

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Mehmet TÜTÜNCÜ

**SİKLAMENDE (*Cyclamen persicum* L.) IŞINLANMIŞ POLEN
YÖNTEMİYLE PARTHENOGENESİS'İN İN VİTRO VE
HİSTOLOJİK TEKNİKLER KULLANILARAK
ARAŞTIRILMASI**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2020

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİKLAMENDE (*Cyclamen persicum* L.) İŞİNLANMIŞ POLEN
YÖNTEMİYLE PARTHENOGENESİS'İN İN VİTRO VE HİSTOLOJİK
TEKNİKLER KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

Mehmet TÜTÜNCÜ

DOKTORA TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 17/04/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
ÜYE

.....
Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU
ÜYE

.....
Prof. Dr. Muharrem ÖZCAN
ÜYE

.....
Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

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

**Bu Çalışma TÜBİTAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 1180728**

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

SİKLAMENDE (*Cyclamen persicum* L.) IŞINLANMIŞ POLEN YÖNTEMİYLE PARTHENOGENESİS'İN İN VİTRO VE HİSTOLOJİK TEKNİKLER KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

Mehmet TÖTÜNCÜ

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
YIL: 2020, Sayfa: 131
JÜRİ : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU
: Prof. Dr. Muharrem ÖZCAN
: Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK

Siklamende klasik yöntemlerle saf hatların geliştirilmesi, bitkinin döllenme biyolojisindeki problemler nedeniyle zaman alıcı ve zordur. *In vitro* haploidizasyon ve *in situ* partenogenesis gibi teknikler bu problemleri aşmak için kullanılmaktadır. Bu tez kapsamında, *in situ* partenogenesis tekniği siklamende ilk defa denenmiş ve farklı ışın dozlarının polen canlılığı, polen çimlenmesi ve ışınlanmış polenlerle tozlama sonrası embriyo oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Çiçek tomurcukları, Co-60 kaynağı kullanılarak farklı gama ışın dozları (0, 50, 100, 150, 200, 300, 450 Gy) ile ışınlanmıştır. Tozlamadan sonra 10'ar gün aralıklarla ışınlanmış polenlerle tozlama yapılan çiçek tomurcukları toplanmış ve embriyo kurtarma (ovül kültürü) için uygun embriyo gelişim aşaması, histolojik analizlerle belirlenmiştir. Sonuç olarak, histolojik analizlerde ilk zigot/embriyo oluşumu, tozlanmadan sonra 20. günde belirlenmiştir. Polen canlılık oranları, ışın dozlarından çok az etkilenmiş ve en yüksek polen canlılığı %87, en düşük polen canlılığı ise %82 olarak bulunmuştur. *In vitro* çimlenme oranları, ışın uygulamalarından önemli düzeyde etkilenmiş ve çimlenme oranı en yüksek %65, en düşük ise %31 olmuştur. Ovül kültüründe en yüksek bitki uyartım oranları ise, sırasıyla %2.66 ve %2.00 oranında, 0 Gy + ½ MS+0.5 mgL⁻¹ Kin ve 100 Gy + ½ MS+0.5 mgL⁻¹ Kin uygulamalarından elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *in situ*, partenogenesis, süs bitkileri, embriyo kurtarma

ABSTRACT

PhD THESIS

INVESTIGATION OF PARTHENOGENESIS THROUGH IRRADIATED POLLEN METHOD USING IN VITRO AND HISTOLOGICAL TECHNIQUES IN CYCLAMEN (*Cyclamen persicum* L.)

Mehmet TÜTÜNCÜ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Year: 2020, Page: 131
Jury : Prof. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Yıldız AKA KAÇAR
: Prof. Şebnem ELLİALTIOĞLU
: Prof. Muharrem ÖZCAN
: Assoc. Prof. Özhan ŞİMŞEK

Improving new cyclamen purelines via classical methods is time-consuming and quite difficult process due to the problems in plant fertilization biology. *In vitro* haploidisation and *in situ* parthenogenesis techniques are used to overcome these problems. In this thesis, *in situ* parthenogenesis was tested in cyclamen first time and the effects of different irradiation doses on pollen viability, pollen germination and embryo formation after pollination with irradiated pollens were investigated. Flower buds were irradiated with different dosages of gamma light (0, 50, 100, 150, 200, 300, 450 Gy) using Co-60source. The flower buds pollinated with irradiated pollens were collected after pollination and appropriate developmental stages of the embryo for embryo rescue (ovule culture) determined via histological studies. As a result, the first zygote/embryo development was determined on 20th day after pollination. Pollen viability rates were slightly affected by irradiation doses. The highest pollen viability rate was 87%, while the lowest was 82%. *In vitro* germination rates were significantly affected and the highest germination rate was 65%, while the lowest was 31%. The highest plantlets induction rates in ovule culture were 2.66% and 2.00% obtained from the applications of 0 Gy + ½ MS+0.5 mgL⁻¹ Kin and 100 Gy + ½ MS+0.5 mgL⁻¹ Kin respectively.

Key Words: *in situ*, parthenogenesis, ornamental plant, embryo rescue

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Ülkemiz, fiziksel konumu, iklim ve toprak faktörleri gibi sahip olduğu eşsiz özellikler nedeniyle pek çok milleti üzerinde barındırdığı gibi, geçmişten günümüze birçok bitki ve hayvan türüne de ev sahipliği yapmaktadır. Bu önemli özellikler, benzer şekilde birçok flora ve fauna öğelerinin de yaşamasına olanak tanımıştır. Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bitki türü sayısı, 13-14 bin civarında olup, Avrupa'daki toplam bitki türü sayısından daha fazladır. Sahip olduğumuz toplam bitki sayısının da 1/3'ü endemiktir.

Bu eşsiz bitkisel biyoçeşitlilik süs bitkileri açısından değerlendirildiğinde de benzer bir görüntü ile karşılaşmaktadır. Ancak, sektörel bazda henüz arzu edilen noktalara gelinememiştir.

Çiçek soğanları veya geofitler; rizom, soğan, yumru veya korm gibi toprak altı organlara sahip bitkiler olarak tanımlanmaktadır. Geofitler, 800'den fazla cinsin oluşturduğu bir gruptur. Bu grubun üyeleri; kesme çiçek, iç mekanlarda saksılı süs bitkisi veya dış mekanlarda çevre düzenlemelerinde peyzaj bitkisi olarak kullanılmakta olup süs bitkisi sektöründe önemli bir yer tutmaktadır. Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren geofit türleri, floramızın yaklaşık %6'sını oluşturmaktadır ve bunlardan 162'si ülkemize endemiktir. Ancak, diğer birçok doğal türde olduğu gibi geofit türleri de doğadan bilinçsiz sökülme, yol açma ve genişletme çalışmaları, tarla açma, aşırı otlatma, yangınlar gibi etmenler nedeniyle tehlike altındadır.

Cyclamen, Myrsinaceae ailesi içerisinde yer alan bir cinstir. Bu cins içerisinde yer alan tür sayısı, araştırmacılara göre farklılık göstermekle birlikte 22 adettir. Taksonomik açıdan oldukça küçük bir cins olmasına karşın, bulunduğu aile içerisinde ekonomik açıdan en gösterişli ve ticari önemi yüksek türleri barındırmaktadır. *Cyclamen* cinsi içerisinde yer alan türlerden 10 tanesi, ülkemiz florasının doğal üyeleridir ve bu türlerden 6'sının ülkemize endemik olduğu bilinmektedir.

Siklamen, geleneksel olarak elle tozlama ile üretilen ve bu nedenle pahalı olan tohumları ile çoğaltılmaktadır. Ancak, kendileme depresyonu gösterdiği için F₁ hibritlerin ebeveyn hatlarının üretimi ve çoğaltımı zordur. Bu nedenle, ıslah programlarında *in vitro* haploidizasyon ve *in situ* partenogenesis gibi kısa sürede saf hatların elde edilmesine olanak tanıyan tekniklerin kullanımı gerekmektedir.

Günümüzde ışınlanmış polenlerle tozlama ya da *in situ* partenogenesis ile haploid uyarımı, sebzelerde (kavun, karpuz, biber) ve bazı süs bitkilerinde (gül, iris) başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak siklamende, bu yöntem bu tez çalışması ile ilk defa uygulanmıştır. Çalışma kapsamında, Co-60 kaynağı kullanılarak çiçek tomurcukları ışınlanmış ve elde edilen ışınlanmış polenlerle kendileme işlemi gerçekleştirilmiştir. Işınlanmış polenlerle tozlama sonrasında embriyo kurtarma işlemi yapılmaktadır. Bu nedenle, embriyoların *in vivo* gelişim durumlarının belirlenmesi ve abortif hale gelmeden kurtarılması gerekmektedir. Bu amaçla ışınlanmış polenlerle kendileme işlemi sonrasında, belirli dönemlerde alınan çiçek tomurcuklarında histolojik çalışmalar yapılarak embriyo gelişimine etkisi incelenmiştir. Aynı zamanda uygun gelişme döneminde abortif embriyo oluşumunu engellemek için ovül kültürü yapılmıştır.

Tez kapsamında, ışın uygulamasına maruz bırakılan 0, 1 ve 2 günlük polenlerde, polen canlılık ve çimlendirme testleri de yapılarak ışın dozlarının canlılık, çimlenme ve çim borusu gelişimleri üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda polen canlılık oranları ışın dozlarından çok etkilenmemekle birlikte, %82-87 arasında bulunmuştur. Diğer taraftan, polen yaşı ve ışın dozlarının çim borusu uzunluğuna etkisi, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Kontrol grubuna ait polenlerin çim borusu uzunluğunun en kısa olduğu belirlenirken, 300 Gy dozda ışına maruz kalan 0 ve 1 günlük polenlere ait polen tüplerinin diğerlerinden daha uzun olduğu belirlenmiştir. En uzun polen tüpü uzunluğu ise 79.37 µm uzunluk ile 300 Gy ışın dozuna maruz bırakılan polenlerden tespit edilmiştir. Yapılan histolojik analizler sonucunda genel olarak, stigma üzerine ulaşan polenlerin ilk iki gün içerisinde çimlendiği ve polen tüpü oluşturduğu

gözlenmektedir. Kontrol grubunda, polen tüpünün tozlanmadan 5-7 gün sonra ovaryuma ulaştığı ve ovüle giriş yaptığı belirlenmiştir. 50, 100 Ve 150 Gy Işın dozu uygulamalarında ise polen tüplerinin yumurtalığa ulaşma sürelerinde bir değişiklik olmamakla birlikte, artan dozlarda polen tüpünün dişicik borusu içinde tutuklu kaldığı görülmüştür. Tozlanmadan 20 gün sonra tohum taslakları içerisinde, etrafında maternal dokuların çevrelediği küresel zigot/embriyo oluşumu gözlenmiştir.

Işınlanmış polenlerle tozlama sonrasında ovül kültürü denemelerinde 10-12 hafta sonra bitkicikler oluşmaya başlamıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bitki oluşumunda ışın dozu, besin ortamı ve bu faktörlerin interaksyonu önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Işın dozunun etkisi değerlendirildiğinde, eksplantlardan bitki eldesi sadece kontrol, 50, 100 ve 150 Gy doz gruplarında gerçekleşmiştir. En yüksek bitkiye dönüşüm oranı, kontrol grubunda gerçekleşmiş ve 150, 100 ve 50 Gy dozu bunu takip etmiştir. En yüksek bitki oluşma oranı, %0.91 ile kontrol grubunda gözlenmiştir.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitiminin ilk gününden itibaren bizleri ışıyla aydınlatan, karşılaştığımız her türlü problemi aşmak için bizleri cesaretlendiren, yol gösteren ve desteğini sürekli hissettiğim danışman hocam Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na, Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a, Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK'e teşekkür ederim. Doktora çalışmam sırasında olduğu gibi günlük yaşantımda tecrübe ve bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyen, Prof. Dr. Muharrem ÖZCAN hocama teşekkür ederim. Tezin ışın uygulaması aşamasında destek olan Dr. Yaprak TANER KANTOĞLU, histolojik çalışmalarında katkılarından dolayı Prof. Dr. Sinan ETİ, Dr. Şenay BEHLÜL KARABIYIK, Dr. Öğr. Üyesi Başar SEVİNDİK'e, polen analizlerinde bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Prof. Dr. Neriman BEYHAN'a, ploidi analizlerinde desteklerinden dolayı Prof. Dr. Metin TUNA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Pembe ÇÜRÜK'e, Dr. Tolga İZGÜ'ye, Dr. Dicle DÖNMEZ'e, Dr. Mehmet Ali SARIDAŞ'a, Dr. Metin KOÇAK'a, Dr. Aycan ALP'e, Dr. H. Şeyma SARIBAŞ'a, Dr. Burak AKYÜZ'e, Zir. Yük. Müh. M. Şamil ÖZDEMİR'e, Zir. Yük. Müh. Senem UĞUR'a teşekkür ederim.

Tez sırasında destek ve yardımlarından dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dekanlığına ve Bahçe Bitkileri Bölümü'ne teşekkür ederim. Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Son olarak doktora çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen aileme, nişanlım Zir. Yük. Müh. Aslıhan ÇİLİNGİR'e, kendisini kaybetmemin üzerinden 15 yıl geçmesine rağmen sıcaklığını ve kokusunu dün gibi hatırladığım, okuma-yazma bilmemesine rağmen eğitim ve öğrenime verdiği önemle motivasyon kaynağım olan rahmetli annem'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
2.1. Siklamende Doku Kültürü Çalışmaları	15
2.2. Ülkemizde Yapılan Işınlanmış Polen Yöntemiyle Haploid Bitki Uyarım Çalışmaları	28
2.3. Süs Bitkilerinde Işınlanmış Polen Tekniği Üzerine Yapılan Çalışmalar	33
3. MATERYAL VE METOT	37
3.1. Bitkisel Materyal.....	37
3.2. Metot.....	38
3.2.1. Çiçek Tomurcuklarının Emaskülasyonu ve Işın Uygulaması.....	40
3.2.2. Işınlanmış Polenlerde Çiçek Tozu Canlılık ve Çimlendirme Testi	42
3.2.3. Işınlanmış Polenlerle Tozlama ve Histolojik Analizler	46
3.2.4. Işınlanmış Polenlerle Tozlama İşlemi Sonrasında <i>in vitro</i> Ovül Kültürü.....	57
3.2.5. İstatistiksel Analizler	64
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	65
4.1. Işınlanmış Polenlerin Canlılık ve <i>In vitro</i> Çimlenme Oranları	65
4.2. Histolojik Analiz Bulguları	76
4.3. Doku Kültürü Çalışmaları ile İlgili Bulgular	92

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	111
KAYNAKLAR.....	115
ÖZGEÇMİŞ.....	131



ÇİZELGELER DİZİNİ**SAYFA**

Çizelge 1.1.	2019 yılı Türkiye süs bitkileri üretimi	2
Çizelge 1.2.	2018 yılı Türkiye süs bitkileri ihracat ve ithalat değerleri	3
Çizelge 3.1.	Johansen solüsyonlarının içeriği	49
Çizelge 3.2.	Ovül kültürü deneme planı	61
Çizelge 3.3.	Denemede kullanılan ½ MS basal besi ortamının kimyasal içeriği	61
Çizelge 3.4.	Birinci denemede kullanılan ortamların bileşenleri	62
Çizelge 3.5.	İkinci denemede kullanılan ortamların bileşenleri	63
Çizelge 4.1.	Işın uygulaması ve polen yaşının polen canlılığına etkisi (%).....	65
Çizelge 4.2.	Işın dozu ve polen yaşının çimlenme üzerine etkisi	69
Çizelge 4.3.	Işın dozunun çim borusu uzunluğuna etkisi.....	73
Çizelge 4.4.	Polen yaşının çim borusu üzerine etkisi.....	73
Çizelge 4.5.	Işın dozu ve polen yaşı interaksyonunun çim borusu uzunluğuna etkisi	74
Çizelge 4.6.	Işın dozlarının kallus gelişimi üzerine etkisi	95
Çizelge 4.7.	Besi ortamlarının kallus oluşumuna etkisi	96
Çizelge 4.8.	Işın dozu x besin ortamı interaksyonunun kallus oluşumuna etkisi.....	98
Çizelge 4.9.	Işın dozunun bitki uyarımına etkisi	101
Çizelge 4.10.	Besin ortamlarının bitki oluşumuna etkisi	102
Çizelge 4.11.	Işın dozu ve ortam interaksyonunun bitki oluşumuna etkisi	104



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Ülkemizde 2019 yılı süs bitkileri üretim alanları dağılımı.....	2
Şekil 1.2.	Siklamen türlerinin doğal olarak yetiştiği alanlar.....	6
Şekil 1.3.	Siklamen bitkisinin genel görünümü.....	7
Şekil 3.1.	Maxora F1 siklamen bitkisinin görünümü	37
Şekil 3.2.	Serada kültüre alınan bitkilerin görünümü	38
Şekil 3.3.	Tez çalışmasına ait aşamaları şema halinde gösterimi	39
Şekil 3.4.	Işınlama işlemi için toplanan çiçek tomurcukları.....	41
Şekil 3.5.	Işınlama işleminde kullanılan reaktörün görünümü	42
Şekil 3.6.	Anterlerin etüvde patlatılması	42
Şekil 3.7.	Çiçek tozu canlılık testinin yapılması.....	43
Şekil 3.8.	Polenlerin ışık mikroskobunda görünümü.....	44
Şekil 3.9.	Polenlerde <i>in vitro</i> çimlendirme testi	46
Şekil 3.10.	Çiçek tomurcuklarının fırça yardımıyla tozlanması	47
Şekil 3.11.	FPA-70 solüsyonunda saklanan çiçek tomurcukları	48
Şekil 3.12.	Çiçek tomurcuğu içindeki havanın alınması	49
Şekil 3.13.	Örneklerin parafin içine gömülmesi aşamaları.....	50
Şekil 3.14.	Parafin bloklarının hazırlanması işlemleri.....	52
Şekil 3.15.	Örneklerin boyanması ve daimi preparat hazırlanması	53
Şekil 3.16.	Örneklerden tespit çözeltilisinin uzaklaştırılması.....	55
Şekil 3.17.	Çiçek tomurcuklarının anilin mavisi ile boyanması	56
Şekil 3.18.	Ezme preparat hazırlanışı	57
Şekil 3.19.	Farklı dozda ışınlanmış polenlerle tozlanan bitkilerde meyve tutumu.....	57
Şekil 3.20.	Yüzey sterilizasyon aşamaları	59
Şekil 3.21.	Ovüllerin izolasyonu	60
Şekil 4.1.	Işın uygulamalarının polen canlılığına etkisi	66
Şekil 4.2.	Çim borusu uzunluğunun belirlenmesi.....	72

Şekil 4.3.	Işın uygulaması yapılmış gün yaşlı polenlerde canlılık, çimlenme oranı ve çim borusu uzunluğunun karşılaştırılması	75
Şekil 4.4.	A-B: Işın uygulaması yapılmayan polenlerin stigma üzerinde çimlenmesi,.....	77
Şekil 4.5.	50 Gy dozda ışınlanan polenlerin	78
Şekil 4.6.	100 Gy dozda ışınlanan polenlerin	79
Şekil 4.7.	A-B: 150 Gy Işın uygulaması yapılan polenlerin stigma üzerinde çimlenmesi, C: polen tüpü uzaması, D: polen tüpünün ovüle ulaşması	80
Şekil 4.8.	A: 200 Gy ışın uygulaması yapılan polenlerin stigma üzerinde çimlenmesi, B: dişicik borusunun görünümü, C: tozlamadan 4 gün sonra yumurtalığın görünümü, D: tozlamadan 8 gün sonra yumurtalığın görünümü	81
Şekil 4.9.	A: 300 Gy ışın uygulaması yapılan polenlerin stigma üzerinde çimlenmesi, B: dişicik borusunun görünümü, C: tozlamadan 4 gün sonra yumurtalığın görünümü, D: tozlamadan 8 gün sonra yumurtalığın görünümü	82
Şekil 4.10.	A: 450 Gy ışın uygulaması yapılan polenlerin stigma üzerinde çimlenmesi, B: dişicik borusunun görünümü, C: dişicik borusu sonu ve yumurtalığın birleştiği bölgenin görünümü, D: tozlamadan 8 gün sonra yumurtalıkta ovüller	83
Şekil 4.11.	Tozlanmamış çiçekte ovaryum görünümü	85
Şekil 4.12.	Tozlamadan 10 gün sonra ovaryumun genel görünümü	86
Şekil 4.13.	Tozlamadan 20 gün sonra ovaryumun genel görünümü	87
Şekil 4.14.	Tozlamadan 30 gün sonra ovaryumun genel görünümü	88
Şekil 4.15.	Tozlamadan 40 gün sonra ovaryumun genel görünümü	89
Şekil 4.16.	Tozlamadan 20 gün sonra ışık mikroskopunda embriyo görünümü	90

Şekil 4.17. Tozlamadan 20 gün sonra floresan mikroskobunda embriyo görünümü	91
Şekil 4.18. Birinci denemede ovül kültüründe kallus rejenerasyonu	93
Şekil 4.19. Kültüre alınan eksplantlarda kallus gelişimi	94
Şekil 4.20. Ovül kültürü denemelerinin görünümü	97
Şekil 4.21. Kendilenmiş ve ışınlanmış polenlerle tozlama sonrasında eksplantlarda gözlenen rejenerasyonlar.....	105
Şekil 4.22. Rejenerasyon sonucu elde edilen bazı bitkicikler.....	106
Şekil 4.23. Bitkilerin aklimatizasyonu	109
Şekil 4.24. A: kültür ortamında gelişimi duran eksplant, B, C ve D: morfolojik özellikleri kontrol grubuna göre daha küçük olan sürgün yapıları.....	110



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µmol	: Mikromol
µM	: Mikromolar
µm	: Mikrometre
2,4-D	: 2,4-dichlorophenoxyaceticacid
2iP	: 6-(γ,γ –dimethylallylamino)purine
ABA	: Absisik Asit
BA	: Benzil Adenin
BAP	: Benzil Amino Purin
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
cm	: Santimetre
Co-60	: Kobalt-60
CO ₂	: Karbondioksit
Dk	: Dakika
FPA	: Formaldehit: propiyonik asit: alkol
g	: Gram
Gy	: Gray
HgCl ₂	: Civa Klorür
IAA	: İndol Asetik Asit
Kin	: Kinetin
kR	: Krad
L	: Litre
m	: Metre
mgL ⁻¹	: Miligram/Litre

mM	: Milimolar
MS	: Murashige & Skoog
NAA	: Naftalen Asetik Asit
NaOH	: Sodyum hidroksit
pH	: Power of hydrogen
TBA	: Tersiyer Bütül Alkol
TDZ	: Thidiazuron
TTC	: Trifenil tetrazolium klorür
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ

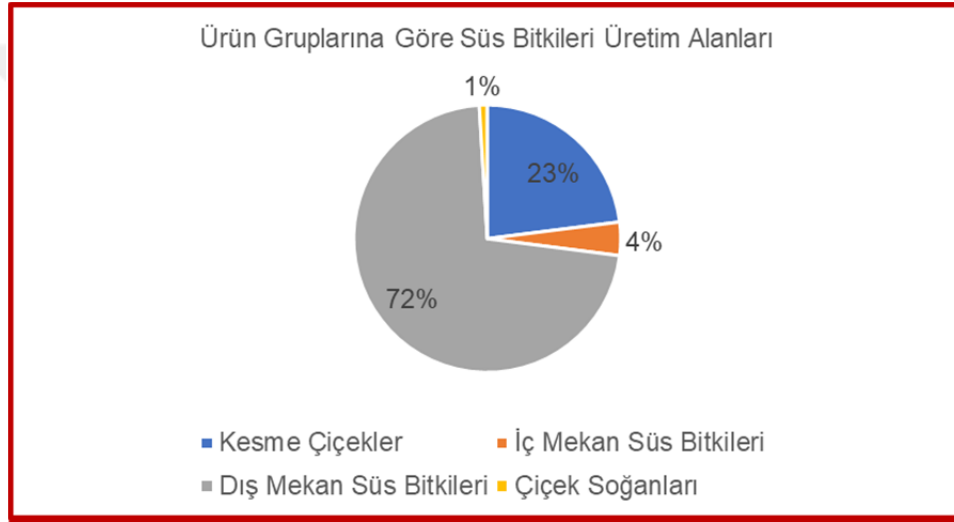
Bitkisel ve hayvansal biyoçeşitlilik bakımından oldukça zengin olan ülkemiz, bu zenginliği sahip olduğu; biyocoğrafik özellikler, iklim ve toprak yapısı ile insanlığın var olduğu dönemlerden günümüze kadar birçok medeniyete ev sahipliği yapmasına borçludur. Ülkemizin sahip olduğu bu özellikler, pek çok milleti üzerinde bir arada barındırdığı gibi, geçmişten günümüze birçok bitki ve hayvan türüne de ev sahipliği yapmasına da olanak tanımıştır. Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bitki türü sayısı 13-14 bin civarında olup, Avrupa'daki toplam bitki türü sayısından daha fazladır. Ayrıca sahip olduğumuz toplam bitki sayısının da 3'te 1'i endemiktir.

Bu eşsiz bitkisel biyoçeşitlilik, süs bitkileri açısından değerlendirildiğinde de benzer bir görüntü ile karşılaşılmaktadır. Ancak, sektörel bazda henüz arzu edilen noktalara gelinebilmiştir. Buna rağmen son 10 yılda, üniversite-kamu ve sanayi iş birliği sayesinde veya kurumların bireysel çalışmaları sonucunda, ülkemizde süs bitkileri potansiyeli gün geçtikçe iyileşmektedir. 2014 yılında süs bitkileri üretimi, 49 bin dekar alanda gerçekleştirilmekte iken, üretim değeri 3 milyar TL civarındaydı. Bu üretim, 70 milyon dekarda üretilen buğdayın üretim değerinin yaklaşık 3'te 1'ini karşılamaktadır (SÜSBİR, 2015). Ülkemizde üretilen süs bitkileri, üretim miktarları bakımından ürün gruplarına göre değerlendirildiğinde, adet bazında kesme çiçekler ve çiçek goncaları, 1 milyar adetten fazla üretilerek ilk sırada yer almaktadır. Bu sırayı; dış mekan süs bitkileri yaklaşık 510 milyon adetle ikinci, çiçek soğanları 62 milyon adetle üçüncü, iç mekan süs bitkileri ise 51.5 milyon adetle son sırada takip etmektedir (Çizelge 1.1; TÜİK, 2020).

Günümüzde süs bitkileri üretim alanımız 51 bin dekarın üzerine çıkmıştır. Dış mekan süs bitkileri 37 bin dekarın üzerinde bir alanla toplam üretim alanlarının %72'sini oluştururken, çiçek soğanları 494 dekar ile toplam üretim alanlarının %1'ini oluşturmaktadır (Şekil 1.1; TÜİK, 2020).

Çizelge 1.1. 2019 yılı Türkiye süs bitkileri üretimi

Ürün Grubu	Üretim Alanı (da)	Üretim Miktarı (Adet)
Kesme Çiçekler ve Çiçek Goncaları	12.374	1.093.333.943
İç Mekan Süs Bitkileri	1.992	51.669.029
Dış Mekan Süs Bitkileri	37.699	510.558.039
Çiçek Soğanları	412	62.537.229
Toplam	52.477	1.718.098.240



Şekil 1.1. Ülkemizde 2019 yılı süs bitkileri üretim alanları dağılımı

Sektörel bazda ihracat ithalat değerleri incelendiğinde, geçmiş yıllarda ithalat yönünde ağır basan rakamların, 2018 yılında ihracat lehine döndüğü gözlenmektedir. 2019 yılı verilerine göre; toplamda 71 milyon dolar ihracat yapılırken, yaklaşık 70 milyon dolarlık ithalat gerçekleştirilmiştir (SÜSBİR, 2019). Kesme çiçekler en çok ihracat yaptığımız ürün grubu iken, çiçek soğanları en az ihracat yapılan ürün grubunu oluşturmaktadır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. 2018 yılı Türkiye süs bitkileri ihracat ve ithalat değerleri

Ürün Grubu	İhracat (\$)	İthalat (\$)
Çiçek Soğanları	1.744.310,00	5.477.415,00
Canlı Bitkiler	24.957.041,00	45.719.663,00
Kesme Çiçekler	34.154.989,00	3.260.840,00
Bitki Yaprak ve Kısımları	7.820.217,00	968.755,00
Çiçek Tohumları	2.562.116,00	5.514.463,00
TOPLAM	71.238.673,00	60.941.136,00

Çiçek soğanları, 2018 yılında 494 dekar üretim alanında 88 milyon adeti aşan bir üretime sahiptir. Çiçek soğanlarına ait ekonomik veriler incelendiğinde, bu ürün grubu 1.7 milyon doları aşan bir ihracat değerine karşılık, yaklaşık 5.5 milyon dolar ithalat değerine sahiptir. İhracat ithalatı karşılamadığı gibi bu ürün grubunda yer alan siklamen gibi bazı bitkiler doğrudan doğadan toplanmaktadır.

Çiçek soğanları veya geofitler; rizom, soğan, yumru veya korm gibi toprak altı organlara sahip bitkiler olarak tanımlanmaktadır. Geofitler 800'den fazla cinsin oluşturduğu bir grup olup, kesme çiçek, iç mekanlarda saksılı süs bitkisi veya dış mekanlarda çevre düzenlemelerinde peyzaj bitkisi olarak kullanılan süs bitkisi sektöründe önemli bir gruptur. Dünya genelinde 4.300'den fazla tür ile temsil edilen geofitler, her yıl vejetasyon dönemi sonunda toprak üstü aksamalarını kaybeder ve bir sonraki vejetasyon döneminde yeniden toprak üstü aksamaları oluşur (Kamenetsky ve Okubo, 2013). Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren geofit türleri, floramızın yaklaşık %6'sını oluşturmaktadır ve bunlardan 162'si ülkemize endemiktir. Ancak, diğer birçok doğal bitkimizde olduğu geofit türleri de doğadan bilinçsiz sökülme, yol açma ve genişletme çalışmaları, tarla açma, aşırı otlama, yangınlar gibi faktörler nedeniyle tehlike altındadır (Koçak, 2012).

Geride bıraktığımız yüzyıl ve hatta öncesinde, geofitler ülkemiz florasından toplanarak yurt dışına satışı gerçekleştirilmiştir. 1960'lardan sonra süs bitkileri sektöründeki ticaretin gelişmesi nedeniyle geofitlerin doğadan sökülmesi yapılarak ihraç edilmesindeki artış, sektörün gelişimi ile benzerlik göstermiştir.

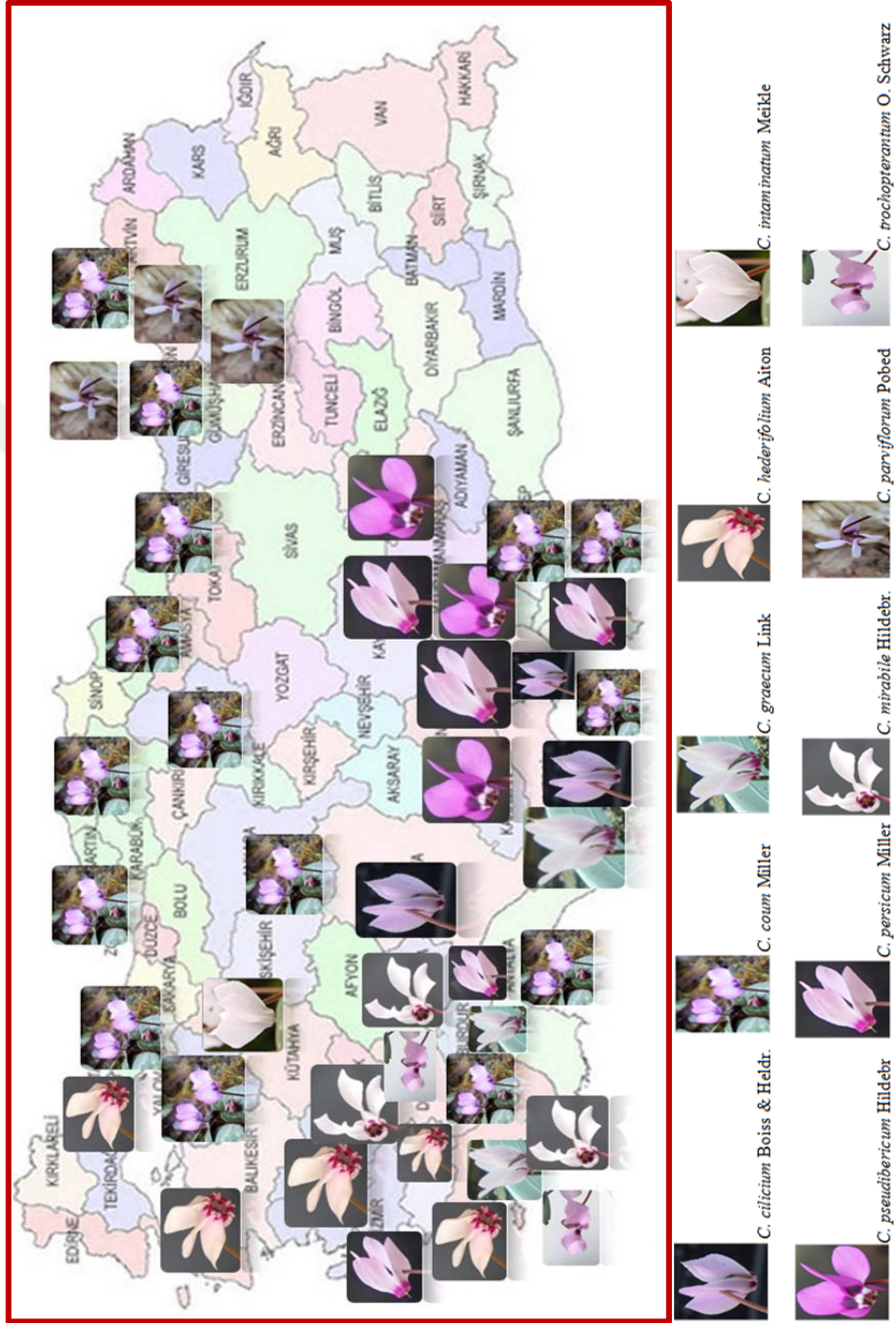
1973 yılında 21 ülkenin katılımıyla ABD’ de CITES sözleşmesi olarak bilinen nesli tehlike altında olan yabancı hayvan ve bitki türlerinin uluslararası ticaretini düzenleme anlaşması imzalanmıştır. Türkiye CITES: 27/4/1996 tarihli ve 96/8125 sayılı Bakanlar Kurulu Kararı ile yürürlüğe konulan “Nesli Tehlikede Olan Yabancı Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşmeyi” resmen kabul etmiştir. Bu sözleşmenin bir sonucu olarak “Doğal Çiçek Soğanlarının Sökümü, Üretimi ve Ticaretine İlişkin Yönetmelik” oluşturulmuş ve doğadan sökülen bitkiler için bu durum kontrol altına alınmıştır. Yönetmelik kapsamında her yıl doğal çiçek soğanları ihracat listesi hakkındaki tebliğ resmî gazetede yayınlanmaktadır. Doğadan toplanarak ihracatı yasak olan çiçek soğanlarının familyaları, cinsleri ve türleri belirlenmekte ve kotayla sınırlandırılmaktadır. Bu tebliğde aynı zamanda bitkilerin ihracat miktarları ve soğan büyüklüğü ile ihracatı üretimden serbest olan çiçek soğanlarının familyaları, cinsleri ve türleri belirlenmektedir. Belirlenen hususlar bir yıl öncesinde genellikle yıl sonuna doğru tebliğ edilmekte ve geçerli olduğu yılın ilk günü yürürlüğe girmekte ve yine geçerli olduğu yılın son günü yürürlükten kalkmaktadır. 2019 yılı için 12 Aralık 2018 tarihinde yayınlanan 2018/49 nolu Doğal Çiçek Soğanlarının 2019 Yılı İhracat Listesi Hakkında Tebliğ’de *C. cilicium*, *C. coum* ve *C. hederifolium* ihracatı kotaya tabi olan çiçek soğanları listesinde yer alırken, diğer siklamen türlerinin doğadan sökümü ve satışı tamamen yasaklanmıştır (TOB, 2018).

Myrsinaceae ailesinin bir üyesi olan *Cyclamen* cinsi içerisinde yer alan tür sayısı, bazı araştırmacılara göre 21 (Compton vd., 2004; Yesson ve Culham, 2006) bazılarına göre de 22’dir (Grey-Wilson, 2003). *Cyclamen* taksonomik açıdan oldukça küçük bir cins olmasına karşın, bulunduğu aile içerisinde ekonomik açıdan en gösterişli ve ticari önemi yüksek türleri barındırmaktadır. *Cyclamen* cinsi içerisinde yer alan türlerden 10 tanesi, ülkemiz florasının doğal üyeleridir. Bu türlerden 5-6’sının ülkemize endemik olduğu bilinmektedir (Koçak vd., 2014; Çuruk vd., 2016). Ülkemizde *Cyclamen* cinsine ait türler, farklı yörelerde tavşan kulağı, domuz turpu, köstebek, dağ menekşesi, kır menekşesi, kuskusa ve siklamen

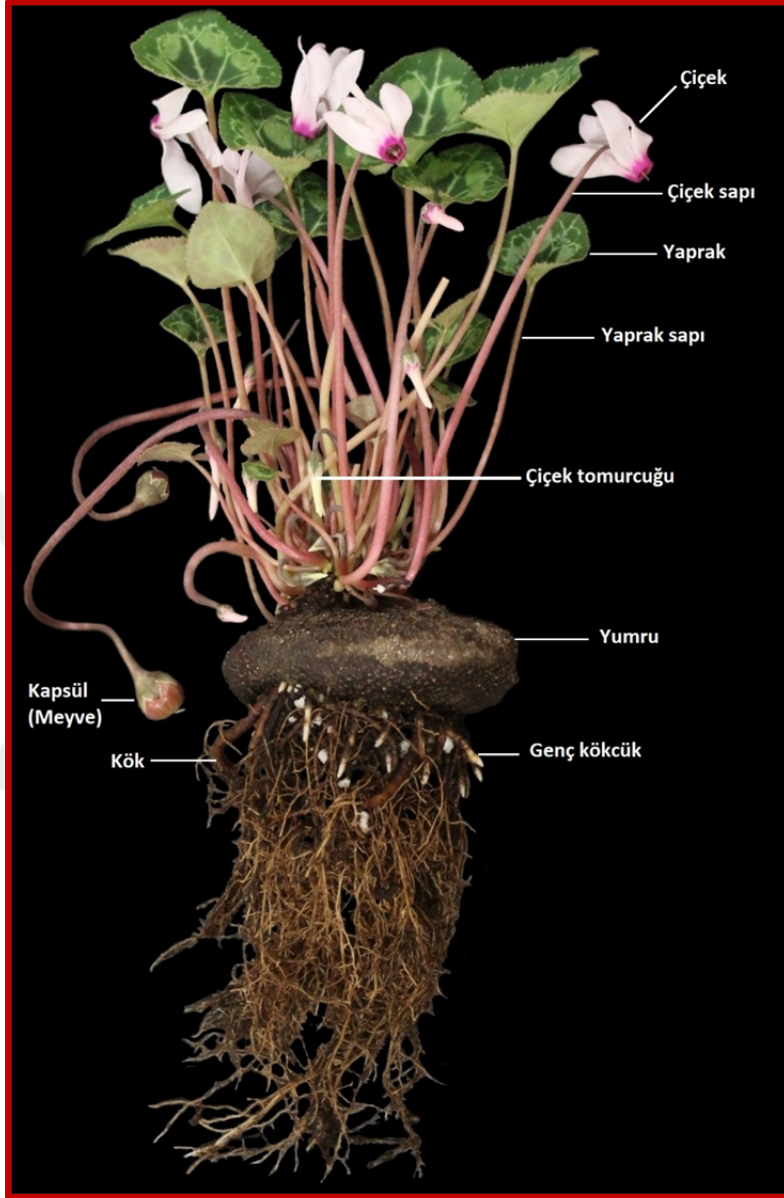
gibi farklı isimlerle bilinmektedir. Ülkemizde doğal olarak yetişen siklamen türleri genel olarak Akdeniz, Karadeniz, Marmara ve Ege bölgelerinde yayılış göstermektedir (Gündoğan, 2003; Şekil 1.2).

Siklamen toprak altı yumrulara, gösterişli çiçek ve yapraklara sahip çok yıllık bir bitkidir. Botanik özellikleri bakımından uzun yaprak ve çiçek saplarına; türlere göre değişmekle birlikte dişli veya düz yaprak kenarlarına sahiptir. Yapraklar, oval, dairemsi veya kalp şeklindedir. Çiçek rengi beyaz, pembe veya eflatun renklidir. Çanak yaprakları 5 lobludur. Erkek organ 5 adet stamenden oluşur ve korollaların tabanından çiçek tablasına kısa filamentlerle bağlıdır. Stamenler uzun olup, dişi organ etrafında huni biçiminde dizilirler. Siklamenlerde ovaryum üst durumludur ve dişicik borusu ince ve uzundur (Davis, 1978; Çürük, 2013). Siklamen bitkisinin genel görünümü Şekil 1.3’de verilmiştir.

Ülkemizin farklı bölgelerine adapte olan siklamen türleri, doğal olarak farklı iklim tiplerinde yetişmektedir. Ancak yetiştiricilik istekleri açısından %60-80 nem oranına sahip, gündüz sıcaklıklarının 16 °C, gece sıcaklıklarının ise 14 °C civarında olduğu şartlarda daha sağlıklı ve kaliteli yetiştiricilik yapılmaktadır. Toprak isteği bakımından siklamen, iyi drenaja sahip havadar topraklar istemektedir. Siklamen türleri her ne kadar ışıklanmaya duyarlı görünse de ışık yoğunluğunun yüksek olması durumunda çiçek tomurcuğu sayısının arttığı bilinmektedir. Serada yetiştiricilikte, kaliteli ve sağlıklı bitki elde etmek için sera içindeki ışık miktarının 30 bin lüks’ün üzerinde olması istenir. Ancak yaz aylarında güneşin aşırı ışıklarından bitkilerin etkilenmemesi ve güneş yanıklarından bitkilerin korunması amacıyla, %50-60 oranında gölgeleme yapılır (Çürük, 2013).



Şekil 1.2. Siklamen türlerinin doğal olarak yetiştiği alanlar (Mendi ve Çürük, 2016)



Şekil 1.3. Siklamen bitkisinin genel görünümü

Siklamen floramızda bulunan diğer geofitler gibi otlama, doğadan bilinçsiz toplama vb. insan faktörünün doğrudan veya dolaylı olarak etkisi altındadır. İlk başlarda ülkemizde geofitlerin ticareti tamamen doğadan toplanarak

gerçekleşmekteyken, günümüzde doğal çiçek soğanlarının kültüre alınması, yeni çeşitlerin ıslahı çalışmaları ile bu durum engellenmeye çalışılmaktadır (Karagüzel vd., 2007). Daha önce kültüre alınmamış ancak ekonomik öneme sahip olan bitkilerin kültüre alınması ve ıslahı, diğer ülkelere göre ülkemizde daha geç başlamıştır. Bu durumun en önemli nedeni ise süs bitkilerinin ticarete konu olan tarımsal bir faaliyet olduğunun henüz kavranmaya başlamasındandır. Bu gecikme, doğal olarak süs bitkileri sektöründeki yeni çeşit geliştirmeye yönelik araştırma-geliştirme faaliyetlerinin de gecikmesine yol açmıştır (Gülbağ, 2015). Günümüzde toplam üretim maliyetleri içinde en yüksek paylardan birinin üretim materyaline ödenmesi, süs bitkileri üreticilerimizin yurt dışı pazarında rekabet kabiliyetini zayıflatmakta, diğer taraftan üretim materyallerinin izinsiz çoğaltılması yöntemine başvurulması ise; hukuki açıdan sorunlara neden olmaktadır. Ayrıca, son yıllarda yaşanan dövizdeki dalgalanmalar, girdi maliyetlerini arttırmaktadır. Bu nedenlerle en azından üreticilerin yurt dışı piyasalarda rekabet kabiliyetinin artırılması amacıyla, üretim materyallerinde dışa bağımlılık azaltılmalı ve verim ve kalite parametreleri bakımından piyasada talep gören yerli çeşitlerin ıslah edilerek süs bitkileri sektörüne kazandırılması gerekmektedir. Yerli çeşitlerin geliştirilmesi ise ancak süs bitkileri açısından ekonomik öneme sahip bitkilerin ıslahı ile gerçekleştirilebilir. Bitki ıslahı ekonomik açıdan öneme sahip bitkilerin genetik esaslardan faydalanılarak mevcut bitkilerin, cins, tür veya çeşitlerin genetik yapısının tüketicilerin talepleri yönünde programlı bir şekilde değiştirilmesidir (Şehirli ve Özgen, 2007). Islahçılar, her yıl pazar talebine göre çiçeklerin renk, vazo ömrü, çiçek şekli gibi özelliklerini değiştirerek birçok yeni çeşit geliştirmektedirler. Yeni çeşit geliştirme çalışmalarında seleksiyon ve melezleme gibi birçok yöntem bulunmakla birlikte, geleneksel yöntemler genellikle çok uzun süren süreçlerdir.

Dünyada diğer süs bitkilerinde olduğu gibi siklamen ıslahı da genellikle klasik melezleme yöntemleri ve fenotipik seçimler ile yapılmakta, fakat bu yöntemlerle çeşit geliştirme oldukça zaman almaktadır. Siklamen ıslahı, bitkinin

döllenme biyolojisinde farklı seviyelerde görülen kendileme depresyonu, farklı ploidi seviyeleri ve abortif embriyo oluşumuna neden olan kendine uyumsuzluk gibi faktörlerden dolayı klasik yöntemlerle bir hayli zordur (Jalali vd. 2012). Bu nedenle ıslahçılar, ıslah programlarında vejetatif yöntemlerin üretim sürecine dahil edilmesine önem vermektedirler. Ayrıca etkili ve ekonomik bir vejetatif çoğaltım gerçekleştirilmesi, ıslahçıların üstün özellikteki bitkileri selekte ederek klonal varyeteleri üretebilmesine olanak sağlamaktadır. Siklamen kesilerek ya da yumruları ayrılarak çoğaltılmamaktadır, bu nedenle *in vitro* tekniklerle vejetatif çoğaltım büyük önem taşımaktadır. Siklamende yeni çeşitlerin geliştirilmesi için, klasik yöntemlerin yanında biyoteknolojik yöntemler de son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak siklamen bitkisinin sahip olduğu kromozom yapısı, çeşitten çeşide farklılık göstermekte olup, diploid $2n=48$, tetraploid $2n=96$ ve aneu-tetraploid $2n=90, 92, 94, 95$ kromozom yapılarına sahip türleri olduğu bilinmektedir. Daha önceki çalışmalardan siklamende triploid çeşitlerin bulunmadığı tespit edilmiştir (Takamura ve Miyajima, 1996). Bu nedenle başlangıç materyalinin genetik yapısının iyi bilinmesi gereklidir.

Süs bitkilerinde sıklıkla kullanılan başka bir ıslah yöntemi de ploidi ıslahıdır. Özellikle genetik kısırılık gösteren bitkilerde uygulanan bu metot, triploid bitki üreterek bitkinin sonraki melezleme aşamalarında problemsiz nesil gelişimini sağlamaktır. Bu ıslah yönteminde uygulanan kimyasal genellikle kolhisin olup, bitkideki mitoz aşamasına müdahale ederek polimerizasyonu engeller ve böylelikle anafaz safhasında kromozomların kutuplara taşınmasını durdurur.

Dihaploidizasyon, bitkilerde homozigot saf hatların elde edilmesini sağlayan iki aşamalı bir yöntemdir. Bu aşamalar, haploidizasyon ve dihaploidizasyon olarak bilinmektedir. Birinci aşamada, türün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısına (n) sahip haploid bitkiler elde edilir. Bu amaçla *in situ* ve *in vitro* haploidi yöntemleri kullanılmaktadır. *In situ* haploid uyartımını teşvik etmek amacıyla türler arası melezlemeler, tozlamının geciktirilmesi, abortif veya ıslanmış polenlerle tozlama, değişik kimyasal maddeler ve hormon uygulamaları,

sıcaklık şokları, “X” veya “UV” ışınları uygulaması gibi yöntemler kullanılmaktadır (Sarı vd., 1992; Çağlar ve Abak, 1999; Kurtar, 1999; Yılmaz, 2005). *In vitro* haploid uyartımında ise erkek gametten yola çıkılarak, haploid bitkiler geliştirilebildiği gibi (androgenesis), dişi gametten de haploid bitki oluşturulabilmektedir (gynogenesis).

Anter kültürü, bitki ıslahı amacıyla kullanılan ilk *in vitro* haploidi tekniğidir (Reed, 2005). Anter kültüründe uygun gelişme döneminde henüz açılmamış çiçek tomurcuklarından izole edilen anterler kullanılmaktadır (da Silva vd., 2015). Haploid uyartımı için yapılan anter kültürü çalışmaları için genellikle en uygun gelişme dönemi, henüz olgunlaşmamış tek çekirdekli mikrospor aşamasıdır (Datta, 2005; Doğru vd., 2016). İlk polen mitozuna denk gelen bu gelişme dönemi, asetokarmin veya DAPI gibi floresan boyalarla boyanan polenlerin mikroskop altında gözlenmesiyle tespit edilebilir (Germana, 2011). Haploid uyartımında androgenesisin etkinliğini arttırmak için, çiçek tomurcuklarına çeşitli fiziksel ve kimyasal ön uygulamalar uygulanmakta ve sonrasında izole edilen anterler aseptik koşullarda farklı besi ortamlarında kültüre alınmaktadır. Ancak, anter kültüründe anter duvarlarından gelişme görülebilmesi genellikle bu tekniğin zayıf tarafıdır. Bu nedenle, son yıllarda mikrospor ya da polen embryogenesis yöntemi ıslah programlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk başarılı mikrospor kültürü *Datura innoxia* bitkisinde Nitsch ve Norreel tarafından 1970’lerde yapılmıştır (Zheng, 2013). İlerleyen yıllarda mikrospor tekniği geliştirilerek diğer türlerde de denenmiştir. Günümüzde; yulaf (Ferrie ve Caswell, 2011), pirinç (Islam vd., 2013), buğday (Ayed vd., 2010) gibi tek yıllık tarla bitkilerinde ve *Brassica* cinsine ait bazı sebzelerde rutin olarak uygulanmaktadır (Babbar vd., 2004). Süs bitkilerinde mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki üretimi, sebzeler ve tarla bitkilerine göre oldukça düşüktür. Ancak, son yıllarda süs bitkilerinde de bu yöntemle haploid bitki elde etme çalışmaları artış göstermektedir. Anter kültürüne benzer olarak mikrospor kültüründe de başarılı olmanın en önemli noktalarından biri, mikrosporların uygun gelişme

döneminin belirlenmesidir. Mikrospor kültüründe uygun gelişme döneminde alınan anterlerden sterilizasyon işleminden sonra mikrosporlar izole edilmektedir. Mikrosporlar mekanik olarak anterlerin parçalanması veya sıvı ortam içerisine alınan anter duvarlarının yırtılarak mikrosporların kurtulması ile elde edilirler (Ferrie ve Caswell, 2011; Olsen, 1991). Anter kültüründe olduğu gibi mikrosporlardanda, uyartımın sağlanması amacıyla farklı fiziksel ve kimyasal ön uygulamalar yapılabilmektedir. Mikrospor kültürü anter kültürüne göre bazı avantajlara sahip olsa da teknik açıdan uygulanması zor bir yöntemdir (Obert vd., 2009).

Haploid bitki üretiminde, androgenesis yöntemleri gynogenesis yöntemlerine göre daha sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, androgenik yöntemler her zaman uygulamalara cevap vermemektedir. Ayrıca donör bitkinin erkek kısır olduğu, düşük rejenerasyon yeteneğine sahip olduğu gibi durumlarda, androgenik yöntemler tercih edilmemektedir (Ferrie, 2003). Bu gibi durumlarda, genellikle gynogenik yöntemlerle haploid bitki üretimi daha sağlıklı sonuç vermektedir.

Gynogenesis yöntemleri olarak çiçek tomurcukları, ovaryum ve ovüller başlangıç materyalleri olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde haploid bitkiler, döllenmemiş yumurta hücresinin veya embriyo kesesindeki sinerjit ve antipod gibi diğer haploid hücrelerin bölünmesi sonucu meydana gelmektedir (Shivanna, 2003). Haploid bitki uyartımında eksplantların gelişim dönemlerinin bilinmesi, androgenesis yöntemlerinde olduğu kadar gynogenesis yöntemlerinde de önemlidir. Ovüllerin farklı gelişim dönemleri, gynogenesis uyartımı için uygun safha olabilir ancak literatürde geç evrelerin daha yatkın olduğu bildirilmektedir. Bu bakımdan androgenik yolların aksine gynogenik uyartım için uygun gelişme dönemi daha uzun bir periyottur (Doi vd., 2011; Chen vd., 2011). Örneğin, *Gerbera jamesonii* türünde ovüllerin gelişim aşamaları, ovülün ovaryum çukurunun yarısını doldurması ve olgunlaşmaya yakın ovül olarak sınıflandırılır. Genellikle ikinci aşamadaki yani olgunlaşmaya yakın ovüllerin gynogenesisise daha yatkın olduğu bildirilmektedir (Sitbon, 1981). Androgenesis yöntemlerine benzer

olarak soğuk-sıcak uygulamaları gibi ön uygulamalar, haploid embriyo oluşum frekansını arttırmaktadır (Sopory ve Munshi, 1996; Chen vd., 2011). Farklı türlerde ülkemizde yapılan anter kültürü çalışmalarında da yapılan farklı uygulamalar ve besin ortamı kompozisyonları ile çeşitlere göre değişen oranlarda haploid bitki oluşumu gerçekleştirilmiş, ancak bu oran sınırlı düzeylerde kalmıştır. Yıllar içerisinde devam edilen çalışmalar sonucunda, bazı türlerde anter kültürü yoluyla ıslah programlarında kullanılabilecek düzeyde haploid bitki elde edilebilecek duruma gelinmiştir (Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz 1997; Ellialtıoğlu vd., 2006). Haploid bitkilerin elde edilmesinden sonraki aşama, bu bitkilerin kromozom sayılarının bazı kimyasal maddeler yardımıyla iki katına çıkartılması ($2n$) veya dihaploidizasyon aşaması olarak tanımlanır. Ploidi seviyesi katlanarak diploid duruma getirilen bitkilerde veya sürgünlerde oluşan çiçekler kendilenecek bunlardan tohum alındığında, sadece bir generasyonluk süre içerisinde tamamen homozigot bitkiler elde edilmiş olmaktadır. Bu yöntem, uzun yıllar (8-10 yıl) kendilemelerle saflaştırma yöntemine göre çok daha avantajlı bir yol olarak görülmekte ve dünyada ıslahçı kişi veya kurumlar tarafından kullanılmaktadır. Dihaploidizasyon, ıslahçılara çalışmalarında büyük avantajlar sağlamıştır. Bunlar arasında; araştırmacılara normal diploid ve dihaploid bitkilerin karşılaştırılmasına imkân vermesi, mutasyon ıslahı çalışmalarında mutajenin etkisinin ilk generasyonda gözlenebilmesi, dihaploid bitkilerde genetik açılımın basit olması, resesif genlerin dominantla tarafından örtülmemesi, saf hatların kısa sürede ve kolaylıkla elde edilebilmesi sayılabilir (Kurtar vd., 2011; Khush ve Virmani, 1996, Sarı, 1994; Emiroğlu ve Gürel, 1993).

Haploidlerin elde edilmesinde kullanılan yöntem ile birlikte, genotip, donör bitkinin büyüme koşulları ve yaşı, gametlerin durumu, sıcaklık şokları ve karanlıkta bırakma gibi ön uygulamalar ile kültür ortamının bileşimi gibi pek çok faktör de etkili olmaktadır (Karakullukçu, 1993a; Karakullukçu, 1993b; Kurt vd., 1994; Juhasz ve Jakse, 2005). Tüm bu faktörler göz önüne alındığında, başarılı bir haploid uyartımı için genotip, kullanılan teknik ve uygulamalar ön plana

çıkılmaktadır. Nitekim, siklamen gibi döllenme biyolojisinde problem olan bitkilerde *in vitro* haploidi uyartım yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak özellikle doğal türlerin (kültüre alınmamış) *in vitro* rejenerasyon oranının düşük olması nedeniyle anter, ovül ya da ovaryum kültürlerinde her zaman başarılı sonuç alınamamaktadır. Işınlanmış polen kullanılarak *in situ* haploid uyartımı, bu gibi durumlarda yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu teknik; iyonlaştırıcı (X ışınları, gama ışınları) veya iyonlaştırıcı olmayan (UV ışınları) ışınlarla maruz bırakılan polenler ve sonrasında normal bitkilerin bu polenlerle tozlanması esasına dayanmaktadır. Eksplant kaynağı olarak anterler, çiçek tomurcukları veya tüm bir çiçek kullanılmaktadır. Normal şartlarda embriyo gelişimi stigma üzerine ulaşan polenlerin çimlenmesi, çim borusu oluşumu ve tohum taslağı içerisindeki çekirdek ile polen çekirdeğinin birleşmesi ile uyartılmaktadır. Ancak ışınlanmış polenler bu durumda, çimlenme ve yumurtayı dölleme yeteneğine sahip değildir. Birçok türde ışınlanmış polen ile tozlama sonrasında embriyo kurtarma, haploid bitkilerin elde edilmesi için gerekmektedir (Grouh vd., 2015). Bu uygulamada ışınlar polenlerin generatif fonksiyonunu tahrip etmekte, ancak yumurta hücrelerini uyartım yeteneğini etkilememektedir. Böylece partenogenik embriyo oluşumları meydana gelmektedir. Polenlerde ışın uygulamaları, 19. yy. sonlarında Röntgen'in X ışınlarını keşfetmesiyle başlamıştır. İlk araştırmalarda, ışın uygulamalarının polen çimlenmesi ve polen tüpü uzaması üzerine etkileri araştırılmıştır. Işınlanmış polenlerle haploid bitki üretimi ilk olarak *Triticum monococcum* türünde gerçekleştirilmiştir. Sonraki yıllarda bu teknik ekonomik bakımdan önemli olan diğer türlerde de başarıyla uygulanmıştır (Sestili ve Ficcadenti, 1996).

Işın uygulamasının partenogenik gelişimine etkisi hakkında farklı görüşler bulunmaktadır. Ancak bu görüşler, temelde ışınlanmış polenlerle tozlamadan; polen tüpü oluşumu sırasında gerçekleşen mitoz bölünmeler sırasında sitolojik anormalliklerin meydana gelmesi ve normal eşeysel döllenmede sürecindeki sapmalardan meydana geldiği üzerinde birleşmektedir. Işınlanmış polenlerle tozlama sonrasında haploid embriyo veya haploid endosperm çekirdeğinin oluşması iki farklı yolla açıklanmaktadır. Bunlardan birincisi; yumurta hücresinin, kromatinleri sitoplazmada eliminasyona uğrayarak zarar görmüş erkek üreme

hücresi tarafından döllenmesidir. İkinci görüş ise; yumurta hücresinin, piknotik çekirdeğe (kromatinleri geri dönüşümsüz olarak yoğunlaşmış çekirdek) sahip erkek üreme hücresi tarafından uyarılmasıdır (Sestili ve Ficcadenti, 1996).

Işınlanmış polenlerle haploid bitki üretimine etki eden faktörler diğer tekniklerle benzerlik göstermekle birlikte, ışın uygulaması nedeniyle farklılıklar göstermektedir. Kullanılan ışın dozu, *in situ* partenogenesisde en önemli faktörlerin başında gelmektedir. Işınlamada uygulanan doz ile polen tüpünün uzaması arasında yüksek bir korelasyon vardır. Bazı türlerde ışınlama işleminin polen çimlenmesinin ve polen tüpü uzamasını arttırmaktadır. Bu durum protein sentezinin artması sonucunda yüksek metabolik aktivitenin gözlenmesi olarak açıklanmaktadır. Neredeyse tüm türlerde, en yüksek haploid uyartım frekansı lethal dozda uygulanan ışın uygulaması ile elde edilmektedir.

Günümüzde ışınlanmış polenlerle tozlama ya da *in situ* partenogenetik haploid uyartımı, sebzelerde (kavun, karpuz, biber) ve bazı süs bitkilerinde (gül, iris) başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak bu yöntem, siklamende bu tez çalışması ile ilk defa uygulanmıştır. Çalışma kapsamında Co-60 kaynağı kullanılarak çiçek tomurcukları ışınlanmış ve elde edilen ışınlanmış polenlerle kendileme işlemi gerçekleştirilmiştir. Işınlanmış polenlerle tozlama sonrasında embriyo kurtarma işlemi gerekmektedir. Bu nedenle, embriyoların *in vivo* gelişim durumlarının belirlenmesi ve abortif hale gelmeden kurtarılması gerekmektedir. Bu amaçla ışınlanmış polenlerle kendileme işlemi sonrasında, belirli dönemlerde alınan çiçek tomurcuklarında histolojik çalışmalar yapılarak embriyo gelişimine etkisi incelenmiştir.

Tez çalışması kapsamında aşağıda belirtilen hedefler amaçlanmıştır;

- i. Farklı gamma ışın dozlarının çiçek tozu canlılığına etkisi,
- ii. Histolojik analizler ile *in vivo* embriyo gelişim safhasının belirlenmesi,
- iii. Işın dozlarının embriyo uyartımına etkisinin ve embriyo kurtarma için uygun embriyo gelişim safhasının belirlenmesi,
- iv. Embriyo kurtarma ve çimlendirme ortam optimizasyonunun yapılması.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Siklamende Doku Kültürü Çalışmaları

1900'lü yılların başında bitkilerin totipotensi yeteneğinin keşfi ile başlayan bitki doku kültürü çalışmaları, 1950'li yıllarda araştırmacıların bitki büyüme düzenleyicileri ve besi ortamlarının farklılaşma üzerine etkisini daha iyi anlamaya başlamasıyla hız kazanmıştır. Siklamende *in vitro* çalışmalar, aynı yıllarda Stichel (1959) ve Mayer (1956)'in yumru örneklerinden kök ve tomurcuk elde etme çalışmaları ile başlamıştır. Siklamenin süs bitkileri açısından ekonomik potansiyeli, daha o yıllarda yapılan çalışmalarda görülmektedir. Doku kültürü çalışmalarının ilk yıllarında araştırmacılar diğer doku kültürü temelli çalışmalara benzer olarak bitkinin farklı kısımlarından aldıkları örnekleri *in vitro* kültüre alarak farklı ortam ve büyüme düzenleyicilerinin embriyo, kallus, kök, sürgün gibi yapılarına dönüşümü üzerine etkilerini belirlemişlerdir. Bu konuda yapılan çalışmalardan bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

Loewenberg (1969), yumruların alınan eksplantlar üzerine farklı oksin hormonlarının, besi ortamı ve ışığın etkisini araştırmıştır. Araştırmada, yumru örnekleri bir gece %0.3 civa klorür içerisinde bekletilmiş ve sonrasında %1'lik sodyum hipoklorit ile yıkanmıştır. Yumruların yüzey sterilizasyonu tamamlandıktan sonra, üst kısmındaki doku temizlenmiş ve yumrular 4 mm boyutunda küp şeklinde parçalara ayrılarak *in vitro*'da tütün örnekleri için kullanılan White's besi ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmada sonucunda, 0.04 mgL⁻¹ 2,4-D içeren besi ortamından en iyi kallus gelişimi gözlenmiş ve karbon kaynağı olarak sakkarozun daha etkili olduğu bulunmuştur. Mannitol ve gliserol ise kallus gelişimine olumsuz etkilenmiş ve bu ortamlarda kallus rejenerasyonu gerçekleşmemiştir.

Morel (1975), siklamende yaprak eksplantlarından kallus rejenerasyonu sağlamış ve bu kalluslardan somatik embriyo benzeri bitkiciğe dönüşebilen meristematik yapıların oluştuğunu tespit etmiştir. Loewenberg'in çalışmasından on

yıl sonra Geier vd. (1979), bu defa yumru örneklerinin yanında yaprak örneklerini *in vitro*'da kültre alarak kallus rejenerasyonunu ve elde ettikleri kallus yapılarından sürgün ve kök oluşumunu incelemişler ve başarıya ulaşmışlardır. Morel'in çalışmasına benzer olarak, Fersing vd. (1982) çalışmalarında kalluslardan sürgün oluşturma yeteneği olan yumruya ve embriyoya benzer yapılar tespit etmiş, ancak bu yapıları tam olarak tanımlayamamıştır. Bu çalışmalardan sonra Wicart vd. (1984), siklamende embriyoya benzer bu yapıların ne olduğunu ortaya koymak amacıyla histolojik analizler yapmıştır. Araştırmacılar yaprak, yaprak sapı ve ovaryum eksplantlarından kallus uyartımını sağlamak amacıyla farklı oksin ve sitokinin büyüme düzenleyicilerini içeren ½ MS ortamında kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda, NAA ve BAP (sırasıyla 0.5 mgL⁻¹ ve 2.5 mgL⁻¹) büyüme düzenleyicisi içeren ortamda sürgün gelişimi ile 0.1-1.0 mgL⁻¹ arasında değişen konsantrasyonlarda NAA, IAA ve 2,4-D oksin içeren veya 0.5-2.5 mgL⁻¹ konsantrasyonlarında kinetin ve adenin içeren ortamlarda ise embriyoya benzer yapılar tespit etmişlerdir. Araştırmacılar histolojik analizler sonucunda elde edilen kalluslarda beyaz nodüller oluştuğunu, bu yapıların ise zamanla farklılaşarak zigotik embriyolarla bir fark göstermeyen embriyolara dönüştüğünü bildirmişlerdir.

Siklamende 1980'lere kadar devam eden doku kültürü çalışmalarında eksplantların yüzey sterilizasyonunda karşılaşılan sorunlar, siklamenin ticari boyutta doku kültürü ile üretimini sınırlandırmıştır (Wainwright ve Harwood, 1985). Bu nedenle Wainwright ve Harwood (1985), farklı eksplant tiplerinin rejenerasyona etkisini araştırırken çalışmalarında *in vitro*'da çimlendirilen ticari siklamen tohumlarını kullanmışlardır. Araştırmacılar yaprak sapı, yumru, kök ve kotiledon eksplantlarını ilk olarak NAA (0, 1, 5 mgL⁻¹) ve BA (0, 1, 2.5 mgL⁻¹) içeren ½MS ortamında kültüre almış ve 2 hafta sonra oksin (NAA) içermeyen ve ilk kültüre benzer olarak BA (0, 1, 2.5 mgL⁻¹) içeren ortamlara aktarmışlardır. Çalışma sonucunda, tüm eksplantlardan sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. En iyi sürgün oluşumu 1 mgL⁻¹ BA içeren besin ortamından sağlanırken, yumrulardan

alınan eksplantlarda BA'ya gereksinim duyulmadığı ancak diğer eksplantlardan sürgün rejenerasyonunun uyartımı için NAA'nın gerekli olabileceği bildirilmiştir.

Pirrie (1985), anter kültürü yoluyla haploid bitkiler elde etmek için *C. persicum*, *Nicotiana glutinosa* ve *Nicotiana tabacum* türlerinde 0, 4, 8 ve 12 gün süreyle ön soğuk uygulaması (4, 6.5 °C) yapmıştır. Çalışma sonucunda; anterlerde tek çekirdekli mikrospor aşaması 6-12 mm boyundaki çiçek tomurcuklarında gözlenmiş, ancak kültüre alınan anterlerde rejenerasyon sağlanamamıştır.

İlerleyen yıllarda doku kültürü temelli çalışmaların artması ve temel besi ortamları ile bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin farklı çalışmalarla ortaya koyulması, başlangıçta organogenesis temelli olan doku kültürü çalışmalarına somatik embriyogenesis gibi farklı tekniklerin de eklenmesi ve ekonomik açıdan önemli bitkilerin mikroçoğaltım ile kitlesel çoğaltımına yol açmıştır. Siklamende yapılan doku kültürü çalışmaları da benzer şekilde gelişerek, çalışmalarda farklı teknikler denenmeye ve kullanılmaya başlanmıştır.

Kiviharju vd. (1992), siklamende farklı eksplant tiplerinin embriyo uyartımına etkisini belirlemek amacıyla çiçek kısımları, yaprak sapı ve zigotik embriyoları farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin eklendiği besi ortamlarında *in vitro*' da kültüre almışlardır. Ovaryum ve anter eksplantları ile çiçek sapı eksplantları, henüz açmamış çiçek tomurcuğundan alınarak yüzey sterilizasyonu yapılmış, zigotik embriyolar ise sterilizasyon işlemi yapılan tohumlardan mikroskop altında izole edilerek kullanılmıştır. Çalışmada somatik embriyogenesisi teşvik etmek amacıyla MS besi ortamına 2,4-D (1 mgL⁻¹) ve 2,4-D (1 mgL⁻¹) + Hindistan cevizi sütü (%10), embriyolarda farklılaşmayı sağlamış için ise 2 mgL⁻¹ NAA + kinetin eklenmiştir. Farklılaşma gösteren embriyoların çimlenmesini sağlamak için ise elde edilen embriyolar NAA (1 mgL⁻¹) + ABA (0.5 mgL⁻¹) içeren MS ortamına transfer edilmiştir. Çalışma sonucunda kullanılan eksplantların tamamında kallus rejenerasyonu gerçekleşmekle birlikte, sadece oksin içeren besi ortamlarına göre oksin ve sitokininin birlikte kullanıldığı ortamlarda kallus rejenerasyonunun daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Farklılaşma ortamına

aktarılan anter ve zigotik embriyo eksplantlarından elde edilen kallus yapıları, farklılaşarak somatik embriyolara dönüşmüştür.

Ishizaka ve Uematsu (1992), türler arası melez bitkiler elde etmek amacıyla *C. persicum* ve *C. hederifolium* türleri arasında melezlemeler sonrasında ovül kültürü yapmıştır. Ovüllerde histolojik analizler için, melezlemeler sonrasında belirli aralıklarla çiçek tomurcuklara toplanarak parafin bloklara alınmıştır. Melezlemelerden sonra, izole edilen ovüller plasenta dokularıyla birlikte kültüre alınmıştır. Histolojik analizler sonucunda diploid *C. persicum* ve *C. hederifolium* türleri arasında melezlemelerden sonra ovüllerin yaklaşık 28 gün sonra kültüre alınması gerektiği, tetraploid *C. persicum* ve *C. hederifolium* türleri arasında melezlemelerden sonra ise, ovüllerin yaklaşık 21 gün sonra kültüre alınması gerektiği tespit edilmiştir. Diploid kromozom setine sahip *C. persicum* ve *C. hederifolium* türlerarası melez kombinasyonlarında ovül kültürü için %3 sakkaroz içeren MS besi ortamı uygun bulunurken, tetraploid *C. persicum* ve *C. hederifolium* türlerarası melez kombinasyonlarında, ovül kültürü için %3 sakkaroz + %10 Hindistan cevizi sütü içeren MS besi ortamının uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Ishizaka ve Uematsu (1993), diploid ve tetraploid *C. persicum* bitkilerinden izole edilen anterler eksplantlarını, NAA (0.002-0.2 mgL⁻¹) büyüme düzenleyicisi ve üç farklı sakkaroz konsantrasyonuna sahip farklı besi ortamlarında (MS, B5 ve N6) kültüre alarak embriyo uyartım etkinliğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda; yüksek sıcaklık embriyo uyartımını engellerken, iki gün boyunca 5 °C'de soğuk uygulaması yapılan anterlerde embriyo uyartımı daha yüksek bulunmuştur. Ortam ve sakkaroz konsantrasyonu bakımından %9 sakkaroz içeren B5 ve N6 besi ortamlarında karanlıkta kültüre alınan anter eksplantlarında, embriyo uyartımının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Siklamende teknik olarak embriyo kurtarma mümkün değildir, bu nedenle türlerarası melezlemelerde abortif embriyo oluşumunu önlemek ve embriyoları kurtarmak amacıyla ovül kültürü yapılmaktadır. Ishizaka vd. (1995), *C. persicum*

ve *C. purpurascense* arasında melezlemeler yapmıştır. Çalışmada diploid *C. persicum* ana ebeveyn tetraploid *C. purpurascense* baba ebeveyn olarak kullanılmıştır. Melezlemelerden sonra belirli aralıklarla çiçek tomurcukları toplanarak parafin bloklar hazırlanmış ve histolojik analizlerle tozlamadan kaç gün sonra, tozlanmış çiçek tomurcuklarından ovüllerin izole edileceğini belirlemiştir. Çalışma sonucunda tozlama işleminden 35 gün sonra ovüllerin izole edilerek kültüre alınmasının uygun olduğu bildirilmiştir. Çalışmada izole edilen ovüller %3 sakkaroz içeren MS besi ortamında karanlıkta kültüre alınmış, ancak kültüre alınan örneklerde canlılık gözlenmemiştir.

Takamura vd. (1995), siklamende aseptik koşullarda tohumları çimlendirerek elde ettikleri fidelerden kök, yaprak sapı, yumru ve kotiledon eksplantlarından embriyo rejenerasyonu için, farklı hormon ve sakkaroz konsantrasyonlarına sahip besi ortamlarının etkisini araştırmışlardır. 2,4-D ve kinetin büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamlarında kültüre alınan tüm eksplant tiplerinden embriyo rejenerasyonu sağlanmıştır. Büyüme düzenleyicileri kombinasyonları arasında en iyi uyartım ise, 0.5 µM kinetin + 5.0 µM 2,4-D içeren besi ortamında gerçekleşmiştir. Optimum sakkaroz konsantrasyonları eksplant tipine göre farklılık göstermiş ve kotiledon ve kök eksplantları için %6 sakkaroz, yumru ve yaprak sapı eksplantları için ise %3 sakkaroz konsantrasyonunun daha elverişli olduğu tespit edilmiştir.

Kreuger vd. (1995), sıvı kültür ortamında siklamen yumrularından süspansiyon kültürü yaparak somatik embriyogenesis uyartımı üzerine bir çalışma yapmışlardır. Kültür ortamında 2,4-D ve kinetin büyüme düzenleyicilerinin varlığında, 5-7 haftada embriyojenik yetkinliğe sahip hücre hatları elde etmeyi başarmışlardır. Elde edilen embriyojenik kallus hatlarından belirli aralıklarla alt kültür sırasında somatik embriyo üretimi için bir kısmını izole ederek, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen farklılaşma ortamına aktarmışlardır. Çalışmada yüksek sakkaroz konsantrasyonunun (175 mM) izole edilen embriyojenik kallus

hatlarının farklılaşmasında etkili olduğu, embriyojenik yapılardan yumru oluşumu ve çimlenmede ise düşük sakkaroz konsantrasyonu (58 mM) etkili olmuştur.

Ewald (1996), türlerarası melezlemelerde abortif embriyo oluşumu ve uyumsuzlukların önüne geçmek için *C. persicum* (CP) ile *C. purpurascens* (RW) türleri arasında melezlemeler yaparak, tozlamadan sonra 21 ve 35'inci günlerde ovaryum izole ederek %3 ve %6 sakkaroz ve %1 agar içeren MS besi ortamında kültüre almıştır. Melez kombinasyonlarından en iyi uyartım 2'şer adet embriyo ile RW x CP kombinasyonunda 21. günde %3 sakkaroz içeren ortamda 6 adet ovaryumun kültüre alınmasından ve %6 sakkaroz içeren besi ortamında 38 ovaryumdan kültüre alınmasından elde edilmiştir. Tozlamadan 35 gün sonra ise; %3 sakkaroz içeren ortamda benzer gelişmeler gözlenmiş, %6 sakkaroz içeren besi ortamına alınan 39 eksplanttan 5'inde embriyo uyartımı sağlanmıştır.

Takamura ve Tanaka (1996), siklamende ekonomik anlamda doku kültürü temelli üretim için çoğaltma katsayısını artırmak amacıyla, eksplantlardan somatik embriyogenesis uyartımına ortam şartlarının etkisini araştırmışlardır. Çalışmada doku kültüründe en önemli kısıtlayıcı faktörlerden birisi olan kontaminasyonu engellemek için başlangıç materyali olarak; karanlıkta 42 gün bekletilen ve etiyolleşen yaprak sapları kullanılmıştır. Eksplantlar kinetin ve 2,4-D büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamında kültüre alınmış ve çalışma sonucunda, en yüksek embriyo uyartım oranı 2,4-D (5.0 µM) içeren besi ortamlarında gözlenmiştir. Ortam şartları bakımından ise en yüksek uyartımın 25 °C sıcaklıkta karanlıkta kültüre alınan eksplantlarda gerçekleştiği belirlenmiştir.

Bach vd. (1998), ticari F1 siklamen çeşidine (*C. persicum* cv. 'Medium') ait aseptik fidelerden alınan yaprak kısımları, kök ve hipokotil ekplantları ile farklı konsantrasyonlarda oksin ve sitokinin büyüme düzenleyicileri eklenen besi ortamlarının rejenerasyona etkisini araştırmışlardır. Çalışmada 2iP'nin 25 mM konsantrasyonu ile nispeten düşük konsantrasyonda NAA (2.5 mM) içeren besi ortamında tüm eksplant tiplerinden kallus rejenerasyonu sağlanmış, bazı eksplantlardan ise doğrudan kök ve sürgün oluşumu gözlenmiştir. Yaprak

eksplantları direkt organogenesis için en iyi eksplant kaynağı olurken, adventif sürgünler genellikle yaprak kenarlarından rejenerasyon olmuştur. Adventif kök yapıları ise yaprağın orta kısımlarından alınan eksplantlardan gelişmiştir. 50 µM 2,4-D ve 4 µM 2iP büyüme düzenleyicileri rejenerasyon uyartımı için etkili olurken, somatik embriyoların gelişimi 0.5 µM 2,4-D ve 5 µM BA içeren besi ortamında gerçekleşmiştir.

Ishizaka (1998), *C. persicum* (2n=2x=48) ile *C. purpurascens* (2n=2x=34)'in melezlenmesiyle elde edilen F1 hibrit (2n=41) bitkilere ait anterler eksplantlarından bitki rejenerasyonunu sağlamak için kültüre almıştır. Polen gelişiminin erken tek çekirdeklilik aşamasındaki mikrosporları içeren anterler 90 g L⁻¹ şeker ve 0.1, 1 mgL⁻¹ NAA veya 0.1 mgL⁻¹ 2,4-D içeren B5 ortamında 5 °C'de 4 gün boyunca kültüre alınmış ve sonrasında 25 °C'de 60 gün karanlık koşullarda kültüre alınarak embriyoidlerin gelişimi sağlanmıştır. Embriyoidler, genellikle 30 g L⁻¹ şeker içeren B5 ortamında 25 °C sıcaklık ve karanlık koşullarda bitkicik oluşturmuştur. Araştırma sonucunda steril bitkilerin, F1 hibridin indirgenmemiş mikrospordan kaynaklanan polihaploidler ve fertil bitkilerin de indirgenmemiş mikrospor kromozomlarının kültürü sırasında kendiliğinden katlanması ile gelişen amfidiploidler olduğu saptanmıştır.

Karam ve Al-Majathoub (2000), yabancı *C. persicum* bitkilerine ait farklı eksplant tiplerinin doku kültüründe sürgün oluşturma yeteneğini araştırdıkları çalışmalarında eksplantları, yalnız TDZ veya BA içeren 1/3MS besi ortamında kültüre almışlardır. Çalışmada BA içeren besi ortamlarında eksplantlardan sürgün gelişimi gözlenmezken, TDZ kullanılan ortamlardan sadece yaprak eksplantlarında sürgün rejenerasyonunun olduğu belirlenmiştir. Çiçek sapında en iyi sürgün gelişimi TDZ'nin 0.022 ve 0.22 mgL⁻¹ konsantrasyonlarında, taç yapraklarda ise TDZ'nin 0.22 mgL⁻¹ konsantrasyonu içeren besim ortamlarında belirlenmiştir.

Hohe vd. (2001), siklamende somatik embriyolarının sıvı kültürde gelişimi ve ticari olarak kitlesel üretim için, globüler somatik embriyo yapılarının biyoreaktörde çoğaltımına yönelik protokol geliştirmişlerdir. 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D ve

0.8 mg L⁻¹ 2iP içeren ½ MS besi ortamında geliştirilen embriyojenik kallus hatlarından, büyüme düzenleyicisi içermeyen aynı besi ortamında farklılaşması sağlanarak somatik embriyolar elde edilmiştir. Çalışmada sıvı kültüre alınan somatik embriyoların farklılaşması için; sıvı kültür zamanı, farklı inokülasyon fraksiyonu, embriyo yoğunluğu gibi parametrelerin optimizasyonunu yapmışlardır. Sıvı kültürde kısa sürede globüler embriyoların çimlendirilmesi ve biyoreaktör sisteminde embriyoların gelişmeleri sağlanmıştır. Hormonsuz besi ortamlarında sıvı kültür başlangıcından itibaren 38 haftalık bir zaman diliminde 27 bin adet bitkicik elde edilerek dış ortama alıştırılmıştır.

Abu-Qaoud (2004), 'Concerto' ticari siklamen çeşidine ait fidelerin yaprak, yaprak sapı ve yumrularına ait eksplantlarını *in vitro*'da kültüre alarak farklı sitokin ve oksin konsantrasyonlarının sürgün ve yumru oluşumu üzerine etkisinin incelemiştir. Hazırlanan tüm besin ortamlarına oksin hormonu olarak NAA'nın 5.4 µM konsantrasyonu ve sitokin hormonu olarak ise ya BA veya TDZ'nin farklı konsantrasyonları eklenmiştir. Çalışma sonucunda sitokin hormonu içermeyen besin ortamlarında sürgün oluşumu gözlenmemiştir. En iyi sürgün oluşumu ise BA'nın 4.4 µM ve TDZ'nin 4.0 µM konsantrasyonlarında gözlenmiştir. Yumru oluşumu ise yaklaşık %42 rejenerasyon oranı ile 2.0 µM TDZ ve yaklaşık %58 rejenerasyon oranı ile 4.0 µM TDZ hormonu içeren besi ortamlarında yaprak eksplantlarında gerçekleşmiştir.

Winkelmann ve Serek (2005), iki farklı ıslahçıdan temin ettikleri farklı çiçek rengi ve büyüme tipine sahip siklamen çeşitlerinden ovül eksplantlarında yüksek oksin düşük sitokin konsantrasyonlarının somatik embriyogenesis etkilerini araştırmışlardır. Toplamda 32 çeşitten alınan ovül eksplantları 9.05 µM 2,4-D ve 3.94 µM 2iP büyüme düzenleyicileri içeren ½MS ortamına transfer edilmiş ve bu çeşitlerden sadece bir tanesinde embriyo uyartımı gerçekleşmemiş, diğer tüm çeşitlerde ise somatik embriyo uyartımı sağlanmıştır. Embriyo rejenerasyon oranı çeşitlere göre değişmekle birlikte %0-65 olmuştur. Çeşitlerin büyüme alışkanlıklarına göre rejenerasyona verdiği tepkiler incelendiğinde 'Orta'

büyüme habitüsüne sahip çeşitlerde embriyo uyartımı daha düşük, çiçek rengi kırmızı olan çeşitlerde ise embriyo uyartımının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Winkelmann vd. (2006), siklamende sıvı kültürde farklı sakkaroz konsantrasyonlarından elde edilen somatik embriyoların çimlenme fizyolojisinin araştırılması için zigotik embriyolarla protein kompozisyonları bakımından karşılaştırmıştır. Somatik ve zigotik embriyoların protein analizleri yapılmış ve çalışma sonucunda 60 g.L⁻¹ sakkaroz içeren sıvı kültürden elde edilen embriyolar ile zigotik embriyoların protein çeşitliliği arasında %74 oranında benzerlik bulunmuştur. Yarı oranda sakkaroz içeren sıvı kültürden elde edilen embriyoların, 60 g.L⁻¹ sakkaroz içeren sıvı kültürden elde edilen embriyolardan protein çeşitliliği bakımından daha az protein türü içerdiği tespit edilmiştir.

Lyngved vd. (2008), siklemende embriyojenik ve embriyojenik olmayan kallus hatlarını protein içeriği bakımından karşılaştırmışlardır. Embriyojenik ve embriyojenik olmayan kallus yapılarında toplamda 1200 farklı protein içeriği belirlenmiş ve bu proteinlerden 943'ünün iki kallus yapısında da bulunduğunu tespit etmişlerdir. Belirlenen protein türlerinden 108'i sadece embriyojenik kalluslarda bulunurken 97'sinin embriyojenik olmayan kalluslarda bulunmuştur. Her iki kallus tipinde de farklılık gösteren protein türlerinin 128'i tanımlanmış ve bunlardan 27'sinin embriyoya özgü proteinler olabileceği belirlenmiştir.

Seyring vd. (2009), beş farklı siklamen türünde *in vitro* çoğaltım olanaklarını incelemişlerdir. *C. persicum*, *C. coum*, *C. africanum*, *C. hederifolium* ve *C. cilicium* türlerine ait 11 genotipte, dört farklı eksplant tipinde iki farklı protokolün *in vitro* çoğaltım etkinliğini incelemişlerdir. İlk protokolde; eksplantlar ilk olarak karanlıkta sekiz hafta, sonrasında 2iP ve 2,4-D içeren MS ortamında dört hafta ve son olarak farklılaşmanın sağlanması için büyüme düzenleyicisi içermeyen aynı ortamda kültüre alınmıştır. Diğer protokolde ise; farklı eksplant tipleri ilk olarak IAA ve BAP içeren N69 besi ortamında 16/8 saat karanlık aydınlık fotoperiyotta altı hafta boyunca, daha sonra ise 8 hafta karanlık ortamda kültüre alınmıştır. Sonuç olarak ilk protokolde tüm tür ve eksplant tiplerinden %80

oranında kallus rejenerasyonu belirlenmiş, ancak *C. hederifolium* türüne ait yaprak sapı eksplantlarında rejenerasyon oranı %50 ve *C. cilicium* türüne ait yaprak eksplantlarında ise rejenerasyon oranı %20 olmuştur. Diğer protokolda rejenerasyon oranı tür ve eksplant tipine göre oldukça farklılık göstermiş ve kültüre alınan genotiplerden yedisinde sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Prange vd. (2010), 2,4-D, BA, 2iP ve kinetin içeren farklı katı ve sıvı kültür ortamlarının *C. coum* türüne ait yaprak eksplantlarında embriyo rejenerasyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda rejenerasyon oranı katı ve sıvı kültürde farklılık göstermiştir. Katı kültür ortamında 876 adet.g⁻¹ somatik embriyo oluşurken, süspansiyon kültüründe ise 4.24 x 10⁵ adet.g⁻¹ protoplast elde edilmiştir.

You vd. (2011), *C. persicum* türüne ait somatik embriyoları eksplant olarak kullanmış ve eksplantlardan yeniden somatik embriyo uyartımı sağlamışlardır. Çalışmada, ilk kültür ortamında eksplantlardan globüler aşamada somatik embriyolar elde edilmiştir. İkinci kültür ortamında ise globüler aşamadaki embriyolardan, torpedo aşamasında embriyolar ile birlikte bitkiciğe dönüşüm sağlanmıştır. Araştırmacılar ilk kültür ortamında elde ettikleri embriyo yapılarını birincil somatik embriyo, ikinci kültür ortamında elde ettikleri embriyoları ise ikincil somatik embriyo olarak adlandırmıştır. Birincil somatik embriyolar büyüklüklerine göre farklı gruplara ayrılarak 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D ve 0.2 mgL⁻¹ 2iP içeren sıvı besi ortamında kültüre alınmış ve kültür başlangıcından dört hafta sonra örnekler bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen farklılaşma ortamlarına transfer edilmiştir. Elde edilen ikincil embriyolar ise, ABA içeren ortamında tekrar kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda birincil embriyolardan %90 oranında kallus rejenerasyonu elde edilmiştir. ABA içeren besi ortamlarında kallus rejenerasyon oranı düşerken, torpedo aşamasında somatik embriyo sayısı artmıştır.

Naderi vd. (2012), *C. persicum* türünde MS ve ½MS ortamlarının yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından kallus ve somatik embriyo oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. Kallus rejenerasyonu üzerine besi ortamlarının etkisi

önemsizken, besi ortamı ve eksplant tipi interaksyonu etkisi önemli bulunmuştur. Somatik embriyo uyartımı ortamlara göre en fazla ½MS için yaprak, MS ortamı için yaprak sapı eksplantlarında gözlenmiştir.

Koçak vd. (2014), ülkemiz florasında bulunan *C. persicum* türüne ait genotiplerde farklı eksplant tipleri ile farklı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları içeren besi ortamlarının, somatik embriyo uyartımı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Doğal ortamlarından sökülerek ısıtmasız sera şartlarında kültüre alınan siklamen genotipleri arasından seçilen 15 genotipte; yaprak, yaprak sapı, ovül ve ovaryum eksplantları *in vitro*'da kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda kullanılan eksplant tipi ve genotipler eksplantların rejenerasyonunda etkili olmuş, ancak en yüksek embriyo uyartımı ovaryum eksplantlarından sağlanmıştır.

Winkelmann vd. (2015), siklamenin kitlesel çoğaltımında somatik embriyogenesis yolağının etkili olduğu ancak embriyoların gelişiminin homojen olmaması veya erken çimlenmesi gibi engellerle karşılaştığını, bu nedenle somatik embriyogenesis yoluyla henüz kitlesel *in vitro* çoğaltım mümkün olmadığını bildirmiştir. Bu nedenle araştırmacılar somatik ve zigotik embriyoların metabolit içeriklerini karşılaştırmışlar ve zigotik embriyoların somatik embriyolardan daha fazla prolin içeriğine sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Tütüncü vd. (2016), üç farklı *C. persicum* genotipine ait embriyojenik kallus hatlarında sitokin uygulamalarının somatik embriyoların farklılaşması üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada ½MS besi ortamına eklenen üç farklı BAP (1.1, 2.2 ve 4.4 µM) konsantrasyonu ile kinetin ve zeatinin 4.4 µM konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Kültüre alınan kallus hatlarında, 4 hafta sonra embriyo sayımları yapılmış ve kallusların relatif büyüme oranları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda 1. genotipte kinetin içeren besi ortamından gelişen 100 mg kallusta 1000'den fazla somatik embriyo elde edilmiştir. 2. genotip için en iyi ortamın zeatin uygulaması olduğu, 3. genotip için ise en iyi ortamın 1.1 µM BAP içeren besi ortamı olduğu belirlenmiştir.

İzgu vd. (2016), ülkemize endemik *C. cilicium*, *C. mirabile*, *C. pseudibericum* ve *C. parviflorum* türlerinde etkili bir somatik embriyogenesis protokolü oluşturmak için farklı eksplantların rejenerasyon üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada kallus rejenerasyonu için 2,4-D ve 2iP'nin farklı konsantrasyonlarını içeren ½MS besi ortamında yaprak, yaprak sapı, ovül ve ovaryum eksplantları kültüre alınmıştır. Kallus rejenerasyonu tür ve eksplant tipine göre farklılık göstermiş ve en yüksek kallus uyartımı (%100) *C. pseudibericum* türünde yaprak sapı eksplantlarından; en düşük kallus uyartımı ise (%56) *C. cilicium* türünde yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. Kallus uyartımı besi ortamı ve içerdiği büyüme düzenleyicisi açısından değerlendirildiğinde en yüksek kallus rejenerasyonu %20 oran ile 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.5 mg L⁻¹ 2iP içeren ½MS ortamında *C. pseudibericum* türüne ait ovül örneklerinden elde edilmiştir. Kalluslardan somatik embriyo uyartım oranı %39 oran ile 2.5 mgL⁻¹ 2,4-D ve 1.0 mgL⁻¹ 2iP içeren besi ortamında *C. pseudibericum* türüne ait yaprak sapı eksplantlarından elde edilmiştir.

Amini (2016), *C. persicum*, *C. hederifolium* ve *C. cilicium* siklamen türlerinde anter ve ovül eksplantlarının somatik embriyogenesisine etkisini araştırmıştır. Çiçek açımından 2-3 gün önce izole edilen ovül eksplantları 30 g.L⁻¹ sakkaroz içeren, anterler ise 90 g.L⁻¹ sakkaroz içeren 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 0.8 mgL⁻¹ 2iP içeren ½MS ortamında kültüre alınmıştır. Ön uygulama olarak kültüre alınan örnekler karanlıkta 5 °C' de 2 gün bekletilmiş ve sonrasında yine karanlıkta 25 °C' de 8 hafta kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra örnekler, 30 g.L⁻¹ sakkaroz içeren büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamda kültüre alınarak kallusların farklılaşması sağlanmıştır. Çalışma sonucunda en yüksek kallus rejenerasyonu, %67.4 ile *C. cilicium*' da ve ardından *C. persicum*' da %66.8 olarak görülürken, en düşük kallus rejenerasyonu %30.1 ile *C. hederifolium*' da gözlenmiştir. Eksplantlarda en yüksek embriyo oranı %30.5 ile anter eksplantlarından elde edilirken, ovül eksplantından gelişen embriyo rejenerasyon oranı %9.0 olmuştur. En yüksek embriyo gelişimi ise

%35.8 ile *C. cilicium*'da gözlenmiştir. *C. persicum* ve *C. hederifolium*'da bu oran sırası ile %21.3 ve %2.0 olmuştur.

Sevindik (2018), ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren *C. persicum*, *C. hederifolium*, *C. coum*, *C. cilicium*, *C. pseudibericum* türleri ile 'Melodi' F1 *C. persicum* ticari çeşidinde anter ve ovül eksplantlarından haploid bitki elde etme olanaklarını incelemiştir. Çalışmada haploid bitki uyartımı amacıyla, anter eksplantları 4 °C' de iki gün bekletilmiş ve sonrasında aktif karbon ve farklı konsantrasyonlarda NAA içeren B5 ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmada ticari çeşide ait anter eksplantlarında kallus rejenerasyonu gözlenirken, yabani *C. persicum* türünde 5 µM NAA içeren B5 ortamında haploid embriyo ve bitkiye dönüşüm sağlanmıştır. Aynı ortamda *C. hederifolium* türünde ise sürgün benzeri yapılar elde edilmiştir. Yabani ve ticari *C. persicum* bitkilerinde kallus uyartımı 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D ve 0.8 mgL⁻¹ 2iP içeren MS ortamında, embriyo uyartımı ise 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D ve 0.5 mgL⁻¹ 2iP içeren MS ortamında elde edilmiştir. *C. coum* ve *C. pseudibericum* türlerinde sadece kallus rejenerasyonu gerçekleşmiştir.

Tütüncü vd. (2019) ülkemizde doğal olarak yetişen *C. persicum* ve *C. pseudibericum* türlerinde farklı doku kültürü ortamlarının gynogenesis üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışmada ovül eksplantları 2,4-D ve 2iP'nin farklı konsantrasyonlarını içeren ½MS ve B5 ortamlarında kültüre alınmıştır. En yüksek kallus uyartım %70 oran ile *C. persicum* türünde 1.5 mgL⁻¹ 2, 4-D ve 0.5 mgL⁻¹ 2iP içeren B5 ortamına alınan eksplantlardan elde edilmiştir. *C. pseudibericum* türü için ise kallus oluşum oranı %48 olmuş ve 1 mgL⁻¹ 2, 4-D ve 0.3 mgL⁻¹ 2iP içeren B5 ortamından elde edilmiştir. *C. persicum* türünde en yüksek embriyo uyartımı (%55); 1.5 mgL⁻¹ 2, 4-D ve 0.8 mgL⁻¹ 2iP içeren ½MS ortamında gelişen kallus yapılarından elde edilmiştir. Ancak, *C. pseudibericum* türünde besi ortamlarının hiçbirinden embriyo uyartımı sağlanamamıştır. Sonuç olarak, kallus uyartımında B5 ortamının ½MS ortamından daha iyi sonuç vermesine rağmen, embriyo uyartımı için yüksek oksin ve düşük sitokinin konsantrasyonuna sahip ½MS ortamı

daha iyi bulunmuş ve 2.0 mgL⁻¹ 2, 4-D ve 0.5 mgL⁻¹ 2iP içeren ½MS ortamından 42 adet bitkicik elde edilmiştir.

Koçak (2019), ülkemizde doğal olarak yetişen *C. coum* türünde farklı eksplant tiplerinin somatik embriyogenesise etkisini incelemiştir. Eksplantlardan embriyojenik kallus uyartımı amacıyla ilk aşamada bir oksin (NAA) ve üç farklı sitokininin (2iP, BA ve kinetin) hormonunun farklı kombinasyonlarını içeren altı farklı besi ortamı denenmiştir. Çalışma sonucunda tüm eksplant tiplerinde ve ortamlarda kallus rejenerasyonu sağlanmıştır. Embriyo uyartımı BA, NAA ve kinetin içeren besi ortamlarında gözlenirken, 2,4-D ve 2iP içeren besi ortamlarında embriyo gelişimi gözlenmemiştir. Eksplantlara göre en yüksek kallus rejenerasyon oranı yaprak sapı eksplantlarında %91.2, yaprak eksplantlarında %89.7 olmuştur. En yüksek embriyo uyartımı ise, yaprak sapı eksplantlarında %89.7 ve yaprak eksplantlarında %69.2 oranında elde edilmiştir.

2.2. Ülkemizde Yapılan Işınlanmış Polen Yöntemiyle Haploid Bitki Uyartım Çalışmaları

Işınlanmış polenlerle tozlaşma ve sonrasında partenogenik haploid bitki eldesi, 1930'lu yıllarda başlamış ve sonrasında birçok türde denenmiştir. Günümüzde daha çok sebzelerde ve özellikle Cucurbitacea familyasında uygulanan bir yöntem olup, dünyada ve ülkemizde de bu konuda başarıyla yapılmış çalışmalar bulunmaktadır.

Gürsöz (1990), iki kavun ve bir karpuz çeşidinde ışınlanmış polenle uyartılan *in situ* partenogenetik embriyolardan *in vitro* kültürü ile haploid bitki eldesi üzerine araştırma yapmıştır. Çalışmada Co-60 kaynağı kullanılarak gamma ışınının 300 Gy dozu ile çiçek tozları ışınlanmış ve kavunda tozlamadan 3-4 hafta sonra, karpuzda ise tozlamadan itibaren 2 haftadan 5 haftaya kadar meyveler hasat edilerek embriyo kurtarma işlemi yapılmıştır. Çalışma sonucunda, kavun çeşitlerinde 100 tohumdan elde edilen embriyo sayısı 1.11-2.34 olarak

belirlenmiştir. Sonuç olarak çalışmada 327 adet kavun ve 17 adet karpuz bitkisi elde edilmiştir.

Sarı (1994), dört farklı karpuz çeşidinde ışınlanmış polenlerle tozlama yoluyla haploid bitki elde edilmesi üzerine araştırmalar yapmıştır. Araştırmada polenlere dört farklı gama ışın dozu (100, 200, 300 ve 400 Gy), toluidin mavisi ve kolhisin kimyasalları ile kontrol olarak su uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonucunda, haploid embriyo uyarımına tozlayıcı çeşidin etkisi önemsiz ana bitki ve mevsimin etkisi ise önemli bulunmuştur. Çeşitlere göre değişmekle birlikte 'Halep karası' çeşidinde meyve başına ortalama 2-7, 'Sugar Baby' çeşidinde 1-2, 'Crimson Sweet' ve 'Charleston Gray' çeşitlerinden ise meyve başına 0-1 adet haploid embriyo uyarımı sağlanmıştır. Araştırmada, tüm çeşitlerden toplamda 54 adet haploid bitki elde edilmiştir. Işın dozlarının etkisi incelendiğinde, 100 Gy ışın dozu uygulaması polenlerin dölleme yeteneklerini değiştirmemiş ve normal melezlenmeler gözlenmiştir. 400 Gy ışın dozunda ise meyve tutumu, meyve ağırlığı, tohum ve embriyo sayıları azalmıştır. Karpuz için en iyi ışın dozlarının 200-300 Gy olduğu belirlenmiştir.

Çağlar (1995), dört farklı hıyar çeşidinde yıl boyunca üç farklı gama ışın dozu (300, 450 ve 600 Gy) ile ışınlanmış polenlerle tozlama yaparak haploid uyarımına genotip, ışın dozu ve mevsimin etkisini incelemiştir. Çalışmada, hıyarda haploid embriyo uyarımı için en uygun ışın dozunun 300 Gy ve en iyi tozlama döneminin mayıs-eylül arasındaki dönem olduğu belirlenmiştir. Işınlanmış polenlerle uyarım yoluyla 'Qamar' çeşidinde 704 adet, 'Seraset' çeşidinde 603 adet, 'Dere' çeşidinde 255 adet ve 'Çengelköy' hıyar çeşidinde 365 adet haploid embriyo elde edilmiştir. Embriyolardan çeşitlere göre sırasıyla 84, 34, 29 ve 43 adet haploid bitki elde edilmiştir. Haploid bitkilerde kromozom katlama için %0.5 dozda 4 saat ya da %1 dozda 2 saat kolhisin uygulaması en iyi sonucu vermiştir.

Yanmaz vd. (2009), acurda ışınlanmış (250, 300 ve 350 Gy) polen yöntemi ile haploid embriyo uyarımını incelemiştir. Erkek çiçekler, çiçek açımından 2-3 gün önce toplanarak ışın uygulamaları yapılmış ve sonrasında tozlama işlemi

gerçekleştirilmiştir. Tozlamadan 3-4 hafta sonra meyveler hasat edilerek embriyo kurtarma işlemi yapılmıştır. Diğer taraftan ışınlamadan sonraki 3 günde her gün *in vitro* polen canlılık testleri yapılmış ve ışın uygulamalarının polen canlılığı üzerine etkisi belirlenmiştir. Çalışma ışınlama yapılmayan polenlerde canlılık %81 iken, ışın uygulamasında bu oran %23'lere düşmüştür. Embriyo uyartım için ise 300 Gy ışın dozu uygun bulunmuştur.

Akbudak (2005), üç farklı domates çeşidinde ışınlanmış polen yöntemi ile haploid embriyo uyartımını araştırmıştır. Bu çeşitlere ait çiçek tozları dört farklı dozda (100, 200, 300 ve 400 Gy) gama ışınına maruz bırakılmıştır. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında, ışın dozları gözlemlere göre değiştirilerek 300 ve 400 Gy dozlar denemenden çıkarılıp yerine 50, 150 ve 250 Gy ışın dozları eklenmiştir. Işınlanan çiçek tozlarının çiçek tozu canlılığı, çimlenme oranları ve tozlamadan sonra meyve bağlama oranlarına etkisi belirlenmiştir. Çalışma sonucunda ışın dozu arttıkça çiçek tozlarının canlılık, çimlenme ve meyve bağlama yetenekleri azalmıştır. 300 ve 400 Gy ışın uygulamalarında en düşük çiçek tozu canlılığı ve çimlenmesinin olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde elde edilen bitki sayısı da ışın dozu arttıkça azalmıştır.

Berber (2009), on beş kabuksuz çekirdek kabaklarında üç farklı gama (50, 100 ve 150 Gy) ışın dozu kullanarak ışınlanmış polen yöntemiyle haploidi uyartımını araştırmıştır. Çalışma sonucunda, her üç ışın dozu uygulamasından da bitkiler elde edilmiş ancak haploid bitki uyartımının daha çok 150 Gy ışın dozunda gerçekleştiği belirlenmiştir. Çalışma kapsamında incelenen tüm genotiplerde, toplam 2073 embriyo elde edilmiş ve bunlardan 979'u çimlenerek bitkiye dönüşmüştür. Morfolojik incelemeler sonucunda dış ortama şaşırtılan 75 bitkinin %42.6'sının haploid, %57.3'ünün ise diploid olduğu tespit edilmiştir.

Kasapoğlu (2009), 'Kırkağaç' kavun çeşidinde farklı dönemlerde ışınlanmış polenlerle tozlama ile haploid uyartımını incelemiştir. Çalışmada tozlama sonrasında meyve ağırlığı, meyvedeki tohum ve haploid embriyo sayıları ile bitkiye dönüşüm oranı incelenmiştir. Sonuç olarak, 26 Nisan ve 3 Mayıs

tarikhleri arasında yapılan tozlamalardan meyve başına 5.81 embriyo ile en yüksek oran elde edilmiştir. Bu dönemde yapılan tozlamalar sonrasında oluşan embriyoların %83.3'ünde bitkiye dönüşüm sağlanmıştır.

Gürsoy (2009), kavunda 300 Gy dozda gama ışınına maruz bırakılan çiçek tozları ile farklı tarihlerde tozlamalar yapılarak en iyi tozlama dönemi araştırılmıştır. Çalışmada tozlamadan sonra meyve tutma oranı, meyve ağırlıkları, tohum sayısı, meyve başına haploid embriyo uyartımı ve farklı gelişme aşamalarında gözlenen embriyo sayıları ile embriyolardan bitkiye dönüşüm oranı incelenmiştir. Kavunlar üç farklı tarihte hasat edilerek 13 °C'de üç haftaya kadar depolanmıştır. Çalışma sonucunda, 4-11 Mayıs tarihleri arasında yapılan tozlamalar sonrasında elde edilen meyvelerdeki embriyoların bitkiye dönüşüm oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Tozlamadan 22 gün sonra yapılan hasattan elde edilen meyvelerin 2 hafta süreyle depolanmasından en iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Baktemur (2009), iki kavun genotipinde 300 Gy dozda gama ışınına maruz bırakılan çiçek tozları ile tozlama sonrasında embriyo uyartımı sağlamış ve bu embriyoların tohumlardan izole edilmesinde, kolaylık sağlayabilecek farklı yöntemleri incelemiştir. Çalışma sonucunda meyve başına ortalama en yüksek embriyo sayısı 3.3 oran ile tohumları tek tek açma yönteminden elde edilmiştir. Tohumlara ışık tutarak embriyo kontrolü uygulamasında bu oran 3.1 ve doğrudan ekimde ise 2.4 olmuştur. Yöntemlerin sağlamış olduğu iş gücü ve kolaylık göz önüne alındığında, tohumların ışıhta sayılması uygulaması en iyi yöntem olurken tohumların doğrudan besin ortamlarına ekimi bunu takip etmiştir.

Kurtar vd. (2009), kabakta farklı gama ışın dozlarına maruz bırakılan çiçek tozları ile farklı zamanlarda yapılan tozlamaların haploid bitki uyartımına etkilerini incelemiştir. Çalışmada, embriyo uyartımı ve bitkiye dönüşüm oranı erken zamanda düşük doz uygulamasıyla artmıştır. Haploid bitki uyartımı embriyoların gelişim aşamaları, tozlanma zamanı ve ışın dozundan etkilenmiştir. Embriyodan bitkiye dönüşüm sadece 50 ve 100 Gy uygulamalarından elde edilmiş ancak *in situ*

partenogenesis uyartımı yalnız 50 Gy uygulamasından sağlanmıştır. Kabakta embriyo kurtarma için uygun hasat zamanı ise tozlamadan 3 hafta sonra olduğu, hasat zamanının gecikmesiyle nekrotik embriyo oranının arttığı tespit edilmiştir.

Taşkın vd. (2010), iki karpuz genotipi ve bir karpuz çeşidinde 5 farklı gama ışın dozu kullanarak ışınlanmış polen tekniği ile haploidi uyartımı sağlamışlardır. Çalışmada çiçek açımından bir gün önce toplanan erkek çiçeklerde 50, 150, 200, 275 ve 300 Gy dozlarında ışın uygulaması yapılmış ve ertesi gün tozlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tozlamadan 25 gün sonra embriyo kurtarma işlemi gerçekleştirilmiş ve 30 g.L⁻¹ sakkaroz, 0.08 mgL⁻¹ B12 ve 0.02 mgL⁻¹ IAA içeren CP besisi ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda toplamda 43 meyveden 60 adet haploid embriyo elde edilmiştir. En yüksek haploid embriyo uyartımı Genotip 1'de 100 meyvede 6.25 oran ile 275 Gy ışın dozundan elde edilmiştir.

Özcan (2017), farklı çiçek yapılarına sahip ıspanak türünde ıslah çalışmalarını kolaylaştırma için doku kültürü destekli haploid bitki üretimi üzerine bir çalışma yapmıştır. Çalışmada anter kültürü ve ışınlanmış polenlerle tozlama yöntemi ile haploid uyartımı araştırılmıştır. Üç farklı ıspanak çeşidinde çiçek tozları 6 farklı ışın dozuna maruz bırakıldıktan sonra tozlama işlemi yapılmıştır. Anterler ise farklı oksin ve sitokinin konsantrasyonları içeren 4 farklı besin ortamı kültüre alınmıştır. Çalışmada kullanılan çeşitlerin ışınlanmış polenlerle tozlanması sonrasında içi boş, katı, sıvı gibi farklı tohum yapıları meydana gelmiştir.

Kurtar vd. (2017), hıyara anaç olarak kullanılacak 17 kabak anaç adayında ışınlanmış polen tekniği ile haploid bitki elde etmişlerdir. Çalışmada, çiçek tomurcukları Co-60 kaynağı kullanılarak 150 Gy dozunda gama ışını ile ışınlanmış ve çiçek tozları elde edilmiştir. Işınlanmış polenlerle tozlamadan 3-4 hafta sonra meyveler hasat edilerek embriyo izole edilmiş ve 0.1 mgL⁻¹ IAA içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda haploid uyartım üzerine genotiplerin etkisinin önemli bulunmuştur. Denemeye alınan I genotipinde toplamda 23 meyveden 3998 tohum, 233 embriyo elde edildiği ve bu

embriyolardan sonuç olarak 3 adet haploid bitki üretildiği bildirilmiştir. H genotipinde ise toplamda 35 meyveden 6464 tohum, 822 embriyo ve sonuç olarak 24 haploid bitki elde edilmiştir. Haploidi frekansı genotiplere göre farklılık göstermekle birlikte en düşük I genotipinde 0.07, en yüksek ise H genotipinde 2.92 olmuştur.

Erol (2018), hıyarda yapmış olduğu çalışmada ovül kültürü, sıvı kültür ve ışınlanmış polenlerle tozlama yöntemlerinin haploid bitki uyartımına etkisini incelemiştir. Işınlanmış polen tekniğinde, 300 Gy dozunda çiçek tomurcuklarına ışın uygulaması yapılmış ve daha sonra çiçek tozları elde edilerek tozlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tozlama işleminden 21-24 gün sonra meyveler hasat edilerek embriyo kurtarma işlemi yapılmıştır. Tohumlardan izole edilen embriyo yapıları, 20 g.L⁻¹ sakkaroz ve 0.1 mgL⁻¹ içeren MS besisi ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda ışınlanmış polen tekniğinden toplam 14 adet haploid bitki elde edilmiştir.

2.3. Süs Bitkilerinde Işınlanmış Polen Tekniği Üzerine Yapılan Çalışmalar

Işınlanmış polen tekniği ile haploid embriyo veya bitki uyartımı tekniği günümüzde neredeyse geleneksel teknikler arasında yer almasına karşın, süs bitkilerinde ışınlanmış polen tekniği ile haploid embriyo uyartımı çalışmaları sebze ve diğer bahçe bitkilerine göre oldukça sınırlıdır.

Raquin (1985), üç farklı ticari *Petunia hybrida* türünde yapmış olduğu çalışmada 6-100 kR arasında farklı dozlarda gama ışını uygulanmış çiçek tozları ile tozlama yapmış ve tozlamadan 9-14 gün sonra ovaryumları kültüre almıştır. Çalışma sonucunda 30 kR doza kadar olan uygulamalarda bitkicikler elde edilmiş, ancak haploid bitkiler 60 kR ve üzerindeki dozlardan elde edilmiştir.

Raquin vd. (1989), *Petunia hybrida* ve *Petunia parodii* türlerinde tozlama işleminden önce çiçek tozları yerine ovaryumlara 50 Gy dozdan 1.000 Gy doza kadar farklı gama ışını uygulaması yapmışlardır. Çalışmada emasküle edilen çiçekler ışına maruz bırakılmış ve sonrasında tozlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tozlama işleminden sonra çiçekler steril olmayan ortamda 4 gün kültüre alınmış ve bu aşamada çiçeklerde tohum oluşumu gözlenmiştir. Ön kültür aşamasından sonra ovaryumlar steril ortamda kültüre alınmıştır. Çalışmada 6-8 hafta sonra kallus ve embriyo yapıları ve bitkicikler oluşmuştur. Çalışma sonucunda 200-1000 Gy ışın dozu uygulamalarından haploid ve diploid bitkiler elde edilmiştir.

Meynet vd. (1994), 'Sonia' gül çeşidi genotiplerinde polenleri karışık toplamış ve sonrasında 4 farklı ışın dozu uygulamıştır. Işınlanmış polenlerle tozlama işlemi sonrasında 21 ve 35. günlerde embriyo kurtarma işlemi için meyveleri hasat etmiştir. Laboratuvar ortamına getirilen örneklerde embriyo kurtarma işleminin teknik zorlukları nedeniyle açılan meyveler içerisinden tohum taslakları mikroskop altında izole edilerek, farklı konsantrasyonlarda oksin (NAA) ve sitokinin (BA veya kinetin) içeren modifiye MS ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda, 500 Gy ışın dozu ve tozlamadan sonra 35. gün en iyi uygulama olarak bulunmuştur. Bu uygulama kombinasyonunda araştırmacılar toplamda 108 tohum taslağı kültüre almış, ancak bunlardan yaklaşık yarısını fungal kontaminasyon nedeniyle kültür sırasında kaybetmiştir. Geri kalan örneklerden ise 2 adet bitki elde edilmiştir.

Sato vd. (2000), karanfilde çiçek tozlarına 100-200 kR dozlarında X ışını uyguladıktan sonra tozlama işlemi gerçekleştirmişlerdir. Tozlama işleminden 2-3 hafta sonra ovaryumlar izole edilerek 2 µM NAA, 2 µM BAP ve farklı konsantrasyonlarda sakkaroz (%6, 9 ve 12) içeren katı MS besisi ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda 2 µM NAA, 2 µM BAP ve %6 sakkaroz içeren MS besisi ortamından elde edilen bitkiler ile ana bitki arasında morfolojik farklılıklar gözlenmiştir. R(0) olarak adlandırılan bu bitkilerin kök hücrelerinde yapılan analizler sonucunda, bitkilerin $2n = 30$ ve $2n = 15$ kromozom sayılarına sahip oldukları belirlenmiştir. R(0) bitkilerinin kendilenmesiyle R(1) bitkileri elde edilmiş ve her bitki grubunda morfolojik olarak birbirinin aynı olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak çalışmada elde edilen R(0) bitkilerinin dihaploid bitkiler olduğu bildirilmiştir.

Murovec ve Bohanec (2013), *Mimulus aurantiacus* türüne ait 'Champagne', 'Light Yellow', 'Lilac' ve 'White' çeşitlerinde ışınlanmış polen tekniğinin uygulanabilirliğini araştırmışlardır. Çalışmada öncelikle embriyoların *in vitro*'da çimlendirilebilmesi için uygun farklı besin ortamları denenmiştir. 600 Gy ışın uygulanan polenler ile tozlamadan sonra 11. günden başlayarak farklı zaman dilimlerinde 35. güne kadar meyveler hasat edilmiş ve farklı sakkaroz ve IAA içeren besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Çalışma sonunda 'Champagne' çeşidinin 'Light Yellow' çeşidine ait ışınlanmış çiçek tozları ile tozlanmasından 21 gün ve 28 gün sonra tohum taslaklarının 40 g.L⁻¹ sakkaroz ve 0.1 mgL⁻¹ IAA içeren MR besi ortamında kültüre alınmasından; 'Light Yellow' çeşidinin 'Champagne' çeşidine ait ışınlanmış çiçek tozları ile tozlanmasından 21 gün sonra tohum taslaklarının 80 g.L⁻¹ sakkaroz ve 0.1 mgL⁻¹ IAA içeren MR besi ortamında kültüre alınmasından haploid bitkiler elde edilmiştir.

Grough vd. (2015), *Iris pseudacorus* türünde ilk defa ışınlanmış polen tekniği ile haploid bitkiler elde etmişlerdir. Çalışmada, *Iris pseudacorus* türüne ait genotipler ana ebeveyn, *I. spuria* genotipleri ise baba ebeveyn olarak kullanılmıştır. *I. spuria* genotiplerinden alınan anterler 0, 100, 200, 300, ve 400 Gy dozlarında X ışınına maruz bırakılmış ve sonrasında *in vitro* polen çimlendirme testleri ile *Iris pseudacorus* türüne ait genotiplerde ışınlanmış polenlerle tozlama yapılmıştır. Tozlamadan 2-4 hafta sonra izole edilen ovüller 2 mM NAA ve 2 mM BAP içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda ışın dozları arttıkça polenlerin canlılık ve çimlenme oranları düşmüştür. Kontrol grubunda polenlerde çimlenme oranı %84 iken, 400 Gy ışın dozunda bu oran %27'ye düşmüştür. Aynı zamanda ışın dozu arttıkça meyve tutumunda da düşüş gözlenmiştir. Kontrol grubu, 100 ve 200 Gy ışın dozu uygulamalarından diploid bitkiler elde edilirken, 300 ve 400 Gy ışın uygulamalarından haploid bitkiler elde edilmiştir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitkisel Materyal

Tez alışması kapsamında *C. persicum* türüne ait ticari ‘Maxora F1’ (Varinova/Hollanda) siklamen çeşidi kullanılmıştır. Büyük iekli kompakt F1 siklamen çeşidi olan Maxora, yaprak yaşlanmasına karşı toleranslı ve homojen bir büyümeye sahiptir (şekil 3.1). Uygun ortamlarda kolayca retilbilir. Hastalıksız ve yüksek çimlenme gücü olan tohumları vardır. Uzun süre çiçeklenme ve güçlü bitki yapısı, renk kaybına toleranslı olması, iç mekan ve dış mekan süs bitkisi olarak kullanılmasında önemli bir unsurdur.



şekil 3.1. Maxora F1 siklamen bitkisinin görünümü

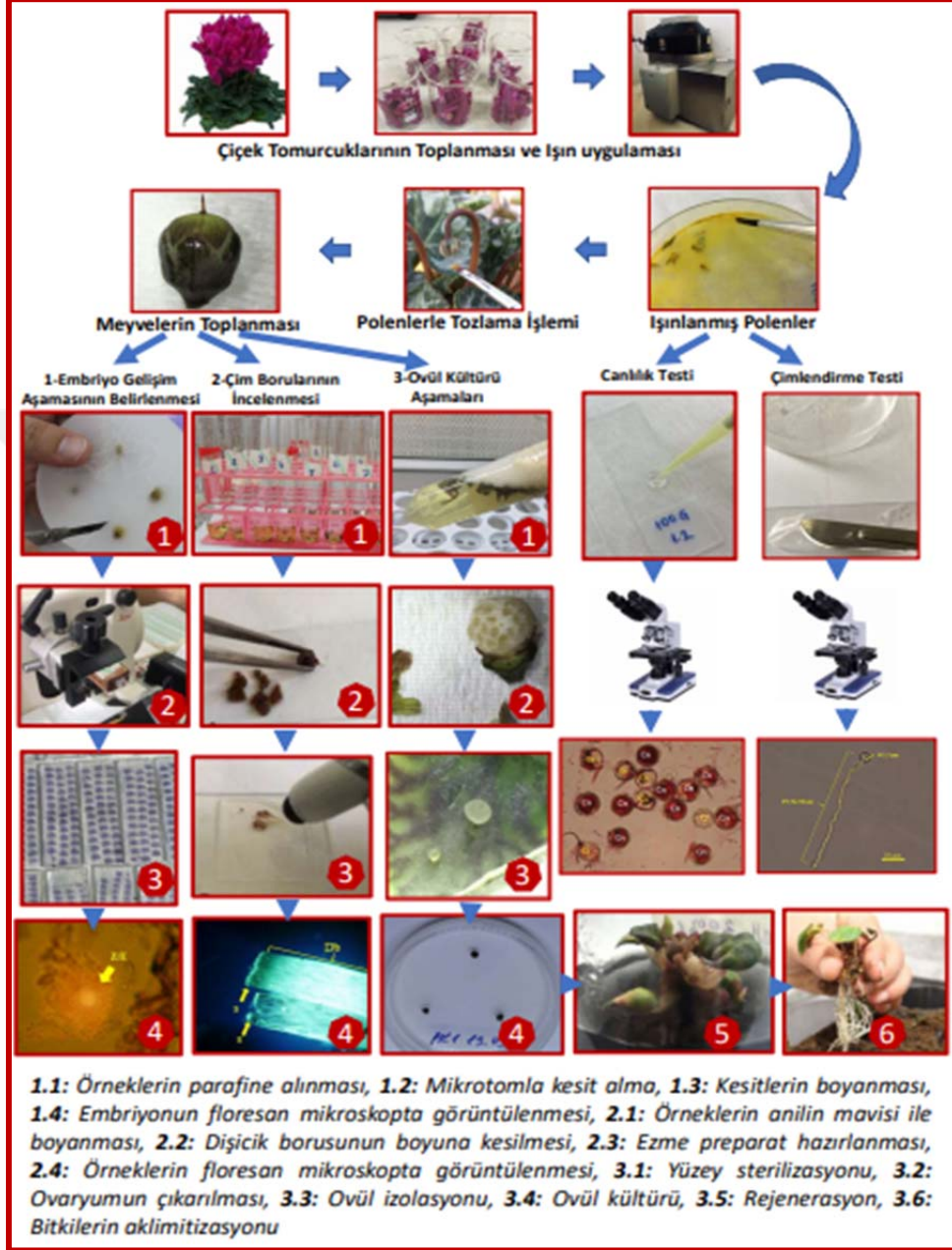
2018 sonbaharından itibaren, ‘Maxora’ çeşidine ait bitkiler, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Arazi’si içerisinde bulunan ısıtmasız cam serada kültüre alınmıştır. Seraya getirilen bitkilerde kültürel bakım işlemleri yapılmış ve saksı içerisindeki ortamın tamamen kurumasına izin verilmeden saksı başına 300 ml olacak şekilde sulama işlemi yapılmıştır. Soğuk havalarda gece sera içi sıcaklığının 10 °C altına düşmemesi için ev tipi ısıtıcı kullanılmıştır. Nisan ayı itibariyle gündüz sera içi sıcaklığlarının 30 °C’ ye ulaşması ve bitkilerin sıcaklığlardan olumsuz etkilenmesi nedeniyle sera içinden ve dışından gölgelik çekilmiştir. Serada kültüre alınan bitkisel materyallere ait görünüm, şekil 3.2.’de verilmiştir.



şekil 3.2. Serada kültüre alınan bitkilerin görünümü

3.2. Metot

Tez çalışmasının *in vitro* denemeleri ve bitkilerin kültüre alınması Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı ve uygulama arazisinde bulunan ısıtmasız cam serada gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının araştırma planı şekil 3.3’ de şematize edilmiştir.



Şekil 3.3. Tez çalışmasına ait aşamaları şema halinde gösterimi

Siklamende ışınlanmış polen yöntemi kullanılarak embriyo uyartımının sağlanması ve uygun embriyo gelişim aşamasının belirlenmesi amacıyla çiçek tomurcuklarında ışın uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Işın uygulamaları, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda yapılmıştır. Bu kapsamda ışın uygulamalarının çiçek tozu canlılığı ile *in vivo* ve *in vitro* çimlenme yeteneği üzerine etkileri belirlenmiş; ışınlanmış polenlerle *in situ* partenokarpik haploidi uyartımı amacıyla tozlamalar yapılmış ve sonrasında embriyo kurtarma amacıyla histolojik çalışmalarla uygun embriyo gelişim aşamaları belirlenmiştir.

3.2.1. Çiçek Tomurcuklarının Emaskülasyonu ve Işın Uygulaması

Polenlere ışın uygulaması ve ışınlanmış polenlerle tozlama için ilk olarak çiçek tomurcuklarında, çiçekler açmadan 1-2 gün önce emaskülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Emaskülasyon işlemi için henüz açmamış çiçeklerin petallerinin baş parmak ve işaret parmağıyla ezmeyecek şekilde sıkıca tutulup, diğer elin yine işaret ve bağ parmağı ile çiçek tablası ezmeden tutularak sabitlenmiştir. Daha sonra petaller, nazikçe ileri-geri ve yanlara doğru hareket ettirilerek petallerin iç kısımda bulunan anterlerin çiçek tablasına bağlandığı noktadan ayrılması sağlanmıştır. Son aşamada petaller saat yönünde döndürülerek yukarı doğru çekilmiş ve bu şekilde çiçek tablasından, ovaryum ve dişicik tepesine zarar verilmeden ayrılmıştır. Işınlama işlemi için hazırlanan çiçek tomurcukları Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. Işınlama işlemi için toplanan iek tomurcukları

Işın uygulamaları, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda yapılmıştır. Işınlama işlemine kadar geçen sürede iek tomurcuklarının canlılığını korumak için, iek tomurcukları içerisinde buz aks bulunan ısı ve iık geçirmeyen kutularda taınmıtır. Işınlama işlemi için iek tomurcukları Şeffaf plastik kaplar içerisine konulmuş ve Co-60 kaynağı ile 361 Gy/saat gama iını veren reaktörde (Institute of Isotopes Co. Ltd., Macaristan) (ekil 3.5) farklı dozlarda (0, 50, 100, 150, 200, 300, 450 Gy) iın uygulaması yapılmıştır. Işınlama işlemi yapılmayan iek tomurcukları kontrol olarak kullanılmıştır. Işınlama işlemi sonrasında iek tomurcukları laboratuvara getirilmiş ve iek tomurcuklarından anterler izole edilmiştir.



Şekil 3.5. Işınlama işleminde kullanılan reaktörün görünümü

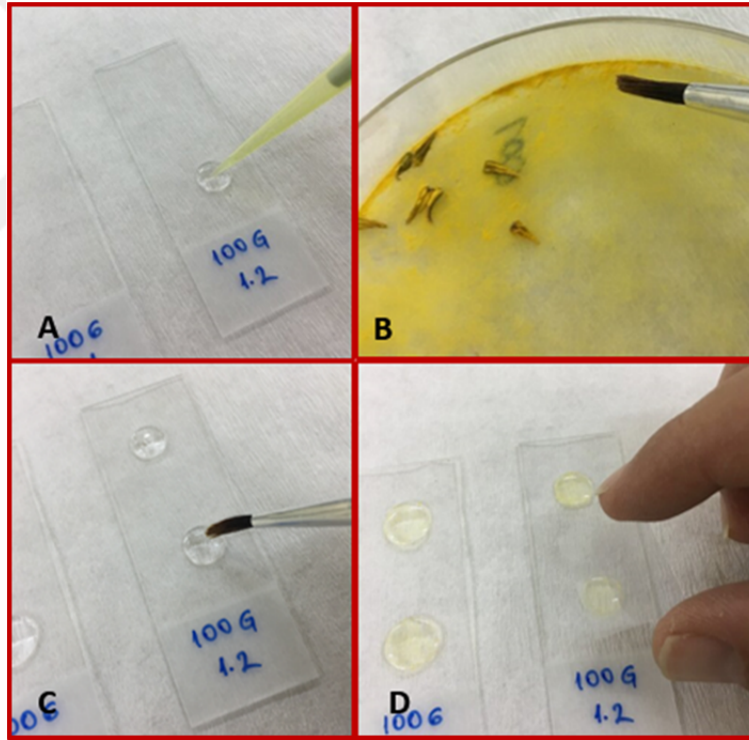
3.2.2. Iınlanmı Polenlerde iek Tozu Canlılık ve imlendirme Testi

Iınlanmı iek tomurcuklarından anterler izole edilerek her bir iın dozuna göre gruplandırılmıştır. iek tozu elde etmek için petri kutularına koyulan anterler, 30 °C' ye ayarlanmış etüv içerisinde bir gece inkübe edilmiştir (ekil 3.6).



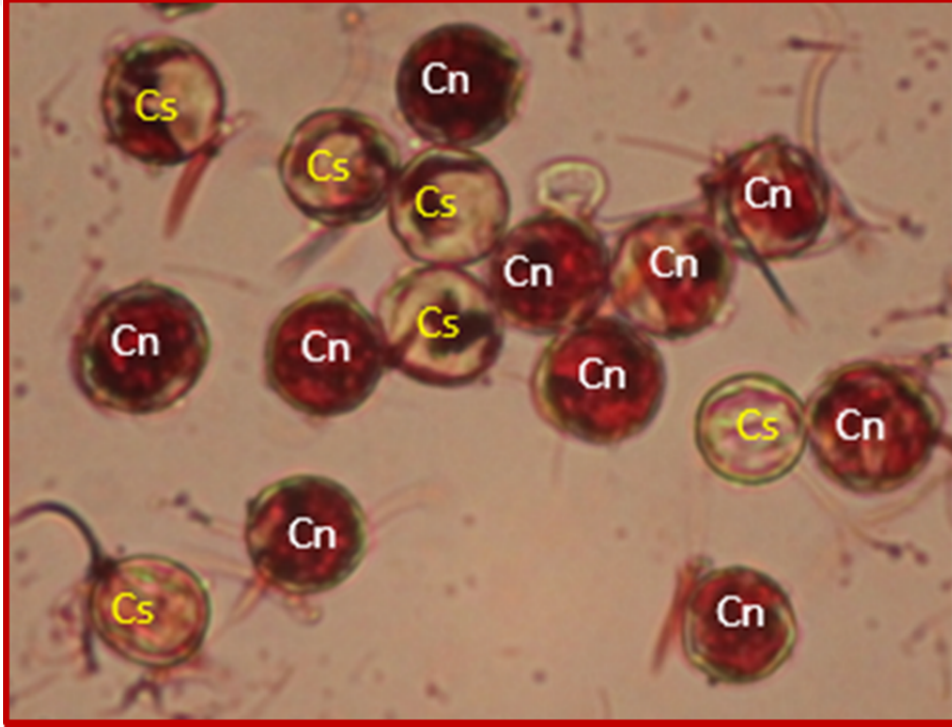
Şekil 3.6. Anterlerin etüvde patlatılması

Farklı dozlarda ışınlama işleminden sonra, elde edilen çiçek tozlarında çiçek tozu canlılık ve *in vitro* çimlendirme testleri yapılmıştır. Çiçek tozu canlılığı TTC (Triphenyl tetrazolium chloride) testi ile belirlenmiştir. TTC testi için 0.1 g TTC tartılarak 1 ml saf su içerisinde çözülmüş; 6 gr sakkaroz 9 ml saf su içerisinde çözülmüş ve ayrı ayrı hazırlanan bu iki karışım birbiri üzerine eklenmiştir (Norton, 1966). Canlılık testi için 1 damla TTC solüsyonu lam üzerine damlatılmış ve fırça yardımıyla küçük bir miktar çiçek tozu alınarak damlanın yüzeyine dağıtılmıştır. Çiçek tozunun birbirine yapışarak birikmesini engellemek için pipet ucu yardımıyla TTC damlasının rengi, homojen sarımsı bir renk alıncaya kadar karıştırılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Çiçek tozu canlılık testinin yapılması (A: TTC solüsyonunun lamlara damlatılması, B: çiçek tozlarının fırça yardımıyla alınması, C: lam üzerindeki TTC damlalarına çiçek tozlarının ekimi, D: lamellerin kapatılması)

Hazırlanan preparatlar, karanlıkta 20-30 dk 30 ± 2 °C’de bekletilmiştir. Daha sonra, test sonuçları mikroskop altında incelenerek polenlerin canlılık oranı belirlenmiştir. Işın uygulaması sonrasında, polen canlılık testleri iki defa tekrarlanarak, her bir ışın dozu için iki preperat hazırlanmış ve toplamda her bir doz için 4 tekerrür oluşturulmuştur. Her bir tekerrür için, mikroskop altında rastgele dört alan (1x1 mm) seçilmiş ve canlı ve cansız iek tozlarının sayımı yapılmıştır. TTC testi sonucunda içi tamamen boyanmış olan polen taneleri canlı, içi boyanmamış Şeffaf olan polen taneleri cansız kabul edilmiştir (Şekil 3.8).



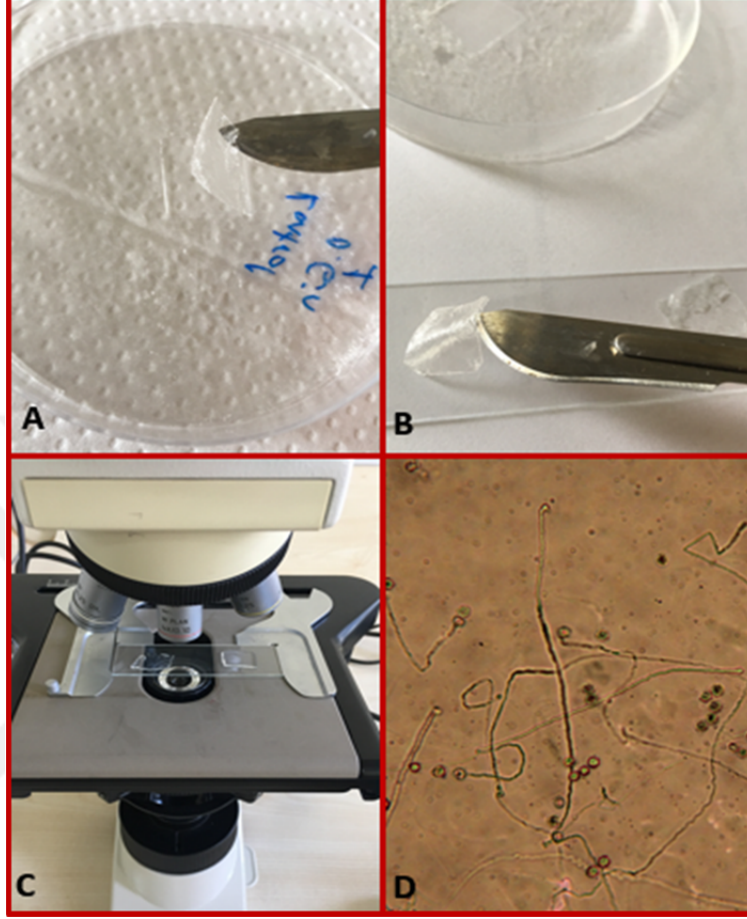
Şekil 3.8. Polenlerin ışık mikroskopunda görünümü (Cn: Canlı; Cs: Cansız)

Polenlerin *in vitro*’da imlendirilmesi petride agar yöntemiyle yapılmıştır. Bu amaçla 250 ml’lik erlen mayer içerisine bir miktar saf su koyulmuş, 10 g sakkaroz saf su içerisinde çözülmüş ve 100 ml’ye tamamlanmıştır. Sonrasında 1 g agar eklenmiş ve agarın çözülmesi amacıyla hazırlanan çözelti, mikrodalga fırında

Şeffaf berrak bir renk alıncaya kadar kaynatılmıtır. Hazırlanan imlendirme ortamı ince bir tabaka halinde petriye dökülmüş, ortam katılamaya başlayınca fırça yardımıyla polenlerin ortama ekimi yapılmıştır. Hazırlanan petriler 30+2 °C' de etüvde 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Her ışın dozu için 4 petriye ekim yapılmıştır. 2 saat sonrasında petrilerde çimlenme oranını belirlemek amacıyla iki petri etüvden çıkartılmış, diğer iki petri ise çim borusu uzunluklarını belirlemek üzere buzdolabının dondurucu kısmında (-18 °C' de) analizler yapılmıaya kadar muhafaza altına alınmıştır.

Çimlenme oranını belirlemek için petrilerde bulunan çimlendirme ortamından bisturiyle kare şeklinde (yaklaşık 1x1 cm) kesitler alınmıştır. Lam zerine transfer edilen kesitler mikroskop altında incelenerek rastgele seçilen 4 bölgede okuma yapılmıştır (ekil 3.9). Kalan polen örnekleri, ışık geçirmeyen film kutularına alınarak buz dolabında +4 °C' de saklanmış ve ertesini gün analizler tekrarlanmıştır.

Işın uygulamaların ve polen yaının çim borusu uzunluğuna etkisini belirlemek için, dondurucuda bulunan örnekler oda şartlarında çözünmeye bırakılmıştır. imlendirme ortamından bisturi ile kare şeklinde, yaklaşık 1x1 cm llerinde 3 kesit alınmıştır. Lam zerine alınan kesitler mikroskop altında 40x objektifte incelenmiştir. Her bir kesitten rastgele seçilen imlenmi ve kendi boyunun en az 3 katı uzamış 10 polenin fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflar bilgisayara aktarılmış ve Digimizer 5.4.1 (MedCalc Software, Belçika) fotoğraf analiz programını ile polen tüplerinin uzunlukları belirlenmiştir.



Şekil 3.9. Polenlerde *in vitro* imlendirme testi (A: ekim yaplm petriden kesit alınması, B: kesitin lam üzerine yerleştirilmesi, C: preparatların mikroskop altında incelenmesi, D: imlenmi polenlerin mikroskop altında görünümü)

3.2.3. Iınlanm Polenlerle Tozlama ve Histolojik Analizler

Işın uygulaması sonrasında laboratuvara getirilen iek tomurcuklarından anterler izole edilmiş ve bir gece etüvde bekletilerek iek tozları elde edilmiştir. Tozlama işlemi, tozlamadan 1-2 gün önce iınlama işlemi için emaskülasyon yapılan iek tomurcuklarında gerçekleştirilmiştir. Petri kutularında seraya götürülen iek tozları, ince uçlu fırça yardımıyla alınarak emaskle edilen çiçeklerin dişicik tepesine srlmtir (ekil 3.10). Diicik tepesinin iek

tozlarıyla sarıya boyanmasına, dolayısıyla tozlanma işleminin gerçekleştirilmesine dikkat edilmiştir.



şekil 3.10. iek tomurcuklarının fırça yardımıyla tozlanması

Çalışmada, *C. persicum* türüne ait “Maxora” F1 ticari çeşidinde polinasyon olanakları ve zamanları histolojik analizlerle belirlenmiştir. Bu amaçla, histolojik analizler yapmak için kendi iek tozları ile tozlanmış (ışınlanmamış) ve tozlama işleminin sonraki günden itibaren 10. güne kadar 3’er iek tomurcuğu toplanmıştır. Embriyo oluşumu ve zamanını belirlemek için ise, 10. günden sonra 20, 30, ve 40. günde 3’er iek tomurcuğu alınmıştır. Bu iek tomurcukları, FPA-70 (900 ml etanol %70, 50 ml formaldehit, 50 ml propiyonik asit) solüsyonu içeren alimünyum folyo ile sarılmış plastik kaplar içerisinde +4 °C’de histolojik analizler yapılıncaya kadar saklanmıştır (Eti, 1990) (şekil 3.11).



Şekil 3.11. FPA-70 solüsyonunda saklanan iek tomurcukları

iek tomurcuklarının parafine alınması ve incelenmesi işlemleri için, ilk olarak örnekler üzerinde küçük delikler açılmış ve örnekler içerisindeki suyun çıkarılması amacıyla artan alkol konsantrasyonlarına sahip (%70, %85, %95 ve %100'lk) Johansen karışımlarında 3'er saat bekletilmiştir. Johansen karışımları, Stsser vd. (1985)' e göre hazırlanmıştır. Solüsyonların içerikleri izelge 3.1'de verilmiştir.

%100'lk Johansen karışımı içerisinde bekleme süresinin son yarım saatinde vakum pompası yardımı ile örneklerin havası alındıktan sonra, rnekler TBA-1 (Tersiyer Bütil Alkol) sıvısı içerisine aktarılarak bir gece bekletilmiştir (ekil 3.12).

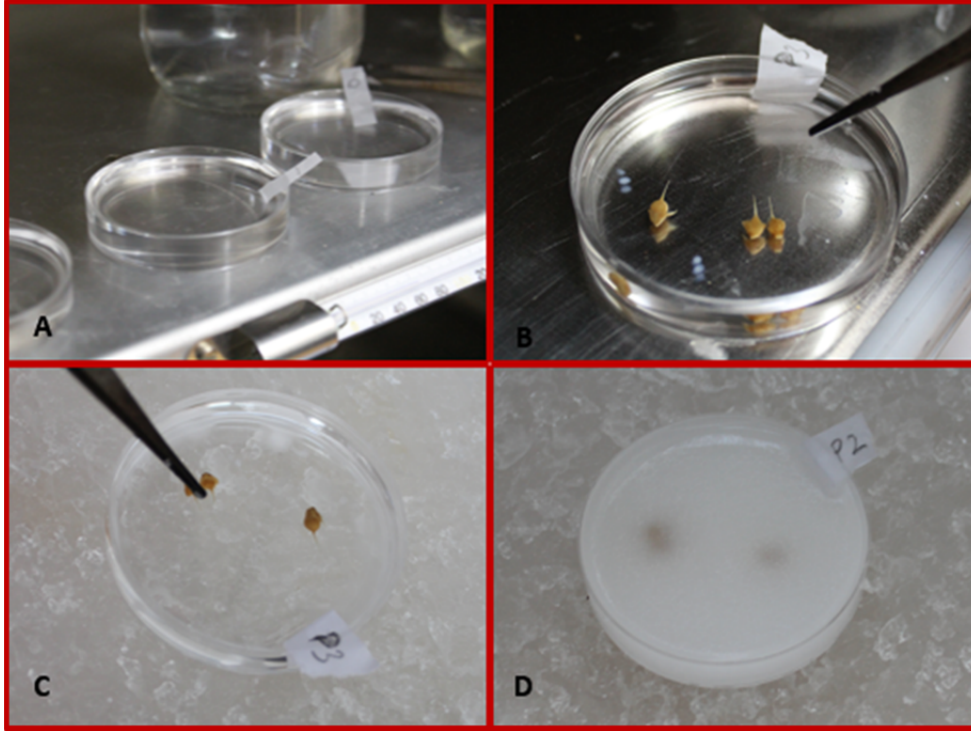
Çizelge 3.1. Johansen solüsyonlarının içeriği

Johansen Solüsyonu (%)	Saf Su (ml)	%96'lık Etil Alkol (ml)	Tersiyer Bütil Alkol (TBA) (ml)
%70	300	500	200
%85	150	500	350
%95	-	450	550
%100	-	200	800



Şekil 3.12. iek tomurcuğu içindeki havanın alınması (A: Çanak yaprakların uzaklaştırılması ve tomurcuğun bistüri ucuyla delinmesi, B: Örneklerin vakum pompası bağlı desikatöre yerleştirilmesi, C: vakum pompası ile havalarının alınması, D: TBA-1 içerisinde örneklerin etüvde bekletilmesi)

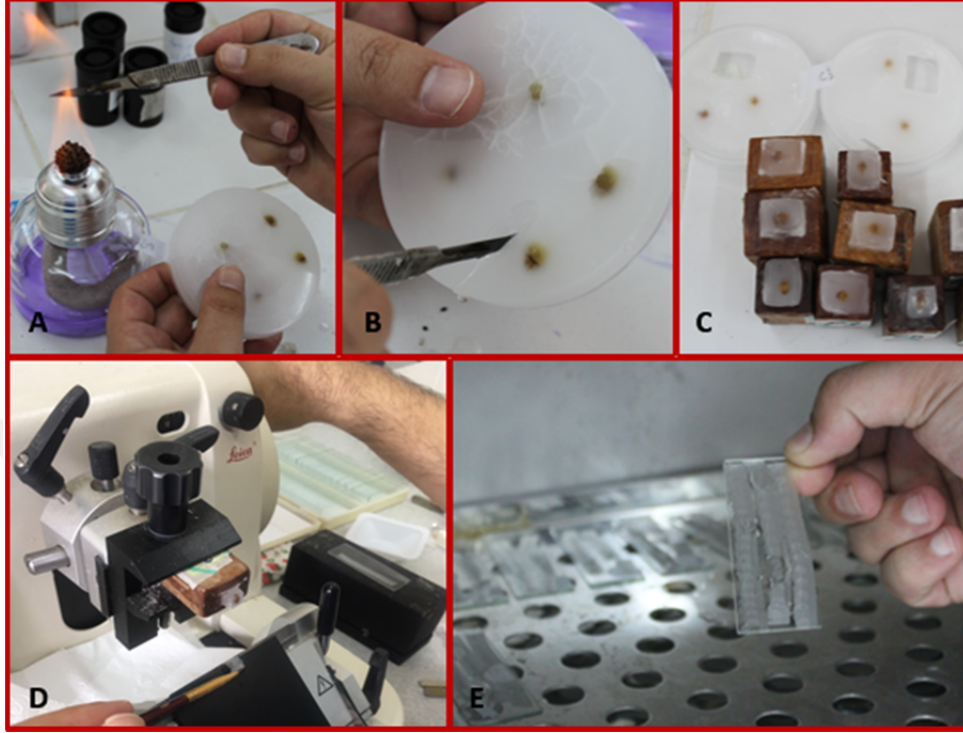
Tersiyer Bütil Alkol (TBA) 20-22 °C'nin altında donan bir sıvı olduğundan bekletme 25-30 °C'ye ayarlanmış etüv içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün örnekler, 3'er saat TBA-2 ve TBA-3 sıvıları içerisinde bekletildikten sonra önceden petri kaplarında eritilmiş sıvı parafin içerisine alınmıştır. 60-65 °C'lik etüvde 2-3 gün bekletilerek parafinin örnekler içerisine nüfuz etmesi sağlanmıştır. Bu srenin sonunda, etüv dışına alınarak buz üzerinde parafinin donması sağlanmış ve ayrıca tamamen sertleşmesi için de +4 °C'de 1-2 gün daha bekletilmiştir (şekil 3.13).



şekil 3.13. Örneklerin parafin içine gömülmesi aşamaları (A: etüvde sıvı parafinin petrilere dökülmesi, B: Örneklerin sıvı parafine batırılması, C: buz üzerine çıkartılan petrilere örneklerin kesim yüzeyinin ayarlanması, D: parafinin buz üzerinde dondurulması)

Mikrotomla kesit alma işlemi için, öncelikle örnekler tahta bloklar üzerine yerleştirilmiştir. Bu amaçla, örneklerin etrafındaki fazla parafin sıcak bistüri ile uzaklaştırılmıştır. Kare şeklinde kesilen parafine gömülü örnekler, ucu ısıtılan bistüri ile tahta bloklar üzerine monte edilmiştir. Bu örneklerde rotasyon mikrotomu ile 10 μ kalınlığında kesitler alınmıştır. Tahta bloklar üzerine yerleştirilen parafin örneklerinden ilk olarak mikrotomda fazla parafinler uzaklaştırılıp, örneklerin kesimine kadar boş kesimler yapılmıştır. Yaklaşık bir lam uzunluğunda ard arda kesimler yapılmış ve bu kesitler iğne ve fırça yardımıyla hassas bir şekilde mikrotomun bıağından kurtarılıp alınmıştır. Alınan kesitler lam üzerine yerleştirilmeden önce örneklerin lama yapışması için önceden 1:1 oranında hazırlanan yumurta akı ve gliserin karışımından oluşan yapıştırıcı kk bir damlacık şeklinde lam üzerine damlatılmıştır. Lam zerine damlatılan yapıştırıcı, serçe parmak yardımıyla lamın tüm yüzeyini kaplayacak şekilde, ince bir tabaka halinde yayılmıştır. Daha sonra üzerine 1-2 damla saf su damlatılan lam üzerine, alınan kesitler yerleştirilmiştir. Hazırlanan lamlar sıcak yüzey (hot plate) zerine konulmuştur. Lamla kesitler arasına parafininin üst üste yapışmaması ve gerginleşerek lam üzerine yapışması için saf su ilave edilmiştir. Boyama işlemi öncesinde hazırlanan örnekler 2 gün boyunca 30 °C'deki etüvde bekletilmiştir (şekil 3.14).

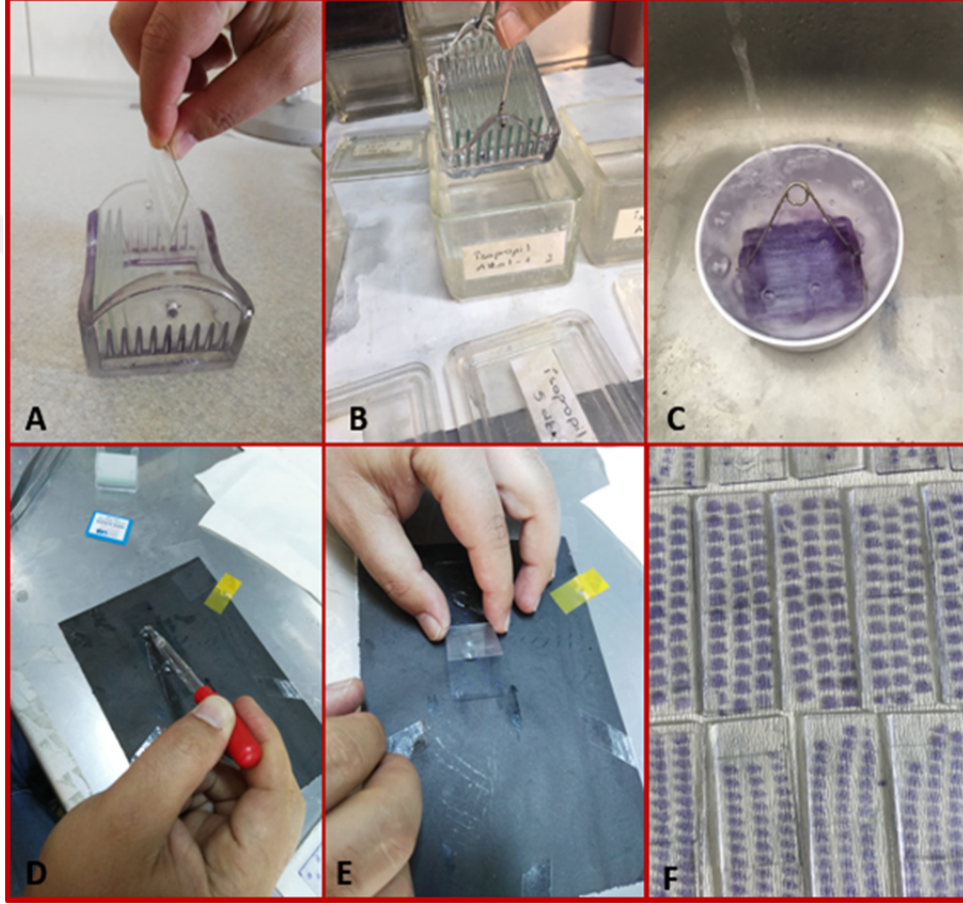
30 °C'de etüvde bekletilen örnekler, ikinci gün sonunda çıkartılmış ve örneklerin boyanması işlemine geçilmiştir. Etüvde iyice kurutulan örnekler, bir lam taşıyıcıya dizilerek önce ksilol dolu küvetler içerisinde bekletilmış ve örneklerin etrafında bulunan parafinler uzaklaştırılmıştır. Ardından rnekler hem parafinden kurtulması hem de içerisinde yavaş yavaş su alması için, önce izopropil alkol ve sonrasında kontrasyonu gittikçe azalan alkol serisinden geçirilmiştir. Son aşamada, örnekler boya çözeltisinin içerisine alınmadan önce boyanın örnekler içerisine iyice nüfus etmesi için saf suda bekletilmiştir. Saf suda bekletilen örnekler, hematoxylin boya çözeltisinde bekletilerek boyanmıştır.



Şekil 3.14. Parafin bloklarının hazırlanması işlemleri (A: bistüri ucunun ısıtılması, B: fazla parafinlerin sıcak bistüri ucuyla uzaklaştırılması, C: Örneklerin tahta bloklar üzerine yerleştirilmesi, D: mikrotomla kesit alınması, E: lam üzerine yerleştirilen kesitlerin etüvde bekletilmesi)

Hematoxylin boya zltisini hazırlamak için, 1 g hematoxylin, 6 ml etil alkol içerisinde eritilmitir. Ayrı bir kaptaki 12.5 g potasyum alüminyum sülfat 100 ml suda eritilmiş ve bu suya 0.18 g $KMnO_4$, 25 ml gliserin ve 25 ml metanol eklenmiştir. Bu zlti önceden eritilen hematoxylin ile karıştırılarak stok zlti hazırlanmıştır. Boyama işlemi için, 1 birim stok zlti 10 birim saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır. Hematoxylin içerisinde 30 dk bekletilen örnekler, daha sonra sürekli akan eme suyu altında 15 dk bekletilerek fazla boyadan arındırılmıştır. Boyama işleminden sonra örnekler, bu defa önce artan konsantrasyonlarda alkol serisinden geçirilmiş ve daha sonra izopropil alkol ve son aşamada ksilol'de bekletilerek doku içerisindeki fazla su uzaklatırılmıtır.

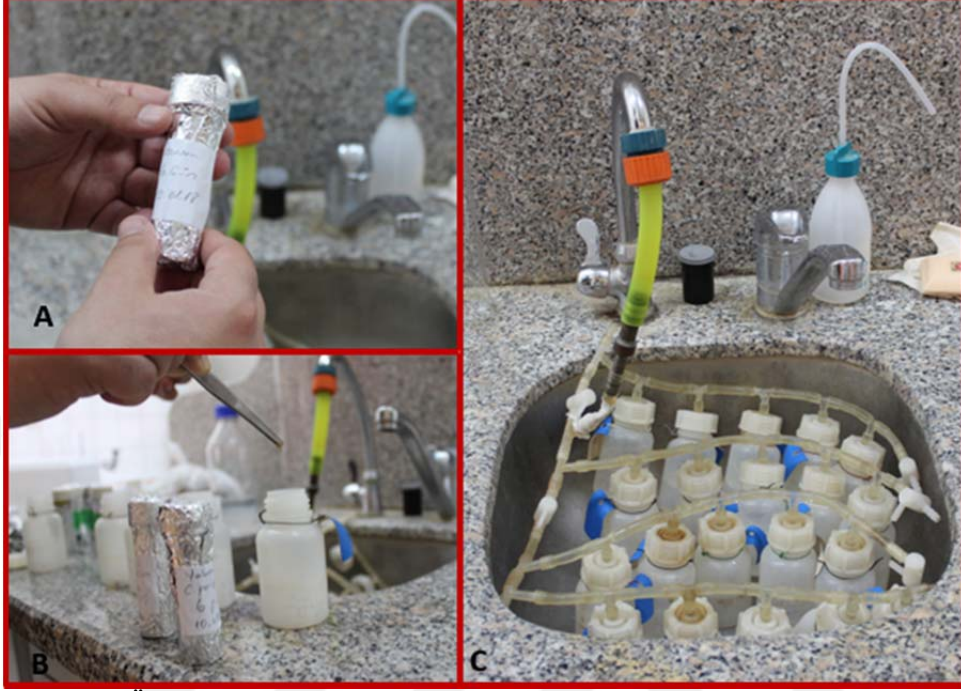
Ksilolde bekletildikten sonra, örneklerden ksilol süzülerek uzaklaştırılmış ve son aşamada daimi preperat hazırlamak amacıyla örneklerin üzerine bir damla şeffaf bir yapıştırıcı olan entellan damlatılarak üzeri lamelle kapatılmıştır (şekil 3.15).



şekil 3.15. Örneklerin boyanması ve daimi preperat hazırlanması (A: Örneklerin lam taşıyıcıya yerleştirilmesi, B: Örneklerin alkol serilerinden geçirilmesi ve boyanması, C: fazla boyanın uzaklaştırılması ve tersine alkol serilerinden geçirilmesi, D: fazla ksilol uzaklaştırdıktan sonra örnek üzerine entellan damlatılması, E: lamelle örneklerin kapatılması, F: hazırlanan daimi preperatlar)

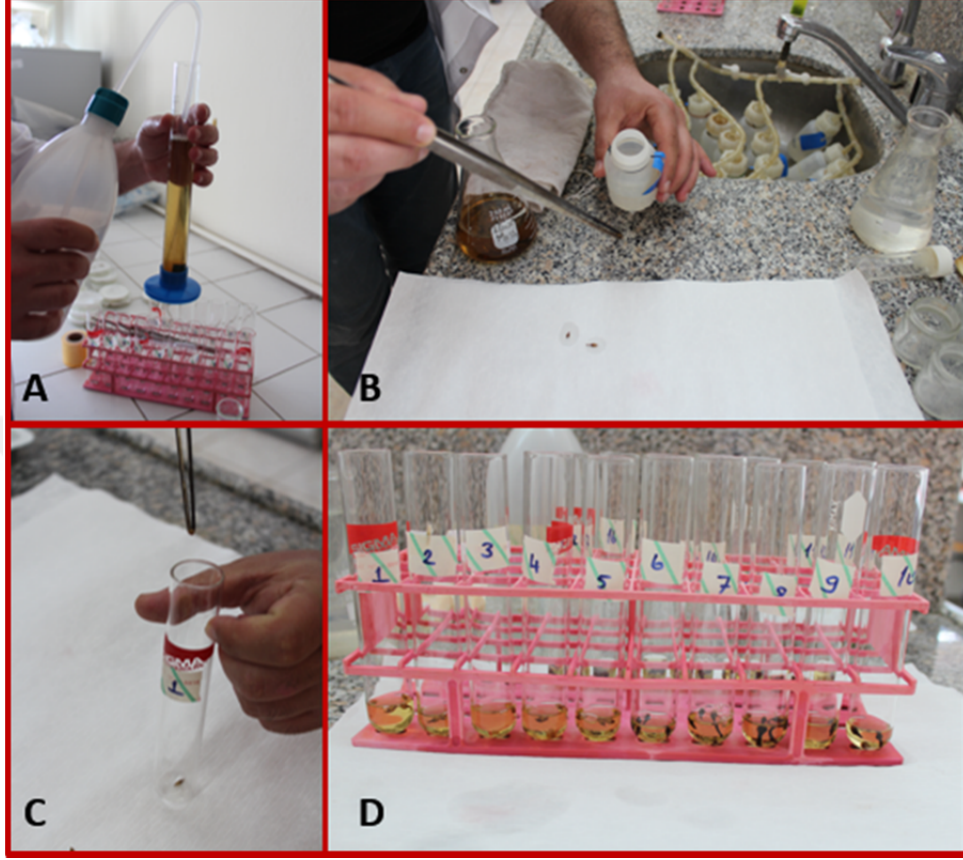
Ezme preparat yöntemi ile iek tozu çim borusu gelişiminin incelenmesi için tozlama işleminden sonraki 1. günden 10. güne kadar 3 iek tomurcuğu toplanmış ve FPA-70 tespit solüsyonuna koyularak +4 °C’de buz dolabında inceleninceye kadar bekletilmiştir. FPA 70 zeltisi hazırlamak için; 900 ml %70’lik etil alkol içerisine 50 ml propionik asit ve 50 ml formaldehit eklenmiştir.

iek tozu çim borusunun yumurtalık ve tohum taslağına ulaşma sürelerinin belirlenmesi için, ezme preparat yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla anilin mavisi ile boyanan pistil örnekleri floresan mikroskop altında incelenmiştir. Ezme preparatların hazırlanmasında ilk olarak, FPA-70 tespit çözeltisinde bulunan örneklerden FPA’nın uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla; örnekler tespit çözeltisinden çıkartılarak yıkama seti içerisine konulmuştur. Yıkama setinin her bir haznesine farklı örnekler konulmuş ve örneklerin karışmaması için üzeri etiketlenmiştir. Yıkama seti; plastik şişeler ve bunları birbirine bağlayan plastik hortumlardan yapılmıştır. Plastik hortumun bir ucu kapalı, diğer ucunda ise musluk bağlantısı bulunmaktadır (şekil 3.16). Plastik şişelerin orta kısmından küçük delikler açılmış ve bu sayede şişelerin taşması önlenerek, içerisindeki suyun devir daim yapması ve örneklerin sürekli temiz suyla yıkanması sağlanmıştır. Örnekler, yıkama seti içerisinde bir gece boyunca bırakılmış ve FPA-70 tespit çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Gece boyunca yıkama seti içerisinde akan suda bırakılan örnekler, ertesini gün alınarak daha önceden hazırlanan 8N NaOH içerisinde 6-8 saat boyunca bekletilmiş ve örneklerin yumuşaması sağlanmıştır. Daha sonra rnekler, NaOH’tan arındırılmak için yıkama setine alınarak 1 gece akan musluk suyunda yıkanmıştır. Yıkanan rnekler, yıkama setinden çıkartılmış ve filtre kağıdı üzerinde hafifçe kurulandıktan sonra anilin mavisi boya çözeltisine alınmıştır. Anilin mavisi boyası hazırlanırken stok çözeltisi 1:3 boya:saf su içerecek şekilde seyreltilmiştir. Anilin mavisi stok çözeltisi hazırlamak için; 1 g anilin mavisi ile 11.28 g tripotasyum fosfat 250 ml saf su içerisinde zdrlmştir.



Şekil 3.16. Örneklerden tespit zltisinin uzaklaştırılması (A: FPA-70 zltisinde bekleyen rnekler, B: Örneklerin plastik Őişelere alınması, C: yıkama setinin genel görünümü)

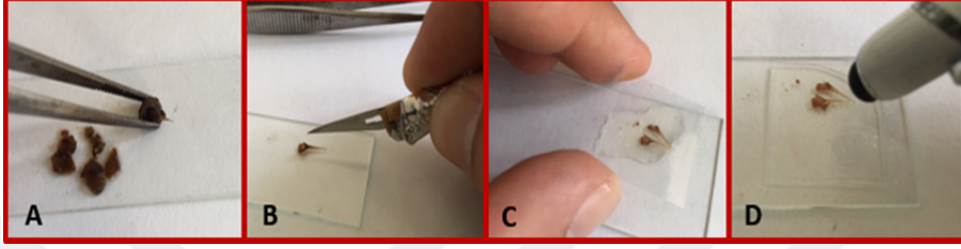
Boya stok zltisinin uzun süre kullanılabilmesi ve fungal bulaşıklığı önlemek için, zlti içine yaklaşık 1 g thymol kristali koyulmuştur. Hazırlanan boya stok zltisi, 2-3 gün boyunca koyu bal rengine dönüşünceye kadar +4 °C’de bekletilmiştir. Anilin mavisi boya zltisi içerisinde rnekler +4 °C’de buz dolabında 2-3 gün bekletilerek boyanın dokulara iyice nüfus etmesi sağlanmıştır. İnceleme esnasında iyi görüntü kalitesi elde etmek için anilin mavisi boya zltisinin koyulacağı kabın iinin temiz, FPA veya NaOH ile bulaşık olmamasına dikkat edilmiştir. Örneklerin anilin mavisi ile boyanması işlemlerinin bazı aşamaları Şekil 3.17’ de verilmiştir.



Şekil 3.17. iek tomurcuklarının anilin mavisi ile boyanması (A: seyreltik anilin mavisi boyasının hazırlanması, B: Örneklerin yıkama setinden çıkartılarak kurulanması, C: Örneklerin temiz cam tüplere alınması ve içerisine boyanın koyulması, D: anilin mavisi boyası içerisindeki örneklerin genel görünümü)

Ezme preparat hazırlamak için incelenecek örnek bir lam üzerine alınmıştır. Stereo mikroskop altında dişicik borusu, bir bistüri veya jilet yardımıyla ortadan ikiye boyuna kesilerek ikiye ayrılmıştır. Hazırlanan rnekler, üzerine bir damla içerisinde bulunduğu boya zeltisinden damlatılmı ve sonrasında üzeri lamel ile kapatılmıştır. Bir kalem yardımıyla lamel üzerine hafif vurular yapılarak, örneğin ezilmesi sağlanmış ve hazırlanan preparatlar floresan mikroskopta incelenmiştir.

Polen tüpünün yumurtalığı ulaşıp ulaşmadığının kontrolü için ise, yumurtalık dokusu benzer şekilde ezme preparat haline getirilerek incelenmiştir. Ezme preparat hazırlama aşımaları Şekil 3.18’de verilmiştir.



Şekil 3.18. Ezme preparat hazırlanışı (A: çiçek tomucuklarının lam üzerine alınması ve ta yaprakların uzaklaştırılması, B: dişicik borusunun boyuna kesilmesi, C: Örneklerin lamelle kapatılması, D: lamelle kapatılan örneklerin ezilmesi)

3.2.4. Işınlanmış Polenlerle Tozlama İşlemi Sonrasında *in vitro* Ovül Kültürü

Farklı dozlarda gama ışını uygulanmış polenlerle tozlamalar yapılmış ve tozlama yapılan çiçek tomurcukları farklı renkli tokalarla işaretleştir. Histolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar da göz önünde bulundurularak, uygun dönemde meyveler toplanarak laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.19).

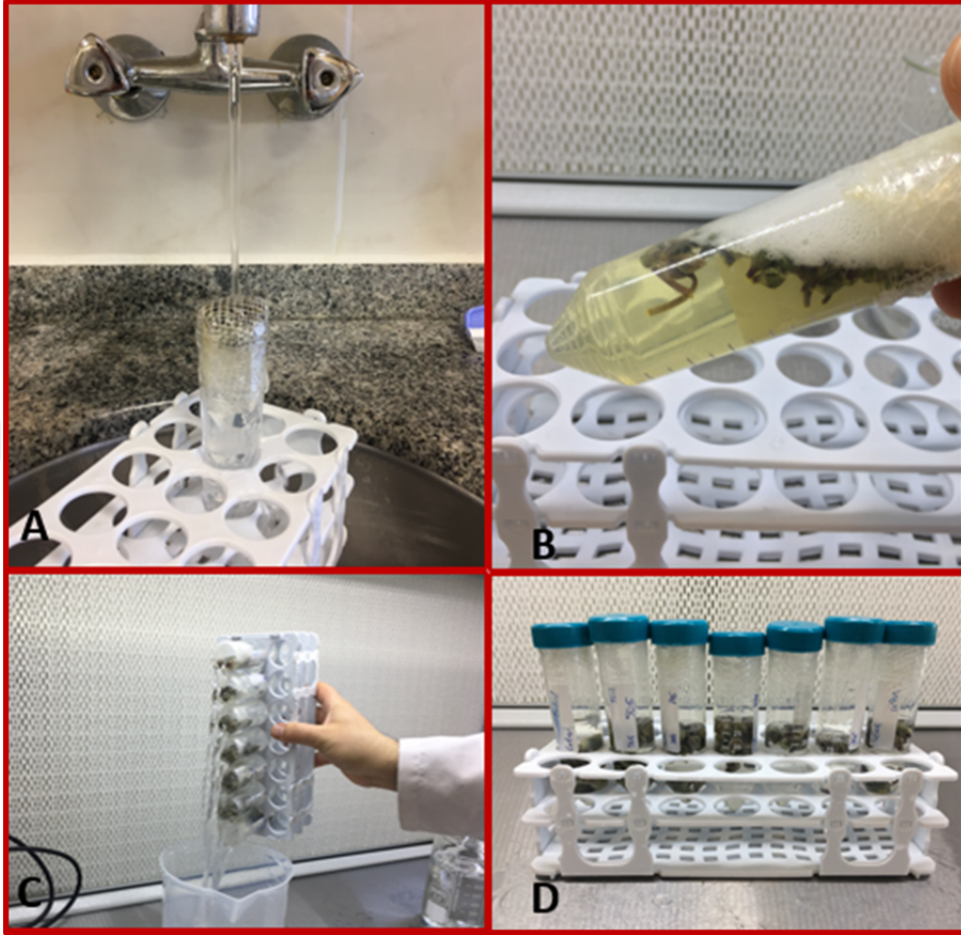


Şekil 3.19. Farklı dozda ışınlanmış polenlerle tozlanan bitkilerde meyve tutumu (M: meyve)

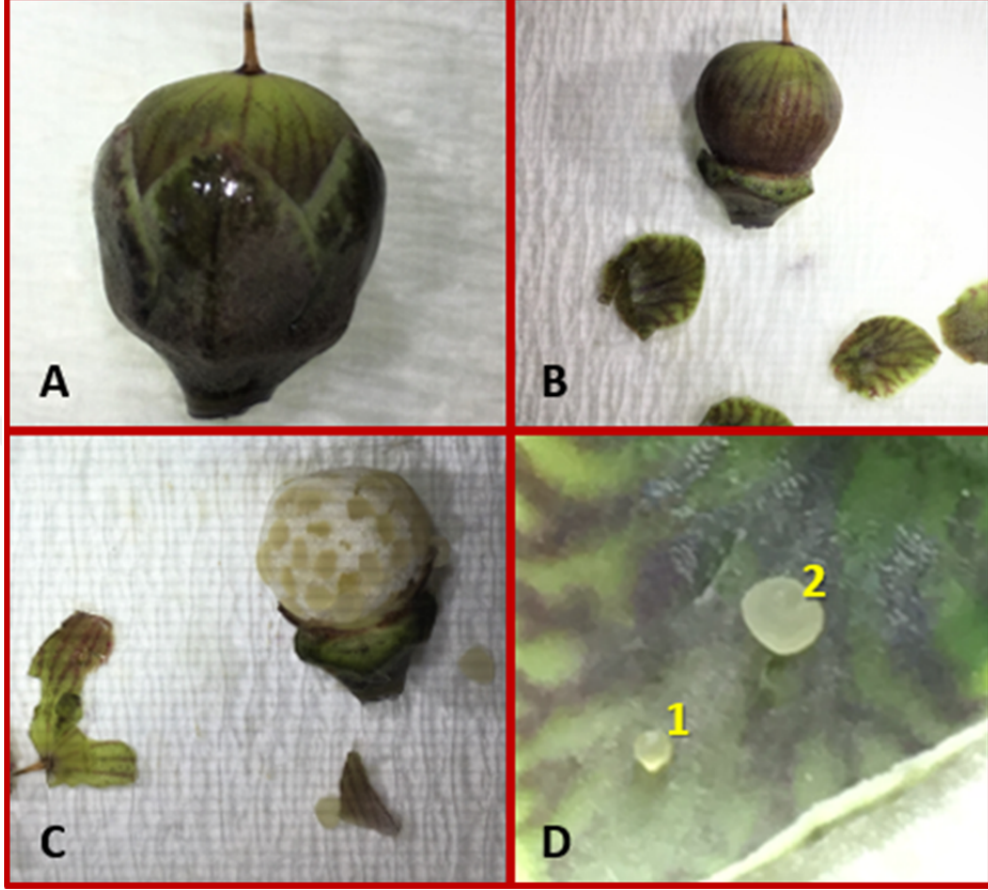
Işınlanmış polenlerle tozlama ve sonrasında ovül kültürü denemeleri iki kez tekrar edilmiştir. İlk uygulamanın sonuçlarına göre, yeniden ışın uygulaması ve tozlamalar yapılmış ve ikinci bir deneme kurulmuştur.

Birinci deneme kapsamında, ovül kültürüne başlanmadan önce ilk olarak yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yüzey sterilizasyonu amacıyla, meyveler doz gruplarına göre ayrılmıştır. Gruplandırılan meyve örnekleri, 50 ml hacimli Falcon tüplere koyularak akan eşme suyu altında 20 dk bırakılarak tozlarından arındırılmıştır. Bekleme işleminde sonra örnekler, 3-5 defa saf su ile durulanmış ve steril kabin içerisine transfer edilmiştir. Kabin içerisinde, steril behere aktarılan örnekler önce %70'lik etil alkolde 1 dk, sonra içerisinde 1-2 damla Tween-20 eklenen %30'luk ticari sodyum hipokloritte (Domestos) 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra örnekler, kpklerinden uzaklaşmaya kadar steril saf su ile durulanmıştır (Şekil 3.20).

Yüzey sterilizasyonu yapılan meyve örneklerinden ovüllerin izolasyonu gerçekleştirilerek *in vitro* ortamda kültüre alınmıştır. Ovüllerin izolasyonu için ilk olarak meyve örneklerinde petallerin iek tablası üzerinde birleştiği noktadan kesim yapılmış ve sonrasında petaller uzaklaştırılmıştır. Yumurtalık zarı, iek sapına yakın kısımdan yatay yönde dairesel olarak kesilmiş ve sonrasında dikey bir kesimle ovllere zarar vermeden yumurtalık zarı uzaklaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra ovlleri daha rahat görmek ve zarar vermeden yumurtalıktan izole etmek için, çalışmalar stereo mikroskop altında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.21).



Şekil 3.20. Yüzey sterilizasyon aşamaları (A: eme suyu altında bekletme, B: Örneklerin ticari hipoklorit çözeltisinde bekletilmesi, C: steril saf su ile durulama, D: yüzey sterilizasyon işlemi gerçekleştirilen eksplantlar)



Şekil 3.21. Ovüllerin izolasyonu (A: hasat edilen meyvenin görünümü, B: Çanak yaprakların uzaklaştırılması, C: ovaryum kılıfının uzaklaştırılması, D: tozlama işleminden sonra 30. Gün tohum taslakları (D1: uyartım sağlanmamı tohum taslağı, D2: uyartım sağlanmış ve büyümüş tohum taslağı)).

Meyvelerden izole edilen ovüller ince uçlu pens yardımıyla zarar vermeden yumurtalıktan alınmış ve besi ortamına ekimi yapılarak deneme kurulmuştur. Denemede temel besi ortamı olarak $\frac{1}{2}$ MS kullanılmıştır. Kültüre alınan örnekler, 8 hafta boyunca karanlıkta ve 8 hafta sonrasında büyütme odası koşullarında (16 saat fotoperiyodisite, 25 ± 1 °C'de) kültüre alınmıştır. Ovül kültürü denemeleri, 10 tekerrürlü ve her tekerrürde 4 ovül olacak şekilde kurgulanmıştır. Ovül kültürü

deneme planı izelge 3.2’ de, temel ortam içeriği izelge 3.3’ de, denemede kullanılan ortam bileşenleri izelge 3.4’ da verilmiştir.

Çizelge 3.2. Ovül kültürü deneme planı

Ortamlar	0 Gy	50 Gy	100 Gy	150 Gy	200 Gy	350 Gy	450 Gy
Kontrol	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl
Ortam 1	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl
Ortam 2	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl	10 petri x 4 ovl

izelge 3.3. Denemede kullanılan ½ MS basal besi ortamının kimyasal içeriği

Makro elementler	(mgL ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
CaCl ₂ x 2H ₂ O	166.1
MgSO ₄ x 7H ₂ O	90.35
KH ₂ PO ₄	85
Mikro elementler	(mgL ⁻¹)
H ₃ BO ₃	3.1
MnSO ₄ x1H ₂ O	8.45
ZnSO ₄ x7H ₂ O	4.3
KI	0.415
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.125
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.0125
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.0125
Vitaminler ve diğerleri	(mgL ⁻¹)
Inositol	50.0
Glisin	1.0
Thiamine HCl	0.5
Pyridoxine HCl	0.25
Nikotinik Asit	0.25
Karbohidratlar	g.L ⁻¹
Sakkaroz	30.0
D(+)-glucose monohydrate	2.0
Katılaştırıcı	g.L ⁻¹
Gelrite	3.7

Çizelge 3.4. Birinci denemede kullanılan ortamların bileşenleri

1 L Ortam Bileşenleri	Kontrol	1 nolu ortam	2 nolu ortam
½ MS Basal	2.2 g	2.2 g	2.2 g
Sakkaroz	30.0 g	30.0 g	30.0 g
Glikoz	2.0 g	2.0 g	2.0 g
Maltoz	-	10.0 g	-
Prolin	-	1.0 g	-
Pepton	-	2.0 g	-
Spermidin	-	200.0 µl	-
2,4-D	-	-	2 mg
2İP	-	-	0.8 mg
BAP	-	0.4 mg	-
GA ₃	-	0.4 mg	-
Kinetin	-	-	-
Gelrite	3.7 g	3.7 g	3.7 g

Ovül kültürünün birinci denemesinde, yüzey sterilizasyonu amacıyla meyveler akan eşme suyu altında 20 dk bırakılmış ve yüzey kirlerinden arındırılmıştır. Sonraki aşamada, eksplantlar birinci denemeden farklı olarak %0.1'lik HgCl₂ (Civa klorür) içerisinde 25 dakika bekletilmiştir. Saf su ile iyice durulanan eksplantlar, buldukları kapların ağızları kapatılarak steril kabin içerisine aktarılmıştır. Bekleme işleminde sonra örnekler, 3-5 defa saf su ile durulanmış ve steril kabin içerisine transfer edilmiştir. Kabin içerisinde steril behere aktarılan örnekler, önce %70'lik etil alkolde 1 dk, sonra içerisine 1-2 damla Tween-20 eklenen %30'luk ticari sodyum hipokloritte (Domestos) 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra örnekler kpklerinden uzaklaşmaya kadar steril saf su ile durulanmıştır.

Sterilizasyon işleminde tamamlanan meyvelerden ovüllerin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Ancak birinci denemede ilk denemeden farklı olarak, bir besi ortamı daha kullanılmış ve toplamda kontrol grubu dahil 4 farklı besi ortamında ovüller kültüre alınmıştır. Kültüre alınan ovüller yine birinci denemede olduğu gibi 8 hafta boyunca karanlıkta ve 8 hafta sonrasında

ise büyütme odası koşullarında (16 saat fotoperiyodisite, 25±1 °C'de) kültüre alınmıştır. İkinci denemede, ovül kültürü 10 tekerrürlü ve her tekerrürde 4 ovül olacak şekilde kurulmuştur. Birinci denemeye ait ortam bileşenleri izelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. İkinci denemede kullanılan ortamların bileşenleri

1 L Ortam Bileşenleri	Kontrol	1 nolu ortam	2 nolu ortam	3 nolu ortam
½ MS Basal	2.2 g	2.2 g	2.2 g	2.2 g
Sakkaroz	30.0 g	30.0 g	30.0 g	30.0 g
Glikoz	2.0 g	2.0 g	2.0 g	2.0 g
Maltoz	-	10.0 g	10.0 g	-
Prolin	-	1.0 g	1.0 g	-
Pepton	-	2.0 g	2.0 g	-
Spermidin	-	200.0 µl	200.0 µl	-
2,4-D	-	-	-	2 mg
2iP	-	-	-	0.8 mg
BAP	-	-	0.4 mg	-
GA ₃	-	-	0.4 mg	-
Kinetin	-	0.5 mg	-	-
Gelrite	3.7 g	3.7 g	3.7 g	3.7 g

Ovül kültüründe karanlıkta kültüre alınan örneklerden rejenerasyon göstererek embriyo ya da sürgün oluşturun yapılar da farklılaşmayı sağlamak amacıyla, örnekler 0.5 g.L⁻¹ aktif karbon içeren hormonsuz kontrol ortamına aktarılmıştır. Elde edilen kök, yumru ve yapraklara sahip bitkilerden dış ortama aktarılacak büyüklüğe gelen örneklerde, öncelikle kültür kaplarının ağızları gevşetiler ek kap içerisine kontrollü hava girişi sağlanmıştır. Bir hafta boyunca kapağı hafif bırakılan kaplarda bulunan bitkiler, daha sonra kültür ortamından çıkartılarak eşe suyu nda kök kısımları yıkanmış ve besi ortamından arındırılmıştır. Sonrasında, steril torf içeren ortamlarda plastik viyollere sağırtılmıştır. 2 hafta boyunca kontrollü iklim odasında kültüre alınmış ve gün

içerisinde nem kaybından kurumaması için aralıklarla sprey ŐŐe ile su pskrtlmŐtir. Son aşamada bitkiler ısıtmasız serada kültüre alınmıştır.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

İÇin uygulamalarının ve polen yaşının çim borusu uzunluğuna etkisine ait istatistiksel analizler tesadüf parselleri faktöriyel deneme desenine göre JMP 8.0 (SAS Institute Inc., ABD) paket programında yapılmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile karŐılaŐtırılmıŐtır.

Ovül kültürü denemelerine ait istatistik bulgular, tesadüf parselleri deneme desenine göre JMP 8.0 paket programında analiz edilmiş, ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile karŐılaŐtırılmıŐtır. Yüzde değerlere istatistik analizler öncesinde aı transformasyonu uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. Işınlanmış Polenlerin Canlılık ve *In vitro* Çimlenme Oranları**

Farklı dozlarda gama ışını uygulanan çiçek tomurcukları, laboratuvara getirilmiş ve anterler izole edilmiştir. Anterlerin petri kaplarında etüv içerisinde gece boyunca bekletilmesiyle çiçek tozları elde edilmiştir (0. Gün); elde edilen çiçek tozlarında TTC testleri yapılmış ve kalan örnekler ışık geçirmeyen siyah film kutularında buz dolabı içinde saklanmıştır. İlk uygulamayı takip eden 1. ve 2. gün'de canlılık testleri tekrarlanmıştır. Polen canlılık sonuçları incelendiğinde; ışın uygulaması yapılmayan kontrol grubunda canlılık oranının yaklaşık %83.5 olduğu belirlenmiştir. 1. gün ve 2. gün testlerinde canlılık oranının giderek düştüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

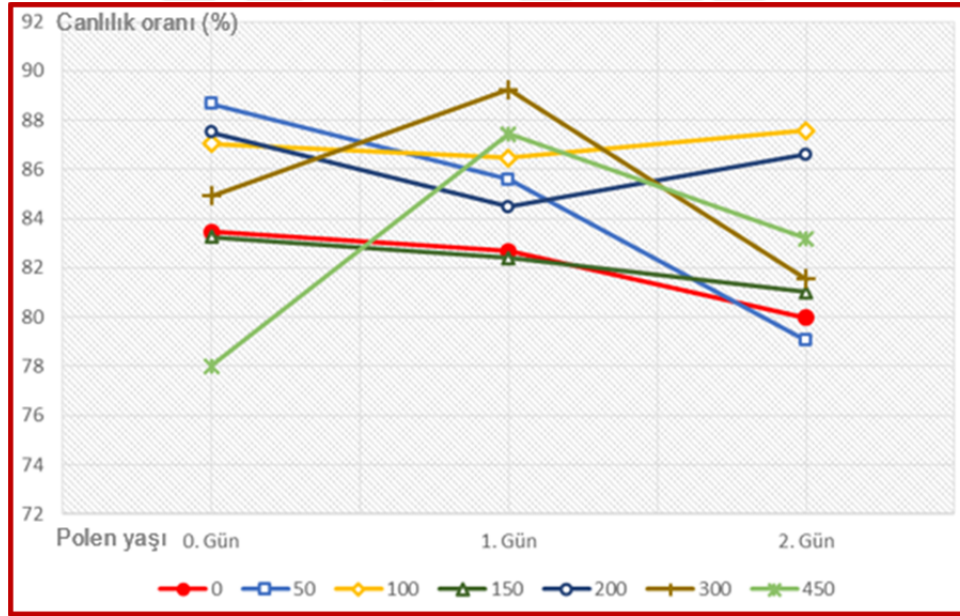
Çizelge 4.1. Işın uygulaması ve polen yaşının polen canlılığına etkisi (%)

Işın Dozu (Gy)	0. Gün	1. Gün	2. Gün	Ortalama
Kontrol	83.46 ± 2.75	82.67 ± 6.28	79.98 ± 2.98	82.03 ± 4.00
50	88.67 ± 1.72	85.59 ± 3.16	79.04 ± 7.27	84.43 ± 4.05
100	87.05 ± 2.39	86.46 ± 1.70	87.58 ± 1.54	87.03 ± 1.87
150	83.25 ± 1.50	82.41 ± 1.70	81.01 ± 3.56	82.22 ± 2.25
200	87.51 ± 2.34	84.48 ± 5.18	86.60 ± 0.88	86.19 ± 2.80
300	84.93 ± 3.93	89.25 ± 2.34	81.54 ± 1.64	85.24 ± 2.63
450	78.00 ± 5.64	87.45 ± 3.79	83.19 ± 2.24	82.88 ± 3.89

Ertesi gün (1. gün) yapılan polen canlılığı testlerinde en yüksek polen canlılığı %89 oran ile 300 Gy ışın dozu uygulamasında belirlenmiştir. Bu uygulamayı, sırasıyla %87 oran ile 450 Gy, %86 oran ile 100 Gy ışın dozu uygulaması takip etmiştir. En düşük polen canlılık oranı, %82 oran ile kontrol ve 150 Gy ışın dozunda gözlenmiştir.

2. gün polen canlılık oranları incelendiğinde; en yüksek canlılık oranı %87 ile 100 Gy ışın dozu uygulamasında en düşük polen canlılığı ise, %79 oran ile kontrol ve 50 Gy ışın dozu uygulamalarında tespit edilmiştir.

Polenlerin ışın uygulamasına göre canlılık değişimleri incelendiğinde, 300 ve 450 Gy doz uygulaması yapılan çiçek tomurcuklarına ait 1. gündeki polen canlılık oranları başlangıçtaki canlılık oranına göre artış gösterirken; diğer dozlardaki ışın uygulamalarında polen canlılık oranları başlangıca göre dşmştr. 2. gün yapılan polen canlılık testi sonuçlarına göre tüm uygulamaların polen canlılık değerleri, başlangıç değerlerine göre daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.1). Uygulamalar arasında, sadece 50 Gy ışın dozu ve kontrol grubundaki polenlerin canlılığında sürekli düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Işın uygulamalarının polen canlılığına etkisi

Polen canlılık oranının belirlenmesi; yapay melezlemelerde ve ıslah programlarında kullanılan yaygın bir yöntemdir (Stone vd., 1995). Diğer taraftan polen canlılığı, melezleme ıslahında kısırlık problemlerinin anlaşılması (Gupta ve

Murty, 1985) ve evrimsel ekoloji için de önemli bir araçtır (Thomson vd., 1994). Bu kapsamda birçok araştırmacı farklı türlerin polen canlılıklarını belirlemiştir. Schwartz-Tzachor vd. (2007), İsrail’de doğal olarak yayılış gösteren iki farklı *C. persicum* popülasyonunda yaptıkları çalışmalarında, bitkilerin iek özellikleri ile ıslah sistemlerini incelemişlerdir. Çalışmada 1, 4, 8, 12, 16 ve 20 günlük polenlerin canlılık oranlarını belirlemişlerdir. Araştırma sonucunda, polenlerin canlılıklarının ilerleyen günlerde kademeli olarak düşüş göstermiş ve en yüksek canlılık oranının 1 günlük polenlerde yaklaşık %80 olduğu bildirilmiştir. 4. günde ise polen canlılığının %70-75 oranına düştüğü grlmştir. Bu sonuçlar, çalışmamızın kontrol grubuna ait veriler ile karşılaştırıldığında canlılık oranının benzerdir. Ancak bazı ışın dozu uygulamalarında polenlerin ilerleyen günlerde canlılıklarını kaybettikleri, bazı dozlarda ise polen canlılığında artış gözlenmiştir. Rodriguez-Riano vd. (2000), 8 farklı türde 4 farklı canlılık testi (PPD, MTT, Baker’s ve X-Gal) kullanarak polen canlılıklarını belirlemişlerdir. Çalışmada, *C. persicum* türüne ait polen canlılığı testlere göre değişmekle birlikte %87.76 ile %94.36 arasında değişiklik göstermiştir. Cordea ve Triplica (2019), 7 farklı siklamen çeşidinde polen canlılık oranlarını incelemişler ve çeşitlere göre değişmekle birlikte polen canlılık oranının %85-95 oranları arasında değişiklik gösterdiğini tespit etmişlerdir. nceki alışmalar göz önünde bulundurulduğunda, siklamende polen canlılık oranının %70 ve üzerinde olduğu ve sonuçların çalışmamızla uyumlu olduğu görülmekle birlikte; Jia vd. (2008), 3 farklı siklamen eşidinde TTC testi ile polen canlılıklarını belirlemişler ve polen canlılıklarının çeşitlere göre %15.30 ile %51.41 arasında değiştiğini bulmuşlardır. Bu canlılık oranları, literatürdeki bilgiler ve çalışmamız sonuçları ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Polen canlılık farklılıklarının, başta genotip farkı olmak üzere kullanılan test yönteminden de kaynaklandığı düşünmektedir. Ayrıca, polenlerin elde edildikleri anterlerin gelişim dönemi, oransal nem, oksijen ve karbondioksit miktarı ve ortam sıcaklığı polen canlılığını belirleyen diğer faktörlerdir (Bots ve Mariani, 2005). Polenlerin

henüz anter içerisinde iken meydana gelen çeşitli stres durumları da polen canlılığını önemli derecede etkileyen bir faktördür (Bots ve Mariani, 2015).

Çalışmamızda kontrol grubu dışındaki ışın uygulamalarında polen canlılık 0 günlük polenlerde ışın dozu arttıkça azalmış, 1 günlük polenlerde genel olarak bir düşüş gözlenmiş ve 2 günlük polenlerde hafif bir artış olsa da başlangıç oranından daha düşük seviyede kalmıştır. Uygulamalar arasında istisnai durum olarak; 300 Gy ışın uygulanan polenlerin canlılığı 1.günde artış gösterirken, sadece 450 Gy ışın uygulaması yapılan polenlerin canlılık oranı 2. günde başlangıç durumuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, kullanılan yöntem ile ilgili olabileceği gibi önceki çalışmalar incelendiğinde polen canlılık oranına daha çok uygulanan ışın dozu miktarı ve süresine göre bitki tür, çeşit veya genotiplerin farklı tepkiler vermesinden kaynaklanmaktadır. Yanmaz vd. (1999), acurda 250 ve 300 Gy dozların kontrole göre polen canlılık oranını arttırdığını, Kurtar (2009) kabakta ışınlanmamış polenlerde canlılık oranı %90 iken, ışın dozu arttıkça bu oranın azaldığını ve 300 Gy doz uygulamasında polen canlılık oranının %17'ye düştüğünü bildirmiştir. Diğer taraftan Falque vd. (1992), kakao bitkisinde yaptıkları çalışmada, polenlerin 0, 50, 100, 200, 500 ve 1000 Gy gama ışınına maruz bırakılmasının polen canlılık oranına etkisinin önemsiz olduğunu tespit etmiştir.

Çalışmamızda, ışın uygulaması sonrasında anterlerin bir gece etüvde bekletilmesiyle çiçek tozları elde edilmiş ve polen canlılık oranlarının belirlenmesi ile birlikte *in vitro* polen çimlendirme testleri de yapılmıştır. Analizlerin yapıldığı ilk gün için polen yaşı 0 olarak kabul edilmiştir. İlk analizler sonucunda, polenlerde en yüksek çimlenme oranı, ışın uygulaması yapılmayan kontrol grubunda (%66) belirlenmiştir. En düşük çimlenme oranı ise %35 ile 450 Gy ışın uygulamasında tespit edilmiştir. Işın dozu miktarı arttıkça polenlerin çimlenme kabiliyetinde düşüş gözlenmiştir. İlk gün çimlendirme testlerinde 50 ve 100 Gy dozlarında ışına maruz bırakılan polenlerin çimlenme oranı sırasıyla %61 ve %60 olmuştur. Artan ışın dozu uygulamalarında çimlenme oranı düşmüştür (Çizelge 4.2).

Farklı dozlarda ışın uygulaması yapılan polenlerle (1 günlük) yapılan *in vitro* çimlendirme testi sonucunda, ışın uygulaması yapılmayan kontrol grubunda %65 oranı ile en yüksek çimlenme oranı gözlenmiştir. En düşük *in vitro* çimlenme oranı ise, en yüksek dozdaki ışın uygulamasında yaklaşık %31'dir (Çizelge 4.2). Işın dozu arttıkça polen çimlenme oranları düşmüş ve 150 Gy üzeri ışın uygulamalarında polenlerin çimlenme kabiliyetinin %50'nin altına düştüğü belirlenmiştir.

İki günlük polenlerle yapılan çimlendirme testleri sonucunda kontrol grubuna ait çimlenme oranında, önceki testlere göre kısmi bir düşüş gözlenmiş ve çimlenme oranının %65 olduğu belirlenmiştir. Polenlerin çimlenme oranı 50 Gy ışın dozu uygulamasında %60, 100 Gy ışın dozu uygulamasında çimlenme oranı %59, 150 Gy ışın dozu uygulamasında %49 ve en yüksek ışın uygulamasında ise çimlenme oranının %28 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Işın dozu ve polen yaşının çimlenme üzerine etkisi

Işın Dozu (Gy)	0. Gün	1. Gün	2. Gün	Ortalama Çimlenme (%)
Kontrol	66.13±3.54	65.19±3.14	65.40±2.30	65.57±2.99
50	63.19±4.22	61.18±4.86	60.09±1.95	61.48±3.67
100	60.78±3.85	60.24±1.18	59.47±2.11	60.16±2.38
150	50.58±1.66	51.25±1.86	49.72±3.05	50.52±2.19
200	50.63±2.01	48.91±1.22	46.78±1.32	48.77±1.52
300	46.94±2.40	43.63±1.18	40.56±3.64	43.71±2.40
450	35.03±1.71	30.92±1.78	28.51±1.74	31.48±1.74

Yapılan analizler sonucunda, *in vitro* çimlendirme oranlarının polen canlılık oranlarına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Rodriguez-Riano ve Dafni (2000), *C. persicum*'da polen canlılık oranına göre *in vitro* çimlenme oranının %5-7 oranında daha düşük olduğunu belirlemiştir. Kermanshahani vd. (2004), *C.*

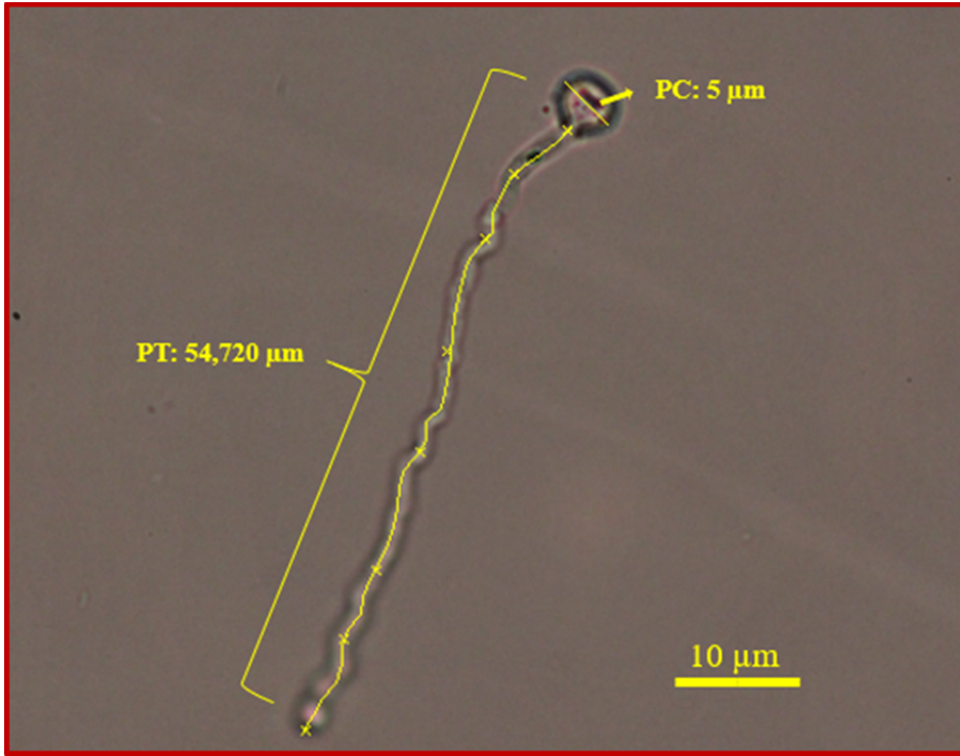
persicum'da *in vitro* çimlendirme testi sonucunda polenlerin çimlenme oranının genotip ve çimlendirme ortam içeriğine bağlı olarak %40-80 oranları arasında olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçlar, çalışmamızın kontrol grubunda yer alan çimlenme oranları ile benzerlik göstermekle birlikte bir miktar düşüktür. Takamura vd. (1996), *C. persicum* türünde ışık ve sıcaklığın polenlerin *in vitro* çimlenmesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada polenlerin çimlenmesi üzerine ışığın etkisinin oldukça düşük olduğu ve artan sıcaklık değerlerinde (30 °C) çimlenmenin daha erken olmasına karşın polen tüpü gelişiminin olumsuz etkilendiği saptanmıştır. Tez çalışmasında ise *in vitro* çimlendirme testinde kullanılan besi ortamı, polen ekiminden sonra 30 °C'de 2 saat boyunca kültüre alınmıştır. Çimlenme oranının literatüre göre çok farklı olmamakla birlikte düşük çıkması, kullanılan bitkisel materyalin genetik yapısı, çimlendirme ortamının kimyasal kompozisyonu veya literatürde belirtildiği üzere 30 °C sıcaklıktan kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, kültür süresinin 2 saat tutulması nedeniyle canlı olsalar bile henüz çimlenmemiş ya da çim borusu çimlenmiş sayılamayacak kadar kısa olan polenlerin varlığı bu oranı düşürmüş olabilir. Çalışmamızın sonuçlarına benzer olarak Cordea ve Triplika (2019), *C. persicum* türüne ait 7 ticari çeşitte yapmış olduğu çalışmada polen çimlendirme oranının çeşitlere göre değişmekle birlikte en düşük %67, en yüksek %87 olarak belirlemiştir. Çalışmada çimlenme oranının polen canlılık oranlarına göre %2-10 arasında daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum polen canlılık ve çimlendirme testlerinde, öncelikle polenlerin temin edildiği bitkinin genetik yapısının polen canlılık ve çimlenme oranlarına etki ettiğini düşündürmektedir. Kontrol grubu dışında bulunan ışınlanmış polenlerin çimlenme oranları, kontrol grubuna benzer şekilde doz arttıkça azalmıştır. 0 günlük polenlerde en yüksek doz uygulamasında, kontrole göre çimlenmede %40'ın üzerinde bir azalma olmasının nedeninin ışın uygulamalarının etkisi olduğu açıkça görülmektedir. 2 günlük polenlerde en yüksek ışın dozu uygulamasında %50'nin de üzerinde olan çimlenme oranındaki bu azalma, polen yaşının da çimlenme kabiliyetini etkilediğini

göstermiştir. Kurtar (2009), kabakta ışınlanmış polen tekniği ile haploid bitki üretimi çalışmasında ışın dozu arttıķa çimlenme oranının azaldığını, 200 ve 300 Gy doz uygulamalarında sadece 0 ve 1 günlük polenlerin imlendiğini, sonraki günlerde polenlerin çimlenme kabiliyetini kaybettiklerini belirlemiştir. Bu sonuçlar artan ışın dozlarında ve yaşlarda polenlerin çimlenme oranının düşmesi bakımından benzerlik göstermekle birlikte çalışmamızda doz ve yaş etkisi daha az olarak bulunmuştur. Bu durum, çalışmalarda kullanılan türlerin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Nitekim, Murovec ve Bohanec (2013), alı maymun çiçeğinde ışınlanmış polen yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında, 600 Gy gama ışın dozunun polenlerin çimlenme oranları üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Diğer taraftan, polen canlılık ve çimlenme oranındaki farklılıkların ışın uygulamaları ile meydana gelen hüresel stresten de kaynaklanabileceği düşünmektedir. Nitekim, farklı dozlarda gama ışına maruz bırakılan elma polenlerinde amilaz, selülaz, rbonkleaz ve asit fosfataz gibi bazı enzimlerde artışa neden olduğu bilinmektedir (Calzoni ve Speranza, 1982).

ışın uygulamalarının çim borusu uzunluğuna etkisini incelemek amacıyla, ışık mikroskobuna entegre edilen fotoğraf makinesi ile imlenen polenlerin fotoğrafı çekilmiş ve bilgisayar programı ile çim borularının uzunluğu belirlenmiştir. im borusu uzunluğu polenin dış çeperi ile tüpün bağlantı noktasından başlayarak tp boyunca orta kısımdan u noktaya kadar takip edilerek belirlenmiştir (şekil 4.2).

ışın uygulamalarının ve polen yaşının çim borusu uzunluğuna etkisini belirlemek amacıyla elde edilen veriler, tesadüf parselleri faktöriyel deneme desenine göre JMP 8.0 (SAS Institute Inc., ABD) paket programında varyans analizi yapılmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizler sonucunda, ışın uygulamaları polen yaşı ve ışın uygulamaları ile polen yaşı interaksiyonunun etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$).

Işın dozunun çim borusu üzerine etkisi incelendiğinde; ışın uygulanmayan kontrol grubunda çim borusu uzunluğu ortalaması 49.60 μm olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna ait örneklerin çim borusu uzunluğunun, diğer uygulamalara göre oldukça kısa olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda uygulamalar, dört gruba ayrılmıştır. 450 ve 300 Gy uygulamaları, en uzun çim borusu uzunluğuna sahip olup "a" grubunda yer almıştır. 100 ve 200 Gy ışın dozu uygulamaları ile 50 ve 150 Gy ışın dozu uygulamaları, kendi aralarında birlikte gruplanmıştır. En uzun çim borusu uzunluğu, 450 Gy ışın dozu uygulamasında ortalama 72.88 μm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.3). Çim borusu uzunluğunun belirlenmesi ile ilgili görsel Şekil 4.2'te verilmiştir.



Şekil 4.2. Çim borusu uzunluğunun belirlenmesi (PC: polen çapı, PT: polen tüpü)

Çizelge 4.3. Işın dozunun çim borusu uzunluğuna etkisi

Işın dozu (Gy)	Uzunluk (µm)	LSD
450	72.88 a	
300	72.12 a	
200	64.18 b	
100	62.19 b	LSD= 4.325*
150	57.77 c	
50	54.58 c	
0	49.60 d	

*p<0.01, Ortalamalar arasındaki farklılıklar harflerle gösterilmiştir.

Polen yaşının çim borusu üzerine etkisi incelendiğinde, istatistiksel analizler sonucunda 0 ve 1 günlük polenlere ait ortalama çim borusu uzunlukları 63 µm ile aynı grupta yer almıştır. 2 günlük polenlerde ise çim borusu uzunlukları daha kısa olup, ortalama 58,40 µm ile “b” grubunda yer almıştır (izelge 4.4).

Çizelge 4.4. Polen yaşının çim borusu üzerine etkisi

Polen yaşı (Gün)	Uzunluk (µm)	LSD
1. Gün	63.66 a	
0. Gün	63.65 a	LSD= 2.831*
2. Gün	58.40 b	

*p<0.05, ortalamalar arasındaki farklılıklar harflerle gösterilmiştir.

Polen yaşı ve ışın dozlarının çim borusu uzunluğuna etkisi, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.01). Işınlanma yapılmayan kontrol grubuna ait polenlerde çim borusu uzunluğunun en kısa olduğu belirlenirken, 300 Gy dozda ışına maruz kalan 0 ve 1 günlük polenlere ait çim borusu uzunluğunun en uzun olduğu belirlenmiştir. 0 Gy’ den 300 Gy doza kadar çim borusu uzunluğu, polen yaşına bağlı olarak ışın doz miktarı arttıkça artmış ve 450 Gy dozda yine yaşa bağlı

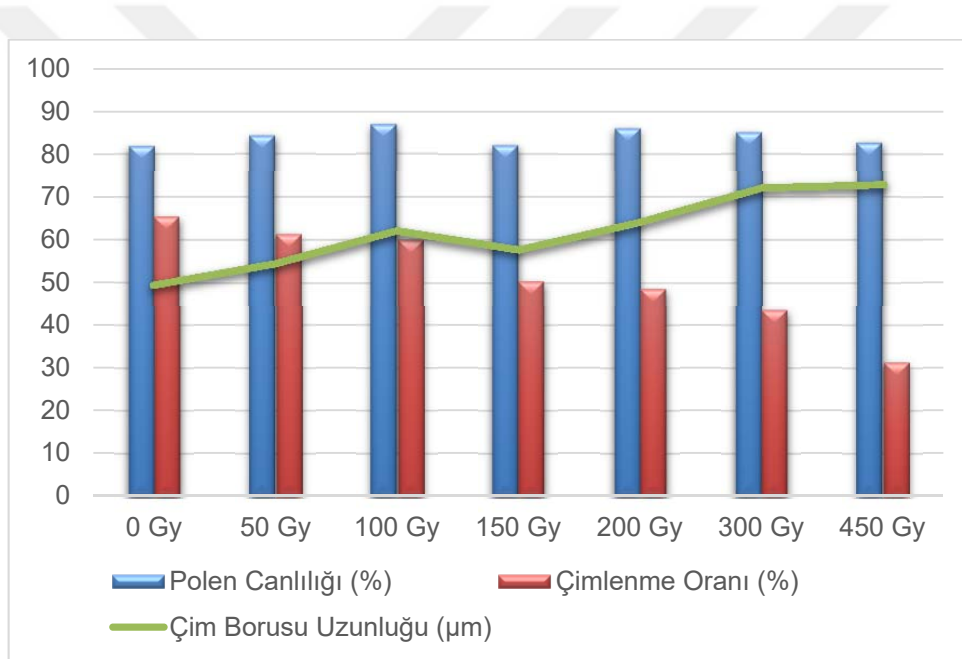
olarak düşüş göstermiştir (izelge 4.5). En uzun çim borusu 79.37 μm ile 300 Gy ışın dozuna maruz bırakılan 0 günlük polenlerde tespit edilmiş ve istatistiki olarak aynı grupta yer alan, 300 Gy ışın dozu uygulanan 1 günlük polenler 78.89 μm çim borusu uzunluğu ise ikinci sırada yer almıştır (izelge 4.5).

Çizelge 4.5. Işın dozu ve polen yaşı interaksiyonunun çim borusu uzunluğuna etkisi

Doz x Yaş yaşı	Uzunluk (μm)	LSD
300-0	79.37 a	
300-1	78.89 a	
450-1	75.57 ab	
450-0	73.34 abc	
450-2	69.73 bcd	
200-1	67.87 cd	
200-0	66.64 cd	
100-1	66.20 cd	
100-0	64.74 de	
150-2	63.53 def	
300-2	58.09 efg	LSD= 7.491*
200-2	58.02 e.h	
150-0	56.19 f-ı	
50-2	55.81 ghı	
100-2	55.62 ghı	
50-0	54.68 g.j	
150-1	53.58 g.j	
50-1	53.25 g.j	
0-0	50.55 hıj	
0-1	50.24 ıj	
0-2	48.02 j	

* $p < 0.01$, ortalamalar arasındaki farklılıklar harflerle gösterilmiştir.

Polenlerin *in vitro* imlenme oranlarında 0 Gy’ den 100 Gy ışın dozuna kadar hafif bir azalma gözlenmiş, 150 Gy’ den 450 Gy’ e kadar olan ışın dozlarında ise polenlerin çimlenme kabiliyetinde azalma, artarak devam etmiştir. im borusu uzunluğundaki değişimler incelendiğinde; artan ışın dozlarına göre çim borusu uzunluğunda 0 Gy’ den 300 Gy ışın dozuna kadar artış gözlenmiş ve 300 Gy ışın dozunda çim borusu uzunluğu en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 450 Gy ışın dozunda ise, çim borusu uzunluk eğrisinin düşüş eğilimine girdiği gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Işın uygulaması yapılmış gün yaşlı polenlerde canlılık, çimlenme oranı ve çim borusu uzunluğunun karşılaştırılması

Çalışmamızda genel olarak, ışın uygulamalarının polen canlılık ve *in vitro* imlenme oranını düşürse de, polen tüpü uzunluğunu arttırdığı görülmektedir. Yiğit (2008), elmada artan dozda lazer ışınları ile polen tüpü uzunluğu arasında pozitif korelasyonun olduğunu bildirmiştir. Livingston ve Stettler (1973), göknarda yaptığı çalışmada polenlere 4, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 kR gamma ışını uyguladıktan

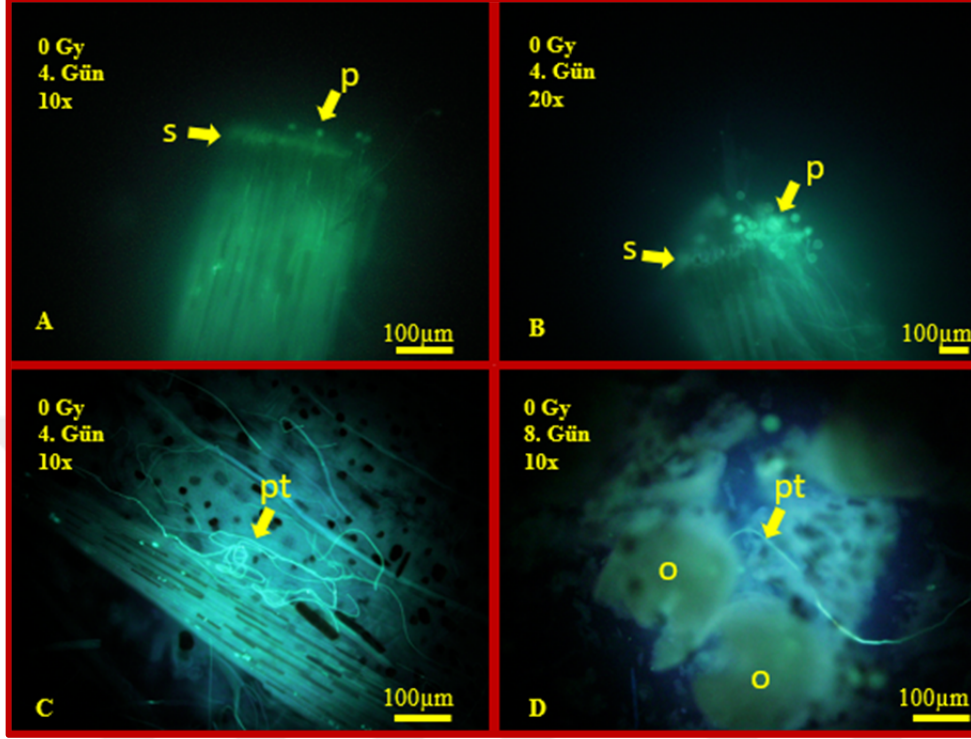
sonra *in vitro* imlenme ve polen tüpü uzunluğunu incelemişlerdir. Çalışmada uygulamalar arasında çimlenme oranında bir değişiklik gözlenmezken, polen tüpü uzunlukları ile ışın dozları arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir. Diğer taraftan Pandey ve Kumar (2013), keten bitkisinde 100, 200, 300, 400 ve 500 Gy dozlarında gama ışınına maruz bırakılmış tohumlardan elde ettiği bitkilerin polenlerinde ışın dozlarının polenlerin çimlenme oranı ile çim borusu uzunluğu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada 300 Gy ışın dozuna kadar polenlerde çimlenme oranlarında artış gözlemlemişlerdir. 400 ve 500 Gy dozlarda ise polen canlılıkları ile çimlenme oranlarında ve polen tüpü uzunluğunda düşüş belirlenmiştir.

Katiyar ve Chauhan (1987), *Pinus patula* bitkisinde gama ışınının polen tüpü ve polen çimlenme oranına etkisini incelemişlerdir. Çalışmada düşük dozlarda ışın uygulaması polen çimlenme oranı ile polen tüpü uzunluğu üzerine pozitif bir uyartım sağlarken, artan ışın dozları polen çimlenme oranını düşürmüş ancak polen tüpü uzamasına etki etmemiştir. Bu durum, ışın uygulamalarının çimlenme kabiliyeti düşük olan polenlerin ölmesine ve normal gelişme gösteren sağlıklı polenlerin ön plana çıkmasından kaynaklanmış olabilir.

4.2. Histolojik Analiz Bulguları

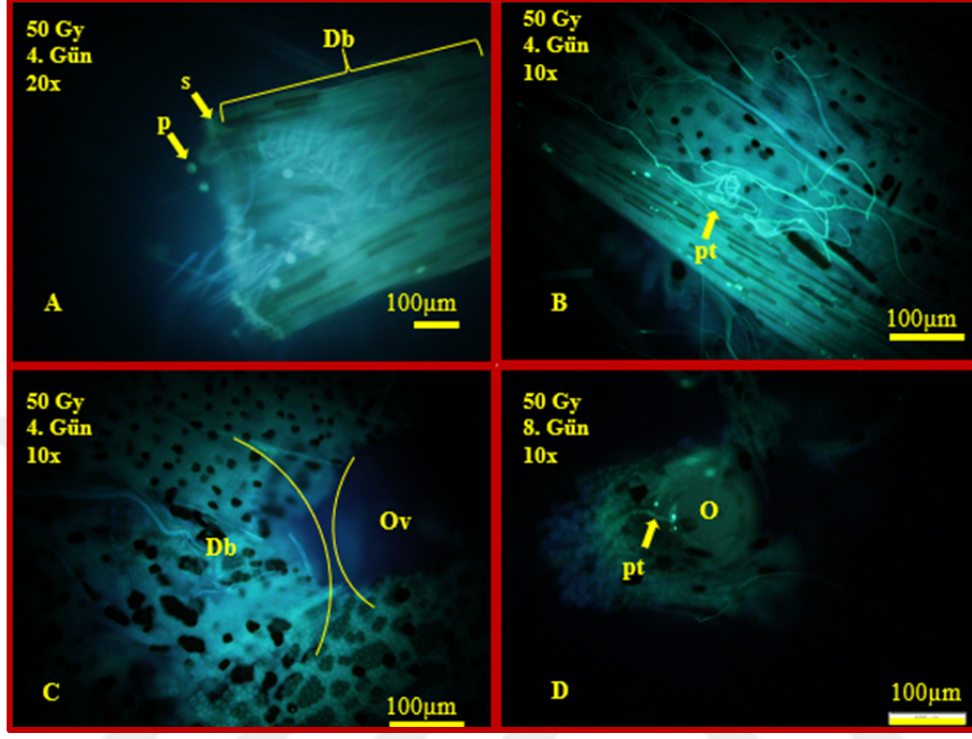
Çalışmanın bu aşamasında, tozlamadan sonra polen tüpü gelişimi ve embriyo oluşum zamanı belirlenmiştir.

Farklı ışın dozları ile ışın uygulaması yapılan polenlerle tozlamadan sonra 10. güne kadar olan dönemde polenlerin stigma üzerinde çimlenmesi ve dişicik borusu içerisinde uzayarak gelişimi, anilin mavisi boyamadan sonra yapılan ezme preperat görüntülerinin floresan mikroskopta (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) incelenmesiyle gözlenmiştir. Yapılan alışma sonucunda, ışın uygulaması yapılmayan polenler stigma üzerinde ilk günden itibaren çimlenmeye başlamış ve tozlamadan 8 gün sonra yumurtalığa ulaşarak ovüle giriş yaptığı tespit edilmiştir (şekil 4.4).



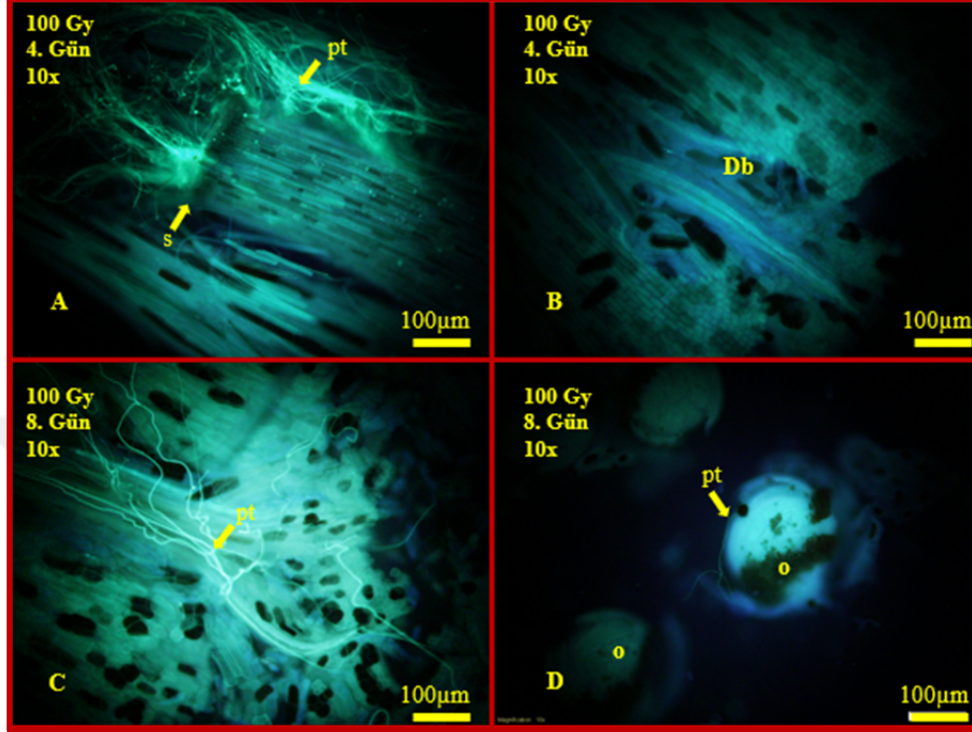
Şekil 4.4. A-B: Işın uygulaması yapılmayan polenlerin stigma üzerinde çimlenmesi, C: polen tüpü uzaması, D: polen tüpünün ovüle ulaşması (s: stigma, o: ovül, p: polen, pt: polen tüpü)

50 Gy ışın uygulaması yapılan polenlerle tozlama sonrasında alınan örneklerde, polenlerin stigma üzerinde çimlenmesi kontrol grubuna benzerlik göstermiştir. Tozlamadan 1-2 gün sonra çimlenmeye başlayan polen taneleri, çim borusu oluşturmuş ve 4. gün sonunda dişicik borusu içerisinde uzayarak gelişmiştir. Ancak, 4. günde henüz ovaryuma ulaşamadığı gözlenmiştir. Tozlamadan 8. gün sonra çim borusunun yumurtalığa girdiği ve ovllere ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 50 Gy dozda ışınlanan polenlerin A: stigma üzerinde çimlenmesi, B: dişicik borusunda çim borusunun görünüşü, C: dişicik borusu ve ovaryum birleşme kısmı D: çim borusunun ovüle girişi (s: stigma, p: polen, pt: polen tüpü, Db: dişicik borusu, o: ovül, Ov: ovaryum)

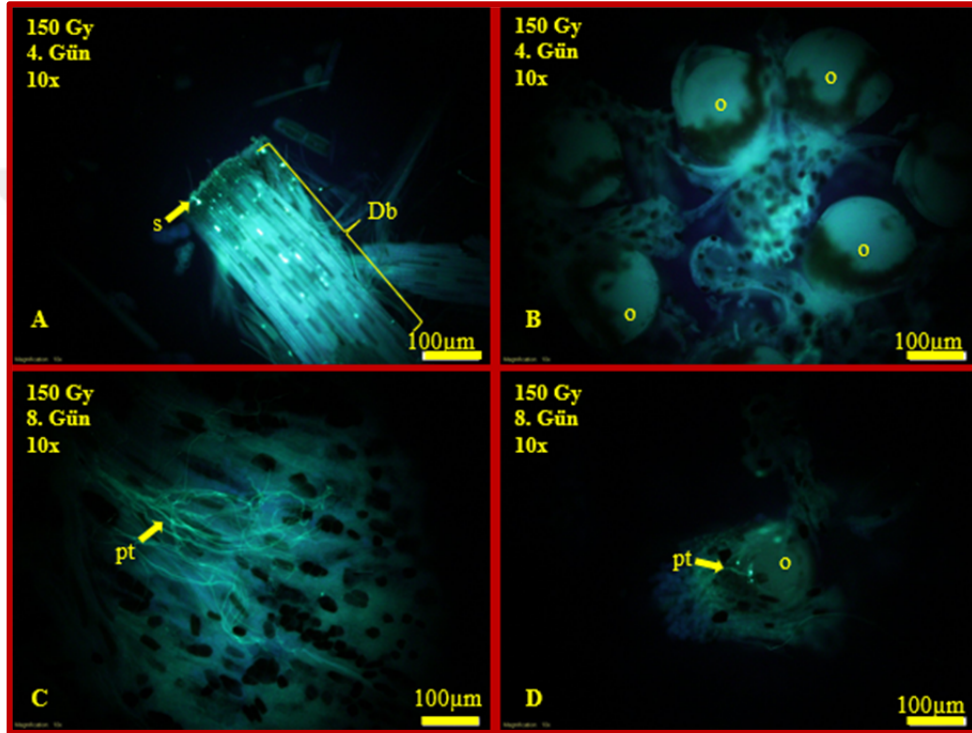
100 Gy ışın uygulaması yapılan çiçek tozları ile tozlama sonrasında toplanan çiçek tomurcuklarında yapılan analizler sonucunda, polenlerin stigma üzerinde çimlenme bulguları daha düşük doz uygulamalarıyla benzerlik göstermiştir. Tozlama sonrası, dişicik tepesi üzerinde çimlenen polen taneleri çim borusunu oluşturmuştur. Dişicik borusu içerisinde uzayan çim borularının 4. gün sonunda yumurtalığa doğru ilerlediği ancak henüz ulaşamadığı gözlenmiştir. Tozlamadan 8 gün sonra, çim borularının ovaryum ve dişicik borusunun birleştiği noktadan geçerek yumurtalığa giriş yaptığı görülmüştür. Tozlamadan 8 gün sonra, toplanan çiçek tomurcuklarında çim borularının ovüle giriş yaptığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 100 Gy dozda ışınlanan polenlerin A: stigma üzerinde çimlenmesi, B: tozlamadan 4 gün sonra dişicik borusu yumurtalık birleşme bölgesi, C: polen tüpünün yumurtalığa girişi, D: polen tüpünün ovüle girişi (s: stigma, pt: polen tüpü, Db: dişicik borusu, o: ovül)

150 Gy ışın dozuna maruz bırakılan polenlerle yapılan tozlama sonrasında alınan örneklerde, polen tanelerinin daha düşük doz uygulamalarındaki ile benzer şekilde çimlendiği gözlenmiştir. Polen taneleri çimlenerek polen tüpünü oluşturmuş, tozlamadan 4 gün sonra ovaryuma giriş yaptığı gözlenmemiştir. Polen tüpleri tozlamadan 8 gün sonra, yumurtalık ve dişicik borusunun birleşim noktasını geçerek ovaryuma giriş yapmış ve yine aynı gün alınan örneklerde polen tüplerinin uzayarak ovüle giriş yaptığı belirlenmiştir (Şekil 4.7). Işın uygulaması yapılmayanlarla 50, 100 ve 150 Gy ışın uygulamaları yapılan polenlerle tozlama sonrasında; polenlerin çimlenmesi, polen tüpünün uzaması ve yumurtalığa giriş yapması tozlamadan sonra ilk hafta içerisinde gerçekleşmiştir. Yapılan analiz ve

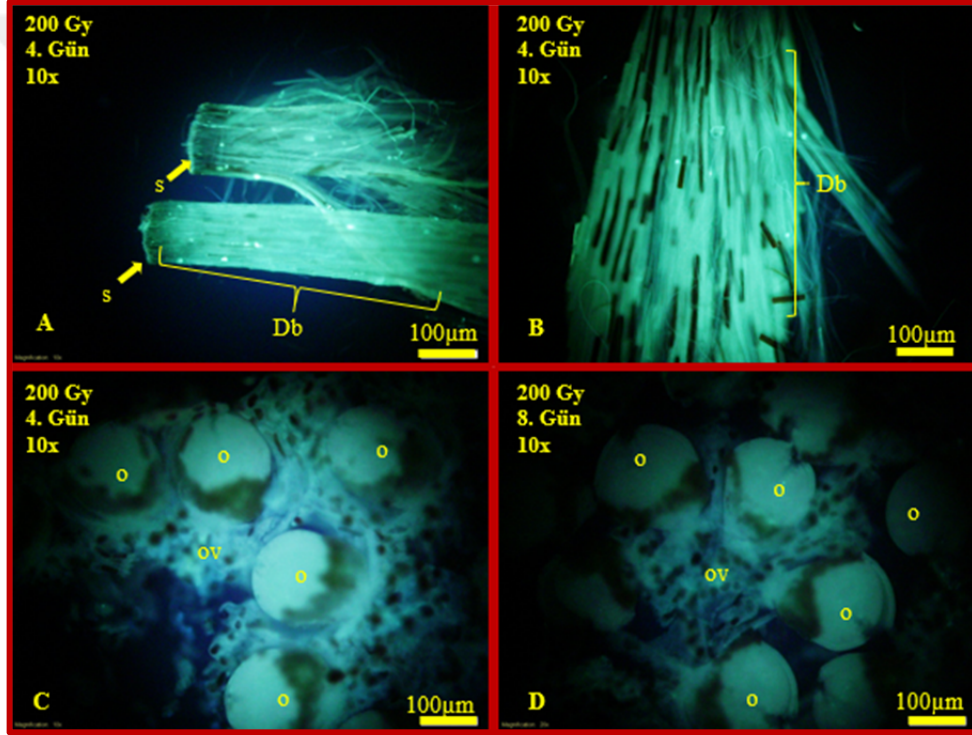
gözlemlerde polenler imlense bile, tozlamadan sonra 4. güne kadar polen tüpünün yumurtalığa giriş yaptığı gözlenmemiştir. 150 Gy doza kadar yapılan ışın uygulamaları yapılan polenlerle tozlamadan 8 gün sonra alınan örneklerde ise, polen tüpünün ovüle giriş yaptığı gözlenmiştir.



şekil 4.7. A-B: 150 Gy Işın uygulaması yapılan polenlerin stigma üzerinde imlenmesi, C: polen tüpü uzaması, D: polen tüpünün ovüle ulaşması (s: stigma, pt: polen tüpü, Db: dişicik borusu, o: ovül, ov: ovaryum)

200 Gy doz ile ışınlanan polenlerle tozlama sonrasında alınan örneklerde yapılan incelemeler sonucunda, daha düşük dozlara oranla polenlerin dişicik tepesi üzerinde çimlenme oranının düştüğü gözlenmiştir. Kontrol grubu ve 200 Gy dozdan daha düşük uygulamalara ait örneklerde gözlendiği üzere tozlamadan 4 gün sonra dişicik borusuna veya dişicik borusu ile yumurtalığın birleştiği bölgeye henüz çim borularının ulaşmadığı gözlenmiştir. Bu durum, daha düşük dozlar ile

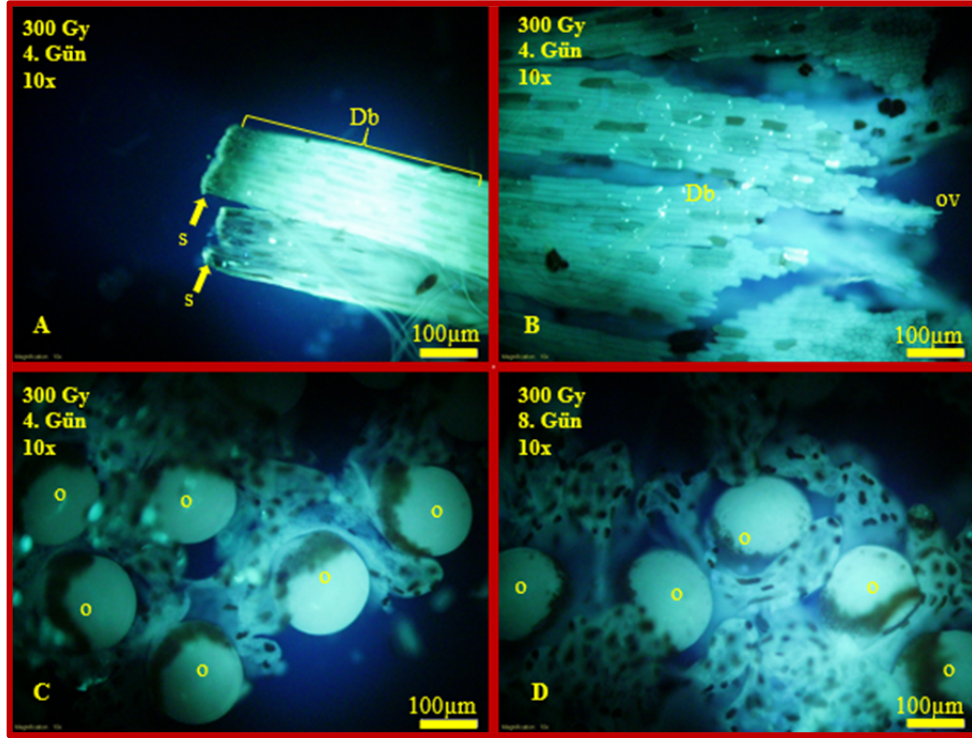
benzerlik göstermiştir. Tozlamadan 4 gün sonra, yine beklenildiği üzere ovaryum incelemelerinde polen tüpünün henüz yumurtalığa ulaşmadığı tespit edilmiştir. Ancak tozlamadan 8 gün sonra, daha düşük doz uygulamalarından elde edilen sonuçların aksine polen tüplerinin yumurtalığa ulaşmadığı belirlenmiştir (şekil 4.8). Çimlenen ve çim borusu oluşturan polenlerin, bir miktar uzadıktan sonra dişicik borusu içerisinde tutuklu kaldığı ve aslında döllenmenin gerçekleşmediği tespit edilmiştir.



şekil 4.8. A: 200 Gy ışın uygulaması yapılan polenlerin stigma üzerinde imlenmesi, B: dişicik borusunun görünümü, C: tozlamadan 4 gün sonra yumurtalığın görünümü, D: tozlamadan 8 gün sonra yumurtalığın görünümü (s: stigma, Db: dişicik borusu, o: ovül, ov: ovaryum)

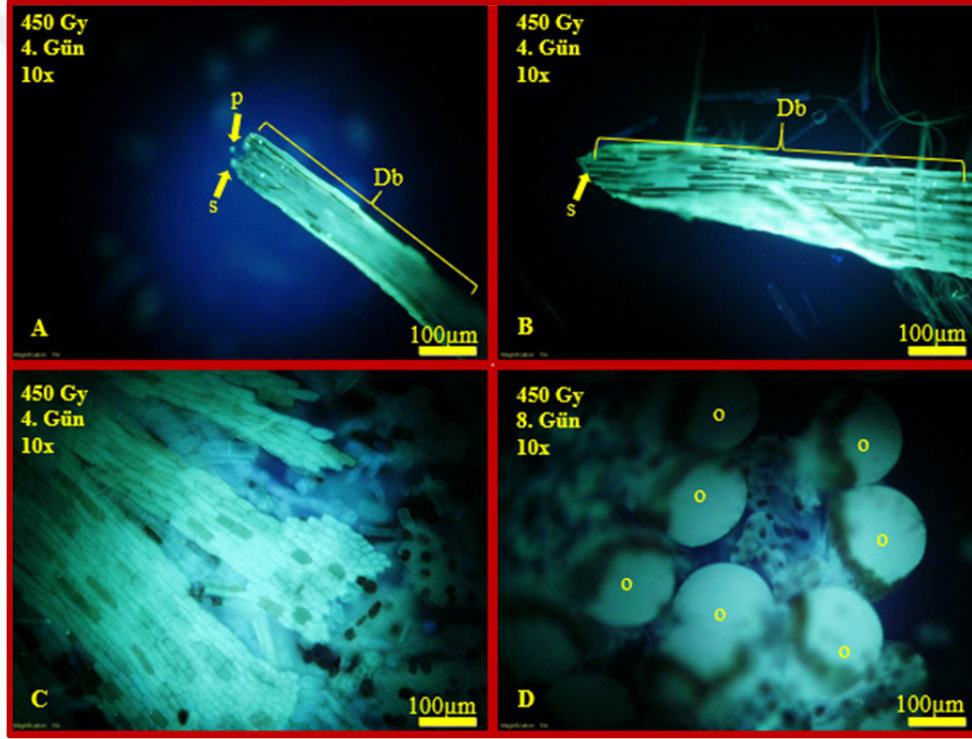
300 Gy ışın dozuna maruz bırakılan polenlerle tozlama sonrası alınan örneklere yapılan incelemelerde; 200 Gy ışın dozu sonuçlarına benzer şekilde

dişicik tepesinde imlenen polen sayısının kontrole ve 50, 100 ve 150 Gy ışın dozu uygulamalarına oranla azaldığı, floresan mikroskopta yapılan gözlemler ile tespit edilmiştir. Tozlamadan 4 gün sonra beklenildiği gibi, imlenen polenlerin oluşturduğu polen tüplerinin henüz dişicik borusu sonu ile yumurtalık bölgesine ulaşmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, tozlamadan 4 gün sonra alınan örneklerde yumurtalığa ulaşan polen tüpüne rastlanılmamıştır. Işınlanmış polenlerle tozlamadan 8 gün sonra alınan örneklerde de, 200 Gy ışın uygulanan polenlerle tozlama sonrasında elde edilen sonuçlara benzer şekilde yumurtalığa ulaşan polen tüpü belirlenmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. A: 300 Gy ışın uygulaması yapılan polenlerin stigma üzerinde imlenmesi, B: dişicik borusunun görünümü, C: tozlamadan 4 gün sonra yumurtalığın görünümü, D: tozlamadan 8 gün sonra yumurtalığın görünümü (s: stigma, p: polen, Db: dişicik borusu, o: ovül, ov: ovaryum)

450 Gy ışın dozu uygulaması yapılan polenlerle tozlama sonrasında; 200 ve 300 Gy ışın uygulamalarına benzer olarak, polen tanelerinin kontrol ile 50, 100 ve 150 Gy ışın uygulamalarına oranla çimlenme kabiliyetlerinin azaldığı gözlenmiştir. Tozlamadan 4 gün sonra alınan örneklerde beklenildiği üzere; dişicik borusu sonu ile yumurtalığın birleşim bölgesine veya yumurtalık içerisine ulaşan polen tüpü tespit edilmemiştir. Tozlamadan 8 gün sonra alınan örneklerde, yine ovüllere ulaşan polen tüpü gözlenmemiştir (Şekil 4.10).



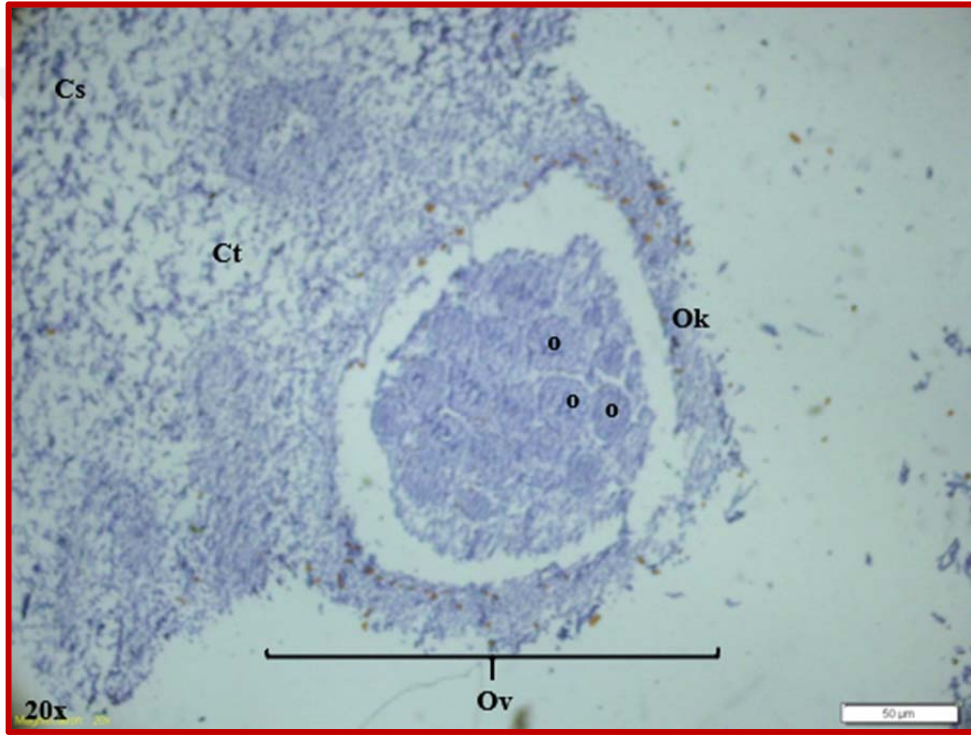
Şekil 4.10. A: 450 Gy ışın uygulaması yapılan polenlerin stigma üzerinde çimlenmesi, B: dişicik borusunun görünümü, C: dişicik borusu sonu ve yumurtalığın birleştiği bölgenin görünümü, D: tozlamadan 8 gün sonra yumurtalıkta ovüller (s: stigma, p: polen, Db: dişicik borusu, o: ovül)

Yapılan histolojik analizler sonucunda; ışın dozları uygulamasına göre değişmekle birlikte, stigma üzerine ulaşan polenlerin ilk iki gün içerisinde

imlendiği ve polen tüpü oluşturduğu gözlenmektedir. Kontrol grubunda, polen tüpünün tozlanmadan sonra 5-7 gün sonra ovaryuma ulaştığı ve ovüle giriş yaptığı gözlenmiştir. Işın dozu uygulamalarında ise; imlenen polenlerin yumurtalığa ulaşma sürelerinde bir değişiklik olmamakla birlikte, döllenmenin ilk hafta içerisinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Ancak, artan dozlarda imlenen polen sayısındaki düşüş veya polen tüpünün çimlendikten sonra dişicik borusu içerisinde tutuklu kalması nedeniyle, yumurtalığa ulaşan polen tüpü sayısının azaldığı ya da hiç ulaşmadığı gözlenmiştir. Ewald (1996), *C. persicum* 'Reinweiş' ve *C. purpurascens* türleri arasında melezlemeler yapmış ve daha sonra histolojik analizlerle polenlerde çimlenme, polen tüpü oluşumu ve döllenmeyi incelemiştir. Yapılan çalışmada polenlerin bazılarının stigma üzerinde imlendiğini, bazılarının ise çimlendikten sonra polen tüpü oluşturduğu ve polen tüpünün yumurtalığa doğru uzadığı tespit edilmiştir. Tozlamadan sonra 5. günde, polen tüpünün yumurtalığa giriş yapmaya başladığı ve tozlamadan sonra 9. güne kadar yumurtalığa ulaşan polen tüpü sayısının giderek arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızın sonuçları ile kısmen benzer olup, polen tüplerinin yumurtalığa ulaşması, tozlanmadan sonraki ilk haftada gerçekleşmiştir. Ancak alışmamızda yumurtalığa ulaşan polen tüpü sayısı artan işın dozu uygulamalarına bağlı olarak azalmıştır. Bu azalmanın, işın uygulamalarının zararlı etkilerinden kaynaklanabileceği dşnlmektedir. Diğer taraftan çalışılan türün genetik yapısı, ovaryuma ulaşan polen tüpü sayısı ve polen tüpü gelişimini etkilemiş olabilir. Yapılan çalışmalarda, polen ve pistil arasındaki etkileşimin genetik olarak kontrol edildiği bildirilmektedir (Alves vd., 2019).

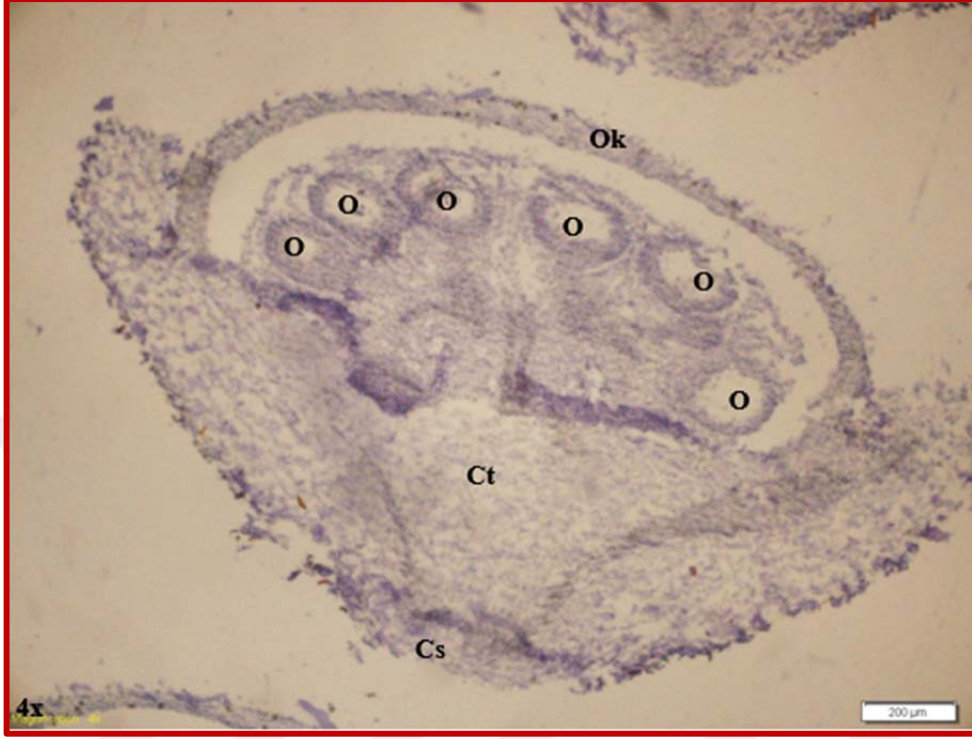
Histolojik analizlerin son aşamasında, embriyo oluşum zamanının belirlenmesi amacıyla tozlamadan 10. günden sonra 20, 30, ve 40. günde 3'er iek tomurcuğu alınmıştır. iek tomurcukları parafin bloklara alındıktan sonra mikrotomla kesit alınmış ve boyama işlemlerinin ardından daimi preparatlar hazırlanmıştır. Daimi preperatlar mikroskop altında incelenerek embriyonun hangi günde oluştuğu gözlenmiştir. Yapılan histolojik analizlerde; ovaryumda bulunan,

uyartımı sağlanan veya normal şekilde döllenen tohum taslaklarının tozlamadan hemen sonra gelişmeye başladığı ve tohumlar olgunlaşıncaya kadar bu gelişmenin devam ettiği görülmektedir. Ancak; uyartım almayan veya dllenmeyen ovüllerin gelişmeleri, sınırlı olmakta ve ovüller belirgin derecede küçük kalmaktadır. Henüz tozlama işlemi yapılmamış çiçeklerden alınan örneklerde ovaryum görüntüsü, Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.11. Tozlanmamış çiçekte ovaryum görünümü (Ov: ovaryum, Ok: ovaryum kılıfı, O: ovül, Ct: çiçek tablası, Cs: çiçek sapı)

Tozlamadan sonra 10. günde alınan çiçek tomurcuklarına ait kesitlerde, ovaryumun hacimce büyüdüğü ve ovllerde benzer olarak hacimsel bir artışın meydana geldiği gözlenmektedir. Ovllerdeki hacimsel artışın bu aşamada homojen olduğu görülmektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Tozlamadan 10 gün sonra ovaryumun genel görünümü (Ok: ovaryum kılıfı, O: ovül, Ct: iek tablası, Cs: iek sapı)

Tozlamadan sonra 20. günde alınan iek tomurcuğu örneklerine ait kesitler incelendiğinde, 10. günde ovaryumda ve ovlde gözlenen hacimsel artışın devam ettiği gözlenmiştir. 20. gün örneklerinde ise, büyümenin devam ettiği ancak bazı ovüllerin diğerlerine oranla hacim olarak daha kk olduğu dikkati çekmektedir. Diğer taraftan, ovüllerin şişmesi boyuna kesitte daha fazla ovülün görülmesine yol açmıştır. iek tomurcuklarında gözlenen hacimsel artış, sadece ovaryum ve ovllerle sınırlı olmayıp tozlamadan sonra 20. günde iek tablasının da genişlemeye başladığı, görsel olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13).



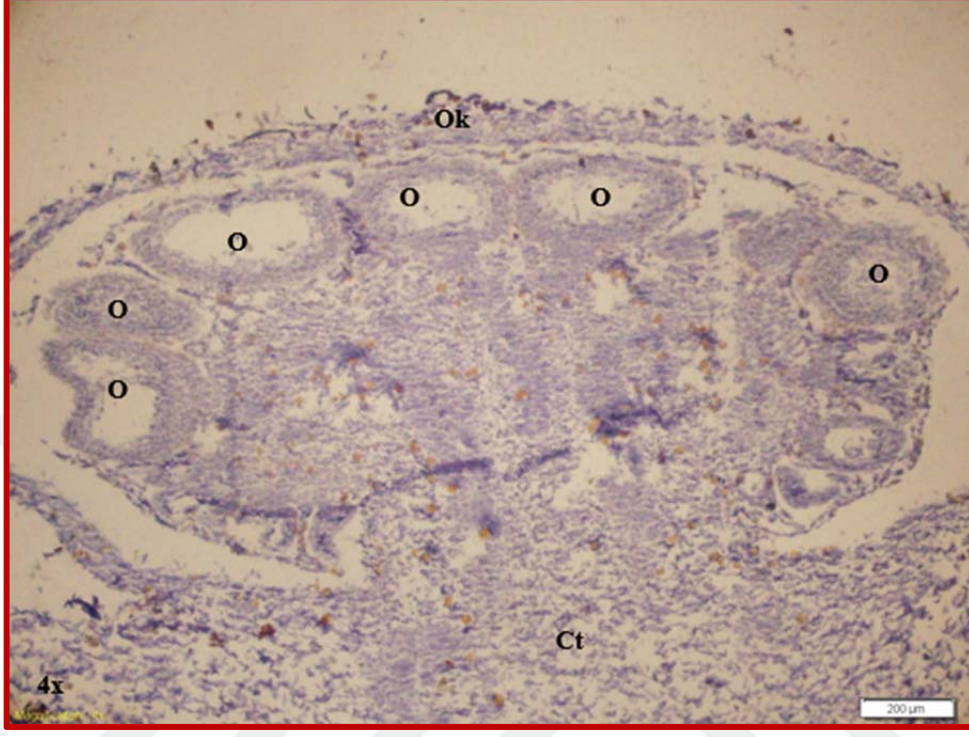
Şekil 4.13. Tozlamadan 20 gün sonra ovaryumun genel görünümü (Db: dışıcık borusu, Ok: ovaryum kılıfı, O: ovül, Ct: iek tablası, Cs: iek sapı)

Tozlamadan 30 gün sonra alınan örneklerde, artık hacimsel artıştan ziyade, ovüllerin homojen olarak büyümeye devam etmediği ve bazı ovüllerin diğerlerinden şekilsel olarak farkedilir derecede ayrıldığı grlmştir (Şekil 4.14).

Tozlamadan sonraki 40. günde de, tozlamadan 30 gün sonra alınan örneklerle benzer olarak ovüllerin gelişiminin devam ettiği gözlenmiştir. Ancak homojen bir büyümenin söz konusu olmayıp görsel olarak birbirinden farklı büyüklükte ovllere rastlanılmıştır (Şekil 4.15). Ovüllerin gelişimindeki bu farklılık, tüm ovüllerin aynı anda dllenmemesi veya histolojik analizler sırasında fiksasyon solüsyonunun tüm ovllere ulaşmamasından kaynaklanmış olabilir.



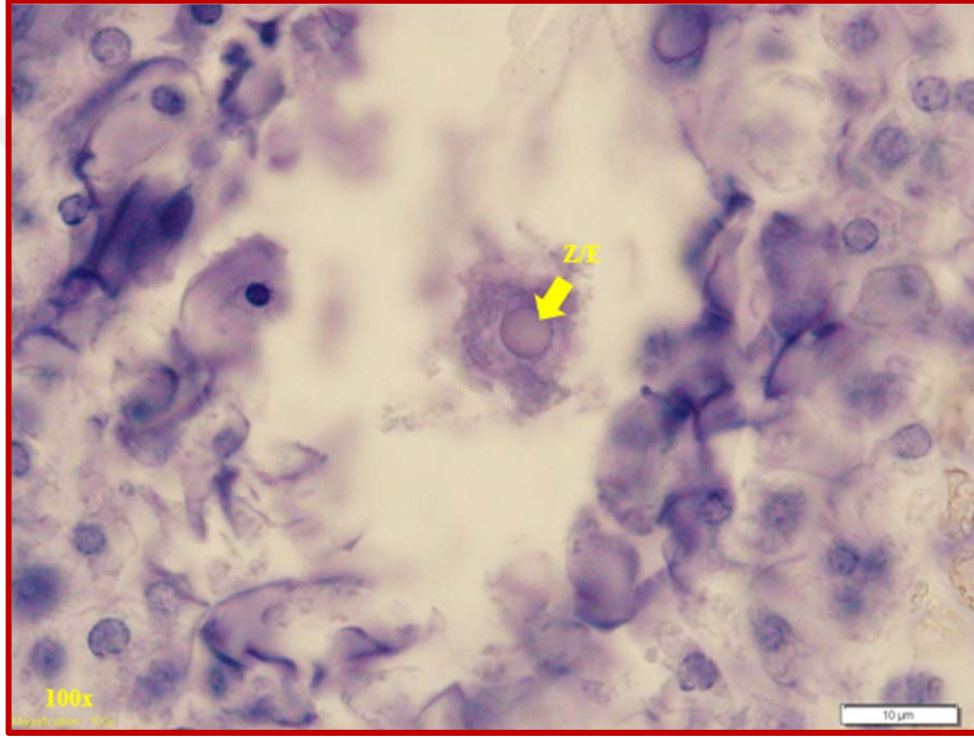
Şekil 4.14. Tozlamadan 30 gün sonra ovaryumun genel görünümü (Ok: ovaryum kılıfı, O: ovül, Ct: iek tablası)



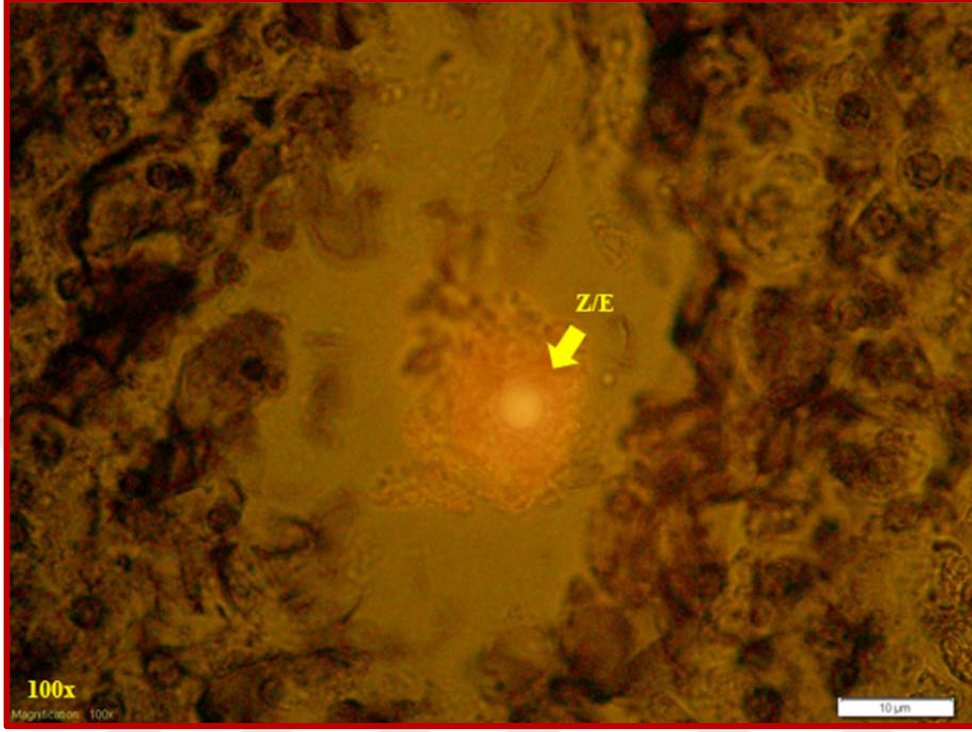
Şekil 4.15. Tozlamadan 40 gün sonra ovaryumun genel görünümü (Ok: ovaryum kılıfı, O: ovül, Ct: iek tablası)

Histolojik çalışmalarda embriyo oluşunun meydana geldiği zamanı belirlemek için, 100x objektifte ışık ve floresan mikroskopta incelemeler yapılmıştır. Gelişim aşamaları incelendiğinde, tohum taslakları içerisinde 20. günde etrafını maternal dokuların çevrelediği küresel zigot/embriyo oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.16). Aynı görüntü floresan mikroskopta incelenmiş ve gözlenen yapının embriyo/zigot olduğuna emin olunmuştur (Şekil 4.17). Bu durum, muhtemelen siklamen tohumlarında embriyo gelişiminin tozlamadan 20 gün sonra gerçekleştiğini düşündürmektedir. Nitekim Ishizaka (1996), kendilenmiş *C. persicum* iek tomurcuklarında 35 ve 42. günlerde benzer şekillerde tohum taslağı içerisinde küresel görünüme sahip olan ve diğer hücrelerden ayrılan yapıyı, endosperm dokusu tamamlanmış embriyo olarak tanımlamıştır. Ishizaka (2008), *C. persicum* ve *C. hederifolium* arasında yaptığı mezozlemeler sonucunda embriyo

oluşumunun tozlamadan sonra 21. günde oluştuğunu, tozlamadan 35 gün sonra ise embriyoların dejenere olduğunu bildirmiştir. Winkelmann vd. (2015), *C. persicum* türünde tozlamadan 11 hafta sonra hasat ettikleri meyvelerden tohumları çıkartıp mikroskopta incelediklerinde, 11 hafta sonra endosperm, testa ve torpedo aşamasındaki embrioyu gözlemlemişlerdir.



Şekil 4.16. Tozlamadan 20 gün sonra ışık mikroskobunda embriyo görünümü (Z/E: Zigot/Embriyo)



Şekil 4.17. Tozlamadan 20 gün sonra floresan mikroskopunda embriyo görünümü (Z/E: Zigot/Embriyo)

Yapılan histolojik analizler sonucunda, literatür bilgileri de göz önünde bulundurulduğunda; siklamende tozlamadan 20 gün sonra embriyo gelişiminin başladığı dşnlmektedir. Literatür bilgileri ışığında herhangi bir uyuramazlık durumu gibi bir engel olmadığında, embriyo gelişiminin tozlamadan 77 gün sonraya kadar devam ederek embriyo aşamalarını sağlıklı biçimde tamamladığı görülmektedir. Ancak, türler arası melezleme veya partenokarpik uyartım gibi embriyonun ilerleyen dönemlerde dejenere olduğu ve sağlıklı bir tohumun oluşmadığı durumlarda, embriyo kurtarma gerekmektedir. nceki alışmalar göz önünde bulundurulduğunda embriyo kurtarmanın tozlamadan sonra 35. güne kadar yapılmasının uygun olduğu dşnlmektedir. Ishizaka ve Uematsu (1995), *C. persicum* ve *C. purpurascens* arasında yaptıkları melezleme çalışmalarında, tozlamadan sonraki 28. günde ovüller içerisinde pro-embriyoların oluşmaya

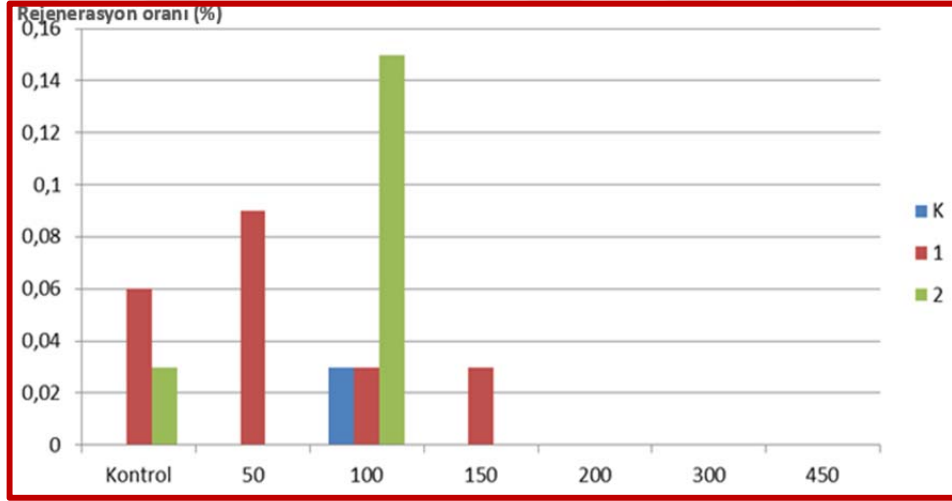
başladığını ve tozlamadan 35 gün sonra ise embriyolar gelişimine devam etmekle birlikte, abortif embriyoların da meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, çalışmamızın histolojik analiz bulguları ile kısmen benzerlik göstermekle birlikte; ortaya çıkan gelişimsel farklılıkların, kullanılan yöntem ve bitkisel materyalin genetik yapısı ile yakından ilişkili olduğu düşünölmektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, ışınlanmış polenlerle tozlamadan 30 gün sonra ovül kültürünün yapılmasının uygun olduğu belirlenmiştir.

4.3. Doku Kültürü alışmaları ile İlgili Bulgular

Embriyo kurtarma amacıyla yapılan ovül kültürü denemeleri kapsamında iki deneme gerçekleştirilmiştir. Birinci denemede, ilk olarak yüzey sterilizasyonu amacıyla meyveler doz gruplarına göre ayrılmıştır. Gruplandırılan meyve örnekleri falcon tp içerisine koyularak akan eşme suyu altında 20 dk bırakılmış ve tozlarından arındırılmıştır. Bekleme işleminden sonra örnekler 3-5 defa saf su ile durulanmış ve steril kabin içerisine transfer edilmiştir. Kabin içerisinde steril behere aktarılan örnekler önce %70'lik etil alkolde 1 dk bekletildikten sonra, içerisinde 1-2 damla Tween-20 içeren %30'luk ticari sodyum hipokloritte (Domestos) 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra örnekler kpklerinden uzaklaşıncaya kadar steril saf su ile durulanmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan meyve örneklerinde ovüllerin izolasyonu gerçekleştirilerek kontrol ($\frac{1}{2}$ MS); $\frac{1}{2}$ MS + 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 0.8 mgL⁻¹ 2iP ve $\frac{1}{2}$ MS + 0.4 mgL⁻¹ BA + 0.4 mgL⁻¹ GA₃ içeren besi ortamlarında kültüre alınmıştır.

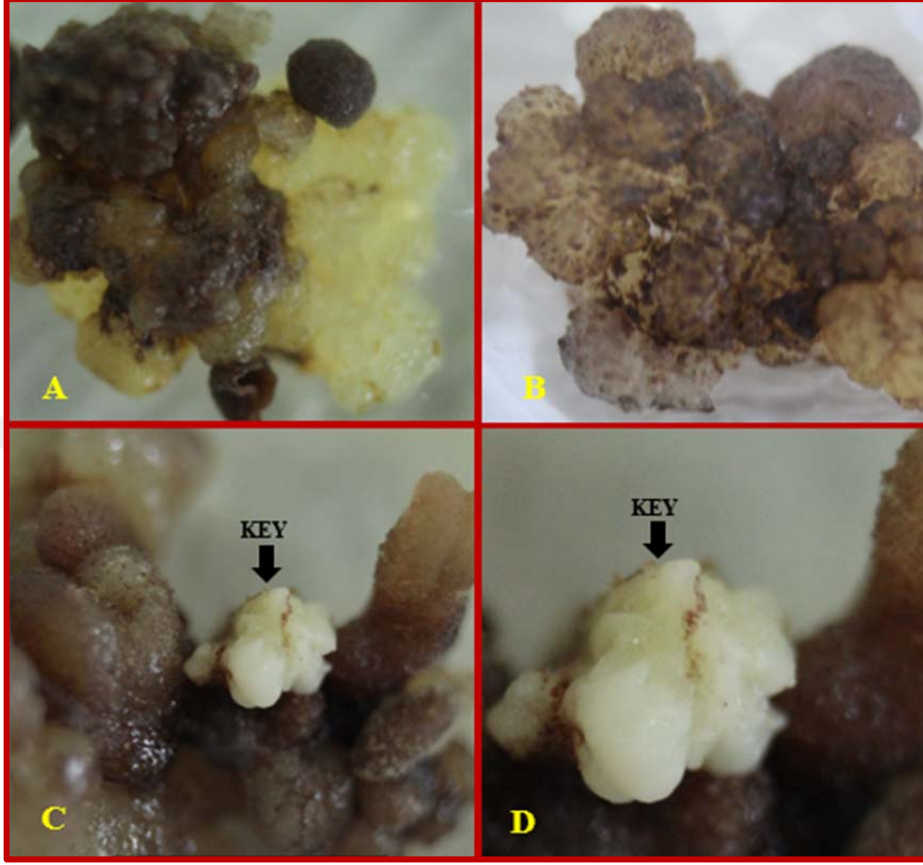
Kültüre alınan embriyoların 4 hafta sonra gözlemleri alınmıştır. Yapılan gözlemlerde kültür ortamlarının birçoğunda fungal bulaşıklık gözlenmiştir. Bazı eksplantlardan, düşük oranda düşük oranda kallus rejenerasyonu gerçekleşmiştir. Elde edilen kalluslar morfolojik olarak incelendiğinde, kallus yapılarının kahverengimsi ve kırılğan bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Schwenkel ve Winkelmann (1998), siklamende ovül kültüründe sarımsı veya kahverenginde yumuşak veya kırılğan kallusların rejenerasyonu olduğunu bildirmiştir. Savona vd.

(2007), *C. persicum* cv. 'Halios' eşidinde yapmış olduğu çalışmalarında ovül kültüründen sarımsı kahverenginde, yumuşak ve kırılđan kallusların geliştiğini bildirmiştir. Çalışmamızda ovül eksplantlarından gelişen kallus yapıları morfolojik olarak önceki çalışmalarda elde edilen kallus yapılarına benzer olduğu görülmektedir. Birinci denemede eksplantlardan en iyi kallus gelişimi, 100 Gy ışın uygulaması grubunda 2 numaralı ½ MS + 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D + 0.8 mgL⁻¹ 2iP besi ortamında gözlenmiştir. 200, 300 ve 450 Gy ışın dozu uygulamalarında hiçbir ortamda gelişme gözlenmemiştir. Kallus gelişim oranları Şekil 4.18'da verilmiştir.



Şekil 4.18. Birinci denemede ovül kültüründe kallus rejenerasyonu

Kültürün ilerleyen dönemlerinde 50 Gy ışın dozu uygulamasına ait 0.4 mgL⁻¹ BAP ve 0.4 mgL⁻¹ GA₃ içeren besi ortamında embriyoların kaynaşmasıyla oluşmuş bir yapı elde edilmiştir. Ancak elde edilen kallus ve embriyoya benzer yapıların, kültüre alınan ovüllerin plasenta kalıntılarında ya da ovül zarında geliştiği dşnlmektedir (Şekil 4.19). Diğer taraftan ilerleyen süreçte, ortamda gözlenen kontaminasyon tüm petrielerde gözlenmiş ve petrieler atılmak zorunda kalınmıştır (Şekil 4.19). Bu nedenle birinci deneme erken sonuçlandırılmıştır.



Şekil 4.19. Kültüre alınan eksplantlarda kallus gelişimi (A: 100 Gy + 1 no'lu ortam, B: 50 Gy + 1 no'lu ortam C, D: 50 Gy + 1 no'lu ortamda KEY (kaynaşmış embriyojenik yapılar))

Birinci denemede ortaya çıkan kontaminasyon nedeniyle sterilizasyon protokolünde değişikliğe gidilmiştir. Hasat edilen meyve örnekleri, ilk protokole benzer şekilde öncelikle yüzey sterilizasyonu amacıyla akan çeşme suyu altında 20 dk bırakılarak yüzey kirlerinden arındırılmıştır. Sonraki aşamada eksplantlar, birinci denemedeki sterilizasyon işleminden farklı olarak %0.1'lik HgCl₂ (civa klorür) içerisinde 25 dakika süre ile bekletilmiştir. Örneklerin %30'luk ticari sodyum hipokloritte (Domestos) bekleme süresi 15 dk'dan 20 dk'ya çıkartılmıştır. Daha sonra örnekler genel sterilizasyon işlemlerine benzer şekilde köpklerinden

uzaklaşmıca kadar steril saf su ile durulanmıştır. Sterilizasyon işlemi tamamlanan meyvelerden ovüllerin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve besi ortamlarında kùltùre alınmıştır. Ancak ikinci denemede ilk denemeden farklı olarak bir besi ortamı (0.5 mgL⁻¹ Kinetin içeren ½ MS) daha kullanılmış ve toplamda kontrol grubu dahil 4 farklı besi ortamında ovüller kùltùre alınmıştır. Kùltùre alınan ovüller 8 hafta boyunca karanlıkta bekletilmiş ve 8 hafta sonrasında bùyùtme odası koşullarında (16 saat fotoperiyodisite, 25±1 °C'de) kùltùre alınmıştır. Bùyùtme odasına aktarılan òrneklere kùltùr boyunca 4-5 hafta aralıklarla alt kùltùr işlemleri yapılmıştır.

Elde edilen veriler ile yapılan istatistik analizler sonucunda ışın dozu, besi ortamı ve ışın dozu-besi ortamı interaksiyonunun kallus gelişimi ùzerine etkisi istatistiki olarak ònemli bulunmuştur (p<0,05). Kallus rejenerasyonu %0.75-6.75 oranlarında 50, 100 ve 150 Gy ışın dozu grubundan elde edilmiştir. Kontrol, 0, 200, 300 ve 450 Gy grubunda kallus gelişimi gerçekleşmemiştir (izelge 4.6).

Çizelge 4.6. ışın dozlarının kallus gelişimi ùzerine etkisi

ışın Dozu (Gy)	Kallus (%)	
50	6.75 (9.48) a	
100	1.50 (2.50) b	
150	0.75 (1.12) bc	
0	0.0 (0.0) c	LSD=1.583*
200	0.0 (0.0) c	
300	0.0 (0.0) c	
450	0.0 (0.0) c	

Aı transformasyonu yapılmış değerler parantez içerisinde verilmiştir. *p<0.05

Besi ortamlarının rejenerasyona etkisi incelendiğinde, kallus rejenerasyon oranı %0.57-3.00 arasında farklılık göstermiş ve istatistiki açıdan ònemli bulunmuştur. En yùksek kallus rejenerasyonu 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D ve 0.8 mgL⁻¹ 2iP

içeren ½ MS besi ortamında gözlenirken, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol grubunda rejenerasyon meydana gelmemiştir (izelge 4.7).

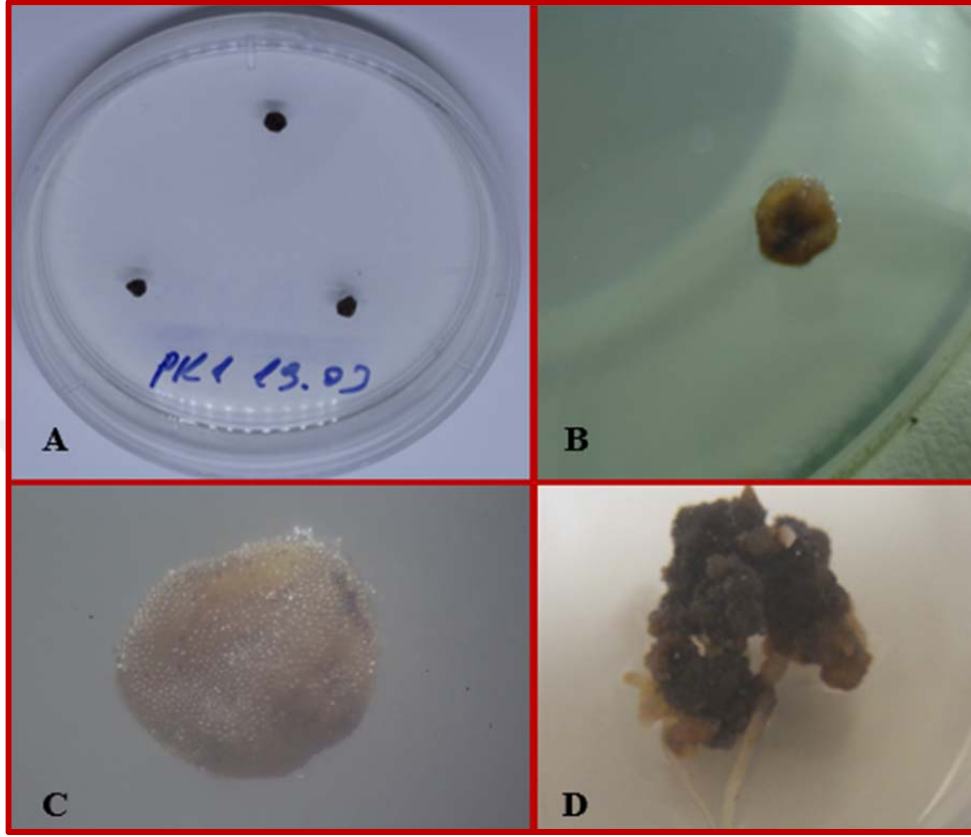
Çizelge 4.7. Besi ortamlarının kallus oluşumuna etkisi

Ortam	Kallus (%)
3 (½ MS+2.0 mgL ⁻¹ 2,4-D+0.8 mgL ⁻¹ 2iP)	3.00 (4.13) a
2 (½ MS+0.4 mgL ⁻¹ BA+0.4 mgL ⁻¹ GA ₃)	1.57 (2.30) b
1 (½ MS+0.5 mgL ⁻¹ Kin)	0.57 (1.05) bc
Kontrol (½ MS)	0.00 (0.00) c

Aı transformasyonu yapılmış değerler parantez içerisinde verilmiştir. *p<0.05

Besin ortamı ve ışın dozu interaksyonu değerlendirildiğinde kallus oluşumu oranının %1-15 arasında değiştiği belirlenmiş ve elde edilen verilerle yapılan istatistiksel analizlerde besi ortamı ve ışın dozu interaksyonunun kallus oluşumu üzerine etkisi önemli bulunmuştur (p<0.05). En yüksek kallus oluşumu 50 Gy gama ışınına maruz kalan polenlerle tozlama sonrasında 3 nolu ortam olan 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D ve 0.8 mgL⁻¹ 2iP içeren ½ MS ortamında kültüre alınan ovül eksplantlarında gerçekleşmiştir (izelge 4.8). Kallus dönüşümü olan ve olmayan bazı eksplantların görünümü Şekil 4.20'de verilmiştir.

Rejenerasyon gözlenen gruplar arasında en düşük kallus uyartımı ise %1 oranla 50 Gy gama ışınına maruz kalan polenlerle tozlama sonrasında, 1 no'lu ortam olan 0.5 mgL⁻¹ Kinetin içeren ½ MS ortamında kültüre alınan ovül eksplantlarında gerçekleşmiştir (izelge 4.8). Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında kültüre alınan eksplantlarda ise herhangi bir kallus rejenerasyonu gözlenmemiştir.



Şekil 4.20. Ovül kültürü denemelerinin görünümü (A: ovüllerin genel görünümü, B-C: kahverengileŐen ovül eksplantları, D: kallus gelişimi)

Çizelge 4.8. Işın dozu x besin ortamı interaksiyonunun kallus oluşumuna etkisi

Işın dozu*ortam	Kallus (%)
50*3	15.00 (19.92) a
50*2	11.00 (16.15) a
100*1	3.00 (5.52) b
150*3	3.00 (4.49) b
100*3	3.00 (4.49) bc
50*1	1.00 (1.84) c
0*Kontrol	0.00 (0.00) c
0*2	0.00 (0.00) c
200*3	0.00 (0.00) c
300*3	0.00 (0.00) c
450*Kontrol	0.00 (0.00) c
150*1	0.00 (0.00) c
150*2	0.00 (0.00) c
150*Kontrol	0.00 (0.00) c
450*3	0.00 (0.00) c
200*1	0.00 (0.00) c
450*2	0.00 (0.00) c
0*3	0.00 (0.00) c
100*2	0.00 (0.00) c
200*Kontrol	0.00 (0.00) c
0*1	0.00 (0.00) c
200*2	0.00 (0.00) c
100*Kontrol	0.00 (0.00) c
300*1	0.00 (0.00) c
300*2	0.00 (0.00) c
300*Kontrol	0.00 (0.00) c
50*Kontrol	0.00 (0.00) c
450*1	0.00 (0.00) c

LSD=3.167*

Açı transformasyonu yapılmış değerler parantez içerisinde verilmiştir. *p<0.05

Tez çalışmasında kallus oluşumu istenmeyen bir durumdur. Çünkü siklamende yapılan ovül kültürü çalışmalarında kallus oluşumu ile birlikte meydana gelen embriyo uyartımının somatik embriyolar olduğu bilinmektedir. Bu

durum, haploid bitki yerine genetik yapısı ovül eksplantlarının alındığı ana bitkiyle aynı olan yeni bitkilerin oluşmasına neden olmaktadır. Çalışmamızdaki 3 no'lu ortam olan 2.0 mgL^{-1} 2,4-D ve 0.8 mgL^{-1} 2iP içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamı daha önce Schwenkel ve Winkelmann (1998) tarafından siklamen için optimizasyonu yapılan bir embriyojenik kallus uyartım ortamıdır. Bu nedenle, çalışmamızda kullanılan 3'nolu ortamda kallus rejenerasyon oranının en yüksek olması beklenen bir durumdur. Ancak, çalışmamızda *in situ* partenogenik uyartım amaçlansa da embriyojenik kallus uyartımı ve sonrasında somatik embriyogenesis için optimize edilen yüksek oksin ve düşük sitokin içeren bu ortamın kullanılması, eksplantların rejenerasyona cevap verme kabiliyetinin test edilmesi açısından önemlidir. Nitekim çalışmamızda en yüksek kallus rejenerasyonu, kullanılan besi ortamlarına göre en yüksek %3 olmuştur. Ancak siklamende ovül kültürü çalışmaları incelendiğinde; Winkelmann ve Serek, (2005) 32 farklı F1 hibrit siklamen çeşidinde yapmış olduğu çalışmada ovül kültüründe aynı ortam içeriğinde %5-42 arasında kallus rejenerasyonu elde etmişlerdir. Araştırmacılar, bitkinin sahip olduğu büyüme alışkanlığına (habits) göre rejenerasyon oranının farklı olduğunu bildirmişlerdir. Koçak vd. (2014) lkemizde doğal olarak yayılış gösteren 15 *Cyclamen persicum* genotipinde yapmış oldukları çalışmada ovül eksplantından kallus rejenerasyon oranını ortalama %26.66; en yüksek ise (bir genotip için) %100 olduğunu ve yüksek oksin düşük sitokin miktarının eksplantlarda kallus rejenerasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Çalışmada rejenerasyon oranının genotipler arasında yüksek oranda farklılık göstermesinin temel sebebinin, yabancı genotiplerin genetik yapısının farklı olması nedeniyle rejenerasyon yeteneğinin ve uyartıma cevap verme davranışlarının farklı olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Sevindik (2018)'in bildirdiğine göre; ticari *C. persicum* çeşidinde yapılan bir çalışmada ovül kültüründe en yüksek kallus uyartımı, %62 oran ile 2 mgL^{-1} 2,4-D + 0.8 mgL^{-1} 2iP ve 2 mgL^{-1} 2,4-D + 0.5 mgL^{-1} 2iP içeren $\frac{1}{2}$ MS besi yerinden elde edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan besi ortamı x ışın dozu uygulamalarının interaksiyonu incelendiğinde; en yüksek kallus oluşumunun %15 oran ile 50 Gy ışın dozuna maruz bırakılan polenlerle tozlama sonrasında alınan ovül eksplantlarının 2 mgL^{-1} 2,4-D + 0.8 mgL^{-1} 2iP ortamında kültüre alınmasından elde edilmiştir (izelge 4.8). Aynı besi ortamında 100 ve 150 Gy ışın dozu uygulanan polenlerle tozlama sonrasında kültüre alınan ovül eksplantlarında kallus rejenerasyon oranı %3 olurken, 200, 300, 450 Gy ışın uygulaması ile ışın uygulaması yapılmayan kontrol grubuna ait eksplantlarda kallus uyartımı gözlenmemiştir.

İşın dozu (izelge 4.6), besi ortamı (izelge 4.7) ile besi ortamı ve ışın dozu interaksiyonu bulguları karşılaştırıldığında; düşük dozda ışın uygulanmış polenlerle tozlamının kallus uyartımını arttırdığı söylenebilir. Ancak genel olarak çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, kallus uyartımının benzer çalışmalardan daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum, eksplant kaynağının fizyolojik durumu veya genetik yapısından kaynaklanmış olabilir. Bitkinin içerisinde bulunduğu fizyolojik durum, biyokimyasal açıdan besi ortamından hormonların absorbe edilmesini ve eksplantlardan kallus rejenerasyonunda hücresel yeteneği etkilemektedir (Sharma ve Nautiyal, 2009). Diğer taraftan kontrol grubunda kallus uyartımının gereklememiş olması, eksplantların alındığı bitkinin rejenerasyon kabiliyetinden kaynaklandığını düşündürmektedir. nceki çalışmalardan farklı olarak ovül kültürü, emaskle edilmiş iek tomurcuklarında tozlama işleminden 30 gün sonra yapılmıştır. Bilindiği üzere bitkilerde meyvelerin olgunlaşması, yaprak ve meyvelerin dökülmesi, yaşlanma, dokularda yaralanmalara karşı oluşturulan cevap, etilen hormonu tarafından kontrol edilmektedir (Theologis, 1992; De Martinis ve Mariani, 1999). Elle tozlama için iek tomurcuklarının emaskle edilmesi sırasında meydana gelen dokudaki yaralanmalar, eksplantların rejenerasyon yeteneğini azalmasına yol açmış olabilir. Nitekim, iek tomurcuğunda etilen üretiminin, ovül gelişimi ile rejenerasyon yeteneğini etkilediği bilinmektedir (Hedhyl, 2009).

Işınlanmış polenlerle tozlamadan 30 gün sonra yapılan ovül kültürü denemelerinde, 10-12 hafta sonra bitkicikler oluşmaya başlamıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bitki oluşumunda ışın dozu, besin ortamı ve bu faktörlerin interaksyonu önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Işın dozunun etkisi değerlendirildiğinde, eksplantlardan bitki eldesi sadece kontrol, 50, 100 ve 150 Gy doz gruplarında gerçekleşmiştir. En yüksek bitki oluşma oranı kontrol grubunda gerçekleşmiş ve 150, 100 ve 50 Gy dozu bunu takip etmiştir. En yüksek bitki oluşma oranı %0.91 ile kontrol grubunda, en düşük bitki oluşumu ise %0.08 ile 50 Gy ışın dozu uygulamasında gözlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Işın dozunun bitki uyartımına etkisi

Işın	Bitki (%)	
0	0.91 (4.55) a	
150	0.66 (3.42) ab	
100	0.50 (2.24) bc	
50	0.08 (0.46) cd	LSD= 2.01*
450	0.00 (0.00) d	
200	0.00 (0.00) d	
300	0.00 (0.00) d	

Açı transformasyonu yapılmış değerler parantez içerisinde verilmiştir. * $p<0.05$

Artan ışın dozlarında rejenerasyonun gözlenmemesi ışın dozunun *in situ* partenokarpik uyartımı sağlamadığını veya artan dozlarda embriyojenik ölümler nedeniyle, rejenere olacak sağlıklı ovüllerin kalmadığını düşündürmektedir. Ancak ışın dozları ile ilgili bu değerlendirme, Pandey ve Phung (1982)'un bildirdiği "Hertwig Etkisi" ile ters düşmektedir. Hertwig etkisi, Hertwig tarafından 1911'de kurbağa spermelerinin iyonize ışın uygulamaları sonrası normal yumurtalarla birleştirildiğinde gözlenen bir durumdur. Spermeler düşük dozlarda ışına maruz bırakıldığında spermin hem yumurtaya girişi hem de dölleme olayı etkilenirken, yüksek ışın dozu uygulanan spermin sadece yumurtaya girişi etkilenmiştir. Ancak

yüksek ışın uygulamalarında yumurtalarda uyartım meydana gelerek, haploid bireylerin meydana gelme oranlarında artış görülmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu durumun diğer hayvanlar ve bitkilerde de görülebileceği bildirilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda, *in situ* partenokarpik uyartımın ışınlanmış polenlerle tozlama sonrasında hangi aşamada gerçekleştiği veya artan ışın dozu ile haploidi uyartımının arasında pozitif bir korelasyonun varlığı bildirilmemiştir. Ayrıca, *in situ* partenokarpik uyartımda, polenlerin alındığı bitkinin genetik yapısı (Pandey ve Phung; 1982), ışın dozu ve miktarı (Sestili ve Ficcadenti, 1996) gibi birçok faktör etkilidir. Diğer taraftan, histolojik çalışmalar kapsamında polen tüpünün uzaması sonuçları da göz önünde bulundurulduğunda, artan ışın dozlarında polen tüpünün uzamasının sınırlı kaldığı ve yumurtalığa ulaşmadığı görülmektedir. Bu nedenle ovüller de bir *in situ* uyartım gerçekleşmemiş olabilir.

Besi ortamlarının bitki uyartımına etkisi incelendiğinde, tüm ortamlarda bitkisel uyartım gerçekleşmiş, ancak tüm uygulamalarda bitki eldesi %1'in altında kalmıştır. En yüksek bitki oluşumu %0.66 ile 1 no'lu ortamdan elde edilirken, en düşük bitki oluşumu %0.04 ile 3 no'lu ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 4.10). Bu durum; düşük dozda kullanılan kinetinin hormonunun embriyoların çimlenmesinde daha etkili olduğunu düşündürmektedir. Nitekim, Kreuger (1995) siklamende besi ortamında kullanılan düşük dozdaki kinetinin eksplantın embriyojenik potansiyelini ortaya çıkardığını bildirmiştir.

Çizelge 4.10. Besin ortamlarının bitki oluşumuna etkisi

Ortam	Bitki (%)	
1 ($\frac{1}{2}$ MS+0.5 mgL ⁻¹ Kin)	0.66 (3.09) a	LSD = 1.52*
2 ($\frac{1}{2}$ MS+0.4 mgL ⁻¹ BA+0.4 mgL ⁻¹ GA ₃)	0.33 (1.69) ab	
Kontrol ($\frac{1}{2}$ MS)	0.19 (1.05) b	
3 ($\frac{1}{2}$ MS+2.0 mgL ⁻¹ 2,4-D+0.8 mgL ⁻¹ 2iP)	0.04 (0.26) b	

Açı transformasyonu yapılmış değerler parantez içerisinde verilmiştir. *p<0.05

İstatistiksel analizler sonucunda ışın dozu ve besin ortamlarının interaksiyonunun, bitki oluşumu üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Bu iki faktörün interaksiyonu incelendiğinde eksplantlardan bitkicik oluşum oranı en düşük %0,33 oran ile 50 Gy ışına maruz kalmış polenlerle tozlamadan 30 gün sonra 3 no'lu ortamda kültüre alınan eksplantlardan elde edilmiştir. En yüksek bitkicik oluşum oranı ise %2.66 ile ışın uygulaması yapılmayan polenlerle tozlamadan 30 gün sonra 1 nolu ortamda kültüre alınan eksplantlardan elde edilmiştir. Bitki elde edilen diğer uygulamalar ise sırasıyla %2.00 oran ile 100 Gy ışın dozu x 1 no'lu ortam; %1.33 oran ile 150 Gy ışın dozu x kontrol ortamı ve 150 Gy ışın dozu x 2 no'lu ortam; %1.00 oran ile kontrol grubu x 2 no'lu ortam uygulamalarından elde edilmiştir (Çizelge 4.11).

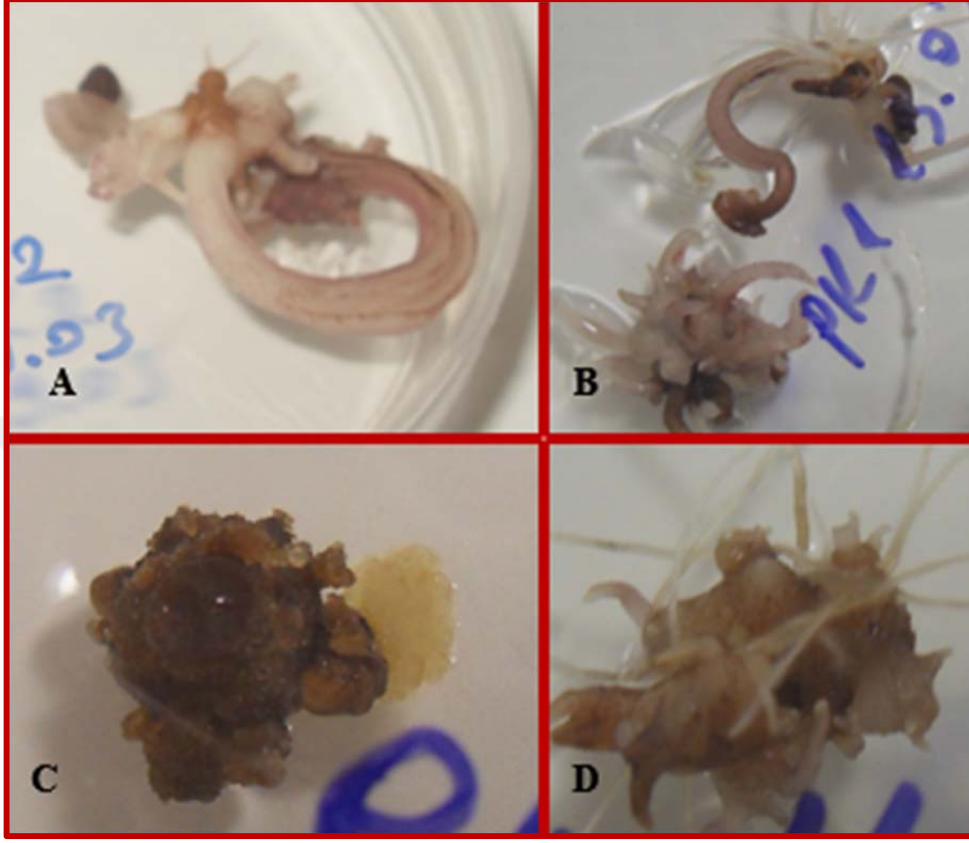
Eksplant gelişimleri ve elde edilen sonuçlar irdelendiğinde kallus oluşumu gözlenmeyen veya kallus rejenerasyon oranının düşük olduğu; 1 no'lu ($\frac{1}{2}$ MS+0.5 mgL⁻¹ Kin) ve 2 no'lu ($\frac{1}{2}$ MS+0.4 mgL⁻¹ BA+0.4 mgL⁻¹ GA₃) ortamlar ile bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamlarında eksplantlardan bitkiye dönüşümün daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kinetin içermeyen ortam ile kontrol ortamında eksplantlardan kallus oluşmadan doğrudan sürgün ve kök gelişimi gözlenirken, 3 no'lu ortamda ($\frac{1}{2}$ MS+2.0 mgL⁻¹ 2,4-D+0.8 mgL⁻¹ 2iP) kallus gelişiminin devam ettiği görülmüş ve bazı kallus yapılarında embriyo gelişimi belirlenmiştir. Ancak, bu gelişim sırasında anormal yapıların da ortaya çıktığı görlmştir (Şekil 4.21). Daha sonra başlangıç kültür ortamına göre değişmekle birlikte bu yapıların bir kısmından bitkiye dönmeye başlamıştır (Şekil 4.22).

Çizelge 4.11. Işın dozu ve ortam interaksyonunun bitki oluşumuna etkisi

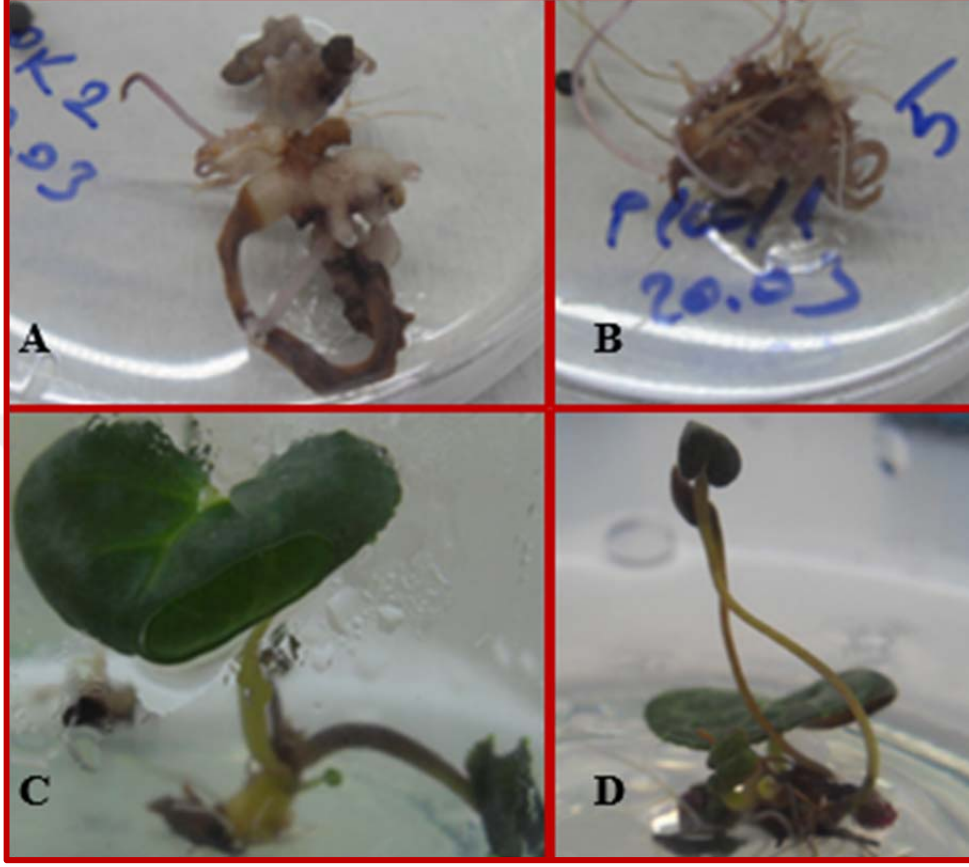
Işın dozu*ortam	Bitki (%)
0*1	2.66 (12.68) a
100*1	2.00 (8.99) ab
150*Kontrol	1.33 (7.37) b
150*2	1.33 (6.34) b
0*2	1.00 (5.52) bc
50*3	0.33 (1.84) cd
450*Kontrol	0.00 (0.00) d
150*1	0.00 (0.00) d
150*3	0.00 (0.00) d
450*3	0.00 (0.00) d
50*1	0.00 (0.00) d
450*2	0.00 (0.00) d
200*1	0.00 (0.00) d
300*3	0.00 (0.00) d
300*2	0.00 (0.00) d
200*2	0.00 (0.00) d
50*2	0.00 (0.00) d
0*3	0.00 (0.00) d
50*Kontrol	0.00 (0.00) d
100*3	0.00 (0.00) d
200*3	0.00 (0.00) d
300*1	0.00 (0.00) d
200*Kontrol	0.00 (0.00) d
300*Kontrol	0.00 (0.00) d
100*2	0.00 (0.00) d
100*Kontrol	0.00 (0.00) d
0*Kontrol	0.00 (0.00) d
450*1	0.00 (0.00) d

LSD=4.02*

Açı transformasyonu yapılmış değerler parantez içerisinde verilmiştir. *p<0.05



Şekil 4.21. Kendilenmiş ve ışınlanmış polenlerle tozlama sonrasında eksplantlarda gözlenen rejenerasyonlar (A-B: kendileme sonrasında kontrol ortamına alınan ovül eksplantları C: 3'nolu ortamda gelişen kallus, D: kinetin içeren ortama alınan ovül eksplantlarının gelişimi)



Şekil 4.22. Rejenerasyon sonucu elde edilen bazı bitkicikler (A: kontrol grubunda rejenerasyon; B: 100 Gy ışınlama sonrasında eksplantların rejenerasyon olması; C: kontrol grubundan elde edilen bitkicik; 100 Gy ışın dozu grubundan elde edilen bitkicik)

Tez çalışması kapsamında ışınlanmış polen tekniği siklamende ilk defa kullanılmıştır. Bu nedenle elde edilen veriler, literatürde yeni bir bilgidir. Daha önce de belirtildiği üzere siklamende embriyo kurtarma işlemi teknik olarak mümkün olmadığından, ışınlanmış polenlerle tozlama sonrasında histolojik çalışmalarla belirlenen embriyo gelişim aşamasında ovül kültürü yapılmıştır. Embriyo kurtarma amaçlı ovül veya ovaryum kültürü denemeleri siklamende türlerarası melezleme çalışmalarında abortif embriyo oluşumunu engellemek için kullanılmaktadır. Ishizaka ve Uematsu (1995) *C. persicum* ve *C. purpurascens*

türleri arasında melezlemeler yapmıştır. iek tomurcukları, melezlemeden 28 gün sonra hasat edilmiş ve yüzey sterilizasyonundan sonra ovaryum duvarı kaldırılıp plasenta dokusu ile birlikte ovüller %3 sakkaroz içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda, *C. persicum* cv. ‘Shubert’ eşidi ile *C. purpurascens* melez kombinasyonundan 8 adet eksplanttan 9 adet bitkicik ve 1 adet embriyo elde edilmiştir. Bu çalışmadan bir yıl sonra Ewald (1996), benzer şekilde *C. persicum* (‘ReinweiB’) ve *C. purpurascens* türleri arasında melezleme ile *C. persicum* (‘ReinweiB’) eşidinin kendilenmesi çalışmasının sonucunu yayımlamıştır. Araştırmacı melezlemeden 14, 21, 28 ve 35 gün sonra ovaryumları %3 ve %6 sakkaroz içeren MS besi ortamlarında kültüre almıştır. Her bir melez kombinasyonu, tozlamadan sonra geçen gün ve ortam için en az 5, en fazla 8 ovaryum kültüre alınmıştır. *C. persicum* (‘ReinweiB’) eşidinin kendilenmesi sonucunda en yüksek embriyo gelişiminin, 2 adet embriyo ile tozlamadan 35 gün sonra %6 sakkaroz içeren besi ortamında kültür alınan 2 adet eksplanttan elde edildiği bildirilmiştir. *C. persicum* (‘ReinweiB’) ve *C. purpurascens* türleri arasında melezleme sonucunda ise; en yüksek embriyo uyartımı, 38 embriyo ile tozlamadan 21 gün sonra %6 sakkaroz içeren besi ortamına alınan 2 eksplanttan elde edilmiştir. Çalışmamız sonuçları ile daha önce türlerarası melezleme çalışmaları sonuçları kıyaslandığında, bitki rejenerasyon oranının bizim çalışmamızda daha düşük olduğu görünmektedir. Bu durum öncelikle kullanılan tekniğin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Türlerarası melezleme çalışmasında uyumazlık durumu söz konusu olmadığında normal bir döllenme olayı, frekansı düşük olsa da gerçekleşmektedir. Ancak, ışınlanmış polenlerle tozlamada ise döllenme olayı gerçekleşmezken, sadece döllenmemiş yumurtanın uyartım alması ve kendi kendine gelişerek embriyoya dönüşmesi beklenmektedir. Diğer taraftan, daha önce yapılan çalışmalarla, çalışmamızda gerçekleştirilen ovül kültürü yöntemi farklılık göstermektedir. nceki çalışmalarda teknik olarak aslında tek bir ovül izolasyonu ve kültürü yapılmak yerine, ovaryum duvarı kaldırıldıktan sonra birçok ovülün plasenta dokusu ile birlikte kültüre alınması söz konusudur. Her bir

ovaryumda yaklaşık 100-200 adet ovül olduğu dşnldğinde, ovül başına düşün rejenerasyon oranı çalışmamızda daha yüksektir.

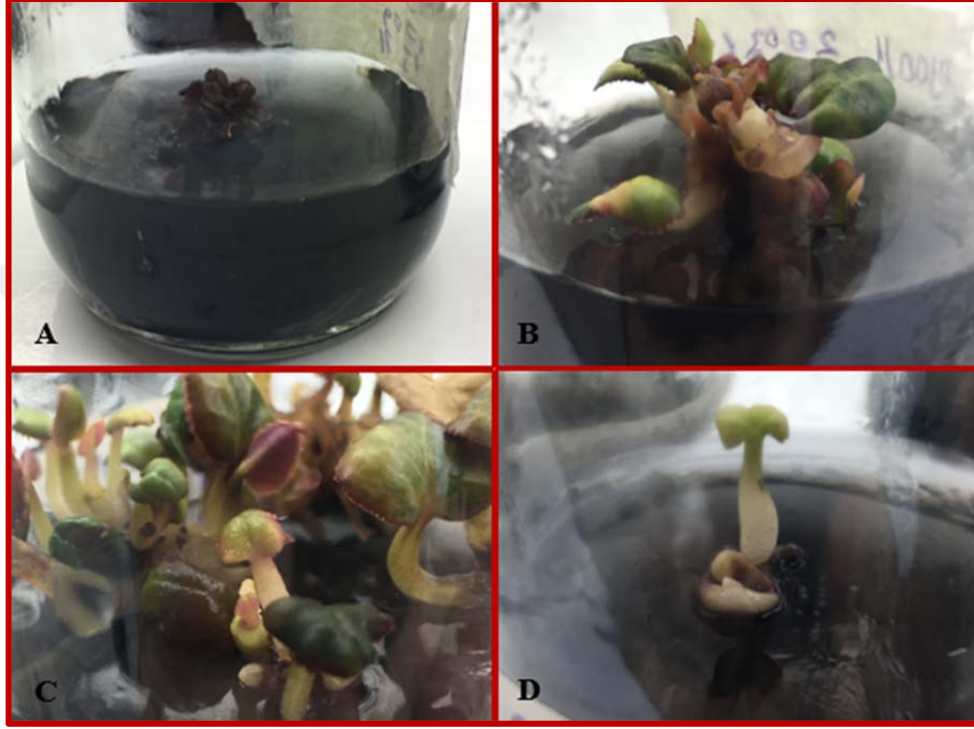
Tez çalışmasının son aşamasında elde edilen sürgün ve bitkicikler 0.5 g.L^{-1} aktif karbon içeren bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamlarda farklılaşmaları için kültüre alınmıştır. Aktif karbon günümüzde sadece doku kültürü çalışmalarında değil birçok alanda kullanılan bir bileşiktir. Doku kültüründe ise, bitkinin kök bölgesi için karanlık bir ortam oluşturarak kök bölgesinin gelişimini ve sadece kök sayısı değil, aynı zamanda kök uzunluğu ile sekonder köklerin oluşumunu arttırmaktadır (Dumas ve Monteuis, 1995). Aktif karbonun kültür sırasında meydana gelen aşırı polifenol üretimi nedeniyle meydana gelen kahverengileşme ve hücre ölümlerini, muhtemelen bitkinin savunma mekanizmasını tetikleyerek önlediği bildirilmektedir (Pan ve Staden, 1998). Çalışmamızda, aktif karbon içeren hormonsuz besi ortamına alınan eksplantlardan bazılarının sağlıklı bir gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Kültür ortamına alınan 100 Gy ışın dozuna maruz bırakılan polenlerle tozlama sonrasında $\frac{1}{2} \text{ MS}+0.5 \text{ mgL}^{-1}$ Kinetin içeren ortamda kültüre alınan ovllerden 3 adet bitkicik ile ışınlama yapılmamış iek tozları ile tozlama sonrasında $\frac{1}{2} \text{ MS}+0.4 \text{ mgL}^{-1} \text{ BA}+0.4 \text{ mgL}^{-1} \text{ GA}_3$ ortamında kültüre alınan ovllerden gelişen 1 adet bitkicik, steril torf içeren viyollere aktarılmıştır. Steril torfa şaşıtılan bitkiler aynı kültür şartlarında hazırlanan mini sera içerisinde kültüre alınmıştır (şekil 4.23).



Şekil 4.23. Bitkilerin aklimatizasyonu (A: bitkilerin kültür ortamından ıkartılması, B: kök bölgesinin besi ortamından arındırılması, C, D, E: kök bölgesi temizlenen bitkiler, F: bitkilerin torfa dikilmesi, G: bitkilerin kültüre alınması)

Aktif karbon içeren bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına aktarılan bazı eksplantların karardığı ve gelişiminin durduğu gözlenirken, bazı eksplantların ise sürgün boylarının ve yapraklarının oldukça küçük olduğu gözlenmiştir. Minyatür yapılı bitkiciklerin henüz kök sistemleri gelişmediği için aklimatizasyonu yapılmamıştır (Şekil 4.24). Literatür bilgileri incelendiğinde, haploid bitkilerin normal bitkilere göre morfolojik özellikleri bakımından daha küçük olduğu bildirilmektedir (Ellialtıoğlu vd. 2001). Bu nedenle, aynı anda kültüre alınmalarına karşın sürgün boyu 2-3 cm kadar olan bu bitkiciklerin haploid

yapılı oldukları dşnlmektedir. Ancak haploid bitkiler olup olmadıkları ploidi seviyelerinin belirlenmesi ile mümkün olacaktır.



Şekil 4.24. A: kültür ortamında gelişimi duran eksplant, B, C ve D: morfolojik özellikleri kontrol grubuna göre daha küçük olan sürgün yapıları

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemiz barındırdığı tür sayısı bakımından diğer bitkilerde olduğu gibi siklamen açısından da oldukça zengindir. Son yıllarda, siklamen iç mekan ve dış mekan süs bitkisi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır ve dünyada ekonomik olarak en çok üretilen süs bitkilerinden birisidir. Ülkemizin sahip olduğu endemik siklamen türleri göz önüne alındığında, siklamenin anavatanı olduğu söylenebilir. Ancak yerel bir siklamen çeşidimiz halen bulunmamaktadır. Siklamende klasik ıslah çalışmaları ile saf hatların elde edilmesi oldukça zor ve uzun yıllar gerektirdiğinden son yıllarda doku kültürü temelli haploidi teknikler ön plana çıkmıştır. Ancak ticari açıdan başarılı ve yüksek verimli bir protokolün bulunmaması nedeniyle, alternatif yöntemlerin araştırılması ve geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Klasik yöntemlerle siklamen ıslahı, bitkinin döllenme biyolojisinde farklı seviyelerde görülen kendileme depresyonu, farklı ploidi seviyeleri ve abortif embriyo oluşumuna neden olan kendine uyumsuzluk gibi faktörlerden dolayı bir hayli zordur. Bu nedenle üretimde ve ıslah programlarında vegetatif üretim önem arz etmektedir. Çeşit geliştirme çalışmalarında bilindiği üzere saf hatların elde edilmesi önemli bir aşamadır. Siklamen gibi bitki türlerinde klasik yöntemlerle saf hatların elde edilmesi oldukça zor ve uzun yıllar alan bir süreç olduğundan, bu gibi türlerde doku kültürü temelli haploidi yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Ancak siklamende henüz kültüre alınmamış yabancı genotiplerin *in vitro* rejenerasyon oranının düşük olması nedeniyle; anter, ovül ya da ovaryum kültürlerinden haploidi uyartım oranı oldukça düşük kalmakta ya da başarılı bir sonuç alınmamaktadır. Bu nedenle, haploidi elde etme oranı yüksek başarılı bir haploidizasyon yöntemine ihtiyaç vardır. Işınlanmış polenlerle tozlama ya da *in situ* parthenogenesis yoluyla haploid uyartımı, sebzelerde (kavun, karpuz, biber) ve bazı süs bitkilerinde (gül, iris) başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Tez kapsamında literatürde ilk defa ışınlanmış polen yöntemi kullanılarak embriyo uyartımının sağlanması ve uygun

embriyo gelişim aşamasının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çiçek tomurcukları toplanarak farklı ışın dozlarına maruz bırakılmış ve sonrasında elde edilen ışınlanmış polenlerle tozlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Işın dozlarının çiçek tozu canlılığı ve çimlenme yeteneği üzerine etkisi belirlenmiştir. Kendileme işlemi yapılan çiçek tomurcuklarında embriyo kurtarma amacıyla embriyo gelişim aşamaları histolojik analizlerle belirlenmiştir. Yapılan ovül kültürü denemeleriyle ışın dozları ve farklı besi ortamlarının eksplantlar üzerine etkisi ortaya koyulmuştur. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar kısaca aşağıda verilmiştir.

- Işın uygulamalarının polen canlılığına etkisi dozlara göre farklılık göstermiştir. 0. günde en yüksek polen canlılığı %88 oran ile 50 Gy ışın dozunda gözlenmiştir. Bunu sırasıyla %87 oran ile 100 ve 200 Gy ışın uygulaması takip etmiştir. 150 Gy ışın uygulamasında polenlerin canlılık oranı kontrol grubu ile neredeyse aynı olurken, 450 Gy ışın uygulaması polen canlılık oranları ışın uygulaması yapılmayan kontrol grubuna göre 0. günde yaklaşık %6 oranında azalmıştır. Işın uygulamalarında polen canlılık 0 günlük polenlerde ışın dozu arttıkça azalmış, 1 günlük polenlerde genel olarak bir düşüş gözlenmiş ve 2 günlük polenlerde hafif bir artış olsa da başlangıç oranından daha düşük seviyede kalmıştır. Uygulamalar arasında istisnai durum olarak 300 ve 450 Gy ışın uygulanan polenlerin canlılığı 1.günde artış gösterirken; sadece 450 Gy ışın uygulaması yapılan polenlerin canlılık oranı 2. günde başlangıç durumuna göre daha yüksek bulunmuştur. Polen canlılık testleri sonucunda ışın dozlarının ışınlama işleminden sonraki 2 gün içerisinde polen canlılığına ciddi bir etkisi bulunmamıştır.
- Polen yaşı ve ışın dozlarının çim borusu uzunluğuna etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Işınlanma yapılmayan kontrol grubuna ait polenlerin çim borusu uzunluğunun en kısa olduğu belirlenirken, 300 Gy dozda ışına maruz kalan 0 ve 1 günlük polenlere ait

çim borusu uzunluğunun en uzun olduğu belirlenmiştir. 0 Gy' den 300 Gy doza kadar çim borusu uzunluğu polen yaşına bağlı olarak ışın doz miktarı arttıkça artmış ve 450 Gy dozda yine yaşa bağlı olarak düşüş gözlenmiştir. En uzun çim borusu uzunluğu 79.37 µm uzunluk ile 300 Gy ışın dozuna maruz bırakılan polenlerin hemen *in vitro* çimlendirme testi yapılmasıyla yani 0 günlük polenlerde tespit edilmiş ve istatistiki olarak aynı grupta yer alan 300 Gy ışın dozu uygulanan 1 günlük polenler 78.89 µm çim borusu uzunluğu ile ikinci sırada yer almıştır.

- Yapılan histolojik analizler sonucunda ışın dozları uygulamasına göre değişmekle birlikte stigma üzerine ulaşan polenlerin ilk iki gün içerisinde çimlendiği ve polen tüpü oluşturduğu gözlenmektedir. Kontrol grubunda polen tüpünün tozlanmadan sonra 5-7 gün sonra ovaryuma ulaştığı ve ovüle giriş yaptığı gözlenmiştir. Işın dozu uygulamalarında ise çimlenen polenlerin yumurtalığa ulaşma sürelerinde bir değişiklik olmamakla birlikte döllenmenin ilk hafta içerisinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Ancak, artan dozlarda çimlenen polen sayısındaki düşüş veya polen tüpünün çimlendikten sonra dişiçik borusu içerisinde tutuklu kalması nedenleriyle yumurtalığa ulaşan polen tüpü sayısının azaldığı ya da hiç ulaşmadığı gözlenmiştir.
- Histolojik çalışmalarda embriyo oluşumunun kaç gün sonra meydana geldiğini belirlemek için 100x objektifte ışık ve floresan mikroskopta incelemeler yapılmıştır. Gelişim aşamaları 100x objektif altında incelendiğinde tohum taslakları içerisinde 20. günde etrafında maternal dokuların çevrelediği küresel zigot/embriyo oluşumu gözlenmiştir. Aynı görüntü floresan mikroskopta incelenmiş ve gözlenen yapının embriyo/ zigot olduğuna emin olunmuştur. Bu sonuçlar literatür bilgileri ile kıyaslandığında ovül kültürü için uygun zamanın tozlamadan sonra 30. gün olduğu belirlenmiş ve ovül kültürü bu zaman diliminde gerçekleştirilmiştir.

- Işınlanmış polenlerle tozlama sonrasında 30 gün sonra yapılan ovül kültürü denemelerinde 10-12 hafta sonra bitkicikler oluşmaya başlamıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bitki oluşumunda ışın dozu, besin ortamı ve bu faktörlerin interaksyonu önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Işın dozunun etkisi değerlendirildiğinde eksplantlardan bitki eldesi sadece kontrol, 50, 100 ve 150 Gy doz gruplarında gerçekleşmiştir. En yüksek bitki oluşma oranı kontrol grubunda gerçekleşmiş ve 150, 100 ve 50 Gy dozu bunu takip etmiştir. En yüksek bitki oluşma oranı %0.91 ile kontrol grubunda, en düşük bitki oluşumu ise %0.08 ile 50 Gy ışın dozu uygulamasında gözlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ve kazanılan deneyimler sonucunda; önceki çalışmalara göre elde ettiğimiz bitki rejenerasyon oranı daha yüksek veya benzer olsa da tek bir ovül izolasyonunun teknik açıdan daha zor ve ovüllerin izolasyonu sırasında dokuların zarar görebilmektedir. Bu nedenle, ışınlanmış polenlerle tozlama sonrasında, ovaryum kültürünün yapılması eksplantların rejenerasyon oranını arttırabilir.

İlerleyen süreçte yapılacak çalışmalarda, ovüllerin rejenerasyon etkinliğinin arttırılması amacıyla farklı sakkaroz konsantrasyonları ile tozlamadan sonra 20, 25, 35 ve 40. günlerde ovaryum kültürü denemelerinin kurulması önerilmektedir. Ayrıca, 100-200 Gy ışın dozları arasındaki değerlerin siklamende *in situ* parthenogenesis yöntemi için uygun olabileceği düşünülmektedir. 300 Gy ve 450 Gy ışın dozları ile tozlamadan 30 gün sonra alınan çiçek tomurcuklarına ait ovüllerin çok azında (tomurcuk başına 1-2 ovül) hacimsel artış gözlenmiş ve birçok ovülün kahverengi ince bir disk halinde kaldığı görülmüştür. Muhtemelen bu aşamada embriyoların dejenere olduğu düşünülmektedir. Bu dozlar (100-200 Gy) ile çiçek tomurcuklarının tozlanması ve sonrasında belirli aralıklarla örnekler alınarak embriyo gelişim aşamalarının etkisinin histolojik olarak incelenmesi de başarıyı arttırabilir.

KAYNAKLAR

- Abu-Qaoud, H. 2004. Direct regeneration in *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissues, An-Najah University Journal for Research - A (Natural Sciences), 18,147–156.
- Akbudak, N. 2005. Domateslerde ışınlanmış polen uyartımıyla haploid bitki elde edilmesi üzerine etkili faktörler, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, s. 210.
- Alves, C. M., Noyszewski, A. K., Smith, A. G. 2019. *Nicotiana tabacum* pollen–pistil interactions show unexpected spatial and temporal differences in pollen tube growth among genotypes, Plant Reprod, 32(4):341-352.
- Amini, L., Mendi, Y. Y. 2016. Bazı siklamen türlerinde (*C. cilicium*, *C. persicum* ve *C. hederifolium*) anter ve ovül kültürü yöntemlerinin embriyo uyartımına etkileri, Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 34-4, 20-29.
- Ayed, O. S., De Buyser, J., Picard, E., Trifa Y., Amara, H. S. 2010. Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum* Desf.), Journal of Plant Breeding and Crop Science, 2:30-38.
- Babbar, S. B., Agarwal, P. K., Sahay, S., Bhojwani, S. S. 2004. Isolated microspore culture of *Brassica*: an experimental tool for developmental studies and crop improvement, Indian Journal of Biotechnology, 3,185-202.
- Bach, A., Malik, M., Zolneczko, B. 1998. Organogenesis and somatic embryogenesis in cultures of *Cyclamen persicum* Mill. F-1 'medium'. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 40, 47-51.
- Baktemur, G. 2009. Kavunda (*Cucumis melo* var. *inodorus*) ışınlanmış polenle uyartılmış haploid embriyoların ayrılmasında kullanılabilecek farklı yöntemler, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s. 75.

- Berber, M. 2009. Kabuksuz çekirdek kabaklarında (*Cucurbita pepo* L. var. *styriaca*) ışınlanmış polenle tozlama yöntemi kullanılarak haploid üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s. 75
- Bohanec, B. 2009. Doubled haploid via gynogenesis. Advances in Haploid Production in Higher Plants. Editörler: Touraev, A., Forster, B. P., Jain, S. M. Berlin: Springer.
- Bots, M., Mariani, C. 2005. Pollen viability in the field, Research Reports No. CGM, 5.
- Calzoni, G. L., Speranza, A. 1982. Effect of methanol and gamma irradiation on enzymatic activity of apple pollen, *Scientia Horticulturae*, 17:231-239.
- Chen, J. F., Cui, L., Malik, A. A., Mbira, K. G. 2011. *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule Culture, *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(3):311-319.
- Compton, J. A., Clennett, J. C. B., Culham, A. 2004. Nomenclature in the dock. overclassification leads to instability: a case study in the horticulturally important genus *Cyclamen* (Myrsinaceae), *Botanical Journal of the Linnean Society* 146:339–349.
- Çuruk, P., Sogut, Z., Izgu, T., Sevindik, B., Tagipur, E. M., da Silva, J. A., Serçe, S., Solmaz, İ., Mendi, N. Y. 2016. Morphological characterization of *Cyclamen* sp. grown naturally in Turkey: Part II, *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 15:205-224.
- Çağlar, G. 1995. Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) ışınlanmış polenlerle tozlama yoluyla *in situ* haploid embriyo uyartımı ve haploid embriyolarında *in vitro* bitki eldesi üzerinde araştırmalar, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana s. 227.
- Çağlar, G., Abak, K. 1999. Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) *in situ* uyartım sonucu elde edilen haploid embriyolardan *in vitro* haploid bitki oluşturma, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23:283-290.

- Çürük, P. 2013. Adana ve çevresinde doğal olarak yetişen siklamen türlerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonu, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Da Silva, J. A. T., Winarto, B., Dobránszki, J., Zeng, S. 2015. Anther culture of Anthurium: a review, *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(8):173.
- Datta, S. K. 2005. Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement, *Current Science*, 89(11):1870-1878.
- Davis, P. H. 1978. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*, Edinburgh, University Press.
- De Martinis, D., Mariani, C. 1999. Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants, *The Plant Cell*, 11(6), 1061-1071.
- Doğru, Ş. M., Çilingir, A., Kurtar, E., Balkaya, A. 2016. Using of haploid and double haploid technique in breeding of cabbage group vegetables, *TURKTOB J.*, 5 (20):30-33.
- Doi, H., Yokoi, S., Hikage, T., Nishihara, M., Tsutsumi, K. I., Takahata, Y. 2011. Gynogenesis in gentians (*Gentiana triflora*, *G. scabra*): production of haploids and doubled haploids, *Plant Cell Reports*, 30 (6), 1099-1106.
- Dumas E Monteuuis O 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from Juvenile and mature Pinus pinaster explants – influence of activated charcoal, *Plant Cell Tissue Org Cult* 40:231–235.
- Ellialtıoğlu, Ş., Bařay, S., Kuřvuran, Ş. 2006. Anter kùltùrùnden elde edilen haploid patlıcanların katlanması amacıyla kullanılan *in vitro* ve *in vivo* kolhisin uygulamalarının karşılaştırılması, VI. Sebze Tarımı Sempozyumu, 19-22 Eylül 2006, Kahramanmaraş, 386-390.
- Ellialtıoğlu, Ş., Tıprıdamaz, R. 1997. Soğuk uygulamaları ve aktif kùmrùn patlıcan ve biberde *in vitro* androgenesis üzerine etkileri, TOGTAG 87 No'lu Proje Sonuç Raporu, Ankara, 98s.

- Emiroğlu, Ü., Gürel, A. 1993. "Bitki ıslahında modern biyoteknoloji, Short Course, The Biotechnology Revaluation, Organized by Ege Univ. Biotech. Cent and Fac. of Agr. Dept. of Crop Sci., 103-110.
- Erol, M. H. 2018. Hıyarlarda ovül-ovaryum kültürleri ve ışınlanmış polen tekniği ile spermidine ve putrescine uygulamalarının haploid embriyo uyartımına etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s. 118.
- Eti, S. 1990. Çiçek tozu miktarını belirlemede kullanılan pratik bir yöntem, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5(4):49-58.
- Ewald, A. 1996. Interspecific hybridization between *Cyclamen persicum* Mill, and *C. purpurascens* Mill, Plant Breeding, 115:162-166.
- Ferrie, A. M. R. 2012. Doubled haploidy as a tool in ornamental breeding, Acta Horticulturae, 953:167-171.
- Ferrie, A. M. R., Caswell, K. L. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production, Plant Cell Tissue Organ Culture, 104:301-309.
- Fersing, J., Mouras, A., Lutz, A. 1982. Premiere etape vers une multiplication vegetative industrielle du *Cyclamen* par la culture *in vitro*, Pepin. Hort. Maraichers ,224:27-30.
- Geier, T., Kohlenbach, H. W., Reuther, G. 1979. Klonale Vermehrung von *Cyclamen persicum*, Gartenbauwissenschaft, 44:226-237.
- Germana, M. A. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production, Plant Cell Tissue Organ Culture, 104:283-300.
- Grey-Wilson, C. 2003. *Cyclamen: A Guide for Gardeners, Horticulturists and Botanists*, London: Timber Press Incorporated.
- Grouh, M. S. H., Sousaraei, N., Akbari, M., Rahimi, V., Bayat, H. 2015. Induction of haploid plants in iris (*Iris pseudacorus*) by pollen irradiation, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 39(4):596-600.

- Gupta M, Murty Y. S. 1985. Viability and longevity of pollen in *Vicia faba* L., Acta Botanica Indica, 13:292–294.
- Gülbağ, F. 2015. Türkiye’de süs bitkileri ıslah çalışmaları, Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi, 14:12-15.
- Gündoğan, M. T. 2003. *Cyclamen mirabile* Hildebr. ve *Cyclamen trochopteranthum* O. Schwarz türleri üzerinde bazı fitokimyasal araştırmalar, Doktora Tezi, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Gürsoy, I. 2009. Yuva ve Hasanbey kavunlarında ışınlanmış polenle farklı tozlama dönemlerinin meyve tutumuna etkisi ile farklı hasat tarihleri ve depolama sıcaklıklarının embriyo verimi ve bitkiye dönüşüme etkileri, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s 71.
- Gürsöz, N. 1990. Kavun (*Cucumis melo* var. *inodorus* ve *reticulatus*) ve karpuzda (*Citrullus lanatus* (thunb.) mansf) ışınlanmış polenle uyartılan *in situ* partenogenetik embriyolardan *in vitro* kültürü ile haploid bitki eldesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s.60.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I., Herrero, M. 2009. Flower emasculation accelerates ovule degeneration and reduces fruit set in sweet cherry, Scientia Horticulturae, 119(4), 455-457.
- Hohe, A., Winkelmann, T., Schwenkel, H. G. 2001. Development of somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. in liquid culture, Gartenbauwissenschaft. 66(5):219- 224.
- Ishizaka, H. 1996. Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* and *C. graecum*, Euphytica, 91(1):109-117.
- Ishizaka, H. 1998. Production of microspore-derived plants by anther culture of an interspecific F₁ hybrid between *Cyclamen persicum* and *C. purpurascens*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 54(1):21-28.

- Ishizaka, H. 2008. Interspecific hybridization by embryo rescue in the genus *Cyclamen*, *Plant Biotechnology*, 25:511–519.
- Ishizaka, H., Uematsu, J. 1992. Production of interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton. by ovule culture, *Japanese Journal of Breeding*, 42(2):353-366.
- Ishizaka, H., Uematsu, J. 1995. Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. produced by ovule culture, *Euphytica*, 82:31–37.
- Islam, S. M. S., Ara, I. Tuteja, N. Subramaniam, S. 2013. Efficient microspore isolation methods for high yield embryoids and regeneration in rice (*Oryza sativa* L.), *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Biological Science and Engineering*, 7 (12):891-96.
- İzgülü, T., Sevindik, B., Çürük, P., Şimşek, Ö., Kaçar, Y. A., Teixeira da Silva, J. A., Mendi, Y. Y. 2016. Development of an efficient regeneration protocol for four *Cyclamen* species endemic to Turkey, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 127:95–113.
- Jalali, N., Nadari, R. Shahi- Gharahlar, A., Da Silva J. A. T. 2012. Tissue culture of *Cyclamen* spp., *Scientia Horticulturae*, 137:11-19.
- Jia, J., Wang, J., Zhang, J., Zhang, S., Zhang, J., Zhao, K. 2008. Determination of vitality and germination rate in cyclamen pollen, *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2, 23.
- Juhasz, A. G., Jakse, M. 2005. Haploids in the improvement of miscellaneous crop species (*Cucurbitaceae*, *Liliaceae*, *Asparagaceae*, *Chenopodiaceae*, *Araceae* and *Umbelliferae*). *Haploids in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Editörler: Don Palmer C., Keller W. A., Kasha K. J., Berlin Heidelberg, Springer.
- Kamanetsky R., Okubo H. 2013. Introduction. *Ornamental Geophytes from Basic Science to Sustainable Production*. Editörler: Kamanetsky R., Okubo H., 1st ed., London, CRC Press.

- Karagüzel, Ö., Aydınşakir, K., Kaya, A. S., 2007. Dünyada ve Türkiye’de çiçek soğanları sektörünün durumu, *Derim*, 24(1):1-10.
- Karakullukçu, Ş., Abak, K. 1993a. Patlıcanda anter kültürü üzerinde araştırmalar. I. Elverişli tomurcuk gelişim döneminin belirlenmesi, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 17:801-810.
- Karakullukçu, Ş., Abak, K. 1993b. Patlıcanda anter kültürü üzerinde araştırmalar. II. Şeker ve büyümeyi düzenleyicilerin etkileri, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 17:811- 820.
- Karam, N. S., Al-Majathoub, M. 2000. *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill., *Scientia Horticulturae*, 86:323-333.
- Kasapoğlu, S. 2009. Kırkağaç kavunlarında ışınlanmış polenle farklı tozlama dönemlerinin meyve tutumuna etkisi ile farklı hasat tarihleri ve depolama sıcaklıklarının embriyo verimi ve bitkiye dönüşüme etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s. 66
- Katiyar, S. R., Chauhan, Y. S. 1987. Effect of gamma rays doses on pollen germination, polysiphony and pollen tube elongation in *Pinus patula* Schiede et Deppe., *Acta Botanica Indica*, 15(1):40-44.
- Kermanshahani, M., Naderi, R., Fattahi, R., Khalighi, A. 2014. Pollen germinability and cross-pollination success in Persian *Cyclamen* (*Cyclamen persicum* Mill.), *Journal of Ornamental Plants*, 4(4):253-261.
- Kiviharju, E., Tuominen, U., Törmälä, T. 1992. The effect of explant material on somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill., *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 28:187-194.
- Kocak, M., Izgu, T., Sevindik, B., Tutuncu, M., Curuk, P., Simsek, O., Kaçar, Y. A., da Silva, J. A., Mendi, Y. Y. 2014. Somatic embryogenesis of Turkish *Cyclamen persicum* Mill., *Scientia Horticulturae*, 172:26-33.

- Koçak, M. 2012. Siklamen (*Cyclamen persicum*)’de somatik embriyogenesisin optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s. 53.
- Koçak, M. 2019. *Cyclamen coum*’da somatik embriyogenesis yöntemi ile rejenerasyonun araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s.122.
- Kreuger, M., Postma, E., Brouwer, Y., Van Holst, G. J. 1995. Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* in liquid medium, *Physiologia Plantarum*, 94(4):605-612.
- Kurt, O., Evans, G.M., Avcıoğlu, R. 1994. Anter kültürü tekniği ile haploid bitki elde edilmesini etkileyen faktörler, E.Ü.Z.F. Tarla Bit. Böl. Tarla Bit. Bilimi Derneği TÜBİTAK ve ÜSİGEM Bitki Islahı Kong. Bild., Bornova-İzmir.
- Kurtar, E. S., Balkaya, A., Okumuş, N. Ö. 2011. Karadeniz Bölgesi Kestane Kabağı (*Cucurbita maxima* Duchesne) ve Bal Kabağı (*Cucurbita moschata* Duchesne) Populasyonlarından Selekte Edilmiş Genotiplerde Işınlanmış Polen Tekniği ile Haploid Embriyo ve Bitki Eldesi. Proje sonuç raporu, Proje No: 108 O 390, s.195.
- Kurtar, E. S. 2009. Influence of gamma irradiation on pollen viability, germination ability, and fruit and seed-set of pumpkin and winter squash, *African Journal of Biotechnology*, 8(24).
- Kurtar, E. S., Balkaya, A., Göçmen, M., Karaağaç, O. 2017. Hıyara (*Cucumis sativus* L.) Anaç olabilecek ümitvar kabak (*Cucurbita* spp.) genotiplerinde ışınlanmış polen tekniği ile dihaploidizasyon, *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 31(1):34-41
- Kurtar, E. S., Balkaya, A., Özbakır, M., Ofluoğlu, T. 2009. Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir), *African Journal of Biotechnology*, 8 (21):5944-5951.

- Kurtar, E.S.1999. Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) haploid embriyo uyartımı ve bitki oluşturma üzerinde araştırmalar, Doktora Tezi, ukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana.
- Livingston, G. K., Stettler, R. F. 1973. Radiation-induced stimulation of pollen-tube elongation in Douglas-fir, *Radiation Botany*, 13(2):65-72.
- Loewenberg, J. R. 1969. Cyclamen callus culture, *Canadian Journal of Botany*, 47: 2065-2067.
- Lyngved, R., Renaut, J., Hausman, J. F., Iversen, T. H., Hvoslef-Eide, A. K., 2008. Embryo-specific proteins in *Cyclamen persicum* analyzed with 2-D DIGE, *Journal of Plant Growth Regulation*, 27:353-369.
- Mayer, L. 1956. Wachstum und organbildung an in vitro kultivierten segmenten von *Pelargonium zonale* und *Cyclamen persicum*, *Planta*, 47:401-446.
- Meynet, J., Barrade, R., Duclos, A., Siadous, R. 1994. Dihaploid plants of roses (*Rosa x hybrida*, cv. 'Sonia') obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds, *Agronomie*, 2:169-175.
- Morel, G. 1975. La multiplication vegetative du *Cyclamen* a partir de petiole foliaire permettra-t-elle une nouvelle application de la culture *in vitro* a l'horticulture, *Pepin. Hort. Maraichers*, 158:25-28.
- Murovec, J., Bohanec, B. 2013. Haploid induction in *Mimulus aurantiacus* Curtis obtained by pollination with gamma irradiated pollen, *Scientia horticulturae*, 162:218-225.
- Naderi, R., Jalali, N., Babalar, M., Mirmasoumi, M. 2012. Estimate of Callus induction and somatic embryogenesis in *Cyclamen*, *The International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(11):699-702.
- Norton, J. D. 1966. Testing of plum pollen viability withtetrazolium salts, *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 89:132-134.

- Obert, B. Žáčková, Z., Šamaj, J. Preťová, A. 2009. Doubled haploid production in Flax (*Linum usitatissimum* L.), *Biotechnology Advances*, 27:371-375.
- Olsen, F. L. 1991. Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgave* L.), *Hereditas* 115, 255-266.
- Özcan, C. 2017. Ispanakta (*Spinacia oleracea* L.) anter kültürü ve ışınlanmış polenle tozlama yöntemi ile haploidizasyon, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s. 138.
- Pandey, K. K., Phung, M. 1982. Hertwig effect'in plants: induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen, *Theoretical and Applied Genetics*,62(4): 295-300.
- Pandey, S., Kumar, G. 2013. Hazardous effect of gamma-rays on *in vitro* pollen germination and pollen tube growth in *Linum usitatissimum* L., *Chromosome Botany*, 8(2):31-34.
- Pirrie, A. 1985. The use of haploid systems in plant genetic manipulation, PhD Thesis, University of Nottingham. pp. 269.
- Prange, A. N. S., Serek, M., Bartsch, M., Winkelmann, T. 2010. Efficient and stable regeneration from protoplasts of *Cyclamen coum* Miller via somatic embryogenesis, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 101:171-182.
- Raquin, C. 1985. Induction of haploid plants by *in vitro* culture of *Petunia* ovaries pollinated with irradiated pollen, *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung*, 94,166-169.
- Raquin, C., Cornu, A., Farcy, E., Maizonnier, D., Pelletier, G., Vedel, F. 1989. Nucleus substitution between petunia species using gamma ray induced androgenesis, *Theoretical and Applied Genetics*, 78:337-341.
- Reed, S. M. 2005. Haploid culture. *Plant Development and Biotechnology*. Editörler: Trigiano, R. N., Gray, D. J. NW, USA: CRC press.
- Rodriguez-Riano, T., Dafni, A. 2000. A new procedure to asses pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, 12(4):241-244.

- S. Ellialtıoğlu, N. Sarı, K. Abak (2001). Haploid plant production. Plant biotechnology I – tissue culture and applications. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya: Selçuk Üniversitesi Yayınları.
- Sarı, N. 1994. Karpuzlarda ışınlanmış polen uyartımıyla haploid bitki eldesi üzerine genotipin ve mevsimin etkisi ile ışınlama yerine geçebilecek uygulamalar üzerinde araştırmalar, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 244s.
- Sarı, N., A. K., Pitrat, M., Dumas De Vaulx, R. 1992. Kavunlarda (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naud ve *C. melo* L. var. *reticulatus* Naud) partenogenetik haploid embriyo uyartımı ve bitki eldesi, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 16:302-314
- Sato, S., Katoh, N., Yoshida, H., Iwai, S. and Hagimori, M. 2000. Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture, Scientia Horticulturae, 83:301- 310.
- Savona, M., Ruffoni, B., Giovanni, A., Altamura M. M., *Cyclamen persicum* Mill. cv. 'Halios': somatic embryogenesis and phenotypic analysis of somatic embryo-derived plants. Acta Hortic., 743, pp. 91-98
- Schwartz-Tzachor, R., Eisikowitch, D., Dafni, A. 2008. Flower characteristics and breeding system of two phenological ecotypes of *Cyclamen persicum* Mill. (*Myrsinaceae*) in Israel, Plant Systematics and Evolution, 274(1-2):127-134.
- Schwenkel, H. G., Winkelmann, T. 1998. Plant regeneration via somatic embryogenesis from ovules of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Tissue Cult. Biotechnol., 4, pp. 28-34.
- Sestili, S., Ficcadenti, N. 1996. Irradiated pollen for haploid production. *In vitro* Haploid Production in Higher Plants (pp. 263-274). Dordrecht, Springer.
- Sevindik, B. 2018. Siklamende anter ve ovül kültürü yöntemleri ile haploid bitkilerin elde edilmesi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s. 175, Adana

- Seyring, M., Ewald, A., Mueller, A., Haensch, A. 2009. Screening for propagation suitability in vitro of different *Cyclamen* species, *Electronic Journal of Biotechnology*, 12, 4.
- Shivanna, K. R. 2003. *Pollen Biology and Biotechnology*, Boca Raton: CRC Press.
- Sitbon, M. 1981. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by *in vitro* culture of unfertilized ovules, *Agronomie, EDP Sciences*, 1(9):807-812.
- Sopory, S. K., Munshi, M. 1996. Anther culture. In vitro Haploid Production in Higher Plants. Editörler: Mohan, J. S., Sopory, S. K., Veilleux, R. E. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Vol 1, pp. 145-176.
- Stichel, E. 1959. Gleichzeitige induktion von sporossen and wurzeln and *in vitro* kultivierten gewebestücken von *Cyclamen persicum*, *Planta* 53:293-317.
- Stone, J. L., Thomson, J. D., Dent-Acosta, S. J. 1995. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review, *American Journal of Botany*, 82:1186-1197.
- Süsbir (Süs Bitkileri Üreticileri Alt Birliği), 2019. Sektör istatistikleri. <http://susbir.org.tr/index.php/2016-03-27-11-11-37/sector-istatistikleri>,
- Süsbir (Süs Bitkileri Üreticileri Alt Birliği). 2015. Türkiye’de süs bitkileri sektörü, *Süsbir Haber İlkbahar*, 1:6-11.
- Şehirali, S., Özgen, M. 2007. Bitki ıslahı. Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayın no: 1553, Ders kitabı, 506.
- Takamura, T, Miyajima, I., Matsuo, E.1995. Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. 'Anneke' from aseptic seedlings, *Plant Cell Reports*, 15:22-25.
- Takamura, T., Miyajima, I. 1996. Cross-compatibility and the ploidy of progenies in crosses between diploid and tetraploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.), *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 64:883-889.

- Takamura, T., Nakao, T., Tanaka, M. 1996. Effects of light and temperature on the *in vitro* germination of cyclamen [*Cyclamen persicum*] pollen grains, Technical Bulletin of Faculty of Agriculture-Kagawa University (Japan).
- Takamura, T., Tanaka, M. 1996. Somatic embriyogenesis from the etiolated petiole of cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.), Plant Tissue Culture Letters, 13 (1), 43-48.
- Taskın, H., Yucel, N. K., Baktemur, G., Çömlekçioğlu S., Büyükalaca, S. 2013. Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization with irradiated pollen technique in watermelon (*Citrullus lanatus* L.), Canadian Journal of Plant Science, 93:1165-1168.
- Theologis, A. 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: The role of ethylene in fruit ripening, Cell 70, 181–184.
- Thomson, J. D., Rigney, L. P., Karoly K. M., Thomson, B. A. 1994. Pollen viability, vigor, and competitive ability in *Erythronium grandiflorum* (*Liliaceae*), American Journal of Botany, 81:1257–1266.
- TOB (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı), 2018. Doğal Çiçek Soğanlarının 2019 Yılı İhracat Listesi Hakkında Tebliğ. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2018/12/20181212-7.htm>
- TÜBİVES. 2019. Türkiye Bitkileri Veri Servisi. <http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php>
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu), 2020. Bitkisel üretim istatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>, Son Erişim Tarihi:01.01.2020
- Tütüncü, M., Mendi, Y.Y, Ratjens, S., Bartsch, M., Winkelmann, T. 2016. Sitokinin uygulamalarının siklamende (*Cyclamen persicum* L.) somatik embriyoların farklılaşması üzerine etkileri, VI. Süs Bitkileri Kongresi, 16-22 Nisan, Antalya, s.142.

- Tütüncü, M., Özcan, M., Mendi, Y. Y. 2019. Bazı siklamen türlerinde farklı doku kültürü ortamlarının gynogenesis üzerine etkileri, Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 34(3):239-249.
- Wainwright, H., Harwood, A. C. 1985. *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissue, Journal of Horticultural Science, 60 (3): 397-403.
- Wicart, G., Mouras, A., Lutz, A., 1984. Histological study of organogenesis and embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. Tissue cultures: evidence for a single organogenetic patterns, Protoplasma, 119:159-167.
- Winkelmann, T., Heintz, D., Van Dorsselaer, Serek, M., Braun, H. P. 2006. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology, Planta 224: 508-519.
- Winkelmann, T., Ratjens, S., Bartsch, M., Rode, C., Niehaus, K., Bednarz, H. 2015. Metabolite profiling of somatic embryos of *Cyclamen persicum* in comparison to zygotic embryos, endosperm, and testa, Frontiers in plant science, 6, 597.
- Yanmaz, R., Ellialtıoğlu, Ő. Taner, K. Y.1999. The effects of gama irradiation on pollen viability and haploid plant formation in snake cucumber (*Cucumis melo* L. var. *flexuous* Naud.), Acta Hort. 492:307-310
- Yesson, C., Culham, A. 2006. A phyloclimatic study of *Cyclamen*, BMC Evolutionary Biology 6, 72.
- Yılmaz, Ö. 2005. Yazlık kabakta (*Cucurbita pepo* L.) ovaryum kültürü yoluyla haploid bitki elde edilmesi, (Yüksek Lisans Tezi), Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Yigit, D. 2014. Lazer ışınlarının sakı elma çeşidine ait polenlerdeki bazı fizyolojik özelliklere etkisi, Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 1(1):17-26.

- You, C. R., Fan, T. J., Gong, X. Q., Bian, F. E., Lian, L. K., Qu, F. N. 2011. A high-frequency cyclic secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill., *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 107:233-242.
- Zheng, M. Y. 2003. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*)-doubled haploid production via induced embryogenesis, *Plant Cell. Tiss. and Organ Cult.*, 73, pp. 213-230.





ÖZGEÇMİŞ

Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldu. 2011-2013 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yaptı. 2014 yılında aynı enstitüde yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2013 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süs Bitkileri Yetiştiriciliği ve Islahı Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2016 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans eğitimini tamamladı ve aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Programı'nda doktora eğitimine başladı. Halen, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süs Bitkileri Yetiştiriciliği ve Islahı Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.