie, A.M.R. and 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.

Ferrie, A. M. R., Caswell, K. L. (2011) Isolated Microspore Culture Techniques And Recent Progress For Haploid And Doubled Haploid Plant Production. Plant Cell Tiss Organ Culture, 104, 301–309.

Fick, G.F. (1978) “Sunflower science and technology” Agron. J. 19(1978) 279-338.

Food And Agriculture Organization Of The United Natius, <http://Fao.Org>, 22.03.2017.

Foroughi-Wehr, B., Wenzel, G. (1993) Andro- and parthenogenesis. In: Hayvard MD, Bosemark NO, Ramagosa I (eds), Plant Breeding: Principles and Prospects. Chapman & Hall, London, pp. 261-277.

Galbraith, D. W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.A., Sharma, D.P., Firoozabady, E. (1983) A rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science, 220 : 1049-1051.

Gallais, A. (1978) Place de l'haploidie dans un schéma de selection. Le Selectionneur Français, 26 : 39-49.

George, E.F., Sherrington, P.D. (1984) Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Eastern Press, Reading, Berks, 314-324.

Goksoy, A.T., Turan, Z.M. (2007) Correlations and path analysis of yield components in synthetic varieties of sunflower (*H. annuus* L.). Acta Agron Hungarica 55:339–345.

- Goodsell, S.R. (1961) Male sterility in corn by androgenesis. *Crop. Sci.*, 1: 227-228.
- Gresshof, P.M., Doy, C.H. (1972) Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 259-264.
- Guha, S., Maheshwari, S.C. (1964) In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*.
- Guha S, Maheshwari, S.C. (1966) Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212: 97.
- Gurel, A., S. Kontowski, K. Nichterlein, W. Friedt (1991) Embryogenesis In Microspore Of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 14 (14): 123-128).
- Gürbüz, B., Kaya, M.D. ve Demirtola, A. (2003) Ayçiçeği Tarımı. Hasad Yayıncılık. 100s.
- Hatipoğlu, R. (1999) Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü.Z.F. Genel Yayın No:190, Ders Kitapları Yayın No: A-58, Adana. 178 Sayfa.
- Heiser, C.B., Smith, D.M., Clevenger, S.B., Martin, W.C. (1969) The North American sunflowers (*Helianthus*). *Mem Torr Bot Club* 22:1–218.
- Heiser, C.B. (1978) Taxonomy of *Helianthus* and Origin of Domesticated Sunflower. *Sunflower Science and Technology* (Ed. J.F. Carter), pp.31-35.ASA Inc. Wisconsin, 505p.
- Hess, D. (1992) *Biotechnologie der Pflanzen*. Verlag Eugen Ulmer , Stuttgart, p.173.
- Hladni, N., Skoric, D., Kraljevic-Balalic, M., Ivanovic, M., Sakac, Z., Jovanovic, D. (2004) Correlation of yield components and seed yield per plant in sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: *Proceedings of the 16th international sunflower conference*, Fargo, vol II, pp 491–496.
- Hu, J., Seilaer, G., Kole, C. (2010) *Genetics, Genomics And Breeding Of Sunflower*. Science Publishers, New Hampshire.
- İlisulu, K. (1973) Yağ Bitkileri ve ıslahı, Çağlayan kitabevi, s. 84-137, İstanbul.
- Irikova, T. and Rodeva, V. (2004) Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): The effect of nutrient media. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 23: 101- 104.

- Irikura, Y. (1975) Induction haploid plants by anther culture in tuber-bearing species and interspecific hybrids of *Solanum*. Potato Res., 18: 133-140.
- Jacobsen, E., Sopory, S.K. (1978) The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspore embryoids in anther cultures of *Solanum tuberosum* and dihaploid hybrids. Theor. Appl. Genet., 52: 119-123.
- Joksimovic, J., Atlagic, J., Jovanovic, D., Marinkovic, R., Dusanic, N., Miklic, V. (2004) Path coefficient analysis of some head and seed components in sunflower. In: Proceedings of the 16th international sunflower conference, Cordoba, pp 525–530.
- Jordan, M.C. & McHughen, A. (1988) Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots. Plant Cell Rep 7: 285-287.
- Kasha, K.J., Kao, K.N. (1970) High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature (Lond), 225: 874-876.
- Kasha, K.J., Simion, E., Oro, R., Yao, Q.A., Hu, T.C., Carlson, A.R. (2001) An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. Euphytica, 120, 379-385.
- Kasha, K.J., Simion, E., Miner, M., Letarte, J., Hu, T.C. (2003) Haploid wheat isolated microspore culture protocol. In: Doubled haploid production in crop plants: A manual. (Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I., -eds.) Kluwer Academic Publishers, pp. 77-82, Dordrecht.
- Kaya, Y., Atakisi, I.K. (2003) Path and correlation analysis in different yield characters in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Anadolu J 13:31–45.
- Kaya, Y., Evcı, G., Pekcan, V., Gücer, T. (2003) The determination of the contribution on important yield components to seed and oil yield in sunflower. In: Proceedings of the 5th Turkish field crop congress, Diyarbakir pp 120–125.
- Kaya, Y., Evcı, G., Pekcan, V. ve Gücer, T. (2003) Ayçiçeğinde tane ve yağ veriminin oluşumunda etkili verim ve öğelerin katkı oranlarının belirlenmesi, Tarla Bitkileri Kongresi, 13-17 Ekim, 2003, Diyarbakır.
- Kaya, Y. (2004) Ayçiçeği Biyoteknolojisinde Son Gelişmeler Ve Islahında Kullanım Olanakları. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. Trakya Univ J Sci,

5(2): 141-147.

Kaya, Y., Evcı, G., Durak, S., Pekcan, V., Gücer, T. (2005) The effect of seed filling period to seed yield and other yield traits in sunflower. The Proceeding of 6th Turkish field crops congress, pp 1–6.

Kaya, Y., Evcı, G., Pekcan, V., Gücer, T., Yılmaz, İ. (2009) Ayçiçeğinde Yağ Verimi Ve Bazı Verim Ögeleri Arasında İlişkilerin Belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 15(4), 310-318.

Kaya, Y. (2014) Ayçiçeği Tarımı <http://arastirma.tarim.gov.tr/ttae/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=54>, 21.08.2016.

Keller, W.A., Armstrong, K.C. (1979) Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. Theor. Appl. Genet., 55: 65-67.

Kim, H., Patel, K.R., Thorpe, T.A. (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture, Bot. Gaz., 146, 335-340.

Knapp, S.J. (1994) Selection Using Molecular Marker Indexes, p.1-11. In: Proceedings of the 2nd Symposium of the American Society for Horticultural Science and Crop Science Society of America: Analysis of Molecular Marker Data (Corvallis, Ore.). Amer. Soc. Hort. Sci. Alexandria, Va.

Koleva Gudeva, L. and Trajkova, F. (2012) Anther Culture of Pepper: Morphological Charactersitics of Fruits of Androgenetic Pepper Lines (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Research in Agriculture*, 1(2): 136-145.

Kumar, A., Shekhawat, N. S. (2009) Plant Tissue Culture and Molecular Markers. Their Role in Improving Crop Productivity, I.K International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India.

Kurtar, E.S. (1999) Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Haploid Embriyo Uyarımı ve Bitki Oluşturma Üzerinde Araştırmalar. Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana, 203 s.

Lichter, R. (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol., 105: 427-434.

- Lu, Y., Dai, S., Gu, A., Liu, M., Wang, Y., Luo, S., Zhao, Y., Wang, S., Xuan, S., Chen, X., Li, X., Bonnema, G., Zhao, J., Shen, S (2016) Microspore Induced Doubled Haploids Production from Ethyl Methanesulfonate (EMS) Soaked Flower Buds Is an Efficient Strategy for Mutagenesis in Chinese Cabbage. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2016.01780.
- Luitel, B.P. and Kang, W.H. (2013) *In Vitro* Androgenic Response of Minipaprika (*Capsicum annuum* L.) Genotypes in Different Culture Media. *Hort. Environ. Biotechnol.*, 54(2): 162-171.
- Maliro, M.F.A., Lameck, G. (2004) Potential of cassava flour as a gelling agent in media for plant tissue cultures, *African J. Biotech.*, 3(4): 244-247.
- Marinkovic, R., (1992) Path-coefficient analysis of some yield components of sunflower (*H. annuus* L.). I. *Euphytica*, 60 (3):201-205.
- Mejza, S.J., Morgant, V., DiBona, D., Wong, J.R. (1993) Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports*, 12, 149-153.
- Melchinger, A.E. (1990) Use of Molecular Markers in Breeding for Oligogenic Disease Resistance. *Plant Breeding* 104:1-19. 2.
- Merkle, S. A., Trigiano, R. N. (1992) *In vitro* propagation of hardwoods Applications of vegetative propagation in forestry, Proceedings of the 1992 SRIEG Biennial Symposium on Forest Genetics, Huntsville, AL. USDA Forest Service Southern Forest Experiment Station General Technical Report SO-108, 1993. 23-37.
- Merkle, S.A., Dean F.D. (2000) Forest tree biotechnology, *Current Opinion in Biotech.*, 11: 298-302.
- Meriç, Ç. (2002) Erkek Fertil Ve Sitoplazmik Erkek Steril *Helianthus Annuus* L. Üzerinde Sitolojik Ve Sitoembriyolojik Araştırmalar. Doktora tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Michalik, B., Adamus, A., ve Novak, E. (2000) Gynogenesis in Polish Onion Cultivars. *Journal of Plant Physiology*. 156 (2), 211-216.
- Miller, J.F., Fick, G.N. (1997) The genetics of sunflower. In: Schneiter AA (ed) *Sunflower production and technology*. Agronomy Monograph 35. ASA-CSSA-SSSA,

Madison, pp 441–495.

Miyoshi, K. (1996) Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Rep.*, 15, 6: 391-395.

Mix, G. (1985) Antheren- Und Ovarienkultur Von Sonnenblumen (*Helianthus Annuus* L.). *Landbauforsch. Volkenrode*, 35(3), 153-156.

Mohammadi, P.P., Moieni, A., Ebrahimi, A., Javidpar, F. (2011) Doubled Haploid Plants Following Colchicine Treatment of Microspore- Derived Embryos of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*.

Munsuz, N., G. Çaycı ve S. Sözüdoğru Ok. (2001) Toprak Islahı ve Düzenleyiciler (Tuzlu ve Alkali Toprakların Islahı) Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:1518, Ankara.

Narayana, E. and Patel, J.C (1998) Correlatiom studies in sunflower. *Guajarat Agricultural University Research Journal*, 23 (2):100-102.

Nitsch, J.P. (1969) Experimental androgenesis in *Nicotiana* . *Phytomorphology*, 19: 389-404.

Nitsch, C. (1974) La culture de pollen isole sur milieu synthetique. *C. R. Acad. Sci.*, 278 D: 1031-1034.

<http://oilworld.biz>, 28 Mart 2017.

Özcan, S. ve Özgen, M. (1996) ‘ ‘ Bitki genetik mühendisliği. *Kükem dergisi*, 1; 69-95.

Özsan, T. (2014) Farklı Genetik İlerleme Seviyesinde Bitki Kullanımının Biber (*Capsicum annuum* L.) Anter ve Mikrospor Kültüründe Haploid Bitki Eldesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı.

<https://pbiosunflowers.wordpress.com/>, 21.03.2017.

Pierik, R.L.M. (1987) *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 344 pages.

Pierik, R.L.M (1989) *In vitro Culture of Higher Plants*. Marthinus Nijhoff Publ. Dordrecht, Boston, Lanchaster, 344pp.

- Pochard E, Dumas de Vault R (1971) La monoploidie chez le piment (*Capsicum annuum*). Z. für Pflanzenzüchtg., 65: 23-46.
- Punia, M.S. and H.S. Gill (1994) Correlations and path coefficient analysis for seed yield traits in sunflower (*H.annuus L.*). Helia, 17 (20):7-11.
- Sakin, M. A. (1994) Tütün (*Nicotiana tabacum L.*) Anter Kültüründe Genotip ve Besi Ortamının Haploid Bitki Olusumuna Etkileri Üzerine Arastirmalar. Yüksek Lisans Tezi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana. 56.
- 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.
- Sarı, N., Abak, K., Pitrat, M., Rode, J.C., Dumas de Vault R (1992b) Karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) ışınlanmış polenle haploid bitki elde edilmesi : Işınlanmış polenlerde çimlenme yeteneğinin değişimi, KÜKEM Dergisi, 15, 2: 15-21.
- Sarı, N., Abak, K. (1995) Farklı ışın dozlarının ve ışınlamaya alternatif uygulamaların karpuzda haploid embriyo uyartımına etkileri. Türkiye II.Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt II, 212-215.
- Sarıkamış, G., Ellialtıoğlu, Ş. ve Yanmaz, R. (2000) Lahanada çiçek tomurcuğu morfolojisi ile mikrospor gelişme dönemi arasındaki ilişkinin belirlenmesi.3. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildirileri, Isparta, 72-76.
- Sato, S., Katoh, N., Iwai, S. and Hagimori, M. (2005) Frequency of spontaneous polyploidization of embryos regenerated from cultured anthers or microspores of *Brassica rapa var.pekinensis L.* And *B.oleracea var.capitata L.* Breeding Science, 55, 99-102.
- Sauton, A. (1987) Recherche d'haploides chez le melon (*C.melo L.*): etude et application a la sélection de la parthénogénese induite par du pollen irradié. These (Docteur nouveau regime), sepécialité.: Biologie et Physiologie Végétales, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 123 p.
- Seiler (1997) 'Anatomy and morphology of sunflower', Sunflower Technology and Production, Agron, 35, 67-111.

Sink, K.C., Padmanabhan, V. (1977) Anther and pollen culture to produce haploids: Progress and application for the plant breeder. HortScience, 12: 143-148.

Shim, Y.S., Kasha, K.J., Simion, E., Letarte, J. (2006) The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. Protoplasma, 228, 79-86.

<https://www.slideshare.net>, 11 Nisan 2017.

Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Pudelska, H., Woźna, J., Pniewski, T. (2017) Improved production of doubled haploids of winter and spring triticale hybrids via combination of colchicine treatments on anthers and regenerated plants. Journal of Applied Genetics. DOI 10.1007/s13353-016-0387-9.

Sridhar, V., Dangi, K.S., Reddy, V.A., Kumar, S.S. (2005) Character association and path analysis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Crop Res 30:63–67.

Sunderland, N. (1971) Anther culture: a progress report. Sci. Prog. Oxf., 59: 527-549.

Sunderland, N., Roberts, M. (1979) Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anther. Ann. Bot., 43: 405-414.

Takahata, Y. and Keller, W.A. (1991) High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. Plant Science, 74, 235-242.

Todorova, M., Dahlhoff, M., Friedt, W. (1993) Microspore culture in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Biotechnol. Biotechnol. Eq. 7: 83–90.

Tuncer, B. (2010) Farklı Uygulamaların Lahanalarda Mikrospor Kültürü Yoluyla Embriyo Uyartımına Etkisi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı.

Tüik, 2015. www.tuik.gov.tr/, 21 Şubat 2017.

Ulrich, I., Ulrich, W. (1986) Flow cytometric DNA-analysis of plant protoplasts stained with DAPI. Naturforschung, 41 C: 1052-1056.

USDA (United States Department of Agriculture), 27 Mart 2017.

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

- Wei, Z., Qiang, F., Xigang, D. and Manzhu, B. (2008) The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. *Scientia Horticulturae*, 117, 69–72.
- Wenzel, G., Thomas, E. (1974) Observations on growth in culture of anthers of *Secale cereale*. *Z. Pflanzenzücht.*, 72: 89-94.
- Wenzel, G., and Foroughi-Wehr, B. (1994) Production and Use of Isogenic Lines (I.K. VASIL ve T.A.THORPE, editör). *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda, P:153-172.
- Wheeler, N. (2004) Executive summary. In: Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification, *Forest Resources Working Papers FGR/59E*, Fores.
- Winter, S., Ravi, K. (2003) Virus and Virus-like Diseases of Major Crops in Developing Countries, Chapter 30, P 755-771 p755
http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-0791-7_30#page-1 14 Ağustos 2016.
- Yin, T., Tian, S., Lu, S., Chen, X., Wang, Y., Shen, S. (2010) Studies on isolated microspore embriyoid induction of *C. annuum* L. *Front. Agric. China*, 4(4): 438-442.

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı** : Ecem Doğan
2. **Doğum Tarihi** : 08.05.1990
3. **İletişim** : 05548183796, eccemdogan@gmail.com
4. **Öğrenim Durumu** :

| Derece | Üniversite | Alanı | Yılı |
|---------------|----------------------|----------------------------------|-----------|
| Lisans | Trakya Üniversitesi | Biyoloji | 2008-2012 |
| Yüksek Lisans | Marmara Üniversitesi | Biyoloji (Bitki Biyoteknolojisi) | 2014-- |

5. Ödüller

2015-2016; Bursiyer, TÜBİTAK Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı Bursu.

6. Görevler

2015; Kısmi Zamanlı Öğrenci Asistanı, MITTO.

7. Yayınlar

Doğan, E., Akgül, N., Aydın, Y., Uncuoğlu, A.A. & Evcı, G. 2016. Microspore Culture Response of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Cultivars, 19th International Sunflower Conference, Edirne, Turkey, 609.

8. Diğer Bilimsel Etkinlikler ve Deneyim

1. İTÜ 5. Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Genetik Kongresi, İstanbul, Ağustos, 2011.
2. İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, İstanbul, Şubat, 2012.
3. Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Hafta Sonu VII, İstanbul, Nisan, 2012.
4. Trakya Üniversitesi DNA ve RNA Tabanlı Moleküler Yöntemler Çalıştayı, Edirne, Nisan, 2012.
5. İstanbul Üniversitesi Multidisipliner AR-GE ve İnovasyon Sempozyumu, İstanbul, Haziran, 2012.
6. Ege Üniversitesi 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, Eylül, 2012.
7. Marmara Üniversitesi 3. Kök Hücre Sempozyumu, İstanbul, Kasım, 2012.
8. Yeditepe Üniversitesi 1. Genetik ve Biyomühendislik Günleri, İstanbul, Mart, 2013.
9. Marmara Üniversitesi 5. Kök Hücre Sempozyumu, İstanbul, Nisan 2016.
10. Marmara Üniversitesi, Marmara Biyom Biyoteknoloji Günleri, İstanbul, Nisan, 2016.
11. Anadolu Eğitim ve Sosyal Yardım Vakfı Sosyal Girişimcilik Eğitim Semineri, İstanbul, Nisan, 2016.
12. 4. Yurtdışı Farkındalık Zirvesi, Taf Network, İstanbul, Mayıs, 2016.