

**Mısır (Zea mays) Bitkisinde Anter Kùltürü  
Olanakları Üzerine Araştırmalar  
Soner Yiğit SARIER  
Yüksek Lisans Tezi  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Kayhan Z. KORKUT**

**2011**

T.C.  
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mısır Bitkisinde (*Zea mays* L.) Anter Kültürü Olanakları Üzerine Araştırmalar

SONER YİĞİT SARIER

TARLA BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. KAYIHAN Z. KORKUT

TEKİRDAĞ-2011

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Kayıhan Z. KORKUT danışmanlığında, Soner Yiğit SARIER tarafından hazırlanan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Kayıhan Z. KORKUT

*imza :*

Üye : Prof. Dr. İsmet BAŞER

*imza :*

Üye : Yard. Doç. Dr. Cemal POLAT

*imza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Fatih KONUKCU  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Mısır Bitkisinde Anter Kültürü Olanakları Üzerine Araştırmalar

Soner Yiğit SARIER

Namık Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kayıhan Z. Korkut

Bu çalışmanın içeriği bazı kendilenmiş mısır hatlarında *in vitro* androgenesis anter kültürü yolu ile aktarılması ve 7–10 gün sürecek ön soğuk uygulaması yaptıktan sonra anterlerin kombine edilen dört embriyo induksiyon ortamına (IMSS & YPm & N6&P II Besi Ortamı) aktarılmasıdır. Ön soğuk uygulanmasından sonra, anterleri kallus oluşturması için induksiyon ortamına transfer edilmiştir. Bu üç faktörlü bir deneme olup üç tekrarlamalı olarak tamamıyla şansa bağlı deneme planına göre dizayn edilmiştir. Her bir tekrarlamadaki petri kabı 30 anter içermektedir. Her biri 28°C sıcaklıkta 3–4 hafta tutulduktan sonra TARİST istatistik programında (ANOVA) varyans analizi yapılmıştır. Sonuçlara göre mısır hatlarının anter kültürüne yanıtlarının kullanılan besi ortamına göre değişebileceği, hatların en iyi yanıt gösterdikleri besi ortamlarının YPI ve MS olup, en yüksek yanıtı SM-53 genotipinden ve en yüksek interaksyonu SM-53 hattı ve YPI (2,4-D + IBA) besi ortamının verdiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** androgenesis, haploid, besi ortamı, kallus, anter kültürü

2010, 56 sayfa

## **ABSTRACT**

MSc. Thesis  
Studies on Anther Culture Possibilities in Maize

Soner Yiğit SARIER

Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Kayıhan Z. Korkut

This study involves *in vitro* androgenesis of *Zea mays* L. some inbred lines via anther culture. combination of four embryo induction media (MS & YPI & N6&P II Media) and cold pretreatment duration (7 to 10 days). After cold pretreatment, anthers were transferred to the induction media to induce of callus. The experiment was carried out in a 3-factorial experiment (based on a completely randomized design) with 3 replications. Each replication consisted of one petri-dish containing 30 anthers. They were grown in a growth chamber at 28°C at 3–4 weeks. And then analysis of variance (ANOVA) was carried out using the TARİST statistical software. According to result, anther culture responses of maize lines was varied according to the used plant media. The highest anther culture responses of maize lines were obtained from YPI and MS medium . SM-53 line between maize genotypes was gave the best response. The highest response for anther culture was obtained in SM-53 line and in YPI media (2,4- D + IBA).

**Keywords:** androgenesis, haploidy, medium, callus, anther culture

**2010, 56 pages**

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	2,4 Diklor fenoksi asetik asit
ABA	Absisik asit
BAP	Benzil amino pürin
DH	Double Haploid
EKÖF	En küçük önemli fark
IAA	Indol asedik asit
IBA	Indol bütirik asit
6BA	Bütirik asit
CIMMYT	Uluslar arası mısır ve buğday araştırma merkezi
KO	Kareler ortalaması
KT	Kareler toplamı
ELS	Embriyo benzeri yapı (Embryo like structures)
MS	Murashige and Skoog besi ortamı
NAA	Naftalin asetik asit
PAA	Fenil asetik asit
SD	Serbestlik derecesi
N 6	Nistch (besi ortamı)
AC	Anter kültürü
MC	Mikrospor kültürü
DK	Değişim katsayısı
mg	Miligram
L	Litre
cm	Santimetre

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	v
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	5
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	11
3.1. Materyal .....	11
3.2. Yöntem .....	12
3.2.1. Anter kültürü .....	13
3.2.1.1. Verici (donor) bitkinin seçilmesi .....	15
3.2.1.2. Çiçek tozu gelişim dönemi .....	15
3.2.1.3. Ön soğuk uygulaması ve sterilizasyon .....	18
3.2.1.4. Anterlerin besi ortamlarının hazırlanması .....	21
3.2.1.5. Anterlerin besi ortamına aktarılması .....	22
3.2.1.6. Anterlerin inkübasyonu .....	24
3.2.2. Biyometrik değerlendirme .....	25
3.2.2.1. Karekök transformasyonları .....	27
3.2.2.2. Logaritma transformasyonları .....	29
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA</b> .....	32
4.1. Kallus oluşturma sayılarına göre hatların karşılaştırılması .....	33
4.2. Kallus oluşturma sayılarına göre besi ortamlarının karşılaştırılması .....	34
4.3. Genotiplere göre en uygun besi ortamları .....	36

<b>5. SONUÇ</b> .....	45
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	46
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	56



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller No	Sayfa No
Şekil 3.2.1.1. Anter kültürü akış şeması .....	14
Şekil 3.2.1.2.1.Mikrosporigenesis .....	16

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No		Sayfa No
Çizelge 3.1.1.	Kullanılan hatlar .....	11
Çizelge 3.1.2.	Kullanılan besi ortamları .....	11
Çizelge 3.1.3.	Kullanılan besi ortamları ve bileşimleri .....	12
Çizelge 3.2.2.1.	Orijinal kallus sayıları istatistikleri .....	25
Çizelge 3.2.2.2.	Kullanılan besi ortamlarına göre genotiplerin .....	26
	oluşturduğu orjinal kallus sayıları	
Çizelge 3.2.2.1.1.	Karekök transformasyonu istatistikleri .....	27
Çizelge 3.2.2.1.2.	Kullanılan besi ortamlarına göre genotiplerin .....	28
	oluşturduğu kallus sayılarının karekök	
	transformasyonuna göre değerleri	
Çizelge 3.2.2.2.1.	Logaritma transformasyonu istatistikleri .....	29
Çizelge 3.2.2.2.2.	Kullanılan besi ortamlarına göre genotiplerin .....	30
	oluşturduğu kallus sayılarının logaritma	
	transformasyonuna göre değerleri	
Çizelge 4.1.	Kullanılan besi ortamlarına göre genotiplerin .....	32
	kallus sayılarının varyans analiz çizelgesi	
Çizelge 4.1.1.	Hatların kallus oluşturma sayılarına göre karşılaştırılması ..	33
Çizelge 4.2.1.	Kallus oluşturma sayılarına göre besi ortamlarının .....	35
	Karşılaştırılması	
Çizelge 4.3.1.	Genotiplere göre en uygun besi ortamları .....	37

## RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa No
Resim 3.2.1.2.1. Erken univalent safhadaki tepe püskülü .....	17
Resim 3.2.1.2.2. Erken univalent dönemde tarlada mısır bitkisi .....	18
Resim 3.2.1.3.1. Ön soğuk uygulaması yapılan tepe püskülleri .....	20
Resim 3.2.1.3.2. Anterlerin %20 lik sodyum hipoklorit ile sterilizasyonu .....	21
Resim 3.2.1.5.1. Besi ortamlarının petri kaplarına aktarımı .....	22
Resim 3.2.1.5.2. Anterlerin kavuzlarından ayrılması .....	23
Resim 3.2.1.5.3. Anterlerin besi ortamına aktarılması .....	23
Resim 3.2.1.6.1. Anterlerin 25 <sup>0</sup> C de inkübasyonu .....	24
Resim 4.1. SM-47 Elde edilen kalluslar 1.tekrarlama YPI .....	39
Resim 4.2. SM-47 anterleri 2. tekrarlama P II .....	40
Resim 4.3. SM-147 Elde edilen kalluslar 3.tekrarlama YPI .....	40
Resim 4.4. SM-195 elde edilen kalluslar 1.tekrarlama MS-2 .....	41
Resim 4.5. SM-47 elde edilen kalluslar 3. tekrarlama MS-2 .....	41
Resim 4.6. SM-204 elde edilen kalluslar 1. tekrarlama N-6 .....	42
Resim 4.7. SM-204 elde edilen kalluslar 1. tekrarlama MS-2 .....	42
Resim 4.8. SM-201 elde edilen kalluslar 3. tekrarlama YPI .....	43
Resim 4.9. SM-53 elde edilen kalluslar 3. tekrarlama MS-2 .....	43
Resim 4.10. SM-147 elde edilen kalluslar 1. tekrarlama YPI .....	44



## 1. GİRİŞ

Dünya tahıl ekiliş ve üretiminde önemli bir paya sahip olan mısır bitkisi; ekim alanı yönünden buğday ve çeltikten sonra üçüncü, üretim yönünden ise buğdaydan sonra ikinci sırayı almaktadır.

Günümüzde insanların beslenmesi açısından yaşamsal öneme sahip olan tahıllarda, üretim ve kalite sorunlarının çözülmesi için genetik varyabilitenin sınırlarına yaklaşılmıştır. Bu nedenle, önemli kültür bitkilerinin ıslahında kullanılacak yeni ve daha geniş varyabiliteye gereksinim vardır. Böyle bir genetik varyabiliteyi elde etmek, geleneksel bitki ıslah yöntemlerinin etkinliğini arttırmak ve ıslah süresini kısaltmak için yeni teknolojilere gereksinim vardır. Bu teknolojiler içinde en yaygın yararlandığımız biyoteknolojidir. Biyoteknoloji kısaca, yaşayan doku ve organları kullanarak, uygun yöntem ve tekniklerle istenilen ürünlerin elde edilmesi anlamına gelir. Geleneksel bitki ıslah yöntemlerinin modifiye edilmesinde biyoteknolojiden yararlanılmaktadır.

Bitki biyoteknolojisinin temelleri 1838 yılında Schwann ve Schleiden in *Totipotens Teorisi* ile atılmıştır. Tek bir hücreden bölünme ve farklılaşma yoluyla organ ve tam bitki elde etme potansiyeline “*Totipotensi*” denir. Bitki hücreleri bu özelliğe sahiptir. Kallus ise, düzenli olmayan hücrelerin oluşturduğu yara dokusudur. Doku kültüründe yapılan çalışmaların çoğunda kallus safhasından geçilerek başarıya ulaşılr.

Bitki biyoteknolojisindeki ciddi gelişmeler 1900 lü yıllarda başlamıştır. Watson ve Crick tarafından genetik yapıların moleküler düzeyde tanımlanması, özellikle bitkilerde moleküler tekniklerin kullanılmasının önünü açmıştır.

1970 li yıllarda haploid bitkilerin elde edilmesi, protoplast kaynaştırması ve somatik melezleme, taksonomik veya genetik olarak farklı türler arasındaki eşeyssel uyumsuzluk engellerin aşılması, mutasyonlar, DNA formundaki genetik materyal transferleri gibi önemli çalışmalar yapılmıştır. Günümüzde ise haploid bitkilerin elde edilmesinde anter kültürü yaygın olarak kullanılan bir biyoteknolojik yöntemdir (Vasil ve ark. 1994). Bir türün normal

kromozom sayısının yarısına (n) sahip olan eşey hücreleri yani gametlerinden yararlanılarak, o türün gametik kromozom sayısını taşıyan haploid bitkilerin elde edilmesine “haploidizasyon” adı verilmektedir.

Somatik hücrelerdeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler adı verilmektedir. Haploidler, her bir lokustaki allellerden yalnız bir seriyi içermekte ve bu özellikleri ile ıslah çalışmalarında önemli yer tutmaktadırlar.

Anter kültürü veya dihaploid elde etmede amaç eldeki materyali en hızlı şekilde homozigot hale getirmektir. Somatik hücrelerdeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler denir. Haploid materyali kolkhisin veya pronamid gibi kimyasallar kullanılarak katlanması ile dihaploid materyal elde edilir. Haploid materyalde doğal olarak spontan olarak kromozom katlanması % 0,001 ile % 0,01 oranındadır. Dihaploid elde etmenin başlıca amaçları:

Hat veya çeşitlerin arzu edilen karakterlerinin fiske edilebilmesi,

Kombinasyon ıslahının kolaylaştırılması,

Islahçıların dihaploidleri kullanarak marker ve haritalama çalışmalarına daha fazla hız kazandırarak çabuklaştırmaktır.

Ayrıca haploid bitkilerin homolog kromozomlarından sadece bir takımı içermesi, resesif mutasyonların açığa çıkartılmasına olanak sağlamaktadır. Bunlara ek olarak, haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması sayesinde % 100 homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir. Böylece uzun yıllar süren (7–10 yıl) saflaştırma işlemi birkaç ay gibi kısa sürede yapılabilmekte; kombinasyon ıslahı ve F<sub>1</sub> çeşit ıslahı programlarında zaman yönünde önemli düzeyde kazanç sağlanabilmektedir.

Haploid bitkilerin tarihi A.D. Bergner tarafından 1921’ de rapor edilmiş olan *Datura stromonium* L.’ un haploid üretimini gözlemlenmesiyle başlamıştır. Bunu bazı türlerde gözlem ve keşifler izlemiş olup *Nicotiana tabacum* (Clauser ve Mann 1924) ve *Triticum compactum* (Gains ve Aase 1926) izlemiştir.

Haploid ve dihaploidler erkek ya da dişi gametik hücrelerden elde edilir. Bu hücrelerden erkek gametik hücreleri içeren polenler yani mikrospor hücreleri iki çekirdek

(vejetatif ve generatif olmak üzere) içerirler. Her bir polen hücresi yalnızca erken gelişim safhasında sporotofik özellik gösterir ve bu safhada totipotent özellik gösterebilir (Touraev ve ark. 2001). Haploid ya da dihaploid elde edilmesinde yapılan çalışmalar sonucunda iki önemli safha söz konusudur. Bunlardan ilki; androgenik indüksiyon süreci, ikincisi haploid ya da dihaploidlerin indüksiyon sürecidir. İndüksiyon safhası anterlere yapılan ön uygulamalardan önceki safhadır. Rejenerasyon safhası ise *in vitro* köklendirme safhasını izleyen safhadır.

Elde edilmesi olası haploid bitkilerin; bitki yetiştirme ve ıslahı gibi uygulamalı birimlerle ilgili konularda sağlamış oldukları avantajları aşağıdaki gibi gruplandırarak sıralamak mümkündür.

Haploidleri kullanmanın en başta gelen avantajı, tam bir homozigotiyi elde etme olanağı sunmasıdır. Dihaploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmalarını yapmak kolaylaşmakta ve sonuca daha çabuk ulaşabilmektedir. F<sub>1</sub> çeşitlerinin geliştirilmesinde homozigot hatlar arasında üstün kombinasyon yeteneği verenlerinin belirlenmesi yöntemi kullanıldığından, haploidinin hibrit çeşit ıslahında özel bir önemi bulunmaktadır. Dihaploid bitkilerden elde edilen saf hatlar F<sub>1</sub> çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilir. Kombinasyon ıslahında da sonuca çok kısa sürede ulaşmayı sağlayan haploidi seviyesinde F<sub>1</sub> kademesindeki melez bitkilerden haploid çekerek; farklı genotiplerde bulunan ve tek bir genotipte bulunması arzu edilen özelliklere sahip bitkiler kazanılması mümkündür. Özellikle mısır bitkisi gibi yabancı döllenmiş bitkilerde heterozigoti oranı çok yüksek olduğundan bunlarda homozigot hatların elde edilebilmesi için 7–10 generasyon boyunca kendileme yapmak gerekmektedir; kendine döllenmiş bitkilerde bile aynı amaç için 5–7 generasyon kendileme işlemine gerek duyulmaktadır. Ancak dihaploidizasyon yöntemi devreye girdiğinde homozigot hatlara tek generasyonda ulaşmak olasıdır.

Haploid bitkiler, somatik hibridizasyon işleminin dihaploid protoplastlara göre daha kolay yapılabilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca iki haploid protoplastın birleşmesinin sonucu “diploid” olacağından; protoplast kültürü kullanılarak yapılan somatik hibridizasyon tekniğinin bilinen dezavantajlarının büyük bir kısmı ortadan kalkacaktır.

Haploid bitkiler, farklı patojen ve patojenlerin fizyolojik ırklarına karşı *in vitro* seviyede seçime olanak vermekte, hastalıklara dayanıklılık çalışmalarında zaman, yer ve maddi kazanç sağlamaktadır.

Dihaploid hatların güncel uygulamalarından biri de gen haritalarının çıkartılmasında kullanımlarıdır.

Dihaploid hatlardan oluşan bir populasyonda; heterozigoti nedeniyle ortaya çıkan intermediyer ekspresyonlara rastlanmaz. Bu nedenle fenotipik işaretleyicilerin (marker) tanınması çok daha etkin olabilmektedir. Dihaploid hatlarda herhangi bir gen, ister bitki isterse marker seviyede olsun (genellikle RFLP analizleri ile belirlenmektedir); 1:1 oranında açılacaktır. Bu durum özellikle poligenik olarak kontrol edilen bir karakterin haritası çıkarılıyorsa önem taşımakta ve kolaylık sağlamaktadır.

Fazla miktarda haploid (n kromozomlu) bitki üretimi sağlayacak olan anter kültürü ile istenilen mutant tiplerin seçimi ve yeni çeşitlerin geliştirilmesi mümkündür. Haploid bitkiler ıslah çalışmalarında genetik analizlerde ve benzer çalışmalarda kullanılan genetik materyallerdir. Haploid bitkilerin ıslah çalışmalarında kullanılabilmesi için, o türe ait haploid bitkilerin istenildiği zaman yeterli miktarda ve kolay elde edilebilmesi gerekmektedir.

Süre kısaltılmasının yanında anter kültürü bahsedildiği üzer, bitki ıslahının değişik alanlarında önemli bir kaynak olarak kullanılmaktadır. Anter kültürü ile elde edilen materyalin kromozom sayısının pronomid ve kolkhisin gibi kimyasallar kullanılarak ikiye katlanması ile % 100 homozigot bitkilerin elde edilmesi özellikle de mısır bitki gibi yabancı döllenelerin melez çeşit ıslahında, ıslah süresinin kısaltılması ve etkinliğinin artırılması için umut olmuştur.

Melez mısır ıslahında, anter kültürü ile homozigot dihaploid mısır hatlarının eldesi mümkündür. Bu nedenle melez çeşit ıslahının etkinliği artacak ve ıslah süresi kısılacaktır.

Yapmış olduğumuz bu tez çalışması ile, melez mısır ıslahı programında kullanılacak uygun anter kültürü yöntemi konusunda bilgi sahibi olunacaktır. Bu amaçla 12 mısır hattı üzerinde 5 farklı besi ortamı kullanılacaktır. Anter kültürü yöntemi ile haploid kallus ya da bitkiler elde ederek anter kültürüne elverişli mısır hat ya da hatlarını saptamak, mısır hatlarının farklı besi ortamlarına olan yanıtlarını ölçmek ve mısır bitkisinde anter kültürü için uygun besi ortamlarının bulunması yapılan çalışmanın temel amacıdır.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kapalı tohumlu bitkilerde kısa bir gametofik safha ve tamamen sporotifik safhaya bağılı bir yaşam vardır. Erkek gametofitler bitkilerden polen tanesi ya da mikrospor oluşturmak üzere gönderilirler. Polen taneleri haploid yapıda olup her bir genden tek bir kopyaya sahiptir. Erkek gametofit fonksiyonlarını uygun şartlar altında androgenesis meydana getirmesi, başlı başına polen tanelerinin sporotifik gelişim yetisinde olmasına bağılıdır. 1920 li yıllarda çeşitli türlerde haploid bitkilerin spontan olarak üretildiği keşfedilmiştir. Spontan haploid bitkiler, iki ebeveyninden gelen iki set kromozomdan ziyade tek ebeveyninden gelen tek set kromozom içermekteydiler. Yüksek bitkilerden *Datura stramonium* un haploid üretimlerinin gözlemlenmesiyle double haploidlerin tarihi süreci başlamıştır (Bergner 1921).

Bunu izleyen yıllarda haploidler arasındaki ıslah programı tanımlanmış bu bağlamda parthenogenesis yolu ile kromozomları katlanmış haploid mısır bitkicikleri geliştirilmiştir (Chase 1952).

Androgenesis, erkek gamet hücresine ait mikrosporların sporotifik gelişime yönlendirilmesidir. Mikrospor normal olarak vejetatif ve generatif olmak üzere 2 çekirdek içeren polen hücresine dönüşmek için programlanmıştır. Androgenesis te her bir gelişim safhasında sporotifik gelişime yönlendirilip totipotent özellik ile döl eldesi ana amaçtır. Androgenesis sürecinde çoğu yöntem 2 ana *in vitro* safhadan ibaret olup 1. si androgenik sürece indüksiyon, 2. si haploid ya da double haploid rejenarasyonudur.

İndüksiyon safhasında bitkilere sıklıkla ön uygulamalar yapıp bunu rejenerasyon safhasında *in vitro* köklenme izler. Mikrospor gelişim safhasında direkt olarak androgenik embriyo oluşabilir buda literatürde “embriyo benzeri apı” ELS olarak geçer. ELS uygun kültür şartlarında çimlenerek direkt olarak bitkiye dönüşür.

Sonraki yıllarda geliştirilen birçok doku kültürü yöntemiyle birlikte ıslahçılar 1950 ler de kendi haploid bitkilerini *in vitro* koşullarda üretmek için mikrospor kültürü gibi yöntemler kullanmışlardır.

İlk kez 1953 yılında Tulecke, *Ginkgo bloba* bitkisine ait olgun polenlerin kültür koşullarında haploid kallus oluşturmak üzere uyarılabileceğini gözlenmiştir.

1964 yılında ilk önemli gelişmeyi Guha ve Maheshwari gerçekleştirmiş, *Datura innoxia* bitkisinin kültüre alınan anterlerinde mikrosporlarından haploid embriyo oluşumu sağlanmıştır (Guha ve Maheshwari 1966).

Bu çalışmalara benzer çeltik (*Oryza sp.*) üzerinde çalışan Nuzeki ve Oono (1968, 1970); Guha ve ark. (1970) başarılı çalışmalar yaparken; Kameya ve Hinata (1970) da *Brassica* türlerinde uygun sonuçlar almışlardır.

Haploid bitkilerle ilgili ilk uluslararası sempozyum 1974 yılında Kanada'nın Guelph eyaletinde "yüksek birkilerde haploidi" adı altında yapıldı. Haploid bitkilerde en çok çalışılan bitkiler arpa, buğday, triticale, mısır, çeltik ve kanoladır.

Kessel ve ark. (1977), oksijen düzeyi düşük olduğu kültürlerde artan adenosine düzeyinin *Daucas caroto* da yeşil bitkicik oranını azalttığını bulmuşlardır.

Immura ve Harada (1980), aspirasyon ile azalan atmosferik basınç uygulamasıyla tütün anterlerinde ön soğuk uygulamasının polen embriyogenesisini arttırdığını belirlemişlerdir.

1982 yılında Maheshwari ve ark. 26 familyanın 60 cinsinin 171 türünde anter kültürüne olumlu yanıt almışlardır. Mısır da anter kültürü çalışmaları izleyen yıllarda devam etmiştir (Genovesi 1980; Maheshwari ve ark. 1982; Narayanaswamy ve George 1982; Bajaj 1983; Johri ve Rao 1984; Dunwel 1985; Heterle ve Bors 1985; Foroughy – Wehr ve Wenzel 1988).

Mısırdaki anter kültürüne yanıt birçok genotipin yanıtızsız olmasıyla yüksek oranda genotipe bağlıdır. Yanıt yeteneği yüksek genotiplerin anterlerinin %18'inden daha fazlasından yanıt alındığı bazı sonuçlarda belirtilmiştir (Genovesi ve Collins 1982).

Bunu izleyen yıllarda birçok çalışma yapılmış ve yaklaşık 250 farklı bitki türünde *in vitro* androgenesis (erkek gametten haploid uyartımı) tekniğinden başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Bajaj 1983; George ve Sherrington 1984; Pierik 1989).

Hassawi ve Liang (1990), buğday ve triticales de yaptıkları çalışmada; çeşit, inkübasyon sıcaklığı ve çiçek tozu gelişim döneminin anter kültürü üzerine etkilerini araştırmışlardır. İnkübasyon sıcaklığının kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu üzerine fazla etkisi olmadığını fakat çiçek tozu gelişim dönemi ile çeşit interaksiyonun kallus oluşumunu önemli derecede arttırdığını bulmuşlardır.

Bu bulgular sonucu androgenesis oluşumu elde edildiğinden sonraki çalışmalar;

—teknik daha fazla geliştirmek,

—mikrospordan bitki eldesi için esas gerekli dış etmenlerin bulunması

—androgenesis oluşumuna neden olan mekanizmayı anlamak amacıyla yapılmıştır.

*Nicotiana*, *Tabacum* ve *Brassica* türlerinde moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik açıdan birçok araştırma ile haploid embriyogenesis mekanizması anlaşılmasına çalışıldı.

Kallus safhasının karışmadığı mikrospordan direkt embriyogenesisin yanı sıra dolaylı olarak yüksek etkinlik sağlayan mikrospor kültürü gelişim sistemlerinde uygulanabilirlik araştırıldı. Gametofik değişimlerden oluşacak embriyonik ihtiyaçların özel koşullar gerektirdiği ortaya kondu.

Anter kültüründe genotip sınırlandırmalarını gidermek için araştırmacılar daha yüksek yanıtta sahip hatları geliştirmek için çalışmışlardır. Yapılan genetik analizler göstermiştir ki androgenik yanıt yüksek oranda kalıtımı olan bazı karakterlerin genleri tarafından kontrol edilmektedir (Morigneux ve ark. 1994).

Bazı çalışmalarda da anter kültürüne yanıtta dominant genler tarafından kontrol edilen basit bir kalıtıma sahip özellik olarak bahsedilmektedir (Sheridon 1982; Petolina ve Thompson 1987; Barloy ve ark. 1989, Afele ve Konnenberg 1990). Hızlı genetik kazançla ilgili olan bu öneriler yanıtı düşük olan germplazma yanıtı yüksek olanlardan bu karakter transfer edilebilir.

Pescitelli ve ark. (1990), anterlerin izolasyonu tekniğinin, düşük sıcaklık uygulamasının ve sakaroz seviyesinin mısır bitkisinde mikrospor kültürüne etkisini araştırmışlardır. İzolasyon tekniğinde pensler yardımıyla kesilerek alınan anterlerin ezilerek alınan anterlere göre 3 kat daha fazla ELS elde edilebileceğini ortaya koymuşlardır. Ön

sıcaklık uygulaması (15<sup>0</sup>c de 4gün) yapılan mikrosporların ön sıcaklık uygulaması yapılmayanlara göre 2 kat daha fazla ELS edilebileceğini ve ayrıca en yüksek yanıt aldıkları sakaroz konsantrasyonun % 8–9.5 olduğunu yaptıkları çalışmalar ile ortaya koymuşlardır.

Afele ve Konnenberg (1990), iki mısır kendilenmiş hattında, DBTS (P<sub>1</sub>) ve B-73 (P<sub>2</sub>), onların F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>ve ilk generasyon geriye melezleri F<sub>1</sub> x DBTS (B<sub>1</sub>) ve F<sub>1</sub> x B-73 (B<sub>2</sub>) kullanarak in vitroda kültüre almışlardır. Bu generasyonlarda 3 farklı karakterin etkisini ölçmüşlerdir; anter yanıtı (%), embriyo sıklığı (%) ve anter verimliliği. Yapılan çalışmada P<sub>1</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> ve B<sub>1</sub> generasyonlarında embriyo sıklığı ve anter kültürüne yanıtta önemli fark olmadığı ancak P<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> generasyonlarında diğer generasyonlara oranla daha düşük yanıt aldıklarını belirtmişlerdir. fakat anter verimliliğinde F<sub>2</sub> generasyonun diğer generasyonlara oranla biraz daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Anter kültürü ile bitkilerin elde edilmesinden sonra uygun genler korunarak her anter kültürü seleksiyonu için uygun bir işlemdir ve yanıt düzeyinin artışı ile uygun genler toplanabilir (Petolina ve ark. 1988). Anter kültürüne yanıtın genetik temelini daha iyi anlamak ve uygun bitki rejenerasyonu için üç araştırmacı grubu kromozomal bölgeleri belirlemişlerdir. Ayrıca bu kromozomal bölgeler RFLP (restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi) analizi kullanılarak bunlarla ilişkili bölgeleri belirlenmiştir (Armstrong ve ark. 1992; Cowen ve ark. 1992; Wan ve ark. 1992).

Wan ve ark. (1992), Pa91 x FR16, H99 x Pa91 ve H99 x FR16 isimli üç mısır F<sub>1</sub> melezinden geliştirilen kallus ya da embriyo benzeri yapılardan RFLP analizi ile yapılan kromozomal inceleme sonucunda rejenere kallus oluşumu ile ilişkili görülebilecek 1, 2 (ikinci bölgeler), 3, 6 ve 8 olmak üzere kromozomlar üzerinde 6 kromozomal bölge belirlemişlerdir.

Bu bölgeler arasında ikinci kromozomun uzun kolunun en sonunda bir ve sekizinci kromozomun uzun kolunun üzerinde diğer bir bölge embriyo benzeri yapı oluşumu ile ilişkili görülebileceğini belirlemişler. Diğer dört bölge embriyo benzeri yapı ya da kallus oluşumunun biri ya da her ikisi ile ilişkili olabileceğini açıklamışlardır.

Bu raporlar bitki rejenerasyonu ya da anter kültürüne yanıt için önemli görülebilen bazı yaygın bölgelerle ilişkili görülmektedir. Birinci ve ikinci kromozomun üzerindeki

sentromere yakın bölgeler anter ve doku kültürü çalışmalarının her ikisinde de belirlenmiştir (Armstrong ve ark., 1992; Wan ve ark., 1992).

Üçüncü kromozom üzerindeki bölge üç araştırmacın hepsi tarafından belirlenmiştir. Armstrong ve ark. (1992) ile Cowen ve ark. (1992) her ikisinde 9 kromozom üzerindeki bölgenin bitki rejenerasyonu ve anter kültürüne yanıt için önemli olduğunu belirlemişlerdir.

RFLP analizleri mısırdaki anter kültürüne yanıtın ve kallus oluşumunun genetik temelini saptamada ve de önceki genetik çalışmalar ile uyumlu olmuştur (Sheridon 1982; Petolina ve Thompson 1987; Barloy ve ark. 1989; Afele ve Kannanber 1990). Anter kültürüne yanıtın bitki rejenerasyonunu izlemesi, yüksek derecede ilişkili olan bölgelerde anterlerin yanıtı ile genotiplerin kolay tanınmasına izin vermek için daha kesin haritalamaya ihtiyaç vardır. Düşük yanıt veren ya da hiç yanıt vermeyen genotiplere yüksek yanıtlı genotiplerden gen transferi, yanıtı bitki rejenerasyonu izlemesi olayını kolaylaştırabilmesi olasıdır.

Saisingtong ve ark. (1996), mısır bitkisinde anter kültürü süresince kolchisin kullanarak kromozom katlanması isimli çalışmalarında 5 – 1000 mg/L aralığında kolchisin eklenmiş besi ortamlarına 1–7 gün arasında  $^{14}C$  sıcaklık uygulamışlardır. En yüksek yanıtı ETH-M 36 isimli genotipten 250 mg/L de 7 günlük ön uygulamadan 9,9 dihaploid bitki /100 anter olacak şekilde elde etmişlerdir.

Petolino ve Thompson (1997), mısır bitkisinde anter kültürüne yanıtı 4 ticari hattın diallel melezlenmesinden elde olunan melezleri kullanarak in vitro da incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda genotipler arasında önemli farklılıklar gözlemlemişlerdir. Yapılan çalışmada H-99 x FR-16 ve PA-91 x FR-16 melezlerinin ebeveynlere oranla anter kültürüne daha yüksek yanıt verdiklerini ortaya koymuşlardır.

Zhongchen ve ark. (2000), anter kültürü ile haploid bitki üretiminin mısır bitkisinde saf hat elde etmede önemli bir araç olduğunu belirtmişlerdir. Bu doğrultuda 50 farklı kombinasyondan 200 ün üzerinde saf hat elde etmişlerdir. Buna ekolarak bunların melez kombinasyonlarından bazılarını tarımsal üretimde kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarında haploid bitki eldesinde kullandıkları besi ortamlarından en fazla yanıt aldıkları ortamın bileşiminde 2 mg/L 2,4-D, % 0.5 lik aktif karbon, 500 mg/L kazein hidrolizat, 0.2 mg/L TIBA ve % 15 sakaroz eklenmiş N-6 besi ortamı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca haploid tekniğini

kullanarak ıslah süresinin büyük oranda kısalacağını çünkü melez çeşit ıslahında gerekli saf hatların bir yıl içinde elde edilebileceğini ortaya koymuşlardır.

Korkut ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada yerli ve yabancı ekmeklik buğday çeşit ile hatlarında haploid ve dihaploid elde edilme olanaklarını araştırmışlardır. Ekmeklik buğday genotiplerinin kallus, albino ve yeşil bitki yanıtlarını düşük bulmuşlardır. 25 genotipten 23 ü kallus geliştirmiş. Bunlardan 3 tanesinde hiçbir organogenesis görülmemiş, 20 tanesinde ise organogenesis görülmüştür. 20 genotipin 15 inden ise yeşil bitki elde etmişlerdir.

İzleyen yıllarda mısır bitkisinin kültüre alınan anterlerinde dihaploid bitki rejenerasyonları sayısını arttırabilecek en etkili kromozom katlama yöntemlerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Kromozom katlama çalışmalarında kolkhisin ve pronamid kullanılmış olup, 0, 125, 250, 500, 1000 mg/l kolkhisin ve 0, 2,5, 5, 10, 20 ve 40 µM pronamid uygulanarak her bir konsantrasyonda 3, 5 ve 7 gün süreyle tutulmuştur.

“Kolkhisin uygulamasında en yüksek kromozom katlaması % 35,3 ile 125 mg/l konsantrasyonda 3 günlük uygulamadan alınmıştır. Pronamid ise % 34,8 ile 20 µM konsantrasyonda yine 3 günlük süreden alınmıştır (Wan ve ark. 2003).

Mısır bitkisinde yapılan diğer bir çalışmada anter kültüründe kolkhisinin embriyo üretimi ve dihaploid üzerine etkisidir. Bu amaçla MS ve YPU besi ortamları kullanılmış ve ön uygulama olarak 0, 100, 200, 300, 400 mg/l olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda kolkhisin, 0, 3, 6, 9 gün olmak üzere uygulanmıştır. Ardından anterler kolkhisin içermeyen indüksiyon ortamına alınmış, sonuç olarak 250 mg/l konsantrasyonunda 6 gün tutulan anterlerden en yüksek yanıt alınmıştır (Mohommodi, Moieni ve Jajali-Javaran 2007).

Widholm ve ark. (2008) mısır bitkisinde kallus oluşumu ve anter kültürüne yanıtta kromozomal bölgelerin RFLP analizi ile belirlenmesi isimli çalışmalarında, RFLP analizinde 3 F<sub>1</sub> hattından (PA-91 x FR-16, PA-91 x H-99, H-99 x FR-16) elde edilen kalluslar kullanılmıştır. PA-91 ve FR-16 melezlerinde kromozomlar üzerlerinde yaptıkları RFLP analizi sonucunda 8 kromozomal bölge elde etmişlerdir. Bunlar 1., 2.(2 bölge), 3., 6. ve 8. kromozom üzerinde kallus oluşumundan ELS ye dönüşümü sağlayan 8 bölge bulmuşlardır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri bölümü tarafından geliştirilmiş kendilenmiş hatlar S-6 kendileme generasyonuna kadar geliştirilmiş, yurtdışı ve yurt içinden toplanan atdışi mısırlardan silaj amaçlı geliştirilen mısır hatları materyal olarak kullanılmışlardır. Bu şekilde geliştirilen 7 kendilenmiş hat kullanılmıştır. Kullanılan kendilenmiş hatların isimleri Çizelge 3.1.1. de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1. Kullanılan hatlar

SM-47
SM-14
SM-53
SM-147
SM-195
SM-204
SM-201
SM-259
SM-293
SM-132
SM-107
SM-138

Anter kültürüne yanıtın aynı türler arasındaki genotipler arasında bile farklılık gösterdiği durumlarda ortak besi ortamı önerimi zordur. Bunun için çalışmamızda N-6, MS, YPI, P II besi ortamları ile bu ortamların 2,4-D, IBA, NAA ve kinetin hormonları ile desteklenmiş 5 farklı ortam kullanılmıştır. Kullanılan besi ortamları ve bu ortamların içeriği Çizelge 3.1.2. ve Çizelge 3.1.3. de verilmiştir.

Çizelge 3.1.2. Kullanılan besi ortamları

1	YPI 2,4-D + IBA
2	MS 1 2,4-D + NAA
3	MS 2 IBA + Kinetin
4	N 6 2,4-D + NAA
5	P II IBA + Kinetin

Çizelge 3.1.3. Kullanılan besi ortamları ve bileşimleri

Besi ortamı	YPI	N-6	MS-1	P II	MS-2
Bileşik	mg/l				
KNO <sub>3</sub>	2,500	2,830	1900	1000	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165	-	1650	200	1650
CaCl <sub>2</sub>	176	166	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	510	400	170	300	170
MgSO <sub>4</sub>	370	185	370	200	370
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	-	463	-	200	-
ZnSO <sub>4</sub>	8.6	1.5	8.6	3	8.6
KI	0.83	-	0.83	0.5	0.83
MnSO <sub>4</sub>	22.3	4.4	22.3	8	22.3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	1.6	6.2	3	6.2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.25	-	0.25	-	0.25
CuSO <sub>4</sub>	0.025	-	0.025	-	0.025
CoCl <sub>2</sub>	0.025	-	0.025	-	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	37.3	37.3	20	37.3
FeSO <sub>4</sub>	27.8	27.8	27.8	-	27.8
Thiamine HCL	0.5	-	-	1	-
Myo-Inositol	100	-	100	100	100
2,4-D	1	1	-	-	1
IBA	1	-	1	1	1
NAA	-	2	1	-	-
Kinetin	-	-	-	1	1
Sakaroz	120,000	40,000	30,000	30,000	30,000
PH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

## 2.Yöntem

Kendilenmiş mısır bitkilerine ait tohumlar Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi deneme alanına mısır bitkisi ekim sezonunda el ile ekilmiştir. Her hat iki sıra elle ekilmiş olup, sıra arası 70 cm, sıra üzeri bitkiler arası 25 cm tutulmuştur. Parsel uzunluğu 5 m olarak alınmıştır. Böylece, her sırada 21 bitkinin yetişmesi sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan mısır hatlarındaki ekim, bakım ve gübreleme işlemleri diğer mısır tarlalarındaki gibi uygulanmıştır.

Anter kültürü çalışması, 12 mısır genotipi ve 5 besi ortamında denemeye alınmıştır. Çalışma 3 tekrarlı olarak, tesadüf parsellerinde bölünmüş parseller deneme desenine göre laboratuvar koşullarında yürütülmüştür. Çalışmamızda 5 besi ortamı ana parsellerde, 12 genotip ise alt parsellerde yer almıştır.

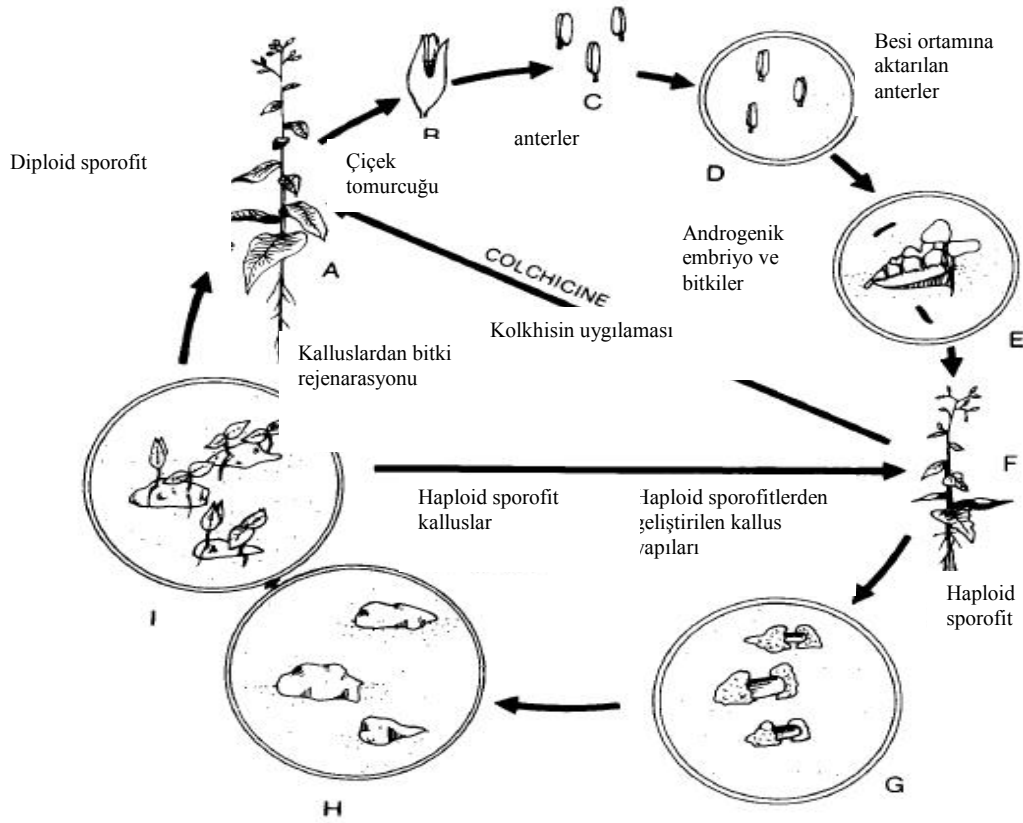


### 3.2.1. Anter kültürü

Anter kültürü esas olarak; içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulunduran anterlerin, tomurcuklarından ayrılarak in vitro koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesi olayına verilen isimdir. Haploid embriyogenesisi arttıran en etkili faktör erkek bitkinin gametofik dokusudur.

Anter kültürü temel prensibi, normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polen tanesinin gametik gelişme yönü; henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmekte ve böylece '*mikrospor androgenesis*' veya sadece '*androgenesis*' olarak adlandırılan oluşum gerçekleşmektedir. androgenesiste en zor oluşum gametofik safhadan sporotifik safhaya geçiştir.

Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler, anter kültürü için uygun başlangıç materyalidir. Mısır bitkisi monoik bir bitki olup dişi ve erkek çiçekler aynı bitkide fakat farklı yerlerde dir. Bizim yararlanacağımız kısım mısır bitkisindeki anterler olup, karışık salkım çiçek durumunda gövde ucundaki erkek çiçek kavuzlarının içinde yer almakta ve her bir erkek çiçek üç anter içermektedir. Başlangıç materyali olarak kullanılacak ve birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler ise bitkide morfolojik olarak, tepe püskülünün çıkmasına yakın dönemde üst yapraklar tarafından sarılmış halidir. Şekil 3.2.2.1. de anter kültürüne ait şemalar görülmektedir.



Şekil 3.2.1.1. Anter kültürü akış şeması (Bohajvani ve Razdan 1996)

Anter kültürü, polen oluşumu sırasında anterlerin çiçek tomurcuklarından çıkarılıp steril koşullarda besi ortamına aktarılması ile başlar. Anterler bu kültür ortamında mitoz bölünme ile gelişirler. Anter kültürü çalışmasının diğer in vitro haploid bitkilerde etme tekniklerine göre avantajı, bir anter içerisinde çiçek tozlarının bulunması ve uygun bir in vitro kültür sistemi ortaya konulabildiğinde bir anterden çok daha fazla sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir.

Anter kültürü çalışmasında kullanılan başlıca evreler; donor(verici) bitkinin seçilmesi, çiçek tozu gelişim dönemi, önsoğuk uygulanması ve sterilizasyon işlemleri, besi ortamlarının hazırlanması, anterlerin besi ortamına aktarılması ve anterlerin inkübasyonudur. Bu devreler alt başlıklar halinde tek tek açıklanmıştır.

### 3.2.1.1. Verici (donor) bitkinin seçilmesi

Yaptığımız çalışmanın ilk aşamasını verici bitkilerin seçimi oluşturmaktadır.

Verici bitkinin gücü ve yetiştirme koşulları anter kültürüne yanıtta oldukça etkilidir. Güçlü gelişen bitkiler zayıf gelişen bitkilerden daha yüksek yanıt vermekte ve iyi uyumlu genotipler arasında bile, iyi yanıt vermede günden güne ve bitkiden bitkiye değişimin olduğu belirlenmiştir.

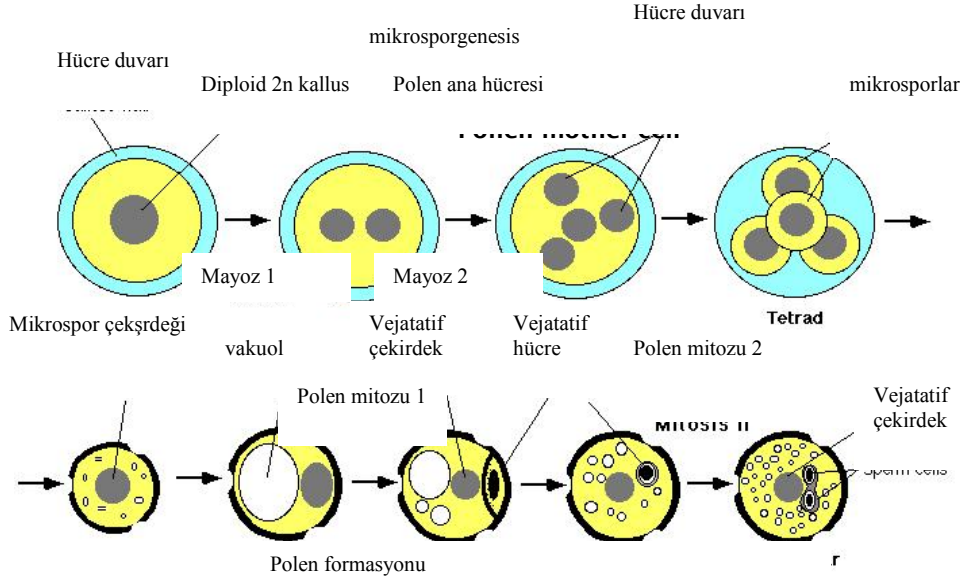
Yaptığımız araştırmada ise, genotiplerin bulunduğu her sıradaki bitkiler sürekli olarak gözlemlenmiş ve her sıradan en iyi gelişim gösteren bitkiler verici olarak seçilmiştir.

### 3.2.1.2. Çiçek tozu gelişim dönemi

*In vitro* androgenesisin başarıyla uyartılmasında etkili olan en önemli faktörlerden birisi, anterlerin donor bitkiden izole edildiği anda mikrosporların içindeki buldukları gelişme dönemidir. Mısır ve diğer birçok bitkide en iyi sonuçlar, tek çekirdekli mikrospor erken aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerden alınmaktadır. Mikrosporlar içerisinde nişasta depolamaya başladıktan sonra, gelişmeyi sporotifik yöne kaydırmak ve haploid embriyo elde etmek için yapılacak uyarılar etkili olamamaktadır. Anterlerin içindeki mikrosporların gelişme dönemi sitolojik gözlemlerle belirlenmektedir.

Mikrospor gelişme aşaması asetokarmin ile hızlı boyama ile saptanabileceği gibi, patates ve kolzada olduğu gibi kalın bir polen duvarı söz konusu ise, bir gece tespit çözeltilisinde bekletmenin ardından asetokarmin ile boyama yöntemi kullanılarak da belirlenebilir. Ayrıca floresans mikroskobu ve preparat hazırlanmasında buna uygun merkürük asit, DAPI gibi boyaların kullanılması ile çok çabuk ve mikrospor çekirdeklerinin çok net bir şekilde görülmesi olasıdır. Floresans boyalarla yapılan boyama, hem mikrosporgenezis aşamalarının tam olarak ortaya konması ve hem de laboratuarda iş akışı içerisinde hızla gözlem yapılabilmesini sağlar.

Mısırdaki anter kültürüne alınan mikrospor hücrelerinin stoplazmasında yer alan ribozomlar düşük yoğunluktadır. İlk yapısal değişim ön hücresel seviyede yani nükleer kromatinlerin yoğunlaşmaya başladığı dönemdir. Çekirdeğin sahip olduğu bu özel iplikli komponentler nadir olarak bulunsa da düşük yoğunluktaki ribozomlar ile 2–3 kat fazla sayıda artan çekirdeksel açıklıkların birinci polen mitozunun hemen öncesinde görülen yapısal değişimler olduğu bilinmektedir.



Şekil 3.2.1.2.1. Mikrosporgenezis (S. S. Bohajvani ve N. K. Razdan, 1996)



Resim 3.2.1.2.1. Erken univalent safhadaki tepe püskülü (orjinal)

Bu sonuçlar göstermiştir ki bu devrede sporotifik gelişmeler için normal gametofitik gelişimde mikrospora geçiş için en uygun dönemdir. Resim 3.2.1.2.1. de erken ünivalent safhadaki mısır bitkisine ait tepe püskülleri ve resim 3.2.1.2.2. Erken univalent dönemde tarlada mısır bitkisi görülmektedir.

Morfolojik olarak univalent dönemdeki mikrosporların bulunduğu dönemde tepe püskülü bitki sapı üzerindeki yapraklar içerisinde lokalize olmuş ve henüz çıkmamışken sabah 7-9 yada öğleden sonra 4-6 saatlerinde, yani anterlerdeki çiçek tozları erken ünivalent dönemde iken tepe püskülünü saran yapraklar ile kesilerek alınmıştır (Change ve Neufteer 1989). Bu dönemde genellikle anterler parlak sarı olmakla beraber kendiliğinden açan hafif sarı anterlerin pozitif sonuç vermediği de gözlenmiştir (Genovesi 1990).





Resim 3.2.1.2.2. Tek çekirdekli dönemde tarlada mısır bitkisi (orjinal)

### 3.2.1.3. Ön soğuk uygulaması ve sterelizasyon

Çiçek tomurcuklarına yapılan bazı ön uygulamalar, mikrosporların kültür sırasındaki gelişmesi üzerine olumlu etki yapmaktadır. Anter kültüründe en etkili ön uygulama, tomurcuklara yapılan soğuk şoklardır. 4-10C° ler arasında, 72 saat ile 4 haftaya kadar tutulan tomurcuklar, polen rejenerasyonu bakımından olumlu yanıtlar vermiştir (arpa: Sunderland ve ark. 1981; patates: Wenzel ve Uhrig 1981; mısır: Genovesi ve Collins 1982; buğday: Lazar ve ark. 1985; biber: Morrison ve ark. 1986). Mısırdaki anter kültürü uygulamaları üzerine bütün

yayınlar yüksek yanıt için önemli olan ön soğuk şoklamasından önce erken ünivalent devredeki mikrosporlara seleksiyon yapılması gerektiğini göstermektedir.

Abiotik stresin çok önemli bir rolü androgenik indüksiyon ilk olarak tütünde uygulandı (Ducken ve Heberle-Bors 1976; Heberle-Bors ve Reinert 1981). Monokotiledon ve dikotiledon bitkilerin her ikisinde de düşük ve yüksek sıcaklık şokları indüksiyonun erken safhasında ön uygulama olarak kullanılmış olup uygun protokoller geliştirilmiştir.

Donor bitkilerden alınan tepe püsküllerine yapılacak ön soğuk uygulaması, sporofit gelişmenin alternatif programı için mikrosporların doğrudan bir gametofitik gelişme olan gelişme programına çevirmek için oldukça önemlidir (Genovesi ve Collins 1982).

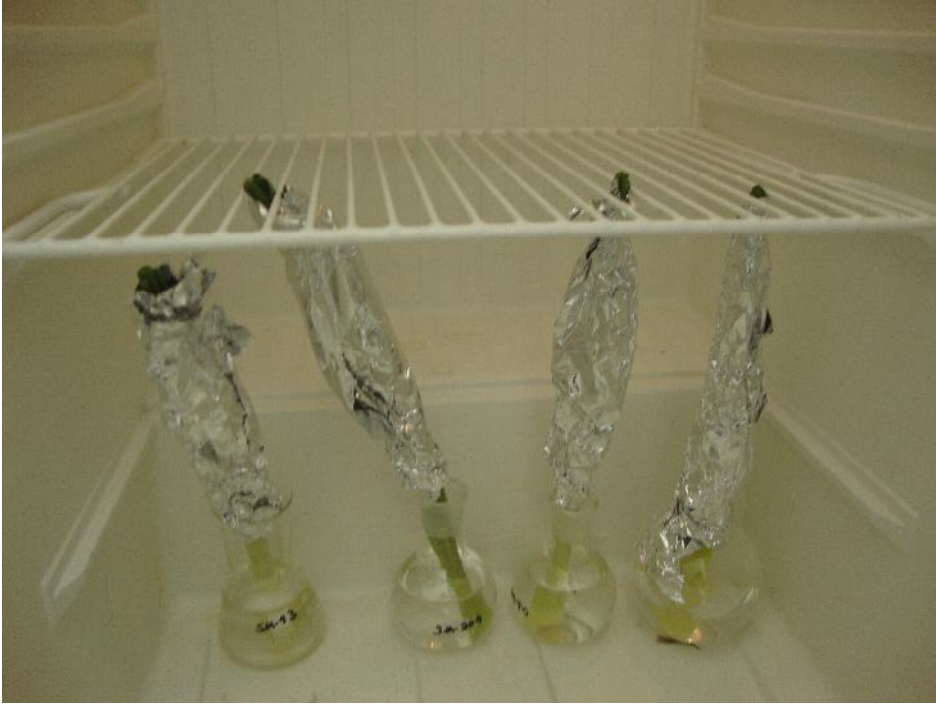
1990 ların başında tahıl androgenesisi 4°C-7°C olarak 3-4 hafta arpanın androgenik indüksiyonunda kullanılmıştır (Olsen 1987; Ziauddin ve ark. 1990; Medhorit ve Lörz 1993; Scott ve Lyne 1994; Evas ve Betty 1994; Solmankallio- Motilla ve ark. 1995).

Buğday da ön soğuk uygulaması 1 haftanın üzerinde uygulanmıştır (Gustafson ve ark. 1995; Redho ve ark. 1995). Aynı şekilde triticale (Slusar ievciz -Jerzino ve Panitka 1997; Meciniok ve ark. 2008; Gonzales ve ark.- Jouve 2000; Immonen ve Robinson 2000; Tuveson ve ark. 2003; Wedzony ve ark. 2003) ve çavdarda (Immonen ve Antilla 2000; Immonen ve Tenhola-Roinian 2003) benzer uygulamalar yapılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Androgenik etkiyi geliştirmek için mısır bitkisinde ön soğuk uygulamaları 7°C olarak tepe püskülüne uygulanmış ve başarı sağlanmıştır (Barnabas et al. 2003a). Ayrıca bunun yerine ön uygulamada sıcaklığı 14°C olarak ayarlayıp, besi ortamının içine mannitol koyarak da başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Nogeli ve ark. 1999; Zhang ve ark. 2003).

Bu bilgiler ışığında, melez mısır ıslah programındaki parsellerdeki bitkilerden alınan tepe püskülleri ön soğuk uygulaması yapılması amacıyla içinde su bulunan kaplara konmuş ve üzerleri ışık almasını engellemek amacıyla alüminyum folyo ile hafifçe kapatılmıştır.

Bu aşamadan sonra materyaller Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümüne ait dolaplara konularak 7°C de 7-10 gün süreyle ön soğuk uygulamasına tabi tutulmuşlardır (Resim 3.2.1.3.1.).



Resim 3.2.1.3.1. Ön soğuk uygulaması yapılan tepe püskülleri (orjinal)

Anter kültüründe ön soğuk uygulamasının önemli etki yapmasının en önemli nedeni; nişasta birikiminin bloke edilerek, tek çekirdekli mikrospor döneminde tutulan mikrospor sayısının artırılması, anter duvarlarının yaşlanmasının geciktirilmesi ve absisik asit gibi bazı engelleyici maddelerin azaltılmasıdır (Arias 2000).

Bu uygulamalardan sonra tepe püskülleri Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlem için tepe püsküllerini saran yapraklar uzaklaştırılmıştır.

Ardından tepe püskülleri içinde 2–3 damla Twin–80 bulunan % 2 lik sodyum hipoklorit solusyonunda 15 dakika süreyle çalkalanarak yüzey sterilizasyonu işlemi yapılmıştır (Resim 3.2.1.3.2.). Daha sonra bu tepe püskülleri steril kabin içinde steril su ile 3 kez durulanmıştır (Barnabas, 2003a).





Resim 3.2.1.3.2. Anterlerin %2 lik sodyum hipoklorit ile sterilizasyonu ve durulanması (orjinal)

#### 3.2.1.4. Besi ortamlarının hazırlanması

Anter kültüründe genel olarak ilk aşamada gametofik dokuları sporifik gelişmeye dönüştürme yönünde uyaracak oksinler gerekli iken; bitkiciğe dönüşüm aşamasında sitokininlerin varlığına gerek duyulur. Mısır bitkisinde anter kültürü çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan oksinler; IBA, NAA ve 2,4-D dir. Sitokinin kaynağı olarak ise genellikle kinetin kullanılmaktadır (Şahin 2009).

Bizde bu amaçla çalışmamızda, MS 1 sıvı ortamına 1 mg 2,4-D + NAA ilavesi, N 6 sıvı ortamına 2 mg NAA ve 1 mg 2,4-D, MS 2 sıvı, P II sıvı ortamlarına 1 er mg IBA ve Kinetin, YPI ortamına 2,4-D ve IBA ilave edilerek Ph 5.8 e ayarlanmıştır.

Besi ortamları labaratuvar koşullarında 0,001 hassas terazi kullanılarak bileşiklerden stoklar hazırlanmıştır. Daha sonra stoklar ile besi ortamları hazırlanmış ve hazırlanan besi ortamları otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilize edilen sıvı besi ortamları sterilize edilen kaplarda bırakılarak anterlerin aktarılması esnasında daha önceden steril edilen (180<sup>0</sup>c de 2saat) petri kaplarına dökülmüştür. Petri kaplarının boyutuna göre her petri kabına ortslms 30 adet mısır bitkisi anteri aktarılmıştır.

### 3.2.1.5. Anterlerin Besi Ortamına Aktarılması

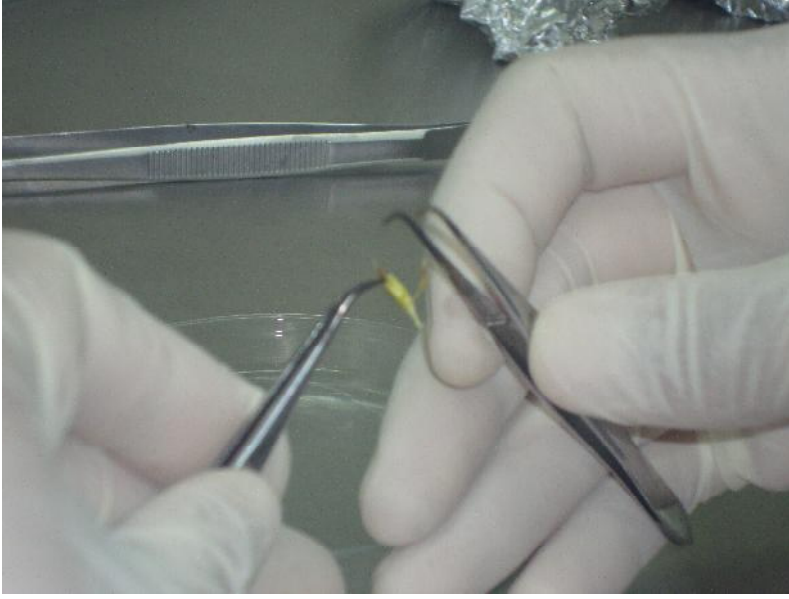
Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler, anter kültürü için uygun başlangıç materyalidir. Bu safhadaki anterleri içeren ve daha önce steril hale getirilmiş tepe püsküllerinin içerdiği tomurcukların içerisinde çıkarılan anterler önceden hazırlanmış ve otoklavlanarak steril hale getirilmiş besin ortamlarının üzerine yerleştirilmiştir (Resim 3.2.1.5.1.).

Anterlerin tomurcuk içerisinde çıkarılması sırasında ezilmemesine ve filamentlerinin, anterle birleştiği noktadan kesilerek uzaklaştırılmasına dikkat edilmiştir.

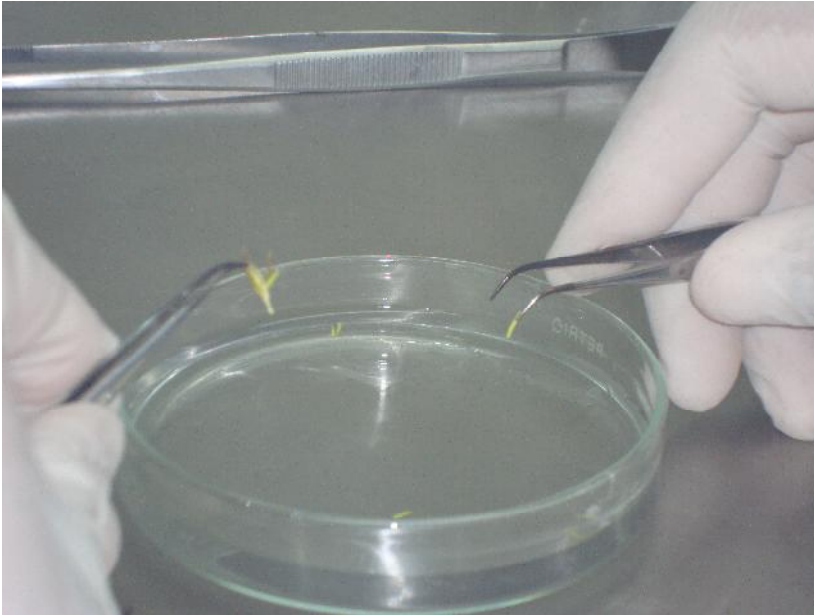
Petri kaplarında katı, yarı katı ve sıvı olarak hazırlanmış ve önceden otoklovlanarak steril olan besin ortamlarına 30 adet olacak şekilde anterler aktarılmıştır. Aktarım işlemi bitiminde petri kaplarının kenarları parafilm ile kapanarak herhangi bir enfeksiyona karşı, dış ortamdaki atmosferle olan ilişki kesilmiştir.



Resim 3.2.1.5.1. Besi ortamlarının petri kaplarına aktarımı (orjinal)



Resim 3.2.1.5.2. Anterlerin kavuzlarından ayrılması (orjinal)



Resim 3.2.1.5.3. Anterlerin besi ortamına aktarımı (orjinal)

### 3.2.1.6. Anterlerin inkubasyonu

Anterlerin aktarılması tamamlandıktan sonra anterlerin konulduğu petri kapları 28°C sıcaklıkta ayarlanan inkübatöre konarak karanlıkta bırakılmıştır. Bu aşamadan sonra gelişme iki farklı doğrultuda seyredebilmektedir; ya doğrudan embriyo oluşumu gerçekleşmekte ve 6–8 hafta içerisinde toprağa transfer edilebilecek gelişme düzeyine ulaşmış bitkiler elde edilebilmekte; ya da haploid kallus dokusu oluşmakta ve kallustan bitki rejenerasyonu yoluna gidilmektedir. Bunlardan ilkinde direkt androgenesis ikincisine ise indirekt androgenesis denir. Bizim çalışmamızda yaklaşık 5 hafta süresince anterlerden kallus gelişimi yani indirekt androgenesis izlenmiştir.



Resim 3.2.1.6.1. Anterlerin 28°C de ikübasyonu(orjinal)

### 3.2.2. Biyometrik değerlendirme

Yaklaşık 5 hafta sonunda elde edilen kallusların sayımları yapılmıştır. Sonuçları incelediğimizde, kallus sayılarının normal dağılım göstermediği görülmüştür. Varyans analizinden önce sayım sonuçlarının normal dağılım göstermediği durumlarda bazı matematiksel işlemler sonucu değişkenler normal dağılıma yaklaştırılabilirler. Varyans analizlerinin temel varsayımlardan birinin veya bir kaçının geçerli olmadığı durumlarda, uygulanacak normal varyans analizi metodlarının hassasiyeti zayıftır. Böyle durumlarda uygulanacak transformasyonlar yardımıyla geçerli olmayan varsayımlar geçerli kılınır. Ancak uygulanacak bir transformasyonla bütün varsayımların düzeltilmesi beklenemez. Çalışmamızda Sokal ve Rohlf tarafından (1969) önerilen yöntemlere göre transformasyonlar yapılmıştır. En çok uygulanan dönüştürmeler karekök ve kogaritma transformasyonlarıdır.

Transformasyonlar yapıldıktan sonra, bütün testler veya güven sınırları bu yeni değere göre bulunur. Transformasyonlar, bazı durumlarda normal dağılım göstermeyen değişkenler, bazı matematiksel işlemler sonucu normal dağılım şekline yaklaştırılabilirler.

Çizelge 3.2.2.1. Orijinal kallus sayıları istatistikleri

Ortalama	14.164166
Standart Sapma	4.4513978
Ortalamanın Standart Hatası	0.3317876026
Üst % 95 Ortalama	14.82110545
Alt % 95 Ortalama	13.507226
N	180

Çizelge 3.2.2.2. Kullanılan besi ortamlarına göre genotiplerin oluşturduğu orjinal kallus sayıları

Ana parsel	Alt parsel	Tekerrür			Ortalama
		1	2	3	
MS-1 (2,4-D + NAA)	SM-47	21.00	1.00	17.64	13.213
	SM-14	25.00	38.44	32.00	31.813
	SM-53	21.00	38.44	16.00	25.146
	SM-147	42.00	0.00	41.00	27.666
	SM-195	41.00	32.00	0.00	24.333
	SM-204	41.00	32.00	0.00	24.333
	SM-201	28.00	0.00	16.00	14.666
	SM-259	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-293	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-132	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-107	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-138	0.00	0.00	0.00	0.00
	MS-2 (IBA + Kinetin)	SM-47	29.00	49.00	50.97
SM-14		25.00	29.00	16.00	23.333
SM-53		70.00	81.00	27.60	59.533
SM-147		21.00	12.96	54.30	29.420
SM-195		31.13	67.50	25.00	41.210
SM-204		31.00	21.00	25.00	25.666
SM-201		21.00	40.96	25.00	29.986
SM-259		0.00	0.00	0.00	0.00
SM-293		0.00	0.00	0.00	0.00
SM-132		0.00	0.00	0.00	0.00
SM-107		0.00	0.00	0.00	0.00
SM-138		0.00	0.00	0.00	0.00
YPI(2,4-D + IBA)		SM-47	65.00	65.00	65.00
	SM-14	12.96	25.00	9.00	15.653
	SM-53	73.00	81.00	70.90	74.966
	SM-147	21.00	16.97	21.00	19.656
	SM-195	25.00	21.00	22.00	22.666
	SM-204	25.00	21.00	22.00	22.666
	SM-201	25.00	16.00	29.00	23.333
	SM-259	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-293	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-132	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-107	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-138	0.00	0.00	0.00	0.00
	N-6 (2,4-D + NAA)	SM-47	0.00	0.00	26.00
SM-14		27.96	34.28	4.00	22.080
SM-53		49.00	67.50	61.00	59.166
SM-147		0.00	27.66	6.00	11.220
SM-195		40.96	16.97	0.00	18.313
SM-204		33.00	16.97	4.97	18.313
SM-201		16.97	26.00	0.00	14.323
SM-259		0.00	0.00	0.00	0.00
SM-293		0.00	0.00	0.00	0.00
SM-132		0.00	0.00	0.00	0.00

	SM-107	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-138	0.00	0.00	0.00	0.00
P II (IBA + Kinetin)	SM-47	0.00	41.50	4.97	15.49
	SM-14	2.23	9.00	4.00	5.076
	SM-53	6.40	0.00	12.96	6.453
	SM-147	0.00	0.00	6.00	2.000
	SM-195	12.96	6.00	0.00	6.200
	SM-204	12.96	6.00	4.97	7.976
	SM-201	0.00	0.00	10.95	3.650
	SM-259	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-293	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-132	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-107	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-138	0.00	0.00	0.00	0.00

### 3.2.2.1. Karekök transformasyonları

Bu transformasyonlar, sayımla elde edilmiş verilerin, varyans analizine uygun hale getirilmesi amacıyla uygulanır. Bu durumda populasyon 'poisson' dağılışı tipindedir. Sayılarak elde edilen veriler genellikle poisson dağılışı gösterirler.

Bu tip dağılım gösteren verilerde varyansı stabil hale getirmek için karekök dönüştürmesi yapılmalıdır. 'poisson dağılışı' gösteren verilerde en uygun transformasyon tipi, karekök transformasyonlarıdır.

Bunlara varyans analizi uygulanmaz. Bu gibi gözlemlere varyans analizi uygulanması için bunların normal dağılıma dönüştürmeleri gerekir. Bu dönüşüm yöntemleri karekök ü alınmak suretiyle yapılmaktadır (Çizelge 3.2.2.1.2.). Ancak bu transformasyonu kullanmak için dağılımın mutlaka poisson dağılımı göstermesine gerek yoktur. Eğer uygulanan karekök transformasyonu varyansı stabil hale getiriyorsa dağılımın poisson olup olmadığına bakılmaksızın karekök transformasyonu uygulanabilir (Çizelge 3.2.2.1.1.).

Çizelge 3.2.2.1.1. Karekök transformasyonu istatistikleri

Ortalama	3.032388
Standart Sapma	1.547941472
Ortalamanın Standart Hatası	0.115376745
Üst % 95 Ortalama	3.260833908
Alt % 95 Ortalama	2.8039420292
N	180

Çizelge 3.2.2.1.2. Kullanılan besi ortamlarına göre genotiplerin oluşturduğu kallus sayılarının karekök transformasyonuna göre değerleri

Ana parsel	Alt parsel	Tekerrür			Ortalama	Orijinal Kallus Değerleri
		1	2	3		
MS-1 (2,4-D + NAA)	SM-47	4.58	1.00	4.20	3.260	13.213
	SM-14	5.01	6.20	5.67	5.626	31.813
	SM-53	4.58	6.20	4.00	4.926	25.146
	SM-147	6.49	1.00	6.40	4.630	27.666
	SM-195	6.40	5.67	1.00	4.356	24.333
	SM-204	6.40	5.67	1.00	4.356	24.333
	SM-201	5.33	1.00	4.00	3.443	14.666
	SM-259	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-293	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-132	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-107	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-138	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	MS-2 (IBA + Kinetin)	SM-47	5.38	7.00	7.14	5.173
SM-14		5.00	5.38	4.00	4.793	23.333
SM-53		8.42	9.00	5.26	7.560	59.533
SM-147		4.58	3.60	7.37	5.183	29.420
SM-195		5.58	8.22	5.00	6.266	41.210
SM-204		5.38	4.58	5.00	4.986	25.666
SM-201		4.58	6.40	5.00	0.829	29.986
SM-259		1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
SM-293		1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
SM-132		1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
SM-107		1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
SM-138		1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
YPI(2,4-D + IBA)		SM-47	8.06	8.06	8.06	8.060
	SM-14	3.60	5.00	3.00	3.866	15.653
	SM-53	8.54	9.00	8.42	8.646	74.966
	SM-147	4.59	4.12	4.58	4.430	19.656
	SM-195	5.00	4.58	4.69	4.756	22.666
	SM-204	5.00	4.58	4.69	4.756	22.666
	SM-201	5.00	4.00	5.38	4.793	23.333
	SM-259	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-293	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-132	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-107	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-138	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	N-6 (2,4-D + NAA)	SM-47	1.00	1.00	5.10	2.366
SM-14		5.26	3.78	2.00	3.680	22.080
SM-53		7.00	8.22	7.81	7.946	59.166
SM-147		1.00	5.26	2.45	2.903	11.220
SM-195		6.40	4.12	1.00	3.840	18.313
SM-204		5.74	4.12	2.23	4.030	18.313
SM-201		4.12	5.10	3.31	4.176	14.323
SM-259		1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
SM-293		1.00	1.00	1.00	1.00	0.00



	SM-132	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-107	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-138	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
PII (IBA +Kinetin)	SM-47	1.00	6.44	2.23	3.223	15.49
	SM-14	2.23	3.00	2.00	2.410	5.076
	SM-53	6.40	1.00	3.60	3.666	6.453
	SM-147	1.00	1.00	2.45	1.483	2.000
	SM-195	3.60	2.45	1.00	2.50	6.200
	SM-204	3.60	2.45	2.23	2.760	7.976
	SM-201	1.00	1.00	3.31	1.770	3.650
	SM-259	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-293	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-132	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-107	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	SM-138	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00

### 3.2.2.2. Logaritma transformasyonları

Ölçüm ile elde edilmiş verilerde varyanslar muamele ortalamalarının kareleriyle orantılı oldukları zaman varyansları stabil hale getirmek için logaritmik transformasyonları kullanılır. Bu daha çok çarpık dağılım gösteren populasyonlar için uygun bir dönüştürmedir. Yani dağılımı normal dağılıma dönüştürmek için gereklidir. Sağa yatık bir dağılım gösteren verilere logaritmik bir transformasyon uygulandığında dağılımın simetriye yaklaştığı görülür. Negatif değerli verilere logaritmik transformasyon uygulanmaz. Verilerde 10 dan küçük değerler varsa  $\log(1+x)$  transformasyonu kullanılır (Çizelge 3.2.2.2.1., 3.2.2.2.2.).

Çizelge 3.2.2.2.1. Logaritma transformasyonu istatistikleri

Ortalama	0.66450000
Standart Sapma	0.8452654021
Ortalamanın Standart Hatası	0.06300236327
Üst % 95 Ortalama	0.7892446802
Alt % 95 Ortalama	0.5397553198
N	180

Çizelge 3.2.2.2.2. Kullanılan besi ortamlarına göre genotiplerin oluşturduğu kallus sayılarının logaritma transformasyonuna göre değerleri

Ana parsel	Alt parsel	Tekerrür			Ortalama	Orijinal Kallus Değerleri
		1	2	3		
MS-1 (2,4-D + NAA)	SM-47	1.32	0.00	1.24	0.853	13.213
	SM-14	1.39	1.58	1.50	1.490	31.813
	SM-53	1.32	1.58	1.20	1.366	25.146
	SM-147	1.63	0.00	1.61	1.080	27.666
	SM-195	1.61	1.50	0.00	1.036	24.333
	SM-204	1.61	1.50	0.00	1.036	24.333
	SM-201	1.44	0.00	1.20	0.813	14.666
	SM-259	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-293	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-132	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-107	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-138	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	MS-2 (IBA + Kinetin)	SM-47	1.46	1.69	1.70	1.616
SM-14		1.39	1.46	1.20	1.350	23.333
SM-53		1.84	1.90	1.44	1.726	59.533
SM-147		1.32	1.11	1.73	1.386	29.420
SM-195		1.49	1.83	1.41	1.576	41.210
SM-204		1.49	1.32	1.41	1.406	25.666
SM-201		1.32	1.61	1.41	1.446	29.986
SM-259		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SM-293		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SM-132		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SM-107		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SM-138		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
YPI(2,4-D + IBA)		SM-47	1.81	1.81	1.82	1.813
	SM-14	1.11	1.40	1.00	1.170	15.653
	SM-53	1.86	1.90	1.85	1.870	74.966
	SM-147	1.32	1.23	1.32	1.290	19.656
	SM-195	1.39	1.32	1.34	1.350	22.666
	SM-204	1.39	1.32	1.34	1.350	22.666
	SM-201	1.39	1.23	1.46	1.360	23.333
	SM-259	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-293	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-132	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-107	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-138	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	N-6 (2,4-D + NAA)	SM-47	0.00	0.00	1.41	0.470
SM-14		1.44	1.15	0.60	1.063	22.080
SM-53		1.69	1.83	1.78	1.766	59.166
SM-147		0.00	1.44	0.84	0.760	11.220
SM-195		1.61	1.23	0.00	0.946	18.313
SM-204		1.51	1.23	0.77	0.390	18.313
SM-201		1.23	1.41	0.00	0.880	14.323
SM-259		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

	SM-293	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-132	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-107	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-138	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P II (IBA + Kinetin)	SM-47	0.00	1.61	0.77	0.793	15.49
	SM-14	0.50	1.00	0.70	0.733	5.076
	SM-53	0.87	0.00	1.11	0.660	6.453
	SM-147	0.00	0.00	0.84	0.28	2.000
	SM-195	1.09	0.84	0.00	0.643	6.200
	SM-204	1.09	0.84	0.77	0.900	7.976
	SM-201	0.00	0.00	1.04	0.346	3.650
	SM-259	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-293	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-132	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-107	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	SM-138	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Araştırmada indirekt androgenesi yani yaklaşık 5 hafta sonunda ortaya çıkan kallus gelişimi incelenmiştir. Bu çalışma melez mısır ıslahının ilk basamağı olan kendilenmiş hat elde sürecinin hem daha kısa zamanda tamamlanmasını hem de klasik yöntemlerle mümkün olmayan %100 homozigot hat eldesi amacıyla uygulanacak anter kültürü olanaklarını belirlemek için yapılmıştır.

Bu amaçla 12 mısır genotipi 5 farklı besi ortamında üç tekrarlamalı olarak kullanılmış. Elde edilen kallusların sayımı yapılmıştır. Bu sayımlar sonucu, incelenen 12 farklı genotipten her birinin 3 tekrarlaması üzerinden 5 farklı besi ortamında kallus oluşturma sayılarına iki faktörlü tesadüf parselleri bölünmüş parseller deneme deseni modeline göre varyans analizi uygulanmıştır. Çalışmamızda, belirlenen önemlilik testi sonuçlarına göre, besi ortamlarının, genotiplerin ve genotip x besi ortamı etkileşimi anter kültürüne yanıtta kallus gelişimi üzerine etkisi önemli bulunmuştur.

Bu çalışmada incelenen 12 genotipin 5 farklı besi ortamı üzerinden ortalama kallus oluşturma sayılarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2. de alt kısımda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kullanılan besi ortamlarına göre genotiplerin kallus sayılarının varyans analiz çizelgesi

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	FDeğerleri		Hesaplanan
			Çizelge		
			0.05	0.01	
Besi ortamı	4	21.612	3.480	5.990	16.511**
Hata-1	10	1.309			
Genotip	11	55.474	1.750	2.180	33.445**
G*B	44	3.202	1.000	1.000	1.930**
Hata-2	110	1.659			
Genel	179	4.831			
DK (%)			51.05		

\* = %5 alfa seviyesinde önemli

\*\* =%1 alfa seviyesinde önemli

Çizelge 4.2. deki varyans analiz tablosunda görüldüğü gibi, besi ortamlarının oluşturduğu kallus sayıları arasındaki farklılıklar, genotipler arasındaki farklılıklar ve bunların interaksiyonu istatistiki olarak % 99 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Bu denemede varyasyon katsayısı % 51.05 bulunmuştur. Tahıllar için doku kültürü çalışmalarında genellikle 13.00 güvenilir bir katsayıdır. Burada elde ettiğimiz 51.05 değeri bu araştırmanın sonuçlarında önemli bir değişim olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar mısır bitkisinde anter kültüründe genotipik farklılıklar, besiortamlarının ve bunların interaksiyonunun kallus oluşturma sayısı üzerine önemli etki yaptığını göstermektedir.

Çalışmamızda kallus oluşturma sayısına etki eden varyantlar alt kısımda çoklu karşılaştırma testi sonuçları ile birlikte önemlilik gruplarına göre verilmiştir.

#### 4.1. Kallus oluşturma sayılarına göre hatların karşılaştırılması

Yapılan varyans analizi sonuçlarına göre istatistikî olarak %99 önemlilik seviyesinde hatlar arasında kallus sayısı açısından fark olduğu yapılan çalışma ve analiz sonucu ile ortaya konmuştur.

Çizelge 4.1.1. Hatların kallus oluşturma sayılarına göre karşılaştırılması

Genotipler	Tansformasyon Değerleri	Orijinal Kallus Değerleri	Önemlilik Grupları
SM-53	6.497	45.0528	a
SM-47	4.683	29.0360	b
SM-195	4.314	22.5440	bc
SM-204	4.191	19.7908	bc
SM-14	4.071	19.5910	bc
SM-201	3.902	17.1916	bc
SM-147	3.726	17.0992	c
SM-259	1.000	0.000	d
SM-293	1.000	0.000	d
SM-132	1.000	0.000	d

SM-107	1.000	0.000	d
SM-138	1.000	0.000	d

EKÖF= 0.55

Bu aşamadan sonra hatlara çoklu karşılaştırma testi uygulanmış ve sonuçlar çizelge 4.1.1. de gösterilmiştir. Denemeye alınan mısır hatları arasında istatistiki olarak en yüksek sayıda (45.0528) kallus oluşturma oranını SM-53 hattı vermiştir.

Bu hattı sırasıyla SM-47 genotipi 29.0360 kallus sayısı ile alt grupta yer alarak (B), SM-195 genotipi 22.5440 kallus sayısı ile, SM-204 genotipi 19.7908 kallus sayısı ile, SM-14 genotipi 19.5910 kallus sayısı ile, SM-201 genotipi 17.1916 kallus sayısı ile ve SM-147 genotipi 17.0992 kallus sayısı ile ikinci grup olarak izlemiştir. Ayrıca 5 hattan ise hiç yanıt alınamamıştır. Tüm genotiplerin kallus oluşturma genel ortalaması ise 3.032 dir. Denemeye alınan mısır genotiplerinden 7 tanesi (SM-53, SM-47, SM- 195, SM-204, SM-14, SM-201, SM-147) ortalamanın üzerinde kallus sayısı vermiştir.

Çalışmamızda da görülmekte olup anter kültüründe yanıt yüksek oranda genotipe bağlıdır. Miao ve ark.(1978), 159 genotipten yalnızca dokuzundan yanıt alabildiklerini rapor etmişlerdir. Dieu ve Beckert (1986), Avrupa Kuzey Amerika Çin ve Hindistan dan toplanan 94 genotipin 5 tanesinin (%5.3) yanıt verdiğini belirtmişlerdir. Petolina ve Jones (1986), ABD de mısır kuşağında yetiştirilmekte olan 30 genotipin 12 sinden (%30.8) yanıt almışlardır. Bizde benzer şekilde bizim çalışmamızda 12 genotipin 7 tanesinden yanıt (%58.3) alınmıştır.

#### **4.2. Kallus oluşturma sayılarına göre besi ortamlarının karşılaştırılması**

Yapılan varyans analizi sonrasında kullanılan besi ortamları arasında fark olduğu istatistikî olarak % 99 güven sınırları içinde ortaya konmuştur. Bu amaçla uygun besi ortam ya da ortamlarını belirlemek amacıyla Eköf çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Bu yüzden uygun besi ortamlarının belirlenmesi için Eköf çoklu karşılaştırma analizleri yapılmış ve sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Çoklu karşılaştırma testi sonucunda üç farklı sınıf elde edilmiş olup ilk sınıfta iki, ikinci sınıfta iki ve üçüncü sınıfta bir besi ortamı yer almaktadır.

Bu istatistiki verilerden yola çıkarak, MS 2(IBA + Kinetin) ve YPI(2,4-D + IBA) besi ortamlarının aynı sınıfta (A) yer aldığı ve bunların arasında istatistiki olarak farkın önemsiz olduğu, MS 1 (2,4-D + NAA), N-6 (2,4-D,NAA) besi ortamının alt sınıfta (B) yer aldığı ve P II (IBA + Kinetin) besi ortamlarının ise iki alt sınıfta (C) yer aldığı ortaya konmuştur (Çizelge 4.2.1.).

Çizelge 4.2.1. Kallus oluşturma sayılarına göre besi ortamlarının karşılaştırılması

Besi Ortamları	Transformasyon Değerleri	Orijinal Kallus Sayıları	Önemlilik Grupları
MS-2 (IBA+Kinetin)	3.807	21.012	a
YPI (2,4-D+IBA)	3.693	20.328	a
MS-1 (2,4-D+NAA)	2.965	13.430	b
N-6 (2,4-D+NAA)	2.806	12.673	b
P II (IBA+Kinetin)	1.889	3.903	c

EKÖF=0.801

Sonuç olarak mısır bitkisinde genotiplerin besi ortamları üzerinde oluşturduğu kallus sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak % 99 oranında önemli bulunmuştur. Yapılan istatistiki analiz sonucunda da görüldüğü gibi en yüksek yanıt YPI ve MS-2 besi ortamlarından alınmıştır.

Elde olunan bulgular mısırdaki anter kültüründe, besi ortamlarının, genotiplerin ve genotip x besi ortamının kallus oluşturma sayıları üzerine önemli etki yaptığını göstermektedir.

Yapılan tez çalışmasında elde edilen sonuçlar Xu (2007) adlı araştırmacının mısır bitkisinde anter kültüründe kromozom katlamaları üzerine yaptığı çalışma ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yaptıkları çalışmada FH x AP81 kendilenmiş hatlarını melezleyerek F<sub>1</sub> melezlerini elde etmişlerdir. Anterleri N-6 ortamına aktarmışlar, aktarılan besi ortamında 2,4-D 2 mg/l, kinetin 1 mg/l, BAP 1 mg/l eklemişlerdir. 40-60 gün sonra polen embriyogenesi şeklinde gelişim sağlamışlardır.

Çalışmamız ayrıca Zhangchen ve ark. (2000) yaptıkları araştırma ile de benzer sonuçlar vermiştir. Çalışmalarında haploid bitki eldesinde kullandıkları besi ortamlarından en fazla yanıt aldıkları ortamın 2 mg/L 2,4-D, % 0.5 aktif karbon, 500 mg/L kazein hidrolizat, 0.2 mg/L TIBA ve % 15 sakaroz eklenmiş N-6 besi ortamı olduğunu belirtmişlerdir

### **4.3. Genotiplere göre en uygun besi ortamları**

Çizelge 4.3.1. den görüldüğü gibi SM-53 genotipi YPU (2,4-D+IBA) sıvı besi ortamında istatistik olarak en yüksek sayıda (74.966) kallus oluşturmuştur.

Bunu sırasıyla SM-47 genotipi YPI (2,4-D+IBA) (a-b) sıvı besi ortamında kullanıldığında 65.000 adet kallus sayısı ile, SM 53 genotipi MS-2(IBA+ Kinetin) 59.533 kallus sayısı(a-c) ve yine SM-53 N-6 (2,4-D + NAA) 59.166 kallus sayısı (a-c), takiben SM-47 (IBA+Kinetin) 42.999 kallus sayısı ile izlemiştir. SM-195 ise MS-2 (IBA + Kinetin) olarak 41.210 kallus sayısı ile bir alt grupta (b-d) yer almıştır.

Yanıt oranları ve hatlara göre besi ortamları sırasıyla SM-53 YPI (2,4-D+IBA) besi ortamı a grubunda yer almakta bundan sonra; SM-47 YPI (2,4-D+IBA) besi ortamında, SM-53 N-6 (2,4-D+NAA) besi ortamında ve SM-47 MS-2 (IBA+ Kinetin) besi ortamında en iyi yanıt vermişlerdir.

SM-259, SM-293, SM-132, SM-107 ve SM-138 genotiplerinden ise yanıt alınamamıştır.



Genotiplerin besi ortamına göre kallus oluşturma genel ortalaması 14.269 dur. Ortalamayı aşan besi ortamı kallus interaksyonu 26 adettir.

Yaptığımız bu çalışmada genotip ve besi ortamına göre kallus oluşumunun önemli oranda değiştiği, bu nedenle her genotipe göre besi ortamının ayrı önem arz edeceği sonucu çıkmaktadır.

Çizelge 4.3.1. Genotiplere göre en uygun besi ortamları

Genotip ve Besi Ortamları	Transformasyon Değerleri	Orijinal Sayıları	Kallus	Önemlilik Grupları
SM-53 YPI 2,4-D + IBA	8.715	74.966		a
SM-47 YPI 2,4-D + IBA	8.124	65.000		a-b
SM-53 MS-2 IBA+Kinetin	7.780	59.533		a-c
SM-53 N-6 2,4-D+NAA	7.756	59.166		a-c
SM-47 MS-2 IBA+Kinetin	6.633	42.999		a-d
SM-195 MS-2 IBA+Kinetin	6.497	41.210		b-d
SM-14 MS-1 2,4-D+NAA	5.728	31.813		c-e
SM-201 MS-2 IBA+ Kinetin	5.566	29.986		d-e
SM-147 MS-2 IBA + Kinetin	5.515	29.420		d-f
SM-147 MS-1 2,4-D+NAA	5.354	27.666		d-f
SM-204 MS-2 IBA+ Kinetin	5.164	25.666		d-g
SM-53 MS-1 2,4-D+NAA	5.113	25.146		d-g
SM-195 MS-1 2,4-D+NAA	5.033	24.333		d-h
SM-204 MS-1 2,4-D+NAA	5.033	24.333		d-h
SM-201 YPI 2,4-D+IBA	4.933	23.333		d-h
SM-14 MS-2 IBA+Kinetin	4.933	23.333		d-h
SM-195 YPI 2,4-D+IBA	4.864	22.666		d-h
SM-204 YPI 2,4-D+IBA	4.864	22.666		d-h
SM-14 N-6 2,4-D+NAA	4.804	22.080		d-ı
SM-147 YPI 2,4-D+IBA	4.545	19.656		e-i
SM-204 N-6 2,4-D+NAA	4.394	18.313		e-i
SM-195 N-6 2,4-D+NAA	4.394	18.313		e-i

SM-14 YPI 2,4-D+IBA	4.080	15.653	e-j
SM-47 P II IBA+Kinetin	4.060	15.490	e-j
SM-201 MS-1 2,4-D+NAA	3.958	14.666	e-j
SM-201 N-6 2,4-D+NAA	3.914	14.323	e-j
SM-47 MS-1 2,4-D+NAA	3.770	13.213	e-k
SM-147 N-6 2,4-D+NAA	3.495	11.220	f-k
SM-47 N-6 2,4-D+NAA	3.109	8.666	g-k
SM-204 P II IBA+Kinetin	2.995	7.976	h-k
SM-53 P II IBA+Kinetin	2.730	6.453	I-k
SM-195 P II IBA+Kinetin	2.683	6.200	i-k
SM-14 P II IBA+Kinetin	2.465	5.076	i-k
SM-201 P II IBA+Kinetin	2.156	3.650	j-k
SM-147 P II IBA+Kinetin	1.732	2.000	k-l
SM-259 N-6 2,4-D+NAA	0.000	0.000	l
SM-259 MS-1 2,4-D+NAA	0.000	0.000	l
SM-259 YPI 2,4-D+IBA	0.000	0.000	l
SM-259 MS-2 IBA+Kinetin	0.000	0.000	l
SM-259 P II IBA+Kinetin	0.000	0.000	l
SM-293 N-6 2,4-D+NAA	0.000	0.000	l
SM-293 MS-1 2,4-D+NAA	0.000	0.000	l
SM-293 YPI 2,4-D+IBA	0.000	0.000	l
SM-293 MS-2 IBA+Kinetin	0.000	0.000	l
SM-293 P II IBA+Kinetin	0.000	0.000	l
SM-132 N-6 2,4-D+NAA	0.000	0.000	l
SM-132 MS-1 2,4-D+NAA	0.000	0.000	l
SM-132 YP II 2,4-D+IBA	0.000	0.000	l
SM-132 MS-2 IBA+Kinetin	0.000	0.000	l
SM-132 P II IBA+Kinetin	0.000	0.000	l
SM-107 N-6 2,4-D+NAA	0.000	0.000	l
SM-107 MS-1 2,4-D+NAA	0.000	0.000	l
SM-107 YPI 2,4-D+IBA	0.000	0.000	l
SM-107 MS-2 IBA+Kinetin	0.000	0.000	l
SM-107 P II IBA+Kinetin	0.000	0.000	l

SM-138 N-6 2,4-D+NAA	0.000	0.000	1
SM-138 MS-1 2,4-D+NAA	0.000	0.000	1
SM-138 YPI 2,4-D+IBA	0.000	0.000	1
SM-138 MS-2 IBA+Kinetin	0.000	0.000	1
SM-138 P II IBA+Kinetin	0.000	0.000	1
EKÖF=2.08			

Bu araştırmada kullanılan besi ortamları ve bu besi ortamlarında kullanılan genotiplerin performanslarıyla ilgili orijinal resimler (Resim 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5., 4.6., 4.7., 4.8., 4.9. ve 4.10.) aşağıda verilmiştir.



Resim 4.1. SM-47 Elde edilen kalluslar 1.ve 2. tekrarlama YPI (orjinal)



Resim 4.2. SM-47 anterleri 2.tekrarlama P II (orjinal)



Resim 4.3. SM-147 elde edilen kalluslar 3. tekrarlama YPI (orjinal)



Resim 4.4. SM-195 elde edilen kalluslar 1.tekrarlama MS-2 (orjinal)



Resim 4.5. SM-47 elde edilen kalluslar 3. tekrarlama MS-2(orjinal)



Resim 4.6. SM-204 elde edilen kalluslar 1.tekrarlama N-6 (orjinal)



Resim 4.7. SM-204 elde edilen kalluslar 1.tekrarlama MS-2 (orjinal)





Resim 4.8. SM-201 elde edilen kalluslar 3.tekrarlama YPI (orjinal)



Resim 4.9. SM-53 elde edilen kalluslar 3.tekrarlama MS-2 (orjinal)



Resim 4.10. SM-147 elde edilen kalluslar 1.tekrarlama YPI (orjinal)



## 5. SONUÇ

Bu çalışma melez mısır ıslahının ilk basamağı olan kendilenmiş hat elde sürecinin hem daha kısa zamanda tamamlanmasını hem de klasik yöntemlerle mümkün olmayan %100 homozigot hat eldesi amacıyla uygulanacak anter kültürü olanaklarını belirlemek için yapılmıştır. Bu amaçla 12 mısır genotipi 5 farklı besi ortamında üç tekrarlamalı olarak kullanılmış. Elde edilen sayısal veriler ile hatlar ve besi ortamlarının normal dağılım göstermediği görülmüştür. Bu nedenle farklılığın belirlenmesi için varyans analizi uygulanmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda % 99 güven sınırları içinde elde edilen bulgular, genotip x besi ortamının interaksiyonunun, genotiplerin ve kullanılan besi ortamlarının kallus sayılarına göre farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Mısır genotiplerinin anter kültürüne yanıtlarının kullanılan besi ortamlarına göre değişebileceği, genotiplerin en iyi yanıt verdikleri besi ortamlarının YPI (2,4-D + IBA) ve MS 2 (IBA + Kinetin) olduğu belirlenmiştir. Genotipler arasında en yüksek yanıt SM-53, SM-47 ve SM-195 genotiplerinden alınmıştır. Genotiplerin besi ortamına yanıtları farklı olurken, anter kültüründe en iyi yanıtın SM-53 genotipinin YPI (2,4-D+IBA) besi ortamında verdiği sonucu elde edilmiştir. Bu iki besi ortamının 2,4-D ve IBA hormonları ile desteklenmesi mısırdaki anter kültürüne yanıtı önemli oranda arttırmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- Aalders K E O (1958). Monoploidy in cucumbers. J. Hered., 49:41-44.
- Abak K (1983). Biberde (*Capsicum annuum L.*) anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırma. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı, Cilt 33, Fas. 1-2-3-4'den ayrı basım.
- Abak K (1993). Biber ıslahında anter kültüründen yararlanma. Bitki Islahı Simp. Bild. Tübitak Toag Yay. 20: 59-66.
- Abak K, Sarı N, Paksoy M, Yılmaz H, Aktaş H, Tunalı C (1966). Kavunda ışınlanmış polen tozlamaları ile haploid embriyo uyarımında genotip etkisi, dihaploid hatların oluşturulması, haploid ve diploid bitkilerin değişik ayrımı. Türk Tarım ve Ormanlık Dergisi, 20: 425- 430.
- Abak K, Çömlekçioğlu N, Büyükalaca S, Sarı N (1998). Use of stomatal characteristics to estimate ploidy level of haploid and dihaploid pepper plants. Xth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, 1998, Avignon-France, 179-182.
- Adamus A, Samek L, Nowak E, Michalik B (2001). Optimization of protocols for gynogenesis induction and haploid plants diploidization in onion (*Allium cepa L.*). Folia Hort. Ann., 13:69-74.
- Afele J C, Kannenberg L W (1990). Genetics studies of corn (*Zea mays L.*) anther culture response. TAG Theoretical and Applied Genetics. Canada, 80:459-464.
- Agache S, Bachelier B, De Buyser J, Henry Y, Snape JW (1989). Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. Theor Appl. Genet., 77:7-11.
- Ağaoğlu YS, Ellialtıoğlu Ş, Marasalı B, Kalyon D (1998) Asmada (*Vitis vinifera L.*) androgenetik kallus oluşumu üzerine araştırmalar. II. Uluslararası Kızıllırmak Fen Bilimleri Kongresi, s. 89–99, 20–22 Mayıs 1998, Kırıkkale.
- Ahmim M, Vieth J (1986). Production de plantes haploides de *Gerbera jamesonii* par culture d'ovules. Can. J. Bot., 64:2355-2357.
- Andersen S B (2003). Doubled haploid production in poplar. In: Maluszynski M, Kâhsa K J, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants – A Manual. Kluwer, Dordrecht/Boston/London, p. 293–296
- Anoim (2001). Tarımsal Değerleri Ölçme Denemeleri Teknik Talimatı. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü. Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü, Ankara. 8 s.
- Ao GM, Zhao SX, Li GH (1982). In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of corn (*Zea mays L.*) Acta. Gen. Sin., 9: 281-283.

- Arias F J, Guzman M (2000). Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) Plant Sci. 152(2):107–114.
- Arias F J (2003). Laboratory protocol for anther culture technique in rice. In Maluszynski et. al.. Doubled Haploid Production in Crop Plants. (109-116). 2003 IAEA, Netherlands.
- Armstrong C L, Romeno-Severson J, Hodges T K (1992). Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification chromosomal regions important regeneration by RFLP analysis. TAG Theoretical and Applied Genetics. 84:755-762, USA.
- Bajaj Y P S (1966b). Growth of *Hyoscyamus niger* ovaries in culture. Phyton (Buenos Aires), 23: 57–62.
- Bajaj Y P S (1972). Effect of some growth regulators on bud formation in excised Leaves of *Torenia fournieri*. Z. Pflanzenphysiol., 66: 284-287.
- Bajaj Y P S (1977a). Initiation of shoots and callus from potato-tuber sprouts and axillary buds frozen at-196~ Crop Improv., 4: 48-53.
- Bajaj Y P S (1977b). Clonal multiplication and cryopreservation of cassava through tissue culture. Crop Improv., 4: 198-204.
- Bajaj Y P S (1978). Effect of super-low temperature on excised anthers and pollenembryos Of *Atropa*, *Nicotiana* and *Petunia*. Phytomorphology, 28: 171–176.
- Bajaj Y P S (1979a). Freeze preservation of meristems of *Arachis hypogaea* and *Cicer arietinum*. Indian J. Exp. Biol., 17: 1405-1407.
- Bajaj Y P S (1979b). Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. Euphytica, 28: 267–285.
- Bajaj Y P S (1979c). Test-tube fertilization and development of maize (*Zea mays* L.) plants. Indian J. Exp. Biol., 17: 475-478.
- Bajaj Y P S (1990). Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated crops. Bull. Soc. Bot. Fr., 137 (Actual Bot.): 99-114.
- Bajaj Y P S and Reinert J (1977). Cryobiology of plant cell cultures and establishment of gene banks. In: J. Reinert and Y.P.S Bajaj (Eds.), Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer, Berlin, p. 757-777.
- Bajaj Y P S, Reinert J and Heberle E (1977). Factors enhancing in vitro production Of haploid plants in anthers and isolated microspores. In: R.J. Gautheret (Ed.), La Culture des Tissus et des Cellules des Vegetaux. Masson, Paris, p. 47–58
- Bajaj Y P S, Saini S S and Bidani M (1980). Production of triploid plants from the immature and mature endosperm cultures of rice. Theor. Appl. Genet., 58: 17-18.

- Bajaj Y P S (1983). In vitro production of haploids I. Springer-Verlag Berlin. 549 p.
- Bhojwani S S (1988). Tissue culture methods for haploid production. In: A.S. Islam 614 and M.M. Haque (Eds.), Proceedings of the Regional Workshop on Tissue Culture of Tropical Crop Plants. Bangladesh Bot. Soc., Dhaka, p. 1-15
- Bhojwani S S and Arora R (1992). Field assessment of variability in R 0 and R1 plants regenerated from tissue cultures of *Brassica juncea*. In: C.B. You and Z.L. Chen (Eds.), Agricultural Biotechnology. China Science and Technology Press, China, p. 334–337
- Bhojwani S S and Sharma K K (1991). Anther and pollen culture for haploid production. In: A.K. Mandal et al. (Eds.), Advances in Plant Breeding, Vol. 2. CBS, New Delhi, p. 65–91
- Bhojwani S S (1988). Tissue culture methods for haploid production. In: A.S. Islam 614 and M.M. Haque (Eds.), Proceedings of the Regional Workshop on Tissue Culture Of Tropical Crop Plants. Bangladesh Bot. Soc., Dhaka, p. 1-15
- Barnabas B (2003a). Anther culture of maize (*Zea mays* L.). In: Maluszynski M, Kâhsa K J, Forster B P, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants – A Manual. Kluwer, Dordrecht/Boston/London, p. 103–108
- Barnabas B (2003b). Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Maluszynski M, Kâhsa K J, Forster B P, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants – A Manual. Kluwer, Dordrecht/Boston/London, p. 65–70
- Barnabas B, Obert B, Kovacs G (1999). Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. Plant Cell Repord, 18:858-962
- Blakeslee A F, Belling J, Farnham M E, Bergner A D (1922). A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. Science, 55: 646–647.
- Bohaojvani S S, Razdan N K (1996). Plant Tissue Culture, Boston/London, p. 167- 215
- Borgel A, Favier F, Bergounioux C (1990). Mixoploidy in plants obtained by haploid method, cytometric DNA quantitative analysis VII. Int. Cong. On Plant Tissue and Cell Culture, 24–29 June 1990, Amsterdam, p. 174-186
- Bossoutrot D, Hosemans D (1985). Gynogenesis in *Beta vulgaris* L from in vitro culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plantes in soil. Plant Cell Repord, 4:300–303.
- Bourgin J P, Nitsch J P (1967). Obtention de *Nicotiana* haploides a partir d'etamines cultivees in vitro. Ann. Pysiol. Veget., 9:377-382.
- Bouvier L, Filon F R, Lespinasse Y (1994). *Oryzalin* as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots in vitro. Plant Breed., 113:343-346.

- Bullock W P, Baenziger P S, Schaffer G W, Bottino P J (1982). Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F1's and their reciprocal crosses. *Theor. Appl. Genet.*, 62:155-159.
- Cagnet Sitbon M (1981). Production of haploid *Gerbera jamesonii* by culture of unfertilized ovules. *Agronomie*, 1:807-812.
- Cai D T, Zhou C (1984). In vitro induction of haploid embryoids and plantlets from unpollinated young florets and ovules of *Helianthus annuus* L. *Kexue Tongbao*, 29:680-682.
- Cappadocia M, Chretien L, Laublin C (1988). Production of haploids in *Gerbera jamesonii* H.Bolus ex Hook via ovule culture: Influence of fall and spring sampling on callus formation and shoot regeneration. *Can J. Bot.*, 66:1107-1110.
- Caranta C (1992). Essai d'induction de la parthenogenese haploide par du pollen irradié chez le fraisier cultivé (*Fragaria ananassa* Duch.) et étude du gametophyte femelle. Mémoire (D.E.A.) option Sciences Agronomiques: Amélioration des Plantes, Faculte des Sciences de Luminy, Marseille, 15 p.
- Changdeng Y, Lianbin W, Chengzhang Z (1998). In vitro regulation of haploid somaclonal micro-buds in indica rice. *Chinese J. Rice Sci.* 12,4:219-222.
- Chen Y, Zuo Q, Li S, Lu D, Zheng S (1981). Green plant regenerated from isolated rice pollen grains in vitro and the induction factors. *Acta Genet. Sin.*, 8: 158-163.
- Chu C C, Hill R D, Brule-Babel A L (1990). High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Sci.*, 66:255-262.
- Chen Y, Zuo Q, Li S, Lu D, Zheng S (1981). Green plant regenerated from isolated rice pollen grains *in vitro* and the induction factors. *Acta Genet. Sin.*, 8: 158-163.
- Cho M S and Zapata F J (1988). Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L. cv. Taipei 309). *Plant Sci.*, 58: 239-244.
- Cho M S and Zapata F J (1990). Plant regeneration from isolated microspore of indica rice. *Plant Cell Physiol.*, 31: 881-885.
- Cuny F (1992). Processus d'induction d'embryons haploides par du pollen irradié chez le melon (*Cucumis melo* L.) Response du pollen a l'irradiation gamma. These de Docteur, Spécialité: Biologie et Cytologie Végétales, Univ. D'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon, 139 p.
- Çağlar G, Abak K (1995). Farklı hıyar genotiplerinde ışınlanmış polenlerle uyartım yoluyla haploid embriyo ve bitki eldesi. *Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kong. Cilt. II*, 159-162.
- Çağlar G, Abak K (1996). Hıyarda ploidi düzeyinin belirlenmesinde bazı morfolojik özelliklerin sitolojik yöntemlere alternatif olarak kullanılabilirliği üzerinde bir araştırma. GAP 1, Sebze Tarımı Simp, 7-10 Mayıs 1996, Şanlıurfa, 357-366.

- Çağlar G, Abak K (1997). *In vitro* colchicine application of haploid cucumber plants. *Cucurbit Genetics Coop.*, 20: 21-23.
- Custers J B M (2003). Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). In: Maluszynski M, Kâhsa K J, Forster B P, Szarejko I (eds) *Doubled Haploid Production in Crop Plants – A Manuel*. Kluwer, Dordrecht/Boston/London, p. 185–194
- Dale P J (1975). Pollen dimorphism and anther culture in barley. *Planta* (Berlin), 127:213-220.
- Data S K, Wenzel G (1987). Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci.*, 48: 49-54.
- David J L, Dusautoir J C, Raynaud C, Roumet P (1999). Heritable variation in the ability to produce haploid embryos via pollination with maize and embryo rescue in durum wheat. *Genome*, 42:338–342.
- De Buyser J, Henry Y, Lonnet P, Hertzog R and Hespel A (1987). Florin: a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breed.*, 98: 53–56.
- De Laat A M M, Göhde W, Vogelzang M J (1987). Determination of ploidy of single plants and plants populations by flow cytometry. *Flow Cytometry*, 99:303–307.
- Demarly Y, Sibi M (1989). *Amélioration des Plantes et Biotechnologies*. John Libbey and Company Ltd, Paris, 43: 86–95.
- De Varna J W, Collins G B (1984). Maternal haploids of *Petunia axillaris* (Lam) BSP via culture of placenta attaches ovules. *Theor Appl. Genet*, 69:187–192.
- Doctrinal M, Sangwan R S, Sangwan-Norreel B S (1989). *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L. Effect of plant regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 17:1-12.
- Dolcet –Sanjuan R, Claveria E (2000). Androgenesis in sweet bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and eggplant (*Solanum melongena* L.) used for the production of commercial hybrid varieties. 4th Int. Symp. On *in vitro* culture and horticultural breeding, 2–7 July 2000, Tampere, Finland, Abstracts:58
- Doré C (1976). Doublement du stock chromosomique d'haplodies d'asperge (*Asparagus officinalis* L.) par culture *in vitro* des meristemes en presence de colchicine. *Ann. Amélior. Plantes*, 4:647–653.
- Doré C (1986). Evaluation du niveau du ploidie des plantes d'une population de choux de bruxelles (*Brassica oleracea* L. ssp. *gemnifera*) d'origine polniquie agronomie, 9:797-801.

- Doré C (1989). Obtention de plantes haploides de chou cabus (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) apres culture in vitro d'ovules pollinises par du pollen irradié, C.R. Acad. Sci. Paris, 309, Serie III, 729–734.
- Doré C, Prigent J, Desprez B (1996). In situ gynogenetic haploid plants of chicory (*Cichorium intybus* L.) after intergenic hybridisation with *Cicerbita alpina* Walbr. *Plant Cell Rep.*, 15:758-761.
- Dryanovska O A, Ilieva I N (1983). In vitro anther and ovule cultures in muskmelon. R. Acad. Sci., 8:1107-1110.
- Dumas de Vault R (1979). Polyploidisation In: J. Jahier (ed.). *Techniques de Cytogenetique Vegetale*, INRA, Paris, p. 149–165
- Dumas de Vault R (1979). Obtention de plantes haloides chez le melon (*Cucumis melo* L.) apres pollinisation par *Cucumis ficifolius* A.Rich Acad Sci. Paris. Serie D, 289:875–878.
- Dumas de Vault R (1992). Polyploidisation In: J. Jahier (ed). *Techniques de Cytogénétique Végétale*, INRA, Paris, p. 149–165
- Dumas de Vault R, Chambonnet D (1982). Culture in vitro d'antheres d'aubergine(*S. Melongena* L.); Stimulation de la production de plantes qu moyen de traitements a +35°C Associes a de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie*, 10:983-988.
- Dumas de Vault R, Chambonnet D, Pochard E (1981). Culture in vitro de antheres de piment (*Capsicum annuum* L.): Amelioration des taux de obtention de plantes chez differents genotypes par des traitements a +35 °C. *Agronomie*,10: 859–864.
- Dunwell J M (1981). Influence of genotype and environment on growth of barley embryos in vitro. *Ann. Bot.*, 48: 535-542.
- Dunwell J M, Perry E (1973). The influence of in vivo growth conditions of *N. tabacum* plants on the in vitro embryogenetic potential of their anthers. *John Innes Inst. Rep.*, 64: 69-70.
- Ekiz H, Konzak C F (1997). Effect of light regimes on anther culture response in bread wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 50(1):7-12.
- Forster B P, Thomas W T B (2005). Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed. Rev.*, 25:57-88.
- Foroughi-Wehr B, Friedt W and Wenzel G (1982). On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theor. Appl. Genet.*, 62: 233–239.
- Foroughi-Wehr B, Wenzel G (1993). Andro- and parthhenogenesis. In: Hayvard MD, Bosemark NO, Ramagosa I (eds), *Plant Breeding: Principles and Prospects*. Champan & Hall, London, p. 261–277

- Foroughi-Wehr B, Zeller F J (1990). Recurrent selection alternating with haploid steps a rapid breeding procedure for combining agronomic traits in inbreeders. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 564-568.
- Fridborg G, Pedersen M, Landström L E, Eriksson T (1978). The effect of activated charcoal on tissue cultures adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol. Plant.*, 43:104-106.
- Foster B P, Touraev A, Jain S M (2009). *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, p. 12–110
- Gallais A (1978). Place de l'haploïde dans un schéma de sélection. *Le Sélectionneur Français*, 26: 39–49.
- Genovesi A D, Collins G B (1982). In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.*, 22:1137-1144.
- Genovesi A D, Magill C W (1979). Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. *Crop Sci.*, 19:662-664.
- Gonzalez J M, Jouve N (2000). Improvement of anther culture media for haploid production in triticale. *Cereal Res. Com.*, 28:65-72.
- Guha S, Maheshwari S C (1966). Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. *Nature*, 212:97–122.
- Hansen N J P, Andersen S B (1998). Efficient production of doubled haploid wheat plants by in vitro treatment of microspores with trifluralin or APM. *Plant Breed.*, 5:401-405.
- Hassawi D S and Liong G H (1990). Effects of Growth Regulator and Genotype of Production of Wheat and Triticale Polyhaploids from Anther Culture. *Plant Breed.*, 104:40-45
- Heberle-Bors E, Reinert J (1979). Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum*: dependence upon pollen development. *Protoplasma*, 9: 237–245.
- Heberle-Bors E, Reinert J (1981). Environmental control and evidence for predetermination of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* pollen. *Protoplasma*, 109:249–255.
- Henry Y, de Buyser J (1985). Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Cell Rep.*, 4: 307-310.
- Jacobsen E, Sopory S K (1978). The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspore embryoids in anther cultures of *Solanum tuberosum* and dihaploid hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, 52: 119-123.
- Johansson L, Eriksson T (1977). Induced embryo formation in anther culture of several *Anemone* species. *Physiol. Plant*, 40:172–174.



- Kasha K J, Kao K N (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Nature (Lond)*, 225: 874–876.
- Kasha K J, Sequin-Swartz G (1983). Haploidy of crop plants. In: M.S. Swaminathan et al. (Eds.), *Cytogenetics of Crop Plants*. Macmillan, Delhi, p. 19–68
- Korkut K Z, Başer I, Turhan H, Bilgin O (2001). Yerli ve yabancı kökenli ekmeklik buğday çeşit ve hatlarında haploid ve dihaploid genotiplerin elde edilme olanakları. TÜAF-232. Tekirdağ.
- Martinez L (2003). In vitro gynogenesis induction and doubled haploid production in onion (*Allium cepa* L.). In: Maluszynski M, Kâhsa K J, Forster B P, Szarejko I (eds) *Doubled Haploid Production in Crop Plants – A Manuel*. Kluwer, Dordrecht/Boston/London, p. 275–281
- Mishra M K (1997). Stomal characteristics at different ploidy levels in coffee. *Ann. Bot.* 80,5:689–692.
- Morrison R A, Köning R E, Evans D A (1986). Anther culture of an interspecific hybrid of capsicum. *J. Plant Physiol.* 126(1): 1–9.
- Nitsch C (1974). La culture de pollen isole milieu synthetique. *C.R. Acad Sci.* 278 D: 1031–1034.
- Nitsch J P (1969). Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology*, 19: 389- 404.
- Nitsch C, Norrreel K (1973). Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans l'anthere ou isole de l'anthere. *C.R. Acad. Sci.* 276 D, 303–306
- Pauk J, Puolimatka M, Tok L, Monostori T (2000). In vitro androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 61:221-229.
- Pauk J, Hassan M S, Puolimatka M, Lantos C S, Mihaly R, Mesterhazy A, Kertesz Z, Matus J (2003a) Microspore- and anther culture improvements for wheat breeding. In: Mujib A, Cho M J, Predieri S, Banarjee S (eds) *In vitro Application in Crop Improvement: Recent Progress*, Science, Enfield, New Hampshire, USA, p. 131–151
- Pesticelli S M, Mitchell J C, Jones A M, Petolini J F (1989). High frequency androgenesis from isolated microspore of maize. *Plant Cell Rep.*, 7: 6773-6776.
- Pescitelli SM, Johnson C D, Petolino J F (1990). Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. *Plant cell reports* 8:628-631.
- Petolino J F, Jones A M, Thompson S A (1997). Selection for increased anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 157-159.
- Reinert J, Bajaj Y P S (1991), *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. Springer Verlag, New York, p. 251–264

- Saisingtong S, Schmid J E, Stamp P, Büter B (1996). Colchicine- mediated chromosome doubling during anther culture of maize. TAG Theoretical and Applied Genetics. 92:1017-1023.
- Sauton A (1987). Recherche d'haploïdes chez le melon (*C.melo L.*) etude et application a la sélection de la parthénogénese induite par du pollen irradié. These (Docteur nouveau regime), sepécialité Biologie et Physiologie Végétales, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 123 p.
- Sauton A (1988). Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo L.* Scientia Hort., 35: 71-75.
- Sauton A (1989). Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. Cucurbit Genetics Coop., 12: 22-23.
- Sharma, K K, Bhojwani S S (1985). Microspore embryogenesis in anther cultures of two Indian cultivars of *Brassica juncea (L.) Czern.* Plant Cell Tissue Organ Cult., 4: 235-239.
- Sokal R R, Rohlf F J (1969). Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Resarch. W. W. Freeman and Company. USA. 776 p.
- Sunderland N (1971). Anther culture: a progress report. Sci. Prog. exp., 59: 527-549.
- Sunderland N, Roberts M (1979). Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anther. Ann. Bot., 43: 405-414.
- Sunderland N, Xu Z H (1982). Shed pollen culture in *Hordeum vulgare*. J. Exp. Bot., 33: 1086-1095.
- Sunderland N, Xu Z H, Huang B (1981). Recent advances in barley genetics anther culture. In: Barley Genetics IV. Proc. 4th Int. Barley Genetics Symp, Edinburgh Univ. Pres., Edinburgh, p. 699-703
- Szarejko I, Forster B P (2007). Doubled haploidy and induced mutations. Euphytica, 130: 359–370.
- Şahin S (2009). Çeltik Bitkisinde Anter Kültürü Uygulama Olanakları Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 49 s., Tekirdağ.
- Testillano P S, Georgiev S, Mogansen H L, Coronado M J, Dumas C, Risueno M C, Matthys-Rochon E (2004). Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during *in vitro* maize induced microspore embryogenesis. Chromosoma, 112:342–349.
- Tulecke W (1953). A tissue derived from the pollen of *Gingko biloba* Science, 117: 599-600.

- Vasil I K, Therge T A (1994). Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, 548p.
- Wan Y, Petolino J F, Widholm J M (1989). Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. Theor. Appl. Genet. 72: 889–892.
- Wang C C, Kuang B J (1981). Induction of haploid plants from the female gametophyte of *Hordeum vulgare* L. Acta Bot. Sin., 23: 329-330.
- Wengel G, ForoughiWehr B (1984). Anther culture in cereal and grasses. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vasil IK (ed) Academic Press Inc., p. 311-327
- Wenzel G, Thomas E (1974). Observations on growth in culture of anthers of *Secale cereale*. Z. Pflanzzücht., 72: 89-94.
- Yurtsever N (1989). Deneysel İstatistik Metotlar Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları. Genel Yayın No:121, Ankara.
- Zhang Y X, Lespinasse Y (1991). Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. Euphytica, 54: 101- 109.
- Zhangchen G, Yinggeng Y, Yiming G, Jinxing L (2000). Anther culture and haploid breeding of maize. Chinese academy of sciences, Institute of Botany, China, 31:447-455.
- Zhu Z, Wu H (1979). In vitro production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum*. Acta. Genet. Sin., 6: 181-183.
- Xu Z, Huang B, Sunderland N (1981). Culture of barley anthers in conditioned medium. J. Exp. Bot., 32: 767-778.
- Xu J (2007). Inducing chromosome doubling in anther culture maize (*Zea mays* L). Institute of Genetics Academia. Kluwer Academic Publishing. Sinica / Beijing / China, 5: 770-788.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılı Tekirdağ'ın Çorlu ilçesinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Çorlu da tamamladı. Liseyi bitirdiği yıl ailesinin çiftçi olması nedeniyle 2003 yılında Trakya Üniversitesi Ziraat Fakültesinde lisans öğrenimine başladı. Lisans eğitiminin üçüncü yılında tarla bitkileri bölümünü tercih etti. 2007 yılında mezun oldu ve aynı yıl Sayın Prof. Dr. Kayıhan Z. KORKUT un danışmanlığında ihtisas eğitimine başladı. Halen ihtisas eğitimi sürmektedir.