

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Ceren ÖZCAN

**ISPANAKTA (*Spinacia oleracea* L.) ANTER KÜLTÜRÜ VE
IŞINLANMIŞ POLENLE TOZLAMA YÖNTEMİ İLE
HAPLOİDİZASYON**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2017

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İSPANAKTA (*Spinacia oleracea* L.) ANTER KÜLTÜRÜ VE İŞINLANMIŞ
POLENLE TOZLAMA YÖNTEMİ İLE HAPLOİDİZASYON**

Ceren ÖZCAN

DOKTORA TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU Doç. Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Doç. Dr. Mehtap YILDIZ
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Nezihe KÖKSAL
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2016-5784**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

ÖZ

DOKTORA TEZİ

İSPANAKTA (*Spinacia oleracea* L.) ANTER KÜLTÜRÜ VE IŞINLANMIŞ POLENLE TOZLAMA YÖNTEMİ İLE HAPLOİDİZASYON

Ceren ÖZCAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
II. Danışman : Doç Dr. Hatıra TAŞKIN
Yıl: 2017, Sayfa: 119
Jüri : Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
: Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU
: Doç Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU
: Doç. Dr. Mehtap YILDIZ
: Yrd. Doç. Dr. Nezihe KÖKSAL

Ispanakta monoik, dioik ve erselik gibi farklı çiçek yapılarının bulunması ıslah çalışmalarını zorlaştırmakta ve bu durum bu tür çalışmaların yaygınlaşmasına engel olmaktadır. Doku kültürü teknikleri içerisinde yer alan haploid bitki üretimi tekniklerinin ıspanakta kullanılabilir hale getirilmesiyle, bu türde çeşit geliştirme çalışmaları artacaktır. Bu nedenle, sunulan bu çalışmada, erkek gametten haploid uyartımı (androgenesis) yöntemlerinden anter kültürü ve dişi gametten haploid uyartımı yöntemlerinden (ginogenesis) ıslanmış polenle tozlama yöntemlerinin ıspanakta kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bitkisel materyal olarak Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitleri kullanılmıştır. Anter kültürü çalışmalarında, farklı oksin ve sitokinin içeriğine sahip 4 farklı ortam denenmiştir. Işınlanmış polen ile tozlama yönteminde ise yine aynı 3 çeşit ile 100, 150, 200, 300, 400 ve 500 Gray olmak üzere 6 farklı ışın dozu denenmiş ve her üç çeşitte de farklı tohum yapılarına (içi katı, içi hafif katı, içi sıvı, içi boşa yakın ve içi boş) sahip bitkiler meydana gelmiştir. Elde edilen bitkilerde kromozom sayımı için flow sitometri kullanılmış ve ayrıca SSR analizi yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ispanak (*Spinacia oleracea* L.), anter kültürü, ıslanmış polenle tozlama, haploid bitki üretimi

ABSTRACT

PhD THESIS

HAPLOIDIZATION USING ANTHR CULTURE METHOD AND POLLINATION WITH IRRADIATED POLLEN TECHNIQUE IN SPINACH (*Spinacia oleracea* L.)

Ceren ÖZCAN

ÇUKUROVA UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA

II. Supervisor : Assoc. Prof. Hatıra TAŞKIN

Year: 2017, Pages: 119

Jury : Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA

: Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU

: Assoc. Prof. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU

: Assoc. Prof. Mehtap YILDIZ

: Asst. Prof. Dr. Nezihe KÖKSAL

Monoic, dioic and hermaphrodite flower types complicate spinach breeding studies and this situation prevents the spread of such studies. By availability of haploid plant production techniques known as one of the tissue culture in spinach, the studies aimed obtaining new varieties in this species will be increased. Therefore, in this presented study, the availability of anther culture method using male gametes (androgenesis) and pollination with irradiated pollen technique using female gametes (gynogenesis) in spinach was investigated. Koto F₁, Greenstar F₁ and Favorit F₁ varieties were used as plant material. Four different media contained different auxin and cytokinin content were tested in the anther culture experiments. Six different irradiation doses: 100, 150, 200, 300, 400 and 500 Gray were tested in the same three varieties in the studies of pollination with irradiated pollen and the plants regenerated from different seed types such as solid inside, slightly solid inside, liquid inside, almost empty inside and empty inside were obtained. The flow cytometer was used for the ploidy level of plants obtained and also they were tested using SSR markers.

Key Words: Spinach (*Spinacia oleracea* L.), anther culture, pollination with irradiated pollen, haploid plant production

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Ispanak monoik, dioik ve hermafrodit çiçek yapısına sahip olması nedeniyle klasik ıslah yöntemleri ile homozigot saf hatların elde edilmesi zor olmaktadır. Bu yüzden birçok özel tohum firması ıspanak ıslahı alanında çalışma yapmaktan kaçınmaktadır. Bu çalışmada ıspanakta ıslah çalışmalarını yaygınlaştırmak amacıyla, Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerinde erkek gametten haploid uyartımı (androgenesis) yöntemlerinden anter kültürü ve dişi gametten haploid uyartımı yöntemlerinden ısıtılmış polenle tozlama yöntemi ile haploid bitki üretiminde uygun ve etkili yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk yılında, farklı oksin ve sitokinin içeriğine sahip 4 farklı MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında anter kültürü yöntemi uygulanmıştır. Anter kültürüne cevap verme oranının belirlenmesinde kültüre alınan anter sayısı, anter başına embriyo sayısı ve embriyolardan oluşan bitki sayısı dikkate alınmıştır. Koto F₁ çeşidinde 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren ortamda anterlerden kallus elde edilmiş, diğer çeşitlerde kallus ya da embriyo gelişimi gözlemlenmemiştir. Kallusların renginin beyaz, açık sarı ve açık yeşil olduğu görülmüş ve kalluslardan bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir.

Çalışmanın ikinci yılında da anter kültüründe ilk yıldaki ile aynı besin ortamları kullanılmıştır. Kallus gelişimi ve embriyo oluşumu her üç çeşitte de kaydedilmiştir. Koto F₁ çeşidinde, diğer çeşitlere göre daha fazla kallus meydana gelmiş ve sadece Koto F₁ çeşidinde bitkiye dönüşüm gerçekleşmiştir. 2 mg/l NAA ve 0.5 mg/l GA₃ içeren ortamdan 1 anterden 1 adet embriyo, 4 mg/l NAA ve 0.5 mg/l GA₃ içeren ortamdan 1 anterden kallus, 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan 11 anterden kallus oluşumu, 4 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan ise 3 anterden kallus elde edilmiştir. Favorit F₁ çeşidinde 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan 7 anterden kallus, 4 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan 2 anterden kallus oluşumu meydana gelmiştir.

Greenstar F₁ çeşidinde ise 4 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren ortamdan 4 anterden kallusların meydana geldiği tespit edilmiştir.

Çalışmanın ilk yılında, ışınlanmış polen ile tozlama yönteminde salkım şeklindeki erkek bitkiler 100, 150 ve 200 Gray ışın dozları ile ışınlanmıştır. Tozlamadan 20 gün sonra dişi bitkiler hasat edilmiş ve steril kabin içerisinde elde edilen tohumlar cam kavanozlara yerleştirilmiştir. Işın dozlarına ve çeşitlere göre tohum sayıları, embriyo sayıları ve gelişen bitki sayıları dikkate alınmıştır.

Işınlanmış polen ile tozlama yönteminde endospermli tohumlar gözlemlendiği için, çalışmanın ikinci yılında ışın dozları yükseltilerek 200, 300, 400 ve 500 Gray ışın dozları uygulanmıştır.

Denemeler süresince aynı şekilde ışın dozlarına ve çeşitlere göre tohum sayıları, embriyo sayıları ve gelişen bitki sayıları belirlenmiştir. Koto F₁, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde farklı dozlarda farklı tohum yapıları gözlemlenmiştir. Bu yapılar; içi katı, içi hafif katı, içi sıvı, içi boşa yakın ve içi boş olarak tanımlanmıştır. Her üç çeşitte de yüksek dozlarda (300, 400 ve 500 Gray) içi boş ve içi boşa yakın tohum yapılarının daha fazla olduğu saptanmıştır. Özellikle içi boş ve içi boşa yakın tohumların diğer tohum yapılarına göre daha yavaş gelişim gösterdiği belirlenmiştir.

Bitkilerin ploidi seviyelerini belirlemek için Koto F₁, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinin embriyolarından elde edilen bitkilerin yaprak örnekleri alınarak flow sitometride analizine tabi tutulmuş, ancak ploidi seviyeleri diploid olarak belirlenmiştir. Bu nedenle elde edilen bitkiler moleküler analizlerin kullanımı ile incelenerek, spontan kromozom katlanmasının gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu amaçla; SO1, SO3, SO4, SO5, SO6, SO7, SO9, SO10, SO13, SO14, SO15, SO16, SO17, SO19, SO22, SO28 ve SO29, SO32, SO48, SO51 primerleri ile SSR analizi yapılmıştır. SO29 primerinde Koto F₁ çeşidinde donör bitkiler heterozigot bant verirken, diğer örneklerin 23 tanesi tek bant vermiş, yani

homozigot yapı göstermiştir. 23 örneğin tek bant vermesi bu örneklerin kendiliğinden katlanmış olabileceğini göstermiştir.



TEŞEKKÜR

Doktora tezimin planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde, oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel olarak şekillendiren, çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Doktora tezimde büyük özveri ile her zaman yardımda bulunan, çalışkan, neşeli, yardımsever Hocam Sayın Doç. Dr. Hatıra TAŞKIN'a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Doktora Tez İzleme Komitesi üyesi Sayın Hocam Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na ve Sayın Hocam Doç. Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU'na teşekkür ederim.

Sitolojik çalışmalarım esnasında her zaman yardımcı olan Hocam Prof. Dr. Sinan ETİ'ye, tezimin istatistik analiz aşamasında derin tecrübesini ve yardımlarını esirgemeyen Hocam Prof. Dr. Sevgi PAYDAŞ KARGI'ya çok teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürü Dr. Davut KELEŞ'e, tezimin her aşamasında benden desteğini ve yardımını esirgemeyen, her zaman engin fikirleri ve önerileri ile bana yardımcı olan arkadaşım Zir. Yük. Müh. Nihal DENLİ'ye, doku kültürü ve arazi çalışmalarında parlak fikirleri ile bana yardımcı olan, araştırmacı ruhu olan Zir. Yük. Müh. Atilla ATA'ya, tezimin biyoteknoloji aşamasında bana yardımcı olan Yrd. Doç Dr. Hasan PINAR'a, Zir. Yük. Müh. Mustafa ÜNLÜ'ye, Zir. Yük. Müh. Sevinç TEKİN'e, Zir. Yük. Müh. Duygu ALTUNÖZ'e, Zir. Yük. Müh. Mine BULUT'a, Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsündeki tüm personele teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin arazi kısmında bana büyük bir özveri ile yardımcı olan Doç. Dr. Mehtap YILDIZ'a, Dr. Namık Kemal YÜCEL'e, Zir. Yük. Müh. Gökhan

BAKTEMUR'a, bana evinin kapılarını açan, yardımlarını esirgemeyen Dr. Songül ÇÖMLEKÇİOĞLU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Işınlanmış polen ile tozlama yöntemi için serasından faydalanmamı sağlayan ve her konuda yardımcı olan Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürü Dr. Abdullah ÜNLÜ'ye ve Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Sebzeçilik Bölüm Başkanı Dr. Volkan GÖZEN'e, ıslama işlemi için Akdeniz Üniversitesi Nükleer Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezine, Akdeniz Üniversitesi Nükleer Teknoloji ve Radyasyon Güvenliği Ana Bilim Dalı Öğr. Gör. Fatih ÖZMEN'e ve Akdeniz Üniversitesi Nükleer Fizik Bölümü yüksek lisans öğrencisi Fatih DÜLGER'e çok teşekkür ederim.

Serada bitkilerin bakımı ve yetiştirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen Şükrü TÜRKMEN ve Hacı TÜRKMEN'e, Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümündeki personellere teşekkür ederim.

Tezimin istatistik kısmında benden yardımlarını esirgemeyen Zir. Müh. Serdar MEMİŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim ve öğretimim boyunca maddi ve manevi her konuda beni destekleyen ve her zaman yanımda olan eşime ve aileme teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım esnasında, maddi destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje kodu: FDK-2016-5784) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Anter Kültürü ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	7
2.2. Işınlanmış Polenle Tozlama Yöntemi İle İlgili Yapılan Çalışmalar	23
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1. Materyal	33
3.2. Metod	33
3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	33
3.2.2. Uygun Anterlerin Seçimi	37
3.2.3. Anter Kültürü İçin Kullanılan Ortam Bileşenleri.....	38
3.2.4. Anterlerin Çıkarılması ve Besin Ortamlarına Ekilmesi	39
3.2.5. Verilerin Alınması ve Değerlendirilmesi	40
3.3. Işınlanmış Polenle Tozlama Yöntemi	40
3.3.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	40
3.3.2. Çiçeklerin İzolasyonu.....	41
3.3.3. Polenlerin Işınlanması	42
3.3.4. Çiçeklerin Tozlanması.....	43
3.3.5. Embriyoların Çıkartılması ve Kültürü.....	45
3.3.5.1. Dezenfeksiyon.....	45

3.3.5.2. Tohum ve Embriyoların Çıkartılması.....	46
3.4. Ploidi Analizleri	47
3.4.1. Flow Sitometri Analizi.....	47
3.4.2. Moleküler Genetik Analizi.....	48
3.4.2.1. Bitki Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	48
3.4.2.2. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) İşlemi	51
3.4.2.3. Elektroforez İşlemi	53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	55
4.1. Anter Kültürü Yöntemi Çalışması.....	55
4.2. Işınlanmış Polenle Tozlama Yöntemi Çalışması.....	63
4.3. Elde Edilen Bitkilerde Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi	72
4.3.1. Flow Sitometri ile Ploidi Belirlenmesi.....	72
4.3.2. Moleküler Yöntemler ile Ploidi Belirlenmesi	75
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	119

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1.	Çalışma takvimi.....	35
Çizelge 3.2.	4 farklı MS besin ortamının içeriği	38
Çizelge 3.3.	Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin baz dizilimleri.....	52
Çizelge 4.1.	Denemenin ikinci yılında anter kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar.....	56
Çizelge 4.2.	Denemenin ilk yılında Koto F ₁ , Favorit F ₁ ve Greenstar F ₁ çeşitlerinde 150 ve 200 Gy dozlarında 100 tohum başına embriyo sayıları.....	64
Çizelge 4.3.	Denemenin ilk yılında Koto F ₁ , Favorit F ₁ ve Greenstar F ₁ çeşitlerinde 150 ve 200 Gy dozlarında 100 tohum başına bitki sayıları.....	65
Çizelge 4.4.	Denemenin ikinci yılında Koto F ₁ , Favorit F ₁ ve Greenstar F ₁ çeşitlerinde 200, 300 ve 400 Gy dozlarında 100 tohum başına embriyo sayıları.....	66
Çizelge 4.5.	Denemenin ikinci yılında Koto F ₁ , Favorit F ₁ ve Greenstar F ₁ çeşitlerinde 200, 300 ve 400 Gy dozlarında 100 tohum başına bitki sayıları.....	67
Çizelge 4.6.	SO29 primeri kullanılarak SSR ile analizlenen 66 örneğe ait bilgiler	77
Çizelge 4.7.	SO29 primeri kullanılarak SSR ile analizlenen Koto F ₁ , Greenstar F ₁ ve Favorit F ₁ çeşitlerine ait 26 örneğe ait bilgiler	80



Şekil 3.1.	Koto F ₁ (A), Greenstar F ₁ (B) ve Favorit F ₁ (C) çeşitlerine ait ıspanak fidelerinden görüntüler	34
Şekil 3.2.	Koto F ₁ (A), Favorit F ₁ (B) ve Greenstar F ₁ (C) çeşitlerinde ıspanak bitkilerinden görüntüler	35
Şekil 3.3.	A) Erkek bitkiden görüntü B) Dişi bitkiden görüntü	36
Şekil 3.4.	A) Koto F ₁ çeşidinde erkek bitkiden görüntü B) Koto F ₁ çeşidinde dişi bitkiden görüntü	37
Şekil 3.5.	A) Greenstar F ₁ çeşidinde seradaki erkek çiçek görüntüsü B) Favorit F ₁ çeşitlerinde seradaki erkek çiçek görüntüsü.....	38
Şekil 3.6.	Çalışmada kullanılan ıspanak bitkilerinin seradaki görünümü	41
Şekil 3.7.	Dişi bitkilerin kağıt keselerle kapatılması.....	41
Şekil 3.8.	Erkek çiçeklerin ışınlama işlemi için petri kaplarına yerleştirilmesi.....	42
Şekil 3.9.	A) Işınlamaya hazır erkek çiçekler B) Petri kabındaki erkek çiçeklerin ışınlanması.....	42
Şekil 3.10.	Işınlanmış erkek çiçeklere ait çiçek tozları ile dişi bitkilerin tozlanması	43
Şekil 3.11.	Kağıt keselerin salkım şeklindeki dişi bitkilerin üzerine kapatılması	44
Şekil 3.12.	Tozlamadan sonra meydana gelen tohumlardan görüntü.....	45
Şekil 3.13.	Tohumların sterilizasyonundan görüntüler	45
Şekil 3.14.	Koto F ₁ çeşidinde tohumların içerisinden embriyoların çıkartılması ile ilgili görüntüler	46
Şekil 3.15.	ıspanak yaprağının jilet ile petri kabının içerisinde parçalanması	48
Şekil 3.16.	ıspanak örneklerinin flow sitometri cihazında analizinin yapılması	48

Şekil 3.17.	Ispanak yaprak örneklerinin Roller Press'ten geçirilmesi ve yaprak örneklerinin özütü yaklaşık 65°C'de 40 dakika boyunca su banyosunda bekletilmesi	49
Şekil 3.18.	Örneklerin üzerine 200 µl Cloroform-Octanol çözeltisinin eklenmesi ile ilgili görüntü	50
Şekil 4.1.	3 nolu besin ortamında Koto F ₁ çeşidinden elde edilen kallus görünümü	55
Şekil 4.2.	A) Koto F ₁ çeşidinde 1 nolu ortamda oluşmaya başlayan bitkinin görünümü B) Bitkinin besin ortamındaki görünümü.....	57
Şekil 4.3.	A) Koto F ₁ çeşidinde elde edilen bitkilerin tüpteki görünümü B) Gelişen bitkilerin mikroçoğaltım yapılarak cam kavanoza aktarılması.....	58
Şekil 4.4.	A) Koto F ₁ çeşidinde 2 nolu ortamdaki kallusun petrideki görünümü B) Kallustan oluşan bitkinin tüpteki görünümü.....	59
Şekil 4.5.	A-B) Koto F ₁ çeşidinde 3 nolu ortamdaki kallus gelişimi	59
Şekil 4.6.	A) Koto F ₁ çeşidinde 3 nolu ortamda bulunan kallusun petrideki görünümü B-C) Koto F ₁ çeşidinde 4 nolu ortamdaki kallus gelişiminin görünümü	60
Şekil 4.7.	A-B) Favorit F ₁ çeşidinde 3 nolu ortamda bulunan kallusun petrideki görünümü	61
Şekil 4.8.	Koto F ₁ çeşidinde içi sıvı yapıya sahip tohum görünümü.....	68
Şekil 4.9.	A) Koto F ₁ çeşidinde içi katı yapıya sahip tohum görünümü B) Koto F ₁ çeşidinde içi boşa yakın yapıya sahip tohum görünümü	68
Şekil 4.10.	A) Koto F ₁ çeşidinde içi katı tohum görünümü B) Koto F ₁ çeşidinde içi boşa çok yakın tohum görünümü	69
Şekil 4.11.	Koto F ₁ çeşidinde 150 Gy ışın dozunda içi katı tohum yapısından meydana gelen bitkiciklerin görüntüsü.....	69

Şekil 4.12. A) Koto F ₁ çeşidinde donör bitkinin flow sitometri sonuçları B) Koto F ₁ çeşidinde ısıtılmış polenle tozlama yöntemi ile elde edilen bitkinin flow sitometri sonuçları	75
Şekil 4.13. SO29 primeri kullanılarak SSR analizi yapılan 66 adet örneğin elektroforez sonuçları.....	76
Şekil 4.14. SO29 primerinin kullanımı ile elde edilen Koto F ₁ , Greenstar F ₁ ve Favorit F ₁ çeşitlerine ait 26 örneğin elektroforez sonuçları	79





SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
dm	: Desimetre
g	: Gram
pH	: pH metre
NAA	: Naftalin asetik asit
IAA	: Indol asetik asit
2,4-D	: 2,4 dikloro fenoksi asetik asit
BA	: Benzil Amino Pürin
TDZ	: Thidiazuron
mM	: Milimolar
MS	: Murashige ve Skoog
N6	: Chu ve ark. 1975
B5	: Gamborg ve ark.
Sp	: Tür
l	: Litre
mg	: Miligram
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
KN	: Kinetin
M	: Molar
DH	: Double haploid
dm	: Desimetre
Cm	: Sibi ve ark. 1979
C	: Dumas de Vault ve ark. 1981
CP	: Dumax de Vault
M1	: Park ve ark. 2001
M2	: Summers, 1997

ABA	: Absisik asit
SSR	: Simple Sequence Repeats
Gy	: Gray
Co ⁶⁰	: Kobalt 60
kGy	: Kilogray
DNA	: Deoksiribonükleik asit
cm	: Santimetre
HCL	: Hidroklorik Asit
KOH	: Potasyum Hidroksit
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
µl	: Mikrolitre
rpm	: Dakikada devir sayısı
dH ₂ O	: Distile su
C	: Sitozin
T	: Timin
G	: Guanin
A	: Adenin
F	: Forward
R	: Reverse
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
MgCl	: Magnezyum klorür
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
TBE	: Tris Borate buffer
EtBr	: Etidium Bromide

1. GİRİŞ

Latince adı *Spinacia oleracea* L. olan ıspanak, *Chenopodiaceae* familyasında yer almaktadır. Yaprakları tüketilen ve serin iklim sebzelerinden olan ıspanağın anavatanı güney Türkistan, Kafkasya ve Nepal olarak bilinmektedir. Ispanak sıcak bölgelerde yaz sonları ve kış aylarında, soğuk bölgelerde ise ilkbahar döneminde üretilmekte ve kış mevsimi boyunca bütün bölgelerimizde yoğun bir şekilde tüketilmektedir. Taşıma ve ulaşım imkânlarının artması ve iyileştirilmesi sonucu, kış süresince güney ve batı bölgelerimizde üretilen ıspanak, iç ve doğu bölgelerimize pazarlanmaktadır. Ispanağın, doğranmış, taze ve dondurulmuş olarak pazarlanabilmesinin yanı sıra, çorba ve çocuk maması sanayiinde kullanılması da üretimi olumlu yönde etkilemiştir. Ispanak üretiminde Çin, ABD ve Japonya'dan sonra 4. sırada yer alan Türkiye'nin 2014 yılı üretimi 207.676 tondur (FAOSTAT 2014). Bu nedenle ıspanağın Türkiye ekonomisi açısından önemi büyüktür.

Ispanak hem antioksidan içermesi hem de vitamin ve mineraller açısından zengin olması nedeni ile önemli sebze türleri arasında yer almaktadır. Vitaminlerden A, C ve K vitaminlerini içermekte ve sadece 180 g ıspanak alınarak bir günlük gereksinimin üzerinde K vitamini ihtiyacı karşılanabilmektedir. Ayrıca 180 g ıspanak tüketildiğinde, günlük A vitamini ihtiyacının 3 katından fazlası elde edilebilmektedir. Tüm bunlara ek olarak, uluslararası sağlık örgütlerine göre, 180 g ıspanak tüketen bir insan, günlük C vitamini ihtiyacının %29,4'ünü karşılamaktadır. Aynı miktarda tüketimle günlük potasyum ve kalsiyum ihtiyacının yaklaşık dörtte biri karşılanmaktadır. Ispanak B vitamini ve düşük oranda E vitamini de içermekte, 180 g ıspanak tüketildiğinde günlük B₂ vitamininin %24,7'si, B₆'nın %22 si, B₁'in %11,3'i ve aynı zamanda vücudun günlük Omega-3 ihtiyacının %7'si karşılanmaktadır (Demir 2007).

Ispanak uzun gün bitkisi olup (Knott 1934; Wagenaar 1954, Demir 2007), çiçeklenme gün uzunluğu 12 saatin üzerine çıkınca başlamaktadır. Ayrıca kurak ve sıcak havalarda çiçeklenme hızlanmaktadır. Erkek bitkilerin dişi bitkilere göre daha

erken sapa kalktığı saptanmıştır. Sapa kalkma sonucunda gövde üzerinde yaprak ve çiçekler oluşmaktadır. Erkek ve dişi çiçekler aynı zamanda çiçek açmakla beraber, erkek bitkiler dişi bitkilere göre daha erken ölmektedirler. Dişi bitkiler ise erkek bitkilere göre daha uzun ömürlü, daha iri ve kalın yapraklara sahiptirler (Sneep 1958). Ispanak yetiştiriciliğinde en önemli özelliklerinden bir tanesi erkenciliktir. Erkencilikte gün uzunluğu gereksinimi, büyüme oranı, büyüme ve gelişme arasındaki dengenin önemli olduğu anlaşılmıştır. Ispanak çeşitleri arasında erkencilik açısından varyasyonlar görülmekte ve bu varyasyonların farklı büyüme koşullarında ıspanağın başarılı bir şekilde yetiştirilmesi için gerekli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, ıslahçılar için erkenciliğin önemli bir özellik olduğu saptanmıştır (Parlevliet 1967).

Haploid bitkiler en basit haliyle gametik kromozom sayısını taşıyan bitkiler olarak tanımlanabilmekte ve haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanmasıyla dihaploid bitkilerin oluştuğu bilinmektedir. Doku kültürü haploidizasyon teknikleri, günümüzde yaygın olarak ıslah süresinin kısaltılmasında kullanılmaktadır. Islah süresinin kısaltılması için haploid bitkilerin bitki ıslahında kullanılması büyük önem taşımaktadır (Hatipoğlu 2008). Böylece tam bir homozigoti çok kısa sürede elde edilmektedir. Dihaploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmaları kolaylaşmış ve sonuca ulaşma hızlanmıştır. Haploid bitkiler, erkek gametten (androgenesis) ve dişi gametten (ginogenesis) haploid elde edilmesi yöntemlerinden meydana gelmektedir. Androgenesis, anterlerden veya izole edilmiş mikrosporelerden, ginogenesis ise döllenmemiş ovul veya ovaryum kültüründen ve döllenmemiş gametten (dişi) meydana gelmektedir (Reed 2005). Androgenesis ve ginogenesis yöntemleri ile elde edilen haploid bitkiler, tarımsal ürünlerde yeni çeşitlerin oluşturulması sürecinin kısaltılması ve tamamen saf homozigot hatların elde edilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Haploid bitki elde edilmesi ve bunların katlanarak dihaploid hale getirilmesi ile ilgili günümüze kadar birçok bitki türünde birçok çalışma yapılmıştır. Türler arası melezleme yoluyla kendiliğinden haploid bitkiler 1960'lı yıllardan önce elde edilmiş, ancak bu çalışmalar ticari

boyuta ulaşamamıştır. Guha ve Maheshwari (1964) tarafından *Datura innoxia* Mill'de yapılan bir çalışma ile doku kültüründe haploid bitki elde etme yöntemlerinin temeli atılmıştır. Tütünde anter kültürü yönteminin denendiği bir çalışmada çok sayıda haploid bitki elde edilebilmiş ve sonrasında yöntem hızla yayılmıştır (Anagnostakis 1974). Günümüze kadar 170 adet türde anter kültürü yöntemi ile androgenik haploid bitkiler elde edilebilmiştir. Dişi organ kültürleri (ovul ve ovaryum) ile ise 30 türde haploid bitki elde edilmiştir (Keller ve Korzun 1996; Lakshmi Sita 1997). Ginogenesis şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.), soğan (*Allium cepa* L.) ve Gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hook) türlerinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Hadziabdic ve ark. 2016).

Günümüzde haploid bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi anter kültürü yöntemidir. Bu tekniğin diğer *in vitro* haploid bitki elde etme tekniklerine göre avantajı, bir anter içerisinde binlerce mikrosporun bulunması ve uygun bir *in vitro* kültür sistemi ortaya konulduğunda bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir. Anter kültürünün temel prensibi, normal olarak erkek gamet oluşturacak olan polen hücresinin gelişmesini durdurmak ve somatik hücrelerde olduğu gibi polen hücresini direkt olarak bir bitki oluşturmaya zorlamaktır. Anter kültürü yöntemi ile haploid bitkiler, direkt ya da indirekt olarak meydana gelmektedir. Direkt androgenesis zigotik embriyogenesise benzemekte, ancak suspensor veya endosperm mevcut değildir. Embriyolar uygun ortama konulduktan sonra, embriyolar gelişmeye devam etmekte, 4-8 hafta sonra kotiledonlar oluşmakta ve anterlerden bitkiler meydana gelmektedir. Indirek androgenesiste globular safhadan sonra, düzensiz bölünmeler meydana gelmekte ve haploid kallus oluşmaktadır (Reed 2005). Anter kültürü yöntemini donör bitkilerin büyüme, gelişme ve fizyolojik koşulları, polen ya da mikrospor gelişim aşaması, genotip ve ortam bileşimi gibi faktörler etkilemektedir. Kromozom katlanması, anter kültürü esnasında kendiliğinden meydana gelebilmektedir. Genotip, mikrosporların gelişim safhası ve ön uygulamalar katlama başarısını etkilemektedir. Örneğin; arpanın %70-90, beyaz buğdayın %50-60, pirincin %50-

90, çavdarın %50-90 (Maluszynski ve ark. 2003) ve mısırın %20 oranında katlandığı tedit edilmiştir (Martin ve Widholm 1996). Kolhisin katlama amaçlı *in vivo* ve *in vitro*'da en fazla kullanılan kimyasal maddedir (Castillo ve ark. 2009). Ayrıca bu amaçla oryzalin ve trifluralin gibi kimyasal maddeler de kullanılmaktadır.

Ginogenik haploid bitkiler, *in vitro* kültür koşullarında yumurtalık veya ovul gibi döllenmemiş gametten (dişi) direkt veya indirekt kallustan regenerasyon yolu ile meydana gelmektedir. Ginogenesisin ilk hücre bölünmesinin zigotik embriyogenesise benzer olduğu belirlenmiştir. Direkt ginogenesisin, yumurta hücresi, sinerjit ve antipodları içerdiği, proembriyoların oluşumundan sonra farklılaşmış embriyoların meydana geldiği bildirilmiştir. Indirekt ginogenesisde, kallusun yumurta hücresi, sinerjit, polar çekirdek, antipodlardan veya proembriyolardan oluştuğu saptanmıştır. Kallustan meydana gelen bitkilerin türlere göre haploid, diploid veya mixoploid olabileceği belirlenmiştir (Hadziabdic ve ark. 2016).

Kobalt 60 ışın kaynağı kullanılarak ışınlanmış polenle tozlama yöntemi, ginogenesisi teşvik etmek için kullanılmaya başlanmıştır. Polen ışınlanması ve ışınlanmış polenlerle dişi çiçeklerin tozlanması yoluyla haploid embriyoların elde edilmesi tekniği birçok bitki türünde oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Polen ışınlanmasında esas olarak kullanılan ışın türü Co⁶⁰ kaynağından elde edilen gama ışıdır. Işın görmüş polenler ile tozlama yapıldığında, stigma üzerinde çimlenmeye başlayan polenin çekirdekleri (genellikle vegetatif çekirdek) bölünmeye başlamaktadır. Polenin bu aktivitesi, embriyo kesesi içerisinde bir uyartıma neden olmakta, ya yumurta hücresi ya da sinerjit veya antipot hücrelerinden biri bölünmeye başlamaktadır. Bu bölünmelerin sonucu olarak düzensiz hücre yığınları (kallus) veya doğrudan embriyolar oluşmaktadır (Ellialtıoğlu ve ark. 2001).

Tüm dünyada sevilerek tüketilen, sağlık açısından önem arz eden ve sanayide de yoğun kullanım alanı bulan ıspanakta monoik, dioik ve erselik çiçek yapılarıyla karşılaştırılması ıslah çalışmalarını zorlaştırmakta ve bu durum çeşit

ıslahına yönelik çalışmaları sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, ıspanakta uygun *in vitro* haploidizasyon yöntemlerinin ortaya konulması ıslah çalışmalarını yaygınlaştıracak, farklı özellikleriyle ön plana çıkan ıspanak çeşitlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacak ve bu yolla hastalık ve zararlılara dayanıklı, besin içeriği artırılmış, daha kaliteli ve verimi yüksek ıspanak ıslahı çalışmalarının yolunu açacaktır. Tüm bu bilgiler ışığında, sunulan bu çalışmada ıspanakta haploid bitki üretiminde uygun ve etkili doku kültürü yöntemlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için, erkek gametten haploid uyartım (androgenesis) yöntemlerinden anter kültürü ve dişi gametten haploid uyartım yöntemlerinden ışınlanmış polenle tozlama tekniği kullanılmıştır. Yöntemlerin ıspanakta haploid bitki elde etme üzerine etkileri denenirken, aynı zamanda anter kültüründe genotip ve besin ortamı, ışınlanmış polenle tozlama yönteminde ise genotip, ışın dozu ve besin ortamı denemeleri yapılmış, her iki yöntem içinde etkili protokoller geliştirilmesi planlanmıştır. Çalışma ile ıspanakta ıslah alt yapının oluşturulması, modern ıslah yöntemleri ile daha ekonomik ve daha kısa sürede homozigot saf hatların geliştirilmesi, kalite ve kantite yönünden daha etkili çeşitlerin geliştirilmesi için yarı yol materyallerinin oluşturulması hedeflenmiştir. Sunulan tez çalışması sadece ülkemiz için değil, dünya içinde yeni bir çalışma olmuş, değerli bilimsel çıktıların yanı sıra önemli pratiğe aktarılabilir sonuçlarda içermiştir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ispanakta doku kültürü yöntemleri ile haploid bitki elde edilmesi konusunda herhangi bir çalışma yapılmaması nedeni ile bu kısımda diğer sebze türlerinde anter kültürü metodu ve ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile ilgili günümüze kadar yapılmış olan çalışmalar özetlenmiştir.

2.1. Anter Kültürü ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Cucurbitaceae familyasında androgenesis yöntemi ile ilk çalışmalar hıyar, karpuz, kavun ve yaz kabağında sınırlı ölçekte gerçekleştirilmiştir. İlk çalışmaların sonuçlarında, daha çok kallus üretimi ve sınırlı sayıda haploid bitkiler elde edilmiştir (Lazarte ve Sasser 1982; Dryanovski ve Ilieva 1983; Xue ve ark, 1983; Shail ve Robinson, 1987).

Xue ve ark. (1983) karpuzda (*Citrullus lanatus*) haploid bitki elde etmek için anter kültürünü denemişler; ancak olumlu sonuçlar elde edememişlerdir. Nitsch (1969), 12 adet tütün türünden 5 tanesinin polen embriyogenesi oluşturduğunu bildirmiştir.

George ve Narayanaswamy (1973) Hindistan'da *C. frutescens* biber türünde, bir yıl sonra ise Novak (1974) Polonya'da anter kültürü yöntemi konusunda çalışmışlardır. *C. annuum* çeşitlerinde türler arası melezlemeler ile anter kültürüne yanıt için birçok çalışma yapılmıştır (Sibi ve ark. 1979; Morrison ve ark. 1986; Kristiansen ve Andersen 1993; Mityko ve ark. 1995; Nowaczyk ve Kisiala 2006; Gémesné Juhász ve ark. 2000).

Gulshan ve Sharma (1981), domatesde (*Lycopersicon esculentum* Mill) farklı genotipler ve besin ortamlarında anter kültürü yöntemini denemişlerdir. 1: Gresshoff ve Doy's (DGII) (Gresshof ve Doy 1972), 2: Nitsch ve Nitsch (NN) (Nitsch ve Nitsch 1969), 3: 2 mg l⁻¹ NAA, 1 mg l⁻¹ kinetin içeren MS, 4: 2 mg l⁻¹ 2,4-D, 0.1 mg l⁻¹ BAP içeren MS ortamları kullanılmıştır. Anterden meydana gelen

kalluslar A: MS ortamı + 2 mg l⁻¹ BAP + 1.0 mg l⁻¹ 2,4-D, B: MS ortamı + 2 mg l⁻¹ BAP + 0.1 mg l⁻¹ 2,4-D, C: MS ortamı + 5 mg l⁻¹ NAA + 0.1 mg l⁻¹ kinetin D: DGII ortamı + 2 mg l⁻¹ kinetin + 0.1 mg l⁻¹ NAA E: DGII ortamı + 8 mg l⁻¹ NAA + 0.1 mg l⁻¹ kinetin içeren ortama aktarılmışlardır. Kallus oluşumu için 2 mg l⁻¹ NAA ve 1 mg l⁻¹ kinetin ilaveli DGII ortamının en iyi ortam, kallus gelişimi ve çoğalması için ise 2 mg l⁻¹ 2,4-D ve 0.1 mg l⁻¹ BAP ilaveli MS ortamının en iyi ortam olduğu saptanmıştır. Androgenesis oluşumunda B ortamının etkili olduğu görülmüştür. Kalluslarda trakeitlerin oluşumu, NAA ve kinetin veya 2,4-D ve BAP içeren ortamda meydana gelmiştir.

Kumar (1984) tarafından lif kabağı ve su kabağında anter kültürü yöntemi uygulanmış ve haploid embriyolar elde edilmiştir. Metwally ve ark. (1998) *C. pepo*'da erkek çiçek tomurcuklarını 4°C'de dört gün boyunca soğuk uygulamasına tabi tutmuşlar ve uygun anter safhasını belirlemek için orta ya da geç tek çekirdekli aşamadaki mikrosporları kullanmışlardır. Anterler, 5 mg l⁻¹ 2,4-D ve 150 g l⁻¹ sakkaroz içeren MS ortamında kültüre alındıklarında anter başına 1.9 adet bitki elde edilmiştir.

1980 yıllarında *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita pepo*, *Luffa cylindrica* Mill ve *Trichosanthes dioica* Roxb. anterlerinden haploid bitki elde etme girişiminde bulunulmuştur (Kumar 1984; Shail ve Robinson 1987). Hıyarda anter kültürü ile ilgili yapılan çalışmalarda, kallus gelişimi gözlemlenmiş ve daha sonra embriyo gelişimi ve organogenesis meydana gelmiştir. Ancak haploid bitki elde edilememiştir (Lazarte ve Sasser 1982).

Wang ve ark., (1986) Çin'de *Capsicum annuum* biber çeşidinde, anter kültürü yöntemini uygulayarak bitki regenerasyonu gözlemlenmişlerdir.

Tuberosa ve ark. (1987) değişik ülkelerden toplanan sekiz farklı patlıcan çeşidi ve bunların arasında yapılan melezlemelerden elde edilen 16 melez genotipde anter kültürü denemeleri yapmışlar ve ebeveynlerden en yüksek 17.3 embriyo/100 anter, bazı melez genotiplerden ise 42 embriyo/100 anter sayısına ulaşmışlardır.

Farklı bitki türlerinde, anter kültüründe embriyo oluşumunda en uygun safhanın tek çekirdekli safha olduğu saptanmıştır (Heberle-Bors 1989; Vicente ve ark. 1991; Telmer ve ark. 1992; Pretova ve ark. 1993; Mityko ve Fari 1997). Supena ve ark. (2006) anter kültüründe geç tek çekirdekli safhada alınan çiçek tomurcuklarının başarıyı etkilediğini gözlemlemiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise, erken iki çekirdekli safhada alınan mikrosporun androgenesis oluşumuna uygun olduğu görülmüştür (Gonzalez-Melendi ve ark. 1995, 1996; Kao ve Horn 1999).

Uzun kırmızı biberde (*Capsicum annuum* L.) androgenesis etkinliğinin belirlendiği bir çalışmada, anterlerden 40 adet embriyo ve bitki elde edilmiş ve elde edilen bitkiler izoenzim markırları ile analiz edilmiştir. Otuz beş adet bitki mikrospor orijinli olarak tek allel göstermiş, 5 adet bitki ise somatik doku orijinli heterozigot yapı göstermiştir. Ancak 2 adet bitki kromozom sayımına göre diploid oldukları halde tek allel göstermiş ve bu bitkilerin kendiliğinden katlandığı belirlenmiştir. Yirmi bir adet bitkide kromozom sayımı yapılmış ve 16 adet bitkinin haploid, 5 adet bitkinin ise diploid olduğu tespit edilmiştir. (Munyon ve ark. 1989).

Onbir adet F1 hibrit karnabahar (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) çeşidinde androgenesis etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, her bir çeşitten kültüre alınan anterlerde embriyo meydana gelmiş, ortalama embriyo verimi 100 anter için 0.6 embriyo ile 82.2 embriyo arasında değişim göstermiştir. Ayrıca sonbahar ve kış mevsiminde olgunlaşan karnabahar çeşitlerinden alınan anterler, yaz mevsiminde alınan anterlere göre androgenesise daha iyi cevap vermiştir. Katı besin ortamında elde edilen embriyo verimi, sıvı besin ortama göre daha yüksek olmuştur. 2,4-D konsantrasyonunun artmasıyla (0.1 ile 0.3 mg/l) embriyo verimi de artmıştır. 0.3 mg/l 2,4-D içeren katı besin ortamında, 0.1 mg/l 2,4-D içeren sıvı besin ortamına göre embriyo veriminde 2 kat artış olduğu rapor edilmiştir (Phippen ve Ockendon 1989).

Andersen ve ark. (1990) havuçta yaptıkları androgenesis çalışmasında, şemsiyelerin tepesini keserek düşük sıcaklık şoku uygulamışlar ve %2.4'den

%3.7'e kadar değişen oranlarda anter kültürüne cevap verme oranı elde etmişlerdir. Aynı yöntem Hu ve ark. (1993) tarafından da 18 adet havuç genotipinde uygulanmıştır. Havuçta anter ve mikrospor kültürü denemeleri Matsubara ve ark. (1995) tarafından da yapılmış ve embriyo elde edilmiştir.

Baş lahanada (*Brassica oleracea* L. *capitata* (L.) Alef.) anter kültüründe genotip, donör bitkilerin büyüme koşulları, besin ortamındaki karbonhidratın konsantrasyonu ve çeşidinin etkisi araştırılmıştır. Açık alanda yetişen donör bitkilerden kültüre alınan anterlerden, serada yetişen bitkilere göre daha fazla sayıda embriyo elde edilmiştir. Sakkaroz konsantrasyonu arttıkça (%7, %10 ve %13) embriyo veriminin de arttığı gözlemlenmiş, sakkaroz yerine maltoz kullanıldığı zaman embriyonik yanıtın %10'u geçemediği görülmüştür. Sakkaroz ile maltoz karşılaştırıldığında, sakkarozdan 100 anter başına 3.4 adet embriyo elde edilirken, maltoz ilavesinde 100 anter başına 1.6 adet embriyo oluşumu gözlemlenmiştir (Roulund ve ark. 1990).

Domatesde (*Lycopersicon esculentum* Mill.) anter kültüründe 3 farklı çeşitte dokuz farklı karanlık/aydınlık ışık rejimlerinin etkisi araştırılmıştır. Profaz I safhasındaki anterler, 2 mg/l NAA, 5 mg/l kinetin, 6 g/l agar içeren besin ortamına yerleştirilmiş, 2 ile 10 hafta karanlık koşulda bekletilmiş ve sonrasında kültürler 10 hafta uygulama süresince 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot koşuluna transfer edilmişlerdir. Karanlıkta bekletme süresi uzatıldıkça, elde edilen kallus sayısı ve çapının arttığı gözlemlenmiştir. Kallus çapının, Ailsa Craig ve Licato çeşidinde 8 haftada, L-680A çeşidinde ise 10 haftada en yüksek seviyeye ulaştığı saptanmıştır. Kallus sayısı ve uzunluğu karanlık koşulda 8 hafta bekletmede artmasına rağmen, kallus kalitesinin azaldığı gözlemlenmiştir (Jaramillo ve Summers 1991).

Ockendon ve ark. (1991) Brüksel lahanasında altı farklı çeşidin ve 2,4-D ile gümüş nitrat içeren altı farklı besin ortamının anter kültürüne etkisini araştırmışlardır. Gümüş nitrat ilavesinden ve 2,4-D konsantrasyonunun artırılmasından olumlu sonuçlar alınmış, ancak gümüş nitrat konsantrasyonunun

artırılmasından negatif gelişmeler gözlemlenmiştir. Genotip, ortam ve genotip x ortam interaksiyonlarının önemli faktörler olduğu ve genotipin diğerlerine göre daha önemli olduğu saptanmıştır.

Yang ve ark. (1991) karnabaharda anter kültüründe etkili faktörleri araştırmışlar. Donör bitkilerin kültür koşullarının önemli olduğunu tespit etmişler ve donör bitkilerin 10°C ile 20°C arasındaki sıcaklıkta, sera koşullarında bahar döneminde yetiştirildikleri zaman en iyi sonuçların elde edildiğini ve kış ve bahar dönemlerinin, yaz ve erken sonbahara göre daha uygun olduğunu saptamışlardır. Optimum çiçek tomurcuğu gelişim safhasının genotiplere göre değiştiği görülmüş, bazı çeşitlerde tek çekirdekli bazı çeşitlerde ise ilk mitotik bölünme safhasında alınan anterlerden daha fazla embriyo elde edildiği görülmüştür. 140 g l⁻¹ sakkaroz konsantrasyonunun embriyogenesis için en iyi karbon dozu olduğu belirlenmiştir. Ortama sitokin (BAP) eklenmesinin embriyo üretimini azalttığı ve konsantrasyonun artırılmasının bu negatif etkiyi arttırdığı, ayrıca sıvı ortam kullanımının ve karanlıkta inkübasyon süresinin artırılmasının embriyo verimini arttırdığı saptanmıştır.

Kieffer ve ark. (1992) 18 yaprak lahanası (*Brassica oleracea* convar. *acephala*) genotipinde androgenesis etkinliğini araştırmışlardır. Altı genotipin anter kültüründe başarılı sonuçlar elde edilmiş ve 100 anter için 17 adet embriyo ile en yüksek verim alınmıştır. Çalışmada 2 gelişim safhası belirlenmiş, birinci anter safhası anter kültürüne en iyi cevabı veren geç tek çekirdekli safha olurken, ikinci anter safhası geç iki çekirdekli safha olarak tespit edilmiştir. Polen canlılığı incelenmiş ve anter kültüründen 9 gün sonra canlılık sıfıra düşmüştür.

Telmer ve ark. (1992) *Brassica napus* türünde anter kültürü için en iyi aşamanın, geç tek çekirdekli safhadan iki hücreli polen taneciğine doğru ilk polen mitozu etrafında olduğunu gözlemlemişlerdir.

Biberde 3 farklı çeşitte anter kültürü için donör bitkilerin yetiştirilmesinde sıcaklığın ve fotoperiyodun etkisi araştırılmıştır. Donör bitkiler sera koşullarında, 16 ve 30°C arasındaki sıcaklıklarda ve 11 ve 19 saat arasındaki fotoperiyot

koşullarında yetiştirilmişlerdir. Üç farklı deneme kurulmuştur; 1. denemede her 3 hibrit çeşitden 6 bitki; 16, 20 veya 24°C sıcaklıkta, 11, 15 veya 19 saat fotoperiyot koşullarında yetiştirilmiş ve anterler 20 ve 24°C sıcaklıkta, 7-12, 16-21 ve 25-29 hafta boyunca kültüre alınmışlardır. 2. denemede, iki çeşidin donör bitkileri serada 24°C sıcaklıkta yetiştirilmiş ve anterler 37-41 hafta kültüre alınmıştır. 3. denemede ise, 2 çeşide ait bitkiler 22, 26 veya 30°C sıcaklıkta yetiştirilmiş ve anterler 12-23 hafta boyunca bekletilmiştir. Optimum gelişme sıcaklığının (26°C) embriyo oluşum oranını arttırdığı saptanmıştır. Düşük sıcaklıklarda (16°C) 100 anter için 0.2 adet embriyo elde edildiği tespit edilmiştir (Kristiansen ve Andersen 1993).

Biberde 6 farklı çeşitte anter kültüründe sezon etkisi araştırılmış ve Temmuz-Kasım ayları arasında anterler kültüre alınmıştır. Anterler 0.004 mg l⁻¹ 2,4-D, 0.1 mg l⁻¹ kinetin, 30 g l⁻¹ sakkaroz, 2 g l⁻¹ agar içeren MS ortamına yerleştirilmiş, 35°C'de 24 saat bekletilmiş ve sonrasında 25°C'de 16 saat gün uzunluğunda 40 gün süresince inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda anterden embriyo ve kallus oluşum oranlarının çeşitlere göre değiştiği gözlemlenmiş, embriyo oluşumunun Eylül ve Ekim aylarında diğer aylara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Eylül ve Ekim aylarında 15°C ve 25°C arası sıcaklıklarda daha yüksek oranda embriyo elde edilmiştir. Tüm çeşitlerde embriyo ve kallus oluşumu gözlemlenmesine rağmen, bazı çeşitlerde daha yüksek embriyo oluşumu bazı çeşitlerde ise daha yüksek kallus oluşumu meydana gelmiştir. (Matsubara ve ark. 1998).

Brassica oleracea'nın 27 çeşidinin anter kültüründe gümüş nitratın 3 farklı konsantrasyonu (0, 5 ve 10 mg l⁻¹ AgNO₃) denenmiştir. Embriyo verimlerinin ortama AgNO₃ eklenmesi ile önemli ölçüde arttığı saptanmıştır (Dias ve Martins 1999).

Kahramanmaraş biber popülasyonunda, bitki büyüme düzenleyicilerin ve aktif kömür gibi bazı maddeler ile iki farklı inkübasyon rejiminin androgenetik potansiyel üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Her bir uygulama grubundan elde edilen anterlerin yarısı, kültürün ilk sekiz günü karanlıkta ve +35°C'ye ayarlanmış

inkübatörün içerisinde bekletilmiş, daha sonra 16/8 saat aydınlık/karanlık periyoduna ve 25°C sıcaklığa ayarlanmış iklim odasına aktarılmıştır. Diğer bir grup anter ise, sürekli olarak 2000 lux ışıık şiddetinde aydınlatılan ve 29°C sıcaklığa sahip olan büyütme dolabında inkübe edilmiştir. Ortamlara 4 mg/l NAA + 1 mg/l BA ve 1 mg/l NAA + 4 mg/l BA kombinasyonları ilave edilmiş; bu ortamlardan bir kısmına ayrıca %0.25 oranında aktif kömür eklenmiştir. Denemeler sonucunda en yüksek embriyo oluşumu, 4 mg/l NAA ve 1 mg/l BA ilave edilen ve %0.25 oranında aktif kömür içeren besin ortamında kültüre alınan ve +29°C’de sürekli aydınlık koşullarında inkübe edilen anterlerden elde edilmiştir (Terzioğlu ve ark. 2000).

Lahanada (*Brassica oleracea* var. *capitata*) anter kültüründe genotip, donör bitki kültür koşulları, ortam bileşeni, anterlerin inkübasyon koşulları, ortama AgNO₃’ın farklı konsantrasyonlarının eklenmesi gibi bazı parametrelerin etkisi araştırılmıştır. Anterler sıcaklık (35°C’de 24, 48 saat ve 6 gün) ve soğuk uygulamasına (4°C’de 24, 48 saat ve 6 gün) maruz bırakılmıştır. 35°C’de 24 saat süresince gerçekleşen sıcaklık uygulamasından, 48 saate göre 100 anter başına daha fazla embriyo elde edildiği görülmüştür. Benzer şekilde, 4°C’de 24 saat sıcaklık uygulamasından 48 saate göre daha fazla embriyo verimi elde edilmiştir. Tüm denemelerde sıcaklık uygulamasında, soğuk uygulamasına göre embriyo veriminin daha yüksek olduğu saptanmıştır. 35°C veya 4°C’de 6 gün uygulamalarından embriyo meydana gelmediği gözlemlenmiştir. Anter kültüründen önce, yüksek sıcaklık ön uygulamasının embriyo verimi üzerine olumlu etkide bulunduğu görülmüştür. Ortama gümüş nitratın (AgNO₃) artan konsantrasyonlarının eklenmesiyle tüm genotiplerde embriyo veriminde artış gözlemlenmiştir (Achar 2002).

Çiner ve Tıprıdamaz (2002) biberde anter kültüründe çiçek tomurcuklarına uygulanan soğuk uygulamasının, NAA ve BA bileşiminin ve aktif kömürün etkisinin haploid embriyo oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. MS besin ortamına 4 mg l⁻¹ NAA, 1 mg l⁻¹ BA, %0.8 agar ve %0.3 sakkaroz ilave edilmiştir.

Deneme sonucunda androjenetik embriyo üretimi %12.5 olarak belirlenmiş ve 4°C’de 48 ve 96 saat süresince uygulanan soğuk uygulamaları sonucu anter kültürüne cevap verme oranının düştüğü, embriyo üretiminin azaldığı ve anterlerden kallus oluşumunun arttığı belirlenmiştir. En yüksek embriyo sayısının 4 mg l⁻¹ NAA, 1 mg l⁻¹ BA ve aktif kömür içeren MS besin ortamından elde edildiği görülmüştür. MS ortamına ilave edilen NAA/BA hormon kombinasyonlarının androjenetik embriyo üretimini arttırdığı tespit edilmiştir.

Calypso ve Green Long hıyar çeşitlerinde anter kültüründe bitki büyüme düzenleyicilerin ve sıcaklık uygulamalarının etkisi araştırılmıştır. Anterler 2,4-D ve NAA içeren B5 ortamına alındıklarında, Calypso ve Green Long çeşitlerinde direkt ve indirekt embriyogenesis meydana geldiği görülmüştür. Anterler IAA, IBA, BAP, KN ve TDZ (0.5–20.0 mM) içeren B5 ortamına yerleştirildiklerinde, anterlerde gelişme görülmemiş, nekrotik yapılar oluşmuştur. Optimum embriyogenik kalluslar/embriyolar 2.0 mM 2,4-D ve 1.0 mM BAP ilaveli B5 ortamında oluşmuştur. Çiçek tomurcuklarına 4°C’de 0-10 gün soğuk uygulaması ve 35°C’de 1 gün sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Anter kültürüne en iyi cevabın 4°C’de 2 gün soğuk uygulaması ile sağlandığı görülmüştür. Embriyolarda farklılaşma 0.09 M sakkaroz, 0.25 mM NAA ve 0.25 mM KN içeren B5 ortamından elde edilmiştir. (Kumar ve ark. 2003).

Buyukalaca ve ark. (2004) serada yetiştirilen donör bitkilerden alınan anterlerin, tarla koşullarında yetiştirilenlere göre daha fazla embriyo oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Kahramanmaraş kırmızı biberlerinde (*Capsicum annuum* L.) anter kültüründe oksin ve sitokinin kombinasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Oksinlerden NAA (2.0, 4.0, 6.0 mg/l) ve 2,4-D (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) ile sitokininlerden BAP (0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mg/l) ve kinetin (0.1, 1.0, 5.0 mg/l) denenmiştir. Ayrıca besin ortamlarına aktif kömür (% 0.25) ve AgNO₃ (10 mg/l) ilave edilmiş ve yedi gün süre ile 4°C (karanlıkta), 29°C (karanlıkta) ve 35°C (karanlıkta) olmak üzere 3

farklı ön sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Araştırma süresince toplam 9750 adet anter konulmuş ve bazı ortamlarda anterlerde yalnızca kallus gelişimi gözlemlenirken, doğrudan embriyogenesis sadece 0.1 mg/l BAP, 4 mg/l NAA, % 0.2 aktif karbon ve 10 mg AgNO₃ bulunduran MS ortamına konulan anterlerde meydana gelmiş ve embriyo oluşturma oranı % 2.8 olarak hesaplanmıştır (Çağlar ve ark. 2004).

Irikova ve Rodeva (2004) 11 adet Bulgar biber genotiplerinde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürüne cevap verme oranını belirlemeyi amaçlamışlardır. Anterler farklı dozlarda kinetin, 2,4-D, IAA ve NAA içeren MS, Cm ve C ortamlarına yerleştirilmiştir. 1 nolu ortam: C ortamı, 2 mg/l kinetin, 0,1 mg/l 2,4-D (Dumas de Vaulx ve ark. 1981), 2 nolu ortam: C ortamı, 3 nolu ortam: C ortamı, 0,01 mg/l kinetin ve 2,4-D (Gyulai ve ark. 2000), 4 nolu ortam: Cm ortamı, 2 mg/l kinetin ve 2,4-D (Sibi ve ark. 1979), 5 nolu ortam: Cm ortamı, 6 nolu ortam: Cm ortamı, 0,01 mg/l kinetin ve 2,4-D, 7 nolu ortam: MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962), 8 nolu ortam: MS ortamı, 0,2 mg/l kinetin, 2 mg/l IAA, 9 nolu ortam: MS ortamı, 2 mg/l NAA ve BA (Park ve ark. 1992), 10 nolu ortam: MS ortamı, 0,1 mg/l kinetin, 0,004 mg/l 2,4-D (Matsubara ve ark. 1998). Deneme sonucunda, 1 nolu ortamın 2 ve 3 nolu ortamlara göre daha yüksek embriyogenik cevap verdiği gözlemlenmiştir. 3 nolu ortamda tüm genotiplerde embriyo görülmemiş, sadece kallus oluşumu belirlenmiştir. 4 nolu ortamdaki, 5 ve 6 nolu ortamlara göre daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. 10 nolu ortam 7, 8 ve 9 nolu ortamlara göre daha yüksek embriyogenik cevap vermiştir.

Kim ve ark. (2004) erken iki çekirdekli aşamada, %75'in üzerinde mikrospor içeren anterlerden izole edilmiş mikrospor kültürünün embriyo üretimi için optimal olduğunu bildirmişlerdir.

Yazlık kabakta anter kültüründe sezon etkisi denenmiş ve 1 Mart ve 1 Kasım tarihinde dikilen bitkilerden elde edilen anterlerden en iyi kallus ve bitki oluşumu elde edilmiştir. Ancak kış sezonunda dikilen bitkilerden elde edilen

anterlerden, yaz sezonuna göre daha fazla kallusun meydana geldiği tespit edilmiştir. (Mohamed ve Refaei 2004).

Rodeva ve ark. (2004) 16 Bulgar biber (*Capsicum annuum* L.) genotipinde anter kültürüne cevap verme oranını araştırmışlar ve N145 hattı ile Zlaten medal çeşidinden indirekt organogenesis oluşumunu gözlemlerlerken; Zlaten medal, Albena, Stryama, Hebur, Kourtovska kapiya çeşitleri, N1647 x N668, N1647 x N1962 hibritleri ve N1312, N145 ve N668 hatlarından embriyogenesis elde etmişlerdir. N145 hattı ile Stryama ve Kourtovska kapiya çeşitlerinden anter kültürü yöntemi ile embriyoların oluştuğu gözlemlenmiş ve embriyolar çimlendikten sonra kotiledon ve kök oluşturan bitkilerin meydana geldiği görülmüştür.

Nowaczyk ve ark. (2006) biberde *Capsicum frutescens* L. türünde anter kültürü yöntemi ile haploid bitki elde etmeyi amaçlamışlardır. Çalışma Ekim ayı içerisinde yapılmış, anter kültürü yöntemi *C. annuum* L. çeşidinde Dumas ve ark., (1981) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak yürütülmüştür. Elde edilen bitkilerin ploidi seviyesi flow sitometri analizi ile belirlenmiştir. Flow sitometri sonucuna göre eşit sayıda haploid ve diploid bitki elde edilmiştir.

Nowaczyk ve Kisiala (2006) iki biber (*Capsicum annuum* L.) hattında (ATZ1 ve PO) ve bu hatların hibritlerinde (ATZ1 × PO) androgenesis etkinliğini araştırmışlardır. Anter kültürü Dumas de Vaulx ve ark. (1981) tarafından geliştirilen yöntem bazı modifikasyonların eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Androgenesis etkinliğinin %1.5 (ATZ1 × PO) F1 ile %4 (ATZ1 hattı) arasında değiştiği tespit edilmiştir. Çiçek tomurcuğu gelişim safhasının ve anter kültürü koşullarının androgenesis etkilediği görülmüştür.

Liljana ve ark. (2007) anter kültürü yöntemi ile 19 biber genotipinde androgenesis etkinliğini araştırmışlardır. Anterler Dumas de Valux ve ark. (1981) tarafından geliştirilen metoda göre; 0,01 mg/l kinetin ve 0,01 mg/l 2,4-D içeren CP ortamına yerleştirilmiştir. Embriyo oluşumu ile sonuçlanan direkt embriyogenesis sunucunda bitkiler meydana gelmiştir.

Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) ön uygulamaların, ön uygulama koşullarının, embriyonik kallus ortamının, embriyo oluşum ortamının, embriyo çimlenme ortamının ve genotipin anter kültürü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Embriyonik kallus oluşumu için en iyi ortamın 4.44 mM BA, 2.26 mM 2,4-D, 4.64 mM KIN, % 3 sakkaroz ve % 0.8 agar içeren MS ortamı olduğu saptanmıştır. Embriyo oluşumu için 0.54 mM NAA, 13.32 mM BA, % 3 sakkaroz ve % 0.8 agar içeren MS ortamının, embriyo çimlenmesi için ise 2.22 mM BA, % 6 sakkaroz ve % 1.2 agar ilaveli MS ortamının en iyi ortamlar olduğu tespit edilmiştir. Otuzbir adet genotip değerlendirildiğinde, bazı genotipler kontaminasyon nedeniyle denemeden çıkarılmış, kalan genotipler ise embriyonik kallus üretmiş ve embriyonik kallus oluşum frekansı 97 ± 4 0 arasında değişmiştir. Genotipler arasında en iyi sonucu Ningjia No. 1 çeşidi vermiştir (Song ve ark. 2007).

Krzyzanowska ve Gorecka (2008) 6 adet brüksel lahanası çeşidinde (*Brassica oleracea* L. var. *gemnifera*) anter kültürü yöntemi ile embriyo oluşumunu araştırmışlardır. Androgenesis oluşumu için üç adet stres faktörü denenmiş, 'sıcak' (+35°C) veya 'soğuk' (+4°C) termal şok (stres) uygulamaları ve anterleri besin ortamına yerleştirmeden önce, anterlerin üst uçlarının kesilmesinden kaynaklanan stres faktörleri incelenmiştir. Başlangıç ortamı olarak Gamborg ve ark., (1968) tarafından tanımlanan B5 ortamı ve Ockendon (1986) tarafından 100 g l⁻¹ sakkaroz, 800 mg l⁻¹ glutamin, 100 mg l⁻¹ serin ve 0.3 mg l⁻¹ 2,4-D içermesi şeklinde modifiye edilen besin ortamı kullanılmıştır. Anter kültürü yöntemi ile elde edilen androgenik embriyolar sürgün gelişimi için 20 mg l⁻¹ kinetin ve 20 g l⁻¹ sakkaroz içeren B5 ortamına (Gamborg ve ark. 1968) alınmışlar, daha sonra bitkiler kök gelişimi için 1 mg l⁻¹ IAA ve 30 g l⁻¹ sakkaroz içeren B5 ortamına aktarılmışlardır. 24 saat sğresince sıcak şoku uygulamanın (+35°C), soğuk (+4°C) uygulamasından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Düşük sıcaklıkta uygulama süresinin uzatılması (48, 96 ve 144 saat), +35°C'de 24 saat sıcaklık uygulamasına göre daha başarısız olmuştur. Uygulamalara göre çeşitler arasında farklılıklar görülmüştür.

Suprunova ve Shmykova (2008) hıyarda (*Cucumis sativus* L.) ovul, anter ve mikrospor kültürleri ile haploid bitki üretmeye çalışmışlar ve araştırma esnasında bitki büyüme düzenleyiciler, genotip, çiçek tomurcuğu uzunlukları ve mikrospor gelişim safhalarını incelemişlerdir. Farklı büyüme düzenleyiciler arasında 0.2 mg l⁻¹ thidiazuron (TDZ)'un ginogenesis oluşumu için en iyi bitki büyüme düzenleyici olduğunu gözlemlemişlerdir. Sadece 'Gordion' çeşidinde ginogenesis yöntemi ile haploid bitki elde edilmiştir. Anter kültürü yönteminde en uygun anter safhasının mikrosporların tek çekirdekli ve erken safhadaki iki çekirdekli aşamada olduğunu tespit etmişlerdir.

Bobkov (2010) bezelyede sıcak ve soğuk şoku uygulamalarının anter kültürüne etkisini araştırmıştır. İlk aşamada çiçek tomurcuklarına soğuk uygulaması 4°C'de 0 ve 1 gün yapılmış ve daha sonra kültüre alınan anterler 32°C'de 1 ve 2 gün sıcak uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Daha sonra denemeler dört farklı stres faktörleri (4°C soğuk uygulama, 35°C, 37°C ve 38°C sıcak uygulama) ile gerçekleştirilmiştir: 1) 0 gün soğuk, 37°C 18 saat sıcak (Stabil çeşidi), 2) 1 gün soğuk, 38°C 18 saat sıcak (Stabil çeşidi), 3) 3 gün soğuk, 35°C 18 saat sıcak (Vizir çeşidi), 4) 4 gün soğuk, 35°C 18 saat sıcak (Vizir çeşidi). İkinci ve üçüncü stres faktörlerinde yeşil nodüler kallus, 3. ve 4. stres faktörlerinde uzun çoğalan ve gelişen kallus oluşumları meydana gelmiştir.

Gorecka ve ark. (2009) havuçta (*Daucus carota* L.) anter kültüründe yaptıkları denemelerde anterleri 20 g dm⁻³ sakkaroz ve 20 g dm⁻³ kinetin içeren B5-1, 20 g dm⁻³ sakkaroz ve hormon içermeyen B5-2, 20 g dm⁻³ sakkaroz ve 0.5 g dm⁻³ aktif kömür içeren MS-1, 20 g dm⁻³ sakkaroz, 1 mg dm⁻³ BA ve 0.001 mg dm⁻³ NAA içeren MS-2, 20 g dm⁻³ sakkaroz ve hormon içermeyen MS-3 ortamına yerleştirmişlerdir. Denemeler sonucunda B5-2, MS-1 ve MS-3 ortamlarının daha başarılı olduğu rapor edilmiştir.

Lantos ve ark. (2009) biberde mikrospor kültüründe % 80 oranında geç tek çekirdekli ve % 20 oranında erken iki çekirdekli mikrosporlar içeren anterlerin embriyogenesi artırdığını gözlemlemişlerdir.

Nowaczyk ve ark. (2009), *C. annuum* F2 hibrit çeşitleri (ATZ1 x PO ve ATZ1 x CDT) ve *C. frutescens* x *C. annuum* ATM1, *C. frutescens* x *C. chinense* türlerarası melezler ile biberde anter kültürü yöntemi ile androgenesisin etkisini belirlemeyi amaçlamışlardır. Anterler 0.01 mg dm^{-3} 2,4-D ve 0.01 mg dm^{-3} Kinetin içeren CP ortamında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan anterler 35°C 'de 8 gün bekletilmiş, daha sonra 25°C 'de 12 saat fotoperiyot koşullarına alınmıştır. 14 gün sonra anterler 0.1 mg dm^{-3} kinetin ilaveli R1 ortamına aktarılmıştır. Hibrit çeşitlerde androgenesisin etkinliği açısından belirgin farklılıklar görülmüştür. Androgenik embriyo oranı en yüksek ATZ1 x PO F2 hibrit çeşidinde meydana gelmiş, ATZ1 x PO F2 hibrit çeşidinde %5 daha yüksek embriyo elde edilirken, ATZ1 x CDT F2 hibrit çeşidinde ise 3 kat daha az embriyonun oluştuğu tespit edilmiştir.

Shrestha ve Kang (2009) tatlı biberde (*Capsicum annuum* L.) dokuz adet hibrit çeşitte anter kültürü denemeleri yapmışlar ve kallus oluşumunun çeşitlere göre farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Kallus oluşumu % 6 (Phenlene çeşidi) ile % 69,8 (Kufrah çeşidi) arasında değişmiştir. En yüksek bitki oluşum yüzdesinin Phenlene (% 2.67) ve Bossanova (% 2.41) çeşitlerinden elde edildiği belirlenmiştir. En yüksek haploid bitki yüzdesinin ise Minipaprika (% 40) ve Bossanova (%3 6.1) çeşitlerinde gözlemlendiği saptanmıştır.

Dört farklı domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hattında ve hatların hibritlerinde anter kültürü yöntemi ile androgenesis etkisi araştırılmıştır. Anterler M1 (Park ve ark. 2001), M2 (Summers 1997) ve M3 (Evans ve ark. 1986) olmak üzere 3 farklı ortama alınmış, $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 4 hafta bekletilmiş ve 4°C 'de 48 saat soğuk uygulamasına maruz bırakılmışlardır. Kallus oluşumu ve kallus gelişiminin ön uygulamaya tabi tutulmuş anterlerden meydana geldiği, ön uygulamaya tabi tutulmamış anterlerden ise oluşan kallusların sürgün gelişimi göstermediği tespit edilmiştir. En yüksek kallus oluşumunun M1 ve M2 ortamında, en fazla kallus çapının ve en yüksek sürgün rejenerasyonunun M1 ortamında meydana geldiği görülmüştür. MsK8 ve Micro Gemma hattının ebeveynlere göre daha yüksek kallus

oluşum frekansına, sürgün rejenerasyonuna ve daha yüksek kallus çapına sahip olduğu saptanmıştır. M1 ortamında, MsK8 × Micro Tina hibritinin yüksek kallus oluşum frekansına ve sürgün rejenerasyonuna, Micro Tina × Micro Gemma hibritinin ise en fazla kallus çapına sahip olduğu belirlenmiştir. Hibrit çeşitlerin ebeveynlere göre ortalama kallus oluşumu, kallus çapı ve sürgün rejenerasyon değerlerinin daha yüksek olduğu, yani hibrit çeşitlerin ebeveynlere göre daha yüksek androgenik yanıt verdiği tespit edilmiştir (Motallebi-Azar 2010).

Anter kültüründe genotipik yanıtı tespit etmek amacıyla on bir farklı biber genotipinin kullanıldığı çalışmada, tomurcuklar 24 saat boyunca soğukta (+4 °C) ve karanlıkta bekletilmiş ve besin ortamı olarak 4 mg/l NAA, 1 mg/l BA, 8 g/l agar ve 30 g /l sakkaroz içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Farklı biber çeşitlerinden farklı androgenetik tepkiler alınmış, 11 genotipten 2398 adet anter kültüre alınmış, 44 embriyo ve 12 bitki elde edilmiştir (Ercan ve Şensoy 2011).

Shrestha ve ark. (2011) Boogie tatlı biber (*Capsicum annuum* L. cv. Boogie) çeşidinde anter kültürü yöntemi ile haploid ve diploid bitkileri üretmeyi ve karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Anterler, 0.1 mg.l⁻¹ kinetin, 0.1 mg.l⁻¹ 2,4-D, % 3 sakkaroz ve % 0.32 phytagel içeren Dumas de Vaulx ortamına (C ortamına) yerleştirilmiştir. Kültüre alınan anterler, 35°C’de 1 hafta süresince karanlık koşullarda bekletilmiş, daha sonra 25°C’de 16 saat fotoperiyod koşullarında 40 gün süresince bekletilmiştir. Deneme süresince 6100 adet anter kültüre alınmış, 2420 adet kallus (% 39.6) oluşmuş ve kalluslardan 109 adet bitki (% 1.78) elde edilmiştir. Bunlardan 64 adet bitkiye flow sitometri analizi ve kromozom sayımı yapılmış, 14 bitki (% 21.9) haploid, 50 bitki ise (%78.1) diploid olarak tespit edilmiştir.

Taşkın ve ark. (2011) beş farklı biber genotipinin anter kültüründe, dört farklı kültür ortamı ve sezon etkisini test etmişlerdir. Ayrıca, gelişimini tamamlayamamış embriyolar 10 gün boyunca 0.5 mg l⁻¹ absisik asit içeren besin ortamında bekletilmişlerdir. Çalışma sonucunda incelenen faktörler embriyo elde edilmesi açısından etkili olmuş, en yüksek embriyo verimi düşük sıcaklığa duyarlı

genotiplerden birisi olan A269'dan elde edilmiştir. Sezon etkisi açısından en yüksek embriyo verimi Nisan-Mayıs aylarından sağlanmış ve embriyoların büyük bir kısmı 3 nolu ortam (MS 4 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, % 0.25 aktif kömür, 15 mg/l AgNO₃, 30 g/l sakkaroz) ve 4 nolu ortamdaki (MS ortamı modifiye edilmiş, % 0.25 aktif kömür, 15 mg/l AgNO₃, 4 mg/l NAA, 0.1mg/l BAP, 0.5 mg/l ABA) elde edilmiştir.

Rakha ve ark. (2012) Cucurbita türlerinde, türler arası melezleme ile elde edilen 6 hibrit çeşitte (*C. pepo* L. (Eskandarani cv.) × *C. moschata* L., *C. pepo* L. (Queen F1) × *C. moschata* L., *C. pepo* L. (Jedida F1) × *C. moschata* L., *C. pepo* L. (MHTC77 F1) × *C. moschata* L., *C. pepo* L. (Queen F1) × *C. ficifolia* L. ve *C. pepo* L. (MHTC77 F1) × *C. martinii* L.) anter kültürü ve ovül kültürünü uygulamışlardır. Anterler 50, 120, 150 g l⁻¹ sakkaroz ve 1.0, 5.0 mg l⁻¹ 2,4-D içeren ortamlara yerleştirilmiştir. Anterden meydana gelen kalluslar ise 90 g l⁻¹ sakkaroz ve 1.0 mg l⁻¹ 2,4-D içeren ortama alınmıştır. *C. pepo* L. (Queen F1) × *C. moschata* L. melezinden anter kültürü ile elde edilen kalluslardan en yüksek oranda (%40) bitki oluşumu gözlemlenirken, *C. pepo* L. (MHTC77 F1) × *C. moschata* L. hibrit çeşidinde ovül kültürüne cevap verme oranının en yüksek (%18.67) olduğu belirlenmiştir. *C. pepo* L. (MHTC77 F1) × *C. moschata* L. hibrit çeşidi dışında soğuk uygulamasının ginogenesisine negatif etkide bulunduğu tespit edilmiştir. Anter kültürü yöntemi ile elde edilen bitkilerin kök uçlarında kromozom sayımı yapılmış, bitkilerin %50'sinin haploid ve %50'sinin ise dihaploid olduğu belirlenmiştir. Ovül kültürü ile elde edilen bitkilerin ise %60'ının haploid, %40'ının diploid olduğu bildirilmiştir.

Ata ve Büyükalaca (2013) biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültüründe mevsim ve mikrospor etkisini araştırmışlardır. Materyal olarak düşük sıcaklığa hassas 195 nolu genotip, tolerant 421 nolu genotip, yüksek sıcaklığa hassas 277A nolu genotip ve tolerant İnan 3363 çeşidini kullanılmıştır. Genotipler arasında en yüksek embriyo verimi İnan çeşidinden ve anter alma dönemleri arasında ise en başarılı sonuçlar Nisan ve Ağustos aylarından elde edilmiştir.

Başay ve Ellialtıoğlu (2013) bazı patlıcan (*Solanum melongena* L.) çeşitleri ve ıslah hatlarında, androgenik oluşuma az ve çok cevap veren genotipleri melezleyerek anter kültürü yöntemi ile haploid embriyo oluşumuna etkilerini araştırmışlardır. Anterler 35°C'de karanlıkta 8 gün boyunca bekletilmiş ve sonra C ortamında 25°C'de 12 saatlik ışık fotoperiyodunda 4 gün boyunca inkübe edilmiş ve sonrasında anterler 30 g/l sakkaroz ve 0.1 mg/l kinetin içeren R ortamına aktarılmıştır. Topan ve Halep Karası çeşitlerinde haploid embriyo oranının % 4.16 ve % 2.63 olduğu tespit edilmiş ve bu çeşitlerin Teorem F1 çeşidi, Vd-1 ve Vd-2 hatlarına göre anter kültürüne daha iyi cevap verdikleri saptanmıştır.

Parra-Vega ve ark. (2013) dört adet tatlı biber çeşidinde Dumas de Vaulx ve ark. (1981) ve Supena ve ark. (2006) tarafından geliştirilen anter kültürü protokolünü uygulayarak anterden gelen kallus ve embriyo oluşumunu gözlemlemişlerdir. Dumas de Vaulx ve ark. (1981) tarafından geliştirilen protokolde embriyo ve kallus gelişimi gözlemlenirken, Supena ve ark. (2006) tarafından geliştirilen protokolde ise sadece embriyo gelişimi görülmüştür. Anterler 35°C'de 4, 8, 12 ve 16 gün bekletildikten sonra 25°C'ye alınmış ve sıcaklık uygulamasında sürenin embriyo verimini etkilediği saptanmıştır.

Roshany ve ark. (2013) biberde anter kültüründe genotip, besin ortamı, bitki büyüme düzenleyicileri ve inkübasyon koşullarının etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. İlk aşamada mikrosporların gelişim safhası belirlenmiş ve daha sonra çiçek tomurcukları 4°C'de 24 saat boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Besin ortamı olarak kallus oluşumu için farklı dozlarda 2,4-D, NAA, BA, kinetin içeren 5 farklı ve bitki regenerasyonu için ise farklı dozlarda ABA, kinetin, BA içeren 6 farklı C ve N6 ortamı, inkübasyon denemeleri içinde 24 ve 30°C dereceleri test edilmiştir. En yüksek oranda kallus, 30°C inkübasyon sıcaklığı ve 0.1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA içeren besin ortamından elde edilmiştir.

Wang ve ark. (2014) yabani kerevizde (*Levisticum officinale* W.D.J. Koch) NAA, 2,4-D ve BAP içeren besin ortamlarında anter kültürü yönteminin başarısını araştırmışlar ve embriyo oluşum frekansının 10.74 µM NAA, 8.80 µM BAP, 9.05

μ M 2,4-D ve %6 sakkaroz içeren MS ortamında % 0.42 ile % 18.25 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Keleş ve ark. (2015) farklı biber tiplerinde anter kültürü yöntemi ile elde edilen bitkilerde spontan dihaploid oranlarını karşılaştırmışlar ve farklı biber tiplerinden farklı spontan dihaploid bitkiler elde etmişlerdir. En yüksek spontan haploid oranı dolmalık biberden (%53.4) elde edilirken, bunu charleston (%31,9) ve kapyra (%30.4) tipleri takip etmiştir.

Kiszcak ve ark. (2015) havuçta (*Daucus carota* L.) düşük sıcaklık uygulamasının anter kültürüne etkisini araştırmışlar ve bitkileri 4°C’de 9, 12 ve 21 gün boyunca bekletmişlerdir. En etkili uygulama 4°C’de 12 gün bekletme olmuş ve 100 anter başına 24.3 adet embriyo elde edilmiştir.

2.2. Işınlanmış Polenle Tozlama Yöntemi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Kabakgiller familyasında ilk haploid bitkiler 1950’lerde elde edilmiştir. Swaminathan ve Singh (1958) karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), Aalders (1958) ise hıyarda haploid embriyolar elde etmişlerdir. Yazlık kabakta (*Cucurbita pepo* L.) ilk haploid bitki, Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1986) tarafından döllenmemiş yumurta kültürü ile elde edilmiştir.

Tulecke (1964) tarafından yapılan çalışmada ilk defa dişi gametten kallus oluşumu meydana gelmiş, arpada yumurtalıkların kültüre alınmasıyla yapılan bir çalışmada ise ginogenesis yöntemi ile ilk haploid bitki elde edilmiştir (Noeum 1976).

Buğday, arpa, pirinç ve mısır gibi türlerde de haploidizasyon çalışmaları sonucunda dihaploid bitkiler elde edilmiştir (Gaj 1998; Sibi ve ark. 2001; Tang ve ark. 2006; Zhou ve Yang 1981). Gurel ve ark. (2000) tarafından şeker pancarında (*Beta vulgaris*) ve Luther ve Bohanec (1999) tarafından soğanda (*Allium cepa*) ginogenesis yöntemi ile başarılı çalışmalar yapılmıştır. Hıyarda (Gemes-Juhasz ve ark. 2002), tatlı patatest (Kobayashi ve ark. 1993) bu yöntem ile haploid bitki üretiminde bazı umut veren sonuçlar elde edilmiştir. Soğanda çiçek organlarına

soğuk şoku uygulaması (8°C’de 7 gün) ve şeker pancarında sıcak ön uygulaması ile (30°C) istenilen sonuçlar elde edilmiştir (Michalik ve ark. 2000; Wremerth ve Levall 2003).

Işınlanmış polenle tozlama yöntemi ile haploid bitki elde edilmesinde ilk başarılı çalışma 30 yıl önce hıyar ve kavunda gerçekleşmiştir (Sauton ve Dumas de Vault 1987, 1988; Truong-Andre 1988; Niemirowicz-Szczytt ve Dumas de Vault 1989). Daha sonraki yıllarda araştırmacılar tarafından haploid bitki elde edilmesinde genotip, zaman ve ışın dozunun önemli olduğu tespit edilmiştir (Cuny ve ark. 1993; Przyborowski ve Niemirowicz-Szczyt 1994; Çağlar ve Abak 1996a, 1999a, b; Faris ve ark. 1999; Lofti ve ark. 1999).

Işın dozu olarak 300 Gy ışın dozunun kavunda (Sauton 1988) ve hıyarda (Niemirowicz-Szczytt ve ark. 1995, Çağlar ve Abak 1996a, 1999a) haploid bitki üretiminde etkili olduğunu bildirilmiştir. Faris ve ark. (1999) hıyarda 50 ve 300 Gy arası ışın dozunu denemişler ve 100 Gy ışın dozunun haploid embriyo elde edilmesinde etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Claveria ve ark. (2005) hıyarda 500 Gy gibi yüksek ışın dozunda daha fazla oranda uyartım gözlemlemişlerdir. Cuny ve ark. (1993) kavunda 150 ve 2500 Gy arasında değişen dozlarda gama ışını uygulaması yapmışlar ve haploid bitki elde etmişlerdir.

Sauton (1988) kavunda Haziran ve Eylül ayları arasında yapılan tozlamalarda haploidizasyon açısından en yüksek verimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Hıyarda haploid embriyo sayısının baharda yaza göre daha çok arttığı tespit edilmiştir (Przyborowski ve Niemirowicz-Szczytt 1994; Sztangret-Wisniewska ve ark. 2006). Benzer şekilde, hıyar bitkilerinde en yüksek haploid bitki sayısının Haziran ve Temmuz aylarında elde edildiği bildirilmiştir (Çağlar ve Abak 1999). *C. pepo*’da, Mayıs ve Eylül ayları arasında yapılan tozlamalardan sonra, meyve başına en yüksek embriyo sayısının Eylül ve Haziran aylarında meydana geldiği görülmüştür (Kurtar ve ark. 2002). *C. lanatus*, *C. moschata* ve *C. maxima*’da haploid embriyo verimi üzerine bahar mevsiminin olumlu etkisi

gözlemlenmiştir (Gürsöz ve ark. 1991; Kurtar ve ark. 2009; Kurtar ve Balkaya 2010).

Sarı ve Abak (1994) Crimson Sweet, Halep Karası, Sugar Baby ve Panonia F1 karpuz [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai] çeşitlerinde ışınlanmış polen ile tozlama yöntemi ile partenogenetik haploid embriyo elde etmeyi amaçlamışlar ve Co⁶⁰ ışın kaynağından gelen 200 ve 300 Gy ışın dozlarını kullanılmışlardır. Deneme sonucunda, Halep Karası çeşidinde 100 tohum başına embriyo sayısının diğer çeşitlere göre daha yüksek olduğu saptanmış, ancak bu çeşitte beyaz, kalp şeklinde embriyoların görülmediği tespit edilmiştir. Tozlama ve embriyo elde edilmesi arasındaki sürenin etkisi çalışılmış, tozlamadan 2 ile 5 hafta sonra hasat edilen meyvelerde globüler ve kalp şekilli embriyolar elde edilmiş ve 100 tohum başına en yüksek bitki sayısının tozlamadan 2 ile 4 hafta sonra kaydedildiği görülmüştür.

Faris ve ark. (1999) hıyarda ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile haploid bitki elde edilmesi konusunda yaptıkları çalışmada, ışın kaynağı olarak gama ışınını (Co⁶⁰) kullanılmışlardır. İlk uygulamada, 5 hıyar hattında ve 3 hibrit çeşitte 0.2 ve 0.3 kGy ışınlarının etkisi test edilmiş, en yüksek embriyo sayısı Gy-3 M ve BxOg hibritlerinden elde edilmiştir (Sırasıyla 111 ve 188). En yüksek embriyo sayısına sahip 2 hat ve 1 hibrit çeşit, en düşük ışınlama dozunu bulabilmek amacıyla ikinci uygulamada kullanılmış ve 0,05 kGy ışınlama dozu ile sadece diploid embriyoların üretildiği saptanmıştır. Diğer üç dozun (0.1, 0.2 ve 0.3 kGy) embriyo gelişimini etkilediği gözlemlenmiştir. Ancak her kombinasyondan elde edilen bitki sayılarının benzer olduğu belirlenmiştir. 0.1 kGy ışın dozu ile en yüksek haploid embriyo elde edildiği bildirilmiştir.

Sarı ve ark. (1999) karpuzda ışınlanmış polen ile tozlama yöntemi ile haploid bitki elde etmişlerdir. Sugar Baby ve Halep Karası karpuz çeşitlerinde haploid ve diploid bitkilerin ploidi seviyelerini belirlemek için direkt (kromozom sayımı) ve indirekt (flow sitometri, stoma büyüklüğü, bekçi hücrelerin kloroplast sayısı ve morfolojik gözlem) metodları kullanmışlardır. Çalışmada; kromozom

sayımının külfetli olduğu, bitkilerin morfolojik gözleminde uzun süreye ihtiyaç duyulduğu ve flow sitometrinin pahalı, yoğun iş gücü gerektirdiği, diğer taraftan stoma ölçümü ve kromozom sayımı yöntemlerinin daha az iş gücü gerektirdiği, bu yüzden diğer yöntemlere göre uygulanmasının daha pratik olduğu belirlenmiştir. Haploid bitkilerin stoma uzunluğunun 17 ± 18 mm, çapının 10 ± 12 mm, bekçi hücrelerinin kloroplast sayısının 6 ± 7 ; diploid bitkilerde ise sırasıyla 23 ± 24 mm, 18 mm ve 11 ± 12 olduğu saptanmıştır.

Gürel ve ark. (2000) şeker pancarında ovul kültürü yöntemi ile haploid bitki üretiminde soğuk ön uygulaması, AgNO_3 ve aktif kömürün etkisini araştırmışlardır. Soğuk ön uygulama ve aktif kömürün embriyo oranını arttırdığı, ancak AgNO_3 uygulamasının embriyo oranını azalttığı gözlemlenmiştir. Kromozomların katlanmasında kolhisin ($50, 100, 150$ ya da 500 mg l^{-1}) ve trifluralin ($1.7, 3.4$ ya da 5.0 mg l^{-1})'in farklı dozları $12, 24, 36$ veya 48 saat süresince katı agar, katı agaroz ve sıvı ortamda karşılaştırılmıştır. Kolhisinde (% 25.3) trifluraline göre (% 18.2) daha yüksek katlanma oranı elde edilirken, önemli bir farklılık saptanmamıştır. Sıvı ortamın (% 29.1), katı agaroz (% 20.7) ve katı agara (% 15.4) göre daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. 48 saat (% 27.5) uygulamasının, 12 saat (% 13.6), 24 saat (% 16.3) ve 36 saat (% 18.6) uygulamasına göre daha etkili olduğu görülmüştür.

Lotfi ve ark. (2003) kavunda (*Cucumis melo* L.) ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile haploid ve dihaploid hatlar üretmeyi amaçlamışlardır. Embriyolar kurtarılmadan önce tohumlar 10 gün boyunca sıvı ortamda kültüre alınmıştır. Embriyo kurtarma ile elde edilen bitkiler (yaklaşık 175 bitki) seraya aktarılmış, flow sitometri analizine göre denenen 2 hatta dihaploid, diğer hatlarda ise haploid ve diploid hücreler içeren mixoploid kromozom sayıları görülmüştür.

Claveria ve ark. (2005) kavunda (*Cucumis melo* L.) dayanıklı çeşit ıslahını hızlandırmak için ışınlanmış polen ile tozlama yöntemini uygulamışlar ve Co60 ışın kaynağından gelen 500 Gy ışın dozunu kullanmışlardır. Ploidi seviyesini belirlemek için flow sitometri cihazı kullanılmış ve SSR yöntemi ile homozigot ve

heterozigot bireyler karşılaştırılmıştır. Kodominant markırlara ve flow sitometri analizine göre, partenogenesis ile elde edilen bitkilerin gametofitik orijinli olduğu ve homozigot hatların haploid olduğu belirlenmiştir.

Lim ve Earle (2008) kavunda (*Cucumis melo* L.) ışınlanmış polen ile tozlama yöntemi ile dihaploid bitkiler elde etmeyi amaçlamışlar, 250 Gy ışın dozunu kullanmışlar ve kromozom katlaması esnasında kolhisin uygulamalarının hayatta kalma, ploidi düzeyi, polen üretimi ve meyve oluşumu üzerindeki etkilerini belirlemişlerdir. Deneme süresince 63 adet partenogenetik kavun bitkisi elde edilmiş ve bu elde edilen bitkiler çoğaltılmıştır. Kromozom katlaması için 3 cm sürgün ucunun 500 mg/l kolhisine 3 saat boyunca daldırılmasının en etkili yöntem olduğu tespit edilmiştir. Bu uygulama ile eksplantların %83'ünün canlı kaldığı, dihaploidiye dönüşüm oranının %26 olduğu saptanmıştır. Polen üreten bitkilerde meyve üretim oranının %60 olduğu belirlenmiştir. Bir başka yöntem olarak, genç bitkilerin tepe uçlarına 5000 mg/l kolhisin 2-4 saat süresince uygulanmış, bu uygulama sonucunda meyve oluşumu sağlanmış, ancak bu meyvelerin hayatta kalma oranının daha düşük olduğu ve morfolojik anormallikler yaşandığı anlaşılmıştır.

Lotfi ve Salehi (2008) hıyarda iki ticari F1 melezi ve dört yerel çeşitte 250 Gy ışın dozu kullanarak ışınlanmış polen ile tozlama yöntemi ile partenogenetik haploid oluşumunu araştırmışlardır. Işınlanmış polenle tozlamadan 3 hafta sonra, hıyar tohumlarını 10 gün süresince sıvı ortamda tuttuktan sonra çimlenme gerçekleşmiştir. Bu metot ile haploid embriyoların daha iyi geliştiği saptanmış, tohumların 10 gün içinde çimlenip yeşile döndüğü ve böylece tohumları tek tek açmaya gerek kalmadan kolaylıkla ayırt edilebildiği görülmüştür. Bu metot diğer yaygın kullanılan metotlar ile karşılaştırıldığında, kurtarılan embriyo sayısında, kalitesinde ve haploid bitki oranında büyük ölçüde artış sağlamıştır.

Bal kabağı (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir.) ve kışlık kabakda (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) farklı ışınlama dozu (50, 100, 200 ve 300 Gri) ve zamanlarının (9, 11, 15, 21 ve 28 Temmuz) polen canlılığı, polen ömrü (0

ve 1 gün), çimlenme kabiliyeti, meyve ve tohum tutumuna etkisi araştırılmıştır. Işınlama dozu, ışınlama süresi ve polen yaşı arttıkça polen canlılığı, çimlenme kabiliyeti, meyve ve tohum tutumunun azaldığı tespit edilmiştir. Işınlanmış ve ışınlanmamış polenlerin canlılığını sırasıyla 1-4 gün ve 4-7 gün koruduğu gözlemlenmiştir. Kışlık kabakta ışınlanmamış polenlerin 2 günde çimlendiği ve en yüksek çimlenme oranının (%22.6 ve %22.9) 9 Temmuz ve 11 Temmuzda elde edildiği saptanmıştır. Ayrıca, ışınlanmış polenlerin 50 Gy ışınlama dozunda (%1.1-8.5) 2 günde, 100 Gy ışınlama dozunda ise (%0.6-10.4) 1 günde çimlendikleri görülmüştür. Kışlık kabakta 9 Temmuzda meyve tutum oranının %75'den (50 Gy) %63.0'e kadar (100 Gy) değiştiği gözlemlenmiştir. 50 Gy ve 100 Gy ışınlama dozu ile ışınlanmış polenler ile tozlama sonucunda, ışınlama sürelerine bağlı olarak tohumlu ve tohum içermeyen meyveler meydana gelmiştir. 200 Gy ve 300 Gy ışınlama dozunda ışınlanmış polenlerin ortamda çimlendikleri, hatta meyve verdikleri, buna rağmen meyvelerin içerisinde tohumun oluşmadığı görülmüştür. En yüksek meyve tutum oranının kışlık kabakta %75, bal kabağında ise %26.3 oranında olduğu belirlenmiştir. Tüm ışınlama sürelerinde, meyve ve tohum tutum yüzdesinin bal kabağında kışlık kabağa göre daha düşük olduğu saptanmıştır (Kurtar 2009).

Kavunda (*Cucumis melo* L.) hastalıklara dayanıklı F1 hibrit çeşit adayları bitki materyali olarak kullanılarak, 300 Gy ışınlama dozu kullanımıyla ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile haploid bitki üretimi elde edilmeye çalışılmıştır. Embriyoların elde edilmesinde; tohumların tek tek açılması (M1), tohumların petri kaplarına ekimi (M2) ve tohumların ışık altında incelenmesi (M3) olmak üzere 3 farklı yöntem uygulanmıştır. Işınlanmış polenle tozlama yöntemi ile %94 oranında meyve tutumu elde edilmiş, 204 adet hasat edilen meyvelerden 280 adet haploid, 44 adet diploid ve 8 adet mixoploid bitki elde edilmiş, haploid bitkilerin çimlenme oranının %96 olduğu görülmüştür. M1, M2 ve M3 metodları karşılaştırıldığı zaman, sırasıyla 162, 125 ve 49 dakikada bir meyve için için olan sürecin tamamlandığı gözlemlenmiştir. M3 yönteminin diğer yöntemlere göre daha başarılı, ekonomik ve etkili olduğu gözlemlenmiştir (Arı ve ark. 2010).

Baktemur ve ark. (2010) kavunda ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile haploid embriyoların ayrılmasına kullanılabilecek yöntemleri denemişlerdir. Işın dozu olarak 300 Gy, kontrol uygulaması olarak ise tohumların tek tek açılarak embriyoların kurtarılması yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca tohumların hepsinin doğrudan besin ortamına ekimi, tohumlara ışıpta bakarak embriyolu tohumların ayrılması ve tohumların hepsinin sıvı ortama ekimi olmak üzere 3 farklı yöntem denenmiştir. Tohumların hepsinin sıvı ortama ekimi uygulamasında embriyo meydana gelmemiştir. Gerekli süre ile birlikte değerlendirildiğinde en iyi uygulamanın tohumların hepsinin besin ortamına ekimi yöntemi olduğu tespit edilmiştir.

Kurtar ve Balkaya (2010) kışlık kabakda (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) 6 adet genotipde 4 ışın dozu (50, 100, 200 ve 300 Gray) ve 5 farklı tarihte (9, 11, 15, 21 ve 28 Temmuz) ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile haploid embriyo oluşumunu araştırmışlardır. Embriyolar daha düşük ışınlama dozlarında (50 Gray ve 100 Gray) ve daha erken ışınlama tarihlerinde elde edilmiştir. Tüm genotiplerden toplam 50 adet meyve, 7071 adet tohum ve 686 adet embriyo elde edilmiş ve meyve başına embriyo sayısı 13.7 olarak belirlenmiştir. En yüksek meyve (29), tohum (4981) ve embriyo sayısı (673) ise 50 Gray ışın dozunda kaydedilmiş ve toplam tohum ve embriyo sayısının farklı ışın zamanlarına göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Daha erken ışınlama zamanlarında (9, 11 ve 15 Haziran) en yüksek tohum (2903, 2979 ve 855) ve embriyo sayısı (223, 318 ve 122) elde edilirken, daha geç ışınlama zamanlarında (21 ve 28 Haziran) en düşük tohum (216 ve 118) ve embriyo sayısı (12 ve 11) elde edilmiştir. Ortalama tohum ve embriyo sayısının genotipler arasında değiştiği gözlemlenmiş, en yüksek ortalama tohum (381) ve embriyo sayısı (21.2) G14 genotipinde, en düşük ortalama tohum (133) ve embriyo sayısı (8.2) ise 55CA06 genotipinde meydana gelmiştir. Kotiledon ve şekilsiz embriyolar sadece diploid bitkilerde meydana gelirken, %33.3 geç torpedo, %50.0 ok ucu ve %66.7 pro-kotiledon embriyoların haploid bitki ürettiği tespit edilmiştir. 50 Gray ışın dozunda 100 tohum başına 0.11, 100

embriyo başına 1.17, 100 bitki başına 10,96 ve meyve başına 0.28 oranında haploid bitki elde edildiği saptanmıştır.

Berber (2012) kabuksuz çekirdek kabaklarında (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) ışınlanmış polen ile tozlama yöntemi ile haploid bitki elde edilmesini ve en uygun ışın dozunu araştırmışlardır. Çalışmada bitki materyali olarak toplam 15 farklı kabak genotipi ve 50, 100 ve 150 Gy olmak üzere 3 farklı ışın dozu denenmiştir. Araştırma süresince 50 Gy ışın dozuyula tozlanan meyvelerin ortalama tohum sayıları 299.9 adet/meyve, 100 Gy’de 247.9 adet/meyve, 150 Gy de ise 198.1 adet/meyve olduğu belirlenmiştir. Tüm genotiplerden toplam 2073 adet embriyo elde edilmiş ve bu embriyoların 979 adedi bitkiye dönüşmüştür. 75 bitkide indirekt yöntemlerle (çiçek tozu varlığı, yaprak ve çiçek özellikleri, stoma yoğunluğu, stomaların bekçi hücrelerinde bulunan kloroplastların sayımı) yapılan gözlemler sonucunda bu bitkilerin %42.6’sının haploid, %57.3’ünün ise diploid olduğu belirlenmiştir.

Kavunda (*Cucumis melo* var. *acidulus*) ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile partenogenetik haploid embriyo elde edilmesinin hedeflendiği bir çalışmada Co60 ışın kaynağından gelen 150, 200, 250, 300 ve 350 Gy olmak üzere beş farklı ışın dozu denenmiştir. 250 Gy gama ışın dozunun diğer ışın dozlarına göre partenogenesis oluşumunda daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Toplamda 76 adet embriyo elde edilmiş, normal gelişen embriyolar arasında globular embriyo yüzdesinin daha yüksek olduğu (%85,52) görülmüş, ancak sonrasında gelişme durmuş ve bitki regenerasyonuna gidilememiştir. Dokuz adet kotiledon şeklinde embriyo elde edilmesine rağmen (%11,84), sadece 1 embriyodan bitki regenerasyonu meydana gelmiştir (Godbole ve Murthy 2012).

Nasertorabi ve ark. (2012) İran kavununda (*Cucumis melo* L.) ışınlanmış polen ile tozlama tekniğini uygulayarak haploid bitki elde etmeyi amaçlamışlar ve farklı genotiplerde 250, 350, 450 ve 550 Gy olmak üzere 4 farklı gama ışını dozunu denemişlerdir. 250 Gy dozunda tohumların içi dolu olmuş (%82), 350 ve 450 Gy dozunda içi boş tohum yüzdesi (% 42 ve % 66) artmış, 550 Gy ışın dozunda ise

tüm meyvelerden içi boş tohumların oluştuğu gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda 550 Gy dozunun etkili olduğu tespit edilmiş ve bitkilerin haploid oldukları kromozom sayımı ile belirlenmiştir.

Ebrahimzadeh ve ark. (2013) yazlık kabakta (*Cucurbita pepo* L.) ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile haploid bitki üretimi üzerine yaptıkları çalışmalarında 25, 50, 75, 100 ve 200 Gray olmak üzere beş farklı ışınlama dozununu denemişlerdir. En yüksek embriyo sayısı (% 82) 50 ve 75 Gy ışınlama dozlarından elde edilmiş, 200 Gy ışınlama dozunda ise embriyo oluşumu gözlemlenmemiştir.

Taşkın ve ark. (2013) karpuzda (*Citrullus lanatus* L.) haploidizasyon tekniğini geliştirmek için ışınlanmış polen ile tozlama tekniğini uygulamışlardır. Co60 ışınlama kaynağından gelen 50, 150, 200, 275 ve 300 Gy olmak üzere 5 farklı gama ışınlama dozları denemeler süresince test edilmiştir. Tozlamadan 25 gün sonra hasat edilen meyvelerden elde edilen embriyolar 30 g l⁻¹ sakkaroz, 8 g l⁻¹ agar, 0.08 mg l⁻¹ B12 ve 0.02 mg l⁻¹ IAA içeren CP ortamında kültür edilmişlerdir. Çalışma süresince toplamda 43 adet meyveden 60 adet haploid embriyo elde edilmiştir. Denenen genotipler arasında, 1 nolu genotip 100 tohum başına 3.57 adet haploid embriyo ile en başarılı genotip olurken, 275 Gy ışınlama dozu diğer dozlara göre daha iyi sonuçlar vermiştir.

Baktemur ve ark. (2013) kavunda (*Cucumis melo* var. *inodorus*) ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile haploid embriyo elde etmek için 300 Gy ışınlama dozununu kullanmışlardır. Haploid embriyoların daha etkili, ekonomik ve daha kısa sürede belirlenmesi için tohumların tek tek açılması, tohumların doğrudan katı besin ortamına ekilmesi, tohumların suda yüzdürülmesi, tohumlara ışıltı bakılması, tohumların sıvı ortama ekimi, yüzey sterilizasyondan sonra tohumların ekimi olmak üzere farklı yöntemler birbirleriyle karşılaştırmalı olarak denenmiştir. Zaman ve ekonomik açıdan tohumların direkt katı ortama ekilmesi ve tohumlara ışıltı bakılmasından daha olumlu sonuçlar alınmıştır.

Kabakta ışınlanmış polen ile tozlama yöntemi ile etkin bir haploidizasyon protokolü geliştirmek için on dört genotip ve 3 farklı gama ışınlama dozları test

edilmiştir. Bu amaçla, erkek çiçekler antesisten 1 gün önce toplanmış ve 150, 200 ve 300 Gy gama ışını dozları ile ışınlanmıştır. Çalışmanın ilk yılında, 219 meyveden 1858 embriyo elde edilmiştir. 150 Gy gama dozu ile ışınlanmış meyvelerde 1358 embriyo, 200 Gy gama dozu ile ışınlanmış meyvelerde ise 500 embriyo sayılmıştır. 150 ve 200 Gy gama ışını dozu ile ışınlanmış meyvelerde 100 tohum başına sırasıyla 9.12 ve 3.53 haploid embriyo elde edilmiştir. 3 nolu genotip, 100 tohum başına 2.42 embriyo ile en başarılı genotip olurken, 4 nolu genotipden 100 tohum başına 1.46 embriyo ile minimum embriyo sayısı belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci yılında, 8 genotip ve aynı ışın dozları kullanılmış, 217 meyveden 2625 haploid ve 1378 diploid embriyo elde edilmiştir. 150, 200 ve 300 Gy ışın dozları ile sırasıyla 2010, 539 ve 76 adet haploid embriyo belirlenmiştir (Baktemur ve ark. 2014).

3. MATERYAL VE METOD

Sunulan bu çalışma Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü (ALATA) ile Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM)'nde yürütölmüştür.

3.1. Materyal

Doktora tezi kapsamına giren çalışmalardan önce birçok ıspanak çeşidi çiçeklenme biyolojileri açısından incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda, çalışmanın amacına en uygun çiçeklenme biyolojisine sahip olan (en fazla dioik yapı gösteren çeşitler) Greenstar F₁ (May Tohum, Bursa, Türkiye), Favorit F₁ (May Tohum, Bursa, Türkiye) ve Koto F₁ (CN Seeds Ltd., Cambrigeshire, İngiltere) ıspanak çeşitleri doktora denemeleri süresince kullanılmıştır.

Greenstar F₁ orta erkenci ve yüksek verimli bir çeşittir. Yaprak yüzeyi düz, şekli geniş oval, yaprak rengi parlak ve koyu yeşildir. Yaprak ucu küt, sapı kısa, yaprak ayası iri ve etlidir. Özellikle ilkbahar, sonbahar ve kış ekimleri için uygundur. Ispanak mildiyösünün 7 ırkına karşı dayanıklıdır.

Favorit F₁ orta erkenci ve yüksek verimli bir çeşittir. Yaprakları hafif dalgalı ve koyu yeşil renklidir. Yaprak ucu küt, sapı kısa, yaprak ayası iri ve etlidir. Sonbahar ve özellikle ilkbahar ekimleri için uygundur. Ispanak mildiyösünün 4 ırkına karşı dayanıklıdır.

Koto F₁ erkenci ve yüksek verimli bir çeşittir. Yaprak ucu sivri ve koyu yeşil renklidir. Sonbahar ve özellikle ilkbahar ekimleri için uygundur. Ispanak mildiyösünün 2 ırkına karşı dayanıklıdır.

3.2. Metod

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Denemenin ilk yılında, anter kültürü ve ısınlanmış polen ile tozlama yöntemi çalışmaları için Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü

Müdürlüğü'ndeki ve Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ndeki uygulama alanında Koto F₁, Greenstar F₁, Favorit F₁ çeşitleri ile Aralık, Ocak ve Şubat ayı içerisinde, 3 farklı dönemde, 30-40 cm sıra arası ve 40 cm sıra üzeri mesafelerle araziye tohum ekimi yapılmıştır. Tohum ekiminden yaklaşık 10-14 gün sonra fide çıkışı gerçekleşmiştir.

Denemenin ikinci yılında da hem Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde hem de Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde, 6 farklı dönemde, içi torf-perlit dolu (2 hacim torf-1 hacim perlit) viyollere tohum ekimi yapılmıştır. Tohumların ekimden toprak üzerine çıkış süresi yine 10-14 gün arasında değişmiştir. Torfun nemini kaybetmemesini sağlamak amacıyla, ya püskürtme şeklinde ya da direkt sulama yapılmıştır. Ayrıca ihtiyaç duyulduğunda gübreleme ve ilaçlama yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Koto F₁ (A), Greenstar F₁ (B) ve Favorit F₁ (C) çeşitlerine ait ıspanak fidelerinden görüntüler

Dikimde bitki sırası 30-40 cm, sıra üzeri 40 cm mesafeler kullanılmıştır (Şekil 3.2). Ispanak yetiştiriciliğinde yabancı otlar yetiştiricilik esnasında büyük sorunlara neden olduğu için, gelişen yabancı otlar temizlenmiş ve kaymak tabakası bağladığında çapa yapılmıştır. Bitkinin sağlıklı gelişimi için, düzenli aralıklarda sulama, gübreleme ve ilaçlama yapılmıştır. Çalışma süresince yapılan tohum ekimleri, fide dikimleri ve hangi çeşitlerin kullanıldığı gibi bilgiler içeren çalışma takvimi Çizelge 3.1'de sunulmuştur.



Şekil 3.2. Koto F₁(A), Favorit F₁ (B) ve Greenstar F₁ (C) çeşitlerinde ıspanak bitkilerinden görüntüler

Çizelge 3.1. Çalışma takvimi

Ekim dönemi	Tohum Ekim Tarihi	Dikim zamanı	Çeşitler
Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü			
1. dönem	05.12.2014	Ocak 2. hafta	Koto F1, Greenstar F1, Favorit F1
2. dönem	11.12.2014	Ocak 2. hafta	Koto F1, Greenstar F1, Favorit F1
3. dönem	29.12.2014	Mart 2. hafta	Koto F1, Greenstar F1, Favorit F1
4. dönem	27.01.2015	Mart 2. hafta	Koto F1, Greenstar F1, Favorit F1
5. dönem	09.02.2015	Mart 2. hafta	Koto F1, Greenstar F1, Favorit F1
6. dönem	17.02.2015 24.02.2015	Mart 2. hafta	Koto F1
Ekim dönemi	Tohum Ekim Tarihi	Dikim zamanı	Çeşitler
Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü			
1. dönem	11.12.2014	Şubat 2. hafta	Koto F1, Greenstar F1, Favorit F1
2. dönem	05.01.2015	Mart 2. hafta	Koto F1, Greenstar F1, Favorit F1
3. dönem	27.01.2015	Mart 2. hafta	Koto F1, Greenstar F1, Favorit F1
4. dönem	09.02.2015		Koto F1
5. dönem	17.02.2015		Koto F1, Greenstar F1, Favorit F1
6. dönem	24.02.2015		Koto F1, Greenstar F1, Favorit F1

Ispanakta salkım şeklinde çiçekler meydana gelmektedir. İlk önce erkek bitkiler daha sonra ise dişi bitkiler oluşmaktadır. Erkek bitkilerin dişi bitkilere göre ömürleri daha kısadır. Erkek bitkiler daha zayıf bünyeli olarak olarak gelişirler ve gövdenin üst kısmında çok az miktarda yaprak meydana getirirler (Şekil 3.3). Buna karşılık gövdenin uç kısmı çiçeklerle kaplıdır. Polen oluşumundan sonra bitki kuruyarak ölür. Dişi bitkiler ise erkek bitkilere göre daha güçlü bir gelişme gösterirler (Şekil 3.3). Yapraklar gövdenin uç kısmına kadar çıkarlar. Bitkiler tohumlarını olgunlaştırmaya kadar yeşil kalırlar ve daha sonra kururlar.



Şekil 3.3. A) Erkek bitkiden görüntü B) Dişi bitkiden görüntü

Koto F₁, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinin çiçek yapıları incelendiğinde, Koto F₁ çeşidi dioik çiçek yapısına sahiptir (Şekil 3.4). Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde ise ilk aşamada dioik çiçek yapısı görülmekte, daha sonra salkımların üst kısımlarında erselik çiçek yapısı meydana gelmektedir.



Şekil 3.4. A) Koto F₁ çeşidinde erkek bitkiden görüntü B) Koto F₁ çeşidinde dişi bitkiden görüntü

3.2.2. Uygun Anterlerin Seçimi

Kültüre alınan anterlerin bulunduğu gelişme safhası haploid embriyo elde edilmesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Bunun için en uygun aşama mikrosporların tek çekirdekli aşamanın sonunda veya iki çekirdekli aşamanın başında olduğu dönemdir. Anter kültürü çalışmalarına başlarken öncelikle Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitleri için uygun anter safhası belirlenmiştir. Bu metodun uygulanması için erkek bitkilerin sapa kalkması beklenmiştir. Erkek bitkilerde kısa bir sap uzamasıyla sürgün ucunda erkek çiçek oluşumu başlamaktadır (Şekil 3.3). Uygun anter safhası belirlenirken anterlerin patlamış olmamasına dikkat edilmiş ve salkım şeklinde olan çiçekler alınmıştır. Farklı büyüklüklerde salkım şeklindeki erkek çiçek tomurcukları toplanarak büyüklüklerine göre ayrılmış ve numaralandırılmıştır. Pens ve bistüri yardımıyla anterler çıkarılarak lamın üstüne konulup ezilmiştir. Anterler ezildikten sonra asetokarmen ile boyanarak lamel ile kapatılmıştır. Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterlerin aşaması seçilerek, çalışmalara bu aşama ile devam edilmiştir.



Şekil 3.5. A) Greenstar F₁ çeşidinde seradaki erkek çiçek görüntüsü B) Favorit F₁ çeşitlerinde seradaki erkek çiçek görüntüsü

3.2.3. Anter Kültürü İçin Kullanılan Ortam Bileşenleri

. Denemeler süresince temel besin ortamı olarak MS ortamı (Murashige ve Skoog 1962) kullanılmış ve farklı oranlarda farklı büyümeyi düzenleyicilerin eklenmesi ile elde edilen 4 adet besin ortamı Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. 4 farklı MS besin ortamının içeriği

Ortam No	Ortam	NAA (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)	BAP(mg L ⁻¹)
1	MS	2	0.5	0
2	MS	4	0.5	0
3	MS	2	0	1
4	MS	4	0	1

Besin ortamının hazırlanması aşamasında kullanılacak olan kimyasal maddeler hassas terazide tartılmış, agar hariç diğer maddeler kullanılarak besin ortamı hazırlanmıştır. Agardan önce ortam pH'sı 1 N'lik HCL ve 1 N'lik KOH kullanımıyla 5.8 olacak şekilde ayarlanmış ve sonrasında agar eklenmiştir. Hazırlanan besin ortamları otoklavda 121°C sıcaklıkta ve 1.2 atmosfer basınçta 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, besin ortamları steril kabin içerisinde 6 cm çapındaki steril petrilere dökülmüştür. Anterlerden oluşan embriyolar bitkiye dönüşümlerinin ve gelişimlerinin sağlanması için bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamına transfer edilmişlerdir.

Ayrıca bitki geliştirme ortamı olarak 0.2 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA ve 1 mg/l IBA, 0.2 mg/l BAP ve 1 mg/l FeEDHA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır.

3.2.4. Anterlerin Çıkarılması ve Besin Ortamlarına Ekilmesi

Anter kültürü için uygun aşama belirlendikten sonra, salkım şeklindeki erkek çiçeklerin (çiçek tomurcuklarının) sterilizasyonu steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla salkım şeklindeki erkek çiçek tomurcukları steril kabinde %20 sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 15 dakika bekletilmiş ve bunu takiben 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Sterilizasyonu takiben anterler, steril pens ve bistüri ile dikkatli bir şekilde anterlerin zedelenmemesine dikkat edilerek çıkarılmış, anterlerin dorsal yüzeyi ortama temas edecek şekilde ve ortama batırılmadan besin ortamı içeren 6 cm çapındaki steril petrilere yerleştirilmiştir. Uygulamada 5 tekerrür ve her tekerrürde 10 petri kullanılmıştır. Her petriye 5 anter yerleştirilmiş, petrinin üzerine çeşidin adı, ortam numarası, tekerrür numarası ve tarih yazılarak etrafı streç film ile kapatılmıştır. Herhangi bir enfeksiyon olma riskini ortadan kaldırmak için deneme 2-3 yıl tekrarlamalı olarak yapılmıştır. Kültürler, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklığa sahip ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık aydınlatma koşulları olacak şekilde hazırlanmış iklim odasına alınmıştır.

Anter kültürü ile ilgili çalışmalarda Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ olmak üzere 3 farklı çeşide ait anterler, 2 yıl süresince 4 farklı besin ortamında

tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 petri olacak şekilde yapılmış ve her petriye 5 anter yerleştirilmiştir.

3.2.5. Verilerin Alınması ve Değerlendirilmesi

Anter kültürüne cevap verme oranının belirlenmesinde dikilen anter sayısı, gelişen anter sayısı, kallus oluşturan anter sayısı, anterden oluşan embriyo sayısı, gelişen bitki sayısı dikkate alınmıştır.

Dikilen anter sayısı: Tüm çeşitlerde ortamlara dikilen anterlerin sayısı (adet olarak)

Gelişen anter sayısı: Tüm çeşitlerde ortamlara dikilen toplam anterlerden gelişen, canlı anterlerin sayısı (adet olarak)

Kallus oluşturan anter sayısı: Tüm çeşitlerde kallus oluşturan anterlerin sayısı (adet olarak)

Anterden oluşan embriyo sayısı: Tüm çeşitlerde gelişen, canlı anterlerden meydana gelen embriyoların sayısı (adet olarak)

Gelişen bitki sayısı: Embriyoların çimlenmesi ile oluşan bitki sayısı (adet olarak)

3.3. Işınlanmış Polenle Tozlama Yöntemi

3.3.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Denemenin birinci yılında, ıspanakta haploid bitki elde etmeye yönelik ışınlanmış polenle tozlama yöntemi için Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ndeki ve Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ndeki uygulama alanlarında Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitleri ile Aralık, Ocak ve Şubat ayı içerisinde, 3 farklı dönemde araziye tohum ekimi yapılmıştır.

Denemenin ikinci yılında, hem Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde hem de Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Sebzeçilik Bölümü'nde 6 farklı dönemde içi torf-perlit dolu (2 hacim torf-1 hacim

perlit) viyollere tohum ekimi yapılmıştır. Tohumların ekimden toprak üzerine çıkış süresi 10-14 gün arasında değişmiştir. Torfun nemini kaybetmemesini sağlamak amacıyla, duruma göre püskürtme ya da direkt sulama,, gübreleme ve ilaçlama gibi gerekli bakım işlemleri yapılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Çalışmada kullanılan ıspanak bitkilerinin seradaki görünümü

3.3.2. Çiçeklerin İzolasyonu

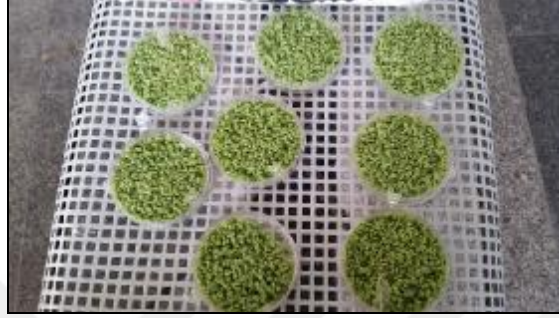
İspanak uzun gün bitkisi olduğu için gün uzunluğu 12 saatin üzerine çıkınca çiçeklenme başlamaktadır. Çiçeklenme başlayınca dışarıdan polen girişini engellemek amacıyla salkım şeklindeki dışi bitkiler keselerle kapatılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Dışı bitkilerin kağıt keselerle kapatılması

3.3.3. Polenlerin Işınlanması

Henüz anterleri patlamamış salkım şeklindeki erkek çiçekler toplanmış ve petri kaplarına yerleştirilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Erkek çiçeklerin ışınlama işlemi için petri kaplarına yerleştirilmesi

Erkek çiçekler Co60 kaynağından gelen gama ışını ile ışınlanmış ve ışınlama dozu olarak ilk deneme yılı, 100, 150, 200 Gy; 2. deneme yılı ise 200, 300, 400 ve 500 Gy ışınlama dozları test edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. A) Işınlamaya hazır erkek çiçekler B) Petri kabındaki erkek çiçeklerin ışınlaması

Işınlama işlemi için Akdeniz Üniversitesi Nükleer Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü'ndeki ışınlama kaynağından yararlanılmıştır. Işınlanan salkım şeklindeki erkek çiçekler, çiçek tomurcuklarının patlayarak çiçek tozlarının ortaya çıkması amacıyla 1 gün süresince oda koşullarında bekletilmiştir.

3.3.4. Çiçeklerin Tozlanması

Işınlamanın ertesi günü, sabahın erken saatlerinde ışınlanmış erkek çiçekler (polenler) ile dişi çiçekler fırça yardımıyla 3 gün süresince tozlanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Işınlanmış erkek çiçeklere ait çiçek tozları ile dişi bitkilerin tozlanması

Ispanakta çiçek yapısı salkım şeklinde olduğu için ilk günden itibaren 3 gün süresince, büyüyen bitkilerin tepe kısımları koparılmıştır. Tozlamadan sonra kesenin üzerine çeşidin adı, uygulama dozu ve tarih yazılmış, yabancı polen girişini engellemek için dişi bitkilerin üzeri keselerle tekrar kapatılmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Kağıt keselerin salkım şeklindeki dişi bitkilerin üzerine kapatılması

İlerleyen günlerde kapatılan keseler açılıp, dişi bitkiler hasat edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Tozlamadan sonra meydana gelen tohumlardan görüntü

3.3.5. Embriyoların Çıkartılması ve Kültürü

3.3.5.1. Dezenfeksiyon

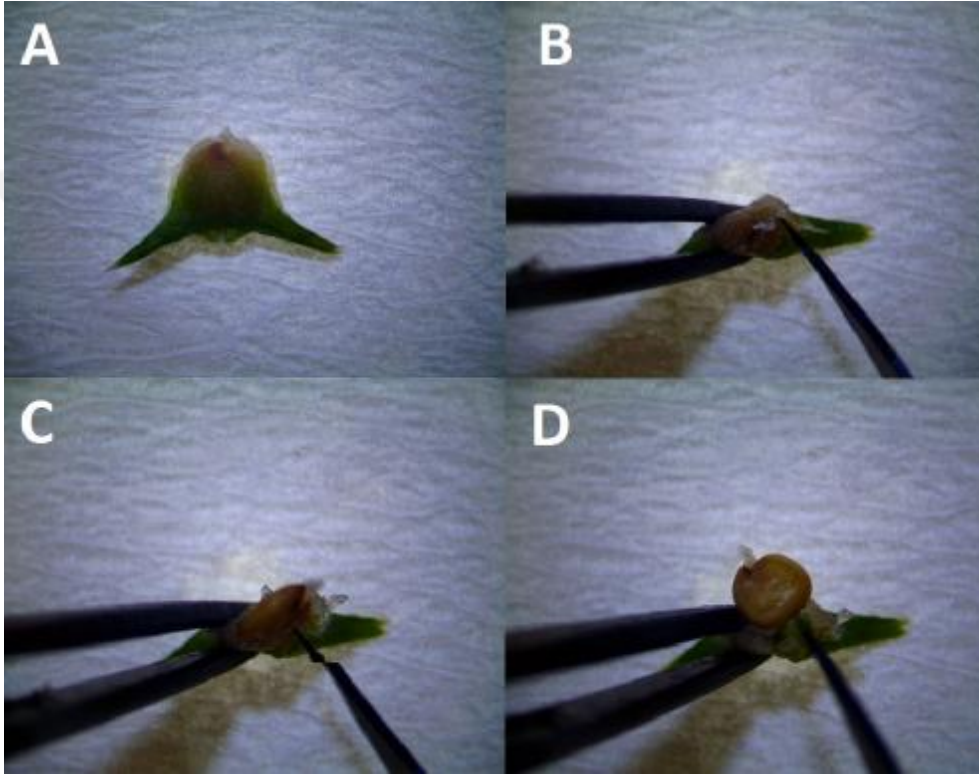
Tozlamadan 20 gün sonra hasat edilen dişi bitkiler doku kültürü laboratuvarına getirilmiştir. Hasat edilen salkım şeklindeki dişi bitkilere ait tohumlar, steril kabinde, %15 sodyum hipoklorit çözeltisinde 10 dakika bekletildikten sonra 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Tohumların sterilizasyonundan görüntüler

3.3.5.2. Tohum ve Embriyoların Çıkartılması

Sterilizasyon aşamasından sonra, steril kabinde stereo mikroskop altında tohumların içerisindeki embriyolar çıkarılmıştır. Çıkarılan embriyolar, içerisinde besin ortamı bulunduran cam kavanozlara aktarılmıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Koto F₁ çeşidinde tohumların içerisindeki embriyoların çıkartılması ile ilgili görüntüler

Işınlanmış polenle tozlama çalışmalarında besin ortamı olarak, 0.01 mg/l IAA, 30 g/l sakkaroz ve 8 g/l agar içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamının hazırlanması, sterilizasyonu ve inkübasyonu anter kültürü için besin ortamının hazırlanması bölümünde anlatıldığı şekilde olmuştur.

Çalışmanın ilk yılında farklı dozların olması ve materyalden kaynaklanan heterojenite nedeni ile 3 çeşit x 2 doz x 3 yinelemeli olarak tesadüf bloklarında

faktöriyel deneme desenine göre varyans analizi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler JUMP programı kullanılarak istatistiki olarak değerlendirilmiştir. 100 tohum başına embriyo ve bitki sayısına açılı transformasyonu uygulanmış ve istatistiksel olarak önemli bulunan ortalamalar LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmanın ikinci yılında, Koto F₁ çeşidi diğer çeşitlere göre daha erken çiçek açtığı için Koto F₁ çeşidinde 200, 300, 400 Gy ışın dozlarının kullanımıyla, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerinde ise 200, 300, 400 ve 500 Gy ışın dozları ile denemeler yürütülmüştür; 200, 300 ve 400 Gy ışın dozları dikkate alınarak, 3 çeşit x 3 doz x 3 yinelemeli olarak tesadüf bloklarında faktöriyel düzen deneme desenine göre varyans analizi uygulanmıştır.

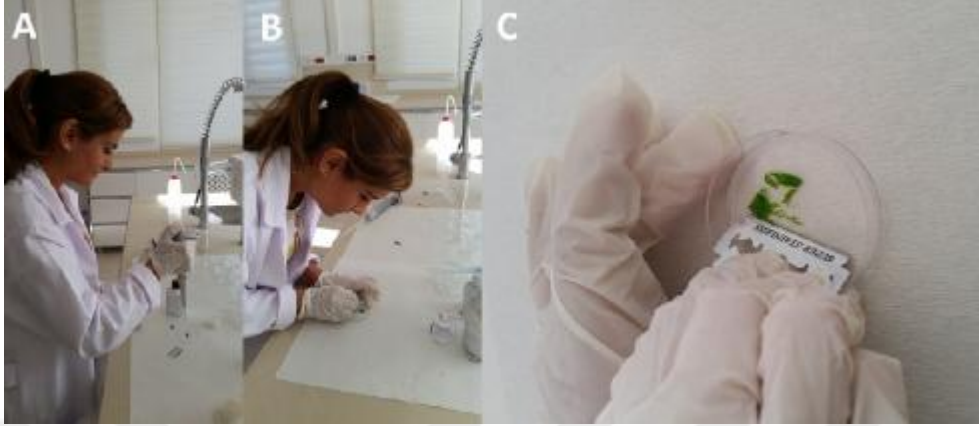
3.4. Ploidi Analizleri

Çalışmalar sonucunda elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerinin belirlenmesi amacıyla hem flow sitometri analizi (Partec, Münster, Germany) hem de moleküler analizler yapılmıştır.

3.4.1. Flow Sitometri Analizi

Flow sitometri analizleri ile birim zamanda okuma aleti içerisinde geçen DNA miktarları belirlenerek; optik okuyucudan geçen DNA miktarları ile bitkilerin ploidi düzeyleri ilişkilendirilerek karşılaştırmalar yapılmıştır. Bir bitkiye ait örnekte birim zamanda geçen daha yüksek DNA miktarı o bitkinin ploidi düzeyinin daha yüksek olduğunu işaret etmektedir.

Flow sitometri analizi için Keleş ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada belirtilen yöntem kullanılmıştır. İlk aşamada amaca uygun ploidi seviyesine ait şahit bitki seçilmiş ve flow sitometri cihazına yerleştirilerek okunmuştur. Daha sonraki okumalar bu örneğe göre değerlendirilmiştir. Öncelikle ıspanak bitkisine ait yapraklar bir jilet yardımıyla petri kabının içerisinde parçalanmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Ispanak yaprağının jilet ile petri kabının içerisinde parçalanması

Özütü çıkarılmış ıspanak örneği flow sitometri tüpüne aktarılmış ve tüp içerisine flow sitometri cihazının örnek görüntülemesi için gerekli olan DAPI (4'6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate) boyası süspansiyona eklenmiştir. Tüp cihazın okuma bölgesine yerleştirilerek ıspanak örneklerinin analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.16).



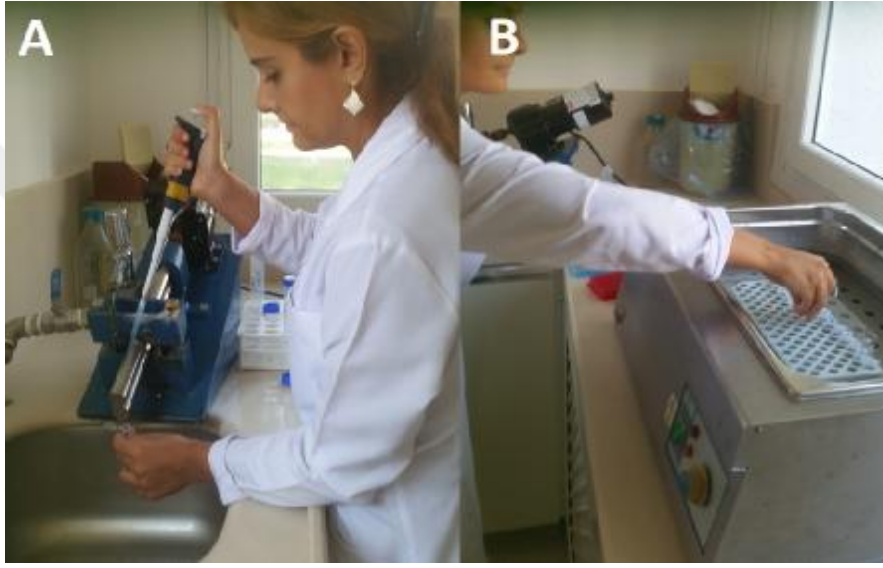
Şekil 3.16. Ispanak örneklerinin flow sitometri cihazında analizinin yapılması

3.4.2. Moleküler Genetik Analizi

3.4.2.1. Bitki Örneklerinden DNA İzolasyonu

Elde edilen ıspanak bitkilerinde polidi seviyesi için yapılan moleküler analizlerde, DNA izolasyonu bitkilerin genç yapraklarından yaklaşık 20 g yaprak dokusu kullanılmasıyla CTAB protokolüne (Doyle ve Doyle 1990) göre

gerçekleştirilmiştir. Laboratuara getirilen yaprak örnekleri Roller Press cihazında ezilerek 1200 µl ekstraksiyon buffer ile ependorf tüplere alınmıştır. Roller Press'ten Ekstraksiyon buffer yardımıyla geçirilen yaprak örneklerinin özütü, yaklaşık 40 dakika 65°C ye ayarlanmış su banyosunda inkübe edilmiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. İspanak yaprak örneklerinin Roller Press'ten geçirilmesi ve yaprak örneklerinin özütü yaklaşık 65°C'de 40 dakika boyunca su banyosunda bekletilmesi

40 dakika sonunda su banyosundan alınan örnekler, 10 dakika süresince soğumaya bırakılmış, soğuduktan sonra örneklerin üzerine 200 µl Cloroform-Octanol çözeltisi eklenmiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Örneklerin üzerine 200 µl Cloroform-Octanol çözeltisinin eklenmesi ile ilgili görüntü

Cloroform-Octanol çözeltisi eklendikten sonra örneklerin kapakları kapatılarak vorteks cihazı ile mekanik parçalama yapılmıştır. Sonrasında mikrosantrifüjde 14000 rpm’de 5 dakika santrifügasyon işlemi yapılmıştır. Santrifügasyon işlemi sona erdikten sonra, üst faz bir mikropipet yardımıyla çekilerek temiz bir tüpe aktarılmış, her örnek için pipet ucu değiştirilmiştir. Üst faza 550 µl izopropanol (2-Propanol) eklenerek, örnekler -20°C de en az 2 saat, tercihen bir gece süresince bekletilmiştir. Izopropanol’de bekletme süresi dolduktan sonra örnekler -20°C’den çıkarılarak, oda sıcaklığına gelmeleri için bekletilmiştir. Oda sıcaklığına gelen örneklerin 14000 rpm’de 5 dakika süresince santrifügasyonu gerçekleşmiştir. Bu işlemi takiben, 500 µl %76’lık EtOH (Etil alkol) + amonyum asetat çözeltisi eklenmiş, örneklerin 14000 rpm’de 5 dakika süresince santrifügasyonu gerçekleşmiştir. Üst faz tamamen uzaklaştırılarak örnekler 1 gün süresince kurumaya bırakılmış, kuruyan örnekler yaklaşık 200 µl steril dH₂O ile çözdürülmüştür. Çözülen DNA’ların spektrofotometre ile kalite ve miktar ölçümü yapılmıştır.

DNA miktarı, Gene Quant pro RNA/DNA spektrofotometre ile ölçülmüştür (Amersham Pharmacia Biotech). Bu amaçla, ölçümlerden önce DNA'nın çözdürüldüğü solüsyonla cihazın Blank okutması yapılmıştır. Her DNA örneğine ait sonuçlar kaydedilmiş ve her defasında cihazın yuvası bir peçete ile temizlenmiştir.

3.4.2.2. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) İşlemi

Çalışmada kontrol bitkiler ile spontan dihaploid bitkiler arasındaki homozigotiye belirlemek için basit dizi tekrarlı mikrosatellit markörler (SSR) kullanılmıştır. Literatürler ışığında ıspanak bitkisi için tanımlanan 10 SSR primer çifti (SO4, SO7, SO10, SO14, SO17, SO22, SO29, SO32, SO48, SO51) kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin baz dizilimleri

SO4	F: CTGCTCATTCTGGTTTGATTG
	R: TCGGGTGTGTTATGATAGGTTG
SO7	F: TGCTTGGGTTCTATTGGTC
	R: TTTTTTTTACAGAAGTGAATGCAA
SO10	F: TGAAATCAACAACGATTACGC
	R: AAGAACAAAGCAAGATAAGGTTCC
SO14	F: CATCTCTACATCCGCCATTTCCA
	R: GTGAAAAAACTCCGACGAAACACC
SO17	F: CCTGAGGTGCAGAACAATAACACG
	R: GAGGGGATTTACCTTAACCTTGC
SO22	F: AGTTATGTGTGTATGCTCATGG
	R: TTTTGTTTAAAATTACTGG
SO29	F: TAGGGTACTGTAGAGGAAGTCG
	R: TGGAATCTAACATTTGTATGC
SO32	F: GATTACTTATGTTAGCCTCAGC
	R: GACCAATAAGCGTTGAACC
SO48	F: AAGAGATCCAAATGCAAAGGAAG
	R: GCAACACTAAAAATACCCTAATCG
SO51	F: AGAGAAAAACCACCCAATCTCA
	R: AAGAGGTGAGAGACGAGTGGAG

55°C’de tüm primerlerin optimum bağlanma (annealing) sıcaklıkları sağlanmış ve PCR amplifikasyonu gerçekleşmiştir. Mikrosatelit analiz için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) karışımları, Khattak ve ark., (2006) tarafından tarif edildiği gibi 50 ng şablon DNA, her bir primer için 0.2 mM, her bir dNTP için 0.2 mM, 1 x reaksiyon tamponu (Thermo Fisher Scientific, MA) ve 10 ml hacimde 1U Taq Polimeraz (Thermo Fisher Scientific) içermektedir. Belirlenen miktarlarda,

steril bir ependorf tüp içinde hazırlanan karışım vortekslenmiş ve her bireye ait protokol numarasını içeren, 0.5 ml'lik steril ependorf tüplerine eşit miktarlarda (15.1 ml) konulmuştur. Her bir tüpe, ait olduğu bireyin DNA'sından 1 ml eklenmiştir. Tüplerin kapakları kapatılarak hava kabarcıklarının yukarı çıkması amacıyla santrifüjasyon yapılmıştır. PZR karışımları Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek PZR işlemleri başlatılmıştır.

PZR şartları aşağıdaki gibidir:

İlk ayrılma (denaturasyon).....	94°C 5 dk	} 35 döngü
Ayrılma (denaturasyon).....	94°C 1 dk	
Bağlanma (annealing).....	55°C 40 sn	
Uzama (extention).....	72°C 30 sn	
Son denaturasyon.....	72°C 7dk	

3.4.2.3. Elektroforez İşlemi

Amplifiye edilen PZR ürünlerindeki gen bölgelerinin uzunluğunu belirlemek için aşağıdaki prosedüre göre hazırlanan agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır.

8 g agaroz ve 500 ml 1X TBE solüsyonu bir beher içerisine konulup, mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra elektromanyetik karıştırıcıda yaklaşık 200 dev/dakika, 15-20 dakika biraz soğuyana kadar karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi devam ederken 25 ml, 10 mg/ml'lik EtBr eklenmiştir. Jel uygun ısıya düşünce, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine dikkatlice dökülmüştür. Bu işlem sırasında özellikle jelde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Jel tamamen katılaştıktan sonra, dikkatlice taraklardan ayrılıp elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

PZR ile amplifiye edilen örneklerin her birine 10'er ml Orange-G çözeltisi eklenip birkaç saniye mikrosantrifüjde 3500 rpm'de çevrilmiştir.

Bu işlemi takiben her bir örnek bir mikropipet ile elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırayla bırakılmıştır. Ayrıca tek bir kuyucuğa da 4 ml ladder eklenmiştir. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak elektroforez cihazı, güç kaynağından 140 volt akım geçecek şekilde ayarlandıktan sonra çalıştırılmış ve örnekler yaklaşık 60-90 dakika yürütülmüştür. İşlem sonunda jel, elektroforez cihazından alınıp Gel Electrophoresis Imaging System cihazına aktarılmıştır. Sonrasında jel görüntü sistemi ile bireyler arası mikrosatellit varyasyonlar değerlendirilmiştir (Kodak Gel Logic 200, Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Ispanakta ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere doku kültürü yöntemleri ile haploid bitki elde edilmesini amaçlayan bu çalışmada, doku kültürü yöntemlerinden anter kültürü ve ışınlanmış polenle tozlama yöntemi kullanılmış ve sonuçlar her iki yöntem için ayrı ayrı sunulmuştur.

4.1. Anter Kültürü Yöntemi Çalışması

Çalışmanın ilk yılında Koto F₁ çeşidinde 3 nolu ortamda kallus meydana gelmiş, oluşan kalluslardan bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 3 nolu besin ortamında Koto F₁ çeşidinden elde edilen kallus görünümü

Anter kültürüne cevap verme oranının belirlenmesinde, kültüre alınan anter sayısı, anter başına embriyo sayısı ve embriyolardan oluşan bitki sayısı dikkate alınmıştır. Denemelerin ilk yılında, Koto F₁ çeşidinde 3 nolu besin ortamı dışında, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde anterlerden embriyo veya kallus oluşumu meydana gelmemiştir.

Anter kültürü çalışmalarının ikinci yılında ise bazı umut var sonuçlar elde edilebilmiştir. Koto F₁ çeşidi diğer çeşitlere göre daha erken çiçeklenmeye geçtiği için anter kültürü çalışmaları Koto F₁ çeşidinde 30.03.2015 tarihinde, Greenstar F₁ çeşidinde 05.05.2015 tarihinde, Favorit F₁ çeşidinde ise 06.05.2015 tarihinde gerçekleşmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

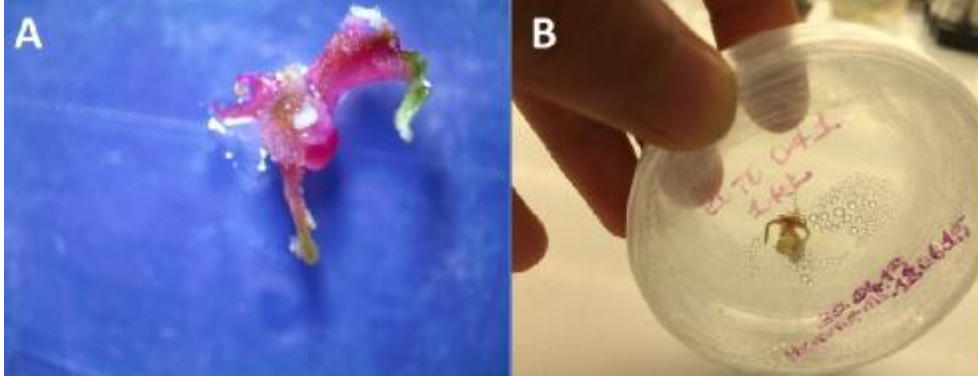
Çizelge 4.1. Denemenin ikinci yılında anter kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar

Tekerrür	Ekilen anter sayısı (adet)	Gelişen anter sayısı (adet)	Kallus oluşturan anter sayısı	Embriyo sayısı (adet)	Bitki sayısı (adet)
Koto F ₁ çeşidinde ikinci yıl 1 nolu besin ortamı					
Toplam	2761	2695	-	1	1
Koto F ₁ çeşidinde ikinci yıl 2 nolu besin ortamı					
Toplam	2453	2340	1	-	1
Koto F ₁ çeşidinde ikinci yıl 3 nolu besin ortamı					
Toplam	1632	1578	11	-	-
Koto F ₁ çeşidinde ikinci yıl 4 nolu besin ortamı					
Toplam	1957	1905	3	-	-
Favorit F ₁ çeşidinde ikinci yıl 1 nolu besin ortamı					
Toplam	759	708	-	-	-
Favorit F ₁ çeşidinde ikinci yıl 2 nolu besin ortamı					
Toplam	497	494	-	-	-
Favorit F ₁ çeşidinde ikinci yıl 3 nolu besin ortamı					
Toplam	1066	1053	7	-	-
Favorit F ₁ çeşidinde ikinci yıl 4 nolu besin ortamı					
Toplam	270	264	2	-	-

Çizelge 4.1. Devamı

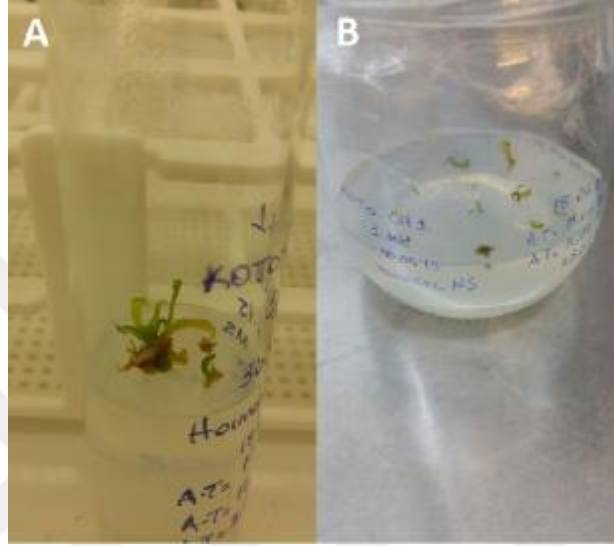
Greenstar F ₁ çeşidinde ikinci yıl 1 nolu besin ortamı					
Toplam	878	801	-	-	-
Greenstar F ₁ çeşidinde ikinci yıl 2 nolu besin ortamı					
Toplam	305	271	-	-	-
Greenstar F ₁ çeşidinde ikinci yıl 3 nolu besin ortamı					
Toplam	250	233	-	-	-
Greenstar F ₁ çeşidinde ikinci yıl 4 nolu besin ortamı					
Toplam	621	621	4	-	-

Koto F₁ çeşidinde 1 nolu ortamda 30.04.2015 tarihinde, ortama dikilen anterde 08.06.2015 tarihinde embriyo meydana gelmiş, 30.06.2015 tarihinde embriyodan bitkiye dönüşüm gerçekleşmiştir. Oluşan bitki bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamına aktarılmıştır (Şekil 4.2).



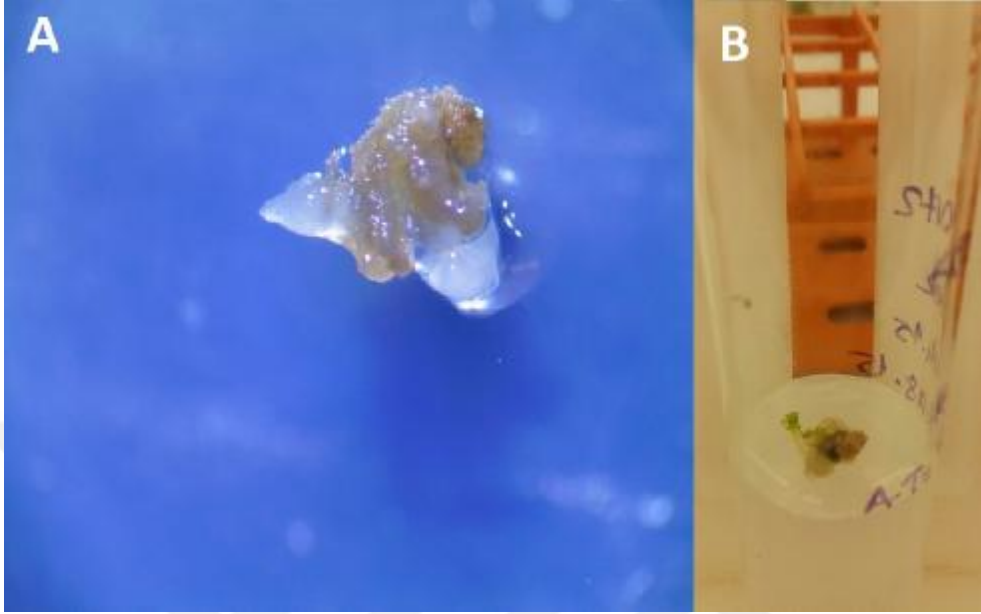
Şekil 4.2. A) Koto F₁ çeşidinde 1 nolu ortamda oluşmaya başlayan bitkinin görünümü B) Bitkinin besin ortamındaki görünümü

Bitki gelişimi takip edilmiş ve 11.07.2015 tarihinde gelişimine daha iyi devam edebilmesi amacıyla uzun cam tüpe ve devamında mikroçoğaltım yapılarak cam kavanozlara aktarılmıştır (Şekil 4.3).



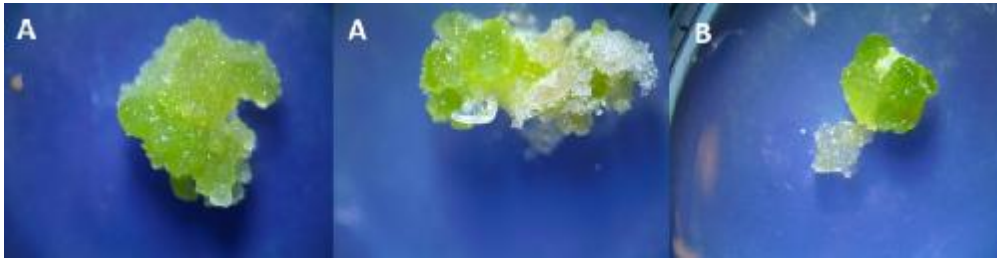
Şekil 4.3. A) Koto F₁ çeşidinde elde edilen bitkilerin tüpteki görünümü B) Gelişen bitkilerin mikroçoğaltım yapılarak cam kavanoza aktarılması

Koto F₁ çeşidinde 2 nolu ortamda 15.04.2016 tarihinde dikilen anterden 29.07.2015 tarihinde kallus oluşumu görülmüş ve oluşan kallustan 06.08.2015 tarihinde bitki meydana gelmiştir. Oluşan bitki, büyümeyi düzenleyici içermeyen MS ortamında cam tüpe aktarılmıştır. Bitkinin belli aralıklarla gelişimi gözlemlenmiş ve 27.08.2015 tarihinde bitkiler mikroçoğaltım yapılarak tüplere aktarılmıştır (Şekil 4.4).



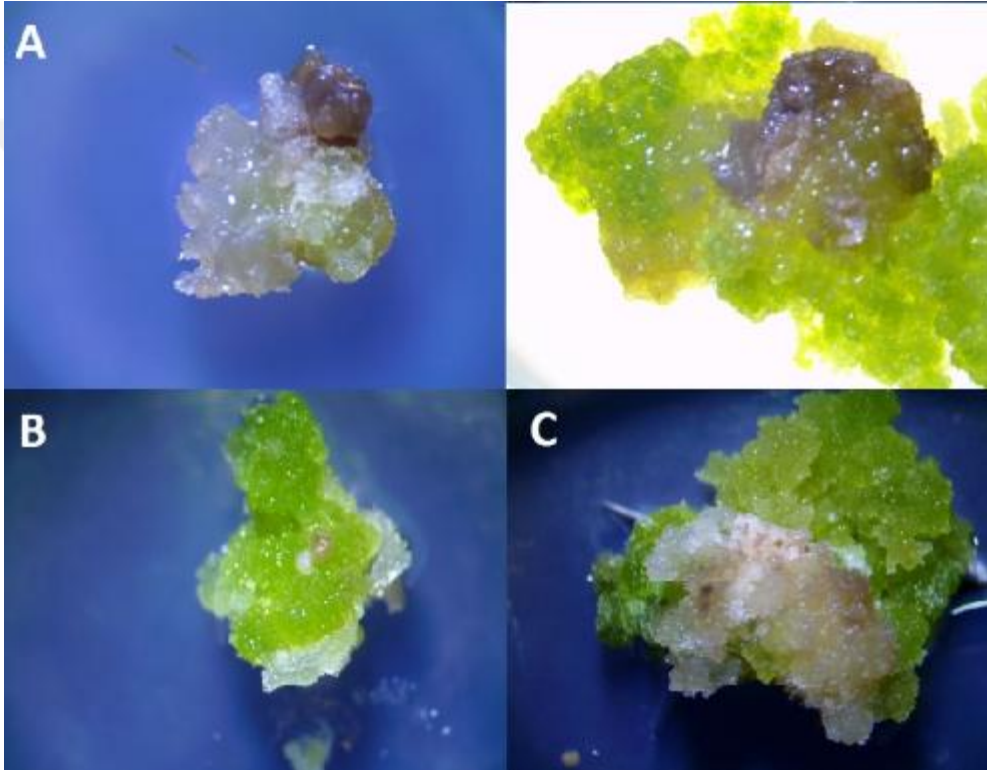
Şekil 4.4. A) Koto F₁ çeşidinde 2 nolu ortamdaki kallusun petrideki görünümü B) Kallustan oluşan bitkinin tüpdeki görünümü

Koto F₁ çeşidinde 1 ve 2 nolu ortam dışında, 3 nolu ortamda 14.04.2015 ve 30.04.2015 tarihlerinde dikilen 5 anterden kallus, 14.04.2015 ve 20.04.2015 tarihlerinde dikilen 3 anterden kallus, 20.04.2015 tarihinde dikilen anterden kallus ve 20.04.2015 tarihinde dikilen 2 anterden kallus oluşumu tespit edilmiştir. Oluşan kallusların açık ve koyu yeşil renkli ve tanecikli olduğu görülmüştür (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5. A-B) Koto F₁ çeşidinde 3 nolu ortamdan kallus gelişimi

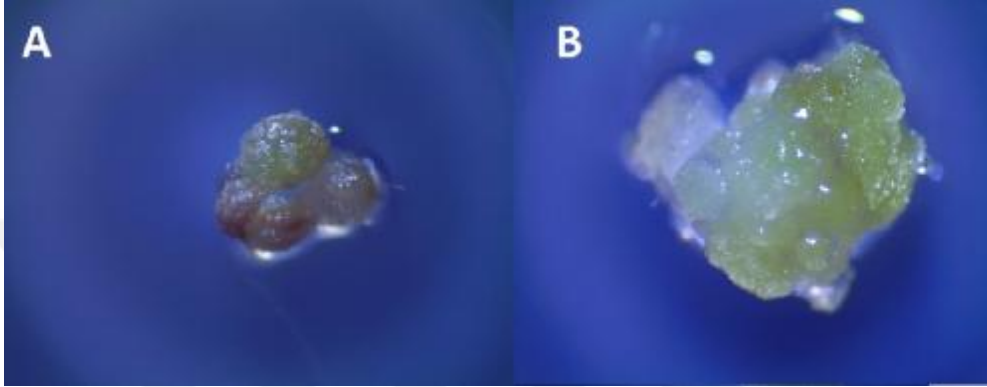
Koto F₁ çeşidinde, 4 nolu ortamda 30.04.2015 tarihinde dikilen anterde kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Dördüncü tekerrürde 22.04.2015 tarihinde kültüre alınan anterlerden sadece bir tanesinde kallus oluşumu gözlemlenmiştir. 20.04.2015 tarihinde kültüre alınan anterlerde kallus meydana gelmiştir. Oluşan kallusların beyaz-açık yeşil renkli ve parçalı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. A) Koto F₁ çeşidinde 3 nolu ortamda bulunan kallusun petrideki görünümü B-C) Koto F₁ çeşidinde 4 nolu ortamdaki kallus gelişiminin görünümü

Koto F₁ çeşidi dışında, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde de kallus oluşumu görülmüştür. Favorit F₁ çeşidinde 1 ve 2 nolu ortamlarda kültüre alınan anterlerden embriyo ya da kallus oluşumu görülmemiştir. 3 nolu ortamda 07.05.2015 ve 29.05.2015 tarihlerinde dikilen 2 anterden, 05.05.2015, 14.05.2015,

29.05.2015 tarihlerinde dikilen 4 anterden, 01.06.2015 tarihinde kültüre alınan bir anterden kallus oluşumu meydana gelmiştir. Oluşan kallusların açık yeşil-açık kahverengi renkli ve yumuşak olduğu görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. A-B) Favorit F₁ çeşidinde 3 nolu ortamda bulunan kallusun petrideki görünümü

Greenstar F₁ çeşidinde 1, 2 ve 3 nolu ortamlarda anterlerden embriyo ya da kallus oluşumu gözlemlenmemiştir. 4 nolu ortamda ise anterlerden embriyo ya da kallus oluşumu görülmemiştir, 28.05.2015 tarihinde kültüre alınan 3 adet anterden kallusların meydana geldiği tespit edilmiştir.

Donör bitkilerin yetiştirilme koşullarının androgenik yanıtı belirlemede önemli rol oynadığı bilinmektedir. Buyukalaca ve ark. (2004) tarafından biberde yapılan çalışmada, serada yetiştirilen donör bitkilerden alınan anterlerden tarla koşullarında yetiştirilenlere göre daha fazla embriyo elde edilmiştir. Sunulan bu çalışmada da, anter kültürü için donör bitkiler denemenin ilk yılı alçak tünelde, ikinci yıl ise serada yetiştirilmiştir. Birinci yıl anter kültüründen sonuç alınamaz iken, ikinci yıl bazı sonuçlar elde edilebilmiştir. Bu durum serada daha kontrollü koşullarda yapılan yetiştiriciliğin anter kültürüne cevabı olumlu yönde etkilendiğini açıkça göstermektedir.

Çalışmanın ilk yılında Koto F₁ çeşidinde 3 nolu ortamdan 3 anterden kallus elde edilmiş, diğer çeşitlerde kallus ya da embriyo gelişimi gözlemlenmiş, elde

edilen kallusların renginin beyaz, açık sarı ve açık yeşil olduğu tespit edilmiştir. Gelişen kalluslardan bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir. Denemenin ikinci yılında her üç çeşitte de kallus gelişimi ve embriyo oluşumu gerçekleşmiş, Koto F₁ çeşidinde diğer çeşitlere göre daha fazla kallus meydana gelmiş ve sadece Koto F₁ çeşidinde bitki gelişimi gözlemlenmiştir. Kallusların açık ve koyu yeşil renkli, tanecikli ve pürüzsüz oldukları tespit edilmiştir. Farklı kallus yapılarının ve renklerinin gözlemlenmesi, hangilerinden embriyo elde edilebileceğinin ve ıspanakta embriyogenik kallus yapısının bilinmesi, daha sonra bu konuda yapılacak çalışmalarda, araştırmacılar için kullanışlı ve önemli bir morfolojik gözlem olarak fayda sağlayacaktır.

Anter kültüründe başarının genotip (Morrison ve ark. 1986, Mityko ve ark. 1995; Bajaj 1990; Karakullukçu ve Abak 1992; Rodeva ve ark. 2004; Taşkın 2005, Taşkın ve ark. 2011), donör bitkilerin yetiştirme koşulları (Tiainen 1992; Yang ve ark. 1992; Kristiansen ve Andersen 1993; Matsubara ve ark. 1998; Büyükalaca ve ark. 2004; Mohamed ve Refaei 2004; Taşkın 2005; Ercan ve ark. 2006), besin ortamının bileşimi (Karakullukçu ve Abak 1993; Dias ve Martins 1999; Çömlekçioğlu ve ark. 1999; Ercan ve ark. 2001; Büyükalaca ve ark. 2004; Taşkın 2005; Koleva-Gudeva ve ark. 2007) ve donör bitki stres faktörlerine (Lu ve ark. 1990) bağlı olduğu bilinmektedir. Bu faktörler içerisinde besin ortamı ve genotip büyük önem arz etmektedir. Anter kültüründe başarının genotiplere göre değiştiği ve her genotipin tepki verdiği besin ortamlarının da farklılaşabileceği tespit edilmiştir (Gorecka ve ark. 2009). Sunulan bu çalışmada, sadece Koto F₁ çeşidinde embriyo meydana gelmiş ve embriyodan bitkiye dönüşüm gerçekleşmiştir. Ayrıca Koto F₁ çeşidinde Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerine göre daha fazla kallus meydana gelmiştir. Yani çalışmada genotip etkisi açıkça görülmüştür. Aynı dönemde kültüre alınan anterlerin farklı genotiplerde değişik tepkiler göstermesi ile ilgili sonuçlar; Karakullukçu ve Abak (1992); Mityko ve ark. (1995); Dias ve Martins (1999); Çömlekçioğlu ve ark. (1999); Çömlekçioğlu ve ark. (2001); Ercan ve ark. (2001); Sayılır ve Özzambak (2005); Çiner ve Tıprıdamaz (2002);

Büyükalaca ve ark. (2004); Koleva-Gudeva ve ark. (2007) ile Taşkın ve ark. (2011) gibi araştırmacılar tarafından da açıkça ortaya konulmuştur.

4.2. Işınlanmış Polenle Tozlama Yöntemi Çalışması

Ispanakta ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışma olmadığı için denemenin ilk yılı 100, 150, 200 Gy ışınlama dozları test edilmiştir. Birinci yıl denenen bu dozlarda endospermli tohum oluşumu gözlemlendiği için denemenin ikinci yılı bu dozlar yükseltilmiş ve 200, 300, 400 ve 500 Gy ışınlama dozları uygulanmıştır. 500 Gy ışınlama dozu ikinci yıl uygulanmaya başlandığı için ve Koto F₁ çeşidinde çiçek dönemi bittiği için 500 Gy ışınlama dozunda istatistik analiz yapılmamıştır.

Çalışmanın ilk deneme yılında, kullanılan çeşitlerden sadece Koto F₁ çeşidi tamamen dioik yapı göstermiştir. Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde dioik yapı yanında erselik çiçekler de görüldüğü için, ışınlanmış polenle tozlama yapılan bitkiler değerlendirmeye alınamamıştır. Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde 100 Gy ışınlama dozunda diğer dozlara göre erselik çiçek yapısı daha fazla görüldüğü için 100 Gy ışınlama dozu istatistik analizine eklenmemiştir. Bu nedenle hem embriyo oluşumu hem de bitkiye dönüşüm açısından 150 ve 200 Gy ışınlama dozları karşılaştırılabilmiştir.

Çeşitler arasında 100 tohum başına embriyo sayısı bakımından ortalamalar incelendiğinde, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitleri arasında farklılık bulunmamış, Koto F₁ çeşidinin diğer iki çeşitten farklı olduğu tespit edilmiştir. Favorit F₁ çeşidi diğer iki çeşide göre iki ışınlama sonrası en yüksek ortalama embriyo sayısına (41.79 embriyo), Koto F₁ çeşidi ise en düşük ortalama embriyo sayısına (24.718 embriyo) sahip olmuştur. 150 Gy ışınlama dozunda 100 tohum başına en yüksek embriyo sayısı Koto F₁ çeşidinden (36.75 embriyo), en düşük embriyo sayısı Favorit F₁ çeşidinden (29.58 embriyo) elde edilmiştir. 200 Gy ışınlama dozundan ise 100 tohum başına en yüksek embriyo sayısı Favorit F₁ çeşidinde (54 embriyo), en düşük embriyo sayısı ise Koto F₁ çeşidinde (12.68 embriyo) görülmüştür. Dozlar

arasındaki ortalama embriyo sayıları arasındaki farka baktığımızda ise 150 ve 200 Gy ışın dozları arasındaki herhangi bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Denemenin ilk yılında Koto F₁, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde 150 ve 200 Gy dozlarında 100 tohum başına embriyo sayıları

Çeşit	Uygulamalar (Dozlar)		Ortalama
	150 Gy	200 Gy	
Koto F ₁	36,75 ab	12,68 c	24,718 b
Favorit F ₁	29,58 bc	54,00 a	41,79 a
Greenstar F ₁	32,31 b	45 ab	38,66 a
Ortalama	32,88	37,23	35,06

Çeşitler arasında 100 tohum başına bitki sayısı açısından ortalamalara bakıldığında Koto F₁ ve Favorit F₁ çeşitleri arasında farklılık görülmemiş, Greenstar F₁ çeşidinin Koto F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir. 150 ve 200 Gy ışınlama sonrası en yüksek ortalama bitki sayısı Greenstar F₁ çeşidinde, en düşük ortalama bitki sayısı ise Koto F₁ çeşidinde kaydedilmiştir. Farklı doz uygulamaları sonucunda 100 tohum başına bitki sayıları incelendiğinde, 150 Gy ışın dozunda en yüksek bitki sayısı Koto F₁ çeşidinde (21.41 bitki), en düşük bitki sayısı ise Favorit F₁ çeşidinde (9.32 bitki) belirlenmiştir. 200 Gy ışın dozunda ise en yüksek bitki sayısı Greenstar F₁ çeşidinde (35.24 bitki), en düşük bitki sayısı Koto F₁ çeşidinde (6.34 bitki) görülmüştür. 150 ve 200 Gy dozlar arasındaki farka baktığımızda ortalamalar arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Denemenin ilk yılında Koto F₁, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde 150 ve 200 Gy dozlarda 100 tohum başına bitki sayıları

Çeşit	Uygulamalar (Dozlar)		Ortalama
	150 Gy	200 Gy	
Koto F ₁	21,41 b	6,34 c	13,88 b
Favorit F ₁	9,32 c	14,58 bc	11,95 b
Greenstar F ₁	15,60 bc	35,24 a	25,42 a
Ortalama	15,44	18,72	17,08

Yapılan istatistiki analizler ile birlikte ilk yıl sonuçları değerlendirildiğinde, 150 ve 200 Gy ışın dozları uygulamalarında Koto F₁ çeşidinde, hem embriyo oluşumu (100 tohum başına embriyo sayısı) hem de bitkiye dönüşüm (100 tohum başına bitki sayısı) açısından, 150 Gy ışın dozundan hem en yüksek embriyo sayısının (36.75) hemde en yüksek bitki sayısının (21.41) elde edildiği tespit edilmiştir. Favorit F₁ çeşidinde embriyo oluşumu açısından (54 embriyo) 200 Gy ışın dozu daha iyi sonuç vermiş, bitkiye dönüşüm açısından ise 200 Gy ışın dozunda 14.58 embriyo elde edilmiştir. Greenstar F₁ çeşidinde ise embriyo oluşumu açısından 200 Gy ışın dozunda Favorit F₁ çeşidinden sonra en yüksek embriyo sayısı (45 embriyo) alınmış, bitkiye dönüşüm açısından ise 200 Gy ışın dozunda en yüksek embriyo (35.24) ile başarılı sonuçlar kaydedilmiştir (Çizelge 4.2 ve 4.3).

Çeşitler arasında 100 adet tohum başına elde edilen ortalama embriyo sayısı incelendiğinde, Koto F₁, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitleri arasında farklılık görülmemiştir. Dozlar arasında ise 200 Gy ışın dozunda 100 tohum başına en yüksek embriyo sayısı bakımından istatistiki fark görülmemiştir. Benzer olarak 300 Gy ışın dozunda 100 tohum başına en yüksek embriyo sayısı bakımından çeşitler arasında fark bulunmuştur. 400 Gy ışın dozuna bakıldığında ise 100 tohum başına en yüksek embriyo sayısı Favorit F₁ çeşidinde (39.66 embriyo) kaydedilmiş, bunu Koto F₁ (25.1.5) ve Greenstar F₁ çeşidi (19.18 embriyo) takip etmiştir. Tüm çeşitler

birlikte değerlendirilerek 200, 300 ve 400 Gy ışın dozlarından elde edilen ortalamalar incelendiğinde, her üç dozdan alınan sonuçlar istatistiki açıdan farklı olmuştur.

Çalışmanın ikinci yılında incelenen özellikler istatistik analiz sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde; 200, 300 ve 400 Gy ışın dozları uygulamalarında Koto F₁ çeşidinde, hem embriyo oluşumu (25.15 embriyo) hem de bitkiye dönüşüm açısından (17.18 bitki) 400 Gy ışın dozunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Favorit F₁ çeşidinde en yüksek embriyo sayısı ile (39.66 embriyo) 400 Gy ışın dozu daha iyi sonuç vermiş, bitkiye dönüşüm açısından ise bu çeşitte 400 Gy ışın dozunda 15.57 embriyo sayısı ile Koto F₁ çeşidinden sonra ikinci sırada yer almıştır. Greenstar F₁ çeşidinde embriyo oluşumu açısından 300 Gy ışın dozunda en yüksek embriyo sayısı (23.69 embriyo) elde edilmiştir. Bitkiye dönüşüm açısından ise 200, 300 ve 400 Gy ışın dozları karşılaştırıldığında, 400 Gy ışın dozunda diğer dozlara göre daha yüksek bitki sayısı (12.09) alınmıştır (Çizelge 4.4 ve 4.5).

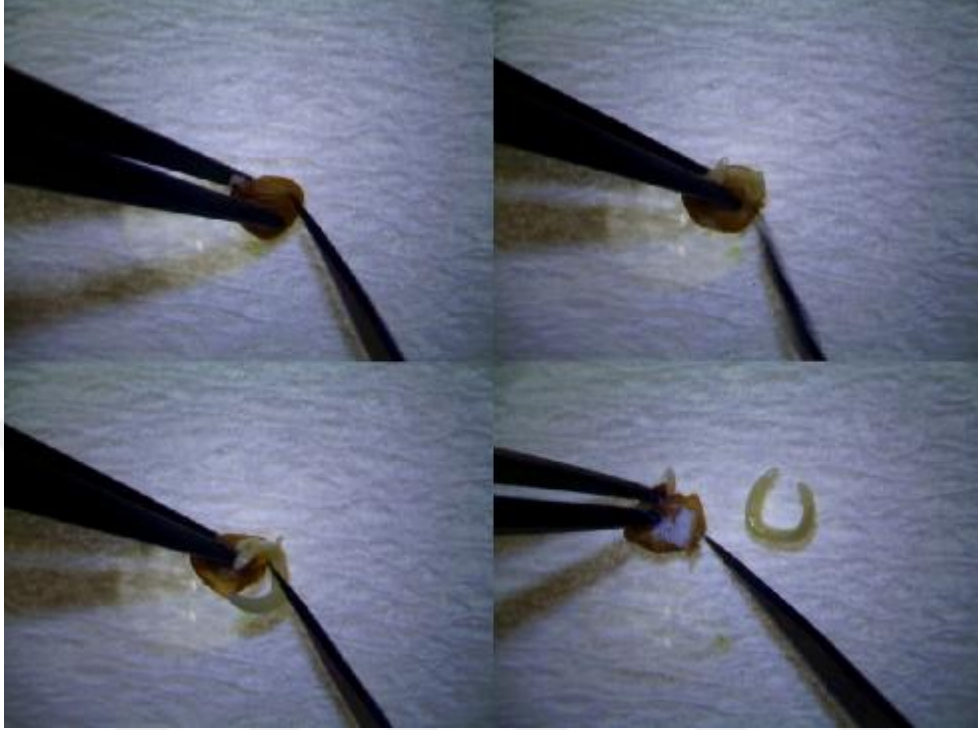
Çizelge 4.4. Denemenin ikinci yılında Koto F₁, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde 200, 300 ve 400 Gy dozlarda 100 tohum başına embriyo sayıları

Çeşit	Uygulamalar (Dozlar)			Ortalama
	200 Gy	300 Gy	400 Gy	
Koto F ₁	18,69 b	24,35 b	25,15 b	22,73
Favorit F ₁	17,95 b	23,87 b	39,66 a	27,16
Greenstar F ₁	20,40 b	23,69 b	19,18 b	21,09
Ortalama	19,01 b	23,97 ab	27,99 a	23,66

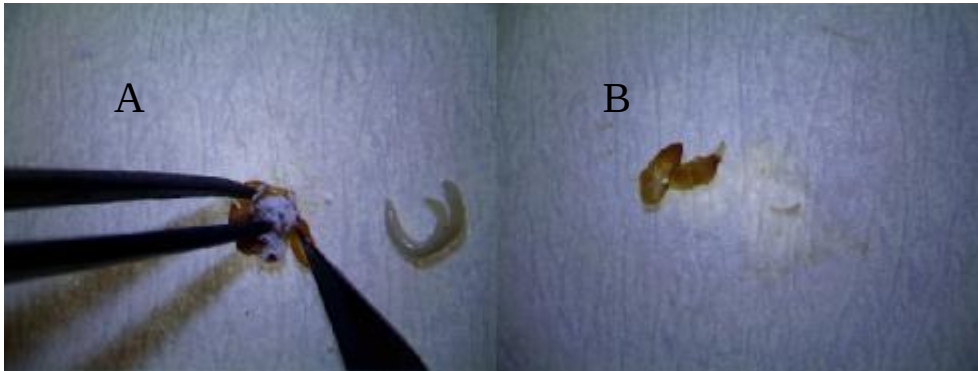
Çizelge 4.5. Denemenin ikinci yılında Koto F₁, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde 200, 300 ve 400 Gy dozlarda 100 tohum başına bitki sayıları

Çeşit	Uygulamalar (Dozlar)			Ortalama
	200 Gy	300 Gy	400 Gy	
Koto F ₁	9,75	16,13	17,18	14,35
Favorit F ₁	9,18	13,48	15,57	12,74
Greenstar F ₁	11,87	10,85	12,09	11,61
Ortalama	10,27	13,49	14,95	12,9

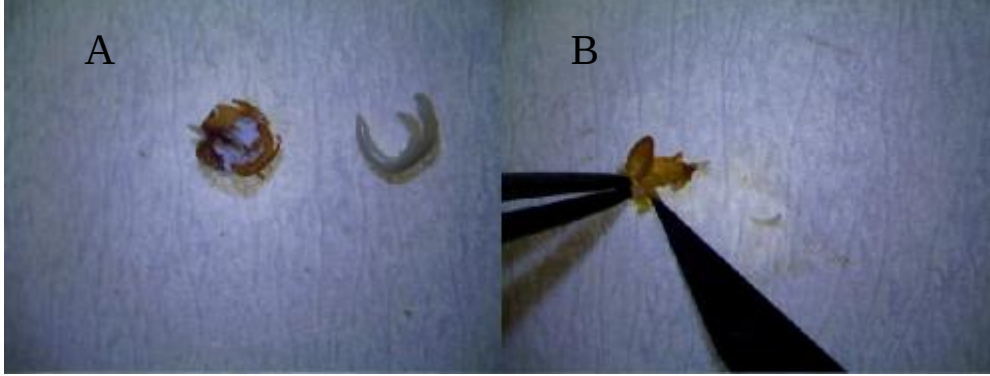
Çalışmanın hem ilk hem de ikinci yılında ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile Koto F₁, Favorit F₁ ve Greenstar F₁ çeşitlerinde farklı dozlarda ve farklı tohum yapılarından bitkiler elde edilmiştir. Bu farklı tohum yapıları içi katı, içi hafif katı, içi sıvı, içi boşa yakın ve içi boş olarak gruplandırılmıştır. Farklı tohum yapılarının görüntüleri Şekil 4.8-4.11’de sunulmuştur.



Şekil 4.8. Koto F₁ çeşidinde içi sıvı yapıya sahip tohum görünümü



Şekil 4.9. A) Koto F₁ çeşidinde içi katı yapıya sahip tohum görünümü B) Koto F₁ çeşidinde içi boşa yakın yapıya sahip tohum görünümü



Şekil 4.10. A) Koto F₁ çeşidinde içi katı tohum görünümü B) Koto F₁ çeşidinde içi boşa çok yakın tohum görünümü



Şekil 4.11. Koto F₁ çeşidinde 150 Gy ışı́n dozunda içi katı tohum yapısından meydana gelen bitkiciklerin görüntüsü

Denemelerden içi katı, içi hafif katı, içi sıvı, içi boşa yakın ve içi boş gibi farklı yapılar da tohumlar elde edilmiş, ancak her üç çeşitde de yüksek dozlarda (300, 400 ve 500 Gy) içi boş ve içi boşa yakın yapıların daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle içi boş ve içi boşa yakın tohum yapılarına sahip bitkiler, diğer tohum yapılarına göre daha yavaş gelişim göstermiştir.

Ispanak ile aynı familyadan olan şeker pancarında ovul kültürü ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bossoutrot ve Hosemans (1985) tarafından şeker pancarında ovul kültürü uygulanmış, kültüre alınan 100 ovulden 2 adet haploid bitki elde edilmiştir. *In vitro* kültürde fiziksel uygulamaların (düşük veya yüksek sıcaklık gibi) embriyo oluşumuna önemli bir etki yaptığı gözlemlenmiştir. *Beta vulgaris* L. çiçek tomurcuklarına 4°C'de 4-5 gün süresince yapılan soğuk uygulamasının kültüre alınan ovullerden embriyo verimini arttırdığı saptanmıştır (Lux ve ark.

1990; Gürel ve ark.2000).

Gürel ve ark. (2000) şeker pancarında ovul kültürü yöntemi ile haploid bitki üretiminde soğuk ön uygulaması, $AgNO_3$ ve aktif kömürün etkisini araştırmışlardır. Soğuk ön uygulaması ve aktif kömürün embriyo oranını arttırdığı görülmüş, fakat $AgNO_3$ uygulamasının embriyo oranını azalttığı gözlemlenmiştir.

Işınlanmış polen ile tozlama yöntemi ilk defa 1987 yılında denenmiş, kavunda ve hıyarda bu yöntem ile haploid bitkiler elde edilmiştir (Sauton ve Dumas De Vaulx 1987; Sauton 1988, 1989; Niemirowicz-Szczytt ve Dumas De Vaulx 1989). Daha sonra bu yöntem kavunda (Cuny 1992; Maestro-Tejada, 1992; Sari ve ark. 1992; Abak ve ark. 1996; Brun 1990; Cuny ve ark. 1992; Dore ve ark. 1995; Abak ve ark. 1996; Yanmaz ve Taner 1996; Sari ve ark. 1999; Bal ve ark. 2003; Yetisir ve Sari 2003; Taner ve ark. 2003; Lotfi ve ark. 2003; Yongbing ve ark. 2007; Lim ve Earle 2008; Lotfi ve Salahi 2008; Kasapoglu 2009; Gursoy 2009; Baktemur 2009; Arı ve ark. 2010; Godbole ve Murthy 2012; Baktemur ve ark. 2013), hıyarda (Truong-Andre 1988; Çağlar ve Abak 1999; Faris ve ark. 1999; Claveria ve ark. 2005; Lotfi ve Salehi 2008), karpuzda (Sari ve ark. 1994; Gürsöz ve ark. 1991; Sari ve ark. 1999; Taşkın ve ark. 2013) kabakda (Kurtar ve ark. 2002; Kurtar 2009; Berber 2009; Ebrahimzadeh ve ark. 2013; Kosmrlj ve ark. 2013; Baktemur ve ark. 2014) uygulanmıştır.

Bu nedenle ıspanakta doku kültürü yöntemlerinin kullanımı ile haploid bitki üretiminin hedeflendiği bu çalışmada, anter kültürü yönteminden sonra ıspanak polenle tozlama denenmiştir. Polen ışınlamasının haploid oluşumunda etkili olduğu, embriyo veriminin genotip, çevresel koşullar, ışın dozu (Ficcadenti ve ark. 1995), polen büyüklüğü, şekli ve polen duvarının kalınlığı (Giles ve Prakash 1987) gibi faktörlerden önemli ölçüde etkilendiği bilinmektedir. Bu nedenle de sunulan bu araştırmanın ilk deneme yılında 100, 150 ve 200 Gy olmak üzere 3 adet farklı doz, 3 adet genotip (Koto F_1 , Greenstar F_1 ve Favorit F_1) üzerinde denenmiş; ikinci yılda ise 200, 300, 400 ve 500 Gy olmak üzere 4 farklı doz, yine aynı 3 adet genotip (Koto F_1 , Greenstar F_1 ve Favorit F_1) üzerinde test edilmiştir. Her iki yılda

da, kullanılan tüm genotiplerde embriyo elde edilip bitkiye dönüşüm gerçekleşmiştir. Işınlanmış polen ile tozlama yönteminde, birinci yıl denemelerinde 0.1 mg/l 1AA içeren besin ortamının dışında, bitkilerde yaşanan sararma ve köklerin iyi gelişmemesi problemleri nedeni ile BAP ve FeEDHA içeren iki ayrı besin ortamı daha test edilmiş, BAP içeren ortam bitkilerin kök gelişimi için, FeEDHA içeren ortam ise bitkilerin yapraklarının sararmasını engellemek için kullanılmıştır. İkinci deneme yılında ise elde edilen bitkilerin kök kısımları iyi geliştiği ve bitkilerin yapraklarında sararma gözlemlenmediği için BAP ve FeEDHA içeren besin ortamları kullanılmamıştır.

Denemeler süresince ışınlanmamış (kontrol) polenlerle tozlama sonucu oluşan ve yaklaşık 2-3 hafta sonra hasat edilen bitkilerdeki tohumlarının içlerinin beklenildiği üzere dolu ve tohum kabuğunun sert olduğu gözlemlenirken, ışınlanmış polenlerle tozlama sonucu oluşan tohumların tohum kabuklarının daha yumuşak olduğu ve içi katı, içi hafif katı, içi sıvı, içi boşa yakın ve içi boş gibi farklı tohum yapılarının oluşumunun gerçekleştiği görülmüştür. Bu tohum yapılarının nusellus yapıdan gelmiş olabileceği söylenebilir. 100, 150 ve 200 Gray ışın dozlarında içi boş ve içi boşa yakın yapılara göre içi katı, içi hafif katı ve içi sıvı yapılar daha fazla görülürken, 300, 400 ve 500 Gray ışın dozlarında içi boş ve içi boşa yakın yapılara ait tohum sayılarında artış gözlemlenmiştir. Işın dozu arttıkça içi boş ve içi boşa yakın tohum yapıları daha fazla görülmüştür. İçi katı, içi hafif katı yapılardaki tohum kabuklarının çok daha sert olduğu, özellikle içi sıvı, içi boş ve içi boşa yakın yapıların tohum kabuklarının çok yumuşak olduğu ve içi boş ve içi boşa yakın yapılarda tohumların içerisinden embriyoların çok fazla uğraşmadan kendiliğinden çıktığı belirlenmiştir. Bazı içi boş ve içi boşa yakın yapılarda nokta şeklinde embriyolar görülmüş ve bu embriyolardan oluşan bitkilerin gelişiminin çok yavaş olduğu tespit edilmiştir. Yine içi katı ve içi hafif katı olan tohum yapılarında içi sıvı yapılara göre daha fazla sayıda embriyoya, içi boş ve içi boşa yakın tohum yapılarında ise çok az sayıda embriyoya rastlanmıştır. İçi katı ve içi hafif katı olan tohum yapılarından elde edilen bitkilerin, içi sıvı

yapılardan elde edilenlere göre, bitki boylarının daha uzun, yaprak genişliğinin daha fazla olduğu, ancak yaprak sayılarının daha az olduğu görülmüştür. İçi boş ve içi boşa yakın yapılardan elde edilen bitkilerin ise bitki boylarının daha kısa, yaprakların genişliğinin daha az, yaprakların sayısının çok az ve bitki gelişiminin yavaş olduğu tespit edilmiştir. İki deneme yılından elde edilen sonuç farklılıkları, her iki yılda farklı ışın dozlarının denenmesi ile ilişkilendirilebilir. İlk deneme yılında seçilen ışın dozlarının yetersiz kalması sonucu, ikinci deneme yılında daha yüksek dozlar kullanılmış ve bu nedenle de daha farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sunulan çalışma, ıspanakta doku kültürü yöntemleri ile haploid bitki elde edilmesini amaçlayan ilk çalışma olduğu için anter kültüründe besin ortamlarının seçilmesinde ve ışınlanmış polenle tozlama yönteminde ışın dozlarının belirlenmesinde herhangi bir referans çalışmadan yardım alınamamıştır. Bu nedenle denemenin ilk yılında elde edilen veriler ışığında ikinci yıl çalışmaları planlanmıştır.

4.3. Elde Edilen Bitkilerde Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi

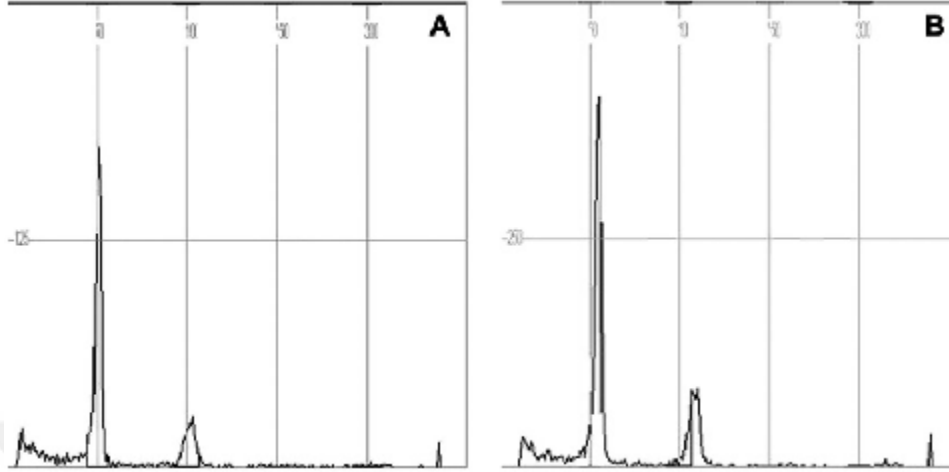
Denemeler süresince elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerinin belirlenmesi hem flow sitometri hem de moleküler metodların kullanımı ile yapılmıştır.

4.3.1. Flow Sitometri ile Ploidi Belirlenmesi

Bitkilerin ploidi seviyelerinin belirlenmesi için Koto F_1 , Favorit F_1 ve Greenstar F_1 çeşitlerinden yaprak örnekleri alınarak, flow sitometride analiz yapılmıştır. Yapılan flow sitometri analizlerinde elde edilen bitkilerin haploid olmadığı görülmüştür (Şekil 4.12). Bu durum elde edilen bitkilerde, biber ve lahanada gibi sebzelerde sıkça rastlanan bir durum olan spontan kromozom katlanmasını düşündürmüştür. Anter kültürü yoluyla elde edilen bitkiler haploid kromozom sayısına sahip olabileceği gibi, bazılarının kültür koşullarında kendiliğinden (spontan) katlandığı ve spontan dihaploid bireylerin de elde edildiği bilinmektedir (Çömlekçioğlu 2001). Ockendon (1986) brüksel lahanasında androgenesis yöntemi

ile elde edilen bitkilerin spontan dihaploid oranlarının %39 ile %63 arasında değiştiğini; Mentewab ve Sarrafi (1997) beş buğday (*Triticum aestivum* L.) genotipinde anter kültürü yöntemi ile elde edilen bitkilerde spontan kromozom katlama oranının PI-49 ve Chenab genotipinde %0, Yecora Rojo genotipinde ise %56 olduğunu; Stober ve Hessu (1997) yazlık buğday çeşitlerinde anter kültürü yöntemi ile elde edilen bitkilerin spontan katlanma oranının %44.3 olduğunu; Gürel (1998) şeker pancarında (*Beta vulgaris* L.) yumurtalık kültürü ile elde edilen bitkilerin diploid olduğunu; Gyulai ve ark. (1999) biberde anter kültürü ile oluşan 152 bitkinin 53'ünün, yani %34.9'unun spontan dihaploid olduğunu; Svirshchevskaya ve Dolezel (2000) şeker pancarında (*Beta vulgaris* L.) ovül kültürü ile elde edilen bitkilerin spontan dihaploid olduğunu; Gemesne Juhasz ve ark. (2001) biberde anter kültürü yöntemi ile elde edilen bitkilerin %68.5'inin haploid ve %29.8'inin spontan dihaploid olduğunu; Barnabas (2003) ekmeklik buğdayda androgenesis ile elde edilen bitkilerin spontan katlama oranının %25 ile %68 arasında değiştiğini; Gu ve ark. (2003) *Brassica rapa* (syn. *Brassica campestris*) ssp. *chinensis*'de mikrospor kültürü ile elde edilen bitkilerin %70'inden fazlasının spontan dihaploid olduğunu; Lotfi ve ark. (2003) kavunda (*Cucumis melo* L.) ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile elde edilen bitkilerde spontan katlanma gözlemlendiğini; Mohammadi ve ark. (2007) mısırdaki (*Zea mays* L.) anter kültürü yöntemi ile elde edilen bitkilerde spontan kromozom katlama oranının %7 olduğunu; Kowalska ve ark. (2008) havuçta anter kültürü yöntemi ile elde edilen bitkilerin %90'dan fazlasının spontan katlandığını; Spika ve ark. (2008) buğdayda (*Triticum aestivum* L.) anter kültürü yöntemi ile elde edilen 582 bitkinin %47.9'unun (279 bitki) spontan dihaploid olduğunu; Kahrizi ve Mohammadi (2009) beş arpa (*Hordeum vulgare* L.) genotipinde mikrospor kültürü yöntemi ile elde edilen bitkilerden spontan kromozom katlanmasının %76 oranında gözlemlendiğini; Mirzaei ve ark. (2011) androgenesis yöntemi ile elde edilen bitkilerde spontan kromozom katlamasının W86 genotipinde %19, W23 genotipinde ise %16 olduğunu; Mirzaei ve ark. (2011) arpada (*Hordeum vulgare*

L.) androgenesis yöntemi ile elde edilen bitkilerde kromozom katlamasının denenen iki genotipte sırasıyla %63 ve %72 olduğunu; Vanous (2011) mısırdaki (*Zea mays* L.) androgenesis ile elde edilen bitkilerin spontan kromozom katlama oranının %2.8 ile %46 arasında değiştiğini; Lee ve ark. (2014) Çin lahanasında (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.)) mikrospor kültürü ile elde edilen bitkilerin %60'ından fazlasının spontan dihaploid olduğunu; Luitel ve Kang (2013) tarafından biberde yapılan bir anter kültürü çalışmasında ploidi düzeyinin %44.5, %42.4 ve %33.3 oranlarında haploid; %55.5, %57.6 ve %66.7 oranlarında ise spontan dihaploid olduğunu; Yuan ve ark. (2015) lahana (*Brassica oleracea* var. *capitata*) ve brokkolide (*Brassica oleracea* var. *italica*) mikrospor kültürü ile elde edilen bitkilerde spontan kromozom katlamasının 14 lahana popülasyonunda %0 ile %76.9, 15 brokoli popülasyonunda ise %52.2 ile %100 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Keleş ve ark. (2015) farklı biber tiplerinde anter kültürü yöntemi ile elde edilen bitkilerde spontan dihaploid oranlarını karşılaştırmışlar ve farklı biber tiplerinden farklı spontan dihaploid bitkiler elde etmişlerdir. En yüksek spontan haploid oranı dolmalık biberden (%53.4) elde edilirken, bunu charleston (%31.9) ve kapyra (%30.4) tipleri takip etmiştir. Arı ve ark. (2016) tarafından ise süs biberinde (*Capsicum annuum* L.) yapılan anter kültürü çalışmasında spontan diploidizasyon oranı %51.6 olarak belirlenmiştir.

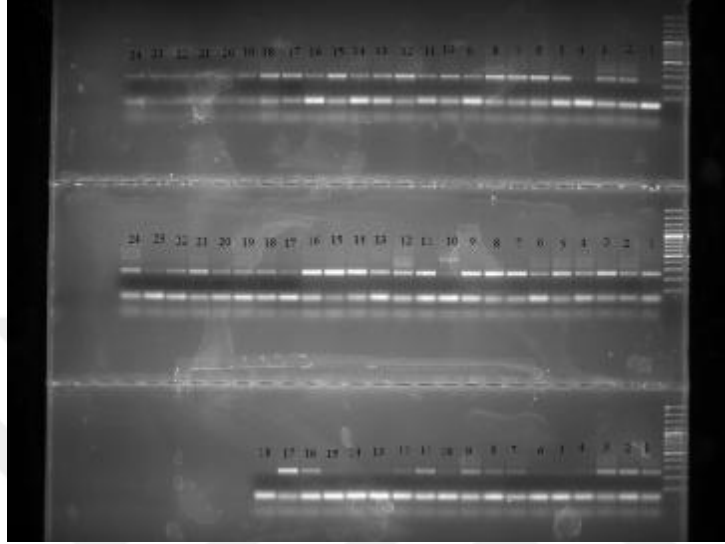


Şekil 4.12. A) Koto F₁ çeşidinde donör bitkinin flow sitometri sonuçları B) Koto F₁ çeşidinde ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile elde edilen bitkinin flow sitometri sonuçları

4.3.2. Moleküler Yöntemler ile Ploidi Belirlenmesi

Flow Sitometri analizlerinden sonra elde edilen bitkiler moleküler analizlerin kullanımı ile incelenerek, kromozom katlanmasının spontan olarak mı gerçekleştiği, ya da bitkilerin en başından beri zaten diploid mi oldukları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla; SO1, SO3, SO4, SO5, SO6, SO7, SO9, SO10, SO13, SO14, SO15, SO16, SO17, SO19, SO22, SO28 ve SO29, SO32, SO48, SO51 primerleri ile Basit Dizi Tekrarı (SSR) analizi yapılmıştır. Moleküler analizler sonucunda, Koto F₁ çeşidinde SO29 primerinde donör bitkilerde heterozigot bant, diğer primerlerde monomorfik bant görülmüştür. SO29 primerinde donör bitkilerde heterozigot bant görüldüğü için, Koto F₁ çeşidine ait 66 örnek (1, 4, 5, 9, 10, 11, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 31, 32, 33, 35, 41, 44, 46, 47, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 ve 66 numaralı örnekler) SO29 primeri kullanılarak SSR ile taranmıştır. SO29 primerinde Koto F₁ çeşidinde ebeveynler heterozigot bant verirken, ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile elde edilen örneklerin 33 adedinde tek bant görülmüştür. Tek bant elde edilmesi test edilen bitkilerin homozigot yapıya sahip olduğunu göstermiş ve bitkilerin kendiliğinden

katlanmış olabileceğini düşündürmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. SO29 primeri kullanılarak SSR analizi yapılan 66 adet örneğin elektroforez sonuçları

135 nolu Koto F₁ bitkisinde 400 Gy ışın dozunda 9 nolu örnekte, 220 nolu Koto F₁ bitkisinde 400 Gy ışın dozunda 11 nolu örnekte, 333 nolu Koto F₁ bitkisinde 300 Gy ışın dozunda 22 nolu örnekte, 83 Koto F₁ bitkisinde 300 Gy ışın dozunda 35 nolu örnekte, 330 nolu Koto F₁ bitkisinde 300 Gy ışın dozunda 41 nolu örnekte, 78 nolu Koto F₁ bitkisinde 200 Gy ışın dozunda 53 nolu örnekte, 91 nolu Koto F₁ bitkisinde 400 Gy ışın dozunda 58 nolu örnekte, 222 nolu Koto F₁ bitkisinde 300 Gy ışın dozunda 62 ve 63 nolu örnekte, 132 nolu Koto F₁ bitkisinde 300 Gy ışın dozunda 64 nolu örnekte Şekil 4.27'deki elektroforez görüntüsüne göre tek bant görülmüş, bu örneklerimizin homozigot yapıya sahip olabileceği anlaşılmıştır.

9 nolu örnekte içi boşa yakın tohum yapısı, 11 nolu örnekte içi boş tohum yapısı, 22 nolu örnekte içi boşa yakın tohum yapısı, 35 nolu örnekte içi boşa yakın tohum yapısı, 41 nolu örnekte içi boşa yakın tohum yapısı, 53 nolu örnekte içi boşa yakın tohum yapısı, 58 nolu örnekte içi boş tohum yapısı, 62 nolu örnekte içi boşa

yakın tohum yapısı, 63 nolu örnekte içi boşa yakın tohum yapısı, 64 nolu örnekte içi boşa yakın tohum yapısı görülmüştür. Yüksek dozlarda (300 ve 400 Gy ışı́n dozlarında) içi boş ve içi boşa yakın tohum yapıları meydana gelmiş (Çizelge 4.6) ve bu tohum yapılarının tek bant gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. SO29 primeri kullanılarak SSR ile analizlenen 66 örneğe ait bilgiler

No	Bitki no	Işın dozu (Gy)	Gözlem tarihi	Tohum yapısı
1	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
2	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
3	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
4	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
5	191 Koto F ₁	400	29.07.2015	İçi sıvı
6	191 Koto F ₁	400	29.07.2015	İçi katı
7	135 Koto F ₁	400	30.07.2015	İçi sıvı
8	135 Koto F ₁	400	30.07.2015	İçi katı
9	135 Koto F ₁	400	21.07.2015	İçi boşa yakın
10	220 Koto F ₁	400	23.06.2015	İçi hafif katı
11	220 Koto F ₁	400	27.05.2015	İçi boş
12	151 Koto F ₁	400	08.06.2015	İçi katı
13	85 Koto F ₁	400	03.08.2015	İçi katı
14	221 Koto F ₁	200	16.06.2015	İçi katı
15	145 Koto F ₁	400	27.07.2015	İçi katı
16	145 Koto F ₁	400	03.08.2015	İçi boşa yakın
17	38 Koto F ₁	300	21.07.2015	İçi boşa yakın
18	38 Koto F ₁	300	01.06.2015	İçi katı
19	149 Koto F ₁	400	09.06.2015	İçi katı
20	333 Koto F ₁	300	09.06.2015	İçi katı
21	333 Koto F ₁	300	03.08.2015	İçi sıvı
22	333 Koto F ₁	300	09.06.2015	İçi boşa yakın
23	267 Koto F ₁	200	13.07.2015	İçi katı
24	316 Koto F ₁	400	28.07.2015	İçi katı
25	221 Koto F ₁	200	03.08.2015	İçi katı
26	173 Koto F ₁	300	17.08.2015	İçi katı
27	235 Koto F ₁	300	10.07.2015	İçi boşa yakın
28	162 Koto F ₁	200	18.06.2015	İçi katı
29	265 Koto F ₁	200	30.07.2015	İçi boşa yakın
30	74 Koto F ₁	300	17.08.2015	İçi katı
31	117 Koto F ₁	300	08.06.2015	İçi boş

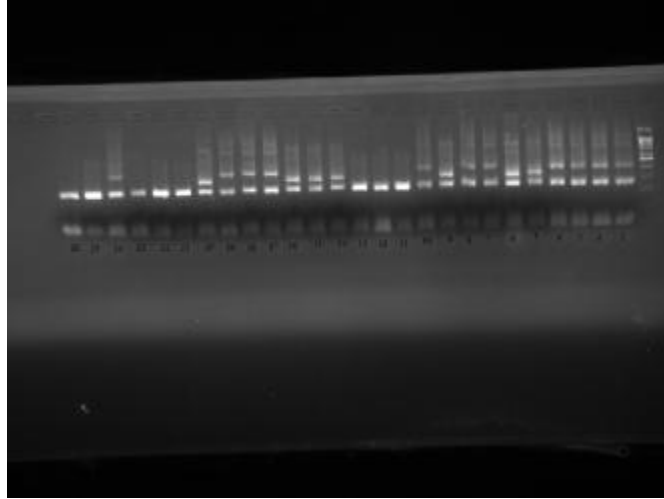
Çizelge 4.6. Devamı

32	117 Koto F ₁	300	08.06.2015	İçi hafif katı
33	235 Koto F ₁	300	31.07.2015	İçi sıvı
34	6 Koto F ₁	200	21.07.2015	İçi hafif katı
35	83 Koto F ₁	300	28.07.2015	İçi boşa yakın
36	83 Koto F ₁	300	27.07.2015	İçi katı
37	166 Koto F ₁	200	05.06.2015	İçi katı
38	177 Koto F ₁	400	15.06.2015	İçi katı
39	144 Koto F ₁	200	03.06.2015	İçi katı
40	330 Koto F ₁	300	09.06.2015	İçi katı
41	330 Koto F ₁	300	09.06.2015	İçi boşa yakın
42	330 Koto F ₁	300	09.06.2015	İçi sıvı
43	76 Koto F ₁	300	22.07.2015	İçi katı
44	165 Koto F ₁	300	29.06.2015	İçi hafif katı
45	224 Koto F ₁	400	18.06.2015	İçi katı
46	316 Koto F ₁	300	14.06.2015	İçi katı
47	144 Koto F ₁	200	31.07.2015	İçi sıvı
48	80 Koto F ₁	400	27.05.2015	İçi hafif katı
49	80 Koto F ₁	400	29.07.2015	İçi sıvı
50	317 Koto F ₁	400	28.07.2015	İçi katı
51	149 Koto F ₁	400	09.06.2015	İçi katı
52	195 Koto F ₁	300	11.06.2015	İçi katı
53	78 Koto F ₁	200	12.06.2015	İçi boşa yakın
54	78 Koto F ₁	200	12.06.2015	İçi katı
55	82 Koto F ₁	300	18.06.2015	İçi katı
56	79 Koto F ₁	400	27.07.2015	İçi katı
57	295 Koto F ₁	300	11.06.2015	İçi katı
58	91 Koto F ₁	400	03.07.2015	İçi boş
59	176 Koto F ₁	300	20.06.2015	İçi hafif katı
60	155 Koto F ₁	300	16.06.2015	İçi katı
61	159 Koto F ₁	400	03.08.2015	İçi katı
62	222 Koto F ₁	300	12.06.2015	İçi boşa yakın
63	222 Koto F ₁	300	27.07.2015	İçi boşa yakın
64	132 Koto F ₁	300	28.07.2015	İçi boşa yakın
65	319 Koto F ₁	300	27.07.2015	İçi katı
66	76 Koto F ₁	300	10.06.2015	İçi katı

Hem ısınlanmış polenle hem de anter kültürü ile elde edilen bitkilerden Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerinde SO29 primeri ile SSR yapılmıştır. SO29 primerinde 11, 12, 13, 21, 22, 23 ve Greenstar F₁ çeşidine ait donör bitkiden alınan

25 nolu örnek ve Favorit F₁ çeşidine ait donör bitkiden alınan 26 nolu örnek tek bant göstermiştir (Şekil 4.14).

Koto F₁ çeşidinde 1 nolu ortamda anterden meydana gelen bitkiden alınan 11 nolu örnekde tek bant görülmesi ile bitkinin homozigot yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Koto F₁ çeşidinde 2 nolu ortamda kallustan meydana gelen bitkiden alınan 23 nolu örnekde de tek bant görülmüştür. Işınlanmış polenle tozlama yöntemi ile elde edilen 507 nolu Greenstar F₁ bitkisinde 500 Gy ışıın dozunda 12 ve 22 nolu örnekde, 314 nolu Favorit F₁ bitkisinde 500 Gy ışıın dozunda 13 nolu örnekde, 394 nolu Favorit F₁ bitkisinde 400 Gy ışıın dozunda 21 nolu örnekde tek bant görülmüştür (Şekil 4.14). Tek bant görülmesi bu örneklerin kendiliğinden katlanmış olabileceğini göstermiştir. Hem ışıınlanmış polenle tozlama yönteminde her üç çeşitde de 400 ve 500 Gy gibi yüksek dozlarda bile hem de anter kültürü yönteminden elde edilen bitkilerden alınan örneklerde tek bant görülmesi uyguladığımız her iki yöntemin de başarılı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.14. SO29 primerinin kullanımı ile elde edilen Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerine ait 26 örneğin elektroforez sonuçları

12 nolu örnekte Greenstar F₁ bitkisinde içi boşa yakın tohum yapısı, 13 nolu örnekte Favorit F₁ bitkisinde içi boşa yakın tohum yapısı, 21 nolu örnekte Favorit F₁ bitkisinde içi boşa yakın tohum yapısı meydana gelmiştir. Yüksek dozlarda (400 ve 500 Gy) içi boş ve içi boşa yakın tohum yapıları meydana gelmiştir (Çizelge 4.7). Bu tohum yapılarının tek bant gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. SO29 primeri kullanılarak SSR ile analizlenen Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerine ait 26 örneğe ait bilgiler

No	Bitki no	Işın dozu (Gy)	Gözlem tarihi	Embriyo yapısı
1	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
2	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
3	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
4	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
5	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
6	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
7	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
8	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
9	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
10	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
11	Koto F ₁ ortam 1	-	18.06.2015	-
12	507 Greenstar F ₁	500	19.06.2015	İçi boşa yakın
13	314 Favorit F ₁	500	10.06.2015	İçi boşa yakın
14	295 Koto F ₁	300	11.06.2015	İçi hafif katı
15	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
16	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
17	78 Koto F ₁	200	12.06.2015	İçi boşa yakın
18	135 Koto F ₁	400	02.06.2015	İçi hafif katı
19	85 Koto F ₁	400	18.06.2015	İçi hafif katı
20	117 Koto F ₁	300	08.06.2015	İçi boş
21	394 Favorit F ₁	400	10.06.2015	İçi boşa yakın
22	507 Greenstar F ₁	500	19.06.2015	İçi boşa yakın
23	Koto F ₁ ortam 2	-	29.07.2015	-
24	Koto F ₁ donör bitki	-	-	-
25	Greenstar F ₁ donör bitki	-	-	-
26	Favorit F ₁ donör bitki	-	-	-

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemizde özellikle son yıllarda sebze tohumculuğu ve çeşit geliştirme konusunda çalışmalar oldukça hızlanmıştır. Özellikle “Türkiye F₁ Hibrit Sebze Çeşit ve Nitelikli Hat Geliştirme Projesi” kapsamında üniversite-araştırma enstitüleri-özel firma işbirlikleriyle, son yıllarda sıcak iklim sebzelerinde çeşit geliştirme konusunda büyük atılımlar yapılmıştır. Aynı işbirliğinin serin iklim sebzeleri içinde devam ettirilmesi için yeni projeler oluşturulmaktadır. Serin iklim sebzelerinin ıslahı sıcak iklim sebzelerine göre daha zor olmakta, daha fazla zaman gerektirmekte ve bu nedenle de daha az çalışmalar yürütülmektedir. Serin iklim sebzeleri arasında yer alan ıspanak; monoik, dioik ve hermafrodit gibi farklı çiçek yapılarına sahiptir ve bu durum bu türde yapılacak ıslah çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Sayılan tüm bu nedenlerle birçok özel firma, ıspanak ıslah alanında çalışma yapmaktan kaçınmaktadır. Bilimsel çalışmalar incelendiğinde ıspanak ıslahı konusunda çok fazla çalışmaya rastlanmamaktadır. Yine günümüze kadar yapılmış olan çalışmaları incelediğimizde, ıslah süresini önemli oranda kısaltması nedeni ile yoğun kullanım alanı bulan doku kültürü tekniklerinden haploid bitki elde etme yöntemleri konusunda da ıspanakta herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Sonuçları sunulan bu Doktora çalışması ile ıspanakta ileride yapılacak olan ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere haploid bitki elde edilmesi tekniklerinin kullanılabilir hale getirilmesi amaçlanmıştır. Haploid bitki elde etme yöntemlerinden yaygın şekilde kullanım alanı bulan anter kültürü ve ışınlanmış polenle tozlama yöntemleri denenmiş ve bu yöntemler denenirken her yöntem için kendi içinde bazı faktörlerin etkisi test edilmiştir. Anter kültürü için genotip ve besin ortamının etkisi araştırılırken, ışınlanmış polenle tozlama yöntemi için genotip ve ışın dozunun etkisi test edilmiştir. Çalışma süresince ulaşılan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Anter kültürü için farklı NAA, GA₃ ve BAP dozları içeren 4 farklı ortam denenmiştir. Denemenin ilk yılında embriyo meydana gelmemiş, sadece kallus elde edilmiş ve oluşan kalluslardan bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir. Denemenin ikinci yılında ise birinci yıla göre daha başarılı sonuçlar elde edilmiş, denemenin yapıldığı her 3 çeşitte, yani Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerinde hem embriyo oluşumu hem de kallus gelişimi meydana gelmiştir. Ayrıca Koto F₁ çeşidinin 1 ve 2 nolu ortamlarında hem direk hem de indirek yollardan bitki elde edilmiştir. Farklı besin ortamı kombinasyonlarının ve genotiplerin anter kültürü yöntemini olumlu yönde etkilediği saptanmıştır.
2. Koto F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerinde 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren 3 nolu ortamda ve Greenstar F₁ çeşidinde 4 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren 4 nolu ortamda en yüksek kallus sayısı elde edilmiştir. Özellikle koyu yeşil renkli ve tanecikli kalluslarda bitkiye dönüşümün daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Kalluslar kültüre alındıktan 2-3 hafta sonra bitki oluşturmaya başlamıştır.
3. Bitkinin yetiştirilme koşullarının anter kültürü üzerinde etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından (Tiainen 1992; Yang ve ark. 1992; Kristiansen ve Andersen 1993; Matsubara ve ark. 1998; Büyükalaca ve ark. 2004; Mohamed ve Refaei 2004; Taşkın 2005; Ercan ve ark. 2006) rapor edilmiştir. Bu çalışmada da anter kültürü için yetiştirilen donör bitkiler ilk yıl alçak tünelde, ikinci yıl ise serada yetiştirilmiş ve ikinci yılda birinci yıla göre daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.
4. Işınlanmış polenle tozlama yönteminde ilk yıl 100, 150 ve 200 Gy ışın dozları denenmiş ve üç dozda da meyve tutumu gerçekleşmiştir. Ancak elde edilen embriyoların diploid olması nedeni ile ikinci yıl dozlar yükseltilmiş ve 200, 300, 400 ve 500 Gy ışın dozları test edilmiştir. Çalışmada kullanılan çeşitler farklı zamanlarda çiçeklenmeye geçmişler ve erkencilik sırası Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ şeklinde olmuştur.

5. Işınlanmış polenle tozlama yönteminde, tüm genotiplerde ve ışın dozlarında embriyo oluşumu ve bitkiye dönüşüm meydana gelmiş, deneme süresince 3414 embriyo ve 1710 bitki elde edilmiştir. Denemenin ilk yılında elde edilen bitkilerin yavaş gelişmesi ve sararması nedeniyle kök gelişimi için BAP içeren, yaprakların sararmasını engellemek için ise FeEDHA içeren besin ortamı kullanılmıştır. Denemenin ikinci yılında ise elde edilen bitkilerin kök kısımları iyi geliştiği ve bitkilerin yapraklarında sararma gözlemlenmediği için bu uygulama yapılmamıştır.
6. Işınlanmış polen ile tozlama yöntemi ile elde edilen tohumlarda endosperm olmayan (içi boş), içi katı, içi hafif katı, içi sıvı, içi boşa yakın gibi değişik oluşumlar gözlemlenmiştir. Koto F₁ çeşidinde 300 ve 400 Gy ışın dozu uygulamalarında, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerinde ise 300, 400 ve 500 Gy ışın dozu uygulamalarında içi boş ve içi boşa yakın yapıların daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İçi boş ve içi boşa yakın tohum yapılarından bitki gelişimi daha uzun sürmüş, ancak embriyo yapıları haploid gibi görünmesine rağmen, bu bitkilerin flow sitometri analizinde diploid oldukları görülmüştür. Biber ve lahanada olduğu gibi kendiliğinden kromozom katlamasının olduğu saptanmıştır.
7. Çalışmanın birinci ve ikinci yılında; Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerinde ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile elde edilen tohum ve embriyo sayıları aynı dozda bile farklı sonuçlar vermiştir. Örneğin; denemenin ilk yılında, 100 Gy ışın dozu ile ışınlanmış Koto F₁ çeşidinde, 4 nolu bitkiden 1098 adet tohum, 55 adet embriyo ve 17 adet bitki elde edilmişken; 10 nolu bitkiden 310 adet tohum, 132 adet embriyo ve 55 adet ise bitki elde edilmiştir. Aynı çeşit ve ışın dozları olmasına rağmen tohum sayıları, embriyo sayıları ve bitki sayıları farklılık göstermiştir. Bu durumun çiçeklenme esnasında bitkilerin farklı zamanda sapa kalkmalarından, ayrıca çiçeklenme ve tozlama zamanındaki hava koşullarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Örneğin; havanın

yağışlı olduğu durumlarda, bitkilerde yeteri kadar çiçek açmamakta ve aynı çeşit ve aynı dozda ışınlama gerçekleşmesine rağmen, aynı sayıda tohum elde edilememektedir.

8. Hava koşulları (havanın yağmurlu ya da güneşli olması) ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile elde edilen tohum ve embriyo sayılarını da etkilemiştir. Yağmurlu havalarda daha az sayıda tohum ve embriyonun, sıcak havalarda ise daha fazla sayıda tohum ve embriyonun meydana geldiği tespit edilmiştir. Denemenin ikinci yılında Koto F₁ çeşidinde, 300 Gy ışınlı dozunda 74 nolu bitkide 424 adet tohumdan 9 adet embriyo gözlemlenirken, 76 nolu bitkiden 35 adet tohum ve 8 adet embriyo meydana gelmiştir. 74 nolu bitkide tohum sayısı 76 nolu bitkiye göre daha fazla olmasına rağmen, hemen hemen aynı sayıda embriyo elde edilmiştir.
9. Her iki deneme yılında da ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile elde edilen tohumlarda içi katı, içi hafif katı, içi sıvı, içi boşa yakın ve içi boş tohum tipleri gözlemlenmiştir. Embriyo kurtarma aşamasında, içi katı ve içi hafif katı yapıların içerisinde embriyoların zor çıkarıldığı, içi sıvı yapılardan içi katı yapılara göre daha kolay, içi boş ve içi boşa yakın yapıların içerisinde ise embriyoların çok kolay çıkarıldığı saptanmıştır.
10. İçi katı, içi hafif katı ve içi sıvı tip tohumların daha büyük, içi boş ve içi boşa yakın tip tohumların ise daha küçük, daha şeffaf olduğu gözlemlenmiştir. Daha küçük embriyoların daha yavaş çimlendiği görülmüş ve çimlenen embriyolardan bitkiye dönüşümün daha yavaş olduğu sonucuna varılmıştır.
11. Elde edilen bitkilerin ploidi ölçümlerinde öncelikle flow sitometri cihazından yararlanılmış ve sonuçlar elde edilen bitkilerin diploid olduğu yönünde kaydedilmiştir. Bu nedenle flow sitometri yöntemi ile yetinilmemiş, PCR tekniğine dayalı moleküler markırlardan biri olan SSR yöntemi ile ve 20 adet primer kullanımı ile moleküler analizler gerçekleştirilmiştir. Bu denenen 20 adet primer içerisinde SO29

primerinde, donör bitkilerin heterozigot olduğu ve çift bant gösterdiği, embriyodan elde edilen bitkilerin ise homozigot olduğu ve tek bant gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, bitkilerin spontan olarak, yani kendiliğinden katlanmış olabileceği sonucuna varılmıştır.

12. Işınlanmış polenle tozlama yönteminin ilk deneme yılında, embriyo oluşumu açısından Favorit F₁ çeşidinde 200 Gy, bitkiye dönüşüm açısından Greenstar F₁ çeşidinde 200 Gy ışın dozu en iyi sonucu vermiş, ikinci yıl ise embriyo oluşumu açısından Favorit F₁ çeşidinde 400 Gy, bitkiye dönüşüm açısından Koto F₁ çeşidinde 400 Gy ışın dozu başarılı olmuştur. Her iki deneme yılında da çeşitler arasında Favorit F₁ çeşidinden en yüksek sonuçlar alınmıştır.
13. Denemede kullanılan Koto F₁, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitleri farklı çiçek yapıları göstermiştir. Koto F₁ çeşidi dioik yapı gösterirken, Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerinde hermafrodit çiçek yapısı da tespit edilmiş ve bu durum tozlama zamanında zorluklara neden olmuştur. Ispanak bitkisi salkım şeklinde çiçek açmaktadır. Greenstar F₁ ve Favorit F₁ çeşitlerinde ilk aşamada erkek çiçekler açmış, ancak daha sonraki günlerde salkım üzerinde hermafrodit çiçek yapısı görülmüştür. İlerleyen aşamalarda ışınlanmış polenle tozlama yapılamamıştır.

Çalışma ile elde edilen sonuçlar ıspanakta anter kültüründe embriyo oluşum oranı üzerinde besin ortamı bileşiminin ve genotipin önemli derecede etkili olduğu, embriyo oluşumunun yeterli olmadığı, embriyodan bitkiye dönüşüm oranının artırılması için yeni araştırmalar yapılması gerektiği, başarı oranı çok yüksek olmamakla birlikte yine de 4 farklı ortam ile fazla sayıda anter dikilmesi halinde spontan dihaploid bitki elde edilebileceği, anter kültürü yöntemi ile elde edilen haploid embriyo oluşum oranı çok düşük olduğu için daha sonra yapılacak çalışmalarda haploid bitkilerin geniş çapta üretimi için uyguladığımız anter kültürü yönteminin daha fazla geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Işınlanmış

polenle tozlama yöntemi ile elde edilen sonuçlar, bu yöntemde ile elde edilen bitkilerin spontan dihaploid olduğu, ışınlanmış polen ile tozlama yöntemi ile ilgili bu çalışmanın ıspanakta haploidizasyon protokolünün geliştirilmesi ve daha sonra yapılacak çalışmalarda farklı genotiplerde farklı ışın dozlarının denenmesi gerektiği şeklinde özetlenebilir.

Sunulan bu çalışma ıspanakta doku kültürü yöntemlerinin kullanımı ile haploid bitki elde edilmesini amaçlayan ilk çalışma olmuştur. Elde edilen sonuçlar umutvar olmuş ve bir temel oluşturmuştur. Bu sonuçların daha sonra yapılacak çalışmalarda temel olarak kullanılması durumunda, ıspanakta etkili bir haploidizasyon protokolü oluşturulabilecek ve bu durum ıspanak ıslah ve tohumculuk çalışmalarının hızlanmasını sağlayacaktır. Çalışma ile elde edilen sonuçlar sadece bilimsel olmamış, aynı zamanda pratiğe aktarılabilir ve ekonomik getiri sağlayacak nitelik taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Aalders, Le., 1958. Monoploidy in cucumbers. Journal of Heredity, Am Genetic Assoc.
- Abak, K., Sarı, N., Paksoy, M., Yılmaz, H., Aktaş, H., Tunalı, C., 1996. Genotype response to haploid embryo induction with pollination by irradiated pollens in melon, obtaining of dihaploid lines, determination of haploid plants by different techniques. Tr J Agric Forest 20(5): 425–430.
- Abdollahi, M.R., Najafi, S., Sarikhani, H., Moosavi, S.S., 2016. Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. Turk J Biol 40: 571-579 TÜBİTAK.
- Achar., P.N., 2000. A study of factors affecting embryo yields from anther culture of cabbage. Department of Microbiology, University of Durban Westville, P. O. Box 1419, Westville 3630, Durban 4000, South Africa.
- Achar, P.N., 2002. A study of factors affecting embryo yields from anther culture of cabbage. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Volume 69, Issue 2, pp 183–188.
- Alremi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S., Ellialtıoğlu, Ş., 2014. Biber (*Capsicum annuum* L.)’de Genotip ve Besin Ortamının Anter Kültürüne Etkileri. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 1(2): 108–116.
- Andersen, S.B., Christiansen, I., Farestveit, B., 1990. Carrot (*Daucus carota* L.): in vitro production of haploids and field trials. Haploids in Crop Improvement I Volume 12 of the series Biotechnology in Agriculture and Forestry pp 393-402.
- Anagnostakis, S.L., 1974. Haploid plants from anthers of tobacco-Enhancement with charcoal. Planta, Volume 115, Issue 3, pp 281-283.

- Arı, E., Büyükalaca, S., 2010. Determination of suitable flower bud morphology for androgenesis studies in *Anemone coronaria* var. *Coccinea*. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 23 (2) : 71 – 78.
- Arı, E., İkten, H., Göçmen, M., Coşkun, R., Eren, A., 2010. Comparative Evaluation Of Different Embryo Rescue Techniques On Parthenogenetic Melon (*Cucumis melo* L.) Fruits Induced With Irradiated Pollen. African Journal Of Biotechnology. 9 (33) : 5347 – 5356.
- Arı, E., Yıldırım, T., Mutlu, N., Büyükalaca, S., Gökmen, Ü., Akman, E., 2016. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) Turk J Biol. 40: 944-954 TÜBİTAK.
- Asif, M., 2013. Progress and opportunities of doubled haploid production. SpringerBriefs in Plant Science, Volume 6.
- Ata, A., Büyükalaca, S., 2013. İklim koşullarına karşı farklı adaptasyon yeteneklerine sahip biberlerde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürüne mevsim etkisi. Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi Yıl:2013 Cilt:29-2.
- Atanassov, A., Zagorska, N., Boyadjiev, P., Djilianov, D., 1995. *In Vitro* Production Of Haploid Plants. World Journal Of Microbiology & Biotechnology. 11 : 400 – 408.
- Baktemur, G., 2009. Kavunda (*Cucumis melo* var. *inodorus*) Işınlanmış Polenle Uyartılmış Haploid Embriyoların Ayrılmasında Kullanılabilecek Farklı Yöntemler. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. p. 61.,
- Baktemur, G., Yıldız, M., Büyükalaca, S., Abak, K., 2010. Kavunda (*Cucumis melo* L.) Uyartılmış Haploid Embriyoların Ayrılmasında Kullanılabilecek Yöntemler. Alatarım, 9 (1): 15-21.

- Baktemur, G., Taşkın, H., Büyükalaca, S., 2013. Comparison of Different Methods for Separation of Haploid Embryo Induced through Irradiated Pollen and Their Economic Analysis in Melon (*Cucumis melo* var. *inodorus*) Hindawi Publishing Corporation The ScientificWorld Journal, 7 sayfa.
- Baktemur, G., Yücel, N.K., Taşkın, H., Çömlekçioğlu, S., Büyükalaca, S., 2014. Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization using irradiated pollen technique in squash. Turkish Journal of Biology, 38: 318-327, TÜBİTAK.
- Bal, U., Sarı, N., Yılmaz, H., 2003. Effects of E20A and MS Based Media on in vitro Induction of Axillary Buds and Shoot Development From Haploid *Cucumis melo* Microcuttings. Pak. J. Biol. Sci. 6(13): 1130- 1138.
- Barnabás, B., 2003. Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Doubled Haploid Production in Crop Plants, pp 65-70.
- Başay, S., Ellialtıoğlu, Ş.Ş., 2013. Effect of genotypical factors on the effectiveness of anther culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). Turkish Journal of Biology, 37: 499-505, TÜBİTAK.
- Berber, M., 2009. Production of haploids in naked seed pumpkins (*Cucurbita pepo* L. var. *styriaca*) by pollination with irradiated pollen. MSc, Çukurova University, Adana, Turkey.
- Berber, M., Abak, K., 2012. Kabuksuz çekirdek kabaklarında (*Cucurbita pepo* L. var. *styriaca*) ışınlanmış polenle tozlama yöntemi kullanılarak haploid üretimi. Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi Yıl:2012 Cilt:27-5.
- Binarova, P., Hause, G., Cenklová, V., Cordewener, J.H.G., Campagne, M.M.L. 1997. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. Sexual Plant Reproduction, Volume 10, Issue 4, pp 200–208.
- Bobkov, S.V., 2009. Isolated Pea Anther Culture. All-Russian Pulse and Groat Crops Research Institute, Orel oblast, 302502 Russia.

- Bobkov, S.V., 2010. Isolated pea anther culture. Russian Agricultural Sciences, 2010, Vol. 36, No. 6, pp. 413–416.
- Bohanec, B., Jakše, M., Ihan, A., Javornik, B., 1995. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. Plant Science, Volume 104, Issue 2, 1995, Pages 215-224.
- Bohanec, B., Jakše, M., 1999. Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. Plant Cell Reports, Volume 18, Issue 9, pp 737–742.
- Bohanec, B., 2009. Doubled haploids via gynogenesis. In: *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (Touraev, A., Forster, B.P. and Jain, S.M., eds), pp, 35–46. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag.
- Bossoutrot, D., Hosemans, D., 1985. Gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: from in vitro culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plants in soil. Plant cell reports.
- Brun, P., 1990. Etude de l'effet genotype sur l'obtention d'haploides par parthenogenese induite par du pollen irradie chez le melon *Cucumis melo* L. et recherché. (DEA) Option Sciences Agronomiques.
- Burbulis, N., Kupriene, R., Ūilenaite, L., 2008. Embryogenesis, callogenesis and plant regeneration from anther cultures of spring rape (*Brassica napus* L.) Acta Universitatis Latviensis, Biology, 676,: 153–158.
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu, N., Abak, K., Ekbiç, N., And Kiliç, N., 2004. Effect of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. Europ. J. Hort. Sci., 69 (5):206-209.
- Cappadocia, M., Ahmim, M., 1988. Comparison of two culture methods for the production of haploids by anther culture in *Solanum chacoense*. *Canadian Journal of Botany*, 1988, 66(5): 1003-1005, 10.1139/b88-144.
- Castillo, Am., Cistué, L., 1993. Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. Plant Cell Reports, Volume 12, Issue 3, pp 139–143.

- Castillo, AM., Cistué, L., Vallés, MP., Soriano, M., 2009. Chromosome doubling in monocots. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds) Advances in haploid production in higher plants. Springer, Heidelberg, pp 329–338
- Chiancone, B., Tassoni, A., Bagni, N., Germana, M.A., 2006. Effect of polyamines on in vitro anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. Plant Cell Tiss Organ Cult 87:145–153.
- Chu, CC., Wang, CC., Sun, CS., Hsu, C., Yin, KC., Chu, CY., Bi, FY., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci Sin 18:659–668.
- Chu, CC., 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. Proceedings of symposium on plant tissue, Science Press Beijing, China.
- Chuang, CC., Ouyang, TW., Chia, H., 1978. A set of potato media for wheat anther culture. Plant Tissue Culture.
- Claveria, E., Garcia-Mas, J., Dolcet-Sanjuan, R., 2005. Optimization of Cucumber Doubled Haploid Line Production Using In Vitro Rescue of In Vivo Induced Parthogenetic Embryos. J. Amer. Soc. Hort, Sci. 130 (4) : 555-560.
- Cordewener, JHG., Hause, G., Görgen, E., Busink, R., Hause, B., Dons, HJM., Van Lammeren, AAM., Van Lookeren Champagne, MM., and Pechan, P., 1995. Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. Planta 196: 747–755.
- Cuny, F., Dumas De Vault, R., Longhi, B., Siadous, R., 1992. Analyse des Plantes de Melon (*Cucumis melo* L.) Issues de Croisements Avec du Pollen Irradié à Différentes Doses. Agronomie, 12: 623-630.

- Cuny, F., 1992. Processus d'induction d'embryons haploides par du pollen irradié chez le melon (*Cucumis melo* L.) responses du pollen à l'irradiation gamma. Thèse de Docteur, Spécialité 'Biologie et Cytologie végétales' Univ. d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon, 139 p.
- Cuny, F, Grotte, M., Dumas De Vault, R., Rieu, A., 1993. Effects of Gamma Irradiation Of Pollen on Parthenogenetic Haploid Production in Muskmelon (*Cucumis melo* L.). Environ Exp Bot., 33:301–312.
- Currah, L., Ockendon, D.J. 1986. Chromosome Doubling Of Mature Haploid Brussels Sprout Plants By Colchicine Treatment. Euphytica 26:167-173.
- Çağlar, G., Abak, K., 1996a. The effects of season and irradiation doses on haploid embryo production in cucumber (*C. sativus* L.). Proc. of the VIth Eucarpia meeting on Cucurbit genetics and breeding, Malaga, Spain, 25 – 30.
- Çağlar, G. Abak, K., 1999. Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) Işınlanmış Polenlerle Tozlama Yoluyla in situ Haploid Embriyo Uyarımı. Tr. J. of Agriculture and Forestry 23 Ek Sayı 1, 63-72. TUBİTAK.
- Çağlar, G., Abak, K., 1999a. In situ haploid embryo induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) after pollination by irradiated pollen. Turk J Agric For 23(EK1):63–72.
- Çağlar, G., Abak, K., (1999b). Obtention of in vitro haploid plants from in situ induced haploid embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Turk J Agric For 23(3):283–290.
- Çağlar, G., Aras, V., Bayram, A., 2004. Kurutmalık Kırmızı Biberlerde Androgenesis Yoluyla *In Vitro* Haploid Embriyo Uyarımı. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 17(1), 87-94.
- Çiner, D. Tıpırdamaz, R. 2001., A Short Report On The Parameters Of A Successful Anther Culture. G.Ü. Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi. 2(2) : 35-39.

- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S., And Abak, K., 1999. Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber populasyonlarında anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etme olanakları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ankara, 897-900.
- De Buyser, J., Henry, Y., 1980. Induction of haploid and plants though in vitro anther culture of haploid wheat ($n=3x=21$). Theoretical and Applied Genetics. March 1980, Volume 57, Issue 2, pp 57-58.
- Demarly, Y., Sibi, M., 1989. Amélioration des Plantes et Biotechnologies. John Libbey and Company Ltd., Paris.
- Demir, H., 2007. Yapraklı Yeniden Sebzeler. Hasad Yayıncılık, İstanbul, 192s.
- Diao, Wp., Jia, Yy., Song, H., Zhang, Xq., Lou, Qf., 2009. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. Scientia Horticulturae, Volume 119, Issue 3, Pages 246–251.
- Dias, J.S., Martins, M.G., 1999. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different Brassica oleracea morphotypes. Instituto Superior de Agronomia, Technical University of Lisbon, Tapada da Ajuda, 1300 Lisbon, Portugal.
- Doctrinal, M., Sangwanr, S., Sangwan-Nor-Reel B, S., 1989. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 17: 1–12. http://dx.doi.org/10.1007%2F978-3-642-61499-6_17.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Huerta, A., 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L.-Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. J Am Soc Hort Sci 122:468–47.
- Doré, C., Boulidard, L., Sauton, A., Rode, J-C., Cuny, F., Niemirowicz-Szczyt, K., Sarı, N., Dumas De Vaulx, R., 1995. Interest of irradiated pollen for obtaining haploid vegetables. Acta Hort 392:123–128.

- Dryanovska, OA., Ilieva IN., 1983. In vitro anther and ovule cultures in muskmelon (*Cucumis melo* L.). C R Acad Bulg Sci 36:1107– 1110.
- Dumas De Vault, R., Chambonnet, D., Pochard, E., 1981. Culture in vitro d. Antheres de piment (*Capsicum annuum* L.): amelioration des taux d, obtention de plantes chez different genotypes par des traitements a +35°C. Agronomie, 1 (10), 859-864.
- Ercan, N., Sensoy, F., and Sensoy, A.S., 2006. Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). Scientia Horticulturae Scientia Horticulturae. 110 (1): 16-20.
- Evans, D.A. and Morrison, R.A., 1986. Tomato Anther Culture, US Patent, 4, vol. 835, pp. 339–345.
- Elli, E.S., Balkaya, A., 2010. Production of in vitro haploid plants from in situ induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. Plant Cell Tiss Organ Cult 102 : 267 – 277.
- Ebrahimzadeh, H., Lotfi, M., Azizi, Sh., Ghanavati, F., 2013. Production of Haploids in *Cucurbita pepo* L. through Parthenogenesis Induced by Gamma-Irradiated Pollen. Spring & Summer 4 : 99 – 108.
- Ellialtıoğlu, S., Sarı, N., Abak, K., 2001. Haploid bitki üretimi. Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü Uygulamaları.
- Ercan, N., Şensoy, F.A., 2011. Androgenic Responses of Different Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 4 (2) : 59 - 61.
- FAOSTAT., 2014. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Faris, NM., Nikolova, V., Niemirowicz-Szczytt, K., 1999. The effect of gamma irradiation dose on cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo production. Acta Physiol Plant 21(4):391–396.
- Ferrant, V., Bouharmont, J., 1994. Origin of gynogenetic embryos of *Beta vulgaris* L. Sexual Plant Reproduction, Volume 7, Issue 1, pp 12–16.

- Ficcadenti, N., Veronese, P., Sestili, S., Crino, P., Lucretti, S., Schiavi, M., Saccardo, F., 1995. Influence of Genotype on the Induction of Haploidy in *Cucumis melo* L. by Using Irradiated Pollen. J. Genet. Breed. 49: 359-364.
- Galatowitsch, M.W., Smith, G.A., 1989. Regeneration from unfertilized ovule callus of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) Can. J. Plant Sci. 70 : 83-89.
- Gałązka, J., Niemirowicz-Szczytt, K., 2013. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. Department of Plant Genetics, Breeding and Biotechnology Warsaw University of Life Sciences 156 Nowoursynowska St, 02-776 Warsaw, Poland. Folia Hort. 25/12013): 67-78.
- Gallais, A., 1988. A method of line development using doubled haploids: the single doubled haploid descent recurrent selection. Theoretical and Applied Genetics. Volume 75, Issue 2, pp 330–332.
- Gamborg, Ol., Miller, Ra., Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, volume 50, Issue 1, Pages 151-158.
- Gémesné, J.A., Sági, Zs., Salamon, P., Somogyi, N., Zatykó, L., And Venczel, G., 1998. Experiences and results of in vitro haploid methods application in pepper breeding programme. Proceedings of the Xth Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant (Avignon, France Sept. 7-11) 201-205.

- Gémesné Juhász, G., Petus, M., Venczel, G., Zatykó, L., Gyulai, G., Cséplő, M., 2000. Genetic variability of anther donor versus spontaneous doubled haploid descendents and colchicine induced doubled haploid sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) lines. SHS Acta Horticulturae 560: IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding.
- Germanà, MA., Crescimanno, FG., Motisi, A., 2000. Factors affecting androgenesis in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. Adv Hortic Sci 14:49–58.
- Germanà, MA., Chiancone, B., 2001. Gynogenetic haploids of Citrus after in vitro pollination with triploid pollen grains. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Volume 66, Issue 1, pp 59–66.
- Germanà, MA., Chiancone, B., 2003. Improvement of Citrus clementina Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration. Plant Cell Reports, volume 22, Issue 3, pp 181–187.
- George, L., Narayanaswamy, S., 1973. Haploid capsicum through experimental androgenesis. Protoplasma 78, 467–470.
- Giles, KI., Prakash, J., 1987. Pollen: cytology and development. agris.fao.org.
- Gonzalez-Melendi, P., Testillano, PS., Ahmadian, P., Fadon, B., Vicente, O., Risueno, MC., 1995. In situ characterisation of the late vacuolated microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in *Capsicum* Protoplasma 187:60-71.
- Gonzalez-Melendi, P., Testillano, Ps., Ahmadian, P., Fadon, B., Vicente, O., Risueno, Mc., 1996. New in situ approaches to study induction of pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. Eur J Cell Biol 69:373-386.
- Górecka, K., Krzyżanowska, D., Kowalska, U., 2007. Regeneration and Evaluation of Androgenetic Plants of Head Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* l.) Vegetable Crops Research Bulletin 67:5-15.

- Gorecka, K., Krzyzanowska, D., Kiszczak, W., Kowalska, U., 2008. Plant regeneration from carrot (*Daucus carota* L.) anther culture derived embryos. *Acta Physiol Plant* 31:1139–1145.
- Godbole, M., Murthy, H.N., 2012. In vitro production of haploids via parthenogenesis in culinary melon. (*Cucumis melo* var. *acidulus*) *Indian Journal Of Biotechnology*. 11 : 495 – 497.
- Gresshoff, P.M., and Doy, C.H., 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107 (2). 161-170.
- Gürel, E., Gürel, S., 1997. Plant Regeneration from Unfertilized Ovaries of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Cultured In Vitro. *Tr. J. of Botany* 22:233-238 TUBİTAK.
- Gürsöz, N., Abak, K., Pitrat, M., Rode, Jc., Dumas De Vault, R., 1991. Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrillus lanatus* L.). *Cucurbit genetics. Coop Rep* 4:109–110.
- Gu, H.H., Zhou, W.J. Hagberg, P., 2003. High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *Chinensis*.
- Guha, S., Maheshwari, Sc., 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, Volume 204, Issue 4957, pp. 497.
- Gulshan, TMV., Sharma, DR., 1981. Studies on anther cultures of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill, *Biologia Plantarum*, vol. 23 (pg. 414-420).
- Gursoy, I., 2009. Yuva ve Hasanbey Kavunlarında Işınlanmış Polenle Farklı Tozlama Dönemlerinin Meyve Tutumuna Etkisi İle Farklı Hasat Tarihleri Ve Depolama Sıcaklıklarının Embriyo Verimi Ve Bitkiye Dönüşüme Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. p. 59.

- Gürsöz, N., Abak, K., Pitrat, M., Rode, J.C., And Dumas De Vaulx, R., 1991. Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). Cucurbit Genet Coop 14: 109–110.
- Gyulai, G., Gemesne, J.A., Sagi, Zs., Zatyko, L., Heszky, L., Venczel, G., 1999. PCR-Analysis of F1 Hybrid Derived DH Pepper Lines. Crysianm & Eggpalnt Newsletter. 18 : 40 - 43.
- Gyulai, G., Gemesne, J. A., Sagi, Zs., Venczel, G., Pinter, P., Kristof, Z., Törjek, O., Heszky, L., Bottka, S., Kiss, J., Zatyko, L. 2000. Doubled Haploid Development and PCR-Analysis of F1hybrid Derived Dh-R2 Paprika (*Capsicum annuum* L.) Lines. J. Plant Physiol. 156:168- 174.
- Gyluai, G., Gemesne, J.A., Sagi, Z., Venczel, G., Pinter, P., Kristof, Z., Torjek, O., Heszky, L., Bottka, S., Kiss, J., Zatyko, L., 2008. Doubled haploid development and PCR-analysis of F1 hybrid derived DH-2 paprika (*C.annuum* L.) lines, J. Plant Physiol, Vol. 156. pp.168-174.
- Hadziabdic, D., Wadl, PA., Reed, SM., 2016. Haploid Cultures. Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology. Pages 385-396.
- Hansen, A.L., Plever, C., Pedersen, H.C., Keimer, B., Andersen, S.B., 1994. Efficient in vitro Chromosome Doubling During *Beta vulgaris* Ovule Culture. Plant Breeding, Volume 112, Issue 2, Pages 89–95.
- Hansen, Al., Gertz, A., Joersbo, M., Andersen, Sb., 1995. Short-duration colchicine treatment for in vitro chromosome doubling during ovule culture of *Beta vulgaris* L. Plant Breeding, Volume 114, Issue 6, Pages 515–519.
- Hansen, N. J. P., Andersen, S. B., 1998. Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM. Plant Breeding, Volume 117, Issue 5, Pages 401–405.
- Hayase, H., 1954. Studies on Cucurbita crosses. v. the occurrence of twin plants with a haploid chromosome number in the f1 of *C. maxima* x *C. moschata*. Ikushugaku Zasshi/Jap. Jour. Breed.

- Hatipoglu, R., (2008). Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü. Adana.
- Heberle-Bors, E., 1989. Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. Sexual Plant Reproduction. March 1989, Volume 2, Issue 1, pp 1–10.
- Irikova, T., And Rodeva, V., 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): The effect of nutrient media. Capsicum and Eggplant Newsletter 23 (2004):101-104.
- Irikova, T., 2008. Obtaining and genotype investigations of androgenic haploids from Bulgarian pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. PhD, University of Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria.
- Irikova, T., Grozeva, S., Rodeva, V., 2010. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. Acta Physiol Plant S.11738.
- Ishizaka, H., Uematsu, J., 1993. Production of plants from pollen in *Cyclamen persicum* Mill. through anther culture. Japan J Breed 43: 207–218.
- Jaramillo, J.1, Summers, W.L.2, 1991. Dark–Light Treatments Influence Induction of Tomato Anther Callus. HORTSCIENCE 26 (7) : 915-916.
- Javornik, B., Bohanec, B., Campion, B., 1998. Second cycle gynogenesis in onion, *Allium cepa* L., and genetic analysis of the plants. Plant Breeding, volume 117, issue 3, pages 275–278.
- Juhász, A.G., Petus, M., Gyulai, G., Cséplő, M., Venczel, G., Zatykó, L., 2001. Genetic Variability of Anther Donor Versus Spontaneous Doubled Haploid Descendants and Colchicine Induced Doubled Haploid Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.) Lines. Proc. IV IS on In Vitro Cult. & Hort. Breeding Eds. Acta Hort S. 560.

- Juhasz, A.G.1, Jakse, M.2, 2005. Haploids in the Improvement of Miscellaneous Crop Species (*Cucurbitaceae*, *Liliaceae*, *Asparagaceae*, *Chenopodiaceae*, *Araceae* and *Umbelliferae*) Biotechnology in Agriculture and Forestry, S. 56.
- Kahrizi, D., Mohammadi. R., 2009. Study of Androgenesis and Spontaneous Chromosome Doubling in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Genotypes Using Isolated Microspore Culture. *Acta Agronomica Hungarica*. 57 (2) : 155-164.
- Karakullukcu, S., Abak, K., 1992. Reactions of some eggplant cultivars to anther culture. *Ziraat Fakültesi Yıllığı*.
- Karakullukcu, S., Abak, K., 1993. Studies on anther culture of eggplant. II.. Effects of sugars and growth regulators. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*.
- Kasapoglu, S., 2009. Kırkağaç Kavunlarında Işınlanmış Polenle Farklı Tozlama Dönemlerinin Meyve Tutumuna Etkisi İle Farklı Hasat Tarihleri Ve Depolama Sıcaklıklarının Embriyo Verimi Ve Bitkiye Dönüşüme Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. p. 55.
- Kao, KN., Horn, D., 1999. Practical improvement to microspore culture. *PBI Bulletin*, Jan 99. Available via <http://www.pbi.nrc.ca/bulletin/jan99/improve.html>.
- Keller, W.A., Armstrong, K.C., 1979. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. *Theoretical and Applied Genetics*, Volume 55, Issue 2, pp 65–67.
- Keller, ERJ., Korzun, L., 1996. Ovary and ovule culture for haploid production. In *Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Volume 23 of the series *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* pp 217-235.

- Keles, D., Pınar, H., Taskın, H., Yıldız, S., Büyükalaca, S., 2015. Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. Hortscience 50(11):1671–1676. 2015.
- Kieffer, M., Fuller, M.P., Chauvin, J.- E., Schlessner, A., 1993. Anther culture of kale (*Brassica oleracea* L. convar, acephala (DC.) (Alef.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1993;33:303- 313.
- Kielkowska, A., Adamus, A., 2010. In vitro culture of unfertilized ovules in carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), Volume 102, Issue 3, pp 309–319.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, Di., Lee, Km., 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult 77:63–72.
- Kim, K.M., And Stephen Baenziger, P., 2005. A simple wheat haploid and doubled haploid production system using anther culture. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 41:22–27.
- KiszczaK, W., Kowalska, U., Kapuścińska, A., 2015. Effect of low temperature on in vitro androgenesis of carrot (*Daucus carota* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, Volume 51, Issue 2, pp 135–142.
- Koleva Gudeva, L., Spasenoski, M., 2002. Callus induction of pepper anthers. Yearbook, 2. pp. 22-32. ISSN 1409-987X.
- Koleva-Gudeva, L., 2003b. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). Institute of Southern Crops, Strumica, Yearbook 95–102.
- Koleva-Gudeva, L.R., Spasenoski, M., And Trajkova, F., 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. Scientia Horticulturae, 111 114– 119.
- Knott, J. E., 1934. Effect of a localized photoperiod on spinach. Proc. Am. Sot. hort. Sci. 31 (Suppl.): 152-154.

- Kondic- Špika, A., Kobiljski, D., Hristov, N., 2008. Efficiency of Anther Culture Technique In the Production of Wheat Double Haploids. Institute of Field and Vegetable Crops M. Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia.
- Košmrlj, K., Murovec, J., Bohanec, B., 2013. Haploid Induction in Hull-less Seed Pumpkin through Parthenogenesis Induced by X-ray-irradiated Pollen. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 138(4):310–316.
- Košmrlj, K., Kastelec, D., Bohanec, B., 2014. Styrian oil pumpkin pollen germinability at higher irradiation doses: optimization of the in vitro germination protocol and irradiation procedure. Turk J. Biol. 38: 516-522 TÜBİTAK.
- Kowalska, U., Rybaczek, D., Krzyżanowska, D., Waldemar, K., Górecka, K., 2008. Cytological Assessment of Carrot Plants Obtained In Anther Culture. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 50 (2) : 7–11.
- Kristiansen, K., Andersen, S.B., 1993. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. Euphytica, Volume 67, Issue 1, pp 105–109.
- Krzyżanowska, D., Górecka, K., 2008. Effect of various stress factors on the induction of androgenesis in anther cultures of Brussels sprouts *Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*). Vol. 69, 5-13.
- Kumar, H., 1984. Differentiation in anther culture of two cucurbits. Genetic manipulation in crops: proceedings of the International Symposium on Genetic Manipulation in Crops, the 3rd International Symposium on Haploidy, the 1st International Symposium on Somatic Cell Genetics in Crops, Beijing: 45-47.
- Kumar, AGA., Murthy, HN., Paek, KY., 2003. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. Scientia Horticulturae 98 213–212.
- Kumar, HGA., Ravishankar, BV., Murthy, HN., 2004. The influence of polyamines on androgenesis of *Cucumis sativus* L. Eur J Hort Sci 69:201–205.

- Kurtar, E.S., 2009. Influence of gamma irradiation on pollen viability, germination ability, and fruit and seed-set of pumpkin and winter squash. Bafra Vocational School, Department of Technical Programs, Ondokuz Mayıs University, 55400 Bafra, Samsun - Turkey.
- Kurtar, E.S., Sarı, N., Abak, K., 2002. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). *Euphytica* 127(3):335–344.
- Kurtar, E.S., Balkaya, A., 2010. Production of in vitro haploid plants from in situ induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. *Plant Cell Tissue Org Cult* 102(3):267–277.
- Krzyżanowska, D., Górecka, K., 2012. Effect of Various Stress Factors on the Induction of Androgenesis in Anther Cultures of Brussels Sprouts (*Brassica oleracea* L. var. Gemmifera) Research Institute of Vegetable Crops Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland.
- Lakshmi Sita, G.L., 1997. Gynogenic haploids in vitro. In *Vitro Haploid Production in Higher Plants*. pp 175-193.
- Lantos, C., Juhász, A.G., Somogyi, S., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., Somogyi, N., Pauk, J., 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture (Pctoc)*. Volume 97, Issue 3, pp 285–293.
- Lazarte, J.E., Sasser, C.C., 1982. Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. (Cucumber, regeneration, tissue culture). *HortScience* 17, 88.
- Lee, M.Y., Lim, C.J., Lee, I. H., Song, J.H., 2014. High-purity Seed Production of Doubled Haploid Chinese Cabbage [*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.)] Through Microspore Culture. *Plant Breeding and Biotechnology* 2 : 167 -175.

- Liljanaa, K.G., Fidankaa, T., Mirkob, S., 2007. Effectiveness of androgenesis induced in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.).
- Lim, W., Earle, E.D., 2008. Effect of in vitro and in vivo colchicine treatments on pollen production and fruit set of melon plants obtained by pollination with irradiated pollen. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2008) 95:115–124.
- Lotfi, M., Salehi, S., 2008. Detection of cucumber parthenogenic haploid embryos by floating the immature seeds in liquid medium. Department of Horticulture, Agricultural college of Aboureihan, University of Tehran, Pakdasht 39754, Iran.
- Lofti, M., Kashi, A., Onsinejad, R., 1999. Induction of parthenogenetic embryos by irradiated pollen in cucumber. *Acta Hort.* 492:323–328.
- Lofti, M., Alan, Ar., Henning, Mj., Jahn, Mm., Earle, Ed., 2003. Production of haploid and double haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep* 21(11):1121–1128.
- Lux, H., Herrmann, L., Wetzel, C., 1990. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant Breed.* 104: 177–183.
<http://dx.doi.org/10.1111%2Fj.1439-0523.1990.tb00420.x>
- Luitel, B. P., Kang, W.H., 2012. In Vitro Androgenic Response of Minipaprika (*Capsicum annuum* L.) Genotypes in Different Culture Media. Department of Horticulture, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.
- Ltifi, A., Wenzel, G., 1994. Anther culture of hot and sweet pepper (*Capsicum annuum* L.): influence of genotype and plant growth temperature. *Capsicum Eggplant Newsl*, 1994.
- Maestro-Tejada, M.C., 1992. Résistance du melon aux virus. Interaction avec les pucerons vecteurs. Analyse génétique sur les lignées haplodiploïdes. Thèse de Docteur, Spécialité 'Biologie des Organismes et Populations', Univ. de Droit, d'Economie et des Sciences d'Aix-Marseille, 134 p.

- Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B.P., and Szarejko, I., 2003. Doubled haploid production in crop plants: a manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- Martin, B., Widholm, J.M., 1996. Ploidy of small individual embryo-like structures from maize anther cultures treated with chromosome doubling agents and calli derived from them. Plant Cell Reports, Volume 15, Issue 10, pp 781–785.
- Matsubara, S., Yamamoto, M., Jo, M.H., Murakami, K., 1998. Embryoid and Callus Formation from Microspores by Anther Culture July to November in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Okayama University. 87 : 117-122.
- Mdarhri-Alaoui, M., Saidi, N., Chlyah, A., And Chlyah, H., 1998. Green haploid plant formation in durum wheat through *in vitro* gynogenesis. C.R. Acad. Sci. Ser. III (Life sciences) 321: 25–30.
- Mentewab, A., Sarrafi, A., 1997. Androgenic ability and chromosome doubling by different colchicine treatments in anther culture of hexaploid wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.).
- Metwally, E.I., Moustafa S.A, El-Sawy, B.I., Shalaby, T.A., 1998. Haploid plantlets derived by anther culture of Cucurbita pepo. Plant cell, Tissue and Organ Culture 52: 171–176.
- Miller, Co., 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. Volume 6 of the series Modern Methods of Plant Analysis / Moderne Methoden der Pflanzenanalyse pp 194-202.

- Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G., And Fari, M., 1995. Anther culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Breeding, 114:78-80.
- Mityko, J., Fari, M., 1997. Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture. Acta Hortic 447:281–287.
- Mirzaei, M., Kahrizi, D., Rezaeizad, A., 2011. Androgenesis and Spontaneous Chromosome Doubling in *Triticum aestivum* L. Researches of the First International Conference (Babylon and Razi Universities) 981 : 2072 – 3875.
- Motabelli-Azar, A., 2010. Androgenic Response Of Tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.) Lines And Their Hybrids To Anther Culture. Russian Agricultural Sciences. 36 (4) : 250 – 258.
- Mohamed, M.F., Refaei, E.F.S., 2004. Enhanced Haploids Regeneration in Anther Culture of Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.) Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut 71526, Egypt.
- Mohammadi, P.P., Moieni, A., Jalali-Javaran, M., 2007. Colchicine induced embryogenesis and doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.) anther culture. Iranian Journal of Biotechnology 5(3).
- Morrison, R.A., Koning, R., Evans, D., 1986. Anther culture of an inter specific hybrid of *Capsicum*. J. of Plant Physiol. 126:1, 1-9.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum (Oph.) 15, 473–497.
- Mukhambetzhonov, S.K., 1997. Culture of nonfertilized female gametophytes in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Volume 48, Issue 2, pp 111–119.

- Munyon, I.P., Hubstenberger, J.F., Phillips, G.C., 1989. Origin of Plantlets and Callus Obtained from Chile Pepper Anther Cultures. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 25:293-296.
- Mythili, J.B., Thomas, P., 1995. Some factors influencing the in vitro establishment and callusing of anthers in capsicum (*Capsicum annuum* L. var *grossum* Sendt). Indian Institute of Horticultural Research, Bangalore (India). Division of Biotechnology.
- Nasertorabi, M., Madadkhah, E., Moghbeli, E., Grouh M S, H., Soleimani, A., 2012. Production of haploid lines from parthenogenetic Iranian melon plants obtained of irradiated pollen (*Cucumis melo* L.) *Int. Res. J. Appl. Basic Sci.* **3**: 1585-1589.
- Niemirowicz-Szczytt, K., Dumas de Vaulx, R., 1980. Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction. *Cucurbit Genet Coop.*
- Niemirowicz-Szczytt, K., Faris, Nm., Nikolova, V., Rakoczy-Troja Nowska, M., Malepszy, S., 1995. Optimization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid production and doubling. In: Lester (ed) *Proceeding of Cucurbitaceae '94*, pp 169–171.
- Niklas-Nowak, A., Olszewska, D., Kisiała, A., Nowaczyk, P., 2012. Study of individual plant responsiveness in anther cultures of selected pepper (*Capsicum spp.*) genotypes. *Folia Hort.* 24/2 : 141-146.
- Nitsch, J.P. 1969. Experimental androgenesis in nicotiana.
- Nitsch, J. P., Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163, 85–87.
- Nowaczyk, P., Kisiała, A., 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *J Appl Genet* 47(2), pp. 113–117.
- Nowaczyk, P., Olszewska, D., Kisiała, A., 2009. Individual reaction of Capsicum F2 hybrid genotypes in anther cultures. *Euphytica* 168:225–233.

- Ockendon, D.J., McClenaghan, R., 1991. Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick, CV35 9EF, UK.
- Qin, X., Rotino, G.L., 1993. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. ISHS Acta Horticulturae 402: International Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops. Part 1: Vegetable Crops.
- Ollitrault, P., Allent, V., Luro, F., 1996. Production of Haploid Plants and Embryogenic Calli of Clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after in situ Parthenogenesis Induced by Irradiated Pollen. Proc. Int. Soco Citriculture, 913-917.
- Özkum, D., Tipirdamaz, R., Ellialtıoglu, S., 2001. The relationship between the endogenous abscisic acid content of anthers and in vitro androgenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). Acta Horti 560:327–329.
- Özkum D, Tipirdamaz R., 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the in vitro androgenesis of pepper (*Capiscum annuum* L.). Turk. J. Bot., 26:131-139.
- Pandeva, R., Zagorska, N., Simeonova, N., 1990. Study of induced callus-and embryogenesis in anther cultures of pepper. Genetika I Seleksiya, 23:2,137-145.
- Paran, I., Aftergoot, E., Shifriss, C., 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. Euphytica, Volume 99, Issue 3, pp 167–173.
- Park, H, G., Choi, K, Y., Lee, D, H., 1992. Effect of explants and growth regulators on somatic embryogenesis and adventitious organogenesis in *Capsicum annuum*. Hortscience, 27, 6, 618.

- Park, J.B., Yi, Y.B., And Lee, C.K., 2001. Effect of Plant Growth Regulators, Donor Plant Bud length, Low Temperature Treatment and Glucose Concentration on Callus Induction and Plant Regeneration in Anther Culture of Cherry Tomato “Mini_Carol”, *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, vol. 42, pp. 32–37.
- Parlevliet, J.E., 1967. Influence of external factors on the growth and development of spinach cultivars (*Spinacia oleracea* L.). Meded. LandbHogesch. Wageningen 67-2: 75 pp.
- Phippen, C., Ockendon, D.J., 1989. Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. botrytis) AFRC Institute of Horticultural Research, Wellesbourne, Warwick, CV35 9EF, UK.
- Phippen, C., & Ockendon, Dj., 1990. Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Theor. Appl. Genet.* 79: 33-38.
- Picard, E., Debuyser, J., 1977. High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats. *Ann Amelior Plant* 27:483–488.
- Powell, W., 1990. Environmental and genetical aspects of pollen embryogenesis. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 12: Haploids in Crop Improvement. Ed. Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag, Berlin. 45–65.
- Prince, JP., Lackney, VK., Angeles, C., Blauth, JR., 1995. A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome*, Volume 38, Number 2.
- Przyborowski, J., Nlemirowicz-Szgytt, K., 1994. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. *Plant Breeding*.

- Qin, X., Rotino, G.L., 1993. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. ISHS Acta Horticulturae 402: International Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops. Part 1: Vegetable Crops.
- Rakha, M.T., Metwally, E.I., Moustafa, S.A., Etman, A.A., Dewir, Y.H., 2012. Evaluation of regenerated strains from six Cucurbita interspecific hybrids obtained through anther and ovule in vitro cultures. AJCS 6(1) : 23-30.
- Reed, S.M., 1997. 17 Haploid Cultures. Plant Development And Biotechnology. 17 : 225 – 234.
- Reed, S.M., 2005. 17 Haploid cultures. Plant Development and Biotechnology, pp 225-234.
- Richards, C.M., Brownson, M., Mitchell, S.E., Kresovich, S., Panella, L., 2004. Polymorphic Microsatellite Markers For Inferring Diversity In Wild And Domesticated Sugar Beet (*Beta vulgaris*). Molecular Ecology Notes. (2004) 4 : 243 – 245.
- Rodeva, V.N., Irikova, T.P., Todorova, V. J., 2004. Anther Culture Of Pepper (*Capsicum annuum* L.) : Comparative Study On Effect Of The Genotype.
- Rodeva, V., Koleva-Gudeva, L., Grozdeva, S., Trajkova, F., 2007. Obtaining of haploids in anther culture of pepper *Capsicum annuum* L. and their including in the breeding process. Yearbook 7, Goce Delcev University, Stip, Faculty of Agriculture, 7-17.
- Rongbai, L., Pandey, M.P., Garg, Gk., Pandey, Sk., 1998. Development of a technique for in vitro unpollinated ovary culture in rice, *Oryza sativa* L.
- Roshany, G., Kalantarai, S., Naderi, R., Hassani, M.E., 2013. Callus Formation via Anther Culture in *Capsicum annum* L. with Differences in Genotypes, Media and Incubation Temperature. Technical Journal of Engineering and Applied Sciences Available online at www.tjeas.com ©2013 TJEAS Journal-2013-3-S/3847-3853 ISSN 2051-0853.

- Roshany, G., Kalantarai, S.1, Naderi, R.1, Hassani, M. E.2, 2013. Callus Formation via Anther Culture in *Capsicum annum* L. with Differences in Genotypes, Media and Incubation Temperature. 1. Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj 31587,Iran 2. Faculty of Agriculture, Food and Natural Resources, University of Sydney. NSW, Australia.
- Roulund, N., Hansted, L., Andersen, S.B., Farestveit, B., 1989. Effect of genotype, environment and carbohydrate on anther culture response in head cabbage (*Brassica oleracea* L convar . *capitata* (L.) Alef.) Department of Horticulture, Royal Veterinary and Agricultural University, Rolighedsvej 23, DK-1958 Frederiksberg C, Denmark.
- Roulund, N., Andersen, S.B., Farestveit, B., 1990. Optimal concentration of sucrose for head cabbage (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* (L.) Alef.) anther culture. Department of Horticulture, The Royal Veterinary and Agricultural University, Rolighedsvej 23, DK-1958 Frederiksberg C, Denmark.
- San Noeum L. H., 1976. Haploides *d'Hordeum vulgare* L. par culture in vitro d'ovaires non fécondés. Ann. Amelior. Plant., 26, 751-754.
- Sarı, N., Abak, K., Pitrat, M., Rode, J.C., Dumas De Vault, R., 1994. Induction of Parthenogenetic Haploid Embryos after Pollination by Irradiated Pollen in Watermelon. HortScience vol. 29 no. 10 1189-1190.
- Sarı, N., 1994. Karpuzda Işınlanmış, Polen Uyartımıyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine Genotipin ve Mevsimin Etkisi ile Işınlama Yerine Geçebilecek Uygulamalar Üzerinde Araştırmalar. Ph.D. thesis. Çukurova University, Adana, Turkey.
- Sari, N., Abak, K., Pitrat, M., 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. Sci Hortic 82(3):265–277.

- Sauton, A., Dumas De Vault, R., 1987. Production of haploid plants in melon (*Cucumis melo* L.) as a result of gynogenesis induced by irradiated pollen. *Agronomie*.
- Sauton, A., Dumas De Vault, R., 1988. Doubled haploid production in melon (*Cucumis melo* L.). *Proc Eucarpia Meetg on Cucurbitaceae*.
- Sauton, A., 1988. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo* L. *Scientia Horticulturae*, Volume 35, Issues 1–2, Pages 71-75.
- Sauton, A., 1989. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. *Cucurbit Genetics Coop*.
- Sayılır, A., Özzambak, E., 2005. Biber anter kültüründe uygun tomurcuk büyüklüğü tespiti ile besin ortamları karışımlarının ve soğuk uygulama sürelerinin embriyo verimine etkileri üzerine bir araştırma. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 42(3): 1-11.
- Shariatpanahi, M.E., Belogradova, K., Hessamvaziri, L., Heberle-Bors, E., Touraev, A., 2006. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Rep* DOI 10.1007/s00299-006-0205-7.
- Shail, J.W., Robinson, R.W., 1987. Anther and ovule culture of *Cucurbita*. *Cucurbit Genetics Coop*. 10: 92.
- Shrestha, S.L., Kang, W., 2009. Effect of Genotype of Donor Plants on the Success of Anther Culture in Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.) Korean J. Plant Res. 22(6) : 506 – 512.
- Shrestha, S.L., Luitel, B.P., Kang, W.H., 2011. Agro-morphological Characterization of Anther Derived Plants in Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Boogie). *Hort. Environ. Biotechnol.* 52 (2) : 196 - 203.
- Sibi, M., Dumas De Vault, R., Chambonnet, D., 1979. Obtention de plantes haploides par androgenese *in vitro* chez le piment (*C. annuum* L.). *Ann Amel. Plantes*, 29:583-606.

- Sita, Gl., 1997. Gynogenic haploids in vitro. In *Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Volume 29 of the series *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* pp 175-193.
- Smykal, P., 2000. Pollen embryogenesis the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biol Plant* 43:481–489.
- Sneep, J., 1958. The present position of spinach breeding. *Euphytica* 7(1):1-8.
- Song, H., Lou, Q-F., Luo, X-D., Wolukau, J.N., Diao, W-P., Qian, C-T., Chen, J.F., 2007. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 90:245–254.
- Supena, ED., Suharsono, S., Jacobsen, E., Custers, JB., 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep* 25:1–10.
- Summers, W.L., 1997. Haploid Plantlet Production in Tomato, Jain, S.M., Sopory, S.K., and Veilleux, R.E., Eds., In *Vitro Haploid Production in Higher Plants*, Vol. 5, Kluwer Academic Pub., pp. 2190–231.
- Sunderland, N., and Roberts, M., 1979. Cold-treatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann. Bot.* 43:405–414.
- Sugiyama, K., Morishita, M., Nishino, E., 2002. Seedless Watermelons Produced Via Soft -X- Irradiated Pollen. *Hortscience* 37(2) : 292-295.
- Suprunova, T., Shmykova, N., 2008. In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. All-Russian Institute of Vegetable Breeding and Seed, Production. Moscow region, Odintsovo district, p/o Lesnoy Gorodok, 143080, Russia.
- Špika, A.D., Kobiljski, B. D., Hristov, N.S., 2008. Efficiency of Anther Culture Technique in the Production of Wheat Double Haploids. *Front Plant Sci.* 115, S. 35-40.

- Stober, A., Hesse, D., 1997. Spike pretreatments, anther culture conditions, and anther culture response of 17 German varieties of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Breeding Volume 116, Issue 5, Pages 443–447.
- Swaminathan, M.S., Singh, M.P., 1958. X-ray induced somatic haploidy in watermelon. Current Science.
- Svirshchetskaya, A.M., Dolezel, J., 2000. Production And Performance Of Gynogenetic Sugarbeet Lines. Journal of Sugar Beet Research 37 (4).
- Sztangret-Wisniewska, J., Galecka, T., Korzeniewska, A., Marzec, L., Kolakowska, G., Piskurewicz, U., Śmiech, M., Niemirowicz-Szczytt, K., 2006. Characteristics of double-haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) lines resistant to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis* [Berk. et Curt.] Rostovzev). *Cucurbitaceae* 515–526.
- Taner, KY., Yanmaz, R., Kunter, B., Sağıl, Z., Tutluer, M., Peşkircioğlu, H., Uslu, N., 2003. Bazı kabakgıl türlerinde gama ışınlamasının polen canlılığı ve haploid bitki oluşumu üzerine etkileri. VIII. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi, 15-17 Ekim, Kayseri, Bildiri Özetleri, p. 39.
- Taskin, H., 2005. Different applications to improve the embryo quality on stimulation of embryo by anther culture in some pepper genotypes. agris.fao.org.
- Taskin, H., Büyükalaca, S., Keles, D., And Ekbic, E., 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. African Journal of Biotechnology Vol. 10(75), pp. 17116-17121, 28.
- Telmer, CA., Simmonds, DH., Newcomb, W., 1992. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol Plant* 84: 417–424.
- Terzioğlu, Ş., Ellialtıoğlu, Ş. Abak, K. 2000. İnkubasyon Koşullarının Biber Anter Kültüründe Embriyo Oluşumu Üzerine Etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu 11-13 Eylül 2000, Isparta, 223-238.

- Tiainen, T., 1992. The influence of culture conditions on anther culture responses of commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30:211-219.
- Tomaszewska, M., 2012. Effect Of Growth Regulators And Other Components Of Culture Medium On Morphogenesis Of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). In Unfertilised Ovule *In Vitro* Cultures. Acta Agrobotanica. 65 (4):91-100.
- Tuberosa, R., Sanguinetti, M., Conti, S., 1987. Anther culture of eggplant (*Solanum melongena* L.) lines and hybrids, Genetica Agraria, 41: 267-274.
- Tulecke, W., 1964. A haploid tissue culture from the female gametophyte of *Ginkgo biloba* L. Nature, adsabs.harvard.edu.
- Touraev, A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O., Heberle-Bors, E., 1996. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. Sexual Plant Reproduction, Volume 9, Issue 4, pp 209–215.
- Truong-Andre, I., 1988. In vitro haploid plants derived from pollination by irradiated pollen on cucumber. Montfavet (France).
- Van Geyt, J., Speckmann, G.J., K D'halluin, Jr., 1987. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Theoretical and Applied Genetics, Volume 73, Issue 6, pp 920–925.
- Vanous, A.E., 2011. Optimization of doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.). Graduate Theses and Dissertations. Paper 11974. [Http://Lib.Dr.Iastate.Edu/Etd/11974](http://lib.dr.iastate.edu/etd/11974).
- Varghese, T.M., Sharma, D.R., 1981. Studies on anther cultures of tomato-*Lycopersicon esculentum* MILL. - Biol. Plant.23: 414–420.
- Vega, V-P., Morata, B.R., Sifres, A., Seguí-Simarro, J-M., 2013. Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult 112:353–360.

- Vicente, O., Garrido, D., Zarsky, V., Eller, N., Rihova, L., Berenyi, M., Tupy, J., Heberle-Bors, E., 1992. Induction of embryogenesis in isolated pollen cultures of tobacco. In: Ottaviano E.; Mulcahy D. L.; SariGovla M.; Mulcahy G. B. (eds) Angiosperm pollen and ovules. Springer, New York, NY, USA, pp 279–284.
- Wagenaar, S., 1954. A preliminary study of photoperiodic and formative processes in relation to metabolism, with special reference to the effect of night temperature. Meded. LandbHogesch. Wageningen 54-2: 45-101.
- Wang, P., Chen. Y., 1986. A study on the application of C17 medium for anther culture. Acta Botanica Sinica 28: 38-45.
- Wedzony, M., Forster, Bp., Zur, I., Golemice, E., Szechynska-Hebda., Dubas, E., Gotebiowska, G., 2009. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In Edited by: Touraev A, Forster BP, Mohan Jain S. Advances in Haploid Production in Higher Plants; 2009: 1-33.
- Wremerth-Weich, E., Levall., M.V., 2003. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta Vulgaris* L.). Doubled Haploid Production In Crop Plants.
- Xue, G.R., W.Y. Yu, And K.W. Fei. 1983. Watermelon plants derived by in vitro anther culture. Plant Physiol. Commun. 4:40–42.
- Yetişir, H., Sari, N., 2002. A New Method For Haploid Muskmelon (*Cucumis melo* L.) Dihaploidization. Scientia Horticulture. 98 (2003) : 277 – 283.
- Yang, Q., Chauvin, J.E., And Herve, Y., 1992. A study of factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). Plant Cell Organ Culture, 28: 289-296.
- Yanmaz, R., Taner, Y., 1996. In vitro Partenogenetik Haploid Bitki Elde Etme Yönteminin Kavun Islah Programında Kullanılabilirliği Üzerinde Araştırmalar. TÜBİTAK-TBGAG-Kesin Proje Raporu.
- Yongbing, Z., Hongping, Y., Yuan, JJ., Jiongxin, F., Mingzhu, W., Jinfeng, C., 2007. Propagation of haploid melon (*Cucumis melo* L.) in vitro Acta Horticult. Sinica. 34(2): 497-500.

- Yoon, Yj., Lee, Ks., Chang, Sk., 1991. Plant induction by anther culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). J Korean Soc Horticult Sci 32:8–16.
- Yuan, S., Su, Y., Liu, Y., Li, Z., Fang, Z., Yang, L., Zhuang, M., Zhang, Y., LV, H., Sun, P., 2015. Chromosome Doubling of Microspore-Derived Plants from Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) and Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) Front Plant Sci. 6: S.1118.
- Zhou, C., and Yang, H.Y., 1981. Induction of haploid rice plantlets by ovary culture. Plant Sci. Lett. 20: 231–237.





ÖZGEÇMİŞ

13/08/1985 yılında Kocaeli’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kocaeli’de tamamladı. 2004 yılında başladığı Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü’nden 2008 yılında mezun oldu ve aynı yıl içerisinde Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı ve 2010 yılında tamamladı. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda doktora öğrenimine başladı. Hala Bahçe Bitkileri Bölümü’nde doktora çalışmalarına devam etmektedir.