

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇEREZLİK AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.)  
GENOTİPLERİNDE ANDROGENESİS VE HAPLOİD  
BİTKİ ELDE EDİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

**Hazırlayan  
Ahmet SAY**

**Danışman  
Prof. Dr. Mehmet ARSLAN**

**Doktora Tezi**

**Temmuz 2023  
KAYSERİ**

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇEREZLİK AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.)  
GENOTİPLERİNDE ANDROGENESİS VE HAPLOİD  
BİTKİ ELDE EDİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

**Hazırlayan  
Ahmet SAY**

**Danışman  
Prof. Dr. Mehmet ARSLAN**

**Doktora Tezi**

**Temmuz 2023  
KAYSERİ**

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Ahmet SAY

İmza

**“Çerezlik Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Genotiplerinde Androgenesis ve Haploid Bitki Elde Edilmesi Üzerine Araştırmalar”** adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Hazırlayan**

Ahmet SAY

**Danışman**

Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

**Tarımsal Biyoteknoloji ABD Başkanı**

Prof. Dr. Semih YILMAZ

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını yönlendiren ve destekleyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet ARSLAN'a minnettarlığımı sunarım.

Tez çalışmamın yanı sıra lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimlerim süresince benimle yakından ilgilenen, öğretisel yönlendirmeleri, değerli katkıları ve güçlü destekleriyle akademik gelişimime büyük katkı sağlayan sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Satı UZUN'a derin minnettarlığımı sunarım.

Tez çalışmamın tasarım ve uygulama aşamalarında önemli laboratuvar olanakları sağlayan, önerileri, destekleri ve deneyimleriyle bana yardımcı olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hasan PINAR'a minnettarlığımı ifade etmek isterim.

Tez çalışmam süresince bilimsel olarak bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim, her zaman desteğini ve yardımlarını gördüğüm sevgili arkadaşım ve hocam Doç. Dr. Hamdi ÖZAKTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında destek olan tüm hocalarıma ve öğrenci arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doğduğum günden bu yana maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen her zaman yanımda olan annem ve babama başta olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi ederim.

Doktora öğrenimim süresince anlayışı, sabrı ve desteğiyle hep yanımda olan, beraber geçireceğimiz vakitlerinden çaldığım başta eşim Rabia ve oğlum Kerem'e ve hayatlarında yer almaktan büyük mutluluk duyduğum USLU ailesine sonsuz teşekkür ederim.

Ahmet SAY

Temmuz, 2023, KAYSERİ

# ÇEREZLİK AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.) GENOTİPLERİNDE ANDROGENESİS VE HAPLOİD BİTKİ ELDE EDİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Ahmet SAY

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü  
Doktora Tezi, Temmuz 2023  
Danışman: Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

## ÖZET

Bu çalışmada, çerezlik ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) çeşitlerinde (İnegöl Alası ve SH361) androgenesis yoluyla haploid bitki elde etme süreci incelenmiştir. Araştırma sonucunda, farklı çeşitlerde bitki büyüme düzenleyicileri ve sıcaklık uygulamalarının anter kültürü performansı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Yapılan çalışmada farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarının ve bazı kimyasal uygulamalarının kallus oluşumu üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Özellikle, 0.5 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren besin ortamlarının anterlerde yüksek oranda kallus oluşumuna neden olduğu ve PVP ile AgNO<sub>3</sub> kullanımıyla bu oranın daha da arttığı tespit edilmiştir. Çeşitler arasında farklılıklar olduğu ve bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarının ve kimyasalların çeşitler üzerinde farklı etkiler gösterdiği belirlenmiştir.

Ayrıca, farklı büyüme düzenleyicileri ve kazein hidrolizatının anter kültürü ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Büyüme düzenleyicilerinin genotiplere bağlı olarak farklı etkiler gösterdiği ve kazein hidrolizatının kallus oluşumu üzerinde pozitif bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Özellikle, İnegöl Alası çeşidinde 0.5 mg/l BAP + 2.0 mg/L NAA kullanımının eksplantlarda yüksek kallus oluşumu sağladığı tespit edilmiştir. Her iki çeşidde de elde edilen kallusların bazılarında bitki rejenerasyonu sağlanmış ve düşük miktarda da olsa sürgün veren eksplantlarda birden fazla sürgün elde edilmiştir. Kazein hidrolizatının kullanımıyla sürgün oluşturan eksplant oranı artmıştır. Çalışmada elde edilen rejenerant bitkilerde yapılan flow sitometri analiz sonuçları rejenerantların hiçbirinin haploid kromozom setine sahip olmadıklarını göstermiştir. Tez çalışmasında kullanılan yöntemlerle haploid bitki elde etmek için androgenesis yoluyla çok sayıda bitki rejenerasyonu elde edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Çerezlik ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), haploid bitki, anter kültürü

# RESEARCH ON ANDROGENESIS AND HAPLOID PLANT PRODUCTION IN CONFECTIONERY SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) GENOTYPES

Ahmet SAY

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

PhD Thesis, July 2023

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

## ABSTRACT

In this study, the process of obtaining haploid plants through androgenesis in confectionery sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars (İnegöl Alası and SH361) was investigated. As a result of the research, the effects of plant growth regulators and temperature applications on anther culture performance in different varieties were investigated.

In the study, it was observed that different combinations of plant growth regulators and some chemical applications had a significant effect on callus formation. In particular, it was determined that nutrient media containing 0.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA caused a high rate of callus formation in the anthers and this rate increased even more with the use of PVP and AgNO<sub>3</sub>. It was determined that there were differences among the varieties and plant growth regulator combinations and chemicals showed different effects on the varieties.

Furthermore, the effect of different growth regulators and casein hydrolysate on anther culture and plant regeneration was investigated. It was observed that growth regulators showed different effects depending on genotypes and casein hydrolysate had a positive effect on callus formation. Especially, it was determined that the use of 0.5 mg/l BAP + 2.0 mg/L NAA on İnegöl Alası variety provided high callus formation in explants. Plant regeneration was achieved in some of the callus obtained in both cultivars and multiple shoots were obtained in explants that generating shoots, even in low amounts. The use of casein hydrolysate increased the rate of shoot formation. Flow cytometry analysis showed that none of the regenerated plants had a haploid chromosome set. It was concluded that a large number of plant regenerations should be obtained through androgenesis to have haploid plants with the methods used in the thesis study.

**Keywords:** Confectionery sunflower (*Helianthus annuus* L.), haploid plant, anther culture

## İÇİNDEKİLER

### ÇEREZLİK AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.) GENOTİPLERİNDE ANDROGENESİS VE HAPLOİD BİTKİ ELDE EDİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK .....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL ONAY .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
KISALTMALAR .....	xi
TABLO LİSTESİ.....	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
GİRİŞ .....	1

## 1. BÖLÜM

### GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Ayçiçeğinde Islah Teknikleri.....	8
1.1.1. Klasik Islah Teknikleri .....	9
1.1.2. Biyoteknolojik Islah Teknikleri .....	9
1.2. <i>İn vitro</i> Tekniklerin Bitki Islahında Kullanım Alanları .....	9
1.2.1. Haploid Kültür Tekniği .....	10
1.3. Haploid Bitkilerin Genel Özellikleri .....	11
1.4. Anter Kültürü.....	11
1.4.1. Anter Kültürünü Etkileyen Faktörler.....	12
1.5. Ginogenesis (Dişi Gamet) Yoluyla Haploid Bitki Elde Etme .....	13
1.5.1. Ovül ve Ovaryum Kültürleri .....	13
1.5.2. Eksik veya Yetersiz Polenlerle Tozlama .....	14
1.6. Haploid Bitkilerde Kromozom Katlanması.....	14
1.7. Araştırmanın Amacı .....	16
1.8. Araştırmanın Önemi.....	16
1.9. Literatür Araştırması .....	17

## 2. BÖLÜM

### YÖNTEM VE MATERYAL

<b>2.1. Materyal.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Yöntem .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Kapitulum Alımı.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2. Uygun Dönemdeki Kapitulumların ve Anterlerin Belirlenmesi.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.3. Kapitulumların Sterilizasyonu ve Anter İzolasyonu .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.4. Anter Kültürü Koşulları ve Ön Uygulamaları .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.4.1. Farklı Çeşit ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Anter Kültürü Performansına Etkisi .....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.4.2. Farklı Çeşit, Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Sıcaklık İnkübasyon Süresi Uygulamalarının Anter Kültürü Performansına Etkisi .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2.4.3. Farklı Dozlarda 2,4-D İçeren Ortamlarda Anter Kültürü.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2.4.4. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri İçeren Ortamlarda Kazeinin Anter Kültürüne Etkisi.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2.4.5. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri, Aktif Kömür ve Farklı Uygulamalar .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2.5. Ploidy Seviyesinin Belirlenmesi .....</b>	<b>39</b>

## 3. BÖLÜM

### BULGULAR VE TARTIŞMA

<b>3.1. Uygun Yaştaki Kapitulumların ve Anterlerin Belirlenmesi .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2. Kapitulumların Sterilizasyonu ve Anter İzolasyonu .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3. Anter Kültür Koşulları ve Ön Uygulamaların Bulguları.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.1. Farklı Çeşit ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Anter Kültürü Performansına Etkisi.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.2. Farklı Çeşi, Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Sıcaklık İnkübasyon Süresi Uygulamalarının Anter Kültürü Performansına Etkisi.....</b>	<b>48</b>
<b>3.3.3. Farklı Dozlarda 2,4-D İçeren Ortamlarda Anter Kültürü.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3.4. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri İçeren Ortamlarda Kazeinin Anter Kültürüne Etkisi.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3.5. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri, aktif kömür ve uygulamalar .....</b>	<b>65</b>

## 4. BÖLÜM

### SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Sonuç ve Öneriler.....	69
4.1.1. Uygun Yaştaki Kapitulumların ve Anterlerin Belirlenmesi .....	69
4.1.2. Kapitulumların Sterilizasyonu ve Anter İzolasyonu .....	69
4.1.3. Anter Kültür Koşulları ve Ön Uygulamaların Kallus oluşumu ve Rejenerasyonuna etkisi.....	70
4.3.3.1. Farklı Çeşit ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Anter Kültürü Performansına Etkisi .....	70
4.1.3.2. Farklı Çeşi, Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Sıcaklık İnkübasyon Süresi Uygulamalarının Anter Kültürü Performansına Etkisi .....	71
4.1.3.3. Farklı Dozlarda 2.4-D İçeren Ortamlarda Anter Kültürü.....	72
4.1.3.4. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri İçeren Ortamlarda Kazeinin Anter Kültürüne Etkisi.....	74
4.1.3.5. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Uygulamaların Anter Kültürüne Etkisi.....	75
KAYNAKÇA .....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	87

**KISALTMALAR**

%	: Yüzde
<sup>0</sup> C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
da	: Dekar
g	: Gram
Gb	: Gigabite
L	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
n	: Haploid kromozom sayısı
2n	: Diploid kromozom sayısı
2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit
BA	: Benzil Adenin
BAP	: Benzil Amino Pürin
DH	: Double haploid
MS	: Murashige ve Skoog besin ortamı (1962)
NAA	: Naftalen Asetik Asit
IAA	: İndol-3 Asetik Asit
FAO	: Food and Agriculture Organization

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Çalışmada kullanılan farklı BAP, NAA, AgNO <sub>3</sub> , PVP, Kinetin ve Aktif kömür uygulamalarıyla oluşturulan gruplar .....	34
Tablo 2.	<i>İn vitro</i> rejenerasyon sırasında kullanılan MS temel besin ortamı içeriği (Murashige ve Skoog, 1962). .....	34
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve kimyasalların konsantrasyon ve kombinasyonları .....	35
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve sıcaklık uygulamaları.....	36
Tablo 5.	Farklı dozlarda 2.4-D içeren ortam kombinasyonları .....	37
Tablo 6.	Farklı büyüme düzenleyici içeren ortamlarda kazeinin kullanımı .....	38
Tablo 7.	Farklı bitki büyüme düzenleyicileri, aktif kömür ve uygulamalar .....	39
Tablo 8.	Farklı bitki büyüme düzenleyicisi ve kimyasal uygulamalarının çerezlik ayçiçeği çeşitlerinde kallus oluşturan anter yüzdesine ait varyans analiz tablosu .....	46
Tablo 9.	Farklı bitki büyüme düzenleyicisi ve kimyasal uygulamalarının çerezlik ayçiçeği çeşitlerinde kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar .....	47
Tablo 10.	Farklı çeşit, bitki büyüme düzenleyicileri ve sıcaklık inkübasyon süresinin kallus oluşturan anter yüzdesine ait varyans analiz tablosu.....	50
Tablo 11.	Farklı çeşit, bitki büyüme düzenleyicileri ve sıcaklık inkübasyon süresinin kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar .....	51
Tablo 12.	Farklı dozlarda 2.4-D içeren ortamlarda anter kültürünün kallus oluşturan anter yüzdesine ait varyans analiz tablosu .....	52
Tablo 13.	Farklı dozlarda 2.4-D içeren ortamlarda anter kültürünün kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar.....	53
Tablo 14.	Farklı büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda kazeinin kallus oluşturan anter yüzdesine ait varyans analiz tablosu .....	54
Tablo 15.	Farklı büyüme düzenleyicisi içeren ortamlarda kazeinin kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar.....	55
Tablo 16.	Farklı bitki büyüme düzenleyicileri, aktif kömür ve uygulamalarının kallus oluşturan anter yüzdesine ait varyans analiz tablosu .....	66
Tablo 17.	Farklı bitki büyüme düzenleyicileri, aktif kömür ve uygulamalar kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar.....	67

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Ayçiçeğinin kapitulum ve tüpsü çiçeğinin görüntüsü.....	3
Şekil 2.	2011-2021 Yılları arasında Dünya ayçiçeği üretim miktarı değişim grafiği .	4
Şekil 3.	2011-2021 Yılları arasında ayçiçeği üretiminde önemli ilk 10 ülke.....	4
Şekil 4.	2018-2022 Yılları arasında Dünya ayçiçeği üretim ve tüketim miktarı ile üretim alanı grafiği.....	4
Şekil 5.	2011-2021 yıllarına ait kıtalara göre ayçiçeği üretim oranları.....	5
Şekil 6.	2011-2021 yılları arasında ülkeler bazında ortalama ayçiçeği üretim miktarı .....	5
Şekil 7.	2017-2021 Yılları arasında Türkiye ayçiçeği üretim alanı ve miktarı grafiği .....	6
Şekil 8.	2011-2021 Yılları arasında Türkiye ayçiçeği üretim grafiği.....	7
Şekil 9.	Çalışmada kullanılan çerezlik ayçiçeği çeşitleri .....	28
Şekil 10.	a, c) 2018 Sera koşullarında yetiştirilen ayçiçeği bitkileri, b, d) Sera koşullarında yetiştirilen ayçiçeğinin henüz açmamış apikal kapitulumu.....	29
Şekil 11.	2019-2020 sera ve arazi koşullarında kademeli yetiştirilen ayçiçeği bitkileri .....	30
Şekil 12.	2021 Sera koşullarında kademeli olarak ekimi yapılan ve yetiştirilen ayçiçeği bitkileri.....	30
Şekil 13.	a) Uygun anterlerin belirlenmesi, b) Ayçiçeği anterlerinin görünümü c) Polen oluşum dönemine girmiş anter .....	31
Şekil 14.	a,b Tüp çiçek tomurcuklarının gruplandırılması, c) ayçiçeği kapitulumun yan kesitinden farklı gelişim evresindeki tüp çiçeklerinin görünümü d) açmamış tüp çiçek tomurcukları, stigma ve anterlerin stero mikroskop altında görüntüsü.....	32
Şekil 15.	Brakte uçları kesilmiş ayçiçeği kapitulumları ve sterilizasyonu.....	33
Şekil 16.	Kavonoz içinde flow sitometri analizleri yapılmak üzere gönderilen bitkiler .....	41
Şekil 17.	a) Ayçiçeği kapitulumun yan kesitinden tüp çiçeklerinin görünümü ve uygun anterlerin bulunduğu bölge b) asetokarmin boya ile boyanıp tek çekirdekli dönemin mikroskop (Zeiss Primostar) altında incelenmesi .....	42
Şekil 18.	Ayçiçeği anterlerinin sırasıyla a) % 1 cıva klorür b) % 2 cıva klorür c) % 3 cıva klorür ile sterilizasyon sonrası meydana gelen doku kararması .....	43

Şekil 19.	Ayçiçeği anterlerinde 1,0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l NAA'ın tek başına ve 1,0 mg/l AgNO <sub>3</sub> ile 1,0 g/l PVP içeren besin ortamlarında gelişen kök oluşumlarından görüntüler .....	44
Şekil 20.	Ayçiçeği anterlerinde 0.5mg/l BAP+0.5mg/l NAA'ın 1,0 mg/l AgNO <sub>3</sub> ve 1,0 g/l PVP içeren besin ortamlarında gelişen kalluslardan görüntüler .....	45
Şekil 21	a) Ovaryumlardan izole edilerek embriyo teşvik ortamlarına ekimi yapılan ovüller b) Anterlerden izole edilerek embriyo teşvik ortamlarına ekimi yapılan anterler .....	46
Şekil 22.	Ayçiçeği anterlerinde sıcaklık uygulaması sonrasında gelişen kalluslardan görüntüler .....	49
Şekil 23.	2.4-D içeren ortamlarda anterleden gelişen kalluslar .....	53
Şekil 24.	Kültür ortamlarına ekimi yapılan anterler .....	56
Şekil 25.	Denemede 1,0 mg/l BAP+2.0 mg/l NAA+500 mg/l CH içeren ortamlardan 0.5 mg/l KINETIN +1,0 g/l PVP içeren MS ortamlarına aktarım sonrası gelişim a) kallus oluşumu b) kılcal kök oluşumları ve c) embriyonik kalluslar .....	57
Şekil 26.	Denemede 1,0 mg/l BAP+2.0 mg/l NAA içeren ortamlardan 0.5 mg/l KINETIN +1,0 g/l PVP içeren MS ortamına aktarım sonrası gelişim a) kallus oluşumu ve b) kılcal kök oluşumları .....	58
Şekil 27.	Denemede 0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l 2.4-D+500 mg/l CH içeren ortamlardan 0.5 mg/l KINETIN +1,0 g/l PVP içeren MS ortamına aktarım sonrası gelişim a) kallus oluşumu ve b) somatik embriyo oluşumları .....	59
Şekil 28.	Denemede 0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l 2.4-D içeren ortamlardan 0.5 mg/l KINETIN +1,0 g/l PVP içeren MS ortamına aktarım sonrası gelişim a) kallus oluşumu ve b) somatik embriyo oluşumları .....	60
Şekil 29.	Oluşan somatik embriyo ve bitkiciklerin 0.2 mg/l BAP içeren MS ortamlarına aktarımı .....	61
Şekil 30.	Oluşan bitkiciklerin 0.2 mg/l BAP içeren MS ortamlarda alt kültüre alınması .....	62
Şekil 31.	Oluşan bitkiciklerin 0.2 mg/l BAP içeren MS ortamlarda alt kültür sonrası gelişimleri .....	63
Şekil 32.	Bitkiciklerin MS ortamında alt kültür sonrası kapitulum oluşturmaları .....	64
Şekil 33.	Bitkilerin a) <sup>1</sup> / <sub>2</sub> MS, 0.5 mg/l IAA ve b) <sup>1</sup> / <sub>2</sub> MS, 0.5 mg/l NAA içeren ortamlarda köklendirilmesi .....	65

- Şekil 34. Denemede 2.0mg/l NAA+1,0mg/l BAP içeren ortamda gelişme gösteren anterlerin 0.5mg/l Kinetin+1,0g/l PVP ilaveli ortama aktarım yapıldıktan sonraki gelişme durumları.....67
- Şekil 35. 4,0mg/l NAA+0.5mg/l BAP+10,0mg/l AgNO<sub>3</sub> içeren besin ortamlarında anterlerin durumu ..... 68



## GİRİŞ

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), Asteraceae familyasına ait, tarım alanında geniş bir ekonomik öneme sahip olan bir bitki türüdür. Hem yağlı tohumları hem de yaprakları ve sapları çeşitli endüstriyel ve tarımsal amaçlarla kullanılmaktadır (Semerci ve ark., 2017). Ayçiçeği, geniş adaptasyon yeteneği ile farklı iklim ve toprak koşullarında yetiştirilebilmesi nedeniyle dünya genelinde yaygın bir tarım ürünüdür (Miladinović ve ark., 2019). Ülkemizde günebakan, güneş çiçeği ve şemşamer (Kayseri) olarak da isimlendirilen ayçiçeğinin 67 civarında yabani türü bulunmakla beraber *Helianthus* cinsinin farklı ploidi seviyesine sahip tek yıllık ve çok yıllık yabani türleri de mevcuttur (Jan, 1997; Kaya, 2014). Kökeni Amerika kıtası olup, İki farklı türde kültüre alınmış ayçiçeği bulunmaktadır. *Helianthus annuus* L. (ayçiçeği) tek yıllık bir bitki olup, yağlı tohumları nedeniyle ekonomik açıdan önemlidir. Diğer tür olan *Helianthus tuberosus* L. (Yer elması) ise çok yıllık bir bitki olup, rizomları besin maddesi olarak kullanılmaktadır (Heiser, 1978). Kupicha (1975)'ya göre Türkiye'de her iki türde bulunmaktadır.

Ayçiçeği, Peru ve Meksika'nın yerli bitkisi olarak kabul edilir. Türkiye'ye ilk kez 1. Dünya Savaşı sonrasında, Romanya ve Bulgaristan'dan gelen göçmenler tarafından getirildiği düşünülmektedir. İlk olarak Trakya'da üretilen ayçiçeği daha sonra Türkiye'nin diğer bölgelerine de yayılmıştır (İncekara, 1972; İlisulu, 1973; Arıoğlu, 1999). Ayçiçeği, yağ üretimi için yaygın bir şekilde yetiştirilmesine rağmen, çerez olarak da tüketilebilen bir bitkidir. Ayrıca, güzel görünümü nedeniyle süs bitkisi olarak da popülerdir (Filippi ve ark., 2014).

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), geniş kullanım alanları ve besleyici özellikleri nedeniyle tarımsal üretimde önemli bir yere sahip olan bitkilerden biridir. Ayçiçeği, düşük karbonhidrat içeriği ile protein, vitamin ve mineral açısından zengin tohumlara sahiptir. İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan ayçiçeği tohumları, doymamış yağ asitleri bakımından zengin olup kalp rahatsızlığı riskini azaltabilir. Ayçiçeğinin

tohumlarındaki linoleik asit miktarı % 51 ila % 73 arasında değişirken, oleik asit miktarı % 14 ila % 37 arasında değişebilir (Fick ve Miller, 1997).

Türkiye'de de ayçiçeği üretimi önemli bir tarımsal faaliyettir, Türkiye'nin en fazla ekim alanına ve üretim miktarına sahip yağlı tohum bitkisidir ve dünya genelinde önemli bir yağ bitkisidir. Ayçiçeği tohumları, yüksek yağ içeriği (% 22-50) nedeniyle bitkisel ham yağ üretimi bakımından önemli bir kaynak oluşturmaktadır ve Türkiye, bitkisel yağ ihtiyacının yaklaşık % 50'sini ayçiçeğinden karşılamaktadır. Dünya bitkisel ham yağ üretiminin % 9.52'si ayçiçeği yağından elde edilirken, Türkiye'de bitkisel ham yağ üretiminin % 46.00'ı ayçiçeği yağından sağlanmaktadır. Ayçiçeği, sıvı yağ ve margarin sanayinde kullanılabileceği gibi, çerez olarak da yaygın şekilde tüketilmektedir. Ayrıca ayçiçeği küspesi hayvan yemi ve silaj olarak da değerlendirilebilmektedir (Semerci, 2011; Semerci Durmuş, 2021; USDA, 2020).

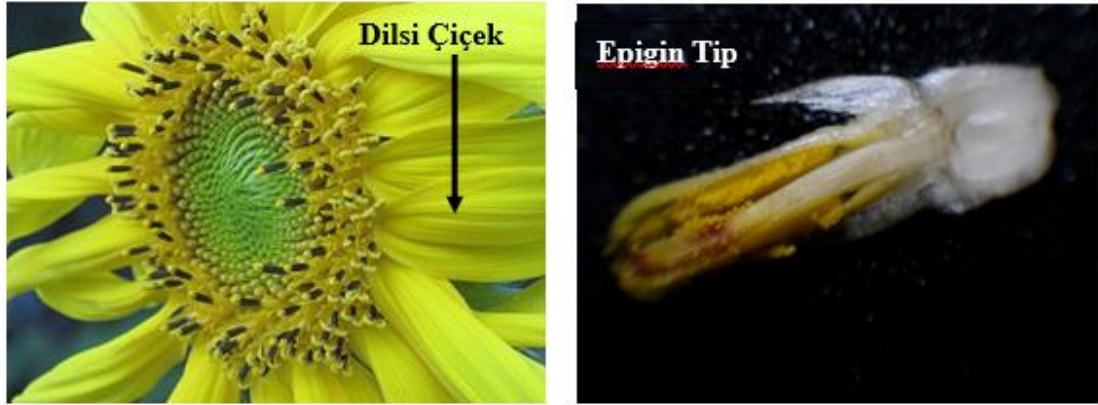
Ayçiçeği, sadece yağlık kullanımı için değil, aynı zamanda çeşitli endüstriyel amaçlar için de faydalar sağlamaktadır. Ayçiçeği tohumunun kabuğu, sapı ve tablaları, kağıt üretiminde veya yakacak olarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra, ayçiçeği bitkisinin yakılan sap ve tablalarının külleri, yüksek potasyum içerdiği için doğal gübre olarak kullanılabilir. Ayçiçeği, münavebe sistemi içinde ekildiği zaman, kendisinden sonra ekilecek bitkilere havalanmış ve yabancı ot mücadelesi yapılmış temiz bir arazi bırakarak, çapa bitkisi olarak da faydalar sağlamaktadır (Eğilmez, 1977).

Ayçiçeği, kuraklık ve soğuğa karşı dayanıklılığı ile tanınan bir bitkidir. Aynı zamanda, kumlu veya killi fark etmeksizin birçok farklı toprak yapısında başarılı bir şekilde yetiştirilebiliyor. Ayçiçeği bitkisi, yüksek adaptasyon yeteneği sayesinde geniş bir coğrafyada üretilmektedir (Goyne ve Hemmer, 1982; Gül, 2013). Fakat, ayçiçeği verimi ve kalitesini belirleyen unsurların, çeşitlere, topraktaki besin elementlerinin farklılığına ve ekolojik ortama bağlı olarak değişebileceği belirlenmiştir (Coşge ve Ulukan, 2005; Pekcan ve Esendal, 2015; Erbaş ve Şenates, 2020).

### **Ayçiçeğinin çiçek morfolojisi**

*Asteraceae* familyası, kapitulum adı verilen çiçek yapısıyla diğer bitki ailelerinden ayrılır. Kapitulum ilk oluştuğunda braktelerle kaplıdır ve kapitulum büyüdükçe brakteler açılır ve kapitulumun kenarlarına iki sıra halinde dizilir. Dilsiz ve tüpsü çiçek olmak üzere iki

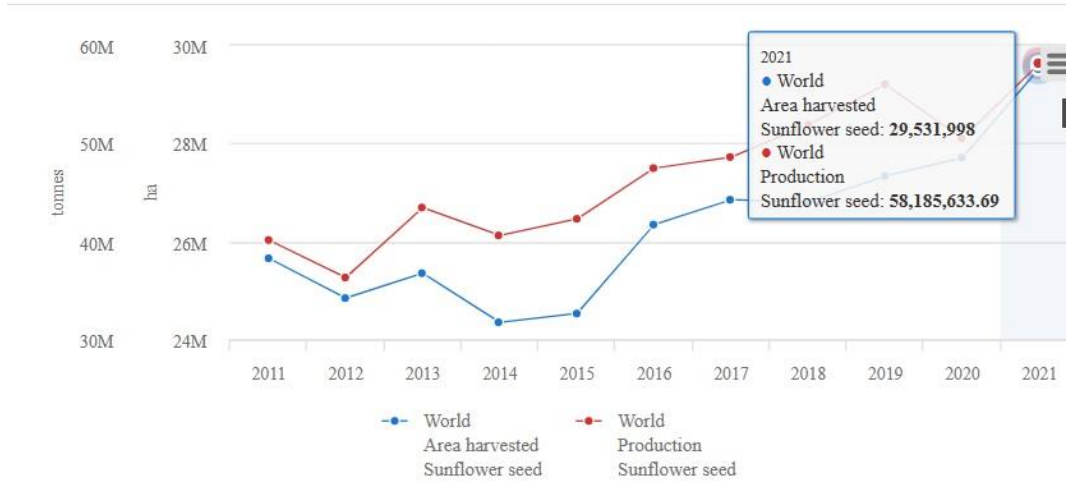
farklı tipte çiçek bulunur. Dilsî çiçekler, kapitulunun etrafında yer alır ve steril özellik gösterirler. Bu çiçeklerde anterler bulunmaz fakat pistil, stigma ve stilus bulunur. Tüpsü çiçekler ise disk şeklindeki kapitulunun çevresinde bulunur ve fertildirler. Bu çiçeklerde hem pistil hem de stamenler bulunur. Ayçiçeği çiçekleri ise epigin tiptedir, yani petaller ve stamenler ovaryumun üzerinde yer alır (Hu, 2010), (Şekil 1).



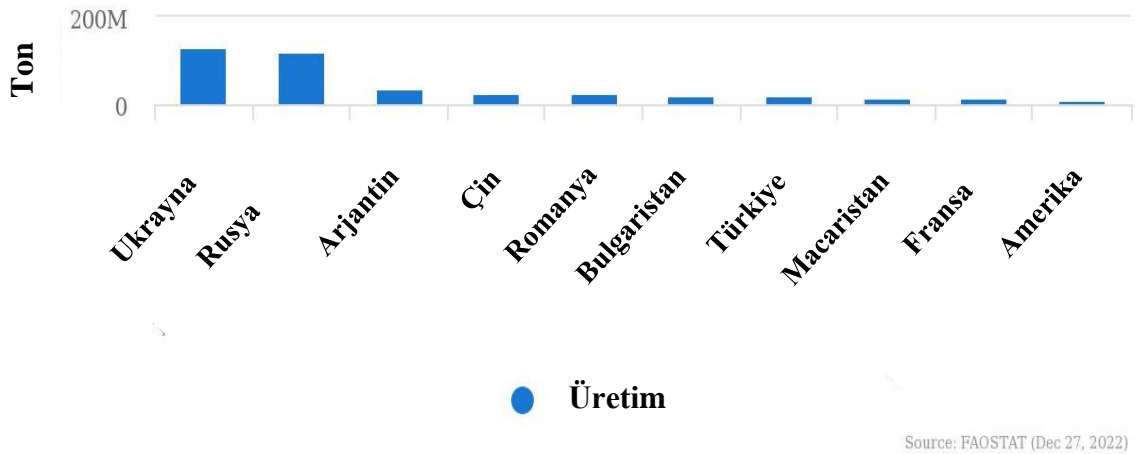
Şekil 1. Ayçiçeğinin kapitulumu ve tüpsü çiçeğinin görüntüsü

### Dünya’da ve Türkiye’de Ayçiçeği Tarımı

Dünya çapında ayçiçeği üretimi, son on yılda (2011-2021) sürekli artarak devam etmektedir (Şekil 2). 2011-2021 yılı verilerine göre, Ukrayna dünya genelinde en fazla ayçiçeği üretimi gerçekleştiren ülke konumundadır. Rusya, Arjantin, Çin ve Romanya da dünya ayçiçeği üretiminde en yüksek paya sahip diğer ülkeler arasında yer almaktadır. İstatistiksel verilere göre, beş ülke dünya ayçiçeği üretiminin yarısından fazlasını gerçekleştirmişlerdir (Şekil 3). 2023 yılına ilişkin tahminlere göre, küresel ayçiçeği üretimi bir önceki yıla göre % 11.6 oranında azalacağı ve 50.7 milyon ton olacağı öngörülmektedir (Şekil 4). Bu düşüşün özellikle Ukrayna, Rusya ve Moldova’da yaşanması beklenmektedir. Arjantin, Amerika Birleşik Devletleri, Sırbistan, Türkiye ve Avrupa Birliği’nde ise üretim artışı beklenmektedir ancak bu artışın, toplam kayıpları telafi etmeye yetmeyeceği düşünülmektedir (Anonim, 2022d). Ayçiçeği, dünya genelinde farklı bölgelerde üretilmektedir. Bölgesel olarak yapılan incelemelerde, Avrupa kıtası, toplam üretimin % 71.9’unu gerçekleştirmektedir (Şekil 5). Ardından, Asya, Amerika, Afrika ve Okyanusya bu sırayı takip etmektedir. Bu bölgelerin ayçiçeği üretim miktarları, dünya genelindeki toplam üretimin dağılımını belirlemektedir (Şekil 6).

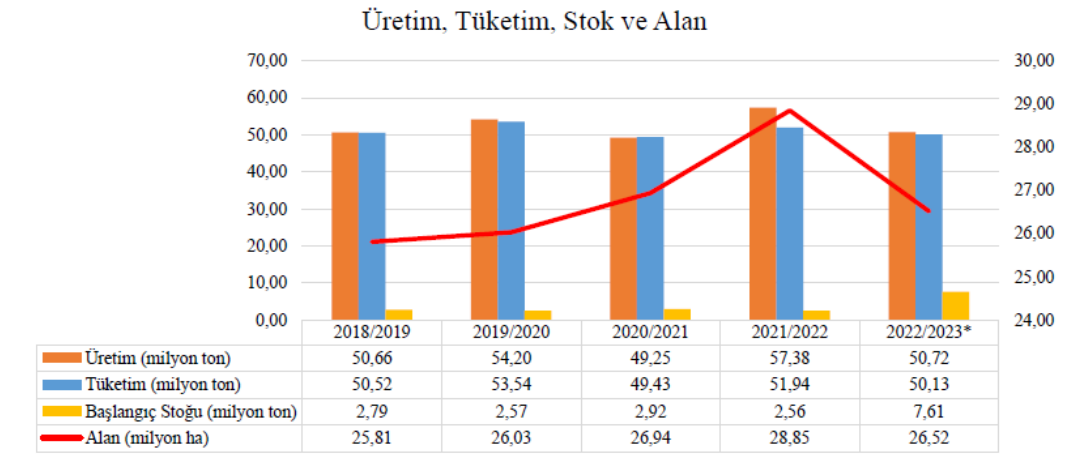


Şekil 2. 2011-2021 Yılları arasında Dünya ayçiçeği üretim miktarı değişim grafiği (FAO, 2022).

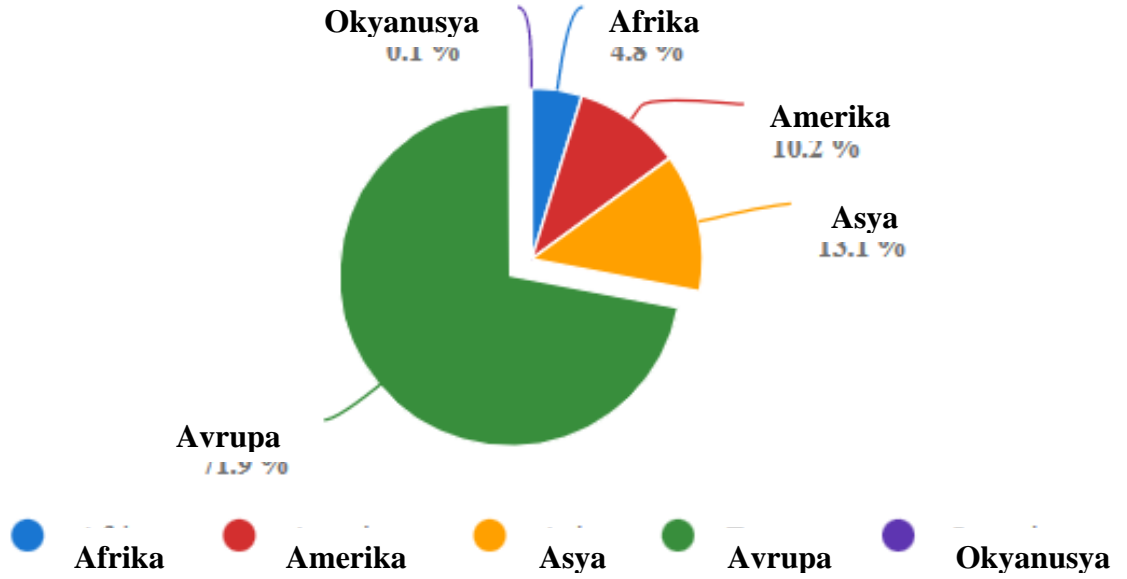


Source: FAOSTAT (Dec 27, 2022)

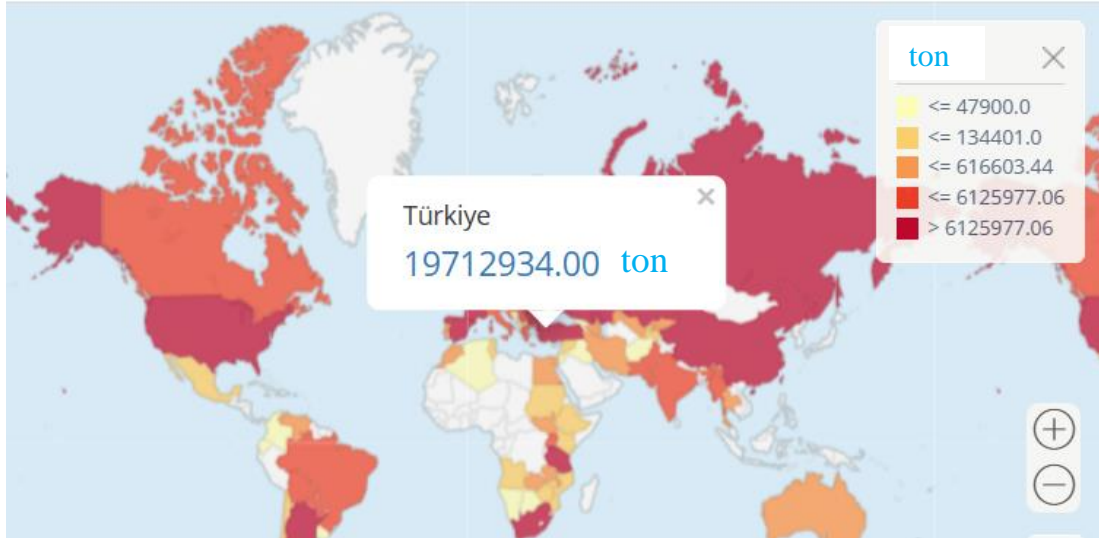
Şekil 3. 2011-2021 Yılları arasında ayçiçeği üretiminde önemli ilk 10 ülke (FAO, 2022).



Şekil 4. 2018-2022 Yılları arasında Dünya ayçiçeği üretim ve tüketim miktarı ile üretim alanı grafiği (Kaynak: USDA, \*Öngörü, <https://www.tarimorman.gov.tr/> erişim tarihi Aralık 2022 )



Şekil 5. 2011-2021 yıllarına ait kıtalara göre ayçiçeği üretim oranları (FAO, 2022).

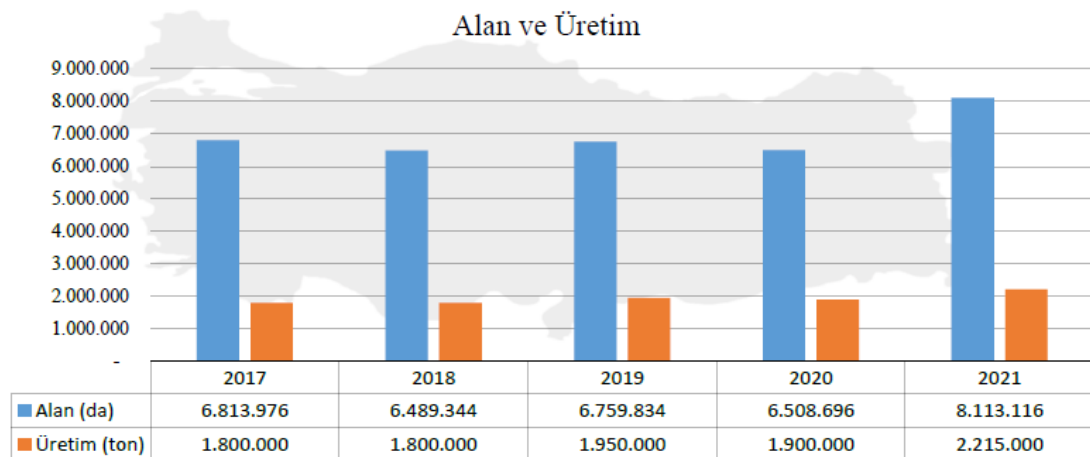


Şekil 6. 2011-2021 yılları arasında ülkeler bazında ortalama ayçiçeği üretim miktarı (FAO, 2022).

2011-2021 yılları arasında dünya genelinde ayçiçeği üretiminde önemli bir paya sahip olan Türkiye, aynı zamanda son 10 yılda üretim miktarı ve alanı bakımından da sürekli bir artış göstermiştir. Türkiye ayçiçeği üretimindeki başarısını devam ettirerek, dünya genelindeki konumunu daha da güçlendirmiştir.

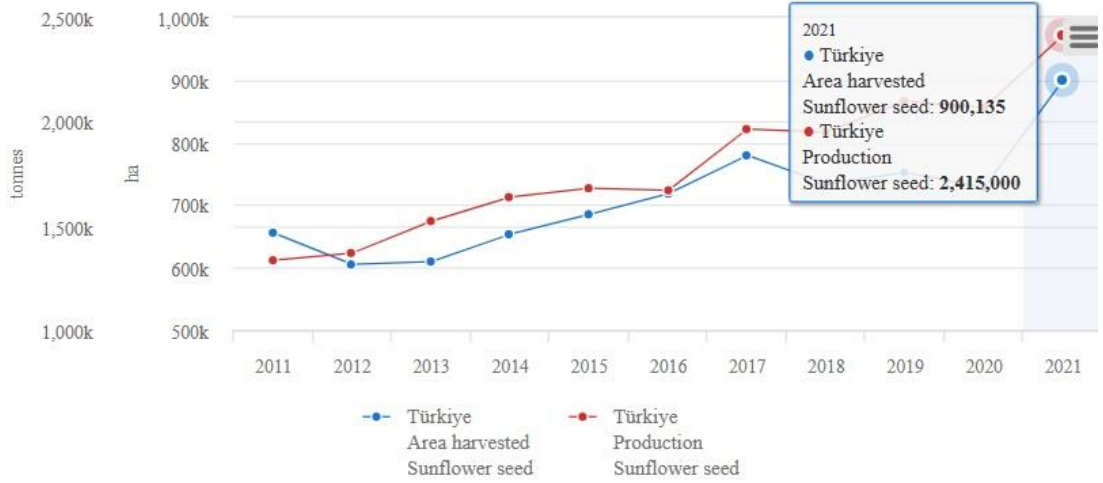
Dünya genelindeki ayçiçeği üretiminde çerezlik ayçiçeğinin payı oldukça sınırlı olsa da Türkiye gibi bazı ülkelerde çerezlik ayçiçeğinin üretimi oldukça önemlidir. 2020 yılı

ayçiçeği verileri incelendiğinde, dünya genelindeki toplam ayçiçeği üretiminin yaklaşık % 2.6'sı çerezlik ayçiçeği olarak üretilmiştir. Türkiye'de ise, ayçiçeği üretiminin % 12.0'si çerezlik ayçiçeği olarak üretilmiştir (Anonim, 2022a, Canlı, 2022). Türkiye, ayçiçeği üretiminde oldukça önemli bir yere sahip olup, İstatistik verilerine göre 2020 yılında toplam ayçiçeği ekim alanı 6.508.696 dekar, üretim miktarı ise 1.900.000 ton iken, 2021 yılında ise üretim alanı 8.113.116 dekara ve üretim miktarı ise 2.215.000 tona yükselmiştir (Şekil 7). Son on yılın verilerine bakıldığı zaman ise Türkiye ayçiçeği üretim miktarında genel olarak artış göstermiştir (Şekil 8). Türkiye'de çerezlik olarak yetiştirilen bitkiler arasında yerfıstığı, kabak çekirdeği, cin mısırı ve çerezlik ayçiçeği öne çıkmaktadır. Bu bitkiler özellikle özel gün ve dönemlerde ve gıda sektöründe katkı maddesi olarak tüketilmektedir. TÜİK'in 2021 yılı verilerine göre, bu bitkilerin üretim miktarları; kabak çekirdeği için 64.861 ton, yerfıstığı için 234.167 ton ve çerezlik ayçiçeği için yaklaşık 200.000 ton civarındadır (Anonim, 2022b). Ayçiçeği yetiştiriciliği yapılan alanlarda ortalama verim 267.99 kg/da (yağlık ayçiçeği: 273.00 kg/da, çerezlik ayçiçeği: 224.00 kg/da) olarak kaydedilirken, üretim miktarı ise yaklaşık olarak 2.415.000 ton (yağlık ayçiçeği: 2.215.000 ton, çerezlik ayçiçeği: 200.000 ton) olarak belirlenmiştir. Türkiye'de en yüksek çerezlik ayçiçeği üretimi Kayseri (29.040 ton), Aksaray (29.756 ton), Denizli (27.452 ton), Kahramanmaraş (17.993 ton) ve Bursa (15.433 ton) gibi illerde yapılmaktadır. İzmir koşullarında yetiştirilen çerezlik ayçiçeği ise 355.00 kg/da verim ile diğer illere göre daha fazla verimlilik sağlamaktadır. Bursa ili ise 322.00 kg/da verim ile çerezlik ayçiçeği üretiminde ikinci sırayı almaktadır (Anonim, 2022c).



Şekil 7. 2017-2021 Yılları arasında Türkiye ayçiçeği üretim alanı ve miktarı grafiği (Anonim, 2022d).

2011 - 2021



Şekil 8. 2011-2021 Yılları arasında Türkiye ayçiçeği üretim grafiği (FAO, 2022)

Yağlık ve çerezlik ayçiçeği olarak üretimi yapılan ülkemizde, çerezlik ayçiçeği üretimi genellikle Doğu ve İç Anadolu Bölgesi'nde yoğunlaşırken, yağlık ayçiçeği üretimi büyük ölçüde Trakya Bölgesi'nde gerçekleştirilmektedir (Anonim, 2022d).

Bu çalışmanın amacı, geleneksel bitki ıslahı yöntemlerinden farklı olarak, doğal döllenme yerine erkek üreme hücrelerinin (polen) mikrospor aşamasındayken tespit edilip laboratuvar koşullarında kültüre alınması ve haploid bitki üretiminin gerçekleştirilmesidir. Haploid bitkiler, genetik araştırmalarda ve bitki ıslahında önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma, çerezlik ayçiçeği genotiplerinde androgenesis ve haploid bitki elde etme sürecini ayrıntılı bir şekilde inceleyerek, bu tekniklerin kullanımının bitki ıslahında yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermeyi hedeflemektedir. Elde edilen sonuçlar, bitki ıslahında genetik varyasyonun artırılması, hibrit çeşit ıslahında kullanılan dihaploid hatların geliştirilmesi, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı yüksek verimli çeşitlerin ıslahı gibi hedeflere ulaşmada önemli katkılar sağlayacaktır.

# 1. BÖLÜM

## GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

### 1.1. Ayçiçeğinde Islah Teknikleri

Bitki ıslah çalışmalarının, ayçiçeği gibi ekonomik öneme sahip bitkilerin kültüre alınması ile birlikte binlerce yıl önce başladığı söylenebilir. Tarım öncesi dönemde insanlar, tohumları belirli bir zamanda toprağa ekmeyi öğrenmiş ve bu bitkilerin kültürlerine başlamışlardır. Kültür bitkileri, doğal varyasyondan yararlanarak ve klasik bitki ıslah yöntemleri (seleksiyon, mutasyon, melezleme vb.) kullanılarak geliştirilmiştir. Klasik bitki ıslahı ile özellikle melez çeşitlerin kullanımı, ürün miktarı ve kalitesinde önemli artışlar sağlamıştır, ancak hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık gibi diğer tarımsal özelliklerde aynı başarı sağlanamamıştır (Ulukan, 2007). Bitki genetik mühendisliği, bitkilerin özelliklerini değiştirme ve geliştirme amacıyla kullanılan bir teknolojidir. Bu teknoloji sayesinde bitkilerin doğal özellikleri genetik modifikasyon yoluyla değiştirilebilmekte ve bu sayede çeşitli hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılıkları artırılabilir. Ayrıca bitki genetik mühendisliği ile farklı türler arasında da gen aktarımı yapmak mümkündür. Böylece bitkilerin genetik çeşitliliği artırılabilir ve çeşitli olumsuzlukların önüne geçilebilir (Hansen, 2000).

Ayçiçeği bitkisinin çiçek yapısı, melezlemelerin başarı oranını etkileyen bir faktördür. Ayçiçeği bitkisi, çok sayıda küçük çiçeğe sahip olan bir bitkidir ve bu durum, melezlemeyi zorlaştırır. Melezleme işlemi, bitki genetiğinin değiştirilmesinde önemli rol oynayan bir yöntemdir ve ayçiçeği ıslahında da kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntem ayçiçeği bitkisinin çiçek yapısı nedeniyle zorluklarla karşılaşabilmektedir (Coşge ve Ulukan, 2005). Ayçiçeği, kendine ve yabancı döllene müsaait bir bitki olması nedeniyle klasik yöntemlerle melezleme çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Melezleme ve kendine döllene çalışmalarından kaynaklanan zorluklar, haploid bitki üretimi ile

aşılabilir. Bu yöntemle elde edilecek haploid bitkiler, dihaplodizasyon çalışmaları ile dihaploid verimli hatlara dönüştürülebilmektedir. Bu sayede, ayçiçeği ıslahında daha verimli ve sağlıklı bitkiler elde etmek mümkün hale gelmektedir (Priya ve ark., 2003).

Günümüzde, ıslah yöntemleri konusunda oldukça büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Klasik yöntemlerin yanı sıra, biyoteknoloji alanındaki yenilikler ve genetik mühendisliği teknikleri ile birçok farklı yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler, genel olarak klasik ve biyoteknolojik yöntemler olarak iki ana başlık altında sınıflandırılabilir.

### 1.1.1. Klasik Islah Teknikleri

Geleneksel bitki ıslahında, hedeflenen özelliklere sahip olan ebeveyn bitkilerin seçilmesiyle başlanır ve bu bitkiler arasında melezleme yapılır. Elde edilen bitkiler, istenen özelliklerin sağlanması için birçok kez kendilenir ve melezlenir ve bu işlem karakterler stabil hale gelinceye kadar devam eder.

### 1.1.2. Biyoteknolojik Islah Teknikleri

Geleneksel bitki ıslah yöntemleri, genellikle istenen özelliklere sahip bitkilerin elde edilmesi için uzun zaman gerektirir. Bu yöntemler, günümüzde biyoteknolojik ıslah teknikleri ile birleştirilerek daha hızlı ve etkili sonuçlar almak mümkün hale gelmiştir. Biyoteknolojik yöntemler arasında, *In vitro* teknikleri oldukça önemlidir ve sürekli geliştirilmektedir.

## 1.2. *In vitro* Tekniklerin Bitki Islahında Kullanım Alanları

Biyoteknolojinin farklı uygulama alanlarını içeren çok geniş bir kapsamı vardır. Doku kültürü ise genel bir terim olup, bitki organları (kökler, sürgün uçları, embriyolar vb.), anterler ve polen (haploidlerin üretiminde), kallus dokuları, hücreler ve protoplastların özel ve steril koşullarda kapalı ve genellikle cam kaplarda (*in vitro*) yapay besi ortamlarına konularak büyümeye bırakılması şeklinde tanımlanabilir. Bu yöntemin diğer adları arasında "**Mikro üretim**" veya "**Aseptik kültür**" bulunur. Bu yöntem sayesinde bitki ıslahçıları, stabil verime sahip, kaliteli ve stres faktörlerine genetik olarak dayanıklı yeni çeşitler geliştirmek üzere modern teknikleri kullanmaktadırlar. (Ingram,1980; Gönülşen, 1987).

Bitki ıslahı, gelişen teknoloji ve biyoteknoloji sayesinde daha verimli hale gelmiştir. Özellikle bitki doku kültürleri, bu alanda önemli bir gelişme sağlamıştır. Bitki doku kültürleri ıslah için hem doğrudan hem de dolaylı olarak kullanılabilir. Bu sayede, bitki ıslahında geleneksel yöntemlere kıyasla daha hızlı ve verimli sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu teknikler sayesinde, istenilen özellikleri taşıyan bitkilerin elde edilme süreci daha kısa zaman almaktadır. Bu teknikler;

- Haploid bitki üretiminde anter (polen) veya yumurtalık (ovul) kültürü,
- Türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü,
- Somaklonal varyasyon,
- *In vitro* seleksiyon,
- *In vitro* döllenme,
- *In vitro* germlazm korunması,
- Somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu),
- Gen transferi,
- Sekonder metabolit üretimi,
- Mikroçoğaltım,
- Sentetik tohum üretimidir.

Haploid kültür tekniği bu tezin ana çalışma konusunu oluşturmaktadır.

### 1.2.1. Haploid Kültür Tekniği

Bitki ıslah çalışmalarında kullanılan anter kültürü tekniği, haploid bitkilerin elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Bu teknik sayesinde mikrospordan haploid bitkiler, organogenez veya embriyo oluşumu yoluyla elde edilebilmektedir. Anter kültürü tekniği ile elde edilen bitkilerin kromozomları katlanarak daha kısa sürede kendilenmiş homozigot hatları veya bitkileri elde etmek mümkün olmaktadır. Bu teknik, klasik ıslah yöntemleriyle uzun yıllar alan türlerde daha hızlı sonuçlar elde etmek için kullanılabilir (Germana, 2011; Morrison ve ark., 1986; Croughan, 1995).

Bitkilerde *in vitro* uyartım yöntemleri ile androgenesis ve ginogenesis adı verilen iki farklı embriyogenez yöntemi uygulanabilir. **Androgenesis** işleminde bitkiden anter veya mikrosporar alınarak kültür ortamında yetiştirilirken, **ginogenesis** işleminde ise bitkinin ovül veya ovaryumu yapay besi ortamında yetiştirilir. Her iki yöntemde de, normal koşullarda gametofitik gelişimin durdurulması sonucu elde edilen mikrospor veya

megaspor hücrelerinin uygun uyarılar yardımıyla embriyogenik gelişime zorlanması temel prensiptir. Haploid bitki elde etmek için sadece androgenesis ve ginogenesis yöntemleri kullanılmaz. Ayrıca, melezleme işlemi veya özel uygulamalarla polen tozlaması da yapılarak embriyo kurtarma tekniği ile haploid bitkiler elde edilebilir. Bu yöntemler, haploidlerin genetik araştırmalarda kullanılması için bir alternatif sağlar. (Jain ve ark., 1996; Kasha ve ark., 2005 ).

### 1.3. Haploid Bitkilerin Genel Özellikleri

Haploid bitkiler, diploid bitkilerde bulunan tüm organlara sahip olsalar da hücreleri daha küçüktür ve bu nedenle daha küçük, güçsüz, bodur ve morfolojik olarak zayıf bitkilerdir. Ayrıca, gelişimleri daha yavaştır ve yaprakları daha dar ve küçüktür. Gövde ve dalların boğum araları kısa olurken, çiçeklenme süreleri de daha uzun olur. Küçük çiçek açarlar ancak sterildirler ve tohum kabiliyetleri bulunmazlar. Bu anterlerin içindeki polenler, normal polenlerden daha küçük boyutta ve şekilleri de anormaldir. Ayrıca polenlerin içi boş olduğundan, anterler normal şekilde çatlamaz ve polenler dökülemezler. Haploid bitkilerin stomaları da daha küçüktür ve birim alanda daha fazla stoma bulunur (Emiroğlu, 1982; Er, 1992; Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

### 1.4. Anter Kültürü

1953 yılına kadar anterlerin *in vitro* çalışmalarında eksplant olarak kullanımı yaygın olmamakla birlikte anter kültürü yöntemi kullanılarak ilk haploid bitki *Nicotiana tabacum* türünde üretilmiştir (Bourgin ve Nitsch, 1967). Henüz olgunlaşmamış, polen oluşumunun gerçekleşmediği, ancak tek çekirdekli mikrosporları içeren anterler, anter kültürü için uygun bir başlangıç materyalidir. Anterleri içeren kapitulumların sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra, uygun gelişim aşamasındaki anterler, genotipe uygun inkübasyon koşulları altında besin ortamına yerleştirilir ve havayla teması kesilir. Anter kültürü sonucunda, androgenesis yani anterlerin içinden direkt olarak embriyo gelişimi gerçekleşebileceği gibi, kallus oluşumunu takiben organogenezis veya embriyo oluşumu da indirekt yolla gerçekleşebilir.

#### 1.4.1. Anter Kültürünü Etkileyen Faktörler

Androgenik bitkilerin üretiminde, androgenesis sürecine etki eden birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin bazıları çevresel faktörlerden kaynaklanırken, diğerleri kalıtsal faktörlere bağlıdır. Anter kültürü uygulamalarında dikkate alınması gereken bir başka faktör olarak genotip özellikleri de önemli bir rol oynamaktadır. Aynı koşullar altında bile, farklı bitki türleri anter kültürüne farklı yanıtlar verebilmektedir. Bu nedenle, anter kültürü uygulamaları öncesinde bitkinin genotipinin belirlenmesi, uygun koşulların sağlanması ve embriyo gelişiminin desteklenmesi önemlidir (Nitsch ve ark., 1969; Gresshof ve Doy, 1972; Irikura ve ark., 1975).

Androgenik bitki üretiminde anter kültürü yönteminin başarısı, donör bitkinin yetiştirme koşullarından da etkilenmektedir. Bitkinin beslenmesi, su ihtiyacı, ışık, sıcaklık, nem ve CO<sub>2</sub> konsantrasyonu gibi faktörler, anterlerin kalitesini ve androgenesis sıklığını etkilemektedir. Bu nedenle, anter kültürü yöntemi için uygun donör bitkinin seçilmesi kadar, bitkinin doğru koşullarda yetiştirilmesi de önemlidir. Dumas de Vault ve Chambonnet (1982) "Dourga" adlı bir patlıcan genotipi üzerinde yapılan anter kültürü çalışmaları, haploid bitki üretimi için başarılı sonuçlar vermiştir. Ancak, Tuberosa (1987) ve Rotino'nun (1987) aynı patlıcan genotipi üzerinde yaptıkları çalışmalarda, embriyo oluşum oranının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Karakullukçu (1991) tarafından yapılan çalışmada, aynı patlıcan çeşidi kullanılmış olmasına rağmen hiçbir embriyo oluşmamıştır. Bu sonuçlar, aynı genotip ile yapılan çalışmalarda bile başarıların elde edilememesi durumunun, donör bitkilerin yetiştirilme koşullarından kaynaklanabileceğini ortaya koymaktadır.

Androgenesis üzerindeki etkileri dikkate alındığında, anterlerin uygun evrede izole edilmesi en önemli faktörlerden biridir. Polen olgunlaşmasının başlamasından sonra mikrosporlar içinde nişasta birikmeye başlar ve bu androgenesis uyartımını olumsuz yönde etkiler. Dolayısıyla, birçok bitkide en iyi sonuç, tek çekirdekli orta veya geç safhadaki mikrosporları içeren anterlerden elde edilir. Mikrospor safhasının belirlenmesi gerektiğinden, DAPI gibi boyaların kullanılmasıyla mikrosporların gelişme evreleri florasan mikroskopu altında belirlenebilir. Ayrıntılı görüntüler elde etmek için parafilm gömerek kesit alma ve farklı boyalarla boyama yöntemleri de kullanılabilir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Kültür sırasında androgenesis oluşumunu teşvik etmek için birçok ön uygulama yapılmaktadır. Bu ön uygulamalardan biri olan soğuk ön uygulaması, çiçek tomurcuğunun belirli bir süre düşük sıcaklıkta muhafaza edilmesi ve daha sonra anterlerinin izole edilmesi temeline dayanır. Genellikle 4-10 °C aralığı kullanılır. Soğuk ön uygulamanın tam olarak nasıl etki ettiği bilinmemektedir, ancak mikrosporların nişasta birikimini bloke ederek embriyo oluşumunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, 30-35 °C arasındaki sıcaklık uygulamalarının da embriyogenesis uyartımını arttırdığı bilinmektedir (Atasoy, 2020; Engin Özü 2006; Hamaoka ve ark., 1991; Karakullukçu ve Abak, 1993; Engin Özü, 2006; Çakmak ve ark., 2019; Badigannavar ve Kuruvinafhetti, 1996; Duran, 2007; Baba, 1992).

Ancak, haploid bitki oluşumu, tek bir cins içinde bile farklılık gösteren bir süreçtir ve bazı durumlarda "çok kolay" olarak kabul edilebilirken bazı durumlarda ise "imkansız" olarak kabul edilebilir. Örneğin, Asma ve Elma türleri üzerinde yapılan anter kültürü çalışmalarında, kallus gelişimi ve embriyoid benzeri farklılaşmalar gözlemlenmiş ancak haploid bitki oluşumu gerçekleştirilememiştir (Ağaoğlu ve ark., 1998; Köseali 2000).

## **1.5. Ginogenesis (Dişi Gamet) Yoluyla Haploid Bitki Elde Etme**

### **1.5.1. Ovül ve Ovaryum Kültürleri**

Döllenenmemiş yumurtalığın veya yumurta hücrelerinin kültür ortamında yetiştirilmesiyle haploid bitki ve embriyo oluşumuna ovaryum veya ovül kültürü adı verilir. Bazı yumrulu bitkiler ve *Compositae* familyasındaki bazı bitkilerde ise ginogenik haploid bitkilerin üretildiği kayıt altına alınmıştır (Babaoğlu ve ark., 2001). 1982 yılından itibaren, ayçiçeğinde ovaryum ve ovül kültürüyle ilgili çalışmalar laboratuvar ortamında gerçekleştirilmektedir. İlk çalışma olan Cai ve Zhou tarafından 1984 yılında yapılan deneyde, sekiz ayçiçeği genotipi kullanılarak genç çiçekçiklerin ovül kültürü gerçekleştirilmiştir. 1985 yılında ise Mix, sekiz farklı ayçiçeği genotipinden toplamda 1590 polenlenmemiş ovaryumu oksin ve sitokin içeren MS besin ortamında kültüre etmiştir. İki hafta sonra kallus oluşmuş ve 19 adet çiçekçik elde edilmiştir. Ancak yapılan analizler sonucu, tüm bu çiçekçiklerin diploid olduğu belirlenmiştir.

### 1.5.2. Eksik veya Yetersiz Polenlerle Tozlama

Ovaryum ve ovül kültürleri üzerine yapılan çalışmalar, dişi gametlerin *in vitro* şartlar altında kültüre alınarak düşük frekansta haploid embriyoların elde edilebileceğini göstermiştir. Bu nedenle, haploidlerin elde edilme oranını artırmak için, polenlere uygulanan bazı teknikler partenogenetik embriyo oluşumunu uyarabilir. Bu teknikler arasında, polenlerin farklı kimyasal maddeler ve radyoaktif ışınlarla muamele edilmesi, uzak akrabalar arasında melezleme yapılması, tozlaşmanın geciktirilmesi ve sıcaklık şokları uygulanması sayılabilir. Bu işlemler sonucunda eksik veya yetersiz polenler elde edilebilir ve bu polenler kullanılarak partenogenetik embriyo oluşumu teşvik edilebilir (Khush ve Virmani, 1996; Sestili ve Ficcadenti, 1996).

Polenlere uygulanan bu yöntemler sayesinde, polen generatif çekirdeği inaktif hale getirilirken, çimlenme yeteneği korunan polenler dişi çiçek tepesi üzerinde çimlendiklerinde, partenogenetik olarak haploid embriyolar üretilir. Ancak bu haploid embriyoların bitkiye dönüştürülmesi için embriyo kültürü yöntemine ihtiyaç duyulur. Embriyo kesesi içinde gelişen haploid embriyo normal döllenme sonucu oluşmadığı için endosperm taşımaz ve kendi başına bir bitkiye dönüşemez. Bu nedenle, haploid embriyoların bitkiye dönüştürülmesi için embriyo kültürü yöntemi uygulanır (Ellialtıoğlu ve ark., 2000). Haploid bitki eldesi için kullanılan embriyo kültürü yöntemi, embriyoların hızlı bir şekilde gelişmesini sağlamaktadır. Ancak bu yöntem, düşük oranda haploid bitki eldesi sağladığı için ıslahçılar tarafından yaygın bir şekilde kullanılmamaktadır (Ferrie ve ark., 2011).

### 1.6. Haploid Bitkilerde Kromozom Katlanması

Haploid bitkilerin elde edilmesinin temel amacı, kromozom setlerinin iki katına çıkarılması ve % 100 homozigot saf hatların hızla geliştirilmesidir. Bu süreç, bitki ıslahında önemli bir rol oynar ve özellikle tarımsal üretim açısından büyük avantajlar sağlar. Metafaz safhasında mitoz bölünme sırasında kromozomların iç ipliklerine bağlanmasını engelleyen antimitotik etkili kimyasallar, replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek hücrelerin kromozom sayısının 2 katına çıkmasına olanak sağlar. Bu sayede haploid bitkilerin kromozom sayısı da  $2n$  seviyesine yükseltilebilir. Bu amaçla kullanılan en yaygın kimyasal kolhisindir (Arı, 2006).

Haploid bitkilerin ploidi düzeylerini belirlemek için genellikle su yöntemleri kullanılır.

**Fenotipik gözlemler:** Poliploidi olarak adlandırılan kromozom sayısının artması, bitkilerin tüm organlarında büyüme etkisine neden olurken haploid bitki organlarının boyutları, diploid bitkilere göre azalma eğilimi göstermektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2002). Kurtar (1999) tarafından yapılan araştırmada, Urfa yerli kabak çeşidinin diploid ve haploid bireyleri karşılaştırılmış ve yaprak boyutunda yaklaşık yarı yarıya bir farklılık tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, haploid bitkilerin diploidler gibi çiçek açtığı, ancak çiçeklerin morfolojik ve biyolojik olarak farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir. Haploid bitkilerde, dişi ve erkek çiçeklerin boyutları daha küçük olmuş, erkek çiçeklerin polen taşımadığı ve açmadan kuruyup öldüğü, dişi çiçeklerin ise küçük bir stigma ve ovaryuma sahip olduğu ancak normal polenlerle tozlandığında hiçbir şekilde meyve oluşturmadığı görülmüştür. Bu bulgular, diğer bitki türlerinde de benzer şekilde belirlenmiştir. Bununla birlikte, fenotipik gözlemler hızlı ve düşük maliyetlidir, ancak güvenilirliği düşük olabilir. Bu nedenle, farklı ploidi belirleme yöntemleri ile desteklenmesi gereklidir.

**Kromozom sayımları:** Kök uçları gibi hızlı büyüyen dokuların kromozom sayımları, güvenilirliği kanıtlanmış bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak, preparat hazırlığı sırasındaki hidroliz veya boyama işlemlerinin zaman alması ve bu işlemlerin deneyim gerektirmesi, yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır (Arı, 2006).

**Flow sitometri:** Hücrelerin floresans dedektöründen tek tek geçirilerek absorbe ettiği ışığın analizine dayalı bir yöntemdir. Bu yöntemde, hücre çekirdekleri floresans boya ile boyanır ve çekirdeksel DNA miktarı belirlenir. Yöntem, her bitki türü için optimize edilmesi gereken bir dezavantajı olsa da, kolay, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle en çok tercih edilen yöntemlerden biridir (Arı, 2006).

**Stomatal incelemeler:** Haploid bitkilerdeki stomaların yoğunluğu ve bu stomalardaki plastidlerin sayısı, diploid veya poliploid bitkilerden farklıdır. Ploidi düzeyi arttıkça stoma uzunluğu ve plastid sayısı da artar. Bu nedenle, farklı bitki türlerinde bulunan stomaların büyüklüğü ve birim alanda bulunan stoma sayısı ile ploidi düzeyi arasında doğru bir ilişki saptanmıştır ve bu yöntem ploidi tespitinde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, bu gözlemler kesinlikle kromozom sayımı ile desteklenmelidir. Ayrıca, farklı

bitki türleri arasında değişen stomal büyüklüğü ve sayısı, bu yöntemin optimize edilmesinde bir dezavantaj olarak gösterilmiştir (Arı, 2006).

### 1.7. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada, çerezlik ayçiçeği çeşitlerinde *in vitro* androgenesis yoluyla haploid bitki oluşumunu ve bu bitkilerin kromozom sayılarının katlanması ile dihaploid bitki elde etmek amaçlanmıştır. Bu sayede anter kültürü tekniği, çerezlik ayçiçeği ıslahında daha etkin bir şekilde kullanılabilir. Elde edilecek sonuçlar, sadece çerezlik ayçiçeği ıslahında değil, aynı zamanda daha kaliteli ve verimli yağlık ayçiçeği çeşitlerinin ıslahında da kullanılabilir. Bu amaçla, farklı çeşitler, uygulamalar ve besin ortamları kullanılarak denemeler kurulmuş ve bu faktörlerin androgenesis üzerindeki etkileri incelenmiştir.

### 1.8. Araştırmanın Önemi

Çerezlik ayçiçeğinde verim artışı, ülkemizin bu alandaki dışa bağımlılığını azaltmak için önemli bir potansiyele sahiptir. Bu çalışmalar, aynı zamanda ülke tarımının ve ekonomisinin güçlendirilmesine de katkı sağlayacaktır.

Bu çalışma, tarım sektöründe önemli bir yere sahip olan çerezlik ayçiçeği çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik önemli bir adımdır. Çiftçilerimizin, ülkemizin tarımsal üretiminde önemli bir yere sahip olan bu bitki türleri ile daha fazla verim elde etmeleri hem ekonomik olarak, hem bu ürünler bazında dışa bağımlılığı azaltmak için önem taşımaktadır.

Ancak, bu bitkinin genetik çeşitliliği oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, farklı genotiplerin kullanılarak *in vitro* androgenesis yoluyla haploid bitki oluşumu gerçekleştirilmesi, bu bitki türünün çeşitliliğini arttırmak için önemli bir yoldur.

Bu çalışmanın diğer bir önemli yanı ise ayçiçeğinde anter kültürü tekniğinin geliştirilmesi ile ilgilidir. Bu teknik, bitki üretiminde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve genetik çeşitliliği arttırmak için kullanılan birçok teknikte kullanılmaktadır. Ancak, çerezlik ayçiçeği için henüz etkin bir şekilde kullanılamamaktadır. Bu çalışma, anter kültürü tekniğinin çerezlik ayçiçeği ıslahında daha etkin bir şekilde kullanılabilmesi için önemli bir adımdır.

Çerezlik ayçiçeği üretimindeki verim artışı, çiftçilerimizin gelirlerinin artması ve üretim alanlarının genişlemesine neden olacaktır. Ayrıca, anter kültürü tekniğinin çerezlik ayçiçeği ıslahında daha etkin bir şekilde kullanılabilmesi, genetik çeşitliliği arttırmak için kullanılan diğer tekniklerde de kullanılabilir hale gelmesine katkı sağlayacaktır.

### 1.9. Literatür Araştırması

Bitki ıslahı, yeni bitki çeşitleri geliştirmek için genetik, morfolojik ve fizyolojik özelliklerin incelenmesini içeren bir disiplindir. Son yıllarda, bitki ıslahçıları, stabil verimliliğe sahip, kaliteli ve stres faktörlerine genetik olarak dayanıklı yeni bitki çeşitleri geliştirmek üzere modern teknikleri kullanmaya başlamışlardır. Bu teknikler arasında biyoteknoloji, moleküler genetik, doku kültürü ve anter kültürü yer almaktadır. Bu tekniklerin kullanımı, daha hızlı ve verimli bir şekilde yeni bitki çeşitleri geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bitki ıslahında haploid bitki elde etme tekniklerinin kullanımının artmasıyla birçok türde hızlı yol alınmıştır.

**Aktaş ve ark., (2023)**, haploid bitki elde etmek amacı ile 16 ayçiçeği hattına ait polenleri farklı dozda gama ışını (500-1000 Gy) uygulayarak ışınlanmışlar ve ışınlanmış polenlerle yaptıkları dölleme çalışmalarında kurtardıkları 18457 embriyoyu Murashige & Skoog (MS) ortamında kültüre almış ve 650 adet çimlenmiş embriyo elde etmişlerdir. Araştırmacılar 500 Gr dozu hariç uygulanan tüm dozların ayçiçeğinde partenogenetik embriyo oluşumu ve haploid bitki elde etmede etkili olduğunu bildirmişlerdir.

**Rodríguez Guzmán ve ark. (2020)**, in vitro anter kültüründen ayçiçeği elde etmek için bir protokol geliştirmek amacıyla çalışmışlardır. Murashige & Skoog (MS) ortamında beş doz 2,4-diklorofenoksiasetik (2,4-D) ( $\mu\text{M}$ ) ve beş doz benziladenin (BA) ( $\mu\text{M}$ ) içeren 25 farklı uygulama yapılmıştır. Çalışma sonunda haploid ve diploid kallus ve haploid genomlu hücreler gözlenmiştir. Kallus indüksiyonunun düşük dozlarda daha yüksek ağırlıkta ve 25 günde ortaya çıktığını ve yüksek dozlarda indüksiyonun 40 günde mevcut olduğunu tespit etmişlerdir. En yüksek kallus ağırlığı, en iyi uygulama olarak kabul edilen 5,4  $\mu\text{M}$  2,4-D ve 5,3  $\mu\text{M}$  BA dozlarından elde edilmiştir.

**Çakmak ve ark. (2019)**, anter kültürü yoluyla iki farklı ayçiçeği genotipinde farklı doku kültürü parametrelerinin kallus dokularına etkisini araştırmışlardır. Yürütülen çalışmada anterler karanlıkta 4°C'de 24 saat soğuk ve 35°C'de 2 gün sıcak ön işleme tabi tutulmuş

ve 6-benzilaminopürin, 2,4-diklorofenoksiasetik asit,  $\alpha$ -naftalin asetik asit ve indol-3-asetik asitin farklı konsantrasyonları ve kombinasyonları ile desteklenmiş besiyerlerine ekilmiştir. Çalışma sonucunda embriyojenik kallus yüzdesinin % 65 ile % 26 arasında değiştiği, kallus oluşturan anter yüzdesinin ise farklı genotipler ve ortamlarla 24 saatlik soğuk muamelenin etkisi göz önüne alındığında % 95 ile % 75 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Rejenerasyon yüzdesi % 10 ile %6 arasında değişmiştir. Embriyojenik kallus yüzdesi % 66 ile % 42 arasında değişirken, kallus oluşturan anter yüzdesi % 100 ile % 48 arasında değişmiştir. Farklı genotipler ve ortamlarla 2 günlük ısı işlemi etkisi dikkate alındığında, rejenerasyon yüzdesi % 23 ile % 4 arasında değişmiştir. En iyi kallus indüksiyonu sonucu (% 100) 2 günlük ısı ön işlem ile G2 genotipinden elde edilirken, en iyi embriyojenik kallus indüksiyonu (% 65) 24 saatlik soğuk ön işlem ile G2 genotipinden elde edilmiştir. En iyi rejenerasyon (% 23) 24 saat soğuk ön işlem ile elde edilmiştir.

**Saensee ve ark. (2018)**, çeşitli kültür ortamlarının anterlerden kallus rejenerasyonuna etkisini araştırmışlardır. Test edilen dört ortam arasında, 2 mg l<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA), 1 mg l<sup>-1</sup> N6 -benzylaminopurine (BAP) ve 100 ml l<sup>-1</sup> hindistan cevizi suyu ile desteklenmiş MS ortamı en yüksek kallus indüksiyonunu (% 60,44) sağlamıştır. Bu ortamda anterden türeyen kalluslar % 20,45 oranında embriyo benzeri yapılara (ES) dönüşmüş ve bu kallusların bir kısmı sürgün veya kök yapısına dönüşmüştür.

**Garkusha ve ark. (2017)**, Oracle ve Orpheus ayçiçeği hibritlerinin anterlerinin in vitro kültürü sırasında fitohormonların, 6-BAP,  $\alpha$ -NAA ve AgNO<sub>3</sub>'ün (gümüş nitrat) kantitatif ve kalitatif bileşiminin kallus oluşumu ve rejenerasyon süreçleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda 2.0 mg/l  $\alpha$ -NAA + 1.0 mg/l 6-BAP + 30.0 g/l sükröz + 7.0 g/l agar içeren MS ortamının ve 2.0 mg/l  $\alpha$ -NAA + 0.5 mg/l 6-BAP + 2.0 mg/l AgNO<sub>3</sub> + 30.0 g/l sukroz + 7.0 g/l agar içeren iki ortamın incelenen iki ayçiçeği melezinde anter kültürü için ideal olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

**Saensee (2017)**, ayçiçeğinde double haploid (DH) bitkiler üretmek amacıyla yaptığı çalışmada 3 farklı ayçiçeği çeşidinde anter kültürü yoluyla haploid kalluslar elde etmiştir. MS besiyerinde 2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP ve % 10 (v/v) hindistan cevizi suyu her üç çeşit için de % 65,48 ile en yüksek kallus yüzdesini meydana getirmiştir. Sürgün oluşturmada, embriyojenik kallus elde etmek için en iyi yanıtı 2 mg/l BAP, 500 mg/l CH ve % 0,2 aktif kömür ile desteklenmiş MS ortamı vermiştir. Aktif kömür ilavesinin anter

kültürü için sinerjik etki gösterdiği, gümüş nitrat anter kültüründen organ indüksiyonu için antagonistik etkiye katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır.

**Öcal (2016)** tarafından yapılan araştırmada, meyve kalitesi yüksek ve iyi agronomik özelliklere sahip olan dolma, sivri, çarliston ve kaypa biber tiplerinin farklı ıslah hatları, üç nematoda dayanıklı genitörle melezlenmiştir. Anter kültürü yoluyla saf hatlar elde edilmiştir. MS+ 30 g/l sakaroz +% 0.25 aktif kömür+15 mg/l AgNO<sub>3</sub>+4 mg/l NAA+ 0.5 mg/l BAP besin ortamı kullanılmıştır. Denemeler sonucunda, genotipler arasında farklı parametrelerin gözlemlendiği ve en yüksek embriyo veriminin Nematoda dayanıklı x dolma melezi Z-tad 87 nolu genotipten elde edildiği tespit edilmiştir. Melezlemelerden en yüksek embriyo verimi dolma biber tipinden elde edilmiştir. Embriyo oranı en yüksek sivri biber melezinde elde edilirken, en yüksek haploid bitki oranı kapya biber melezinden elde edilmiştir. Me1, Me3, N ve Me7 dayanıklılık genlerine sahip üç homozigot saf hat ve bir Me1 genine sahip saf hat elde edilmiştir.

**Pintos ve ark. (2007)**, *Quercus suber* bitkisi üzerinde yaptıkları bir çalışmada, anter kökenli embriyoların çekirdek DNA'sının duplikasyonunun uyarılmasını amaçlamışlardır. Bu amaçla, kolsisin, oryzalin ve amiprofos-methyl (APM) gibi üç farklı antimitotik ajanın farklı konsantrasyonları, in vitro koşullarda altı farklı genotipte test edilmiştir. Bu türün anter kültürünün, spontan diploidlerin % 7.78 oranında verildiği bilinmektedir. 48 saat boyunca 0.01 mM oryzalin kullanımının, yaklaşık % 50 oranında diploid embriyo elde etmek için en etkili uyarımı sağladığı bildirilmiştir. 0.01 mM APM kullanımı, oryzaline göre daha düşük olsa da kabul edilebilir bir artış sağlamıştır. Ancak, 1.30 veya 8.80 mM kolsisin kullanımı, nekroz ve düşük DNA duplikasyonu oluşturarak en az etkili kimyasal ajan olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, anter kültürü kullanarak bitki üretimi için uygun koşulların belirlenmesine yardımcı olabilir.

**Duran (2007)** tarafından yapılan araştırmada, tuzlu koşullara dayanıklı buğday genotiplerinin anter kültürlerine cevabı incelenmiştir. Çalışmada, üç farklı makarnalık buğday genotipi kullanılmış ve farklı süreli ön uygulamaların etkisi test edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, 15 gün süren soğuk şokun en iyi sonucu verdiği görülmüştür. Ayrıca, Berkmen 469 genotipi % 0.62 ile en yüksek kallus oluşum oranına sahip genotip olarak tespit edilmiştir.

**Engin Özü (2006)** tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, tarla veya sera koşullarında yetiştirilen üç farklı ekmeklik buğday genotipi (Seri 82, Genç 99, Balatilla), P2 ortamında dört farklı sıcaklıkta (25 °C, 27 °C, 30 °C, 32 °C) kültüre alınarak anterleri incelenmiştir. Araştırmanın sonuçları, donör bitki yetiştirme koşullarının anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmadığını, ancak genotip ve anter kültür sıcaklığının anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yarattığını ortaya koymaktadır. Anter reaksiyon oranı, genotiplere göre % 0.40 ile % 2.40 arasında değişmiştir. Seri 82 çeşidi, diğer iki çeşide göre daha yüksek anter reaksiyon oranı ortalaması göstermiştir. Kültür sıcaklığı, 25 °C'den 30 °C'ye kadar artırıldığında anter reaksiyon oranında artışa neden olmuştur. 30 °C'de kültür edilen anterler, 25 °C'de kültür edilen anterlere göre daha yüksek anter reaksiyon oranı ortalaması göstermiştir. Ancak, 32 °C'de kültür edilen anterlerin reaksiyon oranı, 30 °C'de kültür edilen anterlere göre önemli ölçüde daha düşük olmuştur. Donör bitkilerin yetiştirme koşulları ve anter kültür sıcaklığı, bitki rejenerasyon oranı, yeşil bitki rejenerasyon oranı ve albino rejenerasyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilememiştir. Ancak, bitki rejenerasyon oranı, yeşil bitki rejenerasyon oranı ve albino bitki rejenerasyon oranı, genotiplere göre önemli derecede farklılık göstermiştir ve Seri 82 çeşidi, diğer iki çeşide göre bu özellikler açısından daha üstün çıkmıştır. Bu araştırma, ekmeklik buğday anter kültüründe haploid bitki rejenerasyonunu etkileyen en önemli faktörün genotip olduğunu göstermektedir.

**Arı (2006)** yürüttüğü araştırmada, Manisa Lalesi olarak da bilinen doğal *Anemone coronaria* var. *coccinea* bitkisinde haploid bitki üretmek için anter kültürü yöntemini kullanmıştır. Araştırma kapsamında, Adana'da doğal yayılışı olan bir popülasyondan elde edilen örnekler, farklı temel besin ortamları, hormon konsantrasyonları ve ön uygulamalara tabi tutulmuştur. Deney sonuçlarına göre, NN ve B5 besin ortamlarına, farklı hormon konsantrasyonları ve aktif karbon, gümüş nitrat, L-glutamin gibi bileşenlerin eklenmesiyle elde edilen farklı uygulamaların embriyo oluşumu performansları belirlenmiştir. Hormon denemelerinde, IAA tek başına veya BAP ile birlikte kullanılmıştır. En yüksek embriyo oluşum oranı, NN ortamındaki 1 mg/l IAA + 0.10 mg/l BAP hormon kombinasyonunda % 12.70 ve B5 ortamındaki 0.50 mg/l IAA + 0.10 mg/l BAP kombinasyonunda % 9.30 olarak elde edilmiştir. Gümüş nitrat denemeleri içerisinde en yüksek embriyo oluşumu % 3.30 ile B5 ortamındaki 5 mg/l gümüş nitrat +0.50 mg/l IAA + 0.10 mg/l BAP içerikli uygulamadan elde edilmiştir. L-Glutamin

denemelerinde, sadece B5 ortamındaki 800 mg/l L-glutamin + 2 mg/l IAA + 0.10 mg/l BAP uygulamasından düşük bir oranda (% 0.70) olumlu sonuç alınmıştır. Aktif karbon denemelerinde ise olumlu bir sonuç elde edilememiş, aktif karbon + gümüş nitrat + L-glutamin karışımı denemelerinde ise tüm ortamlarda polen embriyogenesisine olumsuz etki gözlenmiştir. Çalışmada yapılan soğuk muameleler arasında fark bulunamamıştır. Embriyojenik bölünmelerin simetrik, jeneratif ve vejetatif çekirdek bölünmelerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Direkt polen embriyogenesisinin amaçlandığı bu çalışmada, organogenesis ve yüksek oranda kallus oluşumu belirlenmiştir, ancak elde edilen embriyo ve kalluslar tam bir bitki rejenerasyonu sağlayamamıştır.

**Taskın (2005)** tarafından yapılan bir çalışmada, biber bitkisinde düşük sıcaklığa toleranslı olarak belirlenen A71, A269, A313 numaralı genotipler ile orta derecede toleranslı A109 genotipi ve duyarlı A74 genotipi üzerinde anter kültürü yapılmıştır. Beş farklı genotipin embriyo uyarımı ve bitkiye dönüşümü için anterler farklı zamanlarda kültüre alınmıştır. Bu ortamlarda gelişmesini tamamlayamayan embriyolar ise 10 gün boyunca 0.50 mg/l absisik asit içeren besin ortamında kültüre alınarak embriyo olgunlaşması üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, embriyo oluşumu ve bitkiye dönüşümü genotiplere, anter alma dönemlerine ve besin ortamlarına göre değişmiştir. En yüksek embriyo verimi, soğuğa toleranslı olarak belirlenmiş olan A269 genotipinden elde edilmiştir. Nisan ve Mayıs aylarında anter alma işlemi yapıldığında en başarılı sonuçlar elde edilmiştir. III ((Murashige ve Skoog + 30 g/l sukroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l naftalen asetik asit + 1 mg/l benzil amino pürin) ve IV (modifiye edilmiş Murashige and Skoog + 30 g/l sukroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l naftalen asetik asit + 0.1mg/l benzil amino pürin) numaralı besin ortamlarında daha fazla sayıda embriyo elde edilmiştir. Ancak olgunlaşmamış embriyolara absisik asit uygulamasının olumlu bir etkisi tespit edilememiştir. Bitkiye dönüşüm ise hormonsuz Murashige and Skoog ortamına alınan olgun embriyolardan elde edilmiştir.

**Sayılır ve Özzambak (2005)** tarafından yapılan bir araştırmada, çiçek tomurcukları üç boyutlu olarak sınıflandırılmış ve anterler, MS ve N besi ortamlarına eklenen 4 mg/L NAA+ 0.10 mg/L BA ve aktif kömür ile havuç ekstraktı kullanılarak kültüre alınmıştır. En iyi sonuçlar, aktif kömür ve havuç ekstraktının her ikisinin de eklendiği MS+4 mg/L NAA+ 0.10 mg/L BA ortamından elde edilmiştir. 5-6 mm büyüklüğündeki

tomurcuklardan alınan anterlerin MS+4 mg/L NAA+ 0.1 mg/L BA ortamına alınması, en iyi embriyo verimini sağlamıştır. Kömür tek başına olumlu bir etki göstermemiştir. Ayrıca N + 4 mg/l NAA + 0.1 mg/l BA + % 0.10 aktif kömür + 200 ml havuç ekstraktı da iyi sonuçlar vermiştir.

**Altındal (2005)** tarafından yürütülen bir araştırmada, çavdar bitkisinin anter kültürüyle ilgili bir problem olan rejenerasyon kapasitesinin artırılması amaçlanmıştır. Araştırmada, diploid ve tetraploid çavdar bitkilerine ait anterlerin in vitro kültürü üzerinde farklı uygulamaların kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deneyde, N6 ortamı modifiye edilerek kullanılmıştır. Soğuk ön işlem, ploidi seviyesi, karbon kaynakları ve hormonlar gibi faktörler farklı şekillerde uygulanmıştır. Soğuk uygulaması anter tepki oranını ve kallus büyüklüğünü azaltırken, kallus oranını artırmıştır. Ploidi seviyesi, anter tepki oranı üzerinde istatistiksel olarak önemsiz etkiye sahipken, kallus oluşumu ve kallus büyüklüğü üzerinde önemli etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Tetraploid çavdar bitkilerinde kallus büyüklüğü ve kallus oluşturan anter oranı diploidlerden daha yüksek, tepki gösteren anter oranı ise daha düşüktür. Karbon kaynakları, anter tepki oranı, kallus oranı ve kallus büyüklüğü üzerinde önemli etkilere sahip olup, maltoz kullanıldığında kallus oranı ve kallus büyüklüğü artarken, anter tepki oranı azalmıştır. 2.4-D ve IAA hormonları incelenen özellikler üzerinde benzer etkilere sahip olup, aralarında önemli bir fark tespit edilmemiştir. İncelenen tüm faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimi istatistiksel olarak önemlidir. Bu nedenle, tepki gösteren anter oranı % 27.00-97.50, kallus oluşturan anter oranı % 13.00-28.00 ve kallus büyüklüğü 1.03-6.03 mm arasında değişmektedir.

**Gencer (2002)**, Ege Bölgesi tütün üretim alanlarında gözlenen "külleme" hastalığına dayanıklı bir tütün çeşidi geliştirme amacıyla klasik ıslah metotları ile anter kültürü tekniğini birlikte kullanarak bir araştırma yürütmüştür. Bu amaçla, iki tütün çeşidi arasında geri melezleme yöntemi kullanılarak, külemeye direnci olan bir genotipten diğerine aktarılmıştır. GM1'in anterleri kültüre alınarak haploit bitkiler elde edilmiş ve daha sonra bu haploitlerden androjenez veya kolşisin tedavisi yoluyla dihaploit bitkiler elde edilmiştir. 67 dihaploid hattın 14'ü külemeye dayanıklı bulunmuş ve tarla denemeleri için standart çeşitlerle verim, kalite ve morfolojik özellikler açısından karşılaştırılmak üzere seçilmiştir. Üç hat her iki standart çeşidi de geride bırakırken, yedi hat sadece Karabağlar 6265 standart çeşidini kuru yaprak verimi açısından geçmiştir.

Kalite özellikleri açısından, dört hat azaltılmış şeker ve toplam alkaloid içeriği bakımından bir standart çeşide göre daha iyi sonuçlar göstermiştir. Sonuç olarak, külemeye dayanıklı ve makro verim ve kalite denemelerinde standart çeşidi yaklaşık veya geçen verim ve kalite değerlerini gösteren 8 dihaploid hat seçilmiştir. Bu çalışma, anter kültürü tekniğini kullanarak istenilen özelliklere sahip dihaploid bitkiler elde etmede önemli bir başarı elde etmiştir.

**Saji ve Sujatha (1998)** yaptıkları araştırmada, ayçiçeği bitkisinde anter kültürü yoluyla embriyogenezis ve bitki rejenerasyonu üzerine bir araştırma yapılmıştır. Araştırmacılar, yüksek bir kallus oluşum oranı (% 100) ve maksimum embriyo elde etme oranı (% 44) elde etmişlerdir. Ancak, tam bir bitki elde etme oranları oldukça düşük olduğu belirtilmektedir. Bu sonuçlar, ayçiçeği bitkisinin anterlerinden somatik hücrelere dönüşüm sürecinde elde edilen verimlilik açısından potansiyel göstermektedir. Ancak, bu yöntemin uygulanabilirliği ve etkinliği, bitki rejenerasyonu için diğer tekniklerle karşılaştırıldığında daha fazla araştırma gerektirmektedir.

**Kurt ve Evans (1998)** tarafından yapılan bir çalışmada, haploid keten bitkileri elde etmek için 8 farklı çeşidin anterleri katı ve sıvı kültür ortamlarında kültüre alınmıştır. Araştırmanın sonuçlarına göre, her iki kültür ortamında da kallus oluşum oranı düşük bulunmuştur ve her iki ortamda da çeşitler arasında kallus oluşumu açısından farklılıklar görülmüştür. Blue-Chip keten çeşidi katı kültür ortamında, Antares keten çeşidi ise sıvı kültür ortamında en yüksek kallus oluşum oranlarına sahip olmuştur (% 3.67 ve % 3.35 sırasıyla). Norman keten çeşidi sadece katı kültür ortamında kallus oluşumu sağlarken, McGregor keten çeşidi her iki kültür ortamında da kallus oluşumu göstermemiştir. Soğuk işlem görmüş anterlerin kallus oluşum oranı, katı kültür ortamında kontrol grubuna göre dört kat azalmıştır. Ancak sıvı kültür ortamında bu oran istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte % 25.80 oranında artmıştır. Genel olarak, her iki kültür ortamında da kallus oluşumu sağlanmış olsa da, farklılaşma ortamına transfer edilen kalluslardan herhangi bir farklılaşma elde edilememiştir.

**Todorova ve ark. (1997)**, ayçiçeğinde double haploid bitki üretimi için farklı polen donörleri ve alıcı hibritlerinin kullanıldığı 48 farklı deney gerçekleştirmişlerdir. Polenler 300 Gy, 600 Gy ve 900 Gy dozlarında radyo iyot ışınına maruz bırakılmıştır. 2279 embriyo ve 1107 bitki elde edilmiş ve bunların 582'si kendi kendine döllenenek tohum

üretmiştir. 296 bitkinin haploid olduğu belirtilmiştir. Bazıları kendiliğinden diploid olmuştur ve diğerleri kromozom katlaması için kolhisin solüsyonu ile işlem görmüştür. Sonuçlar, tüylü küf hastalığına dirençli tarımsal olarak kullanışlı double haploid hatlarının üretiminde % 8.60 oranında bir başarı sağlandığını göstermiştir.

**Amaury ve ark. (1997)**, *Lilium longiflorum* bitkisi üzerinde farklı ışık koşulları, besi ortamları ve soğuk ön uygulamanın anter kültürüne etkisini araştırmışlardır. Araştırmada en uygun ortamın karanlıkta ve soğuk ön uygulaması altındaki N6 ortamı olduğu bulunmuştur. Anterlerin mikrosporlarından alınan erken ve orta tek çekirdekli evre mikrosporlar kallus oluşturmuştur. Toplamda 132 bitki rejenerasyona uğramıştır ve rejenerasyon sonrası bitkilerde albino veya morfolojik çeşitlilik gözlenmemiştir. Rejenerasyon sonrası bitkilerin kök uçlarında hem haploid hem de diploid hücelere rastlanmış ve bu durum kromozom duplikasyonunun kendiliğinden olduğunu göstermektedir. Ayrıca, anterlerden elde edilen mikrosporların mikroskopik incelemelerinde, farklı evrelerde çok hücreli taneler tespit edilmiştir. Bu gözlemler, mikrospor kökenli bitkilerin androgenik kökenli olduğunu desteklemekte ve izozim analizi ile de doğrulanmaktadır.

**Nurhidayah (1996)** yaptığı çalışmada, yabani türlerle kültüre edilmiş ayçiçeği hibritlerini kullanarak yapılan bir araştırma özetlenmektedir. Bu çalışmada, 2000'den fazla rejenere bitki elde edilmiştir ve bu bitkilerin 1200'ü F1 hibritlerinden geliştirilmiştir. Anterlerin % 92.7'sinde embriyojenik kallus elde edilmiştir. Bu sonuçlar, interspesifik hibritlerde anther kültürünün yüksek verimliliğini ve bitki rejenerasyonunu sağladığını göstermektedir. Araştırmacılar, interspesifik hibritlerin geniş bir genetik çeşitlilik sağladığını ve anter kültürü için uygun malzeme sağladığını belirtmiştir. Bu nedenle, bu çalışma, ayçiçeği ıslahı ve bitki üretimi için yararlı bir araştırma olarak kabul edilmektedir.

**Badigannavar ve Kuruvinashetti (1996)** yaptıkları çalışmada, ayçiçeği bitkisinin 3 farklı genotipi üzerinde soğuk uygulamanın ve farklı oksin çeşitlerinin anter kültürü üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, soğuk uygulama yapılan tüm genotiplerin anterlerinden elde edilen kallus oluşum oranında artış olduğunu göstermiştir. En iyi yanıt veren besin ortamı kombinasyonları ise 2.4-D (2.00 mg/l) + BA (1.00 mg/l) ve NAA (1

mg/l) + BA (1 mg/l) olarak belirlenmiştir. Bu çalışma, ayçiçeği bitkisinde anter kültürü yönteminin geliştirilmesinde faydalı olabilir.

**Thengane ve ark. (1994)** tarafından yapılan bir çalışmada, ayçiçeği üzerinde anter kültürü kullanılarak dört farklı ayçiçeği genotipinden bitki rejenerasyonu oluşturma potansiyeli incelenmiştir. Ön deneylerde, tek çekirdekli mikrospor hücrelerine sahip anterler, Murashige ve Skoog'un MS, Gamborg'un B5, Nitsch ve Nitsch ile White'in W ortamlarında yetiştirilmiştir. Bu ortamlar, 2,4 diklorofenoksi asetik asit (1 mg/l), 6-benzilaminopurin (0.50 mg/l) ve 40 g/l sukroz içermektedir. İleri deneylerde ise, embriyo indüksiyonuna daha duyarlı olan MS ortamı tercih edilmiştir. MS ortamı, 2,4 diklorofenoksi asetik asit (0.20-2.00 mg/l) ve 6-benzilaminopurin (0.50 ve 1.00 mg/l) ile optimize edilmiştir. Soğuk ön uygulaması, hormon ve sukroz konsantrasyonlarının embriyogenik verimlilik açısından etkisini test etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonuçları, genotipin embriyo oluşum kapasitesinin önemli ölçüde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Embriyo çimlenmesini teşvik etmek için, etilen inhibitörü olan gümüş nitrat (2.50 mg/l) kullanılmıştır. Sadece bir genotipten (% 10-15) bitkiler elde edilebilmiştir.

**Sakin (1994)** tarafından yapılan çalışmada, tütünde anter kültürü yöntemi uygulanmış ve bunun için 20 farklı genotipten alınan anterler MS ve N6 ortamlarında kültüre alınmış. Anterlerin reaksiyon gösterme oranının büyük ölçüde genotipe bağlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, MS ortamının N6 ortamına göre anter reaksiyon oranının daha yüksek olduğu ancak her iki ortam arasında bitki rejenerasyon oranı açısından önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir.

**Baba (1992)** tarafından yapılan bir çalışmada, çeşitli yerli arpa türlerinde N6 ortamında anter kültürü kullanılarak kallus ve embriyoidlerin elde edilmesi için 4°C'de soğuk ön muamele uygulaması yapılmıştır. 15 günlük ön muamele sonucunda Tokak, Yerçil ve Gem çeşitlerinden kalluslar elde edilmiştir. Ayrıca Gem çeşidinden embriyoidler de elde edilmiştir.

**Prasad ve ark. (1991)** tarafından yapılan bir çalışmada, aspir bitkisinde kültür ortamının androgenik kallus üzerindeki etkisi beş farklı besi ortamında incelenmiştir. Araştırma sonucunda, MS ortamının kallus oluşumunda oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Margira yerel çeşidinden elde edilen en yüksek kallus oluşumu % 48.60 oranında

kaydedilmiştir. Olgunlaşmamış kapütüllere üç ile beş gün süren  $5\pm 1$  °C'deki ön soğuk uygulamasının anterlerin kallus oluşturma yüzdesini artırdığı belirlenmiştir. Tarla ve sera koşullarında yetiştirilen anter donör bitkilerinin fizyolojik koşullarının kallus oluşumu ve yeniden değişim üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, tarla koşullarındaki anter donör bitkilerinin en uygun yanıtı verdiği görülmüştür. Sürgün rejenerasyonu, 2.00 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında gerçekleştirilmiş ve köklenme ise 0.10 mg/l NAA ve % 1 sükröz içeren  $\frac{1}{2}$  MS ortamı üzerinde başarıyla sağlanmıştır. Sitolojik gözlemler, anterlerden elde edilen bitkilerin iki ploidi seviyesinde olduğunu ve haploid bitkilerin genellikle % 64 oranında daha baskın olduğunu ortaya koymuştur.

**Hamaoka ve ark. (1991)** yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada, *Brassica campestris* L. bitkisi üzerinde anter kültürü yapılmış ve kültürün ilk üç gününde uygulanan yüksek sıcaklığın (35°C) polen kaynaklı embriyoid verimini artırdığı belirtilmiştir. Bu çalışmada, tek çekirdekli evredeki polenleri içeren anterler modifiye B5 ortamında kültüre alınmıştır. İlk 24 saatte uygulanan yüksek sıcaklık normal polen gelişimini engellemiş ve simetrik bölünmeyi teşvik etmiştir. Ancak bu simetrik bölünme, in vivo (canlı bitkide) gelişen polenlerde çok nadir görülen bir olaydır. Kültüre alınan anterlerde yüksek sıcaklık uygulanmadan polen gelişimi normal şekilde gerçekleşirken, yüksek sıcaklığın normal polen gelişimini engellediği ve sporofitik gelişimi teşvik ettiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca, bu tarz bir simetrik bölünme için bitki büyüme düzenleyicisi veya başka bir besin maddesi gerekli olmadığı ve sadece sukrozun (0.29 M) yeterli olduğu belirtilmiştir.

**Bohorova (1985)** tarafından yapılan bir çalışmada, ayçiçeği bitkisinin anterlerinden in vitro organogenez, androjenez ve embriyo kültürü yöntemleri kullanılarak bitki rejenerasyonu amaçlanmıştır. Araştırmacılar 24 farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonu kullanmışlar ve en iyi sonuçların 2.4-D ve kinetin kombinasyonunda alındığını gözlemlemişlerdir. Bu kombinasyonla % 70-100 oranında granüler embriyojenik kallus elde edilmiştir. Ancak, IAA içerikli besin ortamında gelişen kallusların daha kompakt bir yapıda olduğu rapor edilmiştir.

Çerezlik ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) genotiplerinde androgenesis ve haploid bitki elde edilmesi üzerine yapılan araştırmalar, bitki ıslahı ve genetik mühendislik alanında büyük bir öneme sahiptir. Bu çalışmalar, bitki yetiştiricilerine ve araştırmacılara, hedeflenen özelliklere sahip bitkilerin daha etkin bir şekilde üretilmesi ve genetik

çeşitliliği artırabilme potansiyeli sunar. Androgenesis ve haploid bitki elde etme süreci, geleneksel ıslah yöntemlerine kıyasla zaman ve maliyet açısından daha avantajlı olabilir. Ayrıca, bu çalışmalar genetik varyasyonu hızlı bir şekilde artırma ve yeni genotiplerin oluşturulması için bir araç olarak da kullanılabilir. Bu nedenle, çerezlik ayçiçeği genotiplerinde androgenesis ve haploid bitki elde edilmesi üzerine yapılan araştırmalar, bitki ıslahı ve genetik mühendislik çalışmalarında önemli bir adım olarak kabul edilmektedir.



## 2. BÖLÜM

### YÖNTEM VE MATERYAL

#### 2.1. Materyal

Bu araştırma, 2018- 2022 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Betül - Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi'nin Bitki Biyoteknolojisi Bölümü ile Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nün Doku Kültürü Laboratuvarı bünyesinde yürütülmüştür. Denemede kullanılan bitkiler yaz dönemlerinde Ziraat Fakültesi'nin seraları ile Erciyes Üniversitesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne bağlı Kampüs içi (Yıldırım Beyazıt) bitkisel araştırma alanında ekimi ve yetiştiriciliği yapılmış, kış koşullarında ise Ziraat Fakültesi'nin ısıtılmalı serasında yetiştiriciliği yapılmıştır. Çalışmada iki farklı çerezlik ayçiçeği çeşidi İnegöl Alası ve SH361 kullanılmıştır (Şekil 9).

**İnegöl Alası:** 2013 yılında Uludağ üniversitesi Ziraat Fakültesi tarafından teşçil edilmiş açık tozlanan bir çeşit olup, sarı çiçekli, uzun, gri-beyaz tohum kabuğuna sahiptir (Kaya 2014).

**SH361:** Çin menşeli 2.1-2.3 m boylanan 0.98-1.00 cm eninde 2,5- 3 cm boyunda, siyah beyaz çizgili, dekara 350-400 kg verim veren hibrit çerezlik ayçiçeği çeşididir (Gansu Agricultural Science and Technology. 1001-1436. 09-0037-02).



Şekil 9. Çalışmada kullanılan çerezlik ayçiçeği çeşitleri

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Kapitulum Alımı

Çalışmada kullanılacak çeşitlerle 2018 Mayıs ayında ön çalışmalara başlanmış, çalışmada karşılaşılabilecek problemler, eksiksikler ve sterilizasyon ön denemeleri yapıldıktan sonra asıl çalışmanın ekimi 2019 Mayıs ayında arazi ve sera koşullarında kademeli olarak yapılmaya başlanmıştır. Ayçiçeği çeşitleri 2022 Mayıs ayına kadar kademeli olarak arazi ve sera koşullarında ekimi yapılarak biki yetiştirilmiştir. Bitkiler sezon boyunca laboratuvarında çalışmalarına kesiksiz kapitulum sağlayacak bir şekilde ekim yapılmıştır. Çıkiştandan itibaren yaklaşık iki aylık sonra uygun büyüklüğe gelen kapitulumlar tespit edilip sabahın erken saatlerinde hasadı yapıp buz dolu bir kabın içine konularak laboratuvara götürülmüş ve çalışmalarda kullanılmıştır. Çalışmada apikal kapitulumlar kullanılmıştır (Şekil 10).



Şekil 10. a, c) 2018 Sera koşullarında yetiştirilen ayçiçeği bitkileri, b, d) Sera koşullarında yetiştirilen ayçiçeğinin henüz açmamış apikal kapitulumu



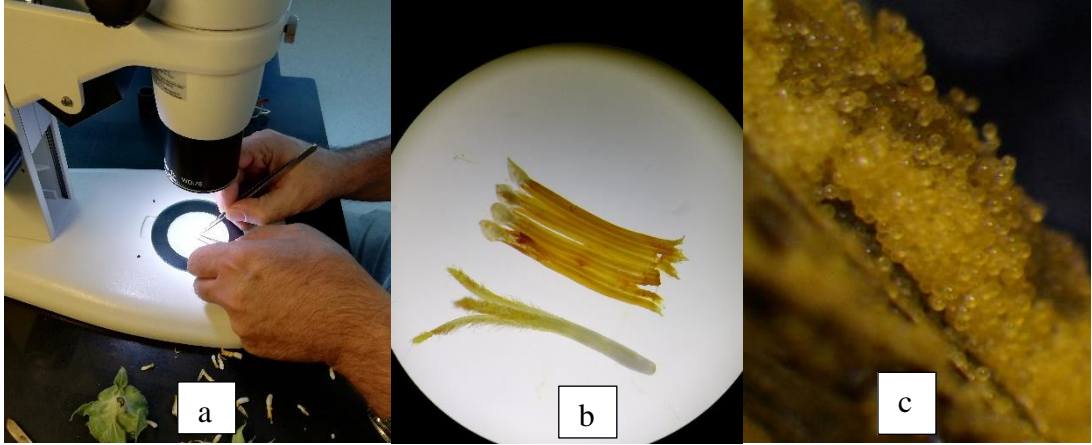
Şekil 11. 2019-2020 sera ve arazi koşullarında kademeli yetiştirilen ayçiçeği bitkileri



Şekil 12. 2021 Sera koşullarında kademeli olarak ekimi yapılan ve yetiştirilen ayçiçeği bitkileri

### 2.2.2. Uygun Dönemdeki Kapitulumların ve Anterlerin Belirlenmesi

Referans taramasında tek çekirdekli mikrosporların bulunduğu uygun anterleri içeren tomurcukların 3 - 4 cm'lik çapa sahip olan çiçekler açmadan hemen önceki kapitulumlarda daha fazla bulunduğu tespit edilmiş (Dayan, 2011) ve çalışmada bu büyüklükteki kapitulumlar kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan kapitulumlardan elde edilen anterlerin uygun büyüklükteki anterler olup olmadığı önce stereo mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 13 a,b). Mikroskop altında incelenip belirlenen anterlerin henüz polen oluşum dönemine (Şekil 2.5b) girmemiş, tek çekirdekli dönemdeki anterler olup olmadığına karar vermek için farklı boydaki ve yaştaki anterler gruplandırılıp % 1'lik asetokarmin ile boyanmış ve mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 14).



Şekil 13. a) Uygun anterlerin belirlenmesi, b) Ayçiçeği anterlerinin görünümü c) Polen oluşum dönemine girmiş anter



*Şekil 14.* a,b Tüp çiçek tomurcuklarının gruplandırılması, c) ayçiçeği kapitulunun yan kesitinden farklı gelişim evresindeki tüp çiçeklerinin görünümü d) açmamış tüp çiçek tomurcukları, stigma ve anterlerin stereo mikroskop altında görüntüsü

### 2.2.3. Kapituluların Sterilizasyonu ve Anter İzolasyonu

Anter kültürü için yapılan ön çalışmalar ve araştırmalar sonucunda, mikrosporların daha fazla bulunduğu boydaki ve dönemdeki kapitulular sabahın erken saatlerinde toplanmıştır. Toplanan kapitulular laboratuvara getirildikten sonra önce kaba bir temizlik yapılması için normal musluk suyunda sıvı deterjan ile yıkanmıştır. Ön yıkamadan sonra brakteler bisturi yardımıyla temizlendikten sonra kapitulular önce % 70'lik etanolde yaklaşık 1 dakika çalkalanmış ve hemen ardından 3 defa steril saf suda durulanmıştır. Daha sonra % 1 – 2 ve 3'lük cıva klorürde yaklaşık bir ve iki dakika kadar çalkalanmış ve hemen ardından yine steril saf suda 3 defa durulanmış ve en son olarak steril kurutma kağıdı üzerinde 2 dakikaya kadar suyunu kaybetmesi için kurumaya bırakılmıştır. Böylece anterlere en az zararı veren ve enfeksiyon riskini en düşük seviyede

tutacak sterilizasyon yönteminin belirlenmesi için ön çalışmalar yapılmış, belirlenen en uygun cıva klorür oranı ve süresi ile çalışmalara devam edilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. Brakte uçları kesilmiş ayçiçeği kapitulümları ve sterilizasyonu

#### 2.2.4. Anter Kültürü Koşulları ve Ön Uygulamaları

Çalışmada ana besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) ile çeşitli ön uygulamalarla birlikte bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır. Çalışmada MS besin ortamının (Tablo 2) tercih edilmesinin nedeni daha önce ayçiçeğinde anter kültürü çalışmalarında bu besin ortamında daha başarılı sonuçlar alınmış olmasıdır (Thengane ve ark., 1994; Saji ve Sujatha, 1998; Vijaya Priya ve ark., 2003). MS besin ortamının pH'sı 5.7'ye ayarlanmıştır. pH ayarlaması için 1N NaOH ve 1N HCl çözeltileri kullanılmıştır. Besin ortamında kullanılan sukroz miktarı, soğuk - sıcak ön uygulamaları ve aktif kömür, PVP, AgNO<sub>3</sub> gibi ilave uygulamalar protokollere göre modifiye edilmiştir. Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin hazırlanmasında kullanılan çözücü ve sterilizasyonda kimyasalın yapısına zarar vermeyecek şekilde Tablo 1'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan farklı BAP, NAA, AgNO<sub>3</sub>, PVP, Kinetin ve Aktif kömür uygulamalarıyla oluşturulan gruplar

Gruplamalar	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	AgNO <sub>3</sub> (mg/L)	PVP (g/L)	Kinetin (mg/L)	Aktif kömür (g/L)
Uygulama 1	0.5	0.5				
Uygulama 2	0.5	0.5	1.0			
Uygulama 3	0.5	0.5		1.0		
Uygulama 4	1.0	2.0				
Uygulama 5	1.0	2.0	1.0			
Uygulama 6	1.0	2.0		1.0		
Uygulama 7	2.0	0.01				
Uygulama 8	2.0	0.01	1.0			
Uygulama 9	2.0	0.01		1.0		
Uygulama 10	2.2	2.1				
Uygulama 11	1.0	2.0		1.0	0.5	
Uygulama 12	0.5	4.0	10.0			2.5

Tablo 2. *In vitro* rejenerasyon sırasında kullanılan MS temel besin ortamı içeriği (Murashige ve Skoog, 1962).

Bileşikler	Konsantrasyon (mg/l)
KNO <sub>3</sub>	1900.000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.000
CaC <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	440.000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370.000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.000
KI	0.830
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	15.600
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.600
CoCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.800
Fe-NaEDTA	37.300
Vitaminler	Konsantrasyon (mg/l)
Thiamine HCl	1.00
Nicotinic Acit	0.50
Prydoxine HCl	0.50
Glycine	2.00
Organik maddeler	Konsantrasyon (mg/l)
<i>Myo-inositol</i>	100.00

### 2.2.4.1. Farklı Çeşit ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Anter Kültürü Performansına Etkisi

Bu protokolda toplamda 2 farklı çeşit donör bitki olarak yetiştirilmiştir. Uygun büyüklüğe gelen ayçiçeği kapitulumların hem anterlerin hem de ovüller eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. İki farklı çeşide ait eksplantlar embriyonik kallus elde etmek amacıyla farklı miktarlarda BAP, NAA, AgNO<sub>3</sub> ve PVP ile 20 g/L sukroz içeren 8 g/L agar ile katılaştırılmış MS besin ortamında kültüre alındıktan sonra 16/8 saat aydınlık karanlık fotoperyotta inkübe edilmiştir. Kültür ortamlarından elde edilen kalluslar 0.5 mg/l BAP ile 30 g/L sukroz içeren 8 g/L agar ile katılaştırılmış MS besin ortamında alt kültüre alınmıştır.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve kimyasalların konsantrasyon ve kombinasyonları

Çeşitler	Gruplama	Uygulamalar			
		Bitki Büyüme Düzenleyicileri		AgNO <sub>3</sub> (mg/l)	PVP (g/l)
		BAP (mg/l)	NAA (mg/l)		
İnegöl Alası	Uygulama 1	0.50	0.50	-	-
	Uygulama 2	0.50	0.50	1.00	-
	Uygulama 3	0.50	0.50	-	1.00
	Uygulama 4	1.00	2.00	-	-
	Uygulama 5	1.00	2.00	1.00	-
	Uygulama 6	1.00	2.00	-	1.00
	Uygulama 7	2.00	0.01	-	-
	Uygulama 8	2.00	0.01	1.00	-
	Uygulama 9	2.00	0.01	-	1.00
SH361	Uygulama 1	0.50	0.50	-	-
	Uygulama 2	0.50	0.50	1.00	-
	Uygulama 3	0.50	0.50	-	1.00
	Uygulama 4	1.00	2.00	-	-
	Uygulama 5	1.00	2.00	1.00	-
	Uygulama 6	1.00	2.00	-	1.00
	Uygulama 7	2.00	0.01	-	-
	Uygulama 8	2.00	0.01	1.00	-
	Uygulama 9	2.00	0.01	-	1.00

### 2.2.4.2. Farklı Çeşit, Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Sıcaklık İnkübasyon Süresi Uygulamalarının Anter Kültürü Performansına Etkisi

Bu protokolda toplamda 2 farklı çeşit donör bitki olarak yetiştirilmiştir. Uygun büyüklüğe gelen ayçiçeği kapitulumlarından izole edilen anterler Tablo 4'te verilen ortamlarda kültüre alınmıştır. Daha sonra kültüre alınan anterler 2 veya 4 gün 35 °C'de karanlık ortamda inkübasyona alınıp sıcaklığın süreye bağlı olarak anterlerde haploit bitki elde etme potansiyeli üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sıcaklık uygulamasından sonra 16/8 h aydınlık-karanlık periyotta inkübasyona bırakılmıştır. Kültür ortamlarından elde edilen kalluslar yaklaşık 3 hafta 0.50 mg/l BAP içeren MS besin ortamında alt kültüre alınmıştır. Çalışmada tüm ortamlar MS (4.40 g/l), sukroz (20 g/l) ve agar (8.00 g/l) içermektedir

Tablo 4. Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve sıcaklık uygulamaları

Çeşitler	Sıcaklık	Gruplama	Uygulamalar			
			Bitki Büyüme Düzenleyicileri BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	AgNO <sub>3</sub> (mg/l)	PVP (g/l)
İnegöl Alası	Sıcaklık 1	Uygulama 1	0.50	0.50	-	-
		Uygulama 2	0.50	0.50	1.00	-
		Uygulama 3	0.50	0.50	-	1.00
		Uygulama 4	1.00	2.00	-	-
		Uygulama 5	1.00	2.00	1.00	-
		Uygulama 6	1.00	2.00	-	1.00
		Uygulama 7	2.00	0.01	-	-
		Uygulama 8	2.00	0.01	1.00	-
		Uygulama 9	2.00	0.01	-	1.00
	Sıcaklık 2	Uygulama 1	0.50	0.50	-	-
		Uygulama 2	0.50	0.50	1.00	-
		Uygulama 3	0.50	0.50	-	1.00
		Uygulama 4	1.00	2.00	-	-
		Uygulama 5	1.00	2.00	1.00	-
		Uygulama 6	1.00	2.00	-	1.00
		Uygulama 7	2.00	0.01	-	-
		Uygulama 8	2.00	0.01	1.00	-
		Uygulama 9	2.00	0.01	-	1.00
SH361	Sıcaklık 1	Uygulama 1	0.50	0.50	-	-
		Uygulama 2	0.50	0.50	1.00	-
		Uygulama 3	0.50	0.50	-	1.00
		Uygulama 4	1.00	2.00	-	-
		Uygulama 5	1.00	2.00	1.00	-
		Uygulama 6	1.00	2.00	-	1.00
		Uygulama 7	2.00	0.01	-	-
		Uygulama 8	2.00	0.01	1.00	-
		Uygulama 9	2.00	0.01	-	1.00

<b>Sıcaklık 2</b>	Uygulama 1	0.50	0.50	-	-
	Uygulama 2	0.50	0.50	1.00	-
	Uygulama 3	0.50	0.50	-	1.00
	Uygulama 4	1.00	2.00	-	-
	Uygulama 5	1.00	2.00	1.00	-
	Uygulama 6	1.00	2.00	-	1.00
	Uygulama 7	2.00	0.01	-	-
	Uygulama 8	2.00	0.01	1.00	-
	Uygulama 9	2.00	0.01	-	1.00

\* Sıcaklık 1: 35 °C'de 2 gün inkübasyon, Sıcaklık 2: 35 °C'de 4 gün inkübasyon

#### 2.2.4.3. Farklı Dozlarda 2.4-D İçeren Ortamlarda Anter Kültürü

Bu protokolde tek çekirdekli dönemde hasat edilen kapitulumlar sterilizasyona tabi tutulduktan sonra 4.4 g/l MS, 30.0 g/l sukroz ve 8.00 g/l agar ilaveli BAP ve 2.4-D kombinasyonları içeren (Tablo 5) ortamlarda 10 gün süreyle 16/8 aydınlık-karanlık periyotta inkübasyona alınmıştır. Elde edilen kalluslar 4.4 g/l MS, 30.0 g/l sukroz ve 8.00 g/l agar ilaveli 0.20 mg/l BAP içeren ortamda 16/8 h aydınlık-karanlık periyotta 10 gün bekletildikten sonra 4.4 g/l MS, 30.0 g/l sukroz ve 8.00 g/l agar ilaveli 0.05 mg/l BAP içeren ortama aktarılmıştır.

Tablo 5. Farklı dozlarda 2.4-D içeren ortam kombinasyonları

Çeşitler	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	
	2.4-D (mg/l)	BAP (mg/l)
İnegöl Alası	0.50	0.50
	1.00	0.50
	1.50	0.50
	2.00	0.50
SH361	0.50	0.50
	1.00	0.50
	1.50	0.50
	2.00	0.50

#### 2.2.4.4. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri İçeren Ortamlarda Kazeinin Anter Kültürüne Etkisi

Bu protokolde, iki farklı çeşit kullanılmıştır. Donör bitkilerin tek çekirdekli dönemde hasat edilen kapitulumları, soğuk uygulaması için 24 saat boyunca +4 °C'de karanlık bekletilmiş ve BAP, NAA, 2.4-D ile CH içeren ortamlara (Tablo 6) ekimi yapılmıştır.

Petri kapları karanlıkta 48 saat boyunca +35 °C'de sıcak uygulamasına tabi tutulduktan sonra 16/8 periyotta aydınlık-karanlık ortamda +25 °C'de 20 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen kalluslar 0.50 mg/l Kinetin ve 1.00 g/l PVP içeren ortamlarda +25 °C'de 10 gün boyunca inkübasyona alınmıştır. Elde edilen sürgünler 0.20 mg/l BAP içeren sürgün büyütme ortamına aktarılarak +25 °C'de 15 gün boyunca 16/8 periyotta aydınlık - karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Sürgünler belirgin hale geldiğinde, 4.40 g/l MS, 30.00 g/l sukroz ve 8.00 g/l agar içeren hormonsuz ortamda +25 °C'de 23 gün boyunca 16/8 periyotta aydınlık-karanlık ortamda inkübasyona alınmıştır. Son olarak, elde edilen bitkiler 1/2 MS, 0.50 mg/l NAA ve 1/2 MS, 0.50 mg/l IAA içeren köklendirme ortamına aktarılmıştır.

Tablo 6. Farklı büyüme düzenleyici içeren ortamlarda kazeinin kullanımı

Çeşitler	Bitki Büyüme Düzenleyiciler			Uygulama
	BAP (mg/l)	2-4D (mg/l)	NAA(mg/l)	CH (mg/l)
İnegöl Alası	0.50	0.50	-	-
	0.50	0.50	-	500
	1.00	-	2.00	-
	1.00	-	2.00	500
SH361	0.50	0.50	-	-
	0.50	0.50	-	500
	1.00	-	2.00	-
	1.00	-	2.00	500

\*CH: Casein hydrolysate

#### 2.2.4.5. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri, Aktif Kömür ve Farklı Uygulamalar

Bu protokolde tek çekirdekli dönemde hasat edilen kapitulumlar farklı bitki büyüme düzenleyici içeren ortamlarda (Tablo 7) uygulamalara tabi tutulup anter kültürü performansları incelenmiştir. Bu amaçla;

**Uygulama 10'**da 1. Aşamada 2.00 mg /l NAA, 1.00 mg/l BAP, 4.40 g/l MS, 30.00 g/l sukroz ve 8.00 g/l agar ilaveli besin ortamına ekimi yapılan anterler 10 gün boyunca karanlıkta tutulduktan sonra 2. Aşamada embriyonik kallus ortamı olarak 0.50 mg/l BAP+0.10 mg/l NAA içeren ortamda 10 gün 16/8 periyotta aydınlık - karanlık ortamda inkübasyona alınmıştır. Daha sonra 3. aşamada kallus+somatik embriyo ortamı olarak 0.50 mg/l BAP içeren ortamda 10 gün 16/8 periyotta aydınlık - karanlık ortamda inkübasyona alınmıştır. Oluşan kallus ve somatik embriyoları 4. aşamada sürgüne yönlendirmek için 0.20 mg/l BAP içeren ortama aktarılmıştır.

**Uygulama 11**'de 1. aşamada 2.00 mg/l NAA, 1.00 mg/l BAP, 4.40 g/l MS, 30 g/l sukroz ve 8.00 g/l agar ilaveli besin ortamına ekimi yapılan anterler 5 gün boyunca karanlıkta tutulduktan sonra 2. aşamada 0.50 mg/l Kinetin, 1.00 g/l PVP ilave edilmiş besin ortamında alt kültüre alınmış ve daha sonra 16/8 periyotta aydınlık - karanlık ortamda +24 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.

**Uygulama 12**'de hasat edilen kapitulomlar ön uygulama olarak 24 saat +4 °C'de karanlık ortamda tutulduktan sonra sterilizasyona tabi tutulup 4.00 mg/l NAA, 0.50 mg/l BAP, 10.00 mg/l AgNO<sub>3</sub>, 2.50 g/l aktif kömür ilaveli 4.40 g/l MS, 30.00 g/l sukroz ve 8.00 g/l agar içeren besin ortamına ekimi yapıldıktan sonra anterler karanlıkta 48 saat +35 °C'de sıcak uygulamasına tabi tutulmuştur. Daha sonra +24 °C'de 16/8 periyotta aydınlık - karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

Tablo 7. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri, aktif kömür ve uygulamalar

Çeşitler	Uygulama	1.Aşama	2.Aşama	3.Aşama	4.Aşama
İnegöl Alası	Uygulama 10	2.0 mg/l NAA+ 1.0 mg/l BAP	0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA	0.5 mg/l BAP	0.2 mg/l BAP
	Uygulama 11	2.0 mg/l NAA+ 1.0 mg/l BAP	0.5 mg/l Kinetin. 1 g/l PVP		
	Uygulama 12	4.0 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP+10 mg/l AgNO <sub>3</sub> +2.5 g/l Aktif kömür			
SH361	Uygulama 10	2.0 mg/l NAA+ 1.0 mg/l BAP	0.5 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA	0.5 mg/l BAP	0.2 mg/l BAP
	Uygulama 11	2.0 mg/l NAA+ 1.0 mg/l BAP	0.5 mg/l Kinetin. 1 g/l PVP		
	Uygulama 12	4.0 mg/l NAA+0.5 mg/l BAP+10 mg/l AgNO <sub>3</sub> +2.5 g/l Aktif kömür			

### 2.2.5. Ploidy Seviyesinin Belirlenmesi

Androgenesis ve ginogenesis gibi üreme teknikleri, bitkilerde farklı ploidy seviyelerine sahip bitkiler elde etmek için önemli araçlar sunmaktadır. Bu yöntemler, bitkilerin üreme hücrelerinin manipülasyonu ile gerçekleştirilir ve bu şekilde yeni bitki genotipleri üretilebilir. ploidy seviyesi, bitkilerin kromozom sayısının belirlenmesinde önemli bir rol oynar ve bitkilerin genetik yapısı, morfolojisi ve adaptasyon kabiliyeti üzerinde etkili olabilir. ploidy seviyesinin belirlenmesinde her bitki türü için yöntemin optimize edilmesi

bazı zorluklar içerse de, kolay kullanımı, hızlı sonuçlar vermesi ve güvenilirliği sayesinde, flow sitometrisi en çok tercih edilen yöntemlerden biri haline gelmiştir (Arı, 2006).

### **Ploidy analizi**

Bitkilerin ploidy düzeyleri flow sitometri yöntemiyle belirlenmiş çekirdek DNA içeriklerinden yararlanılarak belirlenmiştir.

**Flow Sitometri İle Çekirdek DNA Analizi:** Çekirdek DNA analizleri Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında bulunan PARTEC (CyFlow Space) marka Flow sitometri cihazı kullanılarak yapılmıştır. Çekirdek DNA analizleri bitkilerden alınan taze yaprak dokuları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen örnekler kontrol bitkisi ile birlikte flow sitometri analizleri yapılmak üzere Kayseri'den Tekirdağ'a yolda zarar görmemesi için, içinde MS doku kültürü ortamı bulunan kavanozlarda (Şekil 16) alt kültür yapıldıktan sonra kargo ile iletilmiştir. Analizlerde internal standart olarak İnegöl Alası çeşidi kullanılmıştır. Analizlerde PARTEC firmasının Dapi hazır kitleri (CyStain UV Precise P) kullanılmış ve üretici firmanın protokolü takip edilmiştir. Çalışmada kullanılan protocol aşağıda sunulmuştur:

- 1) Yaklaşık olarak 0.5 cm<sup>2</sup> büyüklüğünde taze yaprak dokusu (örnek ve standart bitkinin her ikisinden) petri kabına konulmuş ve üzerine 500 µl Extraction Buffer ilave edilmiştir.
- 2) Yaprak dokuları keskin jilet ile 30-60 saniye süresince küçük parçalara ayrılan kadar parçalandıktan sonra hazırlanmış örnek petri kabı içerisinde hafifçe 10-15 saniye çalkalanmıştır.
- 3) Çalkalama işleminden sonra yaklaşık 40 saniye petri kabında bekletilen örnek Partec marka 50 µl CellTrics filtre ile süzülerek cihaza özel cam tüp içerisine transfer edilmiştir.
- 4) Tüp içerisine 2ml staining solüsyon (Dapi) ilave edilerek hazırlığı tamamlanmış olan örnek ışıksız bir ortamda 30-60 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler flow sitometri cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.

**Çekirdek DNA İçeriğinin Hesaplanması:** Bir bitkinin çekirdek DNA içeriği belirlenmek istendiğinde, bitkinin DNA içeriği, DNA içeriği bilinen bir standart bitki ile kıyaslanır. Bu durum da yukarıda da belirtildiği üzere standart bitkinin dokuları da analiz edilecek örneğe ait dokularla birlikte aynı anda hazırlanır. Bir örneğin mutlak çekirdek DNA içeriği, örnek ile seçilen standardın G1 piklerinin florasan yoğunluklarına ait değerler kullanılarak aşağıdaki formül aracılığıyla pikogram olarak hesaplanır.

Çekirdek DNA içeriği: (örneğin florasan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)) (standartın florasan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)) X standartın pikogram olarak bilinen DNA içeriği



Şekil 16. Kavonoz içinde flow sitometri analizleri yapılmak üzere gönderilen bitkiler

### **Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi**

Verilerin Değerlendirilmesi;

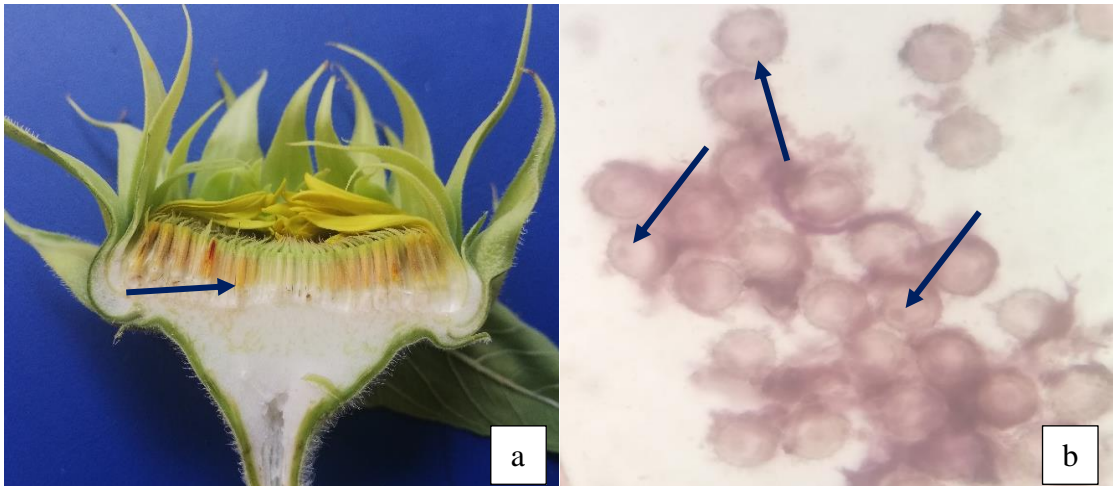
Farklı çeşit ve bitki büyüme düzenleyicilerin anter kültürü performansına etkisi tesadüf parsellerinde 2 x 4 (2 çeşit x 4 uygulama) faktöriyel deneme desenine göre, farklı çeşit, bitki büyüme düzenleyicileri ve sıcaklık inkübasyon süresi uygulamalarının anter kültürü performansına etkisi tesadüf parsellerinde 2 x 2 x 4 (2 çeşit x 2 sıcaklık x 4 uygulama) faktöriyel deneme desenine göre, farklı dozlarda 2.4-D içeren ortamlarda anter kültürü performansına etkisi tesadüf parsellerinde 2 x 2 (2 çeşit x 2 uygulama) faktöriyel deneme desenine göre, farklı büyüme düzenleyici içeren ortamlarda kazeinin anter kültürü performansına etkisi tesadüf parsellerinde 2 x 4 (2 çeşit x 4 uygulama) faktöriyel deneme desenine göre, farklı bitki büyüme düzenleyicileri, aktif kömür ve uygulamaların anter kültürü performansına etkisi tesadüf parsellerinde 2 x 3 (2 çeşit x 3 uygulama) faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüş, elde edilen veriler ‘JMP 13.2.0’ programı ile varyans analizine tabi tutulmuştur. Normal dağılım göstermeyen % değerlere Arcsin transformasyonu uygulanmış ve muamele ortalamaları Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır (Snedecor ve Cochran, 1967).

### 3. BÖLÜM

#### BULGULAR VE TARTIŞMA

##### 3.1. Uygun Yaştaki Kapitulumların ve Anterlerin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan kapitulumlardan elde edilen anterlerin uygun dönemdeki anterler olup olmadığı önce stereo mikroskop altında incelenmiştir. Mikroskop altında incelenip belirlenen anterlerin henüz polen oluşum dönemine girmemiş, tek çekirdekli mikrosporları içeren anterler olup olmadığına karar vermek için farklı boydaki kapitulumlardan elde edilen anterler % 1'lik asetokarmin boya ile boyanmıştır. Yapılan inceleme sonucunda ekimi yapılan ayçiçeklerinden ekimden yaklaşık olarak 63 gün sonra uygun büyüklükte kapitulumlar elde edilmiş ve hasadı yapılan kapitulumların iç merkezden dış çerçevesine doğru gidildikçe tek çekirdekli dönemin geçtiği ve haploid bitki elde etmek için en ideal anterlerin kapitulumun merkezine doğru olan anterlerden elde edildiği saptanmıştır. Bu dönemde alınan anterlerdeki mikrosporların asetokarmin boyanması ve mikroskop altında incelenmesi ile tek çekirdekli dönemleri belirlenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. a) Ayçiçeği kapitulumun yan kesitinden tüp çiçeklerinin görünümü ve uygun anterlerin bulunduğu bölge b) asetokarmin boya ile boyanıp tek çekirdekli dönemin mikroskop (Zeiss Primostar) altında incelenmesi

Haploid bitki elde etmek için anterlerin kullanıldığı çalışmalarda mikrospor hücrelerinin gelişme döneminin önemini vurgulayan araştırmacılar, uygun gelişme dönemi belirlenmeden kullanılan anterlerde başarı sağlanamayacağı belirtilmiştir (Kim ve ark., 2004; Nowaczyk ve Kisiała, 2006; Parra-Vega ve ark., 2013; Barroso ve ark., 2015).

### 3.2. Kapitulumların Sterilizasyonu ve Anter İzolasyonu

Uygun büyüklük ve yaştaki kapitulumların belirlenmesi aşamasından sonra anterlere en az zarar verecek ve enfeksiyon riskini en aza indirecek uygun sterilizasyon yönteminin belirlenmesi için ön çalışmalar yapılmıştır. Yapılan ön çalışmalar neticesinde % 1-2'lük cıva klorürde sterilizasyonu yapılan kapitulumlarda doku zararlanmalarına rastlanmazken, cıva klorür yüzdesi ve uygulama süresi artıkça doku zararlanmalarına bağlı anterlerde renk kararmaları görülmeye başlanmıştır. Ayrıca ekimi yapılan anterlerde inkübasyonda geçen sürenin artmasıyla birlikte kararmalar ve doku ölümleri ile anterlerin tamamen zarar gördüğü belirlenmiştir. Fakat % 1 ile 2 arasındaki cıva klorürde yaklaşık bir dakika çalkalanan kapitulumlarda herhangi bir doku ölümleri görülmediği, enfeksiyona rastlanmadığı tespit edilmiş ve bundan sonra yapılan bütün çalışmalarda risk almamak adına % 1.50'lük cıva klorürde bir dakika sterilizasyon yapılmıştır. Bunun sonucunda anterlerde zararlanmaların ve besin ortamlarında enfeksiyon oranının çok düşük seviyede kaldığı belirlenmiştir.



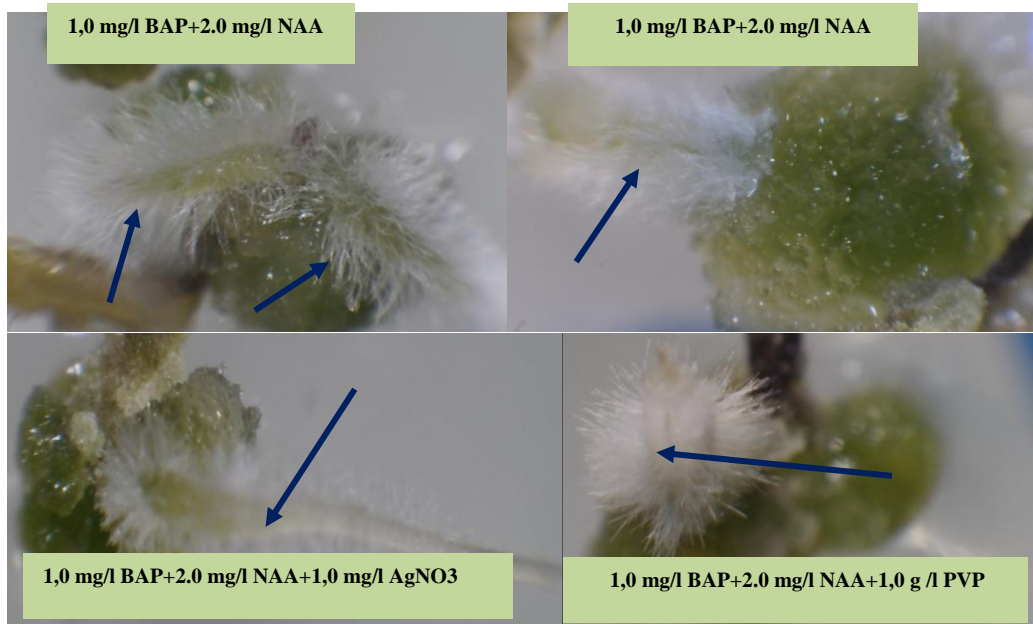
Şekil 18. Ayçiçeği anterlerinin sırasıyla a) % 1 cıva klorür b) % 2 cıva klorür c) % 3 cıva klorür ile sterilizasyon sonrası meydana gelen doku kararması

### 3.3. Anter Kültür Koşulları ve Ön Uygulamaların Bulguları

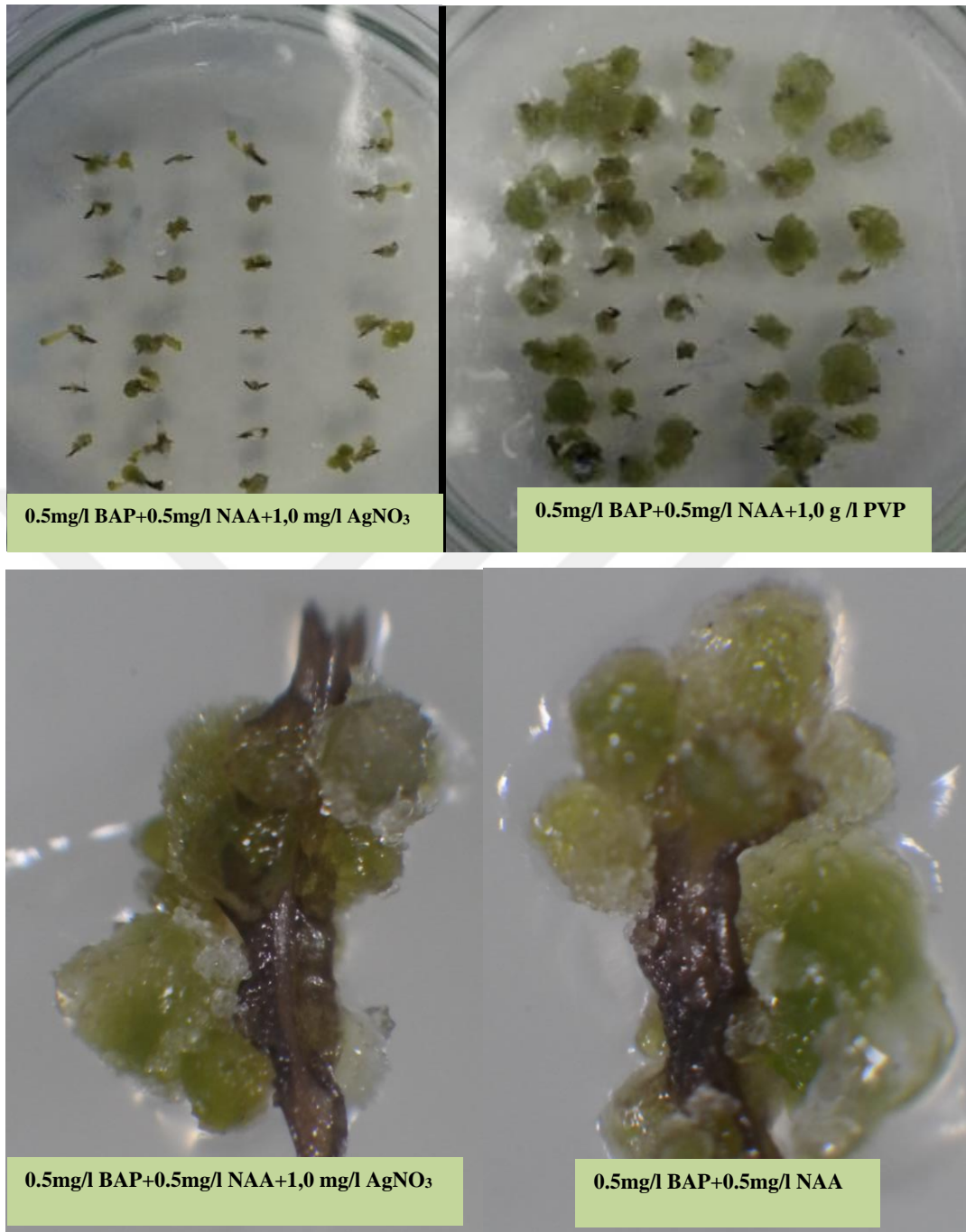
#### 3.3.1. Farklı Çeşit ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Anter Kültürü Performansına Etkisi

İki farklı çeşitin donör bitki olarak kullanıldığı çalışmada, anter kültürü ortamı olarak sukroz (20.00 g/l) ve agar (8.00 g/l) içeren MS (4.40 g/l), besin ortamı kullanılmıştır. Yapılan uygulamada, farklı BAP ve NAA kombinasyonlarının tek başına ve  $AgNO_3$  ile PVP'nin varlığında embriyonik kallus ve bitki oluşumu üzerindeki etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Deneme sonucunda kallus oluşturan anter sayısı ve kallus oluşturan anter oranları incelenmiştir.

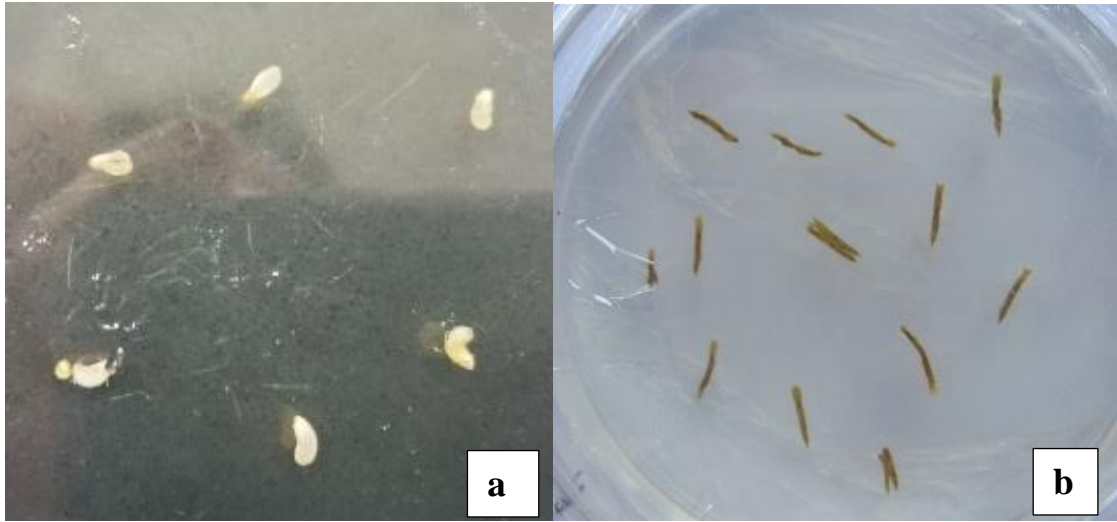
Deneme sonucunda 0.50 mg/l BAP ve 0.50 mg/l NAA içeren besin ortamlarının anterlerde yüksek oranda kallus oluşumuna neden olduğunu ve  $AgNO_3$  ve PVP'nin kullanımıyla bu oranın daha da arttığını göstermiştir. Özellikle, PVP içeren ortamlarda gelişen kalluslar hacimsel olarak daha büyük ve canlı bir görünüme sahip olmuştur (Şekil 20). Öte yandan, 2.00 mg/l BAP ve 0.01 mg/l NAA içeren besin ortamlarının hem tek başına kullanımında hem de  $AgNO_3$  ve PVP ile birlikte kullanımında kallus oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 21b). Ayrıca 1.00 mg/l BAP ve 2.00 mg/l NAA içeren besin ortamlarında, NAA miktarının artmasıyla anterlerde kılcak kök oluşumları gözlenmiştir (Şekil 19). Ovül kültüründe ise kallus gelişimi gözlemlenmemiş ve daha sonra yapılan kültür çalışmalarında sadece anter kültürüyle devam edilmiştir (Şekil 21a).



Şekil 19. Ayçiçeği anterlerinde 1,0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l NAA'nın tek başına ve 1,0 mg/l  $AgNO_3$  ile 1,0 g/l PVP içeren besin ortamlarında gelişen kök oluşumlarından görüntüler



*Şekil 20.* Ayçiçeği anterlerinde 0.5mg/l BAP+0.5mg/l NAA'ın 1,0 mg/l AgNO<sub>3</sub> ve 1,0 g/l PVP içeren besin ortamlarında gelişen kalluslardan görüntüler



Şekil 21 a) Ovaryumlardan izole edilerek embriyo teşvik ortamlarına ekimi yapılan ovüller b) Anterlerden izole edilerek embriyo teşvik ortamlarına ekimi yapılan anterler

İki farklı çeşidin MS besin ortamında farklı koşullar altında kallus oluşum tepkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada, İnegöl Alası ve SH361'in farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri (BAP ve NAA) ile  $AgNO_3$  ve PVP gibi kimyasal bileşiklerin etkisi altında değerlendirilmiştir.

Tablo 8. Farklı bitki büyüme düzenleyicisi ve kimyasal uygulamalarının çerezlik ayçiçeği çeşitlerinde kallus oluşturan anter yüzdesine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri
Çeşit (Ç)	1	0.27	0.270	0.0199
Uygulama (U)	8	105569.40	13196.175	988.8102**
Ç x U	8	287.02	34.752	2.6884*
Hata	72	960.88	13.345	
Genel	89	106817.60		

\*\* : 0.01; \* : 0.05 düzeyinde önemli

İki farklı ayçiçeği çeşitinde farklı BAP ve NAA konsantrasyonları ile  $AgNO_3$  ve PVP kombinasyonlarının kallus oluşturan anter yüzdesine etkisinin varyans analizi sonuçları (transforme değerler) Tablo 8'de verilmiştir.

Varyans analizi tablosu incelendiğinde çeşitler arasında farkın önemsiz olduğu, uygulamalar arasındaki farkın % 1 düzeyinde, Çeşid (Ç) × Uygulama (U) interaksiyonunun ise % 5 düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur.

Tablo 9. Farklı bitki büyüme düzenleyicisi ve kimyasal uygulamalarının çerezlik ayçiçeği çeşitlerinde kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar

Uygulama	İnegöl Alası	SH361	Ortalamalar
Uygulama 1	71.59 cde	68.57 de	70.08 b
Uygulama 2	76.08 bcd	85.88 a	80.98 a
Uygulama 3	80.74 ab	79.62 abc	80.18 a
Uygulama 4	66.71 e	65.81 e	66.26 b
Uygulama 5	66.96 e	65.63 e	66.30 b
Uygulama 6	68.37 de	65.92 e	67.14 b
Uygulama 7	0.00 f	0.00 f	0.00 c
Uygulama 8	0.00 f	0.00 f	0.00 c
Uygulama 9	0.00 f	0.00 f	0.00 c
Ortalama	47.83	47.94	

\*: Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.

Tablo 9'da elde edilen verilere göre, kallus oluşturma yeteneği değerlendirildiğinde, en yüksek kallus oluşturma oranı % 85.88 olarak SH361 ile Uygulama 2'den elde edilirken SH361 x U3 ve İnegöl Alası x U3 interaksiyonlarından elde edilen değerler istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır. En düşük değerler ise her iki çeşitte de Uygulama 7, 8 ve 9 ile interaksiyonlarından elde edilmiştir.

Uygulamaların genel ortalaması incelendiğinde, en yüksek kallus oluşturma oranı sırasıyla % 80.98 ve % 80.18 değerlerine sahip olan Uygulama 2 ve Uygulama 3'den elde edilmiştir. En düşük değerler ise Uygulama 7, 8 ve 9'dan elde edilmiş olup, oluşan fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 9).

Çeşitlerin genel ortalaması incelendiğinde İnegöl Alası en yüksek ortalaması % 47.83 ve SH361 en yüksek ortalaması % 47.94 olarak belirlenmiş olup ortaya çıkan fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 9).

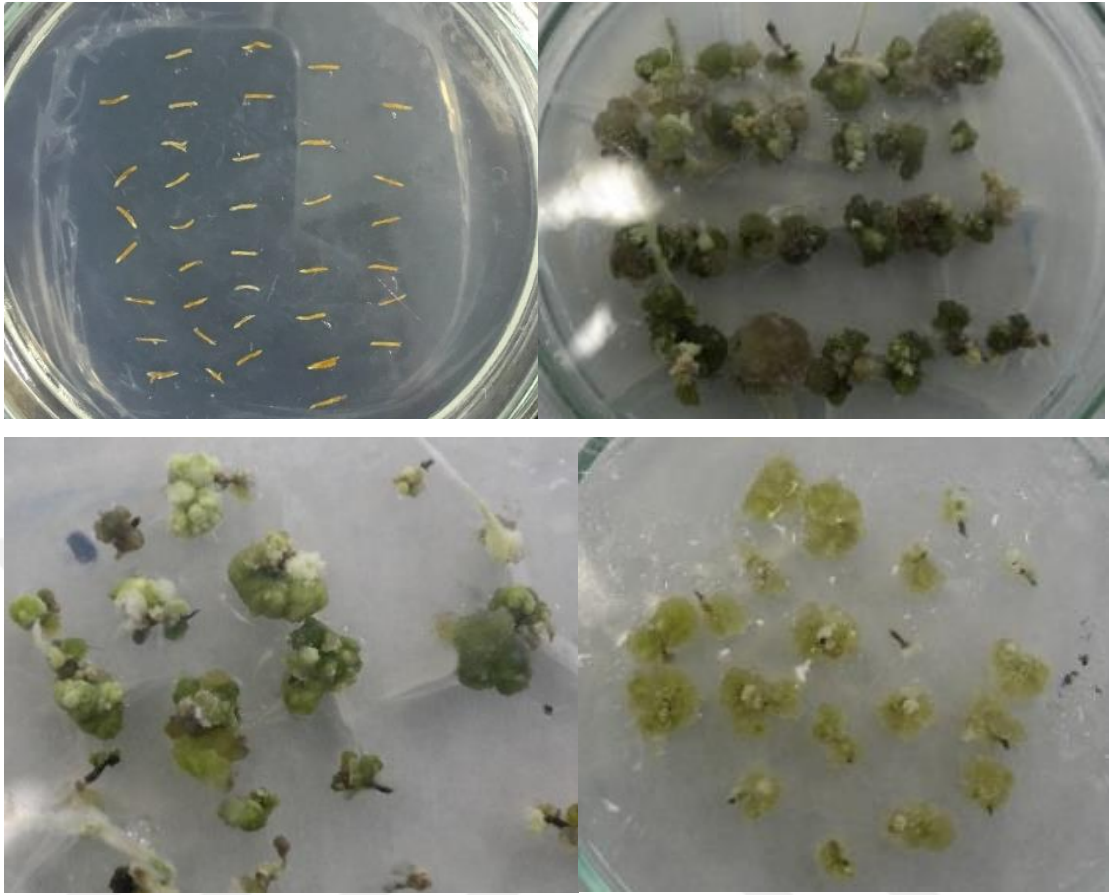
İki farklı çeşidin anter eksplantları kullanılarak yapılan çalışmada, İnegöl Alası için en iyi kallus oluşumu 0.50 mg/l BAP + 0.50 mg/l NAA bitki büyüme düzenleyicisi konsantrasyonuna 1.00 g/l PVP eklendiği uygulamada elde edilirken, SH361 çeşidi için

ise en iyi kallus oluşumu büyüme düzenleyicisi konsantrasyonuna 1.00 mg/l AgNO<sub>3</sub>'ın eklendiği uygulamadan elde edilmiştir.

Bu bulgular, bitki hücre kültürü ve doku kültürü alanındaki araştırmalar açısından önemlidir. AgNO<sub>3</sub> ve PVP gibi kimyasal bileşiklerin, kallus oluşumu gibi önemli hücresel süreçler üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde Thengane ve ark. (1994) tarafından yapılan bir araştırmada, ayçiçeğinde anter kültürü kullanılarak dört farklı ayçiçeği genotipinden bitki rejenerasyonu oluşturma potansiyeli incelenmiş ve embriyo çimlenmesini teşvik etmek için gümüş nitrat (2.50 mg/l) kullanılmış ve bunun sonucunda bitkiler elde edilebilmiş. Diğer bir benzer çalışma olarak Mandal ve ark. (2001) tarafından yapılan araştırmada, gümüş nitratin farklı kimyasallar İLE denendiği ve bunun sonucunda gümüş nitratin, embriyogenik frekansı artırdığı ve uygulamaya tepki veren eksplantlarda, eksplant başına embriyo sayısını önemli oranda arttırdığı bildirilmiştir.

### **3.3.2. Farklı Çeşi, Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Sıcaklık İnkübasyon Süresi Uygulamalarının Anter Kültürü Performansına Etkisi**

İki farklı çeşidin donör bitki olarak kullanıldığı bu çalışmada anterler, uygun olgunluğa ulaştıktan sonra sterilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve ardından içerisinde BAP ve NAA kombinasyonları ile birlikte AgNO<sub>3</sub> ve PVP içeren anter geliştirme ortamlarına aktarılmıştır. Anterler, iki ve dört gün boyunca karanlık ortamda 35°C sıcaklıkta inkübasyona alınarak, sıcaklık süresinin haploit bitki elde etme potansiyeli üzerindeki etkisi incelenmiştir. Belirli sürelerde karanlık ortamda sıcaklığa maruz bırakılan anterler, daha sonra +25°C sıcaklıkta 16/8 aydınlık-karanlık periyotta inkübasyona alınmıştır. Yaklaşık üç hafta sonra anterlerin gelişimi gözlemlenmiş ve elde edilen sonuçlar veri olarak kaydedilmiştir. Ardından elde edilen kalluslar, 0.5 mg/l BAP içeren MS besin ortamında alt kültüre alınmıştır. Farklı büyüme düzenleyiciler, PVP veya AgNO<sub>3</sub> içeren ortamlarda anterlerin yüksek sıcaklıkta inkübasyon sürelerinin haploit bitki elde etme potansiyeli üzerine etkisi incelenmiştir.



Şekil 22. Ayçiçeği anterlerinde sıcaklık uygulaması sonrasında gelişen kalluslardan görüntüler

İki farklı çerezlik ayçiçeği çeşitinin MS besin ortamında iki farklı sıcaklık, farklı BAP, NAA ile  $\text{AgNO}_3$  ve PVP konsantrasyonunun ve kombinasyonlarının kallus oluşturan anter yüzdesine etkisinin varyans analizi sonuçları Tablo 10'da verilmiştir.

Varyans analiz tablosu incelendiğinde kallus oluşturan anter yüzdesi üzerine Sıcaklık (S), Uygulama (U) ve Sıcaklık (S) x Uygulama (U) interaksiyonunun etkisi % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Diğer varyasyon kaynaklarının etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Tablo 10. Farklı çeşit, bitki büyüme düzenleyicileri ve sıcaklık inkübasyon süresinin kallus oluşturan anter yüzdesine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri
Çeşit (Ç)	1	25.75	25.750	3.2919
Sıcaklık (S)	1	266.74	266.740	34.1015**
Uygulama (U)	8	194223.80	24277.975	3103.809**
Ç x S	1	19.56	19.560	2.501
Ç x U	8	36.80	4.600	0.588
S x U	8	689.00	86.125	11.0105**
Ç x S x U	8	13.94	1.7425	0.2228
Hata	144	25.75	0.1788	
Genel	179	266.74		

\*\* : 0.01 düzeyinde önemli

Farklı çeşit, bitki büyüme düzenleyicileri ve sıcaklık inkübasyon süresinin kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11’in incelenmesinden de görüleceği gibi çeşitler arasında sıcaklık ve bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi üzerinde farklılıkların önemli olduğu görülmektedir. Uygulamaların genel ortalaması değerlendirildiğinde, en yüksek kallus oluşturan anter yüzdesi değeri 74.16 Uygulama 2’den elde edilirken, % 72.35 değeri ile Uygulama 3 istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. En düşük değerler ise Uygulama 7 - 8 ve 9’dan elde edilmiş olup, oluşan fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Sıcaklık x Uygulama interaksiyon değerleri incelendiğinde, en yüksek değer % 77.30 ile % 75.24 olarak sırasıyla Uygulama 2 (0.5 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L AgNO<sub>3</sub>) ve Uygulama 3’den (0.5 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA+1.0 g/L PVP) elde edilmiş olup istatistiki olarak en yüksek grupta yer almışlardır. En düşük değerler ise Uygulama 7, 8 ve 9’dan elde edilmiş olup oluşan fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 11).

Çeşitlerin genel ortalaması incelendiğinde İnegöl Alası ortalaması % 47.48 ile 44.39 arasında, SH361 genel ortalaması incelendiğinde % 47.58 ile 45.80 arasında değişiklik gösteriyor olup ortaya çıkan fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 11).

Tablo 11. Farklı çeşit, bitki büyüme düzenleyicileri ve sıcaklık inkübasyon süresinin kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar

Uygulama	İnegöl Alası		SH361		S x U		Genel Ortalama
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	
Uygulama 1	65.62	72.34	66.28	71.91	65.95 ef	72.13 bc	69.04 b
Uygulama 2	69.74	77.44	72.33	77.15	71.03 bcd	77.30 a	74.16 a
Uygulama 3	74.44	69.20	76.04	69.71	75.24 ab	69.46 c-f	72.35 a
Uygulama 4	60.33	67.56	62.18	67.6	61.26 g	67.58 def	64.42 c
Uygulama 5	63.25	69.64	67.70	71.14	65.47 fg	70.39 cde	67.93 b
Uygulama 6	66.13	71.16	67.71	70.71	66.92 def	70.94 bcd	68.93 b
Uygulama 7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 h	0.00 h	0.00 d
Uygulama 8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 h	0.00 h	0.00 d
Uygulama 9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 h	0.00 h	0.00 d
<b>Ortalama</b>	44.39	47.48	45.80	47.58			

\*: Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.

\* S1(Sıcaklık 1): 35 °C'de 2 gün, S2 (Sıcaklık 2): 35 °C'de 4 gün inkübasyon

Benzer şekilde Hamaoka ve ark. (1991) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da yüksek sıcaklığın (35°C) polen kaynaklı embriyoid verimini artırdığı bildirilmiştir. İlk 24 saatte uygulanan yüksek sıcaklık normal polen gelişimini engellemiş ve simetrik bölünmeyi teşvik etmiştir. Kültüre alınan anterlerde yüksek sıcaklık uygulanmadan polen gelişimi normal şekilde gerçekleşirken, yüksek sıcaklığın normal polen gelişimini engellediği ve sporofitik gelişimi teşvik ettiği ortaya çıkmış ve bunun embriyonik kallusların elde edilmesi üzerinde pozitif bir etki yaptığı ortaya konmuştur. Aynı şekilde Engin Özü (2006) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 30 °C'de kültür edilen anterler, 25 °C'de kültür edilen anterlere göre daha yüksek anter reaksiyon oranı ortalaması verdiği bildirilmiştir. Daha önce farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, farklı sürelerde uygulanan yüksek sıcaklık sokunun anter çalışmalarında olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (Atasoy, 2020; Engin Özü 2006; Hamaoka ve ark., 1991; Karakullukçu ve Abak, 1993).

Bu çalışmanın sonuçları, bitki hücre kültürü ve doku kültürü alanında önemli bir bilgi sağlamaktadır. AgNO<sub>3</sub> gibi bileşiklerin kallus oluşumunu teşvik ettiği bilinmektedir. Bu nedenle, AgNO<sub>3</sub> eklenmesiyle kallus oluşumu yükseldiği söylenebilir (Thengane ve ark., 1994; Mandal ve ark., 2001).

### 3.3.3. Farklı Dozlarda 2.4-D İçeren Ortamlarda Anter Kültürü

Bu çalışma, iki farklı çeşidin MS besin ortamında kallus oluşumu üzerindeki tepkilerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Araştırmada, bitki büyüme düzenleyicileri olarak 2.4-D ve BAP'nin farklı konsantrasyonlarının kombinasyonları kullanılmıştır.

Tablo 12 incelendiğinde, iki farklı çeşidin MS besin ortamında farklı koşullar altında kallus oluşum tepkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada, bitki büyüme düzenleyicileri olarak farklı konsantrasyonlarda 2.4-D ve BAP kullanılmıştır. Varyans analiz tablosu incelendiğinde kallus oluşturan anter yüzdesi üzerine, her iki çeşit için de kallus oluşumu, bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonuna bağlı olarak farklı oranlarda gerçekleşmiştir. Yapılan çalışmada uygulamaların kallus oluşumu üzerinde % 1 düzeyinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Tablo 13'te Uygulamaların genel ortalaması incelendiğinde, en yüksek kallus oluşturan anter yüzdesi değeri % 87.65 ile 1.5 mg/L 2.4-D ve 0.5 mg/L BAP içeren uygulamadan elde edilirken, en düşük kallus oluşturan anter yüzdesi değeri % 0 ile 3.0 mg/l 2.4-D ve 0.5 mg/L BAP içeren besin ortamları ile 4.0 mg/L 2.4-D ve 0.5 mg/L BAP içeren uygulamalara ait besin ortamlarında tespit edilmiş olup oluşan fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Elde edilen bulgular haploid bitki elde etme üzerine yapılan birçok farklı çalışmayla da benzer sonuçlar vermiştir (Thengane, 1994; Rodríguez Guzmán, 2020; Khandakar ve ark., 2014).

Çeşitlerin genel ortalaması incelendiğinde İnegöl Alası en yüksek ortalaması % 56.34 ve SH361 en yüksek ortalaması % 56.18 olarak belirlenmiş olup ortaya çıkan fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 13).

Tablo 12. Farklı dozlarda 2.4-D içeren ortamlarda anter kültürünün kallus oluşturan anter yüzdesine ait varyans analiz tablosu

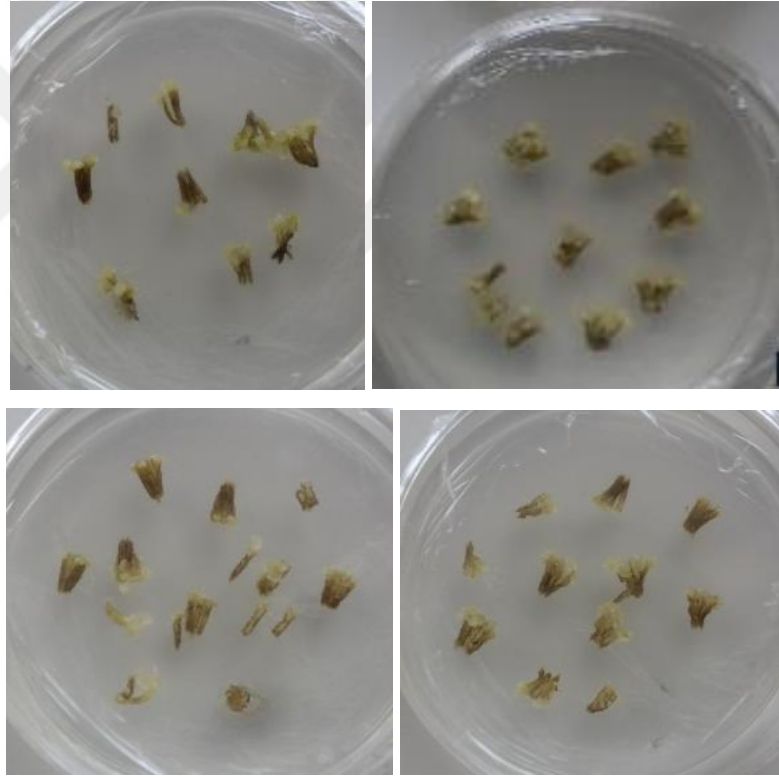
Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri
Çeşit (Ç)	1	0.387	0.3870	0.0202
Uygulama (U)	5	95156.680	19031.3360	992.1504**
Ç x U	5	8.842	1.7684	0.0922
Hata	48	920.732	19.1819	
Genel	59	96086.640		

\*\* : 0.01 düzeyinde önemli

Tablo 13. Farklı dozlarda 2.4-D içeren ortamlarda anter kültürünün kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar

Bitki Büyüme Düzenleyicileri				
2.4-D (mg/L)	BAP (mg/L)	İnegöl Alası	SH361	Genel Ortalama
0.5	0.5	80.54	81.69	81.12 b
1.0	0.5	84.67	84.18	84.42 ab
1.5	0.5	88.37	86.93	87.65 a
2.0	0.5	84.43	84.26	84.35 ab
3.0	0.5	0.00	0.00	0.00 c
4.0	0.5	0.00	0.00	0.00 c
Ortalama		56.34	56.18	

\*: Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.



Şekil 23. 2.4-D içeren ortamlarda anterleden gelişen kalluslar

### 3.3.4. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri İçeren Ortamlarda Kazeinin Anter Kültürüne Etkisi

Bu çalışmada, iki farklı çeşit üzerinde anter kültürü ve bitki rejenerasyonu için farklı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları, kazein hidrolizatının ve farklı ön uygulamaların

etkisi incelenmiştir. Elde edilen veriler, farklı çeşitlerin ve uygulanan faktörlerin kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve sürgün verimine olan etkilerini göstermektedir.

Donör bitkilerin uygun dönemde hasat edilen kapitulumları, soğuk uygulaması için 24 saat boyunca +4 °C'de karanlık ortamda tutulmuştur. Ardından, BAP, NAA, 2.4-D ve CH (Kazein) içeren ortamlarda ekimi gerçekleştirilmiş (Şekil 24) ve karanlıkta 48 saat boyunca +35 °C'de sıcak uygulamasına tabi tutulmuştur. Daha sonra, 16/8 periyotta aydınlık-karanlık ortamda +25 °C'de 20 gün boyunca inkübasyona alınmıştır. Elde edilen kalluslar ve embriyonik kalluslar, 0.5 mg/l Kinetin ve 1.00 g/l PVP içeren ortamlarda +25 °C'de 10 gün boyunca inkübasyona alınmıştır (Şekil 25-26-27-28). Ardından, elde edilen bitkiler 0.20 mg/l BAP içeren sürgün büyütme ortamında +25 °C'de 15 gün boyunca 16/8 periyotta aydınlık-karanlık ortamda inkübasyona alınmıştır (Şekil 29). Bitkilerin gelişimlerini sürdürebilmeleri için aynı ortama alt kültüre alınmışlardır (Şekil 3.13). Sürgünler belirgin hale geldiğinde, 4.40 g/l MS, 30.00 g/l sukroz ve 8.00 g/l agar içeren hormonsuz ortamda +25 °C'de 23 gün boyunca 16/8 periyotta aydınlık-karanlık ortamda inkübasyona alınmıştır. Son olarak, elde edilen bitkiler  $1/2$  MS, 0.50 mg/l NAA ve  $1/2$  MS, 0.50 mg/l IAA içeren köklendirme ortamında köklendirilmeleri sağlanmıştır (Şekil 33).

İki farklı ayçiçeği çeşidinde farklı BAP konsantrasyonları ile 2.4-D, NAA ve CH kombinasyonlarının kallus oluşturan anter yüzdesine etkisinin varyans analizi sonuçları Tablo 14'te verilmiştir. Varyans analizi tablosunda incelendiğinde kallus oluşturan anter yüzdesi üzerine varyasyon kaynaklarının etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Tablo 14. Farklı büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda kazeinin kallus oluşturan anter yüzdesine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F değeri
Çeşit (Ç)	1	4.38903	4.38903	0.1054
Uygulama (U)	3	128.55660	42.8522	1.0288
Ç x U	3	25.17011	8.3900	0.2014
Hata	136	5664.72600	41.6523	
Genel	143	5822.84200		

\*\* : 0.01 düzeyinde önemli

Tablo 15. Farklı büyüme düzenleyicisi içeren ortamlarda kazeinin kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar

Bitki Büyüme Düzenleyiciler						
BAP (mg/L)	2-4D (mg/L)	NAA (mg/L)	CH (mg/L)	İnegöl Alası	SH361	Ort
0.5	0.5			86.81	86.22	86.52
0.5	0.5		500	87.21	85.74	86.48
1.0		2.0		88.21	89.07	88.64
1.0		2.0	500	86.48	86.28	86.38
Ortalama				87.18	86.83	

CH: Casein hydrolysate

Tablo 15'te Uygulamaların genel ortalaması incelendiğinde, en yüksek kallus oluşturan anter yüzdesi değeri % 88.64 ile 1 mg/L BAP ve 2.0 mg/L NAA içeren besin ortamlarında belirlenirken, en düşük kallus oluşturan anter yüzdesi değeri % 86.38 ile 0.5 mg/L BAP, 2.0 mg/L NAA ve 500 mg/L CH içeren besin ortamlarında tespit edilmiş olup ortaya çıkan fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

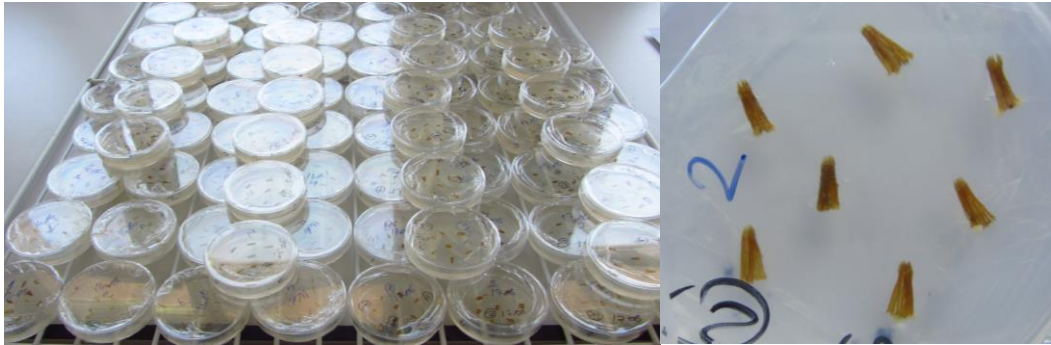
Çeşitlerin genel ortalaması incelendiğinde İnegöl Alası en yüksek ortalaması % 88.21 ve SH361 çeşidinin en yüksek ortalaması % 89.07 olarak belirlenmiş olup ortaya çıkan fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 15).

İnegöl Alası'nda MS besin ortamına 0.50 mg/l BAP + 0.50 mg/l 2.4-D uygulamasıyla yapılan çalışma sonucunda kalluslardan bitki elde edilmiş olup, sürgün oluşturan eksplant adeti olarak 3 bitki rejenere olmuş ve sürgün oluşturan eksplant oranı % 0.67 olarak bulunmuştur. Bazı rejenere olan bitkilerde birden fazla sürgün meydana gelmiş olup, ortalama sürgün veren eksplant başına sürgün sayısı 2 adet olarak bulunmuştur. Aynı besin ortamına kazein hidrolizatı (CH) eklenmesiyle yapılan uygulamalar sonucunda kalluslardan rejenere bitki elde edilmiş olup, sürgün oluşturan eksplant adeti olarak 2 bitki rejenere olmuş ve sürgün oluşturan eksplant oranı % 0.52 olarak bulunmuştur.

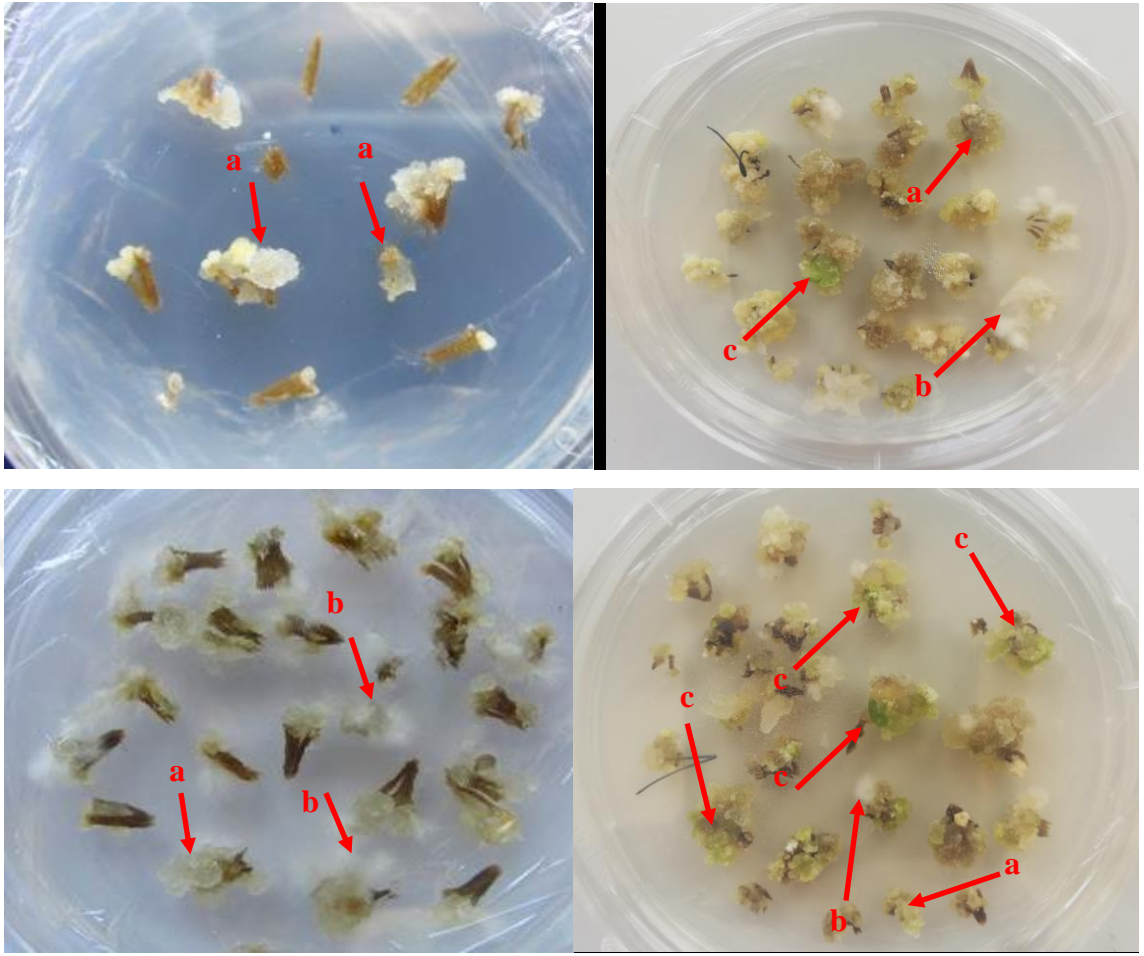
SH361'de MS besin ortamında 0.50 mg/l BAP + 0.50 mg/l 2.4-D uygulamasıyla yapılan çalışma sonucunda kalluslardan bitki elde edilmiş olup, sürgün oluşturan eksplant adeti olarak 2 bitki rejenere olmuş ve sürgün oluşturan eksplant oranı % 0.36 olarak bulunmuştur. Aynı besin ortamına kazein hidrolizatı (CH) eklenmesiyle yapılan

uygulamalar sonucunda kalluslardan rejenere bitki elde edilmiş olup, sürgün oluşturan eksplant adeti olarak 3 bitki rejenere olmuş ve sürgün oluşturan eksplant oranı % 0.67 olarak bulunmuştur. Bazı rejenere olan bitkilerde birden fazla sürgün meydana gelmiş olup, ortalama sürgün veren eksplant başına sürgün sayısı 2 adet olarak bulunmuştur.

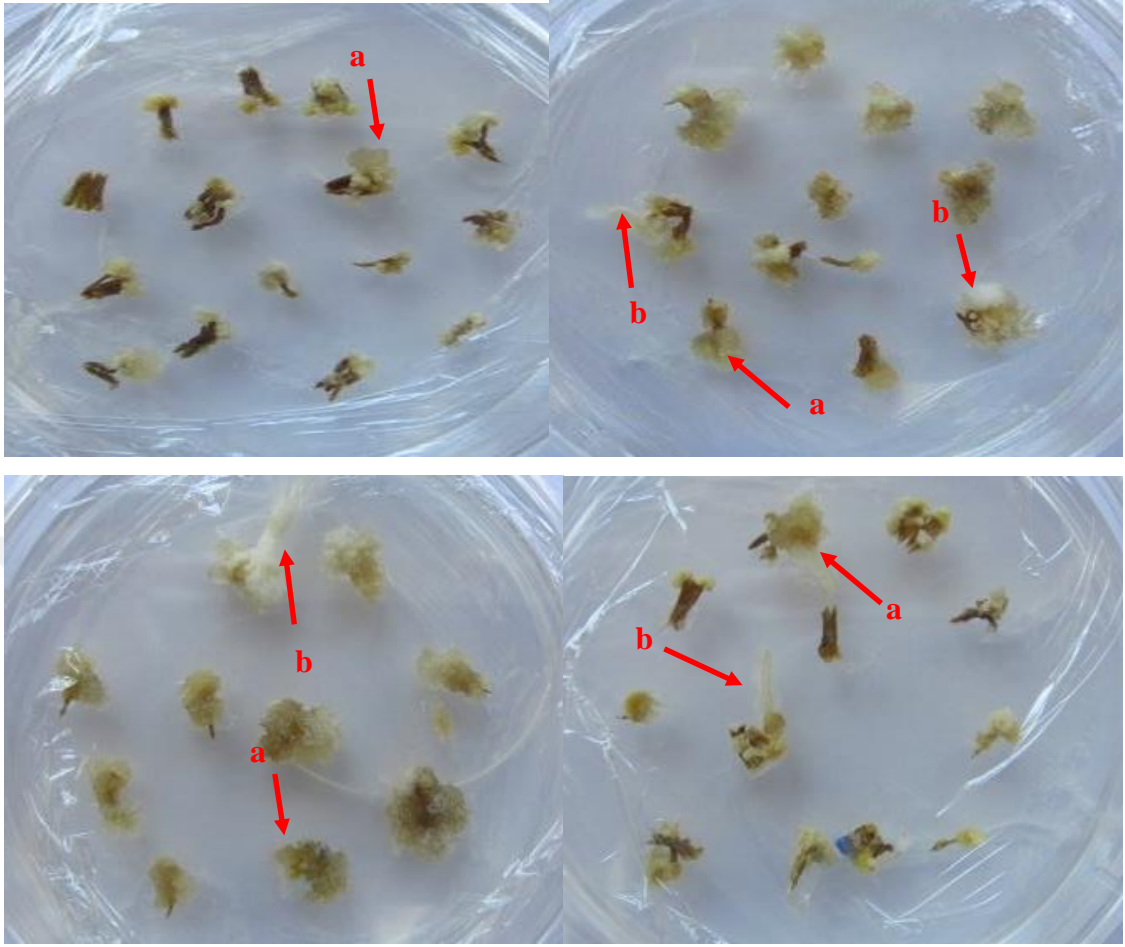
Haploid bitki elde etme üzerine yapılan birçok farklı çalışmadan elde edilen bilgiler doğrultusunda, soğuk ve sıcak ön uygulamalarının doğru bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları ile kullanılması sonucunda pozitif sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Soğuk ve sıcak uygulamalarının anter ve dolayısıyla da polenlerin yaşlanmasını önleyerek embriyonik kallusların oluşmasına katkı sağladığı bildirilmiş olup, yapılan bazı çalışmalarda suğuk ön uygulamasının pozitif etki gösterdiği bildirilirken (Badigannavar ve Kuruvinafhetti, 1996; Duran, 2007; Baba, 1992), bazı çalışmalarda ise farklı sürelerde uygulanan yüksek sıcaklık sokunun anter çalışmalarda olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (Atasoy, 2020; Engin Özü 2006; Hamaoka ve ark., 1991; Karakullukçu ve Abak, 1993). Yaptığımız bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş olup, uygulanan bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları ve kimyasalların etkisi ile soğuk ve sıcak ön uygulamalarının birlikte kullanımının olumlu bir etki oluşturduğu belirlenmiştir.



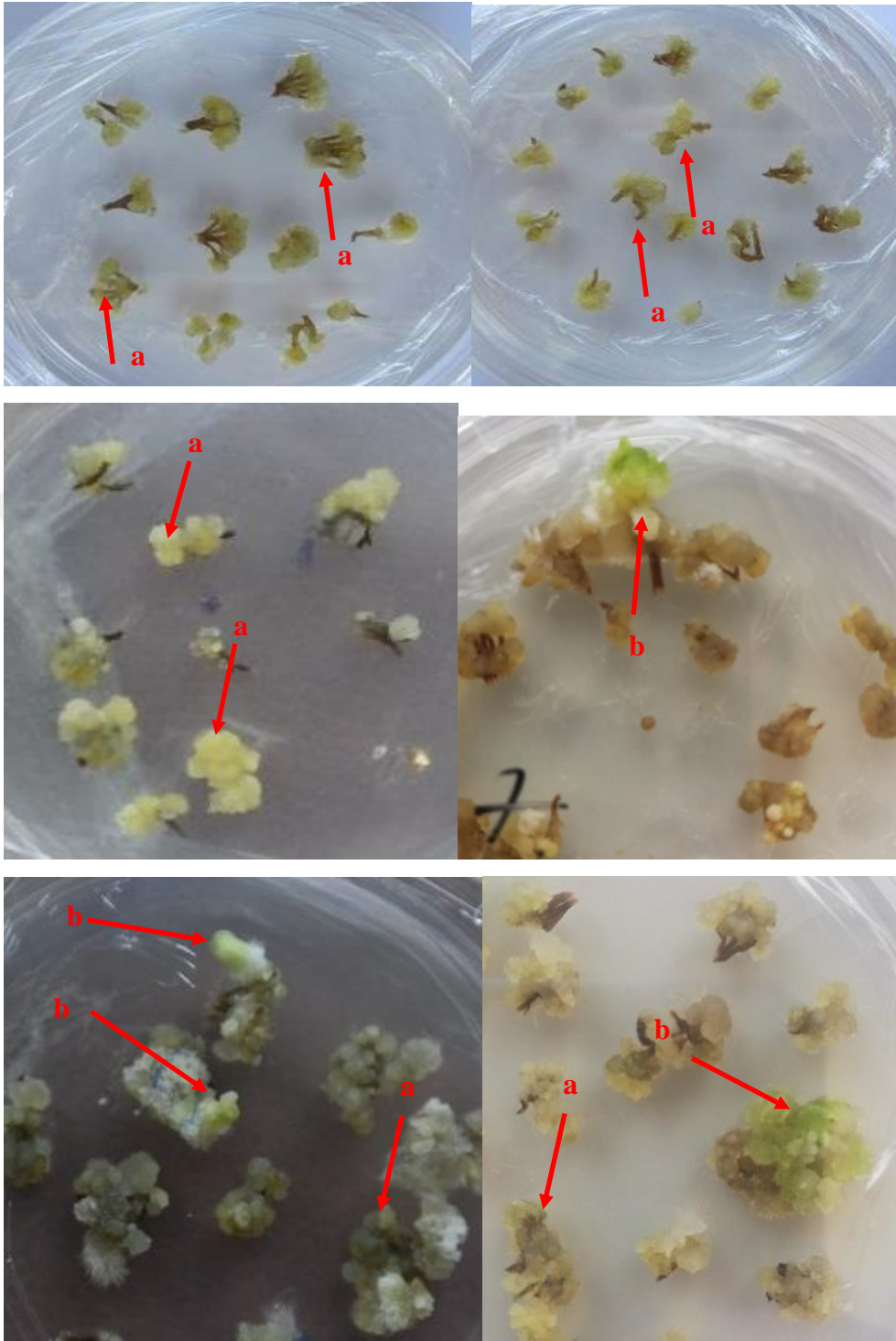
Şekil 24. Kültür ortamlarına ekimi yapılan anterler



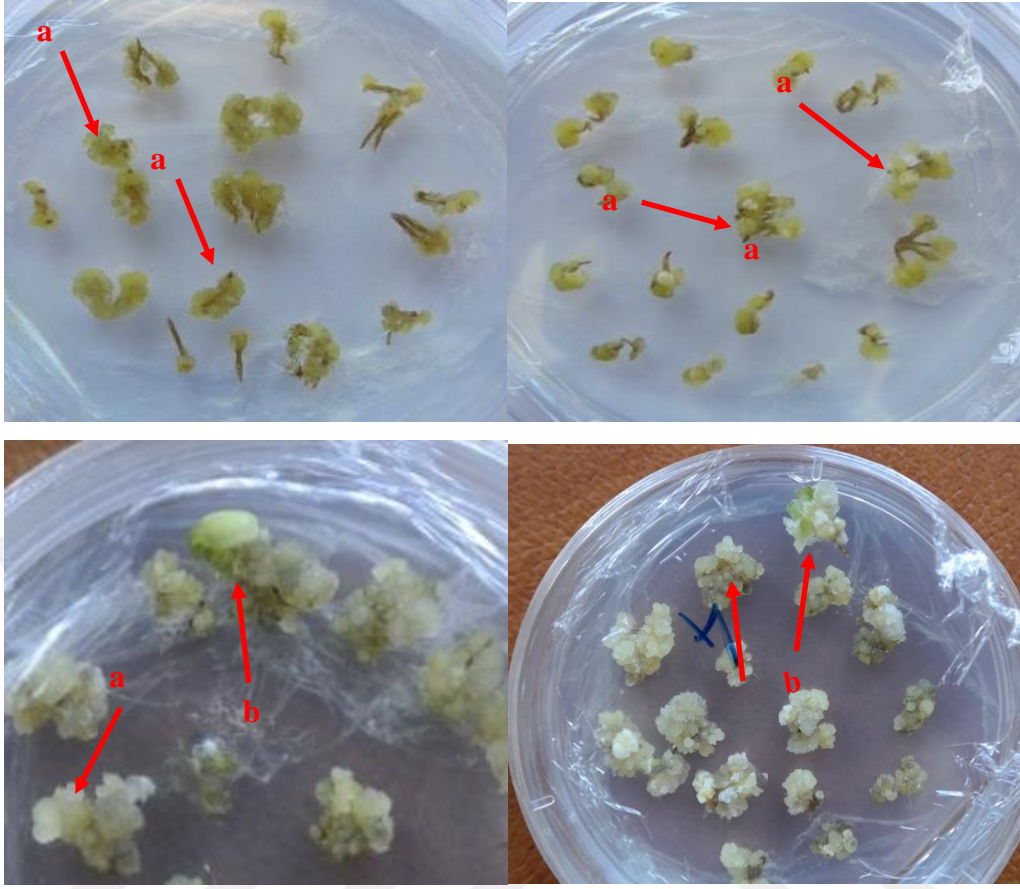
Şekil 25. Denemede 1,0 mg/l BAP+2.0 mg/l NAA+500 mg/l CH içeren ortamlardan 0.5 mg/l KINETİN +1,0 g/l PVP içeren MS ortamlarına aktarım sonrası gelişim a) kallus oluşumu b) kılcal kök oluşumları ve c) embriyonik kalluslar



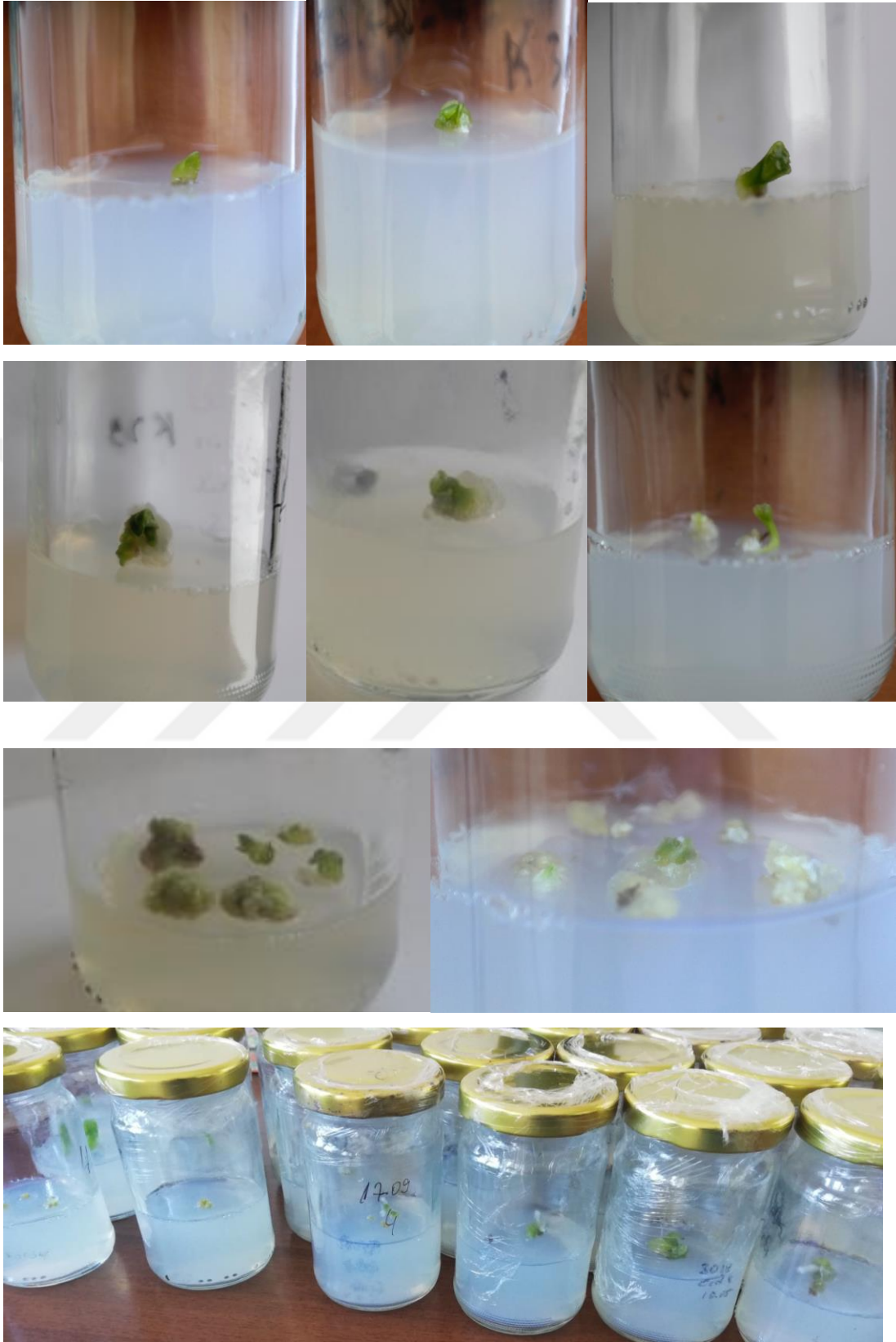
Şekil 26. Denemede 1,0 mg/l BAP+2.0 mg/l NAA içeren ortamlardan 0.5 mg/l KINETİN +1,0 g/l PVP içeren MS ortamına aktarım sonrası gelişim a) kallus oluşumu ve b) kılcal kök oluşumları



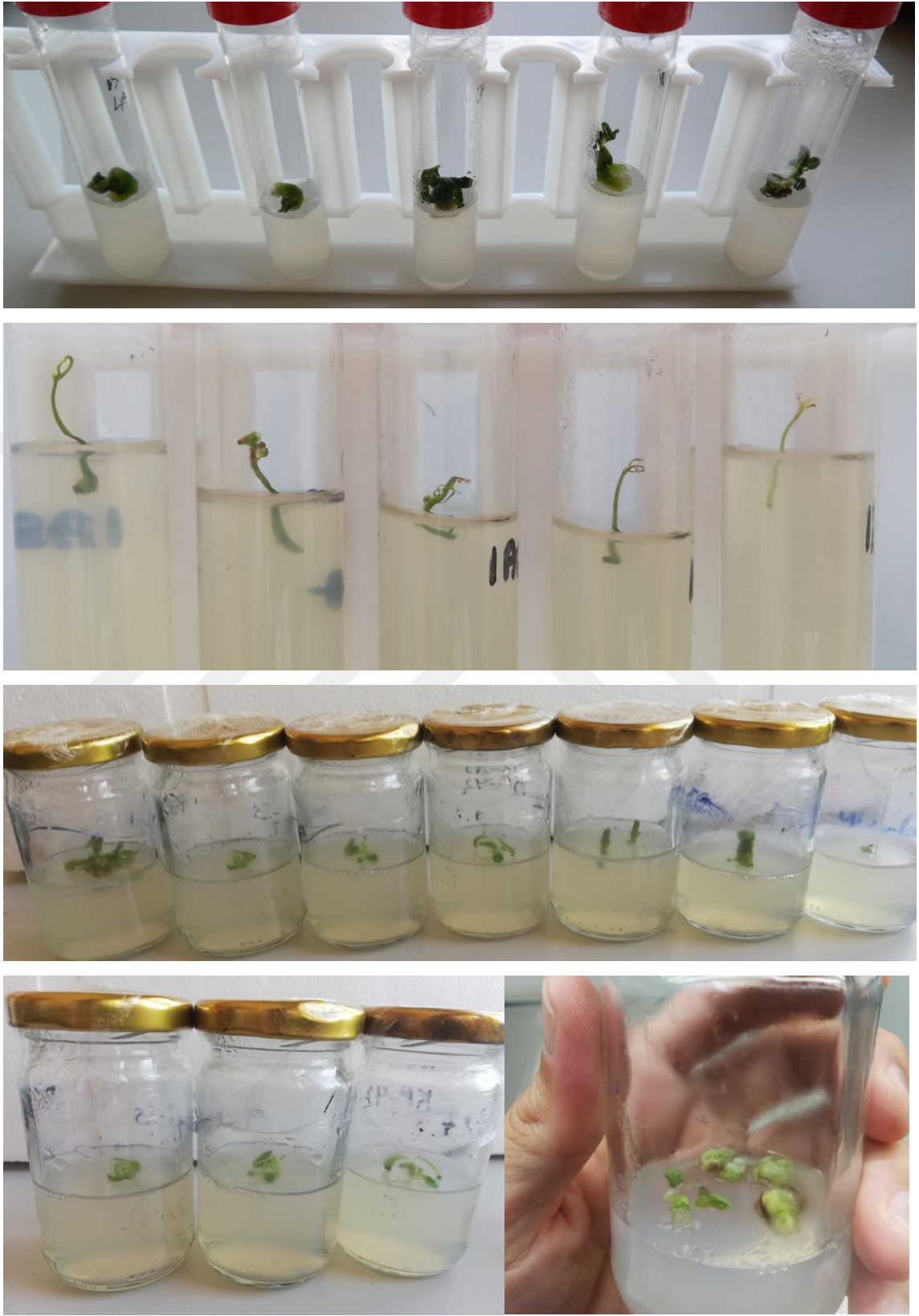
Şekil 27. Denemede 0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l 2.4-D+500 mg/l CH içeren ortamlardan 0.5 mg/l KINETİN +1,0 g/l PVP içeren MS ortamına aktarım sonrası gelişim a) kallus oluşumu ve b) somatik embriyo oluşumları



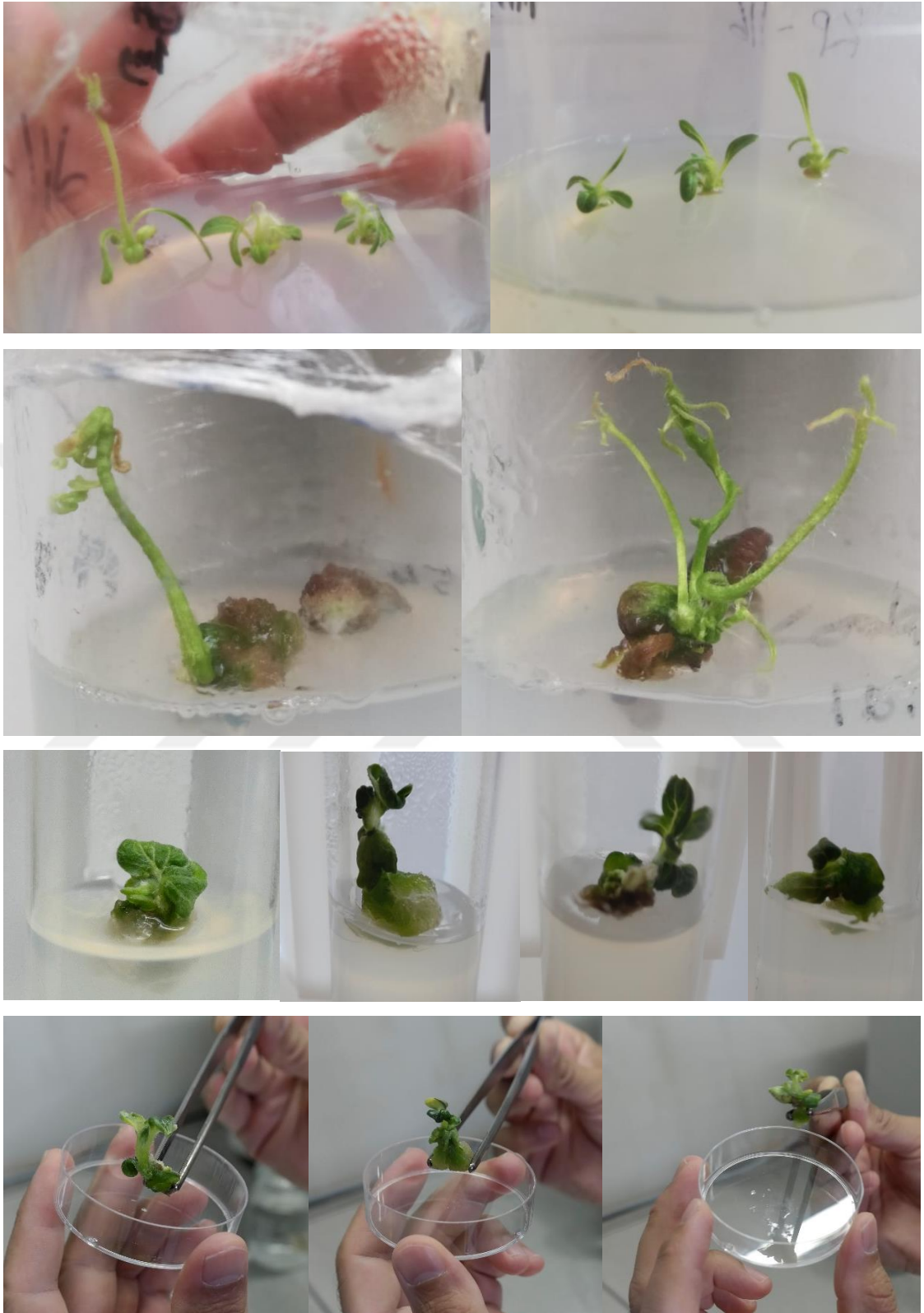
Şekil 28. Denemede 0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l 2.4-D içeren ortamlardan 0.5 mg/l KINETİN +1,0 g/l PVP içeren MS ortamına aktarım sonrası gelişim a) kallus oluşumu ve b) somatik embriyo oluşumları



Şekil 29. Oluşan somatik embriyo ve bitkiciklerin 0.2 mg/l BAP içeren MS ortamlarına aktarımı



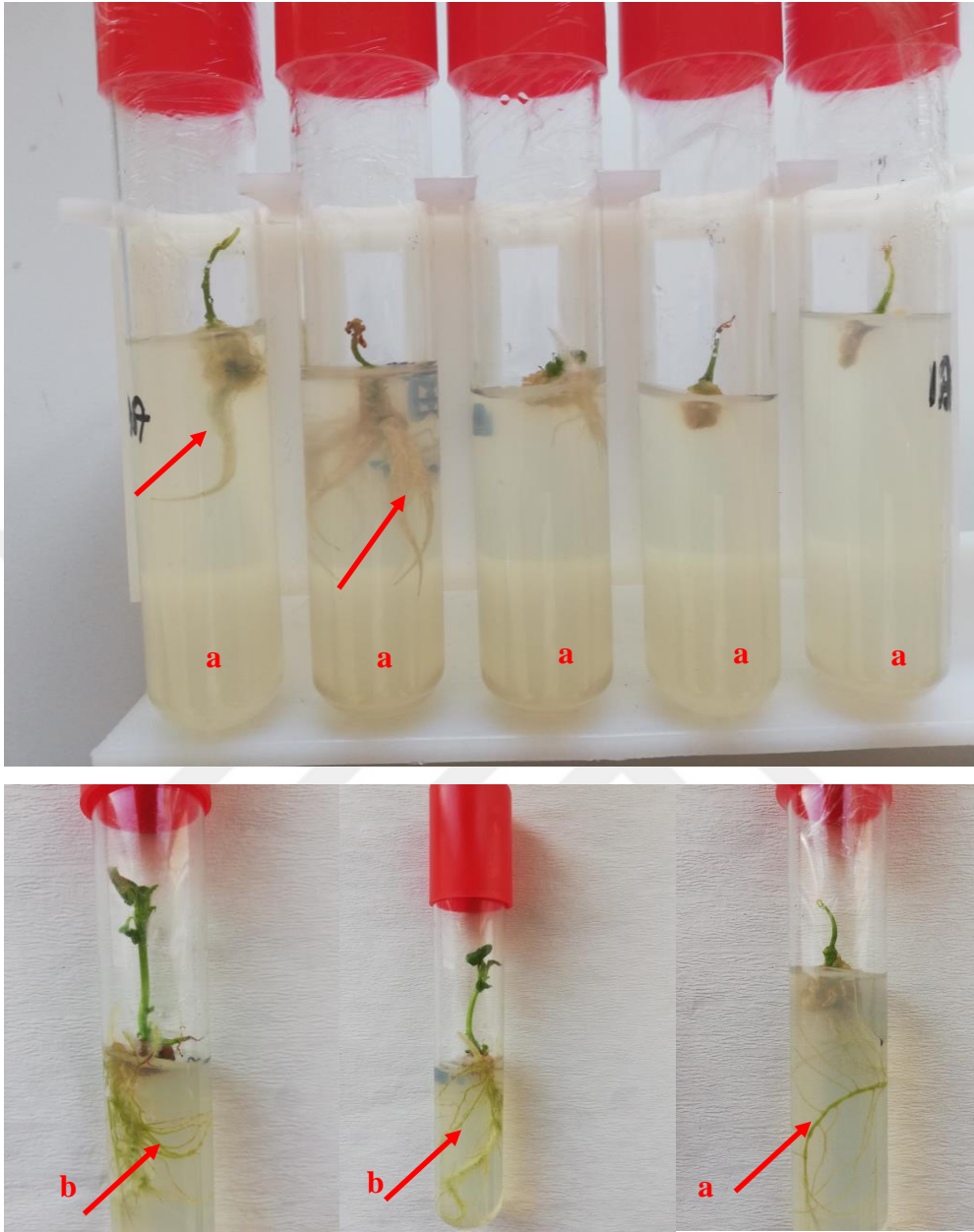
Şekil 30. Oluşan bitkiciklerin 0.2 mg/l BAP içeren MS ortamlarda alt kültüre alınması



Şekil 31. Oluşan bitkiciklerin 0.2 mg/l BAP içeren MS ortamlarda alt kültür sonrası gelişimleri



Şekil 32. Bitkiciklerin MS ortamında alt kültür sonrası kapitulum oluşturmaları



Şekil 33. Bitkilerin a)  $\frac{1}{2}$  MS, 0.5 mg/l IAA ve b)  $\frac{1}{2}$  MS, 0.5 mg/l NAA içeren ortamlarda köklendirilmesi

### 3.3.5. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri, aktif kömür ve uygulamalar

Farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarının ve uygulamalarının incelendiği bu çalışmada, birinci uygulama aşamasında, 2.00 mg/l NAA ve 1.00 mg/l BAP içeren MS besin ortamına ekimi yapılan anterler, 10 günlük karanlık inkübasyonun ardından kallus oluşumu belirlenmiştir. İkinci aşamada, embriyonik kallus oluşumunu teşvik etmek amacıyla 0.50 mg/l BAP ve 0.10 mg/l NAA içeren ortamda 10 gün boyunca 16/8 periyotta

aydınlık-karanlık ortamda inkübasyona alınmış ve kallus oluşumu daha da belirgin hale gelmiştir. Üçüncü aşamada, kallus ve somatik embriyo gelişimi için 0.50 mg/l BAP içeren ortamda 10 gün boyunca 16/8 periyotta aydınlık-karanlık ortamda inkübasyona alınan kallusların gelişimi devam etmiş ve en son aşamada, 0.20 mg/l BAP içeren ortama aktarılan kalluslar daha büyük hacimli ve canlı kalluslar oluşturmuştur.

Bu bulgulara dayanarak, farklı çeşitler arasında kallus oluşumu ve rejenerasyon yeteneği açısından farklılıklar olduğu görülmektedir. İlk uygulamada her iki çeşitte de kallus oluşumu gerçekleşmiş olsa da bitki rejenerasyonu elde edilememiştir. İkinci uygulamada ise kallus oluşumu biraz daha yüksek oranlarda belirlenmiş, ancak yine de rejenerasyon sağlanamamıştır. Yapılan bezer çalışmalarda NAA ve BAP'ın birlikte kullanımı ile kallus oluşumu üzerinde olumlu etkiler tespit edilmiş (Karakullukçu ve Abak, 1992). Bu durum, çeşit özelliklerinin ve kullanılan büyüme düzenleyici kombinasyonları ile yapılan uygulamaların bitki rejenerasyonu üzerinde etki göstermediği belirlenmiştir.

Tablo 16. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri, aktif kömür ve uygulamalarının kallus oluşturan anter yüzdesine ait varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Çeşit (Ç)	1	9.488	9.4880	2.0569
Uygulama (U)	2	32446.710	16223.3550	3517.069**
Ç x U	2	13.227	6.6135	1.4337
Hata	18	83.029	4.6127	
Genel	23	32552.450		

\*\* : 0.01 düzeyinde önemli

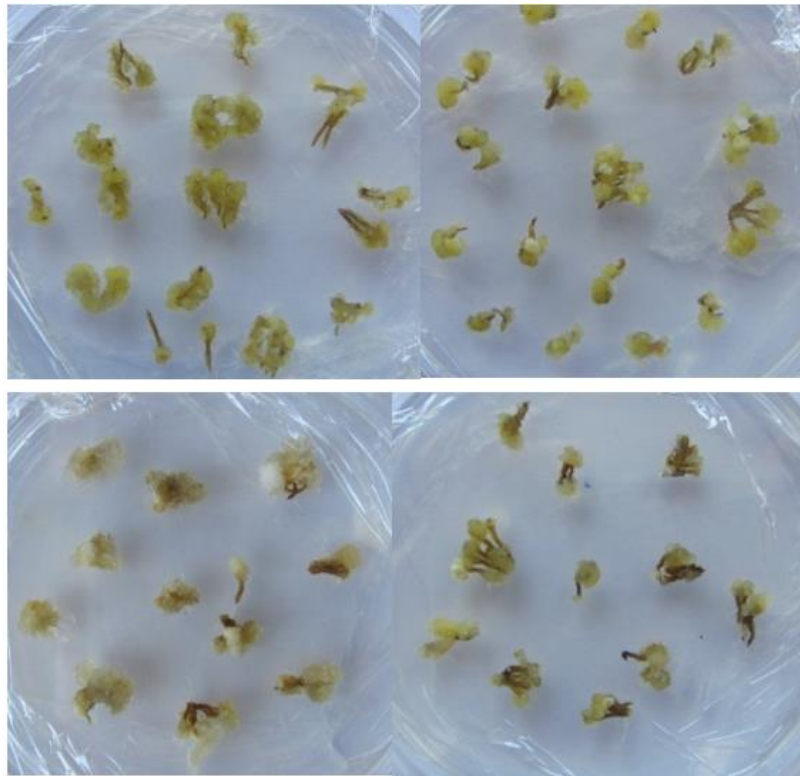
İki farklı ayçiçeği çeşidinde farklı BAP, NAA, AgNO<sub>3</sub>, PVP, Kinetin ve Aktif kömür konsantrasyonları ve kombinasyonlarının kallus oluşturan anter yüzdesine etkisinin varyans analizi sonuçları Tablo 16'da verilmiştir. Tablo 16 incelendiğinde, varyasyon kaynaklarının uygulamanın kallus oluşturan anter yüzdesi üzerine etkisi % 1 seviyesinde önemli bulunurken, diğer varyasyon kaynaklarının etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Tablo 17. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri, aktif kömür ve uygulamalar kallus oluşturan anter yüzdesine etkileri ve oluşan gruplar

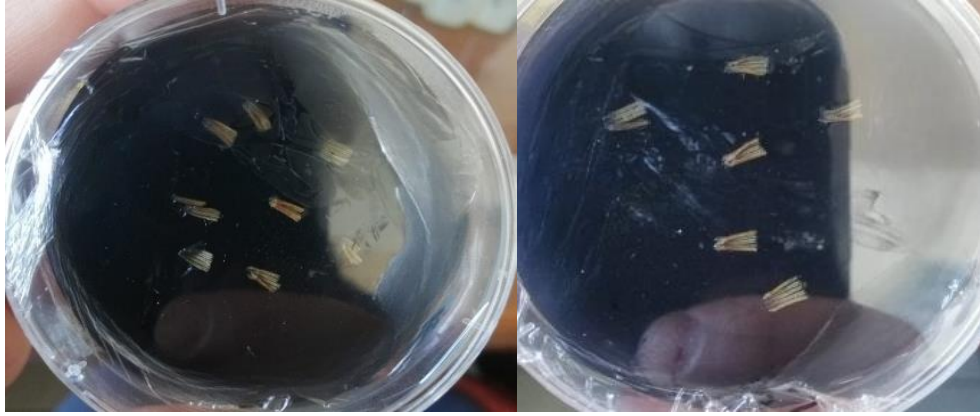
Uygulama	İnegöl Alası	SH361	Genel Ortalama
Uygulama 10	76.53	76.96	76.74 a
Uygulama 11	77.53	80.87	79.20 a
Uygulama 12	0.00	0.00	0.00 b
Ortalama	51.35	52,61	

Uygulamaların genel ortalaması incelendiğinde (Tablo 17), en yüksek kallus oluşturan anter yüzdesi değeri % 79.20 ile % 76.74 Uygulama 10 ve Uygulama 11'e ait besin ortamlarından elde edilirken, en düşük kallus oluşturan anter yüzdesi ortalaması % 0 ile Uygulama 12'ye ait besin ortamlarında tespit edilmiş olup ortaya çıkan fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Çeşitlerin genel ortalaması incelendiğinde İnegöl Alası en yüksek ortalaması % 51.35 ve SH361 çeşidinin en yüksek ortalaması % 52.61 olarak belirlenmiş olup ortaya çıkan fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 17).



Şekil 34. Denemede 2.0mg/l NAA+1,0mg/l BAP içeren ortamda gelişme gösteren anterlerin 0.5mg/l Kinetin+1,0g/l PVP ilaveli ortama aktarım yapıldıktan sonraki gelişme durumları



Şekil 35. 4,0mg/l NAA+0.5mg/l BAP+10,0mg/l AgNO<sub>3</sub> içeren besin ortamlarında anterlerin durumu

## 4. BÖLÜM

### SONUÇ ve ÖNERİLER

#### 4.1.Sonuç ve Öneriler

##### 4.1.1. Uygun Yaştaki Kapitulumların ve Anterlerin Belirlenmesi

Bu çalışmanın ilk aşamasında, stereo mikroskop altında incelenen kapitulumlardan uygun büyüklükteki anterlerin seçimi gerçekleştirilmiştir. Mikroskop altında yapılan inceleme sonucunda, polen oluşum dönemine girmemiş, tek çekirdekli ve uygun boyutta anterlerin belirlenmesi için farklı boyutlardaki anterler gruplandırılmış ve asetokarmin boya ile boyanarak analiz edilmiştir. Bu inceleme sonucunda, ekimi yapılan ayçiçeği bitkilerinden 63 gün sonra uygun büyüklükte kapitulumlar elde edilmiştir. Ayrıca, kapitulumun merkezine doğru olan anterlerin haploid bitki elde etmek için en ideal anterler olduğu belirlenmiştir. Mikrosporların asetokarmin boya ile boyanması ve mikroskop altında incelenmesiyle tek çekirdekli dönemlerin belirlenmesi sağlanmıştır.

Bu sonuçlar, anterlerin uygun yaş ve büyüklükteki kapitulumlardan elde edilmesi metodunu belirlemesi açısından yol gösterici nitelikte olacağı söylenebilir. Ayrıca, anterlerin tek çekirdekli dönemlerinin belirlenmesi, ilerleyen çalışmalarda genetik analizlerin yapılması ve hedeflenen hücre tiplerinin elde edilmesi içinde kritik bir adımdır.

##### 4.1.2. Kapitulumların Sterilizasyonu ve Anter İzolasyonu

Çalışmanın ikinci aşamasında, uygun sterilizasyon yöntemleri araştırılarak anterlerin zarar görmesini ve enfeksiyon riskini en aza indirecek yöntemlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan ön çalışmalar sonucunda % 1-2-3'lük cıva klorürde çalkalanan kapitulumlarda cıva klorür yüzdesi ve uygulama süresi arttıkça anterlerde doku

zararlanmalarının arttığı ve anterlerin zarar gördüğü tespit edilmiştir. Ancak % 1 ile 2 arasındaki cıva klorür konsantrasyonunda bir dakika süreyle sterilizasyon uygulanan kapitulumlarda doku ölümü veya enfeksiyon tespit edilmemiştir. Bu nedenle, riski en aza indirmek amacıyla çalışmaların devamında % 1.5'lük cıva klorür kullanılarak sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu yöntemle anterlerde zararlanma ve besin ortamlarında enfeksiyon oranının düşük seviyede olduğu belirlenmiştir.

Bu bulgular, anterlerin sterilizasyon sürecinde % 1.5'lük cıva klorür kullanılmasının etkili ve güvenli bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ancak, ileriki çalışmalarda farklı bitki türlerinde ve genotiplerde bu sterilizasyon yönteminin etkinliği ve yan etkileri daha ayrıntılı olarak değerlendirilmelidir.

#### **4.1.3. Anter Kültür Koşulları ve Ön Uygulamaların Kallus oluşumu ve Rejenerasyonuna etkisi**

##### **4.3.3.1. Farklı Çeşit ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Anter Kültürü Performansına Etkisi**

Bu araştırma, iki farklı ayçiçeği çeşidinin bitki büyüme düzenleyicileri ve kimyasal bileşikler altındaki kallus oluşum tepkilerini kapsamlı bir şekilde inceleyerek, bitki hücre kültürü ve doku kültürü alanındaki önemli bilgiler sunmuştur. Elde edilen sonuçlar, çeşitler arası farklar, uygulama koşullarının etkisi ve bu faktörlerin etkileşimlerini içermektedir. Aşağıda, çalışmanın verilerini ve sonuçlarını ayrı ayrı değerlendirip, bu sonuçlardan çıkan öneriler verilmiştir:

**Çeşitler Arası Fark ve Uygulama Etkisi:** Araştırma, çeşitler arasında kallus oluşum tepkilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını göstermiştir. Ancak, uygulama koşulları (BAP, NAA, AgNO<sub>3</sub>, PVP) arasında % 1 düzeyinde anlamlı farklar tespit edilmiştir. Bu sonuç, farklı çeşitlerin benzer koşullar altında farklı kallus oluşum tepkileri gösterdiğini ve uygulama koşullarının bu tepkilere etki ettiğini göstermektedir.

**Çeşit x Uygulama İnteraksiyonu:** Çeşit (Ç) × Uygulama (U) interaksiyonunun % 5 düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, farklı çeşitlerin farklı uygulama koşullarına nasıl yanıt verdiğini vurgulamakta ve çeşitler arası farkların uygulama koşulları altında nasıl değişebileceğini göstermektedir.

En Yüksek ve En Düşük Değerler: İki çeşit arasında, en yüksek kallus oluşturma oranı % 85.88 olarak SH361 ile Uygulama 2'den elde edilirken, en düşük değerler her iki çeşitte de Uygulama 7, 8 ve 9 ile interaksiyonlarından elde edilmiştir. Uygulamaların genel ortalaması incelendiğinde, en yüksek kallus oluşturma oranı sırasıyla % 80.98 ve % 80.18 değerlerine sahip olan Uygulama 2 ve Uygulama 3'den elde edilmiştir.

Çeşit ve Uygulama Optimizasyonu: Araştırma sonuçları, çeşitlerin ve uygulama koşullarının kallus oluşum tepkileri üzerindeki etkilerini göstermektedir. Bu nedenle, bitki hücre kültürü protokollerinin optimize edilmesi amacıyla farklı çeşitler ve uygulama koşulları kombinasyonları test edilebilir.

Uygulama Etkisi ve Kimyasal Bileşiklerin Detaylı İncelemesi: Araştırma, AgNO<sub>3</sub> ve PVP gibi kimyasal bileşiklerin kallus oluşumu üzerindeki etkilerini göstermiştir. Gelecekteki çalışmalar, bu kimyasal bileşiklerin bitki hücrelerinin hücresel süreçleri üzerindeki mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak anlamak için moleküler düzeyde analizleri içerebilir.

Bitki Hücre Kültürü Uygulamaları: Bu çalışmanın sonuçları, bitki hücre kültürü alanında yeni protokollerin geliştirilmesi ve bitki biyoteknolojisi uygulamalarının yönlendirilmesi açısından önemlidir. Farklı çeşitlerin farklı koşullar altındaki tepkileri, bitki hücre kültürü tekniklerinin geliştirilmesinde dikkate alınmalıdır.

Sonuç olarak, bu çalışma, farklı ayçiçeği çeşitlerinin bitki büyüme düzenleyicileri ve kimyasal bileşikler altındaki kallus oluşum tepkilerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmiş ve bitki hücre kültürü alanında ileriye dönük çalışmalara ışık tutabilecek önemli bilgiler sunmuştur. Gelecekteki çalışmalar, bu sonuçları daha da genişleterek bitki biyoteknolojisinin gelişimine katkı sağlayabilir.

#### **4.1.3.2. Farklı Çeşit, Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Sıcaklık İnkübasyon Süresi Uygulamalarının Anter Kültürü Performansına Etkisi**

Sıcaklık ve Kallus Oluşumu İlişkisi: Çalışma, farklı sıcaklık koşullarının kallus oluşumu üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle Sıcaklık 1 ve Sıcaklık 2 inkübasyon sürelerinin kallus oluşumu üzerindeki etkileri, istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuçlar, bitki hücrelerinin büyüme ve bölünme aktivitelerinin sıcaklığa duyarlı

olduğunu ve bu faktörün bitki doku kültürü çalışmalarında dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

**Uygulama Yöntemi ve Kallus Oluşumu İlişkisi:** Çalışma, farklı uygulama yöntemlerinin kallus oluşumu üzerindeki etkisini değerlendirmiş ve istatistiksel olarak anlamlı farklar bulmuştur. Uygulama 2 ve uygulama 3, diğer uygulama yöntemlerine göre daha yüksek kallus oluşumu yüzdesine sahiptir. Bu sonuçlar, bitki hormonlarının ve kimyasal bileşiklerin kallus oluşumu üzerindeki spesifik etkilerini göstermekte ve bitki hücre kültürü protokollerinin optimize edilmesine yardımcı olmaktadır.

**Sıcaklık x Uygulama Etkileşimi ve Kallus Oluşumu İlişkisi:** Sıcaklık ve uygulama yöntemi faktörlerinin etkileşimi, kallus oluşumu üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Uygulama 2 ve Uygulama 3 kombinasyonlarının kallus oluşumu üzerindeki etkileri, diğer kombinasyonlara göre daha belirgin ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuçlar, bitki hücrelerinin farklı çevresel koşullar altında nasıl tepki verdiğini anlamamıza katkı sağlamaktadır.

Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak, bitki hücre kültürü protokollerinin optimize edilmesi için daha fazla çalışma yapılabilir. Farklı sıcaklık ve uygulama kombinasyonları test edilerek en verimli koşulların belirlenmesi, bitki hücrelerinin üretkenliğini artırabilir.

Bu çalışma, belirli bir bitki türü üzerine yapılmıştır. Farklı bitki türleri ve uygulamalar için benzer analizlerin yapılması, elde edilen sonuçların genelleştirilebilirliğini artırabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma, bitki hücrelerinin kallus oluşumu üzerine sıcaklık, uygulama yöntemi ve bu faktörlerin etkileşiminin önemli etkilerini ortaya koymuştur. Bu bulgular, bitki biyoteknolojisi alanlarında gelecekteki çalışmalara ışık tutabilir, bitki üretimi ve biyoteknolojik ürün geliştirme açısından yeni stratejilerin oluşturulmasına katkıda bulunabilir.

#### **4.1.3.3. Farklı Dozlarda 2.4-D İçeren Ortamlarda Anter Kültürü**

Bu araştırma, 2.4-D ve BAP'nin farklı konsantrasyondaki kombinasyonlarının iki farklı çeşitte MS besin ortamında kallus oluşumu üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Elde edilen sonuçlar, bitki hücre kültürü alanındaki önemli bilgiler sunmakta ve bitki hücrelerinin doku kültürü koşullarına nasıl tepki verdiğini daha iyi

anlamamıza yardımcı olmaktadır. Aşağıda, çalışmanın elde ettiği bulguları ve bu bulgulardan çıkan önerileri ayrı ayrı sunulmuştur:

**Kallus Oluşumu ve Bitki Büyüme Düzenleyicileri:** Çalışma, farklı konsantrasyonlarda 2.4-D ve BAP'nin kombinasyonlarının kullanıldığı MS besin ortamında kallus oluşumu tepkilerini incelemiştir. Elde edilen sonuçlar, her iki çeşit için de bitki büyüme düzenleyicisi konsantrasyonlarının kallus oluşumu üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, bitki hücrelerinin farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarına farklı şekillerde tepki verdiğini göstermekte ve bitki doku kültürü protokollerinin optimize edilmesi için önemli bir rehber sağlamaktadır.

**Uygulamaların Etkisi:** Araştırma, uygulama koşullarının kallus oluşumu üzerinde önemli bir etkisi olduğunu vurgulamaktadır. Kallus oluşumu, 2.4-D ve BAP'nin farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı farklı besin ortamlarında önemli ölçüde değişmektedir. Bu sonuçlar, bitki hücre kültürü çalışmalarının sonuçlarını etkileyebilecek çevresel faktörlerin önemini göstermektedir.

İncelenen uygulama koşulları arasında, en yüksek kallus oluşturan anter yüzdesi değeri % 87.65 olarak belirlenmiştir. Bu değer, 1.5 mg/L 2.4-D ve 0.5 mg/L BAP içeren besin ortamında elde edilmiştir. En düşük kallus oluşumu ise 3.0 mg/L 2.4-D ve 0.5 mg/L BAP içeren besin ortamları ile 4.0 mg/L 2.4-D ve 0.5 mg/L BAP içeren uygulamaların besin ortamlarında tespit edilmiştir.

Araştırma sonuçlarına dayanarak, bitki hücre kültürü protokollerinin optimize edilmesi amacıyla daha fazla çalışma yapılabilir. Farklı 2.4-D ve BAP konsantrasyonları ile yapılan deneyler, en etkili kallus oluşumu koşullarını belirlememize yardımcı olabilir.

Bu çalışma, belirli iki çeşit üzerine yapılmıştır. Farklı bitki türleri veya doku tipleri üzerine benzer analizlerin yapılması, elde edilen sonuçların genelleştirilmesini sağlayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma, farklı bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarının iki farklı çeşidin kallus oluşumu üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Bu bulgular, bitki hücre kültürü protokollerinin optimize edilmesi, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin anlaşılması ve bitki biyoteknolojisi uygulamalarının geliştirilmesi açısından önemlidir.

Gelecekteki çalışmalar, bu bulguları daha da genişleterek bitki hücre kültürü alanındaki bilgileri artırabilir.

Ayrıca, bitki büyüme düzenleyicilerinin yanı sıra diğer faktörlerin (ışık, sıcaklık, pH vb.) kallus oluşumu üzerindeki etkilerinin de incelenmesi önerilir. Bu faktörlerin kallus oluşumu üzerindeki etkisi, bitki hücrelerinin büyümesi ve farklılaşması üzerinde önemli bir rol oynayabilir. Bu nedenle, bu faktörlerin optimize edilmesi ve kallus oluşumu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi önemlidir.

#### **4.1.3.4. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri İçeren Ortamlarda Kazeinin Anter Kültürüne Etkisi**

Bu araştırma, iki farklı çeşit üzerinde anter kültürü ve bitki rejenerasyonu için farklı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları, kazein hidrolizatının ve farklı ön uygulamaların etkisini incelemeyi amaçlamıştır. Elde edilen veriler, farklı çeşitlerin ve uygulanan faktörlerin kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve sürgün verimine olan etkilerini detaylı bir şekilde göstermektedir. Bu bulguların ışığında elde edilen sonuçları ve geleceğe yönelik önerileri aşağıda sunulmuştur:

Çalışma, donör bitkilerin uygun dönemde hasat edilmesi ve soğuk/sıcak ön uygulamalarının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkilerini incelemiştir. Bu bulgular, uygun ön uygulamaların bitki hücrelerinin doku kültürü koşullarına daha iyi adaptasyonunu sağladığını göstermektedir.

**Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Kazein Hidrolizatı Etkisi:** Araştırma, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin ve kazein hidrolizatının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Farklı kombinasyonlar arasında çeşitlilik gözlemlenmiş, bu da bitki hücrelerinin hormonlara ve besin maddelerine farklı tepkiler verdiğini vurgulamaktadır.

**Uygulama Süreçleri:** Çalışma, kallusların oluşumu, embriyonik kallusların gelişimi ve sürgün veriminin sağlanması için farklı aşamaları içeren bir süreç üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamaların sırasıyla optimize edilmesi, bitki rejenerasyonu sürecinin etkinliğini artırabilir.

Farklı Çeşit ve Türler Üzerinde Çalışmalar: Bu çalışma iki farklı çeşit üzerinde gerçekleştirilmiştir. Benzer analizlerin farklı bitki türleri veya çeşitleri üzerinde uygulanması, sonuçların genelleştirilmesini sağlayabilir.

Uygulama Protokollerinin Geliştirilmesi: Elde edilen sonuçlar, bitki rejenerasyonu protokollerinin geliştirilmesi için önemli bir temel sağlamaktadır. Farklı aşamaların ve koşulların optimize edilmesi, daha yüksek verimli ve istikrarlı sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma farklı çeşitlerin anter kültürü ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkilerini incelemiş ve farklı faktörlerin bu süreçler üzerindeki etkilerini belirlemiştir. Bu çalışmanın sonuçları, bitki rejenerasyonu protokollerinin geliştirilmesi ve bitki biyoteknolojisi alanında daha ileri çalışmaların temelini oluşturabilir. Gelecekteki araştırmalar, bu bulguları daha da genişleterek bitki rejenerasyonu alanındaki bilgileri zenginleştirebilir.

#### **4.1.3.5. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Uygulamaların Anter Kültürüne Etkisi**

Bu çalışma, farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarının ve uygulamalarının anter kültürü ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirmesi amaçlamıştır. Çeşitli aşamalardaki uygulamaların kallus oluşumu ve embriyonik kallus gelişimi üzerindeki etkileri sistematik olarak incelemiş ve çeşitler arası farklılıklar ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda aşağıda sunulan sonuçlar ve öneriler sunulmuştur:

Uygulama Aşamalarının Etkisi: Çalışmada, dört farklı aşama boyunca uygulanan bitki büyüme düzenleyicileri ve besin kombinasyonlarının anter kültüründe kallus oluşumu ve embriyonik kallus gelişimi üzerindeki etkileri belirlemiştir. Bu aşamalı yaklaşımın kallus oluşumu ve embriyonik kallus gelişimi üzerinde olumlu etkiler sağladığı gözlemlenmiştir.

Çeşitler Arası Farklılıklar: Bulgular, farklı çeşitler arasında kallus oluşumu ve rejenerasyon yeteneği açısından farklılıkların olduğunu göstermektedir. Her iki çeşitte de

kallus oluşumu sağlansa da rejenerasyon elde edilememiştir. Çeşit özelliklerinin bitki rejenerasyonu üzerindeki etkileri vurgulanmıştır.

**Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kombinasyonlarının Etkisi:** İkinci aşamada kullanılan farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarının, embriyonik kallus oluşumu ve gelişimi üzerinde pozitif etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarının uygun seçiminin bitki rejenerasyonu protokollerinin etkinliğini artırabileceğini göstermektedir.

**Çeşit Özelliklerinin Daha Ayrıntılı İncelenmesi:** Farklı çeşitler arasındaki kallus oluşumu ve rejenerasyon yeteneği farklarının daha ayrıntılı olarak incelenmesi, çeşit seçiminde ve rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesinde rehberlik edebileceği sonucuna varılmıştır.

**Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kombinasyonlarının Optimizasyonu:** İkinci aşamada kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarının daha detaylı bir şekilde optimize edilmesi, embriyonik kallus oluşumu ve gelişimi üzerindeki etkinliğini artırabilir.

**Farklı Faktörlerin Etkisinin İncelenmesi:** Çalışmada incelenmeyen faktörlerin (örneğin ışık koşulları, besin maddeleri) kallus oluşumu ve rejenerasyon üzerindeki etkilerinin daha detaylı olarak araştırılması farklı açılardan bakmayı sağlayabilir.

Bu çalışma, anter kültürü ve bitki rejenerasyonu alanında önemli bilgiler sunmuştur. Gelecekteki çalışmalar, bu bulguları daha geniş bir bağlama oturtarak ayçiçeği anter kültüründe haploid bitki elde etmede nasıl kullanılabilirliğini ve nasıl geliştirilebileceğini daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.

## KAYNAKÇA

- Ağaoğlu, Y. S., Ellialtıoğlu, S., Maraşlı, B., Kalyon, D., 1998. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Androgenetik Kallus Oluşumu Üzerine Araştırmalar. II. Uluslararası Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi, Kırıkkale, S:89-99
- Aktaş, Y. E., Aydın, Y., Uncuoglu, A.A., 2023. Induction of haploid plants for speed-up breeding insunflower (*Helianthus annuus* L.) by pollen irradiation. **Genetics & Applications**, **7**: 1-9s.
- Altındal, N., 2005. Çavdarda (*Secale cereale* L.) Anter Kültüründe Ploidi, Ön işlem ve Besi Ortamı içeriğinin Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 70s.
- Amaury-M, A. F., 1997. Production of doubled-haploid plants from *Lilium longiflorum* Thunb. anther culture. **Plant Sci.**, **123**: 179-187s.
- Anonim, 2022a. 2019 Yılı Ayçiçeği Raporu. <https://esnafkoop.ticaret.gov.tr/data/> Erişim Tarihi: Aralık 2022.
- Anonim, 2022b. Türkiye İstatistik Kurumu, <https://data.tuik.gov.tr/> Erişim Tarihi: Aralık 2022.
- Anonim, 2022c. 2019 Yılı Ayçiçeği Raporu. <https://esnafkoop.ticaret.gov.tr/data/> Erişim Tarihi: Ocak 2023.
- Anonim, 2022d. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı. <https://www.tarimorman.gov.tr/> Erişim tarihi: Aralık 2022.
- Arı, E., 2006. Türkiye’de Doğal Olarak Yetisen *Anemone coronaria* var. *coccinea*’da Anter Kültürü Çalışmaları. Çukurova Üniversitesi, Doktora Tezi, Adana, 169s.
- Arıoğlu, H., 1999. Yağ bitkileri yetiştirme ve ıslahı, Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 2045, Adana, 37-43s.
- Atasoy, D., 2020. Bazı Biber (*Capsicum annuum* L.) Islah Genotiplerinin Anter Kültürü Performanslarının Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 76s.

- Baba, B., 1992. *Hordeum vulgare* L. (Arpa) Üzerine Anter Kültürünün Uygulanabilirliği. Ege Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 39s.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özen, S., 2001. Bitki Biyoteknolojisi 1, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Badigannavar, A., Kuruvinashetti, M., 1996 Callus induction and shoot bud formation from cultured anthers in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Helia** **19**:39–46s.
- Barroso, P., Rêgo, M., Rêgo, E., Soares, W., 2015. Embryogenesis in the anthers of different ornamental pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes. **Genetics and Molecular Research**, **14** (4): 13349-13363s.
- Bohorova, N., 1985. In vitro organogenesis, androgenesis and embryo culture in the genus *Helianthus* L. **Z. Pflanzenzuchtg**, **95**: 35-44s.
- Bourgin, J. P., Nitsch, J. P., 1967. Obtention De Nicotiana Haploides A Partir D'etamines Cultivees in Vitro. **Ann. Pysiol. Veget.**, **9**: 377-382s.
- Cai, D., Zhou, C., 1984. In vitro induction of haploid embryoids and plantlets from unpollinated young florets and ovules of *Helianthus annuus* L. **Kexue Tongbao**. **29**:680-682s.
- Canlı, Z.,S., 2022. Sürdürülebilir Çerezlik Ayçiçeği (*Helianthus Annuus* L.) Tarımında Kimyasal, Organik Ve Organomineral Gübre Uygulamalarının Verim ve Kalite Parametreleri Üzerine Etkisi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 77s.
- Coşge, B., Ulukan, H., 2005. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) yetiştiriciliğimizde çeşit ve ekim zamanı. **Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, **9**(3).
- Croughan, T. P., 1995. Anther culture for doubled haploid production. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods* (pp. 143-154). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Çakmak, E., Altinkut, Uncuoğlu, A., Aydın, Y., 2019. Evaluation of *in vitro* genotoxic effects induced by *in vitro* anther culture conditions in sunflower. **Plant Signaling & Behavior**, **14**:9.
- Dayan, S., 2011. Ayçiçeğinde (*Helianthus Annuus* L.) Anter Kültürü Yolu ile Haploid Bitki Eldesi Üzerine Araştırmalar. Trakya Üniversitesi, Doktora Tezi, Edirne, 152s.
- Dumas De Vaulx, R., Chambonnet, D., 1982. Culture in vitro D'antheres D'aubergine (*S. Melongena* L.) Stimulation De La Production De Plantes Qu Moyen De Traitements A +35 Oc Associes A De Faibles Teneurs En Substances De Croissance. **Agronomie**, **10**: 983-988s.
- Duran, R. E., 2007. Tuzlu Koşullar İçin Geliştirilebilecek Buğday Genotiplerinin Anter Kültür Tekniğine Uyumu. Süleyman Demirel Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 60s.
- Eğilmez, Ö., 1977. Ayçiçeği Kimya ve Teknolojisi. Tarım Bakanlığı Yayınları, Ayçiçeği Projesi El Kitabı, D-170. Gaye Matbaası, Ankara.
- Ellialtıoğlu, S., Tıpırdamaz, R., 2000. Patlıcan anter kültüründe absizik asit miktarını azaltıcı uygulamaların androgenetik embriyo oluşumuna etkisi. **Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi**, **24(1)**:23-32s.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K., 2000. Haploid bitki üretimi. **Bitki Biyoteknolojisi**, **1**: 137-189s.
- Emiroğlu, Ü., 1982. Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. Ege Ü.Z.F. Yayınları, Yardımcı Ders Kitabı. Yayın No: 450, izmir, 38s.
- Engin Özü, M., 2006. Donör Bitkilerin Yetiştirme Koşulları ve Farklı Kültür Sıcaklıklarının Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Anter Kültüründe Haploid Bitki Rejenerasyonuna Etkileri Üzerine Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 57s.
- Er, C., 1992. Bitki Islahında Doku Kültürleri. Tarım Ve Köy isleri Bakanlığı Yayını, Ankara, 83s.

- Erbaş, S., Şenates, A., 2020. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)'nde azot ve kükürt gübrelenmesinin verim ve kaliteye etkileri. **Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, **24(1)**: 217-225s.
- FAOSTAT, 2021. The statistical database (FAOSTAT). <https://www.fao.org/faostat/en/#data> Erişim tarihi: Ocak 2023.
- Ferrie, A. M. R., Caswell, K. L., 2011. Isolated Microspore Culture Techniques And Recent Progress For Haploid And Doubled Haploid Plant Production. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, **104**: 301–309.
- Fick, G. N., Miller, J. F., 1997. Sunflower breeding. **Sunflower technology and production**, **35**: 395-439s.
- Filippi, C., Zubrzycki, J., Lía, V., Heinz, R. A., Paniego, N. B., Hopp, H. E., 2014. Genetics and genomics applied to sunflower breeding. **Sunflowers: growth and development, environmental influences and pests/diseases**, 61-94.
- Garkusha, S., Savenko, E., Glazyrina, V., Demurin, Y., Gorlova, L., Martynova, E., Mukhina, Z., 2017. Development of methodological procedures for culturing sunflower anthers in vitro. **Journal of Biotech Research**, **8**: 138-150s.
- Gencer, A. S., 2002. Anter Kültürü Teknigi Kullanarak Ege Bölgesi İçin Küllemeye (*Erysiphe cichoracearum* L.) Dayanıklı Tütün Hatlarının Gelistirilmesi, **Turk. J. Agric. For.** **26**: 63-69s.
- Germana, M. A., 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, **104**: 283-300s.
- Goyne, P. J., Hammer, G. L., 1982. Phenology of sunflower cultivars. II. Controlled-environment studies of temperature and photoperiod effects. **Australian Journal of Agricultural Research**, **33(2)**: 251-261s.
- Gönülşen, N., 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. Ege Tarımsal Araş. Enst. Müd. Yay. No: 78, İzmir.

- Gresshoff, P. M., Doy, C. H., 197). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). **Planta**, **107**: 161-170s.
- Gül, V., 2013. Farklı gelişme sürelerine sahip yağlık ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) genotiplerinin farklı azot dozlarına tepkileri. Atatürk Üniversitesi, Doktora Tezi, Erzurum, 107s.
- Hamaoka, Y., Fujita, Y., Iwai, S., 1991. Effects of Temperature on The Mode of Pollen Development in Anther Culture Of *Brassica campestris*. **Physiologia Plantarum**, **82**:67–72s.
- Hansen, M., 2000. Genetic engineering is not an extension of conventional plant breeding: how genetic engineering differs from conventional breeding, hybridization, wide crosses, and horizontal gene transfer. **Consumer Policy Institute/Consumer's Union**, 1-7s.
- Heiser Jr, C. B., 1978. Taxonomy of Helianthus and origin of domesticated sunflower. **Sunflower science and technology**, **19**: 31-53s.
- Hu, J., 2010. Genetics, genomics and breeding of sunflower, editors Jinguo Hu, Gerald Seiler, Chittaranjan Kole. Genetics.
- Ingram, D. S., 1980. Tissue Culture Methods in Plant Pathology. Tissue Culture Methods for Plant Pathologist. Blackwell Sci. Publ. 3s.
- Irikura, Y., 1975. Induction of haploid plants by anther culture in tuber-bearing species and interspecific hybrids of Solanum. **Potato Research**, **18(1)**: 133-140s.
- İlisulu, K., 1973. Yağ bitkileri ve ıslahı E.Ü. Çağlayan Kitap evi, İstanbul, 286-290s .
- İncekara, F., 1972. Yağ bitkileri ve ıslahı, E. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, 49-57s.
- Jain, S. M., Sopory, S. K., Veilleux, R., (Eds.), 1996. *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants: Volume 2: Applications (Vol. 24). Springer Science & Business Media.
- Jan, C. C., 1997. Cytology and interspecific hybridization. **Sunflower technology and production**, **35**: 497-558s.

- Karakullukçu, S., 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde *In Vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi, Doktora Tezi, Ankara, 131s.
- Karakullukçu, Ş., Abak, K., 1993. Patlıcanda anter kültürü üzerinde araştırmalar: II. şeker ve büyümeyi düzenleyicilerin etkisi, **Turk J Agric For**, **17**: 811-820s.
- Kasha, K. J., Keller, W. A., Palmer, C. E., (Eds.), 2005. Haploids in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry 56. Springer.
- Kaya, Y., 2014. Sunflower. **In Alien Gene Transfer in Crop Plants**, **2**: 281-315s.
- Kaya, Y., 2014. Türkiye’de Hibrit Ayçiçeği Tohumluk Üretimi. **Agromedya Dergisi**. **2 (9)**: 26-32s.
- Khandakar, R. K., Yu, J., Min, S., Won, M., Choi, H. G., Park, H., Park, Y. 2014. Regeneration of Haploid Plantlet through Anther Culture of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, **42 (2)**: 482–487s.
- Khush, G. S., Virmani, S. S., 1996. Haploids in Plant Breeding. In Vitro Haploid Production in Higher Plants. **The Netherlands**, **1**:11–33s.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D.-I., Lee, K.-M., 2004, Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). **Plant cell, tissue and organ culture**, **77 (1)**: 63-72s.
- Köseali, N., 2000. Stark Spur Golden Delicious Elma Çesidinde Seker, Aktif Kömür ve Işığın in vitro Androgenesis Üzerine Etkileri. Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 47s.
- Kupicha, F. K., 1975. Helianthus L. In: Flora of Turkey and The East Aegean Island. Ed. Davis, P.H. Edinburh Univ. Pres, 44-45s.
- Kurt, O., Evans, G. M., 1998. Anther Culture Potential of Linseed (*Linum usitatissimum* L.): Effects of Genotypes and Pretreatment on CallusFormation and Differentiation. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, **22(6)**: 553-560s.

- Kurtar, E. S., 1999. Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Haploid Embriyo Uyartımı ve Bitki Olusturma Üzerine Arastirmalar. Çukurova Üniversitesi, Doktora Tezi, Adana, 203s.
- Mandal, A. K. A., Gupta, S. D., Chatterji, A. K., 2001. Factors affecting somatic embryogenesis from cotyledonary explants of safflower. **Biologia plantarum**, **44(4)**:503-507s.
- Miladinović, D., Hladni, N., Radanović, A., Jocić, S., Cvejić, S., 2019. Sunflower and climate change: possibilities of adaptation through breeding and genomic selection. **Genomic designing of climate-smart oilseed crops**, 173-238s.
- Mix, G., 1985. Antheren- Und Ovarienkultur von Sonnenblumen (*Helianthus Annuus* L.). **Landbauforsch.Volkenrode**, **35(3)**: 153-156s.
- Morrison, R. A., Koning, R. E., Evans, D. A., 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of Capsicum. **Journal of plant physiology**, **126(1)**: 1-9s.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, **15**: 473-497s.
- Nitsch, J. P., 1969. Experimental Androgenesis in Nicotiana. **Phytomorphology**, **19**: 389-404s.
- Nowaczyk, P., Kisiała, A., 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. **Journal of applied genetics**, **47 (2)**: 113-117s.
- Nurhidayah, T., Horn, R., Röcher, T., Friedt, W., 1996. High regeneration rates in anther culture of interspecific sunflower hybrids. **Plant Cell Reports**, **16**: 167-173s.
- Öcal, Y., 2016. Anter Kültürü Yoluyla Nematoda Dayanıklı Sivri, Charleston, Dolma ve Kapyra Biber Saf Hatlarının Geliştirilmesi. Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 92s.
- Parra-Vega, V., González-García, B., Seguí-Simarro, J.M., 2013b. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and

- microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Acta Physiol Plant**, **35**: 627- 633s.
- Pekcan, V., Esendal, E., 2015. Çerezlik ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)'nde sulama, azot dozu ve bitki sıklığının verim ve kalite özellikleri üzerine etkileri. **Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi**, **25(2)**: 24-36s.
- Pintos, B., Manzanera, J. A., Buena, M. A., 2007. Antimitotic agents Increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture. **Journal of Plant Physiology** **164**:1595-1604s.
- Prasad, B. R., Khadeer, M. A., Seeta, P., Anwar, S. Y., 1991. *In vitro* induction of androgenic haploids in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Plant cell reports**, **10(1)**: 48-51s.
- Rodríguez Guzmán, E., Ramírez Serrano, C., Güitrón López, M. M., Palmeros Suárez, P. A., Ángeles Espino, A., 2020. Cultivo de anteras e inducción de callo haploide en germoplasma bc3 de girasol (*Helianthus annuus* L.). **Acta universitaria**, 30s.
- Rotino, G., Falavigna, A., Fiume, F., Nervo, G., Restaino, F., 1987. Possibility of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Improvement Through in vitro Techniques. **Genetica Agraria, Vol:XII, N:3**, 314-315, Roma.
- Saensee, K., 2017. Factors affecting doubled haploid production in sunflower (Doctoral dissertation, School of Biology Institute of Science Suranaree University of Technology).
- Saensee, K., Machikowa, T., Kaya, Y., 2018. Relationship between floret size and anther culture response in an ornamental sunflower. **Asia-Pacific Journal of Science and Technology**, **23(2)**.
- Saji, K. V., Sujatha, M., 1998. Embryogenesis and Plant Regeneration in Anther Culture of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) **Euphytica** **103**: 1–7s.
- Sakin, M. A., 1994. Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Anter Kültüründe Genotip ve Besi Ortamının Haploid Bitki Oluşumuna Etkileri Üzerine Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 56s.

- Sayılır, A., Özzambak, E., 2005. Biber Anter Kültüründe Uygun Tomurcuk Büyüklüğü ile Besin Ortamı içeriklerinin Embriyo Verimine Etkileri Üzerine Bir Araştırma. **Ege Üniv. Ziraat. Fak. Derg.** **42(3):**1-11s.
- Semerci, A., 2019. Yağlık Ayçiçeği Üretiminin Ekonomik Analizi: Kırklareli İli Örneği. **Türk Tarım Ve Doğa Bilimleri Dergisi**, **6(4):** 616-623.
- Semerci, A., Durmuş, E., 2021. Analysis of oily sunflower production in Turkey. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, **9(1):** 56-62s.
- Semerci, A., Kaya, Y., Durak, S., 2007. Economic analysis of sunflower production in Turkey. **Helia**, **30 (47):**105-114s.
- Sestili, S., Ficcadenti, N., 1996. Irradiated Pollen For Haploid Production. In *Vitro Haploid Production in Higher Plants, Fundamental Aspects And Methods*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1: 263-274.
- Snedecor, G. W., Cochran, W. G., 1967. *Statistical Methods*, The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Taskın, H., 2005. Bazı Biber Genotiplerinde Anter Kültürü ile Haploid Embriyo Uyartımında Embriyo Kalitesinin Artırılmasına Yönelik Bazı Uygulamalar. Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 72s.
- Thengane, S. R., Joshi, M. S., Khuspe, S. S., Mascarenhas, A. F., 1994. Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. **Plant cell reports**, **13(3):** 222-226s.
- Todorova, M., Ivanov, P., Shindrova, P., Christov, M., Ivanova, I., 1997. Doubled haploid production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. **Euphytica** **97(3):** 249-254s.
- Tuberosa, R., Sanguinetti, M. C., Conti, S., 1987. Anther Culture Of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Lines And Hybrids, **Genetica Agraria**, **41: 267- 274s.**

Ulukan, H., 2007. Klasik Bitki Islahı ve Genetik Mühendisliği ile Oluşturulan Değişimlere Genel Bakış. **U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi**, **21**: 27-40.

USDA, 2020. Amerika Birleşik Devletleri Tarım ve Orman Bakanlığı. Oilcrops Year Book. <https://www.ers.usda.gov/data-products/oil-crops-yearbook/oil-crops-yearbook/> Erişim tarihi:Subat 2020.

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



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Ahmet SAY

Uyruğu : Türkiye (TC)

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	ERÜ Fen Bilimler Enstitüsü	2017
Lisans	ERÜ Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü	2012

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2014-Halen	ERÜ Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, KAYSERİ	Araştırma Görevlisi

### YABANCI DİL

İngilizce