

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

STARKSPUR GOLDEN DELICIOUS ELMA ÇEŞİDİNDE ŞEKER,
AKTİF KÖMÜR ve IŞIĞIN *in vitro* ANDROGENESİS ÜZERİNE
ETKİLERİ

Nurhan KÖSALİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

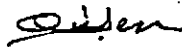
**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ANKARA
2000

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Hatice DUMANOĞLU danışmanlığında Zir. Müh. Nurhan KÖSALİ tarafından hazırlanan bu çalışma 24 / 02 / 2000 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Yücel GÜLŞEN

İmza : 

Üye: Doç. Dr. Hatice DUMANOĞLU

İmza : 

Üye: Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM

İmza : 

Üye:

İmza :

Üye:

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(İmza)

Prof. Dr. Esma KILIÇ

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Ön uygulama.....	12
3.2.2. Androgenesis için uygun çiçek tomurcuğu, çiçek ve anterlerin belirlenmesi.....	12
3.2.3. Mikrospor gelişme dönemlerinin belirlenmesi.....	13
3.2.4. Materyalin dezenfeksiyonu ve dikim.....	14
3.2.5. Besin ortamının hazırlanması.....	15
3.2.6. İnkübasyon koşulları.....	16
3.2.7. Gözlem ve değerlendirmeler.....	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	17
4.1. Mikrospor Gelişme Dönemlerinin Belirlenmesi.....	17
4.2. Birinci Yıl Deneme Sonuçları.....	22
4.2.1. Aktif kömürsüz ortamlardan elde edilen sonuçlar.....	22
4.2.2. Aktif kömürlü ortamlardan elde edilen sonuçlar.....	24
4.2.2.1. %0.10 aktif kömürlü ortamlardan elde edilen sonuçlar.....	24
4.2.2.2. % 0.15 aktif kömürlü ortamlardan elde edilen sonuçlar.....	26
4.2.2.3. % 0.30 aktif kömürlü ortamlardan elde edilen sonuçlar.....	27
4.3. İkinci Yıl Deneme Sonuçları.....	29
4.3.1. % 0.10 aktif kömür ve %3 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar.....	29
4.3.2. % 0.10 aktif kömür ve %6 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar.....	29
4.3.3. % 0.15 aktif kömür ve %3 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar.....	32
4.3.4. % 0.15 aktif kömür ve %6 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar.....	32
4.3.5. % 0.30 aktif kömür ve %3 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar.....	35

4.3.6. % 0.30 aktif kömür ve % 6 sakkaroz ile glükoz içeren ortamlarda elde edilen	35
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	38
5.1. Mikrospor Gelişim Aşaması ile Çiçek Tomurcuğu, Çiçek ve Anter Arasındaki Korelasyonlar.....	38
5.2. Şekerin Etkisi.....	39
5.3. Aktif Kömürün Etkisi.....	40
5.4. Işığın Etkisi.....	40
5.5. Soğuk Uygulamasının Etkisi.....	41
KAYNAKLAR	42

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

STARKSPUR GOLDEN DELICIOUS ELMA ÇEŞİDİNDE ŞEKER, AKTİF KÖMÜR ve IŞIĞIN *in vitro* ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Nurhan KÖSALİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hatice DUMANOĞLU

Tek çekirdekli mikrosporların bulunduğu çiçek tomurcukları bahçedeki ağaçlardan ve tetrat safhasından önce +4°C' de 6 hafta soğuk uygulaması yapılan dallardan alınmıştır. %20'lik sodyum hipokloritte 20' sterilize edilen tomurcuklardan alınan anterler, %0.7 agarla katılaştırılmış ve 1 mg/l IAA ve kinetin, %3 ve %6 sakkaroz ve glikoz ile %0.10, 0.15 ve 0.30 aktif kömür kombinasyonlarını içeren MS (1962) temel besin ortamında (pH 5.8) kültüre alınmışlardır. Kültürler 25±2°C' de ve devamlı karanlık ve 16 saat fotoperiyotta (2000 lüks), ayrıca 4 hafta karanlıktan sonra 16 saat fotoperiyotta (2. yıl) inkübasyona alınmıştır.

Hem aktif kömürsüz ve hem de %0.10 aktif kömür içeren besin ortamlarında kültüre alınan soğuk uygulaması yapılmış tomurcuklarda 2 adet (%0.17) globular embriyoid oluşmuştur. Ancak bu ortamlarda embriyoidler bir gelişme gösterememiş ve aktif kömürsüz ortamdaki anterlerin büyük bir çoğunluğu da kararak daha sonra ölmüşlerdir. Soğuk uygulaması yapılmayan anterlerde kallus ve embriyo oluşmamıştır. %3 sakkaroz ile %0.10 ve %0.15 aktif kömür içeren ortamlar, karanlık koşullarda anter canlılık oranını ve kallus oluşturan anter oranını artırmıştır.

2000, 44 sayfa

ANAHTAR KELİMELE: *Malus comminus* L., *in vitro* androgenesis, şeker, ışık, aktif kömür, soğuk uygulaması

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF SUGAR, ACTIVATED CHARCOAL AND LIGHT ON *in vitro* ANDROGENESIS OF STARKSPUR GOLDEN DELICIOUS APPLE CULTIVAR

Nurhan KÖSALİ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Doç. Dr. Hatice DUMANOĞLU

Flower buds were taken at the uninucleated microspore stage from trees grown in the orchard and bud woods stored at +4°C for 6 weeks before reaching the appropriate stage for anther culture. Extracted anthers from sterilized buds with 20% sodium hypochlorite for 20 min. were transferred into petri dishes containing MS (1962) basal medium (pH 5.8, 0.7% agar) supplemented with 1 mg/l IAA and kinetin, 3 and 6% sucrose and glucose without and with activated charcoal (0.10, 0.15, 0.30%) for embryo induction. Culture were incubated at 25±2°C under continuous dark, 16 h photoperiod (cool white florescent, 2000 lux) and 16 h photoperiod after 4 weeks in the dark.

Two globular embryoids (0.17%) were obtained only from cold pre-treated anthers cultured on the media without and with activated charcoal (0.10%). In medium without activated charcoal nearly all the anthers started to brown soon after inoculation, then died. 0.10 and 0.15% activated charcoal increased anther viability and callus formation rate with 3% sucrose under continuous dark condition. Non pre-treated anthers failed to produce callus and embryo.

2000, 44 pages

Key Words: *Malus comminus* L., *in vitro* androgenesis, sugar, light, activated charcoal, pre-treatment

TEŞEKKÜR

Son yıllarda hızla gelişmekte olan doku kültürleri tekniğinin uygulama alanlarından birisi olan “anter kültürü” konusunda, beni çalışmaya yönlendiren başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yücel GÜLŞEN (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi) olmak üzere, çalışmalarımın bir kısmını oluşturan sitolojik gözlemlerin yapılmasında ve fotoğraflarının çekilmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Doç. Dr. Birhan MARASALI (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi)' ya, çalışmalarım sırasında değerli görüşleri ile beni yönlendiren Sayın hocam Doç. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi)' na, laboratuvar çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm Laboratuvar teknisyeni Handan KIRBAŞ (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi)' a ve çeşitli konularda yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dilek DEĞİRMENCİ (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi) , Arş. Gör. Ali Murat TATAR (Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi), Arş. Gör. Sıddık KESKİN (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi), Esin AKKUZU ve Kadir Ufuk SARIYÜZ' e, ayrıca çalışmalarım sırasında her zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

Nurhan KÖSALİ
Ankara, 2000

SİMGELER DİZİNİ

BA	Benzil adenin
BAP	Benzil amino purin
°C	Celcius
g/l	Gram / litre
HCl	Hidroklorik asit
IAA	indol -3- asetik acid
IBA	indol -3- butyric acid
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyaceticacid
mg/l	Miligram / litre
μ	Mikron
μM	Mikromol
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog (1962)
N	Normalite
NAA	Naphthalene acetic acid
NaOH	Sodyum hidroksit
ppm	Milyonda bir kısım

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Besin ortamlarını hazırlama şeması.....	15
Şekil 4.1. Tek çekirdekli mikrosporların bulunduğu çiçek tomurcuğu (Boy: 4.62 mm, en: 6.39 mm)	19
Şekil 4.2. Tek çekirdekli mikrosporları içeren anterlerin bulunduğu çiçek tomurcuğundaki 1., 2. ve 3. çiçekler (Boy ve enleri sıra ile 11.36–3.40 mm, 9.94-2.55 mm, 9.94-2.41 mm).....	19
Şekil 4.3. Filamentleri kesilerek dikime hazırlanmış 1. çiçekten alınan ve tek çekirdekli mikrosporları taşıyan anter (Boy: 0.71mm , en: 0.56 mm)	20
Şekil 4.4. Tetrat safhasında ve serbest tek çekirdekli mikrosporlar (Asetokarmin yöntemi).....	20
Şekil 4.5. Tetrat safhasındaki mikrosporlar (Parafin yöntemi).....	21
Şekil 4.6. Tek çekirdekli serbest mikrosporlar (Parafin yöntemi).....	21
Şekil 4.7. Kültüre alınan anterlerde karama.....	23
Şekil 4.8. % 6 glikoz içeren ortamda 1. çiçeğe ait anterden oluşan embriyoid	24
Şekil 4.9. %3 sakkaroz içeren ortamlarda 8/16 saat fotoperiyotta mikrospor orijinli kallus oluşumu.....	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Starkspur Golden Delicious elma çeşidinde çiçek tomurcuğu, çiçek ve anterlerin boy ve en değerleri (1998).....	17
Çizelge 4.2. Starkspur Golden Delicious elma çeşidinde çiçek tomurcuğu ile çiçek ve anter büyüklükleri arasındaki korelasyon katsayıları	18
Çizelge 4.3. Aktif kömürsüz ortamlarda kültüre alınan anterlerde sakkaroz ve glikoz ile aydınlatmanın etkileri.....	23
Çizelge 4.4. %0.10 aktif kömürlü ortamlarda kültüre alınan anterlerde sakkaroz ve glikoz ile aydınlatmanın etkileri.....	25
Çizelge 4.5. % 0.15 aktif kömürlü ortamlarda kültüre alınan anterlerde sakkaroz ve glikoz ile aydınlatmanın etkileri	26
Çizelge 4.6. % 0.30 aktif kömürlü ortamlarda kültüre alınan anterlerde sakkaroz ve glikoz ile aydınlatmanın etkileri	28
Çizelge 4.7. % 0.10 aktif kömür ve % 3 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri	30
Çizelge 4.8. % 0.10 aktif kömür ve % 6 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri	31
Çizelge 4.9. % 0.15 aktif kömür ve % 3 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri	33
Çizelge 4.10. % 0.15 aktif kömür ve % 6 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri	34
Çizelge 4.11. % 0.30 aktif kömür ve % 3 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri	36
Çizelge 4.12. % 0.30 aktif kömür ve % 6 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri	37

1. GİRİŞ

Ülkemizin elma gen merkezleri içinde yer almasına, bu nedenle çeşit ve tip zenginliğine sahip olmamıza rağmen, melezleme ıslahı çalışmaları yok denecek kadar azdır. Yabancı döllenmenin yaygın olduğu elma gibi çok yıllık bitkilerde heterozigot genetik yapı nedeniyle melezleme ıslahı uzun yıllar sürmektedir. Günümüzde ıslah sürecinin kısaltılmasında, embriyo ve anter kültürü gibi *in vitro* tekniklerden yararlanılmaktadır.

Anter kültürü, özellikle ıslah amaçlı çalışmalarda başvuru ve birçok yarar sağlayan bir doku kültürü yöntemidir. Anter kültürü, erkek eşey hücrelerinin (mikrogamet) oluşumu sırasında, anterlerin kültüre alınması ve bu kültür ortamında genç mikrosporların (tek çekirdekli) mitoz bölünme ile haploid kromozom sayısına sahip embriyolar oluşturması ve bu embriyoların bitkiye dönüşümünün sağlanmasıdır. Anter kültürünün diğer *in vitro* haploid bitki elde etme yöntemlerine göre avantajı, uygun bir *in vitro* kültür sistemi ortaya konabildiğinde, bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir.

Anter kültürü ile haploid bitkilerin elde edilmesinin heterozigot bitkilerin ıslahında önemli bir yeri vardır. Haploid bitkilerin yarıya indirgenmiş kromozom sayıları, kimyasal maddeler uygulanarak katlanabilir ve 1-2 generasyonda % 100 homozigot hatlar elde edilebilir. Oysa homozigot hatların geleneksel ıslah yöntemleri ile eldesi, kendine dölenen bir yıllık bitkilerde bile, 6-7 generasyon sonunda gerçekleştirilmektedir (Abak 1983).

Tek yıllık ve otsu bitki türlerinde doku kültürü tekniklerinden yararlanmak daha kolay olurken, meyve ağaçları gibi çok yıllık ve odunsu bitkilerde doku kültürü yöntemlerinin uygulanmasında karşılaşılan sorunlar oldukça büyüktür. Kullanılan yöntem aynı olsa bile, alınan sonuçlar türlere göre farklılık göstermekte ve hatta aynı tür içindeki çeşitlerin anterleri bile farklı reaksiyon göstermektedir (Günver 1994). Bu nedenle, meyve türlerinde *in vitro* androgenesis üzerinde yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır ve anter kültüründen yararlanabilmek için, tür ve hatta çeşit bazında başarıyı etkileyen faktörlerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, çok verimli, kaliteli, adaptasyon yeteneği yüksek, muhafaza süresi uzun bir çeşit olan Starkspur Golden Delicious elma çeşidinin anter kültüründe şeker, aktif kömür ve ışığın, ayrıca bazı literatürlerde olumlu

etkisinden söz edilen tomurcuklara soğuk uygulamasının, androgenesis üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Erkek gametten haploid bitki elde etme çalışmalarının ilki Tulecke (1953) tarafından *Ginkgo biloba* bitkisinde gerçekleştirilmiştir. Tulecke, bu çalışmasında olgun polen tanelerinin, uygun ortam sağlandığında haploid kallus oluşturduğunu gözlemiştir (Dodds ve Roberts 1985). Bu ilk haploid dokunun, olgun polen tanelerindeki vegetatif çekirdeğin birbiri ardına bölünmesi sonucunda meydana geldiğini belirleyen araştırmacı, bunun ardından *Taxus* ve *Toreya nucifera* polenlerinden de haploid bitkiler elde etmeyi başarmıştır (Karakullukçu 1991). Bu öncü çalışmalardan sonra Guha ve Maheshwari (1964), kültüre aldıkları *Datura* anterlerinden embriyoya benzer yapılar elde etmişler ve bunların orijininin olgunlaşmamış polen taneleri olduğunu belirlemişlerdir (Gönülşen 1987, Karakullukçu 1991). Bourgin ve Nitsch (1967)' in *Nicotiana glauca* ve *N. tabacum* anterlerinden haploid bitki elde etmelerinden sonra genetikçilerin ve ilahçıların bu konu ile ilgili çalışmaları hızla artmıştır (Nitsch 1981).

Meyve ağaçlarında *in vitro* haploidizasyon çalışmaları 1970'li yılların başlarında anter kültürü ile başlamış, ancak etkili pek çok faktör nedeniyle çok az sayıda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen başlıca faktörler, bitkinin genotipik özellikleri, donör bitkinin yetiştirilmesi, anterlerin alınma zamanı, yapılan ön uygulamalar, besin ortamının fiziksel yapısı ve kimyasal bileşimi, tekniğin uygulanması ve inkübasyon koşullarıdır.

Doku kültürü tekniklerinin tümünde genotip, sonucu etkileyen çok önemli bir faktördür. Anter kültüründe ise bu genotipin etkisi kendini daha çok hissettirmektedir.

Jordan (1974) farklı *Prunus* türleri, *Pyrus communis* L. ve *Ribes nigrum* L.'de anter kültürü çalışmaları yapmıştır. Araştırmacı *Ribes nigrum* L. ve *Prunus* türlerinde haploid kallus ve globular embriyolar elde etmiştir.

Zhang *et al.* (1990), 5 elma genotipinde yaptıkları anter kültüründe, kültür koşulları ne olursa olsun, Topred çeşidinden androgenik embriyo oluşumunu, Golden Delicious ve R₈-R₁₆ çeşitlerinde ise sadece kallus oluşumunu gözlemişlerdir. Starking çeşidinde ise androgenik embriyo uyarımı gerçekleşmiştir.

Hofer ve Schmidt (1994), 13 elma genotipinde yapmış oldukları anter kültüründe, sadece 7 elma genotipinde çok düşük oranlarda (%0.05-0.4) embriyoid oluşumu sağlayabilmişlerdir.

Hidano *et al.* (1995), 40 elma çeşidini ve anacını denemeye almışlar ve bunlardan 36' sının anterlerinden kallus, 23' ünden de adventif embriyoidleri elde edebilmişlerdir.

Zhang *et al.* (1990), elma anter kültürü çalışmalarında, ilk bitki rejenerasyonunun Fei ve Xue (1981) ile Xue ve Niu (1984) tarafından başarıldığını ve sözlü görüşme sonucu, elde edilen bütün androgenik bitkilerin, mixoploid olduklarını belirtmişlerdir.

Wu (1981) 2 Çin yaban elma çeşidinde (*Malus prunifolia*) yapmış olduğu anter kültüründe, meydana gelen kalluslardan rejenerasyon yolu ile haploid ve aneuploid bitkiler elde etmiştir.

Anterlerin alındığı donör bitkinin içinde bulunduğu fizyolojik durum ve bunu etkileyen ışık, gün uzunluğu ve sıcaklık gibi çevresel faktörler anter kültüründe başarıyı etkileyen önemli faktörlerdir (Dodds ve Roberts 1985). Donör bitkinin, çiçeklerin oluşumundan, polenin görülmesine kadarki dönem içerisinde çok iyi beslenmesi ve optimum ışık koşullarında muhafaza edilmesi iyi sonuç vermektedir (Nitsch 1981). Birçok bitki türünde, dış koşullarda yetiştirilen bitkilerden alınan anterler, kontrollü koşullarda yetiştirilen bitkilerden alınan anterlere göre daha iyi sonuç vermiştir. Yapay ışığın güneş ışığının yerini alması mümkün değildir. Bu nedenle Nitsch (1981), eğer donör bitkiler kapalı yerlerde yetiştirilecekse, yapay ışıkla desteklenen seraların tercih edilmesini önermektedir.

Göreceli düşük sıcaklıklarda yetiştirilen kolza bitkilerinin, yüksek sıcaklıklarda yetiştirilenlerden daha yüksek androgenik kapasiteye sahip oldukları belirlenmiştir (Bajaj 1983).

Nitsch (1981) anterlerin alınmasından 3-4 hafta önce donör bitkilere herhangi bir pestisit uygulamasından kaçınılması gerektiğini, bu uygulamalardan sonra anterler kültüre alındığında çok daha çabuk öldüklerini bildirmektedir.

In vitro androgenesisin uyartılmasında en önemli faktörlerden birisi, mikrosporların gelişme aşaması ile ilgili olarak, anterlerin kültüre alınma zamanıdır. Androgenese uygun mikrospor gelişim aşaması, ilk polen

mitozundan hemen önceki aşamadan mitoz sonrasına kadarki aşamadır. Genellikle en yüksek haploid bitki frekansı, içindeki mikrosporlar tek çekirdekli dönemde bulunan anterlerin kültüründen elde edilmektedir (Karakullukçu 1991).

Milewska-Pawliczuk ve Kubicki (1977), elmalarda yaptıkları anter kültüründe en uygun mikrospor gelişme aşamasının tek çekirdekli dönem olduğunu saptamışlardır.

Zhang *et al.* (1990), elmalarda yapılan bütün anter kültürü çalışmalarına dayanarak en uygun mikrospor gelişme aşamasının, tek çekirdekli dönem olduğunu bildirmişlerdir.

Ognjanov (1989) Springcrest ve Redhaven, Todorovic *et al.* (1992) ise Cresthaven ve Vesna şeftali çeşitlerinde yaptıkları anter kültüründe en uygun mikrospor gelişme aşamasının tek çekirdekli dönem olduğunu kaydetmişlerdir.

Hofer ve Hanke (1994), elma ve kirazlarda yaptıkları anter kültüründe, mikrospor gelişme safhasının androgenetik frekans üzerine etkisini incelemişler ve her iki bitkide de en yüksek kallus oluşum oranının tek çekirdekli safhanın başlarında olduğunu, elmalarda embriyoid oluşumunun ise sadece tek çekirdekli safhanın ortalarında vakuol oluşumundan önce gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Mauro *et al.* (1986), *V. vinifera* çeşitlerinden Cabernet Sauvignon üzüm çeşidinde 0.2-1.0 mm uzunlukta ve tetrat safhasındaki tek çekirdekli mikrosporları olan anterlerin, kültüre alınması ile haploid embriyo elde edilebildiğini bildirmişlerdir.

Langenbucher ve Alleweldt (1993) ile Pepescu *et al.* (1996), asmada anter kültürü için en uygun mikrospor gelişim aşamasının tek çekirdekli mikrospor aşaması olduğunu kaydetmişlerdir. Langenbucher ve Alleweldt (1993), ayrıca tek çekirdekli tetrat aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerin yaklaşık 0.3-0.5 mm uzunlukta beyazımsı yeşil renkte, şeffaf görünümlü anterler olduğunu belirtmişlerdir.

Androgenesinin temelinde yatan prensip, gamet olma yolunda ilerleyen mikrospor hücresinin gelişimini durdurmaktır. Yani bir cinsiyet hücresi somatik hücrelerde olduğu gibi bir bitki oluşturmak üzere yönlendirilmektedir. Androgenese doğru yöneliş, anterlerin çiçek

tomurcuğu içerisinde veya kültür ortamında düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmesiyle artmaktadır (Nitsch 1981). Anterlere soğuk uygulamasının anter reaksiyonuna olumlu etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak soğuk uygulaması sonucu zayıf anterler ve mikrosporlar ölmekte ve ölen bu anterler koyu bir renk almaktadır. Böylece, yalnızca yaşama gücü yüksek anterler kültüre alınmış olmaktadır. Diğer taraftan, düşük sıcaklıklarda, nişasta oluşumu bloke olduğundan, anterler içindeki mikrosporların birçoğunda, gelişme ilk mitoz safhasında durmaktadır. Soğuk uygulaması aynı zamanda anter duvarının ve özellikle de tapetum tabakasının yaşlanmasını geciktirmektedir (Hatipoğlu 1997).

Nitsch ve Norreel (1973)'in *D. innoxia* anterlerini 48 saat süreyle buzdolabında tutarak yaptıkları ön uygulamaların olumlu sonuçlar verdiğini belirlemelerinden sonra, soğuk uygulamaları ile ilgili denemeler yapılmaya başlanmıştır (Karakullukçu 1991).

Karakullukçu (1991) anter kültüründen daha yüksek oranda haploid bitkinin elde edilmesi için, türlere göre değişen çok çeşitli sıcaklık dereceleri (4-15°C veya daha yüksek 30-35°C) kullanılabildiğini belirtmektedir. Ancak meyve türlerinde yapılan anter kültürü çalışmalarında, yüksek sıcaklık dereceleri yerine düşük sıcaklık dereceleri daha çok kullanılmaktadır.

Zhang *et al.* (1990), 5 elma genotipinde yaptıkları anter kültürü çalışmasından elde ettikleri bütün embriyoların kültür öncesi 3-4°C' de 5-11 hafta tutulan tomurcuklardan alınan anterlerden meydana geldiğini, 5 haftadan az tutulan tomurcuklardan alınan anterlerde ise embriyo oluşumunun gerçekleşmediğini saptamışlardır. Ayrıca Golden Delicious ve Topred çeşitlerinde 2-4 hafta soğuk uygulaması yapılmış tomurcukların anterlerinde kallogenesisin önemli oranda arttığını gözlemişlerdir.

Hidano *et al.* (1995), soğuk uygulamasının elma anter kültürüne olumlu etki ettiğini bildirmişlerdir.

Hofer ve Hanke (1994), kirazlarda yaptıkları anter kültürü çalışmalarında, çiçek tomurcuklarını kültür öncesi 4°C' deki soğuk hava deposunda 6 hafta tutmuşlar ve bu uygulamanın androgenik reaksiyonu artırdığını bildirmişlerdir.

Langenbucher ve Alleweldt (1993), Riesling üzüm çeşidinde çiçek tomurcuğuna ve anterlere değişik sürelerde +4°C' de soğuk uygulaması yapmışlar ve en iyi sonucu sıvı besin ortamında 4 gün süreyle +4°C' de

bekletilen anterlerden elde etmişlerdir. Hiç soğuklatılmayan materyalde bitki oluşmazken, çiçek tomurcuklarının soğuklatılması ile 25, anterlerin soğuklatılması ile 40 adet bitki oluşmuştur.

Anter kültürü çalışmalarında sıvı veya katılaştırılmış besin ortamı kullanılmaktadır. Yeterli gaz değişimi olmadığı için, sıvı ortam genellikle çok başarılı olmamaktadır (Hatipoğlu 1997).

Katılaştırılmış ortamlarda yaygın olarak kullanılan madde agardır. Ancak, bu amaçla kullanılan agarların kalitesi çok farklıdır ve kültürler için zararlı bazı maddeleri içerebilmektedirler. Diğer taraftan agar, besin ortamı bileşenleri içinde en pahalı olanlarından birisidir. Bu nedenlerle, son yıllarda anter kültürü çalışmalarında agar yerine kullanılabilecek maddelerin araştırılmasına yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır (Hatipoğlu, 1997). Ancak bu tür çalışmalar daha çok buğday ve benzeri bitkilerde yapılırken, meyve türlerinde bu amaca yönelik çalışmalara rastlanmamıştır.

Besin ortamının bileşimi, anter kültüründe sadece başarıyı değil, aynı zamanda direkt veya indirekt (kallus) embriyoid oluşumunu da belirleyen bir faktördür (Bajaj 1983). Ancak, tüm *in vitro* çalışmalarda olduğu gibi anter kültüründe de tüm bitkilerde iyi sonuç verecek tek bir besin ortamının önerilmesi olanaksızdır. Temel besin ortamı olarak anter kültüründe en fazla kullanılan ortamlar MS (Murashige ve Skoog 1962), White (1943) ve Nitsch (1969) ortamlarıdır (Karakullukçu 1991).

Zhang *et al.* (1990), elmada anter kültürü üzerine yapılan bütün çalışmaları incelemiş ve *in vitro* androgenesis için en iyi sonuç veren ortamın MS temel besin ortamı olduğunu saptamışlardır.

Hem besin ortamının osmozunu düzenleyen hem de karbon kaynağı olan şeker, değişik familyalarda detaylı olarak incelenmesi gereken bir bileşendir. Normal olarak %2-4 oranında kullanılan sakkaroz, bir çok türde daha yüksek oranlarda (%6-12) kullanılmaktadır.

Milewska – Pawliczuk (1978), değişik sakkaroz konsantrasyonlarının (5-120 g/l) etkisini araştırdığı elma anter kültüründe, 30 g/l sakkarozun androgenesis için en uygun konsantrasyon olduğunu, düşük sakkaroz konsantrasyonlarında anterlerin yaşama oranının düştüğünü, yüksek sakkaroz konsantrasyonlarının ise yoğun kallus oluşumuna neden olduğunu saptamışlardır (Milewska – Pawliczuk 1990).

Zhang *et al.* (1990), 5 elma genotipinde yaptıkları benzer çalışmada sadece %3 sakkaroz içeren ortamda embriyoid oluştuğunu, fakat %3'den %12'ye yükseltilen sakkaroz konsantrasyonunun, Topred ve Golden Delicious çeşitlerinde kallogenesis oranını azalttığını belirlemişlerdir.

Rajasekaran ve Mullins (1983), Yae *et al.* (1990), Langenbucher ve Alleweldt (1993) ise, *V. vinifera*'da kallus oluşumu için %2 sakkaroz dozunun uygun olduğunu, embriyoid oluştuktan sonraki aşamalarda ise %3 sakkaroz dozunun iyi gelişme sağladığını bildirmişlerdir.

In vitro androgenesisin başarısı için hormonlar, ortama ilave edilecek anahtar maddelerdir. Hormonlar, özellikle oksin ve sitokininler, androgenik gelişmeyi uyarma konusunda en fazla etkiye sahip organik maddelerdir. Ortamda oksinlerin bulunması, hızlı hücre çoğalması ve kallus oluşumuna neden olmaktadır. Birçok bitki türünde 2,4-D, sitokininlerle kombine halde kullanıldığında, embriyogenesi uyarmaktadır. Ancak ilk uyarıcı etkiden sonra embriyoların gelişmesini engelleyici etki yapması nedeniyle kültürün ilerleyen aşamalarında oksinsiz ortamlar kullanılmaktadır (Karakullukçu 1991). Sitokininler, özellikle gelişmenin ileri safhalarında embriyoidlerin bitkicik haline dönüştüğü dönemde, etkin bir rol oynarlar. Bu amaçla çok çeşitli sitokininler kullanılmakta, ancak kinetin ve benzilaminopürin (BAP) birçok türde sıklıkla kullanılan sitokinin olma özelliğini korumaktadırlar (Reinert ve Bajaj 1977).

Milewska - Pawliczuk (1978), Jonathan elma çeşidinde yaptığı anter kültüründe farklı oksin ve sitokinin konsantrasyonlarını denemiştir. Çalışmada yüksek konsantrasyonlardaki IAA, 2,4 - D ve kinetinin, mikrospor gelişme aşaması ne olursa olsun, kallus oluşumuna yol açtığını, ayrıca 2,4 - D'nin kallus gelişimini uyarma yanında mikrosporların yaşama yeteneğini de azalttığını gözlemiştir. Sonuç olarak, androgenesis için en uygun oksin - sitokinin kombinasyonunun 1mg/l IAA ve 1 mg/l kinetin olduğunu bildirmiştir (Milewska - Pawliczuk 1990).

Zhang *et al.* (1990), kültür ortamındaki gerekli maddelerden özellikle hormonların değişiklik gösterdiğine dikkat çekmişler, Topred elma çeşidinde embriyoid oluşumunda en iyi sonucun 0.1 mg/l IBA ve 0.5 mg/l BA içeren MS ortamından alındığını bildirmişlerdir.

Shi *et al.* (1992), *Pyrus bretschneideri* cv. Jinfeng' de yaptıkları anter kültüründe tam ve yarı kuvvetteki MS ortamına IAA, BA ve kinetin eklemiştir. 4 hafta sonra, sadece 0.05-0.5 ppm IAA ve 0.5-2 ppm BA

ilave edilen yarı kuvvetteki MS ortamından, kallus oluşumu olmaksızın, embriyoidlerin elde edildiğini bildirmişlerdir.

Campbell üzüm çeşidinin (*V. vinifera*) anter kültüründe altı değişik besin ortamının etkilerini inceleyen Yae *et al.* (1990) sadece Murashige ve Tucker ortamı ile Nitsch ve Nitsch ortamında, 0.1 mg/l IBA + 1.0 mg/l BAP kombinasyonunda sarımsı yeşil ve sarımsı beyaz renkli kallus oluşumu gözlemişlerdir.

Altamura *et al.* (1992), *V. rupestris* du lot'un erkek çiçeklerinden izole ettikleri anterleri değiştirilmiş Nitsch ve Nitsch (1969) ortamında kültüre almışlardır. 5 µM 2,4 - D + 1 µM BAP içeren ilk ortamda 2-4 hafta içinde oluşan kallusları azalan oksin konsantrasyonlarına transfer etmiş, oksinsiz sıvı ortamda 3-4 hafta beklettikten sonra oksin ve sitokinin bulunmayan katı ortamda embriyoidlerin gelişimini sağlamışlardır.

Todorovic *et al.* (1992), şeftali çeşitlerinden Cresthaven ve Vesna' da Nitsch ve Nitsch ortamına değişik kombinasyonlarda ve konsantrasyonlarda büyümeyi düzenleyici maddeler eklemişlerdir. Ortama 1 mg/l zeatin + 1mg/l 2,4-D + 1 mg /l IAA veya NAA eklenmesiyle en yüksek kallus oluşumunun meydana geldiğini kaydetmişlerdir.

Ognjanov (1989) da Springcrest ve Redhaven şeftali çeşitlerinin anter kültüründe Nitsch ve Nitsch (1969) ortamını kullanmıştır. Yarı kuvvetindeki Nitsch ve Nitsch ortamına %10 oranında ilave ettiği patates ekstraktının etkisini de incelediği araştırmasında, maksimum kallus oluşum frekansının (%68 Springcrest ve %51 Redhaven) karanlıkta ve patates ekstraktı eklenmeyen, 1.5 mg/l 2,4 -D ve 0.25 mg/l zeatin ilave edilmiş tam kuvvetindeki ortamda sağlandığını bildirmiştir.

Tütün ve buğdayda besin ortamına ilave edilen patates ekstraktı, anter kültüründe oluşan haploid bitki frekansını artırırken (Hatipoğlu 1997), elmada patates ekstraktı ilave edilmiş ortamda kallus uyarımı dahi olmamıştır (Hofer ve Hanke 1990).

Bazı durumlarda kültür ortamında nitrojen kaynağı bileşikler ve amino asitlerin kullanıldığı da görülmektedir. Mauro *et al.* (1986), *V. vinifera* çeşitlerinden Cabernet Sauvignon'da değiştirilmiş MS besin ortamına kazein hidrozilat, glutamin ve adenin eklenmesinin kallus ve embriyo oluşumunu artırdığını belirtmişlerdir.

Besin ortamına aktif kömür katılması, birçok bitki türünün anter kültüründe başarıyı artıran bir faktör olarak belirlenmiştir. Aktif kömür, kültüre alınan dokulardan kaynaklanan büyümeyi engelleyici maddeleri absorbe eder, istenmeyen kallus gelişimini engeller, morfogenezis ve ebriyogenesisi uyarır. Ayrıca besin ortamının otoklavda sterilizasyonu sırasında, kültüre alınan dokuların ilk kültür aşamasında ve gelişmenin ilerleyen dönemlerinde ortamda bulunan toksik maddelerin absorbe edilmesini sağlar (George ve Sherrington 1984). Karakullukçu (1991)'ya göre aktif kömürün anter kültüründeki en olumlu etkisi, anter duvarındaki fenolik bileşikleri absorbe etmesidir.

Zhang *et al.* (1990), %0.5 oranında kültür ortamına ilave edilen aktif kömürün 5 elma genotipinin anter kültüründe somatik kallus oluşum limitini ve embriyo çıkışını hızlandırdığını kaydetmişlerdir.

Hidano *et al.* (1995), 40 elma çeşidinde yaptıkları anter kültürü çalışmalarında 3g/l aktif kömürün olumlu etki yaptığını bildirmiştir.

Ortam pH'sı ile ilgili verilere göre anter kültürü için uygun pH değerleri genel olarak 5.6 – 5.8' dir. Milewska – Pawliczuk (1978) elmada yaptığı anter kültürü çalışmalarında, değişik pH değerlerinin (5.4-6.4) etkilerini incelemiş ve androgenesis için en iyi pH derecesinin 5.8 olduğunu, daha düşük ya da daha yüksek pH değerlerinin androgenesisi engelleyici bir etki yaptığını saptamıştır (Milewska – Pawliczuk 1990).

Anterlerin tomurcuktan kesilip alınması ve besin ortamı üzerine yerleştirilme şekli, kültürün başarısında önemli bir etkiye sahiptir. Anterlerin tomurcuktan çıkartılması sırasında zararlanmamasına özen göstermek gerekmektedir. Bistüri veya pens tarafından yaralanmış anterlerde somatik dokulardan kallus oluşumu ile sık sık karşılaşmaktadır. Ayrıca filamentlerinde aynı nedenle anterden uzaklaştırılması gerekmektedir (Reinert ve Bajaj 1977).

Sopory ve Maheshwari (1976), *Datura innoxia* bitkisinde ortam üzerine değişik pozisyonlarda yerleştirilen anterlerden dorsal tarafı ortam yüzeyine yerleştirilenlerden en yüksek oranda embriyoid elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar anterlerin bir kısmının dik veya yatay konumda agarlı ortama batırılmasının oksijen yetersizliğine neden olabildiğini ve gelişmeyi engellediğini de gözlemişlerdir (Karakullukçu 1991).

İnkübasyon aşamasında ışık gereksinimi ve ışığın haploid bitki üretimindeki etkisi tam olarak netlik kazanmamakla birlikte, inkübasyon süresi boyunca sürekli aydınlatmanın (24 saat) genellikle engelleyici etki yaptığı bildirilmektedir (Karakullukçu 1991).

Hofer ve Hanke (1990), değişik elma genotiplerinde yaptıkları anter kültüründe, kültürleri 26°C' de karanlık ve aydınlıkta inkübasyona almışlar, androgenik anter yüzdesinin karanlıkta önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir.

Reinert ve Bajaj (1977), uygun sıcaklık düzeylerinin genellikle 24-27°C olduğunu, ancak birçok türde sıcaklığın 30°C'ye yükseltilmesiyle daha olumlu sonuçlar alınabildiğini belirtmişlerdir. Milewska-Pawliczuk (1990) elmalarda androgenesisin uyarımı için en iyi sıcaklığın 20-25°C olduğunu belirlemiştir.

Zhang *et al.* (1990), 5 elma genotipinde yaptıkları anter kültüründe kültürleri 23±2°C' de 4 hafta karanlıkta tuttukten sonra 16 saatlik fotoperiyoda almışlar ve embriyoid oluşumunu gerçekleştirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Araştırma, 1998-1999 yıllarında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Sitoloji ve Biyoteknoloji laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bahçesi'nde yetiştirilen Starkspur Golden Delicious elma çeşidinin anterleri kullanılmıştır. Androgenesis için en uygun safha olan tetrat ve tek çekirdekli mikrosporları taşıyan anterler kültüre alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ön uygulama

Zhang *et al.* (1990), elmalarda yaptıkları anter kültürü çalışmalarında çiçek tomurcuklarına uygulanan soğuk uygulamasının (3-4°C' de 5-11 hafta) olumlu sonuçlar verdiğini kaydetmişlerdir. Bu amaçla ve ayrıca anterlerdeki mikrospor gelişmesini izleyerek androgenesis için en uygun olan tek çekirdekli mikrosporlara sahip anterlerin bulunduğu çiçekleri ve tomurcukları morfolojik olarak belirlemek için ilk yıl 13.03.1998, ikinci yıl 30.03 1999 tarihinde ağaçlardan dallar kesilerek içinde su bulunan steril cam kavanozlarda +4°C' deki soğuk hava deposuna konmuş ve kavanozlardaki su her gün değiştirilmiştir.

İkinci yıl ayrıca tomurcuklara soğuk uygulamasının etkisini daha iyi belirleyebilmek amacıyla bahçeden alınan çiçek tomurcuklarındaki anterler (soğuklatılmamış) kontrol olarak kültüre alınmıştır.

3.2.2. Androgenesis için uygun çiçek tomurcuğu, çiçek ve anterlerin belirlenmesi

+4°C' deki soğuk hava deposuna konan dallardan birer hafta aralıklarla tomurcuk örnekleri alınarak binoküler mikroskopta oküler mikrometre ile tomurcukların ve bu tomurcuklar içindeki çiçeklerin en ve boyları ölçülmüştür. Ölçümleri yapılan çiçeklerden alınan anterlerin de en ve boyları ölçülmüş, ezme ve parafin yöntemi ile hazırlanan preparatlarda mikrospor gelişmesi incelenerek, tomurcuk, çiçek ve anter gelişme

düzeyleri ile mikrospor gelişme safhaları arasındaki korelasyon incelenmiştir.

3.2.3. Mikrospor gelişme dönemlerinin belirlenmesi

Farklı büyüklükteki çiçek tomurcuklarından çıkarılan çiçeklerden alınan anterlerdeki mikrospor gelişme dönemlerini belirlemek amacıyla parafin ve ezme yöntemlerinden yararlanılmıştır.

Parafin yönteminde örneklerin dehidrasyonu aşamasında kullanılan etil alkol+ksilol serileri Algan (1981)'a göre hazırlanmış, diğer işlemler Johansen (1940)'e göre yürütülmüştür. Dehidrasyon işleminden geçirilen çiçeklerin parafine doyurulması amacıyla ilk aşamada 45-47°C' de eriyen parafin kullanılmış, daha sonraki günlerde 57-60°C sıcaklıkta eriyen saf parafinle doyurma işlemi tamamlanmıştır. Parafine gömülen ve tahta bloklar üzerine yapıştırılan çiçeklerden Rotary (döner kollu) mikrotom ile 10µ kalınlığında enine kesitler alınmıştır. Seri halindeki bu kesitlerin lama yapıştırılmasında gliserin-albümin karışımı (1:1) kullanılmıştır. Boyamada Johansen (1940) de belirtilen %0.5'lik hematoksilin ile birlikte %2 ve %3'lük ferrik amonyum sülfat (mordan) çözeltilerinin kullanıldığı 'Heidenhain demirli hematoksilin' tekniği kullanılmıştır. Boyama işleminden sonra preparatlar saf sudan başlayarak derece derece yükselen etil alkol, etil alkol+ksilol ve saf ksilol serilerinden geçirildikten sonra Entellan kullanılarak 24x32 mm boyutlarındaki lamellerle kapatılmışlar ve sabit preparat haline getirilmişlerdir.

Ezme yönteminde çiçek tomurcukları Farmer tespit çözeltilisinde (3 kısım etil alkol : 1 kısım glisial asetik asit) 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiş, bu sürenin sonunda %70' lik etil alkol içinde birkaç kez çalkalandıktan sonra yine %70' lik etil alkol doldurulan küçük cam şişelerde saklanmıştır. Tomurcuklardan alınan anterler bir lam üzerine konarak bir damla % 1' lik asetokarmın damlatılmış ve bir cam baget yardımıyla anterler ezilerek mikrosporlar serbest hale getirilmiştir. Ok ucu iğne ile anter duvarları alındıktan sonra damla üzerine yavaşça lamel kapatılıp ispiro ocağında birkaç kez kaynatmadan ısıtılmıştır. Preparatın üzerine bir kurutma kağıdı konup hafifçe bastırılarak boyanın fazlası alınmıştır. Boyama işlemi tamamlanan preparatlar mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.4. Materyalin dezenfeksiyonu ve dikim

Soğuk hava deposunda 6 hafta tutulan dallardan birinci yıl 24.04.1998 tarihinde, ikinci yıl 10.05.1999 tarihinde; bahçedeki dallardan ise 15.04.1999 tarihinde, daha önce belirlenen uygun büyüklüğe gelmiş çiçek tomurcukları alınarak laboratuvara getirilmiştir.

Dikimden önce çiçek tomurcukları, birkaç damla Tween 20 eklenmiş %20' lik Sodyum hipokloritde 20 dakika dezenfekte edildikten sonra üç kez beşer dakika süreyle steril saf su ile durulanmıştır. Dezenfeksiyonu tamamlanmış çiçek tomurcukları steril koşullarda penset ve ok uçlu iğne yardımıyla açılmış ve anterleri alacak çiçekler bistüri ile kesilerek alınmıştır. Bu çiçeklerden anterlerin alınması binoküler mikroskop altında yapılmış ve anterler dorsal yüzeyi besin ortamı ile temas edecek, fakat çok kısa kesilmiş filamentleri besin ortamı ile temas etmeyecek şekilde petrilerdeki besin ortamları üzerine yerleştirilmiştir.

Birinci yıl denemelerinde değişik gelişme safhasındaki mikrosporları taşıyan anterlerin, kültüre alındıklarında nasıl bir gelişme göstereceklerini gözlemlemek amacıyla, çiçek tomurcuğundaki ilk 4 çiçeğin anterleri kültüre alınmıştır.

Bir tomurcuktan çıkarılan ilk dört çiçeğe ait 10'ar adet anter bir petride kültüre alınmış ve anterlerin petriye yerleşiminde aşağıdaki yöntem izlenmiştir. Petrilerin altına kalemle birbirine dik iki çizgi çizilerek besin ortamı 4 eşit alana bölünmüş ve her bölme 1, 2, 3 ve 4 rakamları yazılmıştır. Tepe çiçeğinin anterleri 1. bölmeye dikilmiş, diğerleri bu sırayı takip etmiştir. Böylece bir petri kabına 4 çiçeğe ait 40'ar adet anter yerleştirilmiştir. Birinci yıl denemelerinde kallus ve az da olsa embriyo oluşumunun tek çekirdekli mikrosporların bulunduğu anterleri içeren birinci çiçekten gerçekleştiği görüldüğünden, ikinci yıl denemelerinde çiçek tomurcuklarından yalnızca birinci çiçeğe (tepe çiçeği) ait anterler kültüre alınmıştır. Her çiçekten 15 anter alınmış ve bunlar boylarına göre üç gruba ayrılarak alt tarafından çizgilerle 3 eşit parçaya ayrılan petri kaplarına her bölme 5' er anter gelecek şekilde dikilmiştir.

Dikim işlemi tamamlanan petriler kapak kenarları stretch film ile sarılarak inkübasyon odasına alınmışlardır. İzolasyon ve dikimde kullanılan penset ve bistüriler çalışma sırasında her kullanımdan önce %96'lık etil alkole batırılmış ve hemen ardından aleve tutularak sterilize edilmiştir.

3.2.5. Besin ortamının hazırlanması

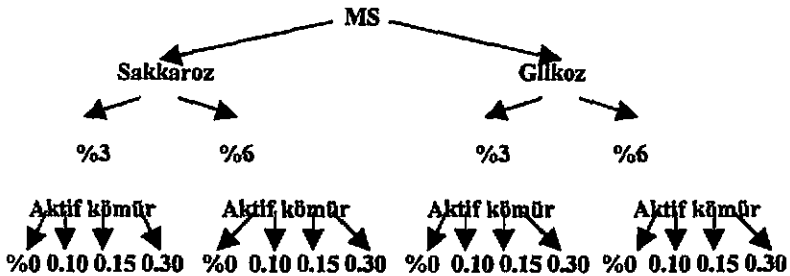
Besin ortamı olarak, yapılan çalışmalarda en uygun olduğu belirtilen, MS ortamı kullanılmıştır (Nakayama *et al.* 1972, Milewska-Pawliczuk ve Kubicki 1977, Fei ve Xue 1981, Xue ve Niu 1984, Johansson *et al.* 1987, Zhang *et al.* 1990, Milewska-Pawliczuk 1990, Hofer ve Hanke 1990, Hofer 1995).

Bütün denemelerde Milewska-Pawliczuk ve Kubicki (1977) ile Milewska-Pawliczuk (1990)'un androgenesis için uygun olduğunu bildirdiği 1 mg/l IAA ve 1mg/l kinetin kullanılmıştır.

Elma anter kültüründe besin ortamına katılan şeker ve aktif kömürün androgenesis üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla besin ortamlarına şekil 3.1' de görüldüğü gibi %3 ve %6 dozlarında sakkaroz ve glikoz, % 0, 0.10, 0.15 ve 0.30 aktif kömür ilave edilmiştir.

Ortamın pH' sı 1 N HCl ve 1 N NaOH yardımıyla, elma anter kültüründe olumlu sonuçlar verdiği bildirilen 5.8' e ayarlanmış (Milewska-Pawliczuk ve Kubicki 1977, Milewska-Pawliczuk 1990) ve %0.7 oranında agar ilave edilerek otoklavda 121 °C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir (Street 1973).

Kültür kabı olarak 8 cm çapındaki cam petri kapları kullanılmıştır. Petriler yıkandıktan sonra paketlenmiş halde 121°C' de 1 saat süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Besin ortamları, otoklavdan çıkartıldıktan sonra steril kabin içerisine alınmış ve hemen steril petri kaplarına eşit miktarlarda (15ml) dağıtılmıştır. Petriler stretch filmle sarılarak, enfeksiyon kontrolleri için, dikimden önce birkaç gün steril kabinde tutulmuştur.



Şekil 3.1. Besin ortamlarını hazırlama şeması

3.2.6. İnkübasyon koşulları

Kültürler, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ' de (Milewska-Pawliczuk 1990) ve floresans lambalarla 2000 lüks ışık şiddetinde aydınlatılan iklim odasında inkübasyona alınmışlardır. Işığın androgenesis üzerine etkisini incelemek amacıyla ilk yıl denemelerinde kültürler iki gruba ayrılmış, yarısı 8 saat karanlık 16 saat aydınlıkta (8/16 saat fotoperiyot), diğer yarısı ise sürekli (24 saat) karanlıkta geliştirilmişlerdir. İkinci yıl denemelerinde ise, bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan anterlerin dikildiği kültürler, ilk yıl denemelerinde olduğu gibi, 8/16 saat fotoperiyot ve 24 saat karanlıkta inkübasyona alınmıştır. Soğuk hava deposunda soğutulan tomurcuklardan çıkarılan anterler 3 gruba ayrılmış, 1. grup 8/16 saat fotoperiyot, 2. grup 24 saat karanlık, 3. grup ise Zhang *et al.* (1990)'a göre 4 hafta karanlıkta tutulduktan sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınmıştır. Anterler bu koşullarda birer ay aralıklarla aynı içerikteki yeni ortamlara şaşırtılmışlardır.

3.2.7. Gözlem ve değerlendirmeler

İlk yıl en az 5, ikinci yıl en az 3 tekerrürlü olmak üzere denemeler kurulmuştur. Kültürlerde enfeksiyon veya anter ölümleri nedeniyle tekerrürlerdeki anter sayıları eşit olmadığından istatistiki analizler yapılamamış, sonuçlar tekerrür ortalamalarından elde edilen verilere göre değerlendirilmiştir.

Kültüre alınan anterlerde canlılık oranları ile kallus ve embrioid oluşum oranları belirlenmiş, çok az sayıda embrioid oluşumu gerçekleştiğinden ve bu embrioidler gelişmediğinden, oluşan embrioidlerde kök, sürgün ve tam bir bitki oluşumu ile ilgili gözlem ve değerlendirmeler yapılamamıştır.

4. şaşırtmadan sonra kültürlerde hacim olarak genişleyen, renkleri sarı veya sarımsı kahverengine dönüşen anterler canlı; koyu kahverengine dönüşen, yumuşayan ve süngerimsi veya büzülmüş yapı gösteren anterler ise ölü olarak değerlendirilmiştir. Canlı anterlerin sayısı, kültüre alınan sağlıklı anter sayısına bölünüp 100 ile çarpılarak canlılık oranı belirlenmiştir. Embrioid oluşturan anter oranının belirlenmesinde embrioid oluşturan anterler, canlı anter sayısına bölünerek 100 ile çarpılmıştır. Kallus oluşturan anter oranlarının belirlenmesinde de aynı yol izlenmiştir. Kültüre alınan anterlerin bazılarının filamentlerinden kallus oluşmuşsa da, bu kalluslar diploid yapıda olduğu için gerek kallus oluşturan anter sayısının ve gerekse kallus oluşum oranının belirlenmesinde değerlendirmeye alınmamıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Mikrospor Gelişme Dönemlerinin Belirlenmesi

Sitolojik ve morfolojik incelemeler sonunda, tek çekirdekli mikrosporların 15.19 ± 0.08 mm boyunda ve 6.39 ± 0.10 mm enindeki çiçek tomurcuklarında bulunduğu (şekil 4.1.) ve bu tomurcuklardaki 1. çiçeklerin anterlerinin tek çekirdekli serbest mikrospora, 2. ve 3. çiçeklerin anterlerinin tetrat safhasındaki mikrospora sahip olduklarını ve 4. çiçeklerin anterlerindeki mikrosporların ise daha geri bir gelişme safhasında oldukları belirlenmiştir (şekil 4.2., 4.3., 4.4., 4.5. ve 4.6.). Çiçek tomurcuklarının, çiçek ve anterlerin boy ve enlerine ait değerler çizelge 4.1.' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Starkspur Golden Delicious elma çeşidinde çiçek tomurcuğu, çiçek ve anterlerin boy ve en değerleri (1998)

Parametreler	Boy (mm)	En (mm)
Çiçek tomurcuğu	15.19 ± 0.08	6.39 ± 0.10
1. çiçek	11.36 ± 0.07	3.55 ± 0.04
2. çiçek	10.65 ± 0.03	2.84 ± 0.04
3. çiçek	10.49 ± 0.03	2.82 ± 0.04
4. çiçek	9.66 ± 0.02	0.71 ± 0.02
1. çiçek anteri	0.85 ± 0.02	0.71 ± 0.02
2. çiçek anteri	0.57 ± 0.01	0.42 ± 0.01
3. çiçek anteri	0.56 ± 0.01	0.42 ± 0.01
4. çiçek anteri	0.42 ± 0.01	0.41 ± 0.01

Çiçek tomurcuğunun boyu ve eni ile çiçek ve anter boyu ve eni arasındaki korelasyon katsayıları incelendiğinde, çiçek tomurcuğu eni ile 1. çiçek eni ve çiçek tomurcuğu boyu ile 2. çiçeğin anter eni arasındaki korelasyon katsayılarının dışında diğer korelasyon katsayılarının istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir (çizelge 4.2.). Bu sonuç Starkspur Golden Delicious çeşidinde tek çekirdekli mikrosporları taşıyan anterlerin,

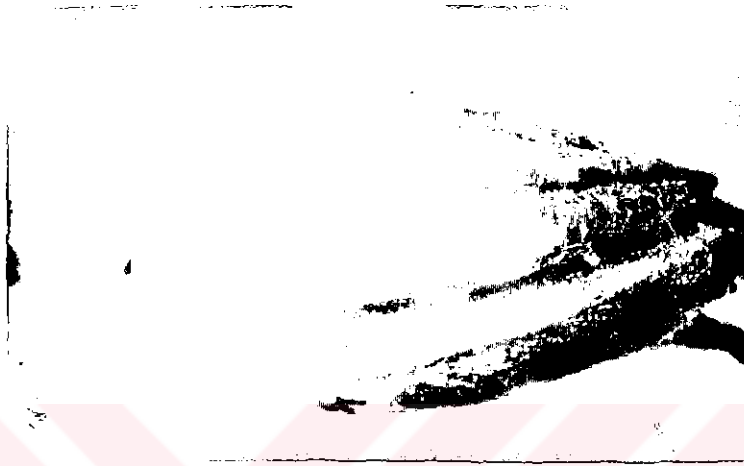
çiçeklerin veya çiçek tomurcuklarının büyüklükleri ile belirlenebileceğini göstermiştir.

Çizelge 4.2. Starkspur Golden Delicious elma çeşidinde çiçek tomurcuğu ile çiçek ve anter büyüklükleri arasındaki korelasyon katsayıları

Çiçek ve anterlerin En ve boyları (mm)		Çiçek tomurcuğu	
		Boy (mm)	En (mm)
1. çiçek	Boy	0.90**	0.63**
	En	0.50**	0.28
2. çiçek	Boy	0.91**	0.65**
	En	0.72**	0.62**
3. çiçek	Boy	0.84**	0.73**
	En	0.69**	0.72**
4. çiçek	Boy	0.87**	0.41*
	En	0.87**	0.49**
1. çiçek anteri	Boy	0.80**	0.72**
	En	0.79**	0.66**
2. çiçek anteri	Boy	0.82**	0.63**
	En	0.21	0.44*
3. çiçek anteri	Boy	0.77**	0.55**
	En	0.37*	0.66**
4. çiçek anteri	Boy	0.69**	0.62**
	En	0.65**	0.52**

$r_{0.05} = 0.36$ (* : $p < 0.05$)

$r_{0.01} = 0.46$ (** : $p < 0.01$)



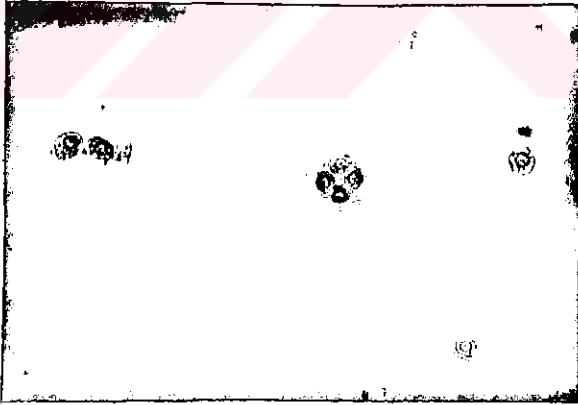
Şekil 4.1. Tek çekirdekli mikrosporların bulunduğu çiçek tomurcuğu (Boy: 14.62 mm, en: 6.39 mm)



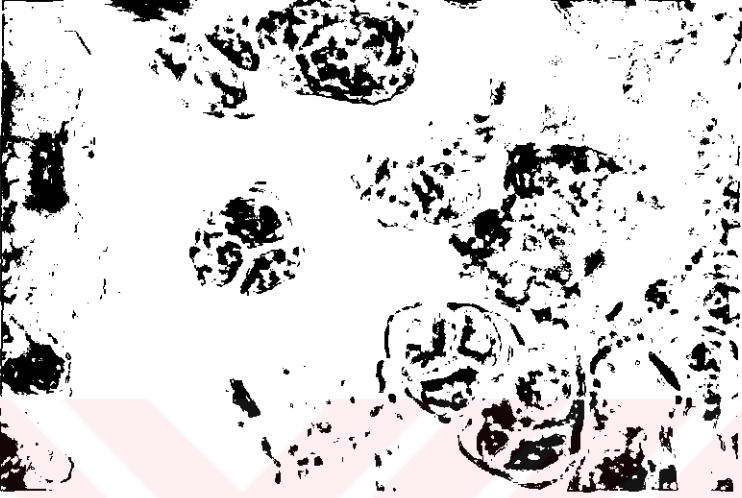
Şekil 4.2. Tek çekirdekli mikrosporları içeren anterlerin bulunduğu çiçek tomurcuğundaki 1., 2. ve 3. çiçekler (Boy ve enleri sıra ile 11.36-3.40 mm, 9.94-2.55 mm, 9.94-2.41 mm)



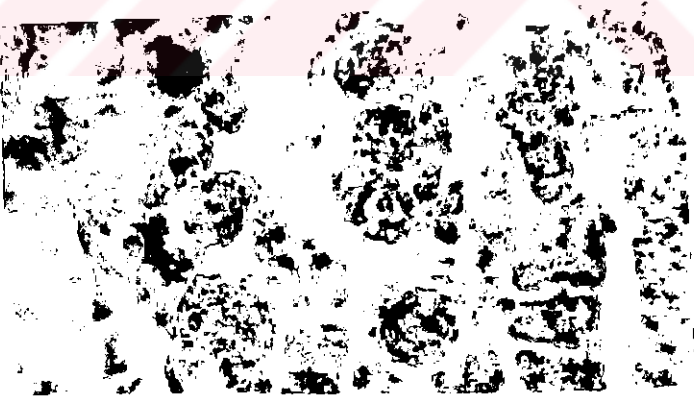
Şekil 4.3. Filamentleri kesilerek dikime hazırlanmış 1. çiçekten alınan ve tek çekirdekli mikrosporları taşıyan anter (Boy: 0.71 mm, en: 0.56 mm)



Şekil 4.4. Tetrat safhasında ve serbest tek çekirdekli mikrosporlar (Asetokarmin yöntemi)



Şekil 4.5. Tetrat safhasındaki mikrosporlar (Parafin yöntemi)



Şekil 4.6. Tek çekirdekli serbest mikrosporlar (Parafin yöntemi)

4.2. Birinci Yıl Deneme Sonuçları

+4°C' de 6 hafta soğuk uygulaması yapılan çiçek tomurcuklarından alınan ilk 4 çiçeğin anterlerinin kültüre alındığı ilk yıl denemelerinde, %3 ve %6' lık sakkaroz ve glikozun etkileri aktif kömürsüz ve aktif kömürlü ortamlarda ve 8/16 saat fotoperiyot ve sürekli karanlık koşullarda incelenmiştir.

4.2.1. Aktif kömürsüz ortamlardan elde edilen sonuçlar

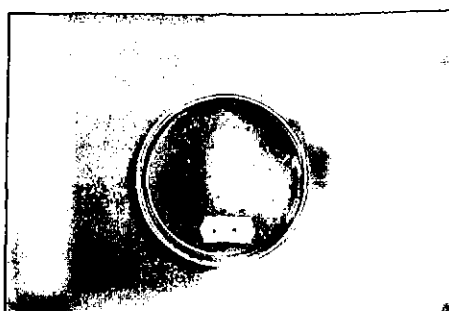
%3 ve %6 sakkaroz içeren ortamlarda kültüre alınan farklı gelişmedeki ilk 4 çiçekten alınan anterlerdeki gelişmeler toplu olarak incelendiğinde; 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanların tamamına yakın bir kısmında ilk kültür aşamasında kararma olmuş ve bu anterler daha sonraki şaşırtma ortamlarında canlılıklarını yitirmişlerdir (şekil 4.7.). Karanlıkta tutulan anterler, 8/16 saat fotoperiyotta tutulan anterlere göre daha az kararma göstermiş ve canlılık oranları %3 sakkaroz içeren ortamda %32.5, %6 sakkaroz içeren ortamda %41.7 olmuştur (çizelge 4.3.). Ayrıca karanlıktaki 1. çiçeğin anterlerinden %3 sakkaroz içeren ortamda 1, %6 sakkaroz içeren ortamda ise 6 adet anterin filamentlerinde kallus oluşumu gözlenmiştir.

1., 2., 3. ve 4. çiçeklerden kültüre alınan anterler ayrı ayrı incelendiğinde (çiçek bazında) en yüksek canlılık oranı %3 sakkaroz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyotta 4. çiçeğin anterlerinden (%2.6), karanlıkta 1. çiçeğin anterlerinden (%100) elde edilmiştir. %6 sakkaroz içeren ortamda ise, 8/16 saat fotoperiyotta 1. ve 2. çiçekten (%3.3), karanlıkta 4. çiçekten alınan anterler en yüksek canlılık oranını (%50) vermiştir.

Glikozun %3 ve %6' lık dozlarında aydınlık ve karanlığın etkisi incelendiğinde, 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınan anterlerin tümüne yakın bir kısmı, sakkarozlu ortamlarda olduğu gibi, kararmıştır. Karanlık ortamda 8/16 saat fotoperiyottaki anterlere göre canlılık oranı artmış, %3 glikoz içeren ortamda %48.3, %6 glikoz içeren ortamda ise %50.6 olmuştur. %3 glikoz içeren ortamda bir anterden (1. çiçeğe ait) kallus oluşmuştur. %6 glikoz içeren ortamda anterden kallus oluşmamışsa da, canlı kalan 3 anterin (1. çiçeğe ait) filamentlerinden yeşil renkte kallus oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca bu ortamdaki bir anterde (1. çiçeğe ait) 1 adet embriyoid oluşmuştur (şekil 4.8.).

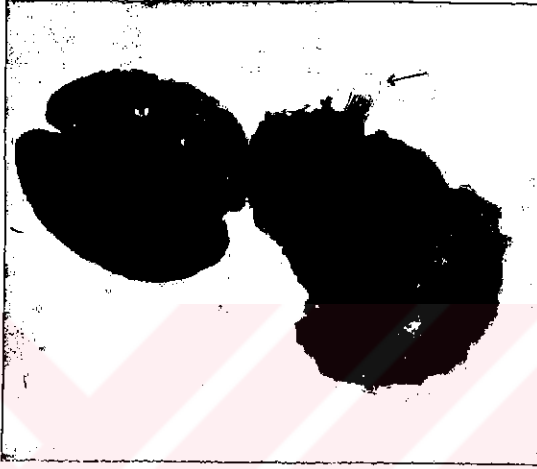
Çizelge 4.3. Aktif kömürsüz ortamlarda kültüre alınan anterlerde sakkaroz ve glikoz ile aydınlatmanın etkileri

Şeker dozları	%3		%6	
Aydınlık ve karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık
SAKKAROZ				
Dikilen anter sayısı	160	160	120	120
Canlı anter sayısı	1	52	2	50
Canlılık oranı (%)	0.6	32.5	1.6	41.7
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0
GLİKOZ				
Dikilen anter sayısı	120	120	160	160
Canlı anter sayısı	1	58	4	81
Canlılık oranı (%)	0.8	48.3	2.5	50.6
Kallus oluşturan anter sayısı	0	1	0	0
Kallus oranı (%)	0	1.7	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	1
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	1.2



Şekil 4.7. Kültüre alınan anterlerde kararma

Çiçek bazında en yüksek canlılık oranı %3 glikoz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyotta 4. çiçeğin (%4), karanlıkta 1. çiçeğin (%86) anterlerinden kaydedilmiştir. %6 sakkaroz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyotta 1. çiçeğin (%5), karanlıkta 2. çiçeğin (%56) anterlerinden elde edilmiştir.



Şekil 4.8. %6 glikoz içeren ortamda 1. çiçeğe ait anterden oluşan embriyoid

4.2.2. Aktif kömürlü ortamlardan elde edilen sonuçlar

Aktif kömür dozlarının etkileri besin ortamının şeker içeriğinin, aydınlık ve karanlığın etkileri dikkate alınarak incelenmiştir.

4.2.2.1. % 0.10 aktif kömürlü ortamlardan elde edilen sonuçlar

%3 sakkaroz içeren ortamda karanlık koşullardaki anterler (%41), 8/16 saat fotoperiyottaki anterlere göre (%24.5) daha yüksek canlılık oranına sahip olup, ilk çiçeğin iki anterinde kallus oluşumu görülmüştür. 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınan anterlerin birinde (1. çiçeğe ait) embriyoid oluşmuştur (çizelge 4.4.). %6 sakkaroz içeren ortamlarda canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyottaki anterlerde %23.3, karanlıktaki anterlerde ise %54.4 olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 4.4. % 0.10 aktif kömürlü ortamlarda kültüre alınan anterlerde sakkaroz ve glikoz ile aydınlatmanın etkileri

Şeker ve dozu	Sakkaroz (%3)		Sakkaroz (%6)		Glikoz (%3)		Glikoz (%6)	
Aydınlık ve karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık
Dikilen anter sayısı	200	200	120	160	120	120	160	120
Canlı anter sayısı	49	82	28	87	11	61	13	24
Canlılık oranı (%)	24.5	41.0	23.3	54.4	9.2	50.8	8.1	20.0
Kallus oluşturan anter sayısı	0	2	1	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	2.4	3.6	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	1	0	0	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	2.0	0	0	0	0	0	0	0

Çiçek bazında en yüksek canlılık oranı %3 sakkaroz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyotta 2. çiçeğin (%2.9), karanlıkta 1. çiçeğin anterleri (%73) vermiştir. %6 sakkaroz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyotta 1. ve 2. çiçeğin (%33), karanlıkta ise 3. çiçeğin anterlerinden (%62) elde edilmiştir.

%3 glikoz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyottaki anterlerde canlılık oranı %9.2 iken karanlıktakilerde %50.8, %6 glikoz içeren ortamda ise 8/16 saat fotoperiyottaki anterlerde %8.1 iken karanlıktakilerde %20 olarak kaydedilmiştir. Anterlerde kallus ya da embriyoid oluşumu gerçekleşmemiştir (çizelge 4.4.).

Çiçek bazında en yüksek canlılık oranını %3 glikoz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyotta ve karanlıkta (%20 ve %63) 2. çiçeğin anterleri vermiştir. %6 glikoz içeren ortamda ise yine 8/16 saat fotoperiyotta ve karanlıkta (%18 ve %25) 1. çiçeğin anterlerinden elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. % 0.15 aktif kömürlü ortamlarda kültüre alınan anterlerde sakkaroz ve glikoz ile aydınlatmanın etkileri

Şeker ve dozu	Sakkaroz (%3)		Sakkaroz (%6)		Glikoz (%3)		Glikoz (%6)	
	8/16 saat fotope riyot	Karanlık	8/16 saat fotope riyot	Karanlık	8/16 saat fotope riyot	Karanlık	8/16 saat fotope riyot	Karanlık
Dikilen anter sayısı	160	200	120	120	160	200	120	120
Canlı anter sayısı	41	74	11	40	27	81	7	26
Canlılık oranı (%)	25.6	37.0	9.2	33.3	16.9	40.5	5.8	21.7
Kallus oluşturan anter sayısı	2	1	0	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	4.9	1.4	0	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0	0	0	0

4.2.2.2. % 0.15 aktif kömürlü ortamlardan elde edilen sonuçlar

%3 sakkarozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerden 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda canlılık oranı %25.6, karanlıktakilerde ise %37.0 olarak belirlenmiştir. %6 sakkaroz içeren ortamlarda ise yine karanlık koşullardaki anterlerde canlılık oranı (%33.3), 8/16 saat fotoperiyottaki anterlere (%9.2) göre daha yüksek olmuştur. Bu ortamlarda hem 8/16 saat fotoperiyotta (%4.9) ve hem de karanlıkta (%1.4) 1. çiçeğin anterlerinden kallus oluşmuştur (çizelge 4.5.).

Çiçek bazında en yüksek canlılık oranı %3 sakkaroz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyotta 3. çiçeğin (%33) ve karanlıkta 1. çiçeğin (%42); %6 sakkaroz içeren ortamda ise hem 8/16 saat fotoperiyotta hem de karanlıkta 4. çiçeğin (%23-%46) anterlerinden elde edilmiştir.

%3 glikoz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyottaki anterlerde canlılık oranı %16.9 iken karanlıktakilerde %40.5, %6 glikoz içeren ortamda ise 8/16 saat fotoperiyottaki anterlerde %5.8 iken karanlıktakilerde %21.7 olarak

kaydedilmiştir. %3 ve %6 glikoz içeren ortamlardaki anterlerin hiçbirinde kallus veya embriyoid oluşumu gerçekleşmemiştir (çizelge 4.5.).

Çiçek bazında en yüksek canlılık oranı %3 glikoz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyotta 2. çiçekten (%22.5), karanlıkta 4. çiçekten (%47); %6 glikoz içeren ortamda ise hem 8/16 saat fotoperiyotta hem de karanlıkta 1. çiçekten (%18-%25) alınan anterlerden elde edilmiştir.

4.2.2.3. % 0.30 aktif kömürlü ortamlardan elde edilen sonuçlar

%3 sakkaroz içeren ortamlarda canlılık oranı karanlıkta %14.6, 8/16 saat fotoperiyotta %8.4; %6 sakkaroz içeren ortamlarda karanlıkta %13.5, 8/16 saat fotoperiyotta ise %3.5 olarak kaydedilmiştir. %3 sakkaroz içeren ortamlarda 8/16 saat fotoperiyotta 2 adet anterde (1. çiçeğe ait) yoğun kallus oluşumu görülmüştür (şekil 4.9.). Karanlık koşullardaki anterlerde kallus oluşumuna rastlanmamıştır (çizelge 4.6.).

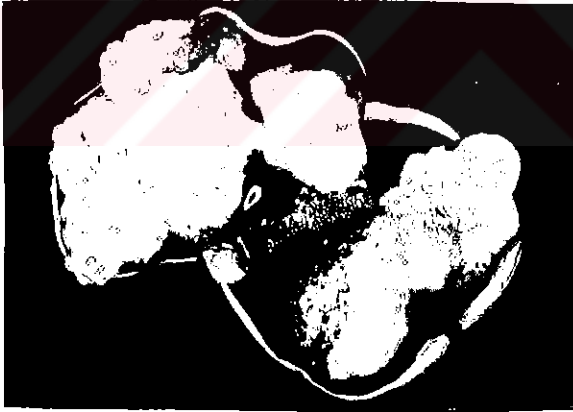
Çiçek bazında en yüksek canlılık oranı %3 sakkaroz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyotta 2. çiçekte (%12), karanlıkta 2. ve 4. çiçekte (%20); %6 sakkaroz içeren ortamda ise hem 8/16 saat fotoperiyotta ve hem de karanlıkta 1. çiçekte (%10-%22) belirlenmiştir.

%3 glikoz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyottaki anterlerde canlılık oranı %13 iken karanlıktakilerde %75; %6 glikoz içeren ortamda ise 8/16 saat fotoperiyottaki anterlerde %0.83 iken karanlıktakilerde %15.8 olarak kaydedilmiştir. Hem %3 hem de %6 glikoz içeren ortamlardaki anterlerin hiçbirinde kallus veya embriyoid oluşumu gerçekleşmemiştir (çizelge 4.6.).

Çiçek bazında en yüksek canlılık oranı %3 glikoz içeren ortamda 8/16 saat fotoperiyotta (%23) ve karanlıkta (%69) 1. çiçeğe ait anterlerde kaydedilmiştir. %6 glikoz içeren ortamda ise en yüksek canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyotta 2. çiçeğin anterlerinden (%10) elde edilirken, karanlıkta 4. çiçeğin anterlerinden (%23) elde edilmiştir.

Çizelge 4.6. % 0.30 aktif kömürlü ortamlarda kültüre alınan anterlerde sakkaroz ve glikoz ile aydınlatmanın etkileri

Şeker ve dozu	Sakkaroz (%3)		Sakkaroz (%6)		Glikoz (%3)		Glikoz (%6)	
Aydınlık ve karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık
Dikilen anter sayısı	320	280	200	200	200	120	120	120
Canlı anter sayısı	27	41	7	27	26	90	1	19
Canlılık oranı (%)	8.4	14.6	3.5	13.5	13.0	75.0	0.83	15.8
Kallus oluşturan anter sayısı	2	0	0	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	7.4	0	0	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.9. % 3 sakkaroz içeren ortamlarda 8/16 saat fotoperiyotta mikrospor orijinli kallus oluşumu

4.3. İkinci Yıl Deneme Sonuçları

1. yıl denemelerinde aktif kömürsüz ortamlarda kültüre alınan anterler yaşamadığı için, 2. yıl denemelerinde soğuk uygulaması yapılan ve yapılmayan tomurcukların 1. çiçeklerinden alınan anterlerin hepsi aktif kömürlü ortamlarda kültüre alınmışlardır.

4.3.1. % 0.10 aktif kömür ve %3 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar

Bahçeden alınan tomurcuklardan sakkarozlu ortamda kültüre alınan anterlerden hem 8/16 saat fotoperiyotta ve hem de karanlıkta inkübasyona alınanlarda canlılık oranı %75.5 olarak belirlenmiştir. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan anterlerde bu oran 8/16 saat fotoperiyotta %93 iken, karanlıkta %97.7, 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda %95.5 olmuştur. Ayrıca sürekli karanlıkta (1. çiçekten) ve 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınan (1. çiçekten) anterlerden birinde kallus oluşumu gözlenmiştir (çizelge 4.7.).

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %3 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyotta %57.7, karanlıkta ise %62.2 olmuştur. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %3 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerden 8/16 saat fotoperiyodik düzende inkübasyona alınanlarda canlılık oranı %71, karanlıkta %73.3 ve 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda %60 olarak gerçekleşmiştir (çizelge 4.7.).

4.3.2. % 0.10 aktif kömür ve %6 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %6 sakkaroz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyotta %66.6, karanlıkta inkübasyona alınanlarda %68.8 olarak belirlenmiştir. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan anterlerde bu oran 8/16 saat fotoperiyotta %68.8 iken, karanlıkta %80, 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda ise %73.3 olmuştur (çizelge 4.8.).

Çizelge 4.7. % 0.10 aktif kömür ve %3 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri

Parametreler	Bahçeden alınan tomurcuklar		Soğuk uygulaması yapılan tomurcuklar		
	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	4 hafta karanlık
SAKKAROZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	34	34	42	44	43
Canlılık oranı (%)	75.5	75.5	93.0	97.7	95.5
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	1	1
Kallus oranı (%)	0	0	0	2.3	2.3
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0
GLİKOZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	26	28	32	33	27
Canlılık oranı (%)	57.7	62.2	71.0	73.3	60.0
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %6 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyotta %35.5, karanlıkta inkübasyona alınanlarda %40 olarak belirlenmiştir. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %6 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerden hem 8/16 saat fotoperiyotta hem de karanlıkta inkübasyona alınanlarda %62.2 olmuş, 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınan anterlerde ise % 64.4 olarak kaydedilmiştir (çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. % 0.10 aktif kömür ve %6 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri

Parametreler	Bahçeden alınan tomurcuklar		Soğuk uygulaması yapılan tomurcuklar		
	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	4 hafta karanlık
SAKKAROZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	30	31	31	36	33
Canlılık oranı (%)	66.6	68.8	68.8	80.0	73.3
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0
GLİKOZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	16	18	28	28	29
Canlılık oranı (%)	35.5	40.0	62.2	60.0	64.4
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0

4.3.3. % 0.15 aktif kömür ve %3 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %3 sakkaroz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerden hem 8/16 saat fotoperiyotta ve hem de karanlıkta inkübasyona alınanlarda canlılık oranı %68.8 olarak

belirlenmiştir. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan anterlerde bu oran, 8/16 saat fotoperiyotta %91 iken, karanlıkta %93, 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda ise %91 olmuştur (çizelge 4.9.).

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %3 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı, 8/16 saat fotoperiyotta %55.5, karanlıkta %57.7 olarak belirlenmiştir. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %3 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyotta %66.6, karanlıkta %68.8 olmuş ve 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda %64.4 olarak bulunmuştur (çizelge 4.9.).

4.3.4. % 0.15 aktif kömür ve %6 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %6 sakkaroz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyotta %60 ve karanlıkta inkübasyona alınanlarda ise %64.4 olarak belirlenmiştir. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %6 sakkaroz içeren ortamlarda, 8/16 saat fotoperiyotta kültüre alınan anterlerde, canlılık oranı %66.6 iken, karanlıkta %75.5, 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda %66.6 olmuştur (çizelge 4.10.).

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %6 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde, canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyotta %31.1, karanlıkta ise %37.7 olarak belirlenmiştir. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %6 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı, 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda %62.2 iken, karanlıkta %68.8 olmuş, 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda %55.5'e düşmüştür (çizelge 4.10.).

Çizelge 4.9. % 0.15 aktif kömür ve %3 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri

Parametreler	Bahçeden alınan tomurcuklar		Soğuk uygulaması yapılan tomurcuklar		
	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	4 hafta karanlık
SAKKAROZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	31	31	41	42	41
Canlılık oranı (%)	68.8	68.8	91.0	93.0	91.0
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0
GLIKOZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	25	26	30	31	29
Canlılık oranı (%)	55.5	57.7	66.6	68.8	64.4
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0

Çizelge 4.10. % 0.15 aktif kömür ve %6 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri

Parametreler	Bahçeden alınan tomurcuklar		Soğuk uygulaması yapılan tomurcuklar		
	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	4 hafta karanlık
SAKKAROZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	27	29	30	34	30
Canlılık oranı (%)	60.0	64.4	66.6	75.5	66.6
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0
GLİKOZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	14	17	28	31	25
Canlılık oranı (%)	31.1	37.7	62.2	68.8	55.5
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0

4.3.5. % 0.30 aktif kömür ve %3 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlardan elde edilen sonuçlar

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %3 sakkaroz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyotta %68.8, karanlıkta inkübasyona alınanlarda ise %71 olarak belirlenmiştir. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan anterlerde bu oran, 8/16 saat fotoperiyotta %86.6 iken, karanlıkta %91, 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda %80 olmuştur (çizelge 4.11.).

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %3 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyotta %40, karanlıkta ise %42.2 olarak belirlenmiştir.

Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan anterlerde bu oran, 8/16 saat fotoperiyotta %68.8 iken, karanlıkta %75.5 olmuş ve 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda %66.6' ya düşmüştür (çizelge 4.11.).

4.3.6. % 0.30 aktif kömür ve % 6 sakkaroz ile glikoz içeren ortamlarda elde edilen sonuçlar

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %6 sakkaroz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerden hem 8/16 saat fotoperiyotta ve hem de karanlıkta inkübasyona alınanlarda canlılık oranı, %55.5 olarak belirlenmiştir. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan anterlerde bu oran, 8/16 saat fotoperiyotta %62.2 iken, karanlıkta %66.6, 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda %68.8 olmuştur (çizelge 4.12.).

Bahçeden alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %6 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı, 8/16 saat fotoperiyotta %28.8, karanlıkta ise %31.1 olarak belirlenmiştir. Soğuk hava deposundan alınan tomurcuklardan çıkarılan ve %6 glikoz içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde canlılık oranı 8/16 saat fotoperiyotta %55.5 iken, karanlıkta %68.8 olmuş ve 4 hafta karanlık uygulamasından sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınanlarda %53.3'e düşmüştür.

Çizelge 4.11. % 0.30 aktif kömür ve %3 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri

Parametreler	Bahçeden alınan tomurcuklar		Soğuk uygulaması yapılan tomurcuklar		
	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	4 hafta karanlık
SAKKAROZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	31	32	39	41	36
Canlılık oranı (%)	68.8	71.0	86.6	91.0	80.0
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0
GLIKOZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	18	19	31	44	30
Canlılık oranı (%)	40.0	42.2	68.8	75.5	66.6
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0

Çizelge 4.12. % 0.30 aktif kömür ve %6 sakkaroz ile glikozlu ortamlarda kültüre alınan anterlerde soğuk uygulamasının ve aydınlatmanın etkileri

Parametreler	Bahçeden alınan tomurcuklar		Soğuk uygulaması yapılan tomurcuklar		
	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	8/16 saat fotoperiyot	Karanlık	4 hafta karanlık
SAKKAROZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	25	25	28	30	31
Canlılık oranı (%)	55.5	55.5	62.2	66.6	68.8
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0
GLİKOZ					
Dikilen anter sayısı	45	45	45	45	45
Canlı anter sayısı	13	14	25	31	24
Canlılık oranı (%)	28.8	31.1	55.5	68.8	53.3
Kallus oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Kallus oranı (%)	0	0	0	0	0
Embriyoid oluşturan anter sayısı	0	0	0	0	0
Embriyoid oranı (%)	0	0	0	0	0

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Starkspur Golden Delicious elma çeşidinin anter kültüründe şeker, aktif kömür, ışık ve soğuk uygulamasının androgenesis üzerine etkileri incelenmiştir. Ayrıca tek çekirdekli mikrospor safhasının, çiçek tomurcuğu, çiçek ve anterlerin morfolojik özellikleriyle saptanabilmesi için korelatif özellikler belirlenmiştir.

Birinci yıl denemelerinde toplam 5080 anter kültüre alınmış ve ancak iki adet embriyoid (%0.17) elde edilmiştir. İkinci yılda ise toplam 3240 anter kültüre alınmış fakat embriyoid elde edilememiştir. Kallus oluşum oranları ise birinci yıl %0.78, ikinci yıl %0.11 olmuştur. Bu bulgular elmalarda yapılan anter kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçları desteklemektedir. Zhang *et al.* (1990), 5 elma genopinde yaptıkları anter kültüründe kültüre alınan 167500 anterden %0.01 oranında embriyoid elde edebilmişlerdir. Hofer ve Schmidt (1994), 13 elma genotipinde yapımışı oldukları anter kültüründe sadece 7 genotipte ve çok düşük oranlarda (%0.05-0.4) embriyoid oluşumunu sağlayabilmişlerdir. Hofer (1995) 6 *Malus domestica* (*M. pumila*) çeşidi ve *Malus zumi*' nin kültürlerinden 3-6 ay arasında embriyoidleri elde etmiş ve Hofer ve Schmidt (1994)'in çalışmalarında olduğu gibi embriyoid oluşumu çok düşük oranlarda (%0.05-0.4) gerçekleştirmiştir.

5.1. Mikrospor Gelişim Aşaması ile Çiçek Tomurcuğu, Çiçek ve Anter Arasındaki Korelasyonlar

Sitolojik ve morfolojik incelemeler sonunda, tek çekirdekli mikrosporların 15.19 ± 0.08 mm boyunda ve 6.39 ± 0.10 mm enindeki çiçek tomurcuklarında bulunduğu ve bu tomurcuklardaki 1. çiçeklerin anterlerinin tek çekirdekli serbest mikrospora, 2. ve 3. çiçeklerin anterlerinin tetrat safhasındaki mikrospora sahip olduklarını ve 4. çiçeklerin anterlerindeki mikrosporların ise daha geri bir gelişme safhada oldukları belirlenmiştir. Çiçek tomurcuğunun boyu ve eni ile çiçek ve anter boyu ve eni arasındaki korelasyon katsayıları incelendiğinde, çiçek tomurcuğu eni ile 1. çiçek eni ve çiçek tomurcuğu boyu ile 2. çiçeğin anter eni arasındaki korelasyon katsayılarının dışında diğer korelasyon katsayılarının istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç Starkspur Golden Delicious çeşidinde tek çekirdekli mikrosporları taşıyan anterlerin, çiçeklerin veya çiçek tomurcuklarının büyüklükleri ile belirlenebileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar Hofer ve Hanke (1994)' nin bulgularıyla uyum göstermektedir. Hofer ve Hanke (1994), elmalarda genotiplere bağlı olmaksın mikrospor

gelişme safhaları ile çiçeğin makroskopik karakterleri arasındaki korelasyonun önemli olduğunu ve bu nedenle elma anter kültüründe optimum mikrospor gelişme safhasının belirlenmesinde, çiçek ve anter uzunluğunun kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

5.2. Şekerin Etkisi

Denemede kullanılan 2 şeker çeşidinin (sakkaroz-glikoz) 2 farklı dozundan (%3-%6) en iyi sonuçlar, diğer anter kültürü çalışmalarında olduğu gibi (Zhang *et al.* 1990, Milewska-Pawliczuk 1990, Hofer ve Hanke 1990), %3 sakkaroz içeren ortamlardan alınmıştır. Bu ortamlarda , hem anterlerin canlılık oranının hem de kallus oluşumunun %6' lık sakkarozdan daha fazla olduğu gözlenmiş, ayrıca 1 anterden de embriyoid elde edilmiştir. %6 sakkaroz dozunun kullanıldığı ortamlardan sadece 1 anterden kallus elde edilmiştir.

Zhang *et al.* (1990), %3' den %12' ye yükseltilen sakkaroz dozunun kallogenesis oranını azalttığını kaydetmişler, ayrıca sadece %3 sakkaroz içeren ortamlarda embriyo oluşumunun gerçekleştiğine dikkat çekmişlerdir. Diğer taraftan Milewska-Pawliczuk (1990) %3 sakkarozun androgenesis için uygun doz olduğunu, ancak düşük sakkaroz dozlarında anterlerin yaşama oranının düştüğünü, yüksek sakkaroz dozlarında ise yoğun kallus oluşumunun gerçekleştiğini bildirmiştir.

Anter kültürü çalışmalarında besin ortamına sakkaroz yerine bazen glikoz, maltoz gibi şekerlerinde katıldığı belirtilmektedir (Hatipoğlu 1997). Bu çalışmada glikozun etkilerini görmek amacıyla, %3 ve %6 dozlarında glikoz besin ortamına ilave edilmiştir. %3 glikoz dozunun kullanıldığı ortamlarda karanlıkta inkübasyona alınan anterlerde canlılık oranı yüksek olmuş ve aktif kömürsüz ortamda 1 anterden kallus oluşmuştur. %6 glikoz içeren ortamlarda ise anterlerdeki canlılık oranının daha düşük olmasının yanında hiçbir kallus oluşumu görülmemiş ve aktif kömürsüz ortamda 1 anterden embriyoid oluşmuştur. Zhang *et al.* (1990), Topred elma çeşidinde karbon kaynaklarının etkilerini inceledikleri çalışmalarında, %3 dozundaki glikozun sakkarozla göre kallogenesis daha fazla uyarıcı etki gösterdiğini gözlemişlerdir. Bu durumun genotip etkisinden kaynaklandığı düşünülebilir.

5.3. Aktif Kömürün Etkisi

Aktif kömürün elma anter kültüründe androgenesis üzerine etkisini araştırmak amacıyla, % 0, 0.10, 0.15 ve 0.30 olmak üzere 4 farklı aktif kömür dozunun etkileri incelenmiştir.

Aktif kömür katılmayan ortamlarda, özellikle 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınan anterlerin tamamına yakın bir kısmında karama meydana geldiğinden canlılık oranı çok düşük olmuştur. Pelletier ve Ilami (1972), aktif kömürün anter duvarının yaşlanmasını engellediğini ve bu nedenle anter duvarının açık renkte kaldığını, dolayısıyla karamanın meydana gelmediğini bildirmişlerdir (Karakullukçu 1991). Aktif kömürün olumlu etkisi besin ortamındaki toksik maddeleri absorbe etme özelliğinden de kaynaklanmış olabilir. %0.10 ve %0.15 aktif kömür içeren özellikle sakkarozlu ortamlardaki anterlerde canlılık oranı daha yüksek olmuş ve kallus oluşumu da artmıştır. Ayrıca elde edilen 2 embrioidin biri aktif kömürsüz, diğeri %0.10 aktif kömürlü ortamda oluşmuştur. %0.30 aktif kömür içeren ortamlarda ise kallus oluşturan anter oranı daha düşük olmuş ve embrioid oluşmamıştır. Bu sonuçlar Zhang *et al.* (1990)' in bulgularıyla bağdaşmamaktadır. Zhang *et al.* (1990), 5 elma genotipinde ortama ilave edilen %0.5 aktif kömürün somatik kallus oluşumunu sınırlandırdığını ve embriyo çıkışını hızlandırdığını saptamışlardır. Bu farklılığın genotip etkisinden kaynaklandığı düşünülebilir.

5.4. Işığın Etkisi

Kültürler 8/16 saat fotoperiyotta, 24 saat karanlıkta ve 4 hafta karanlıktan sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınmışlardır.

Denemede karanlıkta inkübasyona alınan anterlerde canlılık oranı, 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınan anterlere göre daha yüksek olmuştur. Soğuk uygulaması yapılan tomurcuklardan alınan ve 4 hafta karanlıktan sonra 8/16 saat fotoperiyotta inkübasyona alınan anterler, 8/16 saat fotoperiyottakilere benzer canlılık oranları vermiştir. Kallus oluşumu da daha yüksek oranlarda karanlık koşullarda gerçekleşmiştir. Hofer ve Hanke (1990), androgenik anter yüzdesinin karanlıkta önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Zhang *et al.* (1990), 4 hafta karanlıkta tutulduktan sonra 16 saat fotoperiyoda alınan elma anterlerinde %0.1 oranında embrioid oluşumunu gerçekleştirmişlerdir.

5.5. Soğuk Uygulamasının Etkisi

Bir çok bitki türünün, anter kültürüne çok düşük düzeylerde yanıt vermesi ya da elde edilen sonuçların pratikte kullanmak için yetersiz oluşu, uzun yıllar araştırmacıları anter kültüründe embriyo oluşumunu uyarıcı bazı uygulamalara doğru yöneltmiştir. Bunlardan biri de soğuk uygulamasıdır (Karakullukçu 1991).

Gerek birinci yıl gerekse ikinci yıl denemelerinde en yüksek canlılık oranı, embriyoid ve kallus oluşumu, kültür öncesi +4°C'de 6 hafta soğuk uygulaması yapılan tomurcuklardan alınan anterlerden sağlanmıştır. İkinci yıl soğuk uygulamasının kontrolü olarak bahçeden alınan tomurcuklardaki (soğuklatılmamış) anterlerden yapılan kültürlerde ne kallus ne de embriyoid oluşmuştur. Bu bulgular elmalarda yapılan araştırma sonuçları ile uyum içindedir.

Hidano *et al.* (1995), kültür öncesi çiçek tomurcuklarına soğuk uygulamasının elma anter kültürüne olumlu etki ettiğini bildirmişlerdir.

Zhang *et al.* (1990), 5 elma genotipinde yaptıkları anter kültürü çalışmasından elde ettikleri bütün embriyoların kültür öncesi 3-4°C'de 5-11 hafta tutulan tomurcuklardan meydana geldiğini kaydetmişlerdir. Aynı sıcaklıkta 5 haftadan az tutulan tomurcuklardan embriyo eldesi gerçekleşmemiş, ayrıca Golden Delicious ve Topred çeşitlerinde 2-4 hafta soğuk uygulanan tomurcuklarda kallogenesis önemli oranda artmıştır.

Anter kültüründen elde edilen başarı oranı oldukça düşük olan elmalarda yapılan bu çalışma sonuç olarak, ortama ilave edilen şeker ve aktif kömür ile ışık ve soğuk uygulamasının, daha çok kültüre alınan anterlerin canlılık oranı ve kallus oluşumu üzerine etkilerini inceleme olanağı vermiştir. Embriyoid oluşumu çok düşük düzeylerde gerçekleştiği için, androgenesisin uyarılmasındaki etki düzeyleri belirlenememiştir. Elde edilen bu sonuçlardan anlaşılabileceği üzere, embriyo oluşumunun oldukça zor olduğu bu çeşitte, embriyo oluşumunda en önemli bir faktör olan uygun mikrospor gelişme safhasının ve en uygun soğuk uygulama zamanı ve süresinin belirlenmesi üzerinde daha detaylı çalışılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abak, K.1983.Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı, Cilt: 33, (1-2-3-4), 155-163, Ankara.
- Algan, G., 1981. Bitkisel Dokular İçin Mikroteknik. Fırat Üniv. Fen Fak. Yayınları, Bot. No:1. Matbaa Teknisyenleri Basımevi, 94 s., İstanbul.
- Altamura, M.M., Cersosimo, A., Majoli, C. and Crespan, M. 1992. Histological study of embriyogenesis from anthers of *Vitis rupestris* du Lot cultured *in vitro*. Protoplasma, 171; 134-141.
- Bajaj, Y.P.S. 1983. *In vitro* production of haploids. In: Evans, D.A., Sharp, W.R., Amirato, P.V. and Yamada, Y. (eds), Handbook of plant cell culture, 228-269 pp., MacMillan, New York.
- Dodds, J.H. ve Roberts, L.W. 1985. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, 232 p.
- Fei, K. W., and Xue, G.R., 1981. Induction of haploid plantlets by anther culture *in vitro* in apple cv. 'Delicious'. Chinese Agr. Sci. 4:41-44
- George, E.F., and Sherrington, P.D., 1984. Plant propagation by tissue culture 709 p. Eversley.
- Gönülşen, N. 1987. Bitki doku kültürleri yöntemleri ve uygulama alanları. T.C. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayın No: 78, 140 s., İzmir.
- Günver, G. 1994. Bazı meyve tür ve çeşitlerinde *in vitro* koşullarda kallus oluşumu ve buna etki eden faktörler üzerinde araştırmalar. Doktora tezi (Basılmamış). Ege Üniversitesi, İzmir.
- Hatipoğlu, R. 1997. Bitki biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190, 176 s., Adana.
- Hidano, Y., Niizeki, M. and Saito, K., 1995. Production of apple plants from pollen by anther culture. Bull. Fac. Educ. Hirosaki Univ. 58:1-21.
- Hofer, M., 1995.*In vitro* androgenesis in apple. Gartenbauwissenschaft 60 (1): 12-15.
- Hofer, M., and Hanke, V., 1990. Induction of androgenesis *in vitro* in apple and sweet cherry Acta Hort. 280, 333-336.
- Hofer, M. and Schmidt, H., 1994. *In vitro* androgenesis in apple: Induction, regeneration and ploidy level. In: Kellerhalls, M, (ed), Developments in Plant Breeding. Vol 1: 399-402, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands.

- Hofer, M. and Hanke, V., 1994. Anther culture of apple and cherry: Effect of the stage of pollen development – Correlative relations with morphological characters of the flower. *Gartenbauwissenschaft* 59 (5): 225-228.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant Microtechnique*. Mc Graw-Hill Book Company. 523 p., New York
- Johansson, L., Wallin, A., Gedin, A., Nyman, M., Pettersson, E., and Svensson, M., 1987. Anther and protoplast culture in apple and strawberry. Biennial report 1986-1987, Division of fruit breeding Balsgard, Swedish Univ. Agr.Sci.83-92
- Jordan, M., 1974. *In vitro* culture of anther from *Prunus*, *Pyrus* and *Ribes*. *Planta Medica*, Suppl. 59-65.
- Karakullukçu, Ş. 1991. Değişik pathican genotiplerinde *in vitro* androgenesis ve haploid bitki oluşumunu uyarıcı bazı etmenler üzerinde araştırmalar. Doktora tezi (Basılmamış). Ankara Üniversitesi, 135s., Ankara.
- Langenbucher, M. and Alleweldt, G. 1993. The effect of different pretreatments on induction of somatic embryogenesis in anthers of grapevine cv. Riesling. *Vitis* 32 (1); 1-7.
- Mauro, M.C., Nef, C. and Fallot, J. 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Reports*, 5 (5);377-380.
- Milewska-Pawliczuk, E. and Kubicki, B. 1977. Introduction of androgenesis *in vitro* in *Malus domestica* *Acta Hort.* 78;271-276.
- Milewska-Pawliczuk, E. 1990. Apple (*Malus domestica* Borkh.): *In vitro* introduction of androgenesis . In: Bajaj, Y.P.S. (ed), *Haploids in crop improvement I, Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 12 ; 250-263, Springer.
- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497
- Nakayama, R., Saito, K., and Yamamoto, R., 1972. Studies on the hybridization in apple breeding. III. Callus formation and organ differentiation from anther culture. *Bull. Fac. Agr. Hirosaki Univ.* 19: 1-9.
- Nitsch, C. 1981. Production of isogenic lines: Basic technical aspects of androgenesis. In: Thrope, T.A. (ed), *Plant Tissue Culture Methods and Application in Agriculture* 241-252 pp., New York.

- Ognjanov, V. 1989. Culture of anthers and seedling explants of peach in vitro. *Jugoslovensko-Vocarstvo*, 23 (1-2); 471-477.
- Pepescu, C.P., Blakesley, D. and MacAntsaioir, S. 1996. Somatic embriyogenesis and plant development from anther culture of *Vitis vinifera* L. *Plant Growth Regulation*, 20 (1); 75-78.
- Rajasekaran, K. and Mullins, M.G. 1983. Influence of genotype and sexexpression on formation of plantlets by cultured anthers of grapevine. *Agronomie*, 3; 233-238.
- Reinert, J. ve Bajaj, Y.P.S. 1977. Anther culture: Haploidy production and its significance. In: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds), *Plant cell tissue and organ cultur*, pp: 251-264, Springer-Verlag.
- Shi, Y.Z., Yang, Z.Y. and Xue, G.R. 1992. A brief report on the production of embriyoids in pear anther culture. *Hereditas-Beijing*, 14 (4); 43.
- Street, H.E., 1973. *Plant Tissue and Cell Culture*. Blackwell Sci. Publ. Oxford.
- Todorovic, R.R., Misic, P.D., Petrovic, D.M. ve Mircovic, M.A. 1992. Anther culture of peach cultivars "Cresthaven" and "Vesna". *Acta Hort.* 300; 331-333.
- Wu, J.Y., 1981. Induction of haploid plants from anther culture of crabapple. *J. Northeast Agr. Coll.* 3:105-108.
- Xue, G.R. and Niu, J.Z., 1984. A study on the induction of apple pollen plants. *Acta Hort. Sin.* 11:161-164
- Yae, B.W., Moon, J.Y., Cho, H.M., Lee, D.K. and Hwang, J.H. 1990. Factors affecting callus induction from anthers of *Vitis* in vitro. *Horticulture*, 32 (1); 15-21.
- Zhang, Y.X., Lespinasse, Y., and Chevreau, E. 1990. Induction of haploidy in fruit trees. *Acta Hort.* 280, 293-306.

ÖZGEÇMİŞ

Kars'ta 1975 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1992 yılında girdiği Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde iki yıl okuduktan sonra 23.09.1994 tarihinde Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nin aynı bölümüne yatay geçiş ile kayıt yaptı ve Haziran 1996 yılında Ziraat Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü' nün Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda açmış olduğu Yüksek Lisans sınavını kazanarak, Meyve Yetiştirme ve Islahı Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına başladı.