



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA PROGRAMI

**TESCİLLİ HAŞHAŞ ÇEŞİTLERİNDE (*Papaver somniferum* L.)
ANDROGENESİS YOLUYLA HAPLOİD BİTKİ ELDESİ**

DOKTORA TEZİ

Elif KAYMAK ÜSTÜN

Birinci Danışman: Dr.Öğr. Üyesi Emel CANPOLAT

İkinci Danışman: Prof.Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

TOKAT 2022

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Emel CANPOLAT ve Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR danışmanlığında hazırlamış olduğum “Tescilli Haşhaş Çeşitlerinde (*Papaver somniferum* L.) Androgenesis Yoluyla Haploid Bitki Eldesi” adlı doktora tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

28/09/2022

Elif KAYMAK ÜSTÜN

JÜRİ KABUL VE ONAY

Elif KAYMAK ÜSTÜN tarafından hazırlanan “Tescilli Haşhaş Çeşitlerinde (*Papaver somniferum* L.) Androgenesis Yoluyla Haploid Bitki Eldesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 29.08.2022 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Başkan) : Prof.Dr. Lokman ÖZTÜRK

Üye (Danışman): Dr. Öğr. Üyesi Emel CANPOLAT

Üye : Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL

Üye : Doç. Dr. Sibel DAY

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Sam MOKHTARZADEH

ONAY

Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

TESCİLLİ HAŞHAŞ ÇEŞİTLERİNDE (*Papaver somniferum* L.) ANDROGENESIS YOLUYLA HAPLOİD BİTKİ ELDESİ

Kaymak Üstün, Elif

Doktora, Biyoloji Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Emel Canpolat

İkinci Danışman: Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar

Eylül 2022, xi + 78 sayfa

Haşhaş (*Papaver somniferum* L., $2n=22$) tarım, ilaç, sanayi ve ticaret sektörlerinde kullanılan önemli bir bitkidir. Haşhaş kapsüllerinde, özellikle narkotik morfin, antitussif kodein ve kas gevşetici papaverin olmak üzere birçok benzilizokinolin tipi alkaloid bulunmaktadır. Anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birinin genotip olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada haşhaşın 18 çeşidinden dihaploid bitki elde edilmesi amaçlanmıştır. Dihaploidizasyon için toplamda 8100 anter eksplant olarak kullanılmıştır. Yalnızca Ofis-95 çeşidine ait 16 saatlik ışık fotoperiyodundaki eksplantlardan %0.03 oranında spontan dihaploid bitkiler elde edilmiştir. Diğer eksplantlar üzerinde yaygın olarak kararma izlenmiştir. Ploidi analizinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda dihaploid bitkilerde kromozom sayısı $2n=22$ olarak doğrulanmıştır. Yapılan çalışmalar ile haşhaşta dihaploid bitki üretiminin genotipe özgü olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışma gelecekte bu alanda yapılacak çalışmalar için önemli bir temel teşkil etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Androgenez, yerel haşhaş çeşitleri, tıbbi bitki, ploidi, spontan dihaploid, kromozom katlaması

ABSTRACT

HAPLOID PLANT OBTAINING THROUGH ANDROGENESIS IN REGISTERED POPPY VARIETIES (*Papaver somniferum* L.)

Kaymak Üstün, Elif

Doctorate Thesis, Biology Department

Advisor: Asst. Prof. Emel CANPOLAT

Second Advisor: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

September 2022, xi + 78 pages

Poppy (*Papaver somniferum* L., $2n=22$) is an important plant species used in agriculture, medicine, industry and commerce. There are many benzyloquinoline-type alkaloids found in poppy capsules, particularly the narcotic morphine, the antitussive codeine, and the muscle relaxant papaverine. It is thought that one of the most important factors affecting success in anther culture is genotype. The aim of this study was to obtain dihaploid plants from 18 local poppy varieties. A total of 8100 anthers were cultured for dihaploidization. However, %0.03 anthers belonging to Office-95 variety induced spontaneous dihaploid plants under 16-hour light photoperiod. Rest of the plants showed necrosis. The results obtained from the ploidy analyzer confirmed the chromosome number of $2n = 22$ in dihaploid plants. Our research has shown that dihaploid plant production in poppy is genotype specific. This study constitutes an important basis for future studies in this field.

Keywords: Androgenesis, native poppy varieties, medicinal plant, ploidy, spontaneous dihaploid, chromosome doubling

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ETİK SÖZLEŞME.....	i
JÜRİ KABUL VE ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ / KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1. Bitki Islahı ve Islah Yöntemleri.....	6
2.2.Haploid Bitki Elde Etme Yöntemleri.....	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1.Cihazlar	22
3.1.2.Kullanılan kimyasal maddeler.....	22
3.1.3. Çalışmada kullanılan haşhaş çeşitleri.....	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Toprak analizi.....	24
3.2.2. Donör bitkilerin yazlık ve kışlık ekimi.....	24
3.2.3.Tomurcuk alım aşamasının tespiti.....	26
3.2.4.Tek çekirdekli mikrospor aşamasının tespiti.....	27
3.2.5. Anter kültürü uygulamaları	27
3.2.6. Büyüme ortamları ve kültür koşulları.....	28
3.2.7.Stok solüsyonlarının hazırlanması.....	28
3.2.8. Sterilizasyon	29
3.2.9. Soğuk stresi uygulamaları	30

3.2.10. Anterlerin kültüre alınması.....	30
3.2.11. İnkübasyon	31
3.2.12. Kallus oluşumu ve adventif sürgün gösteren eksplantların rejenerasyon ortamına aktarılması	31
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	34
4.1. İklim ve Meteoroloji Verileri	34
4.2. Toprak Analizi	35
4.3. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi	36
4.3.1. Tohum çıkış süreleri	36
4.3.2. Kışlık ekim	38
4.3.3. Yazlık ekim	38
4.4.En Uygun Açı ve Zamanın Belirlenmesi.....	43
4.5. Tek Çekirdekli Polenlerin Belirlenmesi.....	45
4.6. Sterilizasyon.....	45
4.7. Anterlerin Kültüre Alınması	46
4.8. Ploidi Analizi Sonuçları	51
SONUÇ ve ÖNERİLER	52
KAYNAKÇA.....	54
EKLER.....	62

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge No	Sayfa
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihaz ve markaları.....	22
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan başlıca kimyasallar.....	22
Çizelge 3.3 Çeşitlere ait tedarik bilgileri.....	23
Çizelge 3.4. Deneme alanlarının toprak analizi sonuçları.....	24
Çizelge 3.5.Murashige ve Skoog (1962), ortamında bulunan maddeler ve konstrasyonları.....	30
Çizelge 3.6. Anter kültüründe başlangıç besin ortamları ve içerikleri.....	31
Çizelge 4.1 Ekim yapılan 2014-2015 vejetasyon ve generatif dönemine ve uzun yıllar ortalamalarına ait iklim verileri.....	35
Çizelge 4.2 18 adet haşhaş çeşidine ait tohumların kışlık (Kasım) ve yazlık (Şubat) ekimlerine ait çimlenmeleri sonucu elde edilen çıkış gün sayıları.....	37
Çizelge 4.3 Haşhaş (<i>P. somniferum</i>)'in 18 adet çeşidine ait gün süreleri ile ilgili verileri (kışlık ekim).....	40
Çizelge 4.4 Haşhaş (<i>P. somniferum</i>)'in 18 adet çeşidine ait gün süreleri ile ilgili verileri (yazlık ekim)	42
Çizelge 4.5 Anterlerin kültüre alındığı ilk besin ortamları ve ön uygulamalarına ait sonuçlar.....	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Taşlıçiftlik Kampüsü deneme alanlarında yetiştirilen kışlık <i>Papaver somniferum</i> bitkilerinin genel görünümü (20 Mayıs 2015).....	2
Şekil 2.1. Haploid bitki üretim yöntemleri.....	8
Şekil 2.2. Anter kültürünün yapılışı. (a) Direkt <i>in vitro</i> androgenesis, (b) Dolaylı <i>in vitro</i> androgenesis.....	9
Şekil 3.1 Tarlanın ekime hazırlanması.....	25
Şekil 3.2 Haşhaş Ofis 95 çeşidine ait bitkilerin ekiminden sonra tohumların çimlenmesi (a) bitki çıkışı (b, c, d, e) bitki büyümesi (f) tomurcuğun oluşumu ile ilgili aşamaları.....	26
Şekil 3.3 Haşhaş tomurcuklarının (a) sabun ile temizlenmesi, (b,c) sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu ve (d) anterlerin tomurcuklarından çıkartılması.....	29
Şekil 3.4 Mikrospor ve polen gelişiminin şematik gösterimi.....	32
Şekil 4.1 Tomurcukların yaklaşık (a) -90°, (b) -30°, (c) 0°, (d) 30° (e) 45°, (f) 60°, (g) 90° derecelik açılarda görünümü.....	43
Şekil 4.2 Tek çekirdekli mikrosporların tespiti amacıyla her 18 çeşidine ait tomurcukların yaklaşık ~ (-)90° – (+)90° açılarının şematik görüntüleri.....	44
Şekil 4.3 Anterlerin stereo mikroskopta görünüşü.....	44
Şekil 4.4. Çiçek sapıyla yaklaşık 45 derecelik açı yapan <i>P. somniferum</i> Ofis 95 çeşidinde tek çekirdekli mikrospor evresinin tespiti.....	45
Şekil 4.5 (a) Kallus ve somatik embriyo oluşumu (b) Somatik embriyoların olgunlaşma (c) Elde edilen bitkilerin saksılara aktararak alıştırılması (d) Alıştırılmış bitkilerin çiçeklendirmek amacıyla büyük saksılara aktararak açık havada büyütülmesi.....	49
Şekil 4.6 Ploidi analizine ait sonuç grafiği.....	51

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
MÖ	Milattan önce
DNA	Deoksiribonükleik asit
RLFP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
BA	6 -Benzilaminopürin
ABA	Absisik Asit
NaOCl	Sodyum hipoklorit (çamaşır suyu)
K	Kinetin
BAP	6-Benzilaminopürin
NAA	Naftalen Asetik Asit
KNA	Potasyum Naftalen Asetat
2,4-D	2,4- Diklorofenoksiasetik Asit
IAA	İndol-3 Asetik Asit
GA₃	Giberellik Asit
EtOH	Etil Alkol
TDZ	Thidiazuron
IBA	İndol-3 Bütirik Asit
AK	Aktif Karbon (Kömür)
N6	Chu besi yeri
MN6	Modifiye N6 ortamı
MS	Murashige ve Skoog temel besin ortamı
NN	Nitsch and Nitsch temel besin ortamı
B5	Gamborg's temel besin ortamı

DH	Double-haploid
PVP	Polivinilpirolidon
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
KNO	Potasyum nitrat
NH₄NO₃	Amonyum nitrat
MgSO₄. 7H₂O	Magnezyum sülfat
CaCl₂.2H₂O	Kalsiyum klorür
KH₂PO₄	Mono potasyum fosfat
MnSO₄.H₂O	Mangan sülfat
ZnSO₄	Çinko sülfat
H₃BO₃	Borik asit
KI	Potasyum iyodür
Na₂MoO₄. 2H₂O	Sodyum molibdat
CuSO₄. 5H₂O	Bakır sülfat
CoCl₂. 6H₂O	Kobalt klorür
Na₂EDTA	Sodyum EDTA
IAA	İndol 3-asetik asit
NAA	Naftalin asetik asit
BAP	Benzilaminopürin
2,4-D	Diklorofenoksiasetik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
AgNO₃	Gümüş nitrat
P₂O₅	Fosfor pentoksit
K₂O	Potasyum oksit
PEG	Polietilen glikol
PE	Polietilen
Atm	Atmosfer

Simgeler	Açıklama
n	Haploid kromozom sayısı
2n	Diploid kromozom sayısı
DH	Doubled haploid
°C	Santigrat derece
kg/da	Kilogram bölü dalton
mg/l	Miligram bölü litre
mgL⁻¹	Miligram bölü litre
mg/ml	Miligram bölü mililitre
ml/l	Militre bölü litre
g/l	Gram bölü litre
N	Normal
dk	Dakika
Lux	Birim alana düşen ışık akısı ölçü birimi
m²	Metrekare
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
l	Litre
mg	Miligram
cm	Santimetre
mm	Milimetre
ddH₂O	Çift distile su
Gy	Gray (Işın Soğurulma Birimi)
g	Gram
%	Yüzde

1.GİRİŞ

Papaver somniferum ($2n=22$) *Papaver* cinsinin bir üyesi olup, tek yıllık bir bitkidir (Hammer ve Fritsch, 1977, Vašek ve ark., 2019). Genel olarak bitkinin yetiştirilmesi Kuzey yarım kürede Hindistan Mumbai'den Rusya Moskova'ya ve Güney yarım kürede Avustralya'dan Tazmanya'ya kadar geniş bir coğrafi alanı kapsamaktadır (Krikorian ve Ledbetter, 1975, Muhammad ve ark., 2021). Türkiye ve yakın çevredeki İran, Azerbaycan, Ermenistan, Afganistan ve Pakistan gibi ülkelerde doğal olarak yetiştirilmektedir (Davis ve ark., 1988, Muhammad ve ark., 2021).

Papaveraceae familyası 28 cins ve teşhisi yapılmış yaklaşık 250 tür bitkiyi kapsamaktadır. Bu familyaya mensup bitkiler dünyada kuzey yarım kürenin ılıman ve subtropik bölgelerinde yayılış göstermektedir. Türkiye'de ise bu familyaya ait 5 cins bulunmaktadır (Seçmen ve ark., 1995, Muhammad ve ark., 2021). Bu cinslerden birisi olan *Papaver* cinsinin dünya üzerinde 110 kadar türü olduğu bildirilmektedir (Kapoor 1995, Hosokawa ve ark., 2003). Bu türler içerisinde en çok araştırılan *Papaver somniferum*, *P. bracteatum*, *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale*'dir. Yabani haşhaş türlerinden *P. bracteatum*, *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale*, Kafkasya (Gürcistan, Azerbaycan, Ermenistan), İran ve Türkiye'de bulunmaktadır (Parmaksız 2004, Butnariu ve ark., 2022). Bu türler bir, iki veya çok yıllık otsu bitkilerdir (Şekil 1). Tek yıllık türler zayıf bir kök sistemine sahipken, iki ve çok yıllık olan türlerin kök sistemi daha güçlüdür. *Papaver* cinsinin çiçekleri tek, salkım veya bileşik salkım şeklindedir. Çoğunlukla gösterişli çiçeklere sahip olup, çiçek renkleri beyaz, eflatun, pembe veya kırmızı olabilmektedir. Bitkilerin meyvesi bir kapsül olup, kapsül çapı 5-7 cm olan türler mevcuttur (Smith ve Fletcher, 1949, Davis, 1982,). Türkiye'de bulunan 10'u endemik olmak üzere 36 yabani *Papaver* türü, 20 kadar da alt türü ve varyetesinin de bulunduğu göz önüne alınırsa, haşhaşın orijin merkezi olduğu kolayca anlaşılmaktadır. Bu, aynı zamanda Türkiye'nin *Papaver* türleri bakımından ne kadar zengin olduğunu da göstermektedir (Arslan ve ark., 2011). *Papaver* L. cinsi 9 seksiyon altında gruplandırılmaktadır. Kültürü yapılan ve haşhaş olarak bilinen *P. somniferum* bitkisi Papaver seksiyonu içerisinde yer almaktadır (Sarıyar, 2002). *P. somniferum*' un iki alt türü vardır: *P. somniferum ssp. spontaneum* ve *P. somniferum ssp.anatolicum*. Bu alt

türlerden birincisinin kapsülleri olgunlaşınca üstten delikler açılmakta ve tohumları dökülmektedir. Bu alt türe Türkiye’de “açık haşhaş” adı verilmektedir. İkinci alt türün kapsülleri olgunlaşınca açılmaz; bu alt tür de Türkiye’de “kör haşhaş” olarak bilinmektedir. Türkiye’de ağırlıklı olarak *P. somniferum ssp. anatolicum* alt türünün beyaz ve mor çiçekli varyeteleri tarımsal amaçlı olarak kullanılmaktadır (Tanker, 2003). Sistematikteki yeri şu şekildedir (Seçmen ve ark., 1995):

Alem	: Plantae
Alt Alem	: Tracheobionta
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Alt Sınıf	: Magnoliidae
Takım	: Papaverales
Familiya	: Papaveraceae
Cins	: Papaver
Tür	: <i>Papaver somniferum</i>



Şekil 1. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Taşlıçiftlik Kampüsü deneme alanlarında yetiştirilen kışlık *Papaver somniferum* bitkilerinin genel görünümü (20 Mayıs 2015)

Haşhaş bitkisinde rüzgâr aracılığıyla gerçekleşen bir çiçekten diğerine polen aktarımı da mümkündür (Patra ve ark., 1992). Afyon haşhaşında çevresel faktörlere bağlı olarak çeşitli oranlarda yabani dölleme olsa da ağırlıklı olarak %70-72'lik oranında kendi kendini tozlayan bir tür olduğu bilinmektedir (Campbell ve ark., 2019).

Afyon, haşhaşın kesiksiz olgunlaşmamış kapsülünün hava ile kurutulmuş özüdür. Günümüzde hala kullanılan geleneksel afyon üretimi, haşhaş tohumu kapsülünün ekilmesi ve ekstrüde edilmiş (çıkarılmış) meyve suyunun toplanması ve kurutulmasından ibarettir (Azcan ve ark.,2004).

Haşhaş bitkisinden alınan özler, insanlar tarafından en az 3500 yıl boyunca ağrıyı azaltmak için kullanılmıştır. Morfin ve diğer önemli alkaloidlerin üretimi uzun yıllar afyondan yapılmıştır. Afyon herhangi bir kimyasal dönüşüm olmadan kendi başına bağımlılık üretebilir. Morfin, ağırlıklı olarak her türlü şiddetli ağrıyı hafifletmek için kullanılan maddedir ve bitkide çeşitlere bağlı olarak %7-17 aralığındaki başlıca alkaloid madde olarak bulunmaktadır (Yadav, 2008). Morfin, kodein, tebain, narkotin ve papaverin bitki tarafından üretilen en önemli alkaloidlerdir ve ilaç endüstrisi tarafından analjezik (ağrı kesici), antitussif (öksürük dindirici), anti-spazmodik (spazm çözücü), hipnotik ve sakinleştirici olarak kullanılmaktadır. Afyon tohumları narkotik özelliklerden yoksundur, yağ asitleri ve protein bakımından zengindir. Afyonun tıbbi veya süs amaçlı kullanımının yanı sıra, tohum ile tohum yağı için bir kaynak olduğu da düşünülmektedir. Afyon tohumları, yüksek oranda oleik ve linoleik asitler içeren %50 kadar yenilebilir yağ içermektedir. Yağ, yemek amaçlı ve salata sosunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Sert ve parlak bir film oluşturan sararmaz kurutma yağıdır ve bu nedenle endüstriyel boyalar, vernik ve sabun imalatında da kullanılmaktadır. Tohumlar iyi bir enerji kaynağı olup, yağlı kekler ise sığırlar için iyi bir yem olarak kullanılmaktadır (Arslan, 2009).

Türkiye’de 5 bin yıldan beri üretilen ve tıbbi ve endüstriyel bitki olan haşhaş dünyada 140 bin hektar alanda ve Türkiye’de ise 70 bin hektar üretim alanında yasal olarak üretilmektedir. Dolayısıyla, Türkiye haşhaş üretim alanının büyüklüğü ve işlendiği fabrika kapasitesi bakımından dünyada ilk sırada yer almakta ve Birleşmiş Milletler (BM) tarafından Avustralya, Hindistan ve Macaristan’la birlikte öncü ülke olarak kabul edilmektedir. Diğer yandan afyon, yüksek morfin içeriğine sahip tehlikeli bir narkotik ilaçtır. Macar eczacı János Kabay haşhaş samanından direkt olarak gelen morfin

alkaloidlerin ticari üretimi için 1920'lerde bir yöntem tasarlamış ve 1927'de 'Alkaloida' adıyla küçük bir kimya şirketi kurmuştur (Anonim, 2006).

Türkiye'de 1933 yılına kadar haşhaş üretimi serbest iken, bu tarihte uyuşturucu maddelerin üretimini düzenleyen özel bir birimin kurulmasıyla kontrollü üretime geçilmiştir. 1938 yılından beri haşhaş üretimi, satışı ve ticareti Toprak Mahsulleri Ofisi (TMO)'nin denetiminde devam etmektedir. Türkiye'de haşhaş tarımı Çorum, Afyonkarahisar, Burdur, Amasya, Balıkesir, Eskişehir, Denizli, Konya, Isparta, Manisa, Kütahya, Uşak ve Tokat olmak üzere toplam 13 ilde yıllık ortalama 70-71 bin üreticiyle yapılmaktadır (Haşhaş Raporu-2017, TMO). Ekim alanı ve üretim miktarı her yıl farklılaşmasına karşın Türkiye bu geleneksel üründe dünya liderliğini korumaktadır. Ancak 2017 yılı haşhaş üretim miktarının önceki yıla göre %38.7 kadar düştüğü izlenmiştir. Üretilen haşhaşı değerlendirmek ve piyasanın yasal alkaloid gereksinimini karşılamak amacıyla 1981 yılında Afyon Alkaloidleri Fabrikası Bolvadin ilçesinde üretime geçmiştir. Dünyanın en büyük haşhaş işletmesi olan bu fabrika bugün ortalama yıllık 25 bin ton kuru haşhaş işleyip 100 ton morfin üretme kapasitesine sahiptir (Haşhaş Raporu-2017, TMO).

Haşhaş, halihazırda yenilebilir ve yağ üreten tohum için Türkiye ve Macaristan'da yetiştirildiği için morfin ekstraksiyonu bir "yan ürün endüstrisi" haline gelmiştir. Yasal haşhaş üretim bakımından Avustralya, Fransa, Hindistan, İspanya, Macaristan Türkiye'nin rakip ülkeleri sayılmaktadır ve bu ülkelerde hem ekim alanı hemde üretim artışı izlenmektedir. Haşhaş Türkiye ekonomisine 100-120 milyon dolar katkı sağlamaktadır ve dünya morfin ihtiyacının %25'ini karşılamaktadır. Ayrıca, haşhaş kapsülünden elde edilen tohumlar ve üretilen narkotikler ülke ihtiyacı karşıladıktan sonra ihraç edilmektedir. Fabrikada üretilen morfin ve türevlerinin ekonomiye yıllık katkısı 55-60 milyon dolar civarında olup, döviz bazındaki katkısı yılda yaklaşık 100-120 milyon Amerikan doları olarak bilinmektedir (Haşhaş Raporu -2017, TMO).

Genetik olarak (n) kromozom sayısını taşıyan bitki haploid bitki, haploid bitki elde etme işlemi de haploidizasyon olarak tanımlanmaktadır. Haploid bir bitkinin kromozom sayısının (n) bazı kimyasal maddelerle katlanması yoluyla, türün normal kromozom sayısına (2n) yeniden kavuşturulması ve mutlak homozigot bitkilerin elde edilmesi işlemine ise dihaploidizasyon adı verilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2002). Haploid

bitkiler, diploid bir bitkideki tüm organlara sahiptirler ancak hücreleri daha küçük olduğundan morfolojik olarak zayıf, güçsüz, bodur ve daha küçük yapılı bitkiler olup gelişimleri daha yavaştır. Yaprakları dar ve küçük, gövde ve dallarda boğum araları kısa iken, çiçeklenme süresi daha uzundur. Küçük çiçek açarlar ancak sterildirler ve tohum bağlamazlar. Polenleri küçük, anormal şekilli ve içleri boş olup, bu polenlere sahip anterler çatlamaz. Plastid sayıları azdır. Ayrıca stomaları daha küçüktür ve birim alanda daha fazla stoma taşırlar (Emiroğlu, 1982, Er, 1992, Ellialtıoğlu ve ark., 2002). Bu özelliklerinden dolayı normalde hiçbir tarımsal değer taşımayan haploid bitkiler; bitki ıslahı, genetik, sitolojik, fizyolojik, biyolojik ve biyokimyasal çalışmalar için son derece önemli ve değerli materyallerdir. Haploidi teknikleri özellikle ıslah çalışmalarında, yabancı döllen türlerdeki 10-12, kendine döllen türlerdeki 5-7 jenerasyonluk kendileme süresini tek jenerasyona indirerek mutlak homozigotluğu sağlamaktadır. Dioik türlerde veya kendileme depresyonu nedeniyle klasik yöntemlerle homozigotluğa ulaşmanın zor olduğu lahana, çilek, anemon gibi türlerde bu sorun tek bir jenerasyonda çözülebilirken, uzun gençlik kısırlığına sahip çok yıllık meyve ağaçları ve orman bitkilerinde homozigotluk elde etmede çok büyük avantajdır. F₁ hibrit çeşit ıslahında, dihaploid bitkilerden elde edilen saf hatlar ebeveyn olarak kullanılabilir. Mikrosporlardan oluşan embriyolar yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip oldukları için direkt DNA transferi ve gen transferi çalışmalarında etkin şekilde faydalanılabilmektedir. Ayrıca, haploid hücre veya protoplastlar sayesinde farklı patojenler ve bunların fizyolojik ırklarına, antibiyotiklere, toksinlere, herbisitlere, tuza, soğuğa veya ısıya dayanıklı mutantlar *in vitro* seleksiyon imkânı ile küçük bir alanda çok kısa sürede, ekonomik şekilde seçilebilmektedir. Bunların dışında, ıslah etkinliğinin arttırılmasında, saf süper erkek bireyler elde edilmesinde, mutasyon ıslahında, süs bitkilerinin bodurlaştırılmasında, genom haritalarının çıkartılmasında, polijenik karakterlerin haritalanmasında haploid bitkiler özellikle ıslahçı ve genetikçiler için sonsuz avantajlar sunmaktadır (Abak, 1986, Wenzel ve Foroughi -Wehr, 1994, Ferrie ve Keller, 1997, Hatipoğlu, 1999, Ellialtıoğlu ve ark., 2002).

Çoğu bitki türünün anter kültürlerinde en iyi sonuçlar, tek çekirdekli mikrospor döneminin erken veya geç aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerden alınmaktadır. Kendine döllen türlerde bile aynı amaçla 5-7 jenerasyon ve yabancı döllen türlerde heterozigoti oranı çok yüksek olduğundan bunlarda homozigot hatların elde edilmesi için 10-12 jenerasyon kendilemeler yapmak gerekmektedir. Haşhaşa hem morfin verimini artırmak hem de düşürmek için gelenek ıslah yöntemlerinin yetersiz olmasından dolayı alternatif ıslah yöntemlerinin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Bugüne kadar haşhaş bitkisinde haploid/dihaploid bitki üretim konusunda oldukça az çalışma bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında günümüzde kullanılan alternatif ıslah yöntemlerinden biri olan haploid bitki üretimi yöntemi ile genetik ve ıslah alanındaki çalışmalara bir temel oluşturacak şekilde haşhaş bitkisinden dihaploid bitki elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ / KURAMSAL TEMELLER

2.1. Bitki Islahı ve Islah Yöntemleri

Bitki ıslahı, istenen özelliklere sahip tarım ya da süs bitkileri elde etmek amacıyla insan eliyle uygulanan eşleştirme ve seçme yöntemlerine verilen genel isimdir. Doğa koşullarının canlı türlerini seçilime tabi tutmasına benzer şekilde, insanlar da istedikleri özelliklere göre bazı bitkileri seçip diğerlerini eleyerek bitki türlerini bir seçilime tabi tutarlar. Islahın amacı, verimi artırmak, kaliteyi artırmak, üretim alanlarını genişletmek, makinalı tarımı geliştirmek, hastalıklara/zararlılara dayanıklılık, bir örnek ürün yetiştirmek, olumsuz çevre koşullarına dayanıklılık (soğuğa, yüksek sıcaklığa, kurağa, tuza, kirece, vb.) olarak bilinmektedir.

Islahta klasik yöntemler; seleksiyon ıslahı, melezleme ıslahı, mutasyon ıslahı ve poliploidi ıslahıdır.

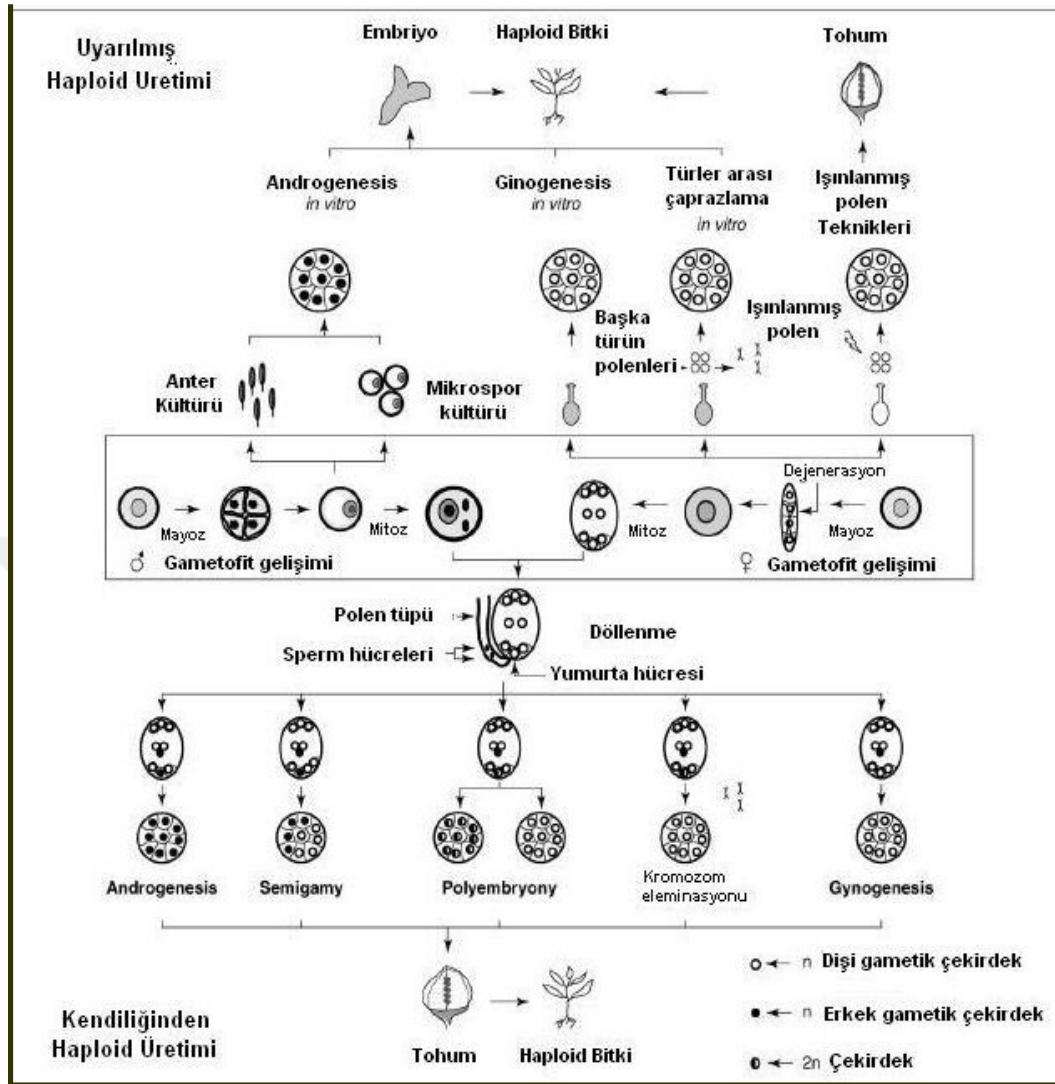
Biyoteknolojik ıslah yöntemleri ise doku kültürleri, marker destekli ıslah ve gen aktarımından oluşmaktadır. Doku kültürü teknikleri; embriyo kurtarma, *in vitro* seleksiyon, somaklonal varyasyon, protoplast kültürü, dihaploidizasyon, embriyogenesis ve rejenerasyon olarak bilinmektedir (Ellialtıoğlu, 2002).

Biyoteknolojik ıslah metodları arasında olan *in vitro* katlanmış haploid tekniği, %100 homozigot hatlar ve kısa sürede homozigotiye yalnızca bir jenerasyonda istenilen özellikte sağlamaktadır (Arı ve ark., 2016). Haploid bitkiler *in vitro* kültürde anter ya da izole edilen mikrosporla (androgenesis), ovül (ginogenesis) veya ışınlanmış polenle (partenogenesis) *in situ* tozlamayla oluşan partenogenetik embriyoların *in vitro* da kurtarılmasıyla elde edilmektedir (Gonzalo ve ark., 2011). Ginogenesis, döllememiş ovaryum, ovül veya dişi gametofitlerin kültüre alınması işlemidir (Zhao ve ark., 2014).

2.2. Haploid Bitki Ede Etme Yöntemleri

Haploid bitkiler 3 yolla elde edilmektedir (Şekil 2.1):

- i. Spontan yolla: İlk doğal haploid, Blakeslee ve ekibi (1922, Arı, 2006) tarafından *Datura stramonium*'da keşfedilmiştir. Doğada androgenesis, ginogenesis, semigami, poliembriyoni veya kromozom eliminasyonu yollarından birisi ile oluşan spontan haploidlerin oluşum frekansı % 0.001–0.01 gibi çok düşük düzeydedir ve bugüne kadar ancak 100 kadar türde rastlanmıştır.
- ii. *In situ* uyartımla: Uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlamının geciktirilmesi, abortif veya ışınlanmış polenlerle tozlama, sıcaklık şokları, değişik kimyasallar, hormon uygulamaları, “X” veya “UV” ışınları ile haploid bitki elde edilebilmektedir (Arı, 2006).
- iii. *In vitro* uyartımla: Androgenesis (anter veya mikrospor kültürü) veya ginogenesis (ovül kültürü, ovaryum kültürü veya embriyo kurtarma) yöntemleri ile laboratuvar koşullarında da haploid bitki elde edilebilmektedir (Arı, 2006). Androgenesis haploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılan en yaygın yöntem olarak kullanılmaktadır.

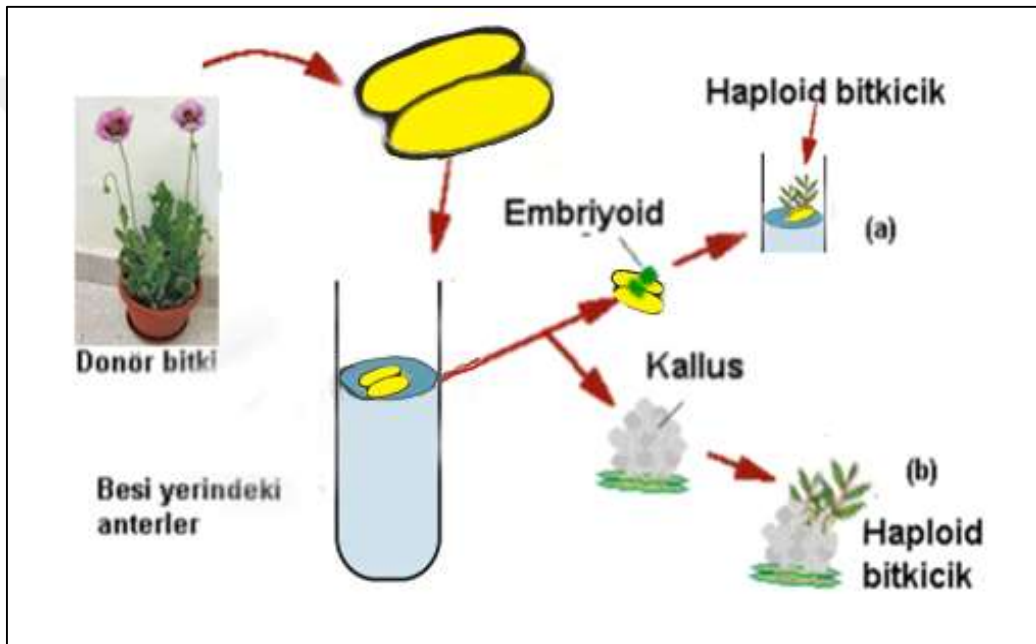


Şekil 2.1. Haploid bitki üretim yöntemleri (Forster ve ark., 2007'den uyarlanmıştır)

In vitro teknikler, özellikle de anter kültürü çalışmaları gibi yöntemler, bitki ıslahı programları için saf hat üretimini önemli ölçüde hızlandırmak amacıyla giderek daha etkin hale gelmiştir. Anter kültürü, bir bitkiden izole edilen anterlerin uygun bir ortama alınarak yeni bitkilerin yetiştirilmesi amacıyla kullanılan bir tekniktir ve aşağıdaki uygulama basamaklarından oluşmaktadır (Şekil 2.2):

- Donör bitkilerin sera veya tarla koşullarında yetiştirilmesi
- Besin ortamları ve bitki hormon çözeltilerinin hazırlanması
- Tek çekirdekli mikrospor evresinin belirlenmesi
- Ön uygulamalar (stres vb.)

- Tomurcukların yüzey sterilizasyonu
- Ortam ve ekipman sterilizasyonu
- Anterlerin çıkarılması ve kültüre alınması
- İnkübasyon
- Haploid bitkilerin dış ortama alıştırılması
- Ploidi analizleri
- Kromozom katlama (kolşisin uygulamaları)
- Dihaploid hatların eldesi ve tohum alınması



Şekil 2.2. Anter kültürünün yapılışı. (a) Direkt *in vitro* androgenesis, (b) Dolaylı *in vitro* androgenesis (Dayan, 2011’den uyarlanmıştır)

Son yıllarda tıbbi sorunların önlenmesi ve tedavisi amacıyla otlar, baharatlar ve tıbbi bitkilerin kullanımında yeniden canlanma olmuştur. Tıbbi bitki türleri üzerine çok az bitki ıslahı veya genetik araştırmalar bulunmaktadır. Bitki yetiştirme sistemlerinin geliştirilmesi ve iki kat haploid (dihaploid) bitki üretimi için geliştirilecek protokoller bu bitki grupları açısından son derece faydalı olacaktır. Bitki ıslah çalışmalarında özellikle haploid ve dihaploid bitki üretimi çok önemlidir. Dihaploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmalarını yapmak kolaylaşmakta ve sonuca daha çabuk ulaşılabilmektedir. Resesif genler dominant genler tarafından maskelenemeyeceğinden, homozigot bireylerde genetik açılımı izlemek daha basit bir işlem haline gelmektedir.

Haploidleri kullanmanın başlıca avantajı, tam bir homozigot bitkiyi çok kısa bir sürede elde etme olanağı sunmasıdır (Ellialtıoğlu ve ark., 2002).

Haploid bitkiler gametofitik kromozom sayısına sahiptir. Özellikle mutasyonların indüklenmesi (uyarılması) ve aynı zamanda homozigot bitkilerin üretimi için yapılan çalışmalarda büyük önem taşımaktadırlar. Bitki yetiştiricileri tarafından üretimleri için kullanılan geleneksel yöntemler zaman alıcı, zahmetli, az verimli ya da verimsizdir. Bazen saf bir hat üretmek yıllarca sürebilir. Dihaploid çeşitlerin hibrit çeşit ıslahında özel bir önemi bulunmaktadır ve çok kısa sürede sonuca ulaşmayı sağlayan homozigotluk sayesinde, farklı genotiplerde bulunan arzu edilen özelliklerin tek bir genotipte toplanması mümkün olmaktadır. Anter kültürünün tüm bitkilere genellenemeyecek, türlere özgü bazı avantajları da bulunmaktadır. Örneğin *Asparagus officinalis* (kuşkonmaz) bitkisinde XY kromozom yapısına sahip erkek bitkilerden anter kültürü yoluyla dihaploid hatlar elde edildiğinde XX ve YY kromozom yapısında bireyler oluşmaktadır. Böylece doğada oluşma olasılığı olan hatlar elde edildiğinde XX ve YY kromozom yapısına sahip bitkilerin (süper erkek veya süper dişi) elde edilebilmesi mümkündür. Ayrıca haploidi, resesif mutasyonların açığa çıkartılması ve bunlardan homozigot bireylerin elde edilmesini de sağlayabildiği gibi; somatik hibridizasyon işleminin diploid protoplastlara göre daha kolay yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. (Özkum ve ark., 2000).

Patlıcan, biber, buğday, asma, nane, kabak çekirdeği, şeker pancarı, çilek, kivi, havuç, lahana gibi bitkilerde anter kültürü çalışmaları yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Türkiye’de biber, arpa, buğday gibi tahıllar üzerinde dihaploid üretim çalışmaları yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. (Özcan ve ark., 2001).

Dihaploid hatların güncel uygulamalarından biri de gen haritalarının çıkartılmasında kullanılmasıdır. DH hatlardan oluşan bir populasyonda; heterozigoti nedeniyle ortaya çıkan intermediyet ekspresyonları rastlanmaz. Bu nedenle de fenotipik işaretleyicilerin (marker) tanımlanması çok daha etkin olabilmektedir. DH hatlarda seçildiği bitkilerde hangi gen olursa olsun (genellikle RFLP ile belirlenmektedir). 1:1 oranında açılmakta ve bu durum poligenik olarak kontrol edilen karakter/lerin haritası çıkartılmak için kolaylık sağlamaktadır (Özcan ve ark., 2001).

Pratik ve temel araştırmalarda kullanılabilecek etkin bir protokol geliştirmek adına optimizasyon gereklidir. Embriyogenezi etkileyen faktörlerin, genotip, donör bitkinin yaşı ve yetişme koşulları, anter içindeki mikrospor durumu, besin ortamı ve ortam bileşenleri, bitki büyüme düzenleyicileri, organik ve inorganik katkı maddeleri, çiçek tomurcuklarına veya anterlere uygulanan ön uygulamalar olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Verimli bir protokol geliştirildikten sonra, yetiştiriciler, ıslah, mutageniz ve transformasyon için metodolojiyi ve sonuğa ortaya çıkan dihaploid hatlarını kullanabilirler. Dihaploid bitkiler, aynı zamanda, bitkilerin biyokimyası ve fizyolojisini ve önemli biyokimyasal yolları incelemek için de yararlı olacaktır.

Haşhaş bitkisinde bulunan alkaloidlerin üretimi ve alkaloid içeriğinin yükseltilmesi amacıyla saf hatların üretilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada, farklı ortam ve hormon konsantrasyonları ile fitohormonlar ve sıcaklıktan etkilenen *Papaver somniferum* bitkisinde haploid kültürünün optimizasyonu için etkili bir protokolün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu konu ile ilgili olarak yapılan benzer çalışmalara ait literatür özetleri aşağıda sunulmuştur.

Dieu ve ark., (1988), haşhaş (*P. somniferum*) ile yaptıkları çalışmada 43 farklı genotip kullanmışlardır. Soğuk stresinin anter kültürü üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla 7 °C’de 2 gün ve 7 °C’ de 7 günlük soğuk şoku uygulaması yapılmıştır. 0.1 mgL⁻¹ BAP ve 0.5 mgL⁻¹ K içeren MS ortamında kültüre alınan, 367 androjenetik kallustan 63 bitki gelişimi gözlenmiştir. Bunlardan 60 tanesi diploid, 2 tanesi kimerik (haplo-diploid) ve 1 tanesi de haploid olarak tanımlanmıştır.

Engin (1991), *Triticum aestivum*’ın (buğday) 6 kültür çeşidi üzerinde yapılan araştırma sonucunda embrioid oluşumunun genotipin yeteneğine bağı olduğunu tespit etmiştir. Bw.5 çeşidinde en fazla embrioid oluşumu, Bw.8 çeşidinde ise en az sayıda embrioid oluşumu gözlemlenmiştir. Anter kültürü denemelerinde bazı çeşitlere ait anterlerde albino bitkilerin oluşumu izlenmiştir. Bw.2 ile Bw.5 çeşitleri 18 °C’de albino bitkiler oluşturmadığı halde, +23 °C ‘de albino bitkiler gözlemlenmiştir. Bw.9 çeşidinde 18 °C’de anormal albino bitkiler elde edildiğı halde, 23 °C’de albino bitkilerin oluşmadığı

gözlenmiştir. Her iki çeşidin somatik embriyo verimi katı ortam üzerinde fazla olmuştur. Albino bitkilerin oluşum oranı artış göstermiştir. Gerek albino gerekse albino olmayan bitkilerin oluşmasının genotip ve çevre koşullarına bağlı olduğu belirtilmiştir.

Baba'nın (1992) çalışmasında arpanın (*Hordeum vulgare* L.) 2 ve 6 sıralı çeşitleri arasında haploid bitki üretimi açısından kıyaslama yapılmıştır. Tarla ve seralarda yetiştirilen bitkilerden elde edilen başaklar 15 ve 30 gün +4 °C'de soğuk ön uygulamasına bırakılmıştır. Kültür ortamına aktarılan, 15 gün soğuk ön uygulamalı anterlerin 15 gün sonra 2 sıralı Gem ve Tokak, Yerçil çeşitlerinde kallus oluşumu ve Gem çeşidinde embriyoid oluşumu gözlenmiştir.

Sakin (1994), *Nicotiana tabacum* L. (tütün) bitkisinin anter kültüründe genotip ve ortamın haploid bitkiler oluşumuna etkisini araştırmıştır. 20 adet tütün genotipinden elde edilen anterler MS ve N₆ ortamlarında kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre sürgün rejenerasyonunun hem genotip hem de kullanılan ortamlardan etkilendiği tespit edilmiştir. MS ortamının N₆ ortamına göre daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

Türkeç (1994), tarafından yapılan çalışmada, farklı genetik materyalden kaynaklanan onbir farklı genotip, üç donör bitki büyüme koşulu (sera, ova ve yayla) ile IAA ve 2,4-D bitki büyüme düzenleyicilerini içeren iki ortam kullanılmıştır. Kallus farklılaşması onbir genotipin dördünde gözlenmiş ve Resy çeşidinden 41 bitki elde edilmiştir. Bu bitkiler farklı ploidi düzeyi göstermişlerdir. %12.1 dihaploid, %22.0 triploid ve %65.9 tetraploid bitki elde edilmiştir. Bu çalışmada, kallus rejenerasyonu üzerine ortamların farklı etkileri olduğu belirlenmiştir. Yayla koşullarında en yüksek kallus oluşumu oranı %12.3 olarak tespit edilmiştir. Ova çeşidinde %6.1 ve sera çeşidinde ise % 1.0 olarak belirtilmiştir.

Savaşkan (1994), Türkiye'de tarımı yapılan dört arpa çeşidinin anter kültürüne cevabını, farklı kültür ve fiziksel ortamlarda araştırmıştır. Tüm çeşitler BAC3 kültür ortamında 21 gün soğuk ön işleminden sonra rejenerasyon göstermişlerdir. Cumhuriyet-50 ve Tokak 157/37 çeşitleri sırasıyla %329.7 ve %531.6 kallus üretimi, %8.9 ve %3.9 yeşil rejenerant bitki oluşum değerleri göstermişlerdir. BAC3 kültür ortamında soğuk ön işlem uygulanmadığı takdirde Cumhuriyet-50 ve Tokak 157/37 çeşitleri yine Anadolu ve Obruk

çeşitlerinden daha iyi sonuçlar vermiştir. FHG kültür ortamında ise anter rejenerasyonu ve kallus üretimine ait değerler karşılaştırıldığında tüm çeşitlerde düşük olduğu belirtilmiştir. Düşük ve zayıf kalitede kallus oluşumundan dolayı FHG kültür ortamından hiç rejenerant bitki alınamamıştır. Çeşitlerde BAC3 ve FHG kültür ortamlarından elde edilen sonuçlar arasında önemli ($p<0.01$) farklılıklar izlenmiştir. BAC3 kültür ortamında soğuk ön işlem yapılmadan ve 21 gün soğuk ön işleminden sonra alınan sonuçlar karşılaştırıldığında kallus üreten anter oranı ve kallus üretimi bakımından ($p<0.01$) önemli farklılık gözlenmiştir. Ayrıca, altı Türk arpa genotipinde (Anadolu, Cumhuriyet-50, Obruk-86, Tokak157/37, Bülbül, Yıldırım) ileride alınacak olan DH hatlarda gametoklonal varyasyonun doğru teşhisi yapılmıştır.

Doğramacı (1995), ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkisinin anter kültüründe genotipler, besi ortamları ve jelleştirici maddelerin haploid bitkilerin üretiminde etkili olduğunu göstermiştir. Çalışmada, Çukurova Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü ıslah programlarında yer alan 10 adet ekmeklik buğday çeşidi ve hattından alınan anterler 2 adet farklı 85D12 ve P2 besin ortamına ve agar, buğday ile mısır nişastasında kültüre alınmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, anter ve rejenerasyon oranının büyük ölçüde genotip, ortam ve ortamı jelleştirici maddelerin etkisi altında olduğu, rejenerasyon oranı bakımından kıyaslandığında P2 ortamının 85D12 ortamına göre daha etkin olduğu, agar ile buğday nişastasında eşit, mısır nişastasında ise artış gözlemlendiği belirtilmiştir.

Kalyon (1995) çalışmasında, Kalecik karası, Hasandede 99R ve RupestrisduLot asma çeşitlerinden anter kültürü çalışmaları yapmıştır. Araştırmacılar çiçek tomurcuklarına 120, 96 ve 72 saat 4 °C'lik ısı şoku vermişler ve 2,4-D/BAP ve NAA/kinetinin farklı kombinasyonlarında anter kültürü ile embriyo oluşumunu izlemişlerdir. Modifiye edilmiş Nitsch ve Nitsch (1969) besin ortamı olarak kullanılmıştır. Erkek çiçekli Rup.du Lot ve 99R genotiplerinin Hasandede ve Kalecik karası üzüm çeşitlerine göre rejenerasyona daha uyumlu oldukları izlenmiştir. Soğuk şoku, genotip ve hormon kombinasyonları arasında etkileşim olduğu, 2,4-D/BAP kombinasyonuna göre daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Yalnız 99R ve Rup.du Lot asmalarına ait anterlerde kallus oluştuğu belirtilmiştir.

Çeliktaş (1995), arpa (*Hordeum vulgare* L.) anter kültürü çalışmasında genotip, soğuk ön muamele süreleri ve 2,4-D konsantrasyonlarının anter kültürü rejenerasyonunda etkili olduğunu saptamıştır. Araştırmada arpa genotipleri farklı sürelerde soğuk muamelelerine tabi tutulmuş ve farklı oranda 2,4-D içeren Nq ortamı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre toplam 14,400 anterden %0.3 oranda rejenerasyon izlenmiştir. Dobra genotipinde % 1.3 rejenerasyon oranı ile en yüksek anter rejenerasyonuna ulaşılmıştır. Aurupa çeşidinde %0.4 ve 82-ÇZT06 genotipinde ise % 0.3 oranında rejenerasyon izlenmiştir. Barberousse/Rhodes genotiplerinde rejenerasyon izlenmemiştir. Soğukla muamele işleminin anter rejenerasyonuna önemli düzeyde etkisinin olduğu belirlenmiştir. Her çeşit için 14 günlük soğuk muamele ile %0.7'lik anter reaksiyonu en ideal olarak saptanmıştır. 21 günlük soğuk muamelede %0.4'lük rejenerasyon oranı izlenmiştir. Ayrıca, araştırmada genotip × soğuk ön muamele süreleri arasındaki etkileşim dikkate alındığında, Kaya, SSCB, 82-ÇZT06, Streangstranken × AÇV-77/2, 82-ÇZT12, gem ve Barberousse /Rhodes çeşitlerine ait anterlerin, farklı soğuk uygulamalarında meydana getirdikleri kallus indüksiyon oranları arasında farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir. Dobra genotipi 14 günlük soğuk muamelesi sonunda %3.8 oranında rejenerasyon gösterirken, bu oran 21 günlük soğuk muamele sürede %2.5 oranına düşmüştür. Araştırmada kullanılan değişik 2,4-D dozlarından elde edilen %0.1-% 0.4 arasındaki rejenerasyon oranları arasında istatistiki olarak benzerlik izlenmiştir. Dobra genotipinde 14 günlük soğuk muamelesi sonunda en fazla anter rejenerasyonu 8 mgL⁻¹ 2,4-D dozunda izlenirken, 21 günlük soğuk muamelesi ile en yüksek rejenerasyona 2 mgL⁻¹ 2,4-D dozu ile ulaşılmıştır.

Biner (1998) çalışmasında, biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisinin anter kültürü çalışmalarında soğuk ve sıcak muamelelerin etkilerini izlemiştir. Bu araştırmada Amazon ve Sirena biber çeşitleri kullanılmıştır. Tomurcukların bir kısmı +4 °C'de 24 saat, diğer kısmı ise 48 saat bekletilmiştir. Elde edilen anterler, 5 mg/1 kinetin ve 2,4-D içeren, 30 gl⁻¹ süktroz ve %1 aktif kömür içeren MS ortamında kültüre alınarak, farklı sıcaklık ile aydınlık uygulaması gibi ön uygulamalarda yapılmıştır. Ardından, anterler 25 °C sıcaklık ile 16 saat aydınlık içerisinde kültüre alınmıştır. Araştırma sonuçlarına göre Sirena çeşidinde en yüksek % embriyo oluşum oranı (%6.18) elde edilmiştir. Amazon çeşidi için ise en yüksek % embriyo oluşum oranı %3.03 olarak belirtilmiştir.

Doğramacı-Altuntepe (2000), çalışmalarında 10 adet tetraploid makarnalık buğday (*Triticum turgidum* L., $2n=4x=28$, AABB) çeşidinden anter kültürü ile rejenerasyon oranını izlemek amacıyla, 3 adet farklı rejenerasyon koşulu ve 4 adet farklı besin ortamında toplam 86.400 anteri kültüre alarak 324 adet bitki elde etmişlerdir. Elde edilen bitkilerden 248 adet yeşil ve 76 adet albino bitki elde edilmiştir.

Turesson ve ark., (2000), tarafından anter kültürü için Almanya, Fransa, İsveç veya Birleşik Krallığa ait toplam 257 ebeveyn buğday ve 38 tritikale hattı kullanılmıştır. Ortalama olarak, başak başına 2.1 yeşil buğday haploidi elde edilmiştir. Tritikalede başak başına 5.3 yeşil haploid bitkisi elde edilmiştir. Tarama deneyinde bir ebeveyn hattın başak başına en az bir yeşil haploid vermesi gerektiği kriteri kullanılarak, 91 F1 buğday yetiştirme kombinasyonunun 88' inden ve 21 F1 ve F2 tritikale hattının her birinden yeşil haploidler üretilmiştir. Buğday üretim programında başak başına ortalama 4.7 yeşil bitki elde edilirken, tritikale programında başak başına ortalama 6.2 yeşil bitki elde edilmiştir.

Çömlekçioğlu (2001), biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla farklı sıcaklık ve ışık uygulamalarının etkilerini araştırmış, çalışmada Sirena ve Amazon biber çeşitleri kullanılmıştır. Tek çekirdekli mikrospor döneminde tomurcuklar toplanmıştır. Bunların bir kısmı $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat, diğer kısmı ise $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat bekletilmiştir. Elde edilen anterler, 5 mg l^{-1} kinetin ve 2,4-D içeren, 30 g l^{-1} süktroz ve % 1 aktif kömür içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Ardından anterler farklı sıcaklık ve aydınlık uygulamalarıyla muamele edilerek 25°C sıcaklık ve 16 saat aydınlıkta kültüre alınmıştır. Araştırma sonuçlarına göre Sirena çeşidinde en yüksek embriyo oluşum oranı (%6.18) $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat ön uygulaması ile 25°C 'de 1 hafta süreyle 24 saat karanlıkta bekletilen anterlerden elde edilmiştir. Amazon çeşidi için ise en yüksek % embriyo oluşum oranı (3.03) $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat ön uygulaması yapıldıktan sonra 25°C 'de 1 hafta süreyle 24 saat karanlıkta bekletilen anterlerde izlenmiştir.

Çetin (2002), araştırmasında Hafızali, Ata şansı ve 99r Asma çeşitlerinde anter kültürü için en uygun rejenerasyon sistemini belirlemeye çalışmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, soğuk uygulaması, besin ortamı, besin ortamlarına eklenen fitohormonların ve fitohormon konsantrasyonlarının etkileri belirlenmiştir. Çalışmada beyaz-sarı, renkli sert-

kırılgan yapılı ve sarımsı-kahverengi ya da kahverenginin değişik tonlarında, sulu, yumuşak, kolay dağılabilen kallus oluşumu sağlanmasına rağmen üzerinde herhangi bir rejenerasyon izlenmemiştir. Elde edilen bu kalluslar renklerine, yapılarına ve görünümlerine göre iki farklı tipte sınıflandırılmışlardır. Kalluslar elde etmek için Ata sarısı çeşidinde soğuk uygulaması yapılmadan 0.5 mgL^{-1} NAA, 1.0 mgL^{-1} kinetin, 20 gL^{-1} sakkaroz ve 6 gL^{-1} gelrite agar katkılı NN ortamı, Hafızali çeşidinde $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 48 saat soğuk uygulaması yapılmış 0.5 mgL^{-1} NAA, 1.0 mgL^{-1} kinetin, 20 gL^{-1} sakkaroz ve 6 gL^{-1} gelrite agar içeren NN ortamı, 99R çeşidinde ise $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 48 saat soğuk uygulaması yapıp, 1.0 mgL^{-1} NAA, 1.0 mgL^{-1} kinetin, 0.5 g/l aktif kömür, 20 gL^{-1} sakkaroz ve 6 mgL^{-1} agar, 1 mgL^{-1} 2,4-D, 0.25 mgL^{-1} BAP, 1000 mgL^{-1} kazein hidrolizat, 20 g/l sakkaroz ve 6 gL^{-1} gelrite agar içeren $1/2 \times \text{MS}$ ortamı kullanılmıştır. Genotiplerin anter kültürüne göstermiş oldukları tepkilerin oldukça değişken olduğu belirlenmiştir.

Tıprıdamaz ve ark., (2002), araştırmasında 11 B 14 ve Demre sivrisi biber çeşitlerinin çiçek tomurcuklarında soğuk muamelesi ile ve %1 aktif kömürü içeren ortamda farklı oranda absizik asit konsantrasyonlarının etkilerini incelemişlerdir. Eksplantları 80, 90 ve 100 saat $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ soğuk muamelesi veya $9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 ve 9 gün süre bekletmişlerdir. Soğuk muameleleri ve aktif kömür içeren ortamda anterlerin ABA miktarında azalma izlenmiştir. $9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 9 gün bekletilen ve aktif kömür içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde gözlemlenmiştir. Denemelerde uygulanan soğuk şokları ve aktif kömür içeriğinin, anter eksplantlarındaki ABA miktarını azaltarak embriyo oluşturmada etkili olmadığı gözlemlenmiştir.

Ayar (2003), çalışmasında, 2000-2002 yılları arasında Kekova ve Sera-Demre 8 biber çeşitlerinde yaz ve kış olmak üzere haploid bitki üretiminde iklim ve bitki yaşının etkisini araştırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, çeşitler ve eksplant aldığı aylar dikkate alındığında rejenerasyon üzerinde farklılıklar olduğu belirtilmiştir. Yaz aylarında Kekova çeşidinde %4.97 ve Sera-Demre 8 çeşidinde ise %1.49 rejenerasyon izlenmiştir. Kış döneminde ise Sera-Demre 8 çeşidinde %4.26, Kekova çeşidinde %2.69 oranında embriyo rejenerasyonu saptanmıştır. Kekova çeşidinde Haziran ayında %7.3, Sera-Demre 8 çeşidinde ise Ağustos ayında %3.96 oranda embriyo oluşumu saptanmıştır.

Kışlık olarak Şubat ayında Kekova çeşinde %7.70 ve Sera-Demre 8 çeşidinde %8.75 oranında embriyo oluşumu tespit edilmiştir.

Kaçar ve ark., (2004), W. Murcott mandarin çeşidinde, çiçeklenme döneminde farklı boyutlardaki çiçek tomurcuklarını toplamışlar ve elde edilen anterleri asetokarmin boyasıyla tek çekirdekli mikrosporlar elde etmek amacıyla çalışmışlardır. Elde edilen bulgulara göre, çiçeklerin 4-5 mm olduğu dönem uygun dönem olarak tespit edilmiştir. Bu dönemdeki çiçek tomurcuklarının 4 ve 25°C'de 48 saat inkübe edilmesi ve ardından 0 mgL⁻¹ TDZ (Thidiazuron), 0.1 mgL⁻¹ TDZ ve 0.5 mgL⁻¹ TDZ içeren anterlerin N6 ortamı içeren kültüre alınması sonucunda 16 saat aydınlık (anterlerin yarısı) veya karanlık (diğer yarısı) ortamda anterler üzerinde embriyoid oluşmadığını gözlemlemişlerdir.

Çağlar ve ark., (2004), Kahramanmaraş kırmızı biberi (*Capsicum annuum* L.) ile yürüttükleri çalışmalarında taç yaprakları açmamış biber çiçek anterleri kullanarak *in vitro* ortamda haploid embriyo eldesi için çalışmışlardır. MS ortamlarında 2.0, 4.0, 6.0 mgL⁻¹ NAA ve 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mgL⁻¹ 2,4-D ile sitokininlerden 0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mgL⁻¹ BAP ve 0.1, 1.0, 5.0 mgL⁻¹ kinetin kullanılmıştır. Ayrıca besin ortamlarına %0.25 aktif kömür ve 10 mgL⁻¹ AgNO₃ da eklenmiştir. Anterler yedi gün süre ile 4°C (karanlıkta), 29°C (karanlıkta) ve 35°C (karanlıkta) bekletilmiştir. Araştırma süresince toplam 9750 anter kullanılmıştır. Yalnız 0.1mgL⁻¹ BAP + 4 mgL⁻¹ NAA + %0.25 aktif kömür + 10 mgL⁻¹AgNO₃ içeren MS besin ortamında anterlerden %2.8 oranında direkt haploid embriyo oluşumu sağlanmıştır.

Taşkın (2005), tarafından yapılan çalışmada, üç defa kendilenmiş A71, A269, A313, A74 ve A109 no'lu biber hatları kullanılarak anterler farklı zamanlarda kültüre alınmıştır. Gelişmelerini tamamlayamayan embriyolar 10 gün süresince 0.5 mgL⁻¹ absisik asit içeren besin ortamına alınarak absisik asitin etkisi belirlenmiştir. Denemenin sonucunda gerek embriyo oluşumu gerekse oluşan embriyoların bitkiye dönüşüm sürecinin genotiplere, anter alma dönemine ve besin ortamına göre değiştiği tespit edilmiştir. Genotipler arasında en yüksek embriyo verimi soğuğa tolerant olarak belirlenmiş olan Nisan ve Mayıs aylarından 269 no'lu hattın 30 g/l sakkaroz + %0.25 aktif kömür + 15 mgL⁻¹ gümüş nitrat + 4 mgL⁻¹ naftalen asetik asit + 1 mgL⁻¹ benzil amino pürin içeren MS ortamından

ve IV no'lu besin ortamından ve + 30 g/l sakkaroz + %0.25 aktif kömür + 15 mgL⁻¹ gümüş nitrat + 4 mgL⁻¹ naftalen asetik asit + 0.1mgL⁻¹ benzil amino pürin içeren modifiye edilmiş MS ortamından elde edilmiştir.

Altındal (2005), çavdarda anter kültüründe diploid ve tetraploid kültür çavdarına ait anterlerlerden kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu eldesi için çalışmıştır. Çalışmada modifiye edilmiş N6 ortamı değerlendirilmiştir. Araştırma tesadüf parsellerinde 20 tekerrürlü faktöriyel deneme desenine göre kurulmuştur. Ön işlem [soğuk uygulanmış (7 gün +4°C'de karanlık muamelesi) ve uygulanmayan], ploidi [diploid ve tetraploid (*Secale cereale* L.)], karbon kaynaklı (120 g/l maltoz ve 90 g/l sakkaroz) ve bitki büyüme düzenleyiciler (2 mgL⁻¹ 2,4-D, 0.5 mgL⁻¹ kinetin ve 1 mgL⁻¹ IAA) ile uygulamalar yapılmıştır. Tarla şartlarında yetiştirilen çavdar başaklarına ait anterler bayrak yapraktan kılçıkların görüldüğü dönemde alınmış ve besin ortamlarına ekilmiştir. Örnekler 16 saat aydınlık altında 2000-2200 lux ışık koşullarında 22 °C'de kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda ön işlem uygulamasının anter tepki oranı, kallus oluşumu ve kallus büyüklüğü üzerine önemli etkileri belirlenmiştir. Soğuk uygulaması kallus oluşum oranını arttırmıştır. Şeker, yerine maltoz kullanıldığında fazla miktarda kallus rejenerasyonu ve kallus büyüklüğü artmıştır. İncelenen tüm faktörlerin (ön işlem × ploidi × karbon kaynakları × hormon) birbirleriyle olan interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Rejenerasyon gösteren anter oranının %27.00-97.50, kallus oluşturan oranın ise %13.00-28.00 arasında değiştiği ortaya konmuştur.

Duran (2007), çalışmasında *Triticum durum* Desf. makarnalık buğdayın, Berkmen 469, Kunduru 1149 ve DH-Berkmen çeşitleri için anter kültürü ortamını tespit etmiştir. Berkmen 469 genotipi %0.62 kallus üretimi ile anter kültürü için en iyi çeşit olarak belirlenmiştir. Her genotip için soğuk ön işlem süresi 15 gün olarak uygulanmıştır ve tuza tolerans seviyesi belirlenmiştir.

Şahin (2009), çalışmasında yirmi altı adet çeltik hattı kullanmış ve numuneler 5 adet farklı besin ortamında kültüre edilmiştir. Anter kültürü sonuçlarına göre, kullanılan *İndika* tipi çeltik genotiplerinin *Japonika* tipinden daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Çeltik

genotiplerinin anter kültürüne en iyi yanıt verdikleri besin ortamlarının “B5- NAA+2,4 D sıvı” ve “N6 - NAA+2,4 D sıvı” ortamları olduğu belirtilmiştir.

Salantur ve ark., (2011), araştırmalarında 21 adet ekmeklik buğday çeşidini F2 popülasyonlarının anter kültüründe bitki rejenerasyonunu incelemek amacıyla 100'er adet anteri eksplant olarak kullanmışlardır. Kallus + embrioid sayısı, albino bitki sayısı, yeşil bitki sayısı, steril bitki sayısı, katlanma indeksi ve başarı indeksi incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre kullanılan 15 popülasyondan katlanmış haploid bitki elde edilmiş, 4 popülasyonda sadece kallus oluşumu gözlenmiştir. 2 adet popülasyonda herhangi rejenerasyon izlenmemiştir. Islah materyalinde her bir F2 popülasyonlarının buğday anter kültüründe haploid bitki rejenerasyonuna cevabı birbirlerinden oldukça farklı bulunmuştur. F2-804, F2-1025, F2-1037 ve F2-863 popülasyonlarında daha iyi rejenerasyon tespit edilmiştir.

Khan ve ark., (2017), *Zea mays* ve *Imperata cylindrica* 'da farklı büyüme ortamlarının buğday F1 hatlarında haploid bitki üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Dört F1 melezi, LWH x VL616, HPW266 x Yr15 (CN25087), HS490 x HI1563 ve Local Red x WHD938, sera koşullarında yetiştirilmiş ve mısır ile tozlaştırılmıştır. DH üretiminin verimliliği tarlada yetiştirilen F1'lerle kıyaslandığında serada yetiştirilen F1'lerde oldukça yüksek bulunmuştur. Ayrıca ekmeklik buğdayda da DH üretimi için verimli bir protokol elde edilmiştir.

Hooghvorst ve ark., (2018) tarafından yapılan çalışmada, pirinçte double haploid (DH) bitkiler geliştirmek için iki adet japonika pirinci NRVC980385 ve H28 hattından anter mikrosporları indüksiyon ortamında üç büyüme düzenleyici kombinasyonuna ve dört kolşisin işlemine tabi tutulmuştur. Ek olarak, haploid bitkiciklerden double haploid bitkicikleri oluşturmak için kolşisin kullanılan bir protokol test edilmiştir. Mikrosporların 9 gün boyunca 10 °C'de soğuk ön muamelesi, NRCV980385 genotipinde kallus indüksiyonunu 50 kat arttırmıştır. Her iki genotip için, kolşisin içermeyen indüksiyon ortamında 2 mg L⁻¹ 2,4-D ve 1 mg L⁻¹ kinetin kullanılarak en iyi sonucu elde edilmiştir. Her iki genotipin kültürlenebilirliği kolşisin destekli indüksiyon ortamında değişmiştir. Kallus indüksiyonu ve double haploid bitkiciklerin rejenerasyonu için yüksek bir genotip

bağımlılığı kaydedilmiştir. 300 mg L⁻¹ de kolşisin içeren ortamda 48 saat muamele sonucunda H28' hattında 100 kat daha fazla kallus indüksiyonu izlenmiştir. Haploid bitkiciklerin 500 mg L⁻¹ kolşisin ile muamelesinin verimli double haploid bitkiciklerin üretilmesine neden olduğu belirtilmiştir. Son olarak, anter ve post anter kültüründen tüm bitkicikleri analiz etmek için flow sitometri protokolü ile bitkilerin kromozomları teyit ettirilmiştir.

Yorgancılar ve ark., (2016)'nın yapmış olduğu çalışmada, 61 adet F2 buğday melezi kullanılmıştır. Başaklar 4 °C'de 12- 15 gün bekletilmiştir. Rejenerasyon için MN6 besin ortamı kullanılmıştır ve 28 °C'de karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Ardından, elde edilen kalluslar 190 II katı ortamına aktararak, petri kapları 25 °C'de 16 saat ışık koşullarında rejenerasyon için bekletilmiştir. Gelişen bitkiler 190 II katı besin ortamına aktarılmıştır. Elde edilen sonuçlarına göre, F2 bitkilerden 107.984 anterden, 22.979 kallus ve 1160 adet bitki eldesi mümkün olmuştur. Elde edilen bitkiler 4 °C'de vernalizasyona tutularak spontan diploid bitkilerin ploidi düzeyleri kontrol edilmiştir.

Korkunç (2016), çalışmasında 3 adet pamuk çeşidini: Aşkabat-100 (*Gossypium barbadense* L.), Coker-312 ve Stoneville-468 (*G. hirsutum* L.) kullanmış, Aşkabat-100 çeşidinin kallus oluşumu ve rejenerasyon için uygun olduğunu belirtmiştir. Daha sonra en fazla embriyo ile sürgün oluşumu (66.47 adet) 0.5 mg L⁻¹ kinetin içeren ortamda gözlemlenmiştir. Elde edilen sürgünlerden bitkiciğe dönüşüm izlenmemiştir.

Geboloğlu ve ark., (2017), anter kültürü çalışmalarında patlıcan anter kültüründe bal kullanarak, farklı sakkaroz ve bal dozları arasında kıyaslama yapmışlardır. 2,4-D ve 1, 3 ve 5 mg L⁻¹ Kin kullanılmıştır. En yüksek embriyoid oluşumu 1.0 mg L⁻¹ kinetin + 3.0 mg L⁻¹ 2,4 D uygulamasından elde edilmiştir. Sakkaroz yerine bal kullanımının patlıcan anter kültüründe embriyoid oluşumunu pozitif yönde uyardığını belirtmişlerdir.

Özcan (2017), çalışmasında erkek gametten haploid uyartımı (androgenesis) yöntemlerinden anter kültürü ve dişi gametten haploid uyartımı yöntemlerinden (ginogenesis) ışınlanmış polenle tozlama yöntemlerinin ısıpanakta kullanılabilirliğini Koto F1, Greenstar F1 ve Favorit F1 çeşitleri üzerinde araştırmıştır. Farklı oksin ve

sitokinin içeriğine sahip 4 farklı ortam test edilmiştir. Işınlanmış polen ile tozlama yönteminde ise yine aynı 3 çeşit ile 100, 150, 200, 300, 400 ve 500 Gray olmak üzere 6 farklı ışın dozunu denenmiş ve her üç çeşitte de farklı tohum yapılarına (içi katı, içi hafif katı, içi sıvı, içi boşa yakın ve içi boş) sahip bitkiler meydana gelmiştir. Kromozom sayımı için flow sitometri kullanılmış ve SSR analizi yapılmıştır. Araştırmada kullanılan ıspanak aksesyonlarının ortalama DNA içeriği 2.225 pg/2C ile 2.059 pg/2C arasında değişmiştir.

Kara ve ark., (2018), 'Ekşi Kara' ve 'Narince' üzüm çeşitlerinde anter kültürü için 0.3–1.0 mm uzunlukta anterleri kullanmıştır. Kallus oluşum ve rejenerasyonu için N&N besin ortamı kullanılmıştır. Eksplantlar 25 °C sıcaklıkta kültüre alınmıştır. Korolla rengi koyu yeşilden hafif sarıya dönüş gösteren çiçek tomurcuklarının anterleri kültür için uygun bulunmuştur. 'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde %22.86 ve 'Narince' üzüm çeşidinde %35.17 kallus oluşumu tespit edilmiştir.

Çift haploidler, kendiliğinden veya bir haploid bitkinin kromozom duplikasyonu ile indüklenen bitkilerdir (Karjee ve ark., 2020). Tüm lokuslarda homozigoturlar, bu da onları genom bileşeni açısından ebeveynden benzersiz bir çizgi haline getirir. Çift haploidlerin çapraz tozlaşmalı ürünler için homozigot hatların üretimi ve mutasyon ıslahı gibi ıslah programlarında önemli kullanımı vardır. Kromozomların haploidizasyonu ve tekrar ikiye katlanması nedeniyle mevcut diploid koşul altında ifade edilemeyen bazı yeni özellikler üretilebilir. Bu teknik, krizantem, karanfil, petunya, gül, süsen, zambak, phlox vb. gibi çiçekçilik bitkilerinin iyileştirme programı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Haploidler kendiliğinden daha düşük bir sıklıkta meydana gelirler ancak modifiye tozlaşma yöntemleri gibi çeşitli yöntemlerle indüklenebilirler. *In vivo* (geniş hibridizasyon, kromozom eliminasyonu, ışınlanmış polen ile tozlaşma, vb.) ve olgunlaşmamış gametofitlerin *in vitro* kültürü ile özellik ifadesinde stabilite elde etmek için kromozomları ikiye katlarlar. Çift haploidlerin üretimi için yeni gelişmiş teknikler sadece üreme sürecini hızlandırmakla kalmamış, aynı zamanda mahsul iyileştirmede yeni bir boyut açmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar

Bu tez çalışması süresince kullanılan cihazlar ve cihazlara ait markalar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	Marka
Stereo Mikroskop	Nikon Eclipse E600
Laminar Flow (Hava Akım) Kabini	TelstarBio II A
İklim Dolabı (Growth Chamber)	Nüve 600 L
İnkübatör	Memmert IPP 400
Otoklav	Alp
Isıticılı Mantetik Karıştırıcı	Lab
pH metre	Hanna
Otomatik pipetler	Ependorf

3.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler

Bu tez çalışması süresince kullanılan başlıca kimyasallar ve markaları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan başlıca kimyasallar ve markaları

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Marka
Murashige-Skoog Temel Besiyeri	Sigma
Sükroz	Fluka
Maltoz	Fluka
Agar	Duchefa
Tween 20	Sigma
Sodyum hipoklorit	Tekkim
6-Benzylaminopürin	Sigma
2,4-D (2,4-D diklorofenoksi asetik asit)	Caisson
Giberellik asit	Caisson
Kinetin	Caisson
NAA (1-Naftalen asetik asit)	Caisson
KNA (Potasyum naftalen asetat)	Caisson
Vitamin B12	Caisson
Asetik asit	Chembio
Karmin boya	Sigma
Etanol	Tekkim

3.1.3. Çalışmada kullanılan haşhaş çeşitleri

Bu tezin ilk aşamasında kullanılan haşhaş çeşitleri ve tedarik bilgileri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çeşitlere ait tedarik bilgileri

	Çeşit	Tedarik Bilgisi
1	Ankara 94	Prof. Dr. Neşet ARSLAN, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü
2	Afyon kalesi	
3	Anayurt 95	
4	Afyon 95	
5	Camcı 95	
6	Ofis 3	
7	Ofis 4	
8	Ofis 8	
9	Ofis 95	
10	Ofis 96	
11	TMO 1	
12	TMO 2	
13	TMO 3	
14	Karahisar 96	
15	Kemerkaya 95	
16	Kocatepe 96	
17	Şuhut 94	
18	Çelikoğlu	Prof. Dr. Güngör YILMAZ Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü

3.2. Yöntem

3.2.1. Toprak analizi

Çalışmanın yürütüldüğü Gaziosmanpaşa Üniversitesi Taşlıçiftlik Kampüsü deneme alanlarından rastgele seçilmiş 3 farklı yer 30 cm derinlikten toprak örnekleri alınarak analiz edilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Deneme alanlarının toprak analiz sonuçları

Faktörler	Özellikler
Tekstür	Killi tın
pH	8.1-Kuvvetli alkali
Organik madde	%1,00-Fakir
Kireç	(%)20.6-Çok kireçli
P ₂ O ₅	5.68 kg/da-az
K ₂ O	157.7 kg/da –fazla
EC	0.22 mS/cm

3.2.2. Donör bitkilerin yazlık ve kışlık ekimi

Bitkilerin yetiştirilmesi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Taşlıçiftlik Kampüsü deneme alanlarında gerçekleştirilmiştir. Araziye rotatıl çekilerek toprak ekime hazır hale getirilmiştir. Ekim için 5 m × 40 m parseller hazırlanmış, sıra arası 1 metre olacak şekilde düzenlenmiştir (Şekil 3.1). Tohum ekiminin birincisi kışlık olarak 22.11.2014 ve ikincisi baharlık olarak 21.02.2015 tarihinde yapılmıştır. 2016 yılı sonrasındaki çalışmalar için bitkilerin yetiştirilmesi Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri A.B.D. deneme alanlarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Tarlanın ekime hazırlanması

Bitkilere herhangi bir sulama ve gübreleme işlemi yapılmamıştır. Bitkilere zarar verebileceği ihtimali göz önüne alınarak herhangi bir pestisit uygulamasına yer verilmemiştir. Her iki ekimde de yabancı ot mücadelesi elle çapalama yöntemi ile yapılmıştır. Haşhaş bitkisi fotoperiyoda hassas olduğu için kışlık ve yazlık olarak ekilen çeşitlerde tomurcuk ve çiçek oluşumu 1 Mayıs-21 Haziran arasında senkronize olmuştur.

Çalışma kapsamına alınan *P. somniferum*'a ait 18 adet (Ofis 95, Kocatepe 96, TMO-1, Anayurt 95, Afyon 95, Ofis-8, Şuhut 94, Karahisar 96, Ofis 3, Afyon Kalesi, Ofis 96, Ankara 94, TMO-3, Ofis-4, TMO-2, Camcı 95, çiftçiden alınan tohum (Ofis 8), Kemer kaya 95) haşhaş çeşidinin hem kışlık hem de yazlık olarak tarla koşullarında ekimi yapılmıştır. Altı ay sonra dihaploid bitki çalışmalarının ilerlemesiyle 18 adet *Papaver* çeşidinin yoğun olarak yapılan çalışma ve kültüre alınan anter eksplantlarındaki [3 adet soğuk muamele $\times$ 18 adet çeşit $\times$ iki adet (kışlık ve yazlık ekim) ekim = 108 adet denemedeki] gelişmeler takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yeni denemelerin yapılmasına ve denemede kullanılacak çeşit sayılarına tez izleme komitesi tarafından karar verilmiştir. Bitki topraktan çıkışından itibaren takip edilerek sapa kalkma dönemine girdikten sonra periyodik olarak çapalama ve gerek görülen alanlarda tekleme işlemi yapılmıştır. Kök sistemi iyi gelişene kadar bitkiyi rüzgâr ve yağmurların etkisinden korumak amacıyla boğaz doldurma işlemleri yapılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Haşhaş Ofis 95 çeşidine ait bitkilerin ekiminden sonra tohumların çimlenmesi (a), bitki çıkışı (b, c, d, e), bitki büyümesi (f) tomurcuğun oluşumu ile ilgili aşamaları

3.2.3. Tomurcuk alım aşamasının tespiti

Mayıs ayının başından itibaren 20 Haziran'a kadar bitkilerden anter kültürü için I. mitoz bölünmenin başladığı, yani mikrosporların tek çekirdekli aşamanın sonunda veya iki çekirdekli aşamanın başında olduğu uygun safhadaki çiçek tomurcukları her gün sabah saat 07:00-09:00 saatleri arasında toplanmıştır. Her yarım saat sonra bir kez tomurcuklar çiçek sapıyla yaklaşık -90° , -75° , -60° , -45° , -30° , 0° , 30° , 45° , 60° , 75° , 90° derecelik açılar [11 adet çiçek açısı $\times$ 18 adet çeşit $\times$ iki adet ekim zamanı $\times$ 5 farklı saat (07:00, 07:30, 08:00, 08:30, 09:00) = 1980 adet örnek] yaptığında (tek çekirdekli mikrospor aşaması için en uygun zamanı belirlemek amacıyla) toplanarak laboratuvara getirilmiştir. Bu çalışmalar Mayıs ayının ilk haftası başlayarak Haziran ayının üçüncü haftasına kadar devam etmiştir.

3.2.4. Tek çekirdekli mikrospor aşamasının tespiti

Anterlerde mikrospor gelişim aşamalarının tespit edilmesi için ezme preparat hazırlanmış ve asetokarmin boyama yöntemi Elçi (1982)'ye göre yapılmıştır. 55 ml saf su içerisine 45 ml glasiyel asetik asit ilave edilerek kaynatılmış, sonra bu karışıma 1g karmin eklenmiş ve filtre edilerek boya hazırlanmıştır. Anterler bir lam üzerinde pens yardımıyla ezilerek mikrosporlar serbest hale getirilmiş ve %1'lik asetokarminden 500-1000 µl damlatılarak boyanın mikrospora etki etmesi sağlanmıştır. Lam lamelle kapatıldıktan sonra preparatın kenarından fazla boya kurutma kâğıdı ile alınarak 3-4 kez kaynatılmadan ateşte ısıtılmıştır. Nikon Eclipse E600 40×100 büyütme mikroskop kullanılarak tek çekirdekli mikrospor evresi tespit edilmiş ve mikroskop görüntüleri alınmıştır.

3.2.5. Anter kültürü uygulamaları

Çalışmalar Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi-Biyoloji Bölümü ve Ziraat Fakültesi-Bahçe Bitkileri Bölümü ile Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Steril ortam çalışmaları için Telstar Bio II A marka vertikal flow kabin kullanılmıştır. Anterlerin inkübasyon evrelerini tamamlamalarından dış koşullara alıştırılınca kadar ki dönemi geçirmeleri için sıcaklık, ışık ve nem kontrollü büyütme odası kullanılmıştır. Büyütme odasında rafların aydınlatılması led lambalarla yapılmıştır.

Ayrıca, büyütme/iklim dolabı (growth chamber), anterleri 9°C'de bekletmek için sıcaklık, nem ve ışık kontrolünü sağlayan 600 litre hacimli Nüve Test Kabini kullanılmıştır. Anterleri 35°C'de karanlık koşullarda bekletmek için Memmert 'IPP 400' inkübatör kullanılmıştır. Anter boyama işlemi için mikroskop, besin ortamları hazırlarken gerekli kimyasal maddelerin belirli bir sıcaklık ve devirde manyetik alan etkisiyle karıştırılmasını sağlayan karıştırıcı cihaz ve ortamların pH'sını ayarlamak için pH metre kullanılmıştır.

3.2.6. Büyüme ortamları ve kültür koşulları

Denemelerde MS (Murashige ve Skoog) mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962, Çizelge 3.6) ile %3 süktroz içeren ve %0.8'lik agar (Duchefa) ile katılaştırılan temel besin ortamı (MS) kullanılmıştır. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, gerektiğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda 24°C sıcaklıkta tutulmuşlardır.

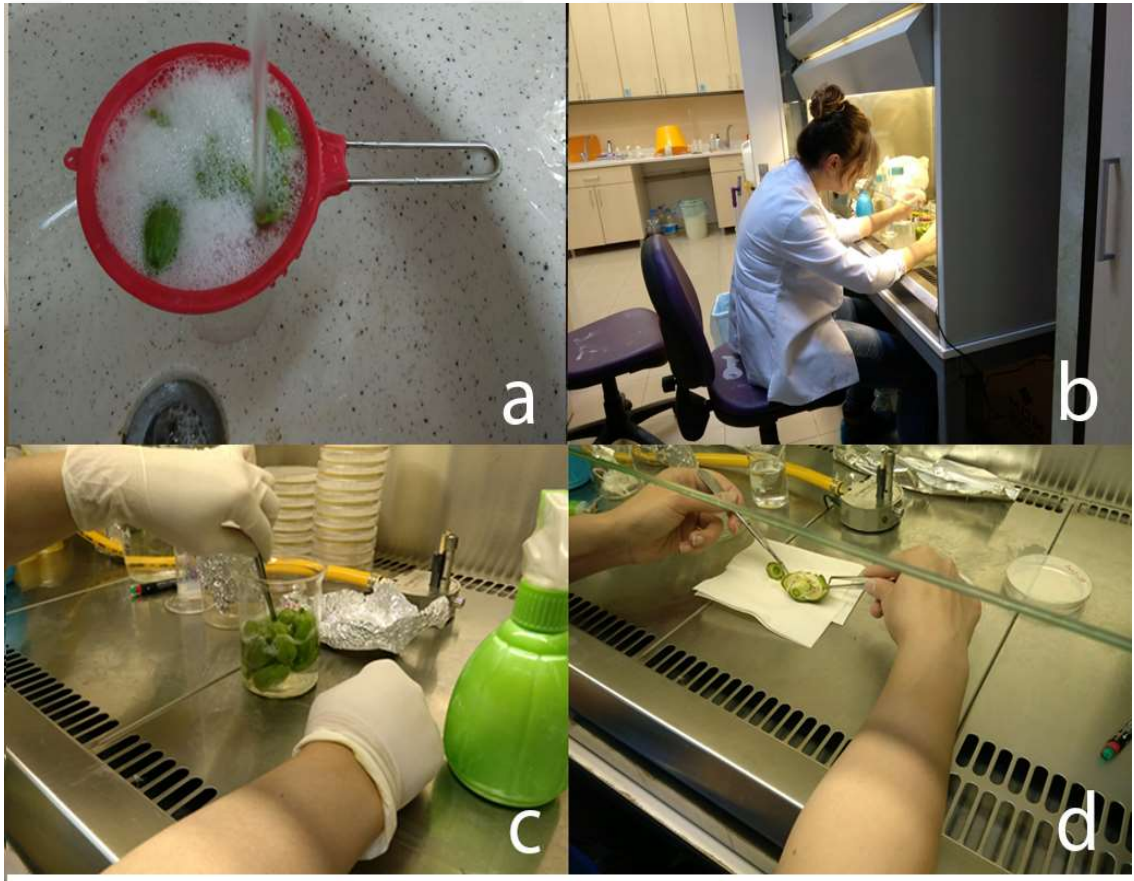
3.2.7. Stok solüsyonlarının hazırlanması

Hormonlar (bitki büyüme düzenleyicileri) uygun çözücülerde çözüldükten sonra standart şekilde istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Kinetin, KNA, BAP (6-benzilaminopürin) ve 2,4 D hormon stokları 10 mgL⁻¹ olarak hazırlanmıştır. %3 süktroz içeren temel besin ortamına 0.03 mgL⁻¹ olacak şekilde B12 vitamini eklenmiştir. Stok çözeltiler aşağıda belirtilen şekile hazırlanmıştır.

1 mg/ml stok solüsyonu hazırlamak için 10 ml'lik volumetrik şişelere 10 mg bitki büyüme düzenleyicisi konulmuştur. Suda çözünmeyen bitki büyüme düzenleyicilerini çözmek için başlangıçta 2-5 ml çözücü eklenmiştir (çözücüler kinetin için 1N NaOH, 2,4-D için ddH₂O, giberellin için EtOH'dur) ve tamamen çözüldükten sonra ddH₂O ile son hacme getirilmiştir. Bitki büyütme düzenleyicileri olarak Kinetin (0.01,0.1ve 1.00 mgL⁻¹), Giberellin (GA₃-Giberellic acid 50 mgL⁻¹), 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit (0.01,0.1ve 1.00 mgL⁻¹) ve KNA (0.5 mgL⁻¹) kullanılmıştır. Hormon stokları, ortamlar otoklavda steril edilmeden önce ilave edilmiştir. Hazırlanan hormon stok solüsyonları +4°C'de saklanmıştır.

3.2.8. Sterilizasyon

1 Mayıs-20 Haziran 2015 tarihleri arasında toplanarak laboratuvara getirilen tomurcuklar 20 dk akan musluk suyu altında temizlenmiştir. Daha sonra steril kabin içerisinde tomurcuk sterilizasyonu yapılmıştır. %20'lik ticari çamaşır suyu (%1 NaOCl -Sodyum hipoklorit) çözeltisine 1000-2500 µl Tween 20 damlatılmış olan çözeltide tomurcuklar 15 dk sterilizasyona tabi tutulmuştur. Sonrasında 5 dk $\times$ 3 kez steril saf sudan geçirilerek durulama işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Haşhaş tomurcukların (a) sabun ile temizlenmesi, (b, c) sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu ve (d) anterlerin tomurcuklarından çıkartılması

3.2.9. Soğuk stresi uygulamaları

Tarladan getirilen 18 adet haşhaş çeşidine ait tomurcuklar nem kaybını önlemek için şeffaf kutularla ve nemli kurutma kağıtlarına konularak laboratuvara taşınmıştır. Tomurcuklar üçe ayrılarak birinci gruba hiçbir ön muamele ve stres uygulanmamıştır. İkinci gruba +4 °C'de 24 saat soğuk stresi, üçüncü gruba ise +4 °C'de 48 saat soğuk stresi uygulanmıştır.

3.2.10. Anterlerin kültüre alınması

Tomurcuklar anterlere zarar vermeden pens ve bisturi yardımıyla nazıkçe açılmıştır. Anterler steril kabinde MS (Murashige ve Skoog) içeren besin ortamına sahip petri kutularında kültüre edilmiştir (Çizelge 3.5). Başlangıç kültürü olarak Çizelge 3.6'da belirtilen besin ortamları hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. Murashige ve Skoog (1962), ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

Ortamda bulunan maddeler	Konsantrasyonu (mgL ⁻¹)
<i>Makro Elementler</i>	
NH ₄ NO ₃	1650.000
KNO ₃	1900.000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.000
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.000
KH ₂ PO ₄	170.000
<i>Mikro Elementler</i>	
KI	0.830
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.850
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.250
<i>Vitaminler</i>	
Myo-Inositol	100.000
Nikotinik asit	0.500
Pyrotinik Asit	0.500
Tiamin-HCl	0.100
Glisin	2.000

Çizelge 3.6. Anter kültüründe başlangıç besin ortamları ve içerikleri

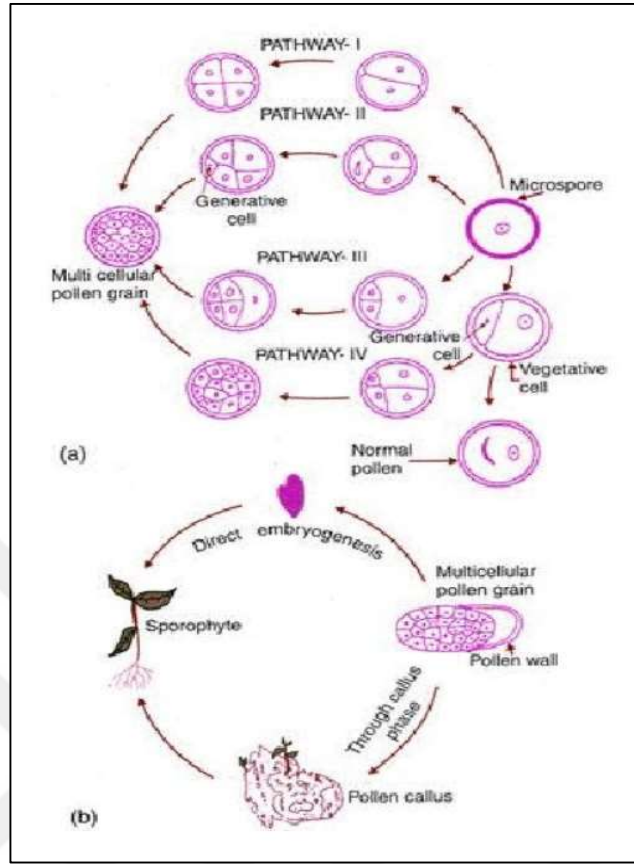
No.	Kinetin (mgL ⁻¹)	2,4-D (mgL ⁻¹)	Vitamin B12 (mgL ⁻¹)
1	0.01	0.01	0.03
2	0,01	0.1	0.03
3	0,01	1	0.03
4	0.1	0.01	0.03
5	0.1	0.1	0.03
6	0.1	1	0.03
7	1	0.01	0.03
8	1	0.1	0.03
9	1	1	0.03

3.2.11. İnkübasyon

Kallusların aktarıldığı petri kapları 25 °C’de 16 saat ışık (50 µmol s⁻¹ m⁻²) ve 8 saat karanlık iklim odalarında bitkiler rejenere oluncaya kadar bırakılmış, anterler kültüre alındıktan sonra petri kapları 9 °C ve 35 °C olmak üzere 2 ayrı inkübasyon koşulunda karanlıkta 8 gün inkübe edilmiştir. İnkübatörde 8 günü geçiren anterler, 25 °C de 16 saat ışık (50 µmol s⁻¹ m⁻²) ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda iklim odalarında bitkiler rejenere oluncaya kadar bırakılmış ve bu petri kaplarındaki kallusların gelişimi takip edilmiştir.

3.2.12. Kallus oluşumu ve adventif sürgün gösteren eksplantların rejenerasyon ortamına aktarılması

Kültüre alınan anterlerden kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu gelişimi beklenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Mikrospor ve polen gelişiminin şematik gösterimi (Watkins, 2017)

Rejenerasyon veya kallus oluşumu gösteren çeşitlere ait 1000'er adet anter Çizelge 3.6'da belirtilen besin ortamlarında rejenerasyon sağlamak için kültüre alınmıştır.

Ayrıca, Kasım 2019 tarihinde rejenerasyon veya kallus oluşumu gösteren çeşitlere ait 1000'er adet anter 2, 4 ve 8 gün 8 °C de bekletilen, 20 g/l süktroz, 0.1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l KNA (potasyum içeren naftalenasetik asit) içeren MS ortamında kültüre alınmıştır.

Her iki çalışmada anterler kültüre alındıktan sonra 9 °C ve 25 °C olmak üzere 2 ayrı inkübasyon koşulunda 8 gün karanlıkta bekletilmiştir. Ardından, eksplantlar 25 °C sıcaklık ve 16 saat ışıklı bitki büyütme odasına alınmıştır.

Oluşan sürgünlerden elde edilen bitkicikler yüksek nem (%80) içeren mikro seralarda pet bardaklara transfer edilmiştir. On beş günün ardından alıştırılmış bitkiler 3 litrelik plastik saksılarda büyütülmüş ve tohum alana kadar yetiştirilmiştir. Yetiştirilen spontan dihaploid bitkilerden kuru kapsüller hasat edilerek oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Daha sonra tohumlar 16 saat ışık altında tohum çimlendirme sepetlerine aktarılmıştır. Filizlenmiş tohumların bu noktada gelişmesi için ışık ve hava sirkülasyonu gerektiği için havalandırma deliklerini tamamen açmak ve ardından günde birkaç saat çıkarmak bu sürece yardımcı olmuştur.

Elde edilen spontan dihaploid bitkilere ait tohumlar tarladan alınan nemli toprak içeren 8 ocaklı (viyollu) sepetlerde, nem kontrol amacıyla kullanılan iki adet delikli kubbe (mikrosera) ile kapatılarak oda sıcaklığında çimlendirilmiştir. Ardından, bitkicikler saksılara alınarak 20-25 cm boylandıklarında analiz amacıyla Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Yenimahalle, Biyoteknoloji Merkezine taşınmıştır ve hizmet alımı ile ploidi analizör (Symex ploidi analyser) cihazında ploidi seviyeleri tespit edilmiştir (Karaoğlu ve Salantur 2016). Çalışmada 0.5 cm²'lik yaprak örneği polistiren petri kutuları içerisine konularak üzerine 400 mikrolitre nuclei extraction buffer solüsyonu ilave edilmiştir. Yaprak örneği bistüri ile 2 dakika süreyle küçük parçalara ayrılarak çekirdeğin ortaya çıkması sağlanmıştır. Solüsyon 30 mikron çapındaki filtreden geçirilerek deney tüpüne alınmış, üzerine 1.6 mililitre DAPI boyası ilave edilmiştir. İki dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra Ploidi analizatör cihazında ölçümleri yapılmıştır (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Almanya). Ploidi seviyesi bilinen Tosunbey ve Ceyhan-99 buğday çeşitlerine ait bitkiler kontrol olarak kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. İklim ve Meteoroloji Verileri

T.C. Meteoroloji Genel Müdürlüğü Ankara'dan alınan veriler Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu verilere göre günlük maksimum 10 cm toprak sıcaklığı 4.07 °C (Ocak 2015) ve 19.92 °C arasında değişmiştir. Ekimin yapıldığı Kasım 2014'te toprak sıcaklığı 10.07 °C olmuştur. Bitkilerin sapa kalkma dönemi olan Aralık 2014'te toprak sıcaklığı 8.04 °C olarak not edilmiştir.

Meteoroloji verilerine göre günlük ortalama aktüel basınç (hPA) 942.64 hPA (Mayıs 2015) ve 948.88 (hPA) (Kasım 2014) arasında değişmiştir. Maksimum günlük ortalama aktüel basınç (hPA) ekimin yapıldığı Kasım 2014'te izlenmiştir. Daha sonraki aylarda günlük ortalama gerçek basınçta (hPA) ciddi bir azalma gözlemlenmiştir.

Günlük Ortalama Nispi Nem %57.12 (Mayıs 2015) ve %75.56 (Aralık 2014) arasında değişmiştir. Maksimum günlük ortalama nispi nem sapa kalkma dönemi olan Kasım 2014'te izlenmiştir. Daha sonraki aylarda günlük ortalama nispi nemde bir azalma gözlemlenmiştir.

Günlük toplam güneş radyasyonu 1.35 kwsaat÷m² (Aralık 2015) ve 5.53 kwsaat÷m² (Mayıs 2015) arasında değişmiştir. Minimum günlük toplam güneş radyasyonu sapa kalkma dönemi olan Kasım 2014'te izlenmiştir. Daha sonraki aylarda günlük toplam güneş radyasyonunda bir yükselme izlenmiştir.

Günlük ortalama sıcaklık 2.41 °C (Ocak 2015) ve 16.88 °C (Mayıs 2015) arasında değişmiştir.

Günlük toplam ortalama yağış 1.72 (Şubat 2015) ve 4.50 mm=kg/m² (Kasım 2014) arasında değişmiştir. Ekimin yapıldığı Kasım ayında fazla miktarda yağış topraktaki nemi artırarak tohumların çimlenmesine yardımcı olmuştur. Daha sonraki aylardaki yağışlar bitkilerin vejetatif ve generatif dönemdeki gelişmelerini sağlanmasında efektif rol oynamıştır.

Aralık 2014 ve Ocak 2015’te hava bulutlu olup günlük güneşlenme izlenmemiştir. Diğer aylarda günlük güneşlenme 1.55 (Şubat 2014) ve 6.87 saat arasında değişmiştir. Tohumların ekiminin yapıldığı Kasım ayında 3.28 saat güneşlenme izlenmiştir. Mayıs ayındaki en fazla güneşlenme süresi generatif/çiçeklenme dönemindeki gelişmenin sağlanmasında efektif rol oynamıştır.

Çizelge 4.1. Ekim yapılan 2014-2015 vejetasyon ve generatif dönemine ve uzun yıllar ortalamalarına ait iklim verileri*

İklim Verileri	Kasım (2014)	Aralık (2014)	Ocak (2015)	Şubat (2015)	Mart (2015)	Nisan (2015)	Mayıs (2015)
Günlük Maksimum 10 cm Toprak Sıcaklığı (°C)	10.07	8.04	4.07	5.59	8.83	11.63	19.92
Günlük Ortalama Aktüel Basınç (hPA)	948.88	948.49	947.39	942.90	946.01	943.66	942.64
Günlük Ortalama Nispi Nem (%)	73.13	75.56	68.98	62.51	65.59	58.31	57.12
Günlük Toplam Güneş Radyasyonu (kwsaat÷m ²)	1.98	1.35	1.76	2.35	3.05	4.4	5.53
Günlük Ortalama Sıcaklık (°C)	7.15	6.96	2.41	5.21	8.09	9.95	16.88
Günlük Toplam Ortalama Yağış (mm÷kg/m ²)	4.50	2.46	3.49	1.72	2.71	2.15	2.32
Günlük Güneşlenme Süresi (saat)	3.28	0	0	1.55	3.38	4.95	6.87

*T.C. Meteoroloji Genel Müdürlüğü, Ankara

4.2. Toprak Analizi

Çalışmanın yürütüldüğü Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Taşlıçiftlik Kampüsü deneme alanına ait toprak örneklerinin analiz sonuçları Çizelge 3.5’de gösterilmiştir. Araştırma yapılan tarlanın toprak özelliklerini saptamak amacıyla, ekim yapılacak alanı temsil edecek 3 farklı noktadan 0-30 cm derinliğinde profiller açılarak alınan toprak örneklerinin (Karaman ve ark., 2004) analiz edilmesi sonucunda araştırmanın yürütüldüğü toprağın killi tınlı, kuvvetli alkali pH 8.1, organik maddece fakir (%1), çok kireçli (%20.6), fosfor içeriği az (5.68 kg/da), potasyum (157.7 kg/da) bakımından fazla ve E:C. değer 0.22 ms/cm olduğu belirlenmiştir.

Materyal ve yöntem kısmında da belirtildiği gibi denemede kullanılan 18 farklı haşhaş çeşidine ait tohumlar 22.11.2014 ve 21.02.2015 tarihinde tarlaya ekilmiştir.

4.3. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Taşlıçiftlik Kampüsü deneme alanlarında uygun iklim ve toprak koşullarının sağlanması ile 18 adet haşhaş çeşidine ait bitki tohumlarının ekimi ve yetiştirilmesinde, ayrıca vejetatif ve generatif dönemdeki gelişmelerinde herhangi bir sorun yaşanmamıştır.

4.3.1. Tohum çıkış süreleri

Kasım ayında günlük maksimum ortalama 10 cm toprak sıcaklığı 10.07 °C, günlük ortalama aktüel basınç 948.88 hPA, günlük ortalama nisbi nem %73.13, günlük güneş radyasyonu 1.98 kwsaat·m², günlük ortalama sıcaklık 7.15 °C, toplam ortalama yağış 4.50 mm ve güneşlenme süresi 3.28 saat olarak izlenmiştir (Çizelge 4.3). 22 Kasım'da ekilen 18 adet haşhaş çeşidine ait tohumlar 8 ile 13 gün arasında çimlenerek topraktan çıkış göstermişlerdir (Çizelge 4.2). 22 Kasım'da gün uzunluğu 9 saat:44dk:48sn olup, 8 gün sonra gün uzunluğu 9 saat:33dk:59sn ve 13. günde ise gün uzunluğu 9 saat:26dk:41sn olmuştur (Ek 1,2). Elde edilen sonuçlara göre tohum ekimi ve 8. ile 13. gün çıkışı arasında gün uzunluğunda sırasıyla 10 dk: 89 sn ve 18 dk: 7 sn azalma izlenmektedir.

21 Şubat 2015' te günlük maksimum ortalama 10 cm toprak sıcaklığı 5.59 °C, günlük ortalama aktüel basınç 942.90 hPA, günlük ortalama nisbi nem %62.51, günlük güneş radyasyonu 2.35 kwsaat m², günlük ortalama sıcaklık 5.21 °C, toplam ortalama yağış 1.72 mm ve güneşlenme süresi 1.55 saat olarak izlenmiştir (Çizelge 4.4). 21 Şubat'ta ekilen 18 adet çeşide ait tohumlar 20 ile 26 gün arasında çimlenmiş olup geç çıkış görülmüştür (Çizelge 4.2). 21 Şubat 2015 gün uzunluğu 10 saat:33dk:48 sn olup, 20 gün sonra gün uzunluğu 11 saat:45 dk:41sn ve 26. gün uzunluğu 12 saat:01dk:45sn olmuştur. (Ek 3, 4). Elde edilen sonuçlara göre tohum ekimi ve 20. ile 26. gün sonra topraktan çıkışı arasında gün uzunluğunda sırasıyla 1 saat: 12dk: 08sn ve 2 saat: 32 dk: 5sn artış izlenmektedir.

Kış ekiminin yapıldığı Kasım 2014'ten sonra gün uzunluğunda azalma ve yazlık ekimin yapıldığı Şubat 2015'ten sonra da gün uzunluğunda belirgin artış izlenmiştir. Ayrıca,

meteoroloji verileri karşılaştırıldığında güneşlenme süresi hariç tüm meteorolojik parametrelerde düşüş izlenmiştir. Parametrelerdeki düşüş tohum çimlenmelerini olumsuz şekilde etkilemiştir, ancak gün uzunluğunun tohum çimlenmesi üzerinde bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla Kasım ekimine göre tohumun çimlenmesi ve çıkışında gecikme (20-26 gün) izlenmiştir.

Hartmann ve ark., (1990), Mahdavi-Damghani ve ark., (2010), Bidgoly ve ark., (2018)'nin de belirttiği gibi tohum çimlenmesi ve çıkışının meteoroloji parametrelerine ve genotipe bağlı olarak farklı tepki gösterdikleri görülmüştür. Özellikle toprağın nem seviyesi ve sıcaklığın çimlenme süresini düzenleyen en önemli faktörler olduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 4.2. 18 adet haşhaş çeşidine ait tohumların kışlık (Kasım) ve yazlık (Şubat) ekimlerine ait çimlenmeleri sonucu elde edilen çıkış gün sayıları

Sayı	Çeşitler	Ekim tarihleri	
		22 Kasım 2014 (gün)	21 Şubat 2015 (gün)
1	Ankara 94	8	20
2	Afyon kalesi	8	21
3	Anayurt 95	8	21
4	Afyon 95	9	26
5	Camcı 95	8	25
6	Çelikoğlu	11	23
7	Ofis 3	11	20
8	Ofis 4	10	21
9	Ofis 8	12	21
10	Ofis 95	13	21
11	Ofis 96	13	23
12	TMO 1	13	23
13	TMO 2	8	23
14	TMO 3	13	24
15	Karahisar 96	10	24
16	Kemer kaya 95	8	26
17	Kocatepe 96	9	26
18	Şuhut 94	13	20

4.3.2. Kışlık ekim

Vejetatif gelişim süreleri (kışlık ekim)

Kasım 2014'te yapılan kışlık ekim ve Şubat 2015'te yapılan yazlık ekimde haşhaş çeşitlerine ait vejetatif gelişim süreleri sırasıyla 161-164 gün ve 69-71 gün olarak hesaplanmıştır. Bu veriler, yazlık ekim ile kışlık ekim karşılaştırılığında kışlık dönemde haşhaş çeşitlerinin vejetatif dönemde kalma süresinin kısaldığını göstermektedir. Ayrıca, yazlık ekim dönemine ait ortalama gün uzunluğu süreleri sırasıyla 9:44:48-13:54:33 ve 9:44:48-14:01:20 saat arasında değişmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4).

Generatif gelişim süreleri

Zaman bakımından Kasım'da ekilen haşhaş çeşitlerinin generatif dönemi (çiçeklenme dönemi) 206-208 gün arasında değişmiştir. Generatif döneme ait ortalama gün uzunluğu süreleri 13:54:33-15:01:45 ve 14:01:20-15:01:45 saat olarak not edilmiştir (Çizelge 4.3). Bu sonuçlar incelendiğinde, gün uzunluğu süresi ve diğer iklim faktörlerine bağlı olarak haşhaş çeşitlerinin generatif süresinin önemli oranda artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, bitkinin doğal gelişimini tamamlamadan kurumasına dolayısıyla polen oluşum parametrelerinin düşmesine neden olmuştur.

4.3.3. Yazlık ekim

Vejetatif gelişim süreleri (yazlık ekim)

Şubat 2015'te yapılan yazlık ekimde haşhaş çeşitlerine ait vejetatif gelişim süreleri 69-71 gün olarak hesaplanmıştır. Yazlık ekim dönemine ait ortalama gün uzunluğu süreleri 9:44:48-14:01:20 saat arasında değişmiştir (Çizelge 4.4).

Generatif gelişim süreleri

Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi zaman bakımından Şubat'ta ekilen haşhaş çeşitlerinin hem vejetatif hem de generatif dönemine (çiçeklenme dönemi) ait gün sayısında önemli derecede azalma izlenmiştir. Generatif döneme ait ortalama gün uzunluğu süreleri 10:55:48-14:03:33 ve 10:55:48-14:05:44 saat olarak not edilmiştir. Bu sonuçlar

incelendiğinde, gün uzunluğu süresi ve diğer iklim faktörlerine bağlı olarak haşhaş çeşitlerinin generatif süresinin önemli oranda azalma gösterdiği belirlenmiştir.

Bu veriler, yazlık ekim ile kışlık ekim karşılaştırıldığında kışlık dönemde haşhaş çeşitlerinin vejetatif dönemde kalma süresinin kısaldığını göstermektedir. Bu değerler ortalama gün uzunluğu süresi uzadıkça bitkinin vejetatif dönemde kalma süresinin kısaldığını da ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, haşhaşta gün uzunluğu genotiplere bağlı olarak farklılık göstermektedir.



Çizelge 4.3. Haşhaşın (*P. somniferum*) 18 adet çeşidine ait gün süreleri ile ilgili verileri (kışlık ekim)

Çeşit	Tohum ekim tarihi	İlk çiçeklenme tarihleri	Vejetatif sürenin bitişi (gün)	Gün uzunluğu aralığı (saat)	Generatif sürenin bitişi (tarih olarak)	Generatif süresine ait gün uzunluğu aralığı (saat olarak)	Generatif sürenin bitişi (gün olarak)	Tohum ekim tarihi	İlk çiçeklenme tarihleri
Ankara 94	22 Kasım	1 Mayıs	161	9:44:48 - 13:54:33	15 Haziran	13:54:33-15:01:45	206	21 Şubat	5 Mayıs
Afyon kalesi	22 Kasım	2 Mayıs	162	9:44:48-13:56:50	16 Haziran	13:56:50-15:02:06	207	21 Şubat	6 Mayıs
Anayurt 95	22 Kasım	2 Mayıs	162	9:44:48-13:56:50	16 Haziran	13:56:50-15:02:06	207	21 Şubat	5 Mayıs
Afyon 95	22 Kasım	2 Mayıs	162	9:44:48-13:56:50	15 Haziran	13:56:50-15:01:45	206	21 Şubat	5 Mayıs
Camcı 95	22 Kasım	2 Mayıs	162	9:44:48-13:56:50	17 Haziran	13:56:50-15:02:24	208	21 Şubat	5 Mayıs
Çelikoğlu	22 Kasım	2 Mayıs	162	9:44:48-13:56:50	15 Haziran	13:56:50-15:01:45	206	21 Şubat	6 Mayıs
Ofis 3	22 Kasım	3 Mayıs	163	9:44:48-13:59:06	15 Haziran	13:59:06-15:01:45	206	21 Şubat	6 Mayıs
Ofis 4	22 Kasım	4 Mayıs	164	9:44:48-14:01:20	15 Haziran	14:01:20-15:01:45	206	21 Şubat	6 Mayıs
Ofis 8	22 Kasım	1 Mayıs	161	9:44:48-13:54:33	15 Haziran	13:54:33-15:01:45	206	21 Şubat	4 Mayıs
Ofis 95	22 Kasım	1 Mayıs	161	9:44:48—13:54:33	15 Haziran	13:54:33-15:01:45	206	21 Şubat	4 Mayıs
Ofis 96	22 Kasım	1 Mayıs	161	9:44:48-13:54:33	15 Haziran	13:54:33-15:01:45	206	21 Şubat	4 Mayıs
TMO 1	22 Kasım	2 Mayıs	162	9:44:48-13:56:50	15 Haziran	13:56:50-15:01:45	206	21 Şubat	4 Mayıs

Çizelge 4.3. Haşhaşın (*P. somniferum*) 18 adet çeşidine ait gün süreleri ile ilgili verileri (kışlık ekim) (devamı)

TMO 1	22 kasım	2 Mayıs	162	9:44:48- 13:56:50	15 haz.	13:56:50- 15:01:45	206	21 Şubat	4 Mayıs
TMO 2	22 kasım	3 Mayıs	163	9:44:48- 13:59:06	15 haz.	13:59:06- 15:01:45	206	21 Şubat	4 Mayıs
TMO 3	22 kasım	4 Mayıs	164	9:44:48- 14:01:20	15 haz.	14:01:20- 15:01:45	206	21 Şubat	5 Mayıs
Karahisar 96	22 kasım	2 Mayıs	162	9:44:48- 13:56:50	15 haz.	13:56:50- 15:01:45	206	21 Şubat	5 Mayıs
Kemerkaya 95	22 kasım	2 Mayıs	162	9:44:48- 13:56:50	15 haz.	13:56:50- 15:01:45	206	21 Şubat	6 Mayıs
Kocatepe 96	22 kasım	2 Mayıs	162	9:44:48- 13:56:50	15 haz.	13:56:50- 15:01:45	206	21 Şubat	6 Mayıs
Şuhut 94	22 kasım	2 Mayıs	162	9:44:48- 13:56:50	15 haz.	13:56:50- 15:01:45	206	21 Şubat	6 Mayıs

Çizelge 4.4. Haşhaş (*P. somniferum*)’in 18 adet çeşidine ait gün süreleri ile ilgili verileri (yazlık ekim)

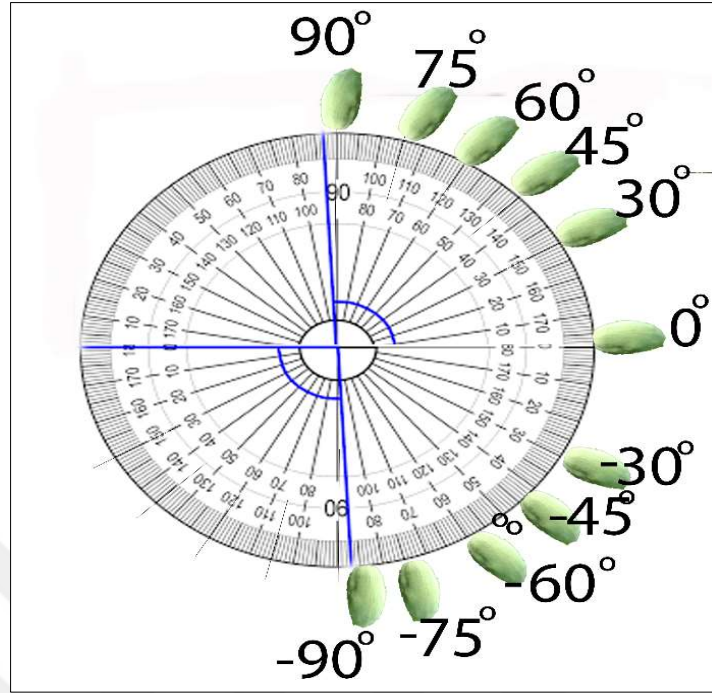
Sayı	Çeşit	Tohum ekim tarihi	İlk çiçeklenme tarihleri	Vejetatif sürenin bitişi (gün)	Gün uzunluğu aralığı (saat)	Generatif sürenin bitişi (tarih olarak)	Generatif sürenin bitişi (gün olarak)	Gün uzunluğu aralığı (saat)
1	Ankara 94	21 Şubat	5 Mayıs	70	10:55:48-14:03:33	10 Haz	37	14:03:33-14:59:06
2	Afyon kalesi	21 Şubat	6 Mayıs	71	10:55:48-14:05:44	11 Haz	37	14:05:44-14:59:45
3	Anayurt 95	21 Şubat	5 Mayıs	70	10:55:48-14:03:33	11 Haz	38	14:03:33-14:59:45
4	Afyon 95	21 Şubat	5 Mayıs	70	10:55:48-14:03:33	11 Haz	38	14:03:33-14:59:45
5	Camcı 95	21 Şubat	5 Mayıs	70	10:55:48-14:03:33	11 Haz	37	14:03:33-14:59:45
6	Çelikoğlu	21 Şubat	6 Mayıs	71	10:55:48-14:05:44	11 Haz	37	14:05:44-14:59:45
7	Ofis 3	21 Şubat	6 Mayıs	70	10:55:48-14:05:44	12 Haz	38	14:05:44-15:00:20
8	Ofis 4	21 Şubat	6 Mayıs	71	10:55:48-14:05:44	12 Haz	38	14:05:44-15:00:20
9	Ofis 8	21 Şubat	4 Mayıs	69	10:55:48-14:01:20	10 Haz	38	14:01:20-14:59:06
10	Ofis 95	21 Şubat	4 Mayıs	69	10:55:48-14:01:20	10 Haz	38	14:01:20-14:59:06
11	Ofis 96	21 Şubat	4 Mayıs	69	10:55:48-14:01:20	10 Haz	38	14:01:20-14:59:06
12	TMO 1	21 Şubat	4 Mayıs	69	10:55:48-14:01:20	11 Haz	39	14:01:20-14:59:45
13	TMO 2	21 Şubat	4 Mayıs	69	10:55:48-14:01:20	11 Haz	39	14:01:20-14:59:45
14	TMO 3	21 Şubat	5 Mayıs	70	10:55:48-14:03:33	11 Haz	38	14:03:33-14:59:45
15	Karahisar 96	21 Şubat	5 Mayıs	70	10:55:48-14:03:33	11 Haz	38	14:03:33-14:59:45
16	Kemer kaya 95	21 Şubat	6 Mayıs	71	10:55:48-14:05:44	11 Haz	37	14:05:44-14:59:45
17	Kocatepe 96	21 Şubat	6 Mayıs	71	10:55:48-14:05:44	11 Haz	37	14:05:44-14:59:45
18	Şuhut 94	21 Şubat	6 Mayıs	71	10:55:48-14:05:44	11 Haz	37	14:05:44-14:59:45

4.4. En Uygun Açı ve Zamanın Belirlenmesi

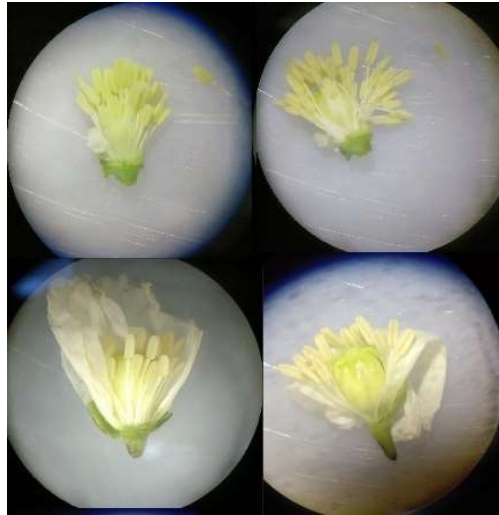
Haşhaş bitkisi fotoperiyoda hassas olduğu için kışlık olarak ve baharlık olarak olarak ekilen çeşitlerde tomurcuk ve çiçek oluşumu Mayıs ayının ilk haftası başlayıp Haziran ayının ikinci haftasına kadar devam etmiştir. Tek çekirdekli polen mikrosporlarının sağlanması açısından tomurcukların hasadı için çiçek sapıyla yaklaşık -90° -75° , -60° , -45° , -30° , 0° 30° , 45° , 60° , 75° , 90° derecelik açılar yaptığı dönemlerde toplanmıştır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Laboratuvarda tomurcukları nazıkçe bisturi ve pens ile açılmıştır (Şekil 3.8) ve yapılan asetokarmin boyaması ile mikroskop altında incelenmiştir. Tek çekirdekli mikrospor aşamasını yakalamak için en uygun derecenin 45° C ve en uygun toplanma saatinin ise 07:00-07:30 arası olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Tomurcukların yaklaşık (a) -90° , (b) -30° , (c) 0° , (d) 30° (e) 45° , (f) 60° , (g) 90° derecelik açılarda görünümü



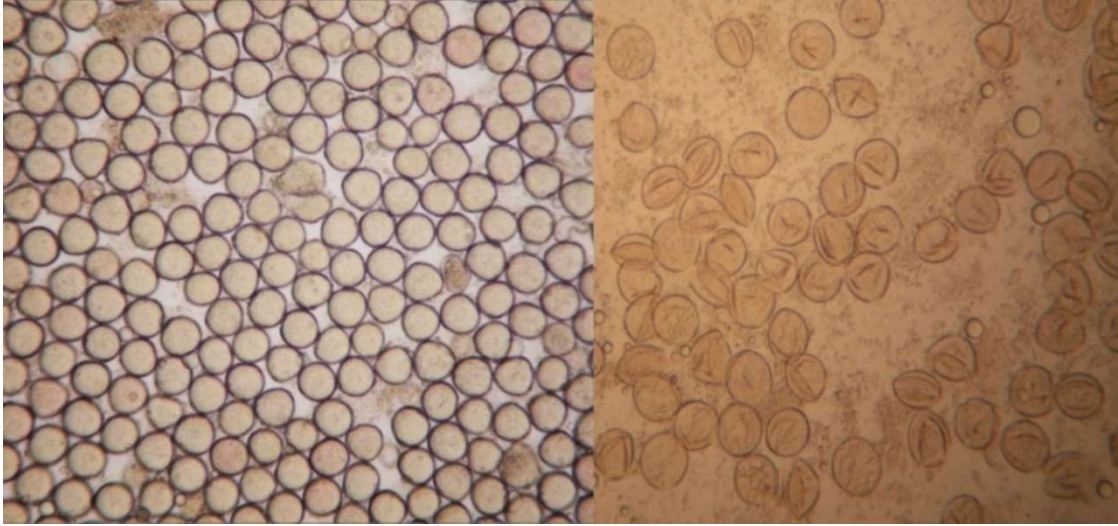
Şekil 4.2. Tek çekirdekli mikrosporların tespiti amacıyla 18 haşhaş çeşidine ait tomurcukların yaklaşık $\sim (-) 90^\circ - (+) 90^\circ$ açılarının şematik görünüşleri



Şekil 4.3. Anterlerin stereo mikroskopta görünüşü

4.5. Tek Çekirdekli Polenlerin Belirlenmesi

Tarladan getirilen 18 adet haşhaş çeşidine ait 11 farklı açıdan toplanan tomurcuklara ait anterlerde mikrospor gelişim aşamalarının tespit edilmesi amacıyla asetokarmin boyama yöntemi kullanılarak ezme preparat hazırlanmış ve polen incelemeleri yapılmıştır (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Elde edilen sonuçlara göre, her 18 çeşide ait 07:00 – 07:30 saatleri arasında veya daha erken saatlerde toplanan tomurcuklarda yoğun bir şekilde tek çekirdekli polen izlenmiştir. Daha sonra toplanan tomurcuklarda ise tek çekirdekli beraber 2 ve 4 çekirdekli polenler de tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Çiçek sapıyla yaklaşık 45 derecelik açı yapan *P. somniferum* Ofis 95 çeşidinde tek çekirdekli mikrospor evresinin tespiti

4.6. Sterilizasyon

Materyal yöntemde ayrıntılı olarak anlatılmış olduğu gibi, toplanarak laboratuvara getirilen tomurcuklar 20 dk akan musluk suyu altında temizlenmiştir. Daha sonra %20'lik ticari çamaşır suyu çözeltisine (%1 NaOCl -Sodyum hipoklorit) 250-1000 µl Tween- 20 damlatılarak 15 dk sterilizasyona tabi tutulmuş tomurcuklardan elde edilen anterlerin kültüre alınması sonucu herhangi bir kontaminasyon izlenmemiştir. Tomurcukların sterilizasyonu için çalışma boyunca bu yöntem tercih edilmiştir.

4.7. Anterlerin Kültüre Alınması

Çalışma 18 haşhaş çeşidinin (Ankara 94, Afyon kalesi, Anayurt 95, Afyon 95, Camcı 95, Çelikoğlu Ofis 3, Ofis 4, Ofis 8, Ofis 95, Ofis 96, TMO 1, TMO 2, TMO 3, Karahisar 96, Kemerkaya 95, Kocatepe 96, Şuhut 94) kışlık ve yazlık ekimi ile başlatılmıştır. Her çeşide ait kışlık ve yazlık olarak toplanan tomurcuklar anterlere zarar vermeden pens ve bisturi yardımıyla nazikçe açılmıştır. Ardından her iki ekimden elde edilen 18 adet haşhaş çeşidinden 100'er adet anter (toplam 1800 + 1800=3600 adet) anter steril kabinde MS içeren besin ortamına sahip petri kutularında kültüre edilmiştir. Çalışmalar Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Tarladan toplanan ve 3 gruba ayrılan tomurcukların 1. grubunda (kontrol grubu) yani soğuk muamelesi yapılmayan anter ve mikrosporlarda ne şişme ne de kallus oluşumu görülmemiş, kararma/canlılık kaybı izlenmiştir (Çizelge 4.5).

2. grupta bulunan 4 °C'de 24 saat bekletilerek soğuk stresi uygulanmış 4 haşhaş çeşidine (Ofis 96, Ofis 8, Ofis 95, Kemerkaya 95) ait eksplantlarda 0.1 mgL⁻¹ kinetin, 1 mgL⁻¹ 2,4-D, ile 0.03 mgL⁻¹ vitamin B12 içeren MS ortamında hafif şişme görülmüş olup daha sonra nekroz/kararma izlenmiştir (Çizelge 4.5).

3. grupta bulunan 4 °C'de 48 saat bekletilerek soğuk stresi uygulanmış eksplantlarda 8 haftalık inkübasyon sonrasında 4 adet haşhaş çeşidine ait (Ofis 96, Ofis 8, Ofis 95, Kemerkaya 95) anterlerde kinetin, 2,4-D, ile vitamin B12 içeren 7.ve 8. MS ortamlarında şişme izlenmiştir. Diğer bir uygulamada, 5 adet haşhaş çeşidine ait (Ofis 96, Çelikoğlu, Ofis 8, Ofis 95, Kemerkaya 95) anterlerde kinetin, 2,4-D, vitamin B12 içeren 7, 8, ve 9 numaralı MS ortamlarında anterlerde şişme oluşumu izlenmiştir (Çizelge 4.5).

Benzer şekilde Kaçar ve ark., (2004), mandarinle yapmış oldukları çalışmada anterlerin gelişim gösterdiğini fakat embriyoid oluşturmadığını belirtmiştir. Yine Dayan (2011)'ın çalışmasında ayçiçeğinde, Çetin (2002) asma bitkisinde, Boyacı (2009) biberde (*Capsicum annuum* L.), Çeliktaş (1995) arpada (*Hordeum vulgare* L.), Kalyon (1995) üzümle yapmış oldukları çalışmalarda kallus oluşumu gözlemişler, ancak haploid bitkileri elde edememişlerdir.

Nekroz programlanmamış bir hücre ölümüdür ve istenmeyen bir durumdur (Moujalled ve ark., 2021). Nekroz, bitki fizyolojisinin değişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bitki veya bitki hücre kültürleri abiyotik strese maruz kaldıklarında hücrelerde nekroz zincir şekilde hızlı hücre ölümünü başlatmaktadır. Moleküler ve biyokimyasal çalışmalar O₃'ün bitkilerde fenilpropanoid metabolizmasını uyardığını göstermektedir (Schraudners ve ark., 1998; Wohlgemuth ve ark., 2002; Pasqualini ve ark., 2003). Orta düzeyde O₃ konsantrasyonlarına uzun süre maruz kalmanın bitkinin fenolik profilinde önemli değişikliklere neden olabileceği, bitkinin eksplantlar üzerindeki abiyotik strese tepkisini değiştirebileceği ve eksplant hücrelerinin ölümüne neden olabileceği belirtilmiştir (Jansen ve ark., 2008, Yadav ve ark., 2010, Feher, 2015).

Yukarıda belirtildiği gibi, anterlerin 24 saat soğuk strese maruz bırakılması ile karşılaştırıldığında, 48 saat soğuk muamelesinin kallus oluşumuna olumlu etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

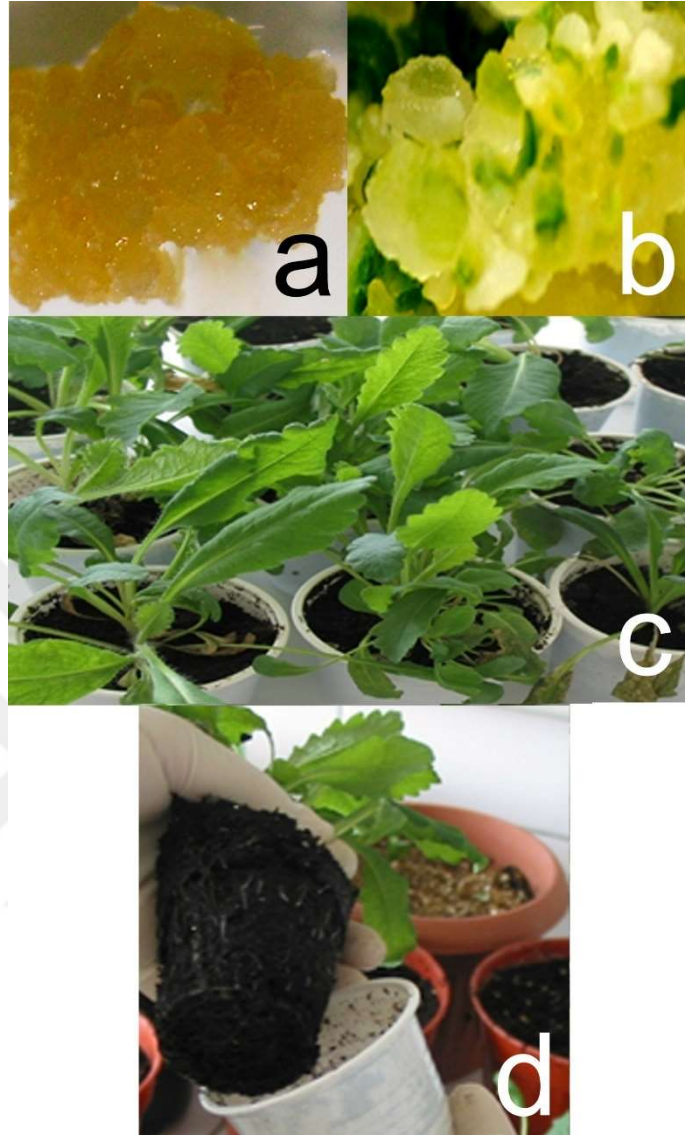
Anterler oksidatif stres durumunda olması nedeniyle 7-10 günlüğüne 50 mgL⁻¹ GA₃ (giberellik asit) içeren ortama alınmıştır. Besin ortamlarına 30 mgL⁻¹ süktroz şekere ilaveten 90 mgL⁻¹ maltoz eklenmiştir. Giberellik asit içeren ortama alınan anterler 18 °C'de, 3000 lux ışık yoğunluğunda inkübe edilmiştir. Ancak oksidatif stresten oluşan hasarın fazla olması nedeniyle eksplantlardaki nekroz oluşumu tüm eksplantları kaplayarak canlılık kaybına sebep olmuştur. Çalışmaların ilk kısmında haploid bitki eldesi üzerine yapılan denemelerden sonuç alınamamıştır. Daha sonraki çalışmalara Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri bölümünde devam edilmiş, ekimler tarla ve sera koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Bir sonraki denemede (Kasım/2019) soğuk stresinin anter kültürü üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla 45 derecelik aç gösteren tomurcuklar 8 °C'de 2, 4 ve 8 gün bekletilerek nazikçe bisturi ve pens ile açılarak anterleri (1000'er adet) elde edilmiştir. Çizelge 4.5'te belirtilmiş 5 adet haşhaş çeşidinde şişme gösteren ortamlar ile 20 g/l süktroz ve 0.1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l KNA (potasyum içeren naftalen asetik asit) içeren ortamda 4 gün soğuk muamele gören 1000'er adet anterlerden yalnız kallus oluşumu elde edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışma koşulları ile çalışma devam ettirilmemiştir.

Buna ilaveten, 8 gün 8 °C’de bekletilen 1000 adet anterden %0.08 (8 adet anter) androgenetik kallus ve daha sonra yalnız %0.03 kallustan somatik embriyogenesis yoluyla spontan double haploid bitki elde edilmiştir (Şekil 4.5). Diğer kalluslarda zamanla nekroz oluşumu izlenmiştir.

Çizelge 4.5. Anterlerin kültüre alındığı ilk besin ortamları ve ön uygulamalarına ait sonuçlar

	Besin Ortamı İçeriği			Soğuk muamelesiz	4 °C’ de 24 saat bekletme	4 °C’ de 48 saat bekletme	
Ortam No.’lar	Kinetin (mgL ⁻¹)	2,4-D (mgL ⁻¹)	Vitamin B12 (mgL ⁻¹)	Şişkinliği gösteren çeşitleri (%)	Şişkinliği gösteren çeşitleri (%)	Şişkinliği gösteren çeşitleri (%)	Kallus oluşum gösteren çeşitleri (%)
1	0.01	0.01	0.03	0.00	Eksplantlarda Şişme izlenmemiştir	Eksplantlarda Şişme izlenmemiştir	
2	0.01	0.1	0.03	0.00			
3	0.01	1	0.03	0.00			
4	0.1	0.01	0.03	0.00			
5	0.1	0.1	0.03	0.00			
6	0.1	1	0.03	0.00			
7	1	0.01	0.03	0.00	Ofis 96, Ofis 8, Ofis 95, Kemer kaya 95 çeşitlerine ait anterlerde %100 şişme ve kararma izlenmiştir.	Ofis 96, Ofis 8, Ofis 95, Kemer kaya 95, Ofis 95 çeşitlerine ait anterlerde %100 şişme ve daha sonra kararma izlenmiştir.	
8	1	0.1	0.03	0.00	0.00		
9	1	1	0.03	0.00			



Şekil 4.5. (a) Kallus ve somatik embriyo oluşumu (b) Somatik embriyoların olgunlaşması (c) Elde edilen bitkilerin saksılara aktararak alıştırılması (d) Alıştırılmış bitkilerin çiçeklendirmek amacıyla büyük saksılara aktararak açık havada büyütülmesi

Duran (2007), *Triticum durum*'da, Hakan (2013), susam bitkisi anter kültürü çalışmalarında farklı soğuk muamelelerin önemini vurgulamaktadır. Dieu ve Dunwel (1988)'in sonuçları bu çalışmadan elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar sırasıyla 3160'er adet soğuk muamele görmemiş, 2 ve 7 gün soğuk muamele görmüş anterden %2.4, %2.4 ve %6 androgenetik kallus elde etmişlerdir.

Çömlekçioğlu (2001), biber (*Capsicum annuum*) bitkisinde anter kültürü yoluyla elde edilen bitkilerin haploid kromozom sayısına sahip olabileceği gibi, bazılarının kültür

koşullarında kendiliğinden (spontan) katlandığı ve spontan dihaploid bireylerin de elde edildiğini bildirmektedir. Sarier (2016) çalışmasında, seraya aktarılan yeşil bitkiciklerin %49.35'inden haploid bitki ve %11.55'inden spontan doubled-haploid bitki elde etmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, spontan haploid bitkilerin elde edilmesi noktasında bizim çalışmamızla da uyumluluk göstermektedir.

Haploid bitkiler fertil olmadığı için uygun zamanda kromozom sayısının katlanarak fertil doubled-haploid bitkilerin elde edilmesi gerekmektedir. Kromozom katlamada en yaygın olarak kullanılan kolşisin mutajen etkiye sahip olduğu için pratikte uygulanan haploid bitki sayısının az olması buna karşılık spontan doubled-haploid bitki sayısının yüksek olması tercih edilmekte ve kolşisin uygulamasından kaçınılmaktadır. Bu açıdan spontan doubled-haploidler ıslah çalışmalarında kullanımı açısından güvenilirdir. Sarier (2016) çalışmasında, 2 farklı ekmeklik buğday ileri hattını materyal olarak kullanmıştır. Bizim çalışmamızda ise başlangıçta 5 farklı tescilli haşhaş çeşidi kullanılmış, sonraki yıllarda ise Ofis 95 çeşidi ile devam edilerek sonuçlar elde edilmiştir.

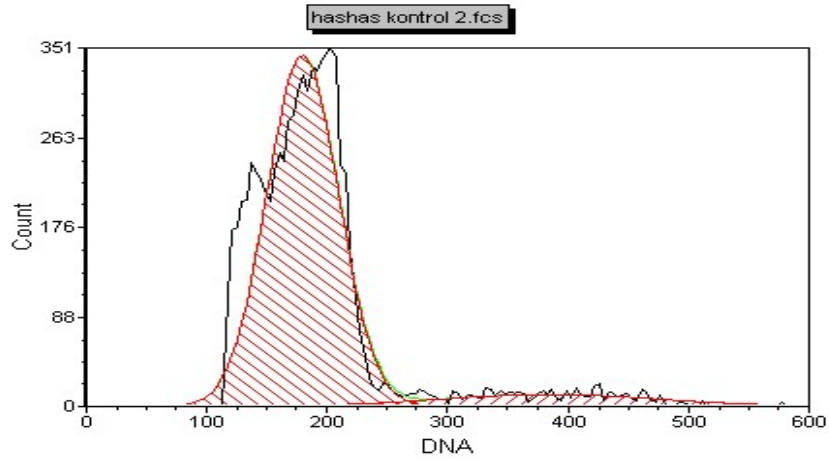
Dieu ve ark., (1988), haşhaş (*Papaver somniferum* L.) ile yapılan araştırmada 43 farklı genotip kullanmışlardır. Soğuk stresinin anter kültürü üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla 7 °C'de 2 gün ve 7 °C'de 7 günlük soğuk şoku uygulaması yapılmıştır. 367 androgenetik kallustan 63 bitki gelişimi gözlenmiştir. Bunlardan 60 tanesi diploid, 2 tanesi kimerik (haplo-diploid) ve 1 tanesi de haploiddir. Çalışmamızla besin ortamında K ve BAP kullanımı ve soğuk stresi uygulamaları açısından benzerlik göstermektedir. Soğuk stresinde ise çalışmamızda 4 °C sıcaklık kullanılmışken, diğer çalışmada 7 °C'lik soğuk stresi uygulanmıştır. Yine çalışmamızda süre bakımından 24 saat ve 48 saat olarak iki farklı zaman diliminde tomurcuklar soğuk stresine maruz bırakılırken, Dieu'nun çalışmasında bu süre 2 gün ve 7 gün olarak daha uzun tutulmuştur.

4.8. Ploidi Analizi Sonuçları

Saksılarda yetiştirilen Ofis 95 çeşidine ait 4'er adet diploid bitkiler (kontrol) ve double haploid bitkilerden yaprak örnekleri alınarak ploidi analizi cihazı ile ploidi seviyelerinin belirlenmesi sonucunda, double haploid bitkilerde spontan kromozom katlanması tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6' da gösterilmektedir.

03.06.2021

T.C.
GIDA, TARIM ve HAYVANCILIK BAKANLIĞI
TARLA BİTKİLERİ MERKEZ ARAŞTIRMA ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ
BİYOTEKNOLOJİ ARAŞTIRMA MERKEZİ



G1 Mean	G1 CV	%G1	G2 Mean	G2 CV	%G2	%S	G2/G1	%Total
11816,73	16,63	90,49	25358,82	23,67	9,51	0,00	2,15	100,00

Histogram #	Filename	Median	Geometric Mean	CV
1	hashas kontrol 2.fcs	12024,00	12320,01	46,12
3	hashas kontrol 2.fcs - Cell Cycle fit	12022,58	12455,67	36,36
4	hashas kontrol 2.fcs - Cell Cycle fit	11770,58	11601,53	16,63
5	hashas kontrol 2.fcs - Cell Cycle fit	65280,00	n/a	n/a
6	hashas kontrol 2.fcs - Cell Cycle fit	25259,82	24489,33	23,68

Şekil 4.6. Ploidi analizine ait sonuç grafiği

SONUÇ ve ÖNERİLER

Haploid bitki üretimi son yıllarda bitki ıslahı alanında yaygın olarak kullanılan araçlardan biri haline gelmiştir. Haploid üretim uygulamaları üzerine araştırmalar, *Datura stramonium*'daki keşiflerden (Blakeslee ve ark., 1922) bu yana hızla gelişip devam etmektedir. Bitki türlerinde spontan dihaploid görülme sıklığı çok düşüktür. Ancak, *in vitro* kültür teknikleriyle haploid ve dihaploid bitkilerin yüksek oranda elde edilebilmesi ve zaman tasarrufu nedeniyle bu yöntemler gittikçe önem kazanmaktadır. 1964'te Guha ve Maheshwari, kültürlenmiş polenin haploid bitkilerin üretimine yol açtığını keşfetmiştir. O zamandan beri, anter ve/veya polen kültürünün haploid üretimi için kullanımı hem dikot hem de monokot olmak üzere bir dizi bitki türünde rapor edilmiştir (Maheshwari ve ark., 1964; Narayanaswamy ve George, 1982; ve Rao, 1996; Dunwell, 1985; Bajaj, 1990; Huang, 1992; Wenzel ve ark., 1992). Her bir lokustaki allelerden sadece bir seriyi içeren yani bir kromozom setine sahip haploidler genetik mekanizmaları incelemek için kullanılmaktadır. Araştırmalarda dihaploidlerin başarılı bir şekilde elde edilmesi homozigotluğa ve genetik stabiliteye ulaşmak için önemlidir. Genel olarak kromozom katlama teknikleri, (a) rejenerasyonun ardından kallus indüksiyonu ve (b) hücre bölünmesi sırasında fiziksel veya kimyasal (kolşisin vd.) muamele ile elde edilmektedir. Haploid dokuları veya haploid bitkileri diploidize ederek yüzde yüz homozigotları üretmenin etkili yollarını optimize etmek için çaba gösterilmesi gerekmektedir.

Dieu ve Dunwel (1988) tarafından yapılan bir çalışmada, haşhaş bitkisinde çok düşük oranda double haploid üretimi gerçekleşmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da Türkiye'de yetiştirilen ve Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Taşlıçiftlik Kampüsü deneme alanlarında hem kışlık hem de yazlık olarak ekimi yapılan 18 farklı haşhaş çeşidi (Ankara 94, Afyon kalesi, Anayurt 95, Afyon 95, Camcı 95, Çelikoğlu Ofis 3, Ofis 4 Ofis 8, Ofis 95, Ofis 96, TMO 1, TMO 2, TMO 3, Karahisar 96, Kemer kaya 95, Kocatepe 96, Şuhut 94) kullanılarak dihaploid bitki elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk kısmında genel olarak anterlerde şişme ve sonrasında kararma ile canlılık kaybı gözlenmiştir. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri bölümünde yürütülen sonraki çalışmalar neticesinde, yalnızca Ofis-95 çeşidine (morfin oranı %0.660, kapsül verimi 93 kg/da ve tohum verimi 118 kg/da) ait 16 saatlik ışık fotoperiyodundaki

eksplantlardan %0.03 oranında spontan dihaploid bitkiler elde edilmiştir. Ploidi analizinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda dihaploid bitkilerdeki kromozom sayısı da $2n=22$ olarak doğrulanmıştır. Diğer eksplantlar üzerinde ise yaygın olarak kararma izlenmiştir.

Literatür özeti kısmında da detaylı bir şekilde açıklandığı üzere, genotiplerin anter kültürüne göstermiş oldukları tepkilerin oldukça değişken olduğu belirtilmiştir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birinin genotip olduğu düşünülmektedir. Yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak, bu çalışmada da haşhaş bitkisinde dihaploid bitki üretiminin genotipe özgü olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, yapılan bu tez çalışması sonucunda 18 adet haşhaş çeşitlerinden sadece Ofis 95 çeşidinde düşük oranda dihaploid bitki elde edilmiştir. Diğer çeşitlere ait anterlerden bitki rejenerasyonunda kararsızlık izlenmiştir. Bundan sonraki süreçte, farklı hormon konsantrasyonları ve soğuk stres muameleleri ile daha yüksek ve kararlı rejenerasyon için yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma gelecekte bu alanda yapılacak çalışmalar için önemli bir temel teşkil etmektedir. Özellikle tıbbi, ticari ve ekonomik değeri olan haşhaş bitkisinde bulunan alkaloidlerin üretimi ve alkaloid içeriğinin yükseltilmesi amacıyla saf hatların üretilmesi ve haşhaşta haploid bitki üretim teknolojisinin geliştirilmesi bitki ıslah çalışmaları açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKÇA

- Abak, K. 1986. Biber Islahında Anter Kültüründen Yararlanma. Tübitak Bitki Islahı Sempozyumu Bildiri Özetleri. 15-17 Ekim, İzmir. Sayfa:64.
- Altındal, N., 2005. Çavdarda (*Secale cereale* L.) anter kültüründe ploidi, ön işlem ve besi ortamı içeriğinin etkisi. Yüksek lisans tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Aras, V., Bayram, A., 2004. Kurutmalık kırmızı biberlerde androgenesis yoluyla in vitro haploid embriyo uyartımı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2004, **17**(1), 87-94. 56.)
- Arı, E., Bedir, H., Yıldırım, S., Yıldırım, T., 2016. Androgenic Responses Of 64 Ornamental Pepper (*Capsicum annuum* L.) Genotypes To Shed-Microspore Culture In The Autumn Season. *Turkish Journal Of Biology*. 40:706-717.
- Arslan, Y. 2009. *Papaver somniferum* alkaloidleri ve özellikleri. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Bitirme Tezi, Ankara.
- Arslan, N., İpek, A., Sarıhan, E.O., Parmaksız, İ., Gümüşçü, A. ve Tanrıverdi, M.O. 2011. Erzincan ilinde bulunan *Oxytona* Seksiyonundaki Papaver Türlerinin Tebain Yönünden Değerlendirilmesi Üzerine Çalışmalar. VIII. Tarla bitkilerikongresi, Bursa.
- Anonim. 2006. Narcotic Drugs Production and Marketing.
- Ata, A., 2011. Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) anter kültüründe mevsim etkisi ve mikrospor gelişimi. Yüksek lisans tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Ataşi, K., 1999. Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı Ders Kitabı Notları. Trakya Üniversitesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi, Yayın No: 148, Tekirdağ.
- Ayar, F., 2003. Bazı biber (*Capsicum annuum* L.) çeşitlerinde anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde edilmesinde mevsimin ve bitki yaşının araştırılması. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri ABD, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Azcan, N., Kalender, B.O. and Kara, M. 2004. Investigation of Turkish poppy seeds and seed oils. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 40: pp. 370-372.
- Baba, B., 1992. *Hordeum vulgare* L. (arpa) üzerine anter kültürünün uygulanabilirliği. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Başer, İ., Z. Korkut, K., Bilgin, O. ve Balkan, A., 2016. Anter Kültürü Tekniği ile Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Melez Populasyonlarından Doubled

Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2016, 25 (Özel sayı-1):232-236 Araştırma Makalesi (Research Article)

- Bidgoly, R. O., Balouchi, H., Soltani, E., & Moradi, A., 2018. Effect of temperature and water potential on *Carthamus tinctorius* L. seed germination: Quantification of the cardinal temperatures and modeling using hydrothermal time. *Industrial Crops and Products*, 113, 121-127.
- Biner, B., 1998. Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine farklı sıcaklık ve ışık uygulamalarının etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Akdeniz Üniversitesi.
- Blakeslee, A.F., J. Belling, M.E. Farnham and A.D. Bergner, 1922. A haploid mutant in Jimsonweed, *Datura stramonium*. *Science* 55: 646-647.
- Bajaj, Y.P.S., 1990. Haploids in Crop Improvement. Vol. 12., Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag, Berlin.
- Butnariu, M., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Pentea, M., Sarac, I., Küşümler, A. S., & Cho, W. C., 2022. Papaver Plants: Current Insights on Phytochemical and Nutritional Composition Along with Biotechnological Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
- Campbell, L. G., Blanchette, C. M., & Small, E., 2019. Risk analysis of gene flow from cultivated, addictive, social-drug plants to wild relatives. *The Botanical Review*, 85(2), 149-184.
- Çay, F., 2012. Bazı buğday melez popülasyonlarının anter kültürüne yanıtları. Yüksek lisans tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Çeliksaş, N., 1995. Arpa anter kültüründe genotip soğuk ön muamele süresi ve 2,4-D konsantrasyonunun haploid bitki üretimine etkileri. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Çetin, S., 2002. Asmada (*Vitis* spp.) anter kültürü üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S., and Abak, K., 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum*). XIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant, 2001, Antalya-Turkey.
- Dayan, S., 2011. Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) anter kültürü yolu ile haploid bitki eldesi üzerine araştırmalar. Doktora tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Davis, P. H. 1982. Flora of Turkey, Vol. 7: p. 395, Edinburg University Pres.
- Davis, P. H., Mill, R. R., and Tan, K. (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol 10. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.

- Dieu, P., Dunwell, J.M., 1988. Anther Culture with Different Genotypes of Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.): Effect of Cold Treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12;263-271.
- Doğramacı Altuntepe, M., 2000. Makarnalık buğday (*Triticum turgidum* L.) anter kültüründe genotip, besi ortamı ve donör bitki yetiştirme koşullarının haploid bitki üretimine etkileri ve rejenerantların sitolojik analizleri. Doktora Tezi, Tarla Bitkileri ABD, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Dunwell, J.M., 1985. Anther and ovule culture. In: S.W.J. Bright and M.G.K. Jones (Eds.), *Cereal Tissue and Cell Culture*, pp. 1-44.
- Duran, E.R. 2007. Tuzlu koşullar için geliştirilebilecek buğday genotiplerinin anter kültür tekniğine uyumu. *Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta*.
- Elçi, Ş., 1982. Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları. *Biyoloji*: 3. Elazığ. 165s.
- Ellialtıoğlu, S. Sarı, N. Abak, K. 2002. Haploid Bitki Üretimi (M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan, Editörler), *Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü ve Uygulamaları*. S.Ü. Vakfı Yayınları, II. Baskı, Konya, 137-189.
- Emiroğlu, Ü., 1982. Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. Ege Ü.Z.F. Yayınları, Yardımcı Ders Kitabı. Yayın No: 450. Bornova, İzmir. 38 Sayfa.
- Er, C., 1992. Bitki Islahında Doku Kültürleri. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayını, Ankara. 83 Sayfa.
- Erdurmuş, A., 1989. Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) hatlarında fenolojik ve morfolojik karakterlerin morfin ve tohum verimiyle ilişkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Engin, G., 1991. *Triticum aestivum* L. (Buğday) üzerinde anter kültürü çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gen Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385-402.
- Ferrie, A. M. R. Keller, W. A., 1997. Production of Haploids in *Brassica* Spp. Via Microspor Culture. *Plant Tissue Culture Manual*, E6: 1-17. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Forster, B. P. Heberle-Bors, E. Kashsa, K. J. Touraev, A., 2007. "The Resurgence of Haploids in Higher Plants" *Trends in Plant Science*, v:12-8, p:368-375.

- Foroughi-Wehr, B. Wenzel, G. 1993. Andro- And Parthenogenesis. In: Hayvard, M. D. Bosemark, N. O., Ramagosa, I., (Eds) Plant Breeding: Principles And Prospect. Chapman And Hall, London, Pp. 261-277.
- Geboloğlu, N., Doksöz Boncukçu, S., Durna, P., ve Bayram, M., 2017. Patlıcanda şeker, bal ve büyüme düzenleyicilerin anter kültüründe embriyoid oluşumuna etkisi. Akademik Ziraat Dergisi Cilt:6 Özel Sayı:275-280 (2017) *Araştırma* ISSN: 2147-6403 <http://azd.odu.edu.tr> (Research) 48.
- Gonzalo, M.J., Claveria, E., Monforte, A.J., Dolcet-Sanjuan, R. (2011) Parthenogenic haploids in melon: generation and molecular characterization of a doubled haploid line population. J. Am. Soc. Hort. Sci., 136(2):145–154.
- Hakan, M.T., 2013. Susam bitkisinde (*Sesamum indicum*L.) Anter kültürü ile kallus oluşturma potansiyelinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Hammer, K., Fritsch, R., Motel, J.S., Hanelt, P., Kruse, J. ve Schafer, H., 1977. Kultur pflanze XXVI" 1978" S. 363—381.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester and F.T. Davies., 1990. Plant Propagation. Principles of Propagation by Seed. 647 p.
- Hatipoğlu, R. 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Genel Yayın No:190, Ders Kitapları Yayın No: A-58, Adana. 178 Sayfa.
- Haşhaş Raporu, 2017. 2017 Yılı Haşhaş Sektör Raporu. Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü Yayınları.
- Hosokawa, K., Shibata, T., Nakamura, I. And Hishida, A., 2003. Discrimination Among Species of *Papaver* Based on the Plastid rpl16 Gene and the rpl16-rpl14 Spacer Sequence. Forensic Science International, Vol. 139: s. 195-199.
- Hooghvorst, I., Ramos-Fuentes, E., López-Cristofannini, C., Ortega, M., Vidal, R., Serrat, X., & Nogués, S., 2018. Antimitotic and hormone effects on green double haploid plant production through anther culture of Mediterranean japonica rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(2), 205-215.
- Huang, B., 1992. Genetic manipulation of microspores and microspore-derived embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 28 P: 53–58.
- Jansen, M. A., Hectors, K., O'Brien, N. M., Guisez, Y., & Potters, G., 2008. Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops?. *Plant Science*, 175(4), 449-458.
- Kaçar Aka, Y., Şimşek, Ö., Dönmez, D., Boncuk, M., Yeşiloğlu, T., ve Akgöl, M., 2014. W. Murcott mandarin çeşidinde anter kültürü çalışmaları. *Derim*, 2014, 31 (2):37-50.

- Kara, Z., Yazar, K., ve Ekinçi, H.,2018. Ekşi kara ve narince üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşitlerinde anter kültürü. BAHÇE 47 (Özel Sayı 1: Türkiye 9. Bağcılık ve Teknolojileri Sempozyumu): 671–676 (2018) ISSN 1300–894367149.
- Karaoglu, Cuma, and Ayten Salantur. "10 Anther Culture for Doubled Haploids." *Biotechnology of Major Cereals* (2016): 133.
- Karjee, S., Mahapatra, S., Singh, D., Saha, K., & Viswakarma, P. K. (2020). Production of double haploids in ornamental crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(4), 555-565.
- Karaman, M. R., A., Brohi (2004). Limit values of plant nutrition in soil based on different methods. Proceedings book for agriculture, industry, environment. Appendix Tables. Nobel Publishing, Editorsnames: M. R. Karaman, A. Brohi 1415-1426. Ankara. (In Turkish)
- Kapoor, L.D. 1995. Opium Poopy: Botany, Chemistry and Pharmacology. Food Products Press, New York.
- Korkunç, M., 2016. Pamukta (*Gossypium spp.*) anter kültürünü etkileyen faktörlerin incelenmesi. Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji ABD, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş.
- Khan, H., Bhardwaj, S. C., Gangwar, O. P., Prasad, P., & Rathore, R. (2017). Efficiency of double haploid production in wheat through wide hybridization and embryo rescue. *Indian J Genet Plant Breed*, 7(3), 428-430.
- Krikorian, A.D., Ledbetter, M.C.,1975. Some observations on the cultivation of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) for latex. *Bot. Rev.* 1975 Jan-Mar;41(1):30-103.
- Mahdavi-Damghani, A., Kamkar, B., Al-Ahmadi, M. J., Testi, L., Muñoz-Ledesma, F. J., & Villalobos, F. J. (2010). Water stress effects on growth, development and yield of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Agricultural water management*, 97(10), 1582-1590.
- Maheshwari, S.C., A.K. Tyagi and K. Malhotra, 1980. Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms-the current status. *Theor.Appl. Genet.* 58: 193–206.
- Moujalled, D., Strasser, A., & Liddell, J. R.,2021. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death & Differentiation*, 28(7), 2029-2044.
- Muhammad, A., Akhtar, A., Aslam, S., Khan, R. S., Ahmed, Z., & Khalid, N. (2021). Review on physicochemical, medicinal and nutraceutical properties of poppy seeds: a potential functional food ingredient. *Functional Foods in Health and Disease*, 11(10), 522-547.
- Murashige, T. And Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.*, 15; 473-497.

- Narayanaswamy, S. and L.P. Chandy, 1971. *In vitro* induction of haploid, diploid and triploid androgenic embryoids and plantlets in *Daturamete*. Ann. Bot. 35: 535–542.
- Parmaksız, İ. 2004. *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonunun Türkiye'de Yetişen Türlerinde Genetik Çeşitliliğin RAPD Markörleri İle İncelenmesi. Doktora Tezi, Tarla Bitkileri ABD, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Patra, N.K., Ram, R.S., Chauhan, S.P., ve Singh, A.K., 1992. Quantitative studies on the mating system of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). Theoretical and Applied Genetics. 84, 299-302.
- Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., DellaTorre, G. and Ferranti, F., 2003. 'Ozone- induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation', *Plant Physiology* **133**, 1122–1134.
- Tıprıdamaz, R., Ellialtıoğlu, Ş., 2002. Soğuk uygulamaları ve aktif kömürün biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü süresince absisik asit miktarındaki değişim üzerine etkisi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2002, **15**(1), 9-18. 50.
- Tanker, M. ve Tanker, N. 1990. Farmakognozi, Cilt I. Ankara Üni., Eczacılık Fak., Yayınları. No: 65. Ankara.
- Tanker, M. ve Tanker, N., 2003. Farmakognozi, Cilt II. Ankara Üni., Eczacılık Fak., Yayınları No: 66. Ankara.
- Özkum, D., Tıprıdamaz, R. ve Ellialtıoğlu, Ş., 2000. Relationship between endogenous abscisic acid content of anthers and *in vitro* androgenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.) 4 thInt. Symp. On *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding. 2-7 July 2000. Tampere. Finland. Abstracts (Late arrivals): 8.
- Özcan, S., Babaoğlu, M. ve Sancak, C., 2001. Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Babaoğlu. M., Gürel. E., Özcan. S., S.Ü. Vakfı Yayınları. Konya.
- Salantur, A., Yazar, S., Dönmez, E., ve Akar, T., 2011. Kışlık ekmeklik buğday f2 popülasyonlarının anter kültüründe bitki rejenarasyonuna tepkisinin belirlenmesi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2011, 20 (1): 15-21 Araştırma Makalesi (Research Article) 68.
- Sarıyar, G. 2002. Biodiversity in the Alkaloids of Turkish *Papaver* Species. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74 (4): pp. 557–574.
- Sakin, M.A., 1994. Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) anter kültüründe genotip ve besi ortamının haploid bitki oluşumuna etkileri üzerinde araştırmalar. Yüksek lisans tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi, Adana.

- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C. *et al.* (1998) 'Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3', *The Plant Journal* **16**, 235–245.
- Smith, W. W., & Fletcher, H. R. (1949). XXII. The Genus *Primula*: Sections *Cuneifolia*, *Floribundae*, *Parryi*, and *Auricula*. *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*, *61*(3), 631-686.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekar, L. ve Leblebici, E. 1995. Tohumlu Bitkiler Sistematigi. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Ders Kitapları Serisi No: 116, Sayfa:396, İzmir.
- Şahin, S., 2009. Bazı çeltik çeşit ve hatlarında anter kültürü yapma olanakları. Yüksek lisans tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Özcan, C., 2017. Ispanakta (*Spinacia oleracea* L.) anter kültürü ve ısıtılmış polenle tozlama yöntemi ile haploidizasyon. Doktora tezi, Bahçe Bitkileri ABD, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Rao, P.S., Suprasanna, P., 1996. Methods to double haploid chromosome numbers. In: Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (eds) *In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, vol 23. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1860-8_18.
- Tuvesson, S., Ljungberg, A., Johansson, N., Karlsson, K. E., Suijs, L. W., & Josset, J. P. (2000). Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breeding*, *119*(6), 455-459.
- Toğaç, H., 2014. Anter kültüründe genotip, besi ortamı ve oksin çeşidinin buğdayda (*Triticum aestivum* L.) haploid bitki rejenerasyonuna etkisi. Yüksek lisans tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Yadav, M., 2008. Encyclopedia of Molecular Developmental Biology Vol:4. 280 pp. Discovery Publishing. 9788183563000 ISBN.
- Yadav, M., Chaudhary, D., Sainger, M., & Jaiwal, P. K. (2010). Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *103*(3), 377-386.
- Yorgancılar, Ö., Yorgancılar, A. ve Yumurtacı, A., 2014. Bazı Türk ekmeklik buğday melezlerinde katlanmış haploid hatların taranması için anter kültürünün kullanımı. *Bilim ve Teknoloji Dergisi C –Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Cilt: 3 Sayı: 2*, 2014 Sayfa: 53 – 61, Anadolu Üniversitesi.
- Yorgancılar, Ö., Yorgancılar, A., Dikmen, S., Dikmen, S., Çarıkçı, M., Evcen, F., Van, F., Uzun, P., Yumurtacı, A., Kutlu, İ., Sirel, Z., 2016. Buğdayda F2 Generasyonunda Anter Kültürü Tekniği Kullanılarak Saf Hatların Elde Edilmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2016, 25 (Özel sayı-1):237-242 Araştırma Makalesi (Research Article).

- Zhao, H., Wang, X.X., D, Y.C., Zhu, D.W., Guo, Y.M., Gao, J.C., Li, F., John, C.S. (2014) Haploid Induction Via in Vitro Gynogenesis in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Journal of Integrative Agriculture*, 13 (10), 2122-2131.
- Vášek, J., Čílová, D., Melounová, M., Svoboda, P., Vejl, P., Štikarová, R., & Ovesná, J., 2019. New EST-SSR markers for individual genotyping of opium poppy cultivars (*Papaver somniferum* L.). *Plants*, 9(1), 10.
- Watkins, O., 2017. Presentation on Theme: “Anther and Pollen Culture”. <https://slideplayer.com/slide/1188945/>
- Wenzel, G., A. Graner, F. Fadel, J. Zitulsperger and B. Foroughi-Wehr, 1992. Production and use of haploids in crop improvement. In: J.P. Moss (Ed.), *Biotechnology and Crop Improvement in Asia*, pp. 169–179. ICRISAT, AP.
- Wohlgemuth, H., Mittelstrass, K., Kschieschan, S. *et al.* ,2002. ‘Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone’, *Plant, Cell and Environment* 25, 717–726.

EKLER

Ek 1: Kasım 2014 Gün Doğumu, Gün Batımı ve Gün Uzunluğu Bilgileri

2014	Gün doğumu/ gün batımı		Gün uzunluğu	
Kasım	Gün doğumu	Gün batımı	Uzunluk	Fark
1	06:03 ↑ (108°)	16:31 ↑ (252°)	10:28:08	-2:21
2	06:04 ↑ (109°)	16:30 ↑ (251°)	10:25:48	-2:19
3	06:05 ↑ (109°)	16:28 ↑ (251°)	10:23:30	-2:18
4	06:06 ↑ (110°)	16:27 ↑ (250°)	10:21:12	-2:17
5	06:07 ↑ (110°)	16:26 ↑ (250°)	10:18:56	-2:16
6	06:08 ↑ (110°)	16:25 ↑ (249°)	10:16:41	-2:14
7	06:09 ↑ (111°)	16:24 ↑ (249°)	10:14:28	-2:13
8	06:11 ↑ (111°)	16:23 ↑ (249°)	10:12:17	-2:11
9	06:12 ↑ (112°)	16:22 ↑ (248°)	10:10:06	-2:10
10	06:13 ↑ (112°)	16:21 ↑ (248°)	10:07:58	-2:08
11	06:14 ↑ (112°)	16:20 ↑ (248°)	10:05:51	-2:06
12	06:15 ↑ (113°)	16:19 ↑ (247°)	10:03:46	-2:05
13	06:16 ↑ (113°)	16:18 ↑ (247°)	10:01:43	-2:03
14	06:18 ↑ (113°)	16:17 ↑ (246°)	9:59:42	-2:01
15	06:19 ↑ (114°)	16:16 ↑ (246°)	9:57:42	-1:59
16	06:20 ↑ (114°)	16:16 ↑ (246°)	9:55:45	-1:57
17	06:21 ↑ (114°)	16:15 ↑ (245°)	9:53:50	-1:55
18	06:22 ↑ (115°)	16:14 ↑ (245°)	9:51:57	-1:52
19	06:23 ↑ (115°)	16:13 ↑ (245°)	9:50:06	-1:50
20	06:25 ↑ (115°)	16:13 ↑ (244°)	9:48:18	-1:48

Ek 1: Kasım 2014 Gün Doğumu, Gün Batımı ve Gün Uzunluğu Bilgileri (devamı)

21	06:26 ↑ (116°)	16:12 ↑ (244°)	9:46:32	−1:46
22	06:27 ↑ (116°)	16:12 ↑ (244°)	9:44:48	−1:43
23	06:28 ↑ (116°)	16:11 ↑ (244°)	9:43:07	−1:40
24	06:29 ↑ (117°)	16:10 ↑ (243°)	9:41:29	−1:38
25	06:30 ↑ (117°)	16:10 ↑ (243°)	9:39:53	−1:35
26	06:31 ↑ (117°)	16:10 ↑ (243°)	9:38:20	−1:32
27	06:32 ↑ (117°)	16:09 ↑ (243°)	9:36:50	−1:30
28	06:33 ↑ (118°)	16:09 ↑ (242°)	9:35:23	−1:27
29	06:34 ↑ (118°)	16:08 ↑ (242°)	9:33:59	−1:24
30	06:35 ↑ (118°)	16:08 ↑ (242°)	9:32:38	−1:21

Ek 2 : Aralık 2014 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri

2014	Gün doğumu/ gün batımı		Gün uzunluğu	
Aralık	Gün doğumu	Gün batımı	Uzunluk	Fark
1	06:36 ↑ (118°)	16:08 ↑ (242°)	9:31:20	−1:17
2	06:37 ↑ (119°)	16:08 ↑ (241°)	9:30:05	−1:14
3	06:38 ↑ (119°)	16:07 ↑ (241°)	9:28:54	−1:11
4	06:39 ↑ (119°)	16:07 ↑ (241°)	9:27:46	−1:08
5	06:40 ↑ (119°)	16:07 ↑ (241°)	9:26:41	−1:04
6	06:41 ↑ (119°)	16:07 ↑ (241°)	9:25:40	−1:01
7	06:42 ↑ (119°)	16:07 ↑ (241°)	9:24:42	−0:57
8	06:43 ↑ (120°)	16:07 ↑ (240°)	9:23:48	−0:54
9	06:44 ↑ (120°)	16:07 ↑ (240°)	9:22:57	−0:50
10	06:45 ↑ (120°)	16:07 ↑ (240°)	9:22:10	−0:46
11	06:46 ↑ (120°)	16:07 ↑ (240°)	9:21:27	−0:43
12	06:46 ↑ (120°)	16:07 ↑ (240°)	9:20:47	−0:39
13	06:47 ↑ (120°)	16:07 ↑ (240°)	9:20:12	−0:35
14	06:48 ↑ (120°)	16:08 ↑ (240°)	9:19:40	−0:31
15	06:49 ↑ (120°)	16:08 ↑ (240°)	9:19:12	−0:27
16	06:49 ↑ (120°)	16:08 ↑ (240°)	9:18:48	−0:24
17	06:50 ↑ (120°)	16:08 ↑ (239°)	9:18:28	−0:20
18	06:51 ↑ (121°)	16:09 ↑ (239°)	9:18:12	−0:16
19	06:51 ↑ (121°)	16:09 ↑ (239°)	9:18:00	−0:12
20	06:52 ↑ (121°)	16:10 ↑ (239°)	9:17:51	−0:08

Ek 2 : Aralık 2014 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri

21	06:52 ↑ (121°)	16:10 ↑ (239°)	9:17:47	−0:04
22	06:53 ↑ (121°)	16:11 ↑ (239°)	9:17:47	< 1s
23	06:53 ↑ (121°)	16:11 ↑ (239°)	9:17:51	+0:03
24	06:54 ↑ (121°)	16:12 ↑ (239°)	9:17:59	+0:07
25	06:54 ↑ (121°)	16:12 ↑ (239°)	9:18:10	+0:11
26	06:55 ↑ (121°)	16:13 ↑ (240°)	9:18:26	+0:15
27	06:55 ↑ (120°)	16:14 ↑ (240°)	9:18:46	+0:19
28	06:55 ↑ (120°)	16:14 ↑ (240°)	9:19:09	+0:23
29	06:55 ↑ (120°)	16:15 ↑ (240°)	9:19:37	+0:27
30	06:56 ↑ (120°)	16:16 ↑ (240°)	9:20:08	+0:31
31	06:56 ↑ (120°)	16:17 ↑ (240°)	9:20:44	+0:35

Ek 3: Ocak 2015 Kasım 2014 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri

2015	Gün doğumu/ gün batımı		Gün uzunluğu	
Ocak	Gün doğumu	Gün batımı	Gün doğumu	Gün batımı
1	06:56 ↑ (120°)	16:17 ↑ (240°)	9:21:23	+0:39
2	06:56 ↑ (120°)	16:18 ↑ (240°)	9:22:x06	+0:42
3	06:56 ↑ (120°)	16:19 ↑ (240°)	9:22:53	+0:46
4	06:56 ↑ (120°)	16:20 ↑ (240°)	9:23:43	+0:50
5	06:56 ↑ (120°)	16:21 ↑ (241°)	9:24:37	+0:54
6	06:56 ↑ (119°)	16:22 ↑ (241°)	9:25:35	+0:57
7	06:56 ↑ (119°)	16:23 ↑ (241°)	9:26:36	+1:01
8	06:56 ↑ (119°)	16:24 ↑ (241°)	9:27:41	+1:04
9	06:56 ↑ (119°)	16:25 ↑ (241°)	9:28:49	+1:08
10	06:56 ↑ (119°)	16:26 ↑ (241°)	9:30:01	+1:11
11	06:56 ↑ (118°)	16:27 ↑ (242°)	9:31:16	+1:14
12	06:55 ↑ (118°)	16:28 ↑ (242°)	9:32:34	+1:18
13	06:55 ↑ (118°)	16:29 ↑ (242°)	9:33:55	+1:21
14	06:55 ↑ (118°)	16:30 ↑ (242°)	9:35:20	+1:24
15	06:54 ↑ (117°)	16:31 ↑ (243°)	9:36:47	+1:27
16	06:54 ↑ (117°)	16:32 ↑ (243°)	9:38:18	+1:30
17	06:53 ↑ (117°)	16:33 ↑ (243°)	9:39:51	+1:33
18	06:53 ↑ (117°)	16:34 ↑ (243°)	9:41:28	+1:36
19	06:52 ↑ (116°)	16:36 ↑ (244°)	9:43:07	+1:39
20	06:52 ↑ (116°)	16:37 ↑ (244°)	9:44:48	+1:41
21	06:51 ↑ (116°)	16:38 ↑ (244°)	9:46:33	+1:44

**Ek 3: Ocak 2015 Kasım 2014 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri
(devamı)**

22	06:51 ↑ (116°)	16:39 ↑ (245°)	9:48:20	+1:46
23	06:50 ↑ (115°)	16:40 ↑ (245°)	9:50:09	+1:49
24	06:49 ↑ (115°)	16:41 ↑ (245°)	9:52:01	+1:51
25	06:49 ↑ (115°)	16:43 ↑ (246°)	9:53:55	+1:54
26	06:48 ↑ (114°)	16:44 ↑ (246°)	9:55:51	+1:56
27	06:47 ↑ (114°)	16:45 ↑ (246°)	9:57:50	+1:58
28	06:46 ↑ (114°)	16:46 ↑ (247°)	9:59:50	+2:00
29	06:46 ↑ (113°)	16:47 ↑ (247°)	10:01:53	+2:02
30	06:45 ↑ (113°)	16:49 ↑ (247°)	10:03:57	+2:04
31	06:44 ↑ (112°)	16:50 ↑ (248°)	10:06:04	+2:06

Ek 4: Şubat 2015 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri

2015	Gün doğumu/ gün batımı		Gün uzunluğu	
Şub	Gün doğumu	Gün batımı	Gün doğumu	Gün batımı
1	06:43 ↑ (112°)	16:51 ↑ (248°)	10:08:12	+2:08
2	06:42 ↑ (112°)	16:52 ↑ (249°)	10:10:22	+2:10
3	06:41 ↑ (111°)	16:54 ↑ (249°)	10:12:34	+2:11
4	06:40 ↑ (111°)	16:55 ↑ (249°)	10:14:47	+2:13
5	06:39 ↑ (110°)	16:56 ↑ (250°)	10:17:02	+2:14
6	06:38 ↑ (110°)	16:57 ↑ (250°)	10:19:19	+2:16
7	06:37 ↑ (110°)	16:58 ↑ (251°)	10:21:37	+2:17
8	06:36 ↑ (109°)	17:00 ↑ (251°)	10:23:56	+2:19
9	06:35 ↑ (109°)	17:01 ↑ (251°)	10:26:16	+2:20
10	06:33 ↑ (108°)	17:02 ↑ (252°)	10:28:38	+2:21
11	06:32 ↑ (108°)	17:03 ↑ (252°)	10:31:01	+2:23
12	06:31 ↑ (107°)	17:04 ↑ (253°)	10:33:26	+2:24
13	06:30 ↑ (107°)	17:06 ↑ (253°)	10:35:51	+2:25
14	06:29 ↑ (107°)	17:07 ↑ (254°)	10:38:18	+2:26
15	06:27 ↑ (106°)	17:08 ↑ (254°)	10:40:45	+2:27
16	06:26 ↑ (106°)	17:09 ↑ (255°)	10:43:13	+2:28
17	06:25 ↑ (105°)	17:10 ↑ (255°)	10:45:43	+2:29
18	06:23 ↑ (105°)	17:12 ↑ (255°)	10:48:13	+2:30
19	06:22 ↑ (104°)	17:13 ↑ (256°)	10:50:44	+2:31
20	06:21 ↑ (104°)	17:14 ↑ (256°)	10:53:16	+2:31
21	06:19 ↑ (103°)	17:15 ↑ (257°)	10:55:48	+2:32
22	06:18 ↑ (103°)	17:16 ↑ (257°)	10:58:22	+2:33
23	06:17 ↑ (102°)	17:17 ↑ (258°)	11:00:56	+2:33
24	06:15 ↑ (102°)	17:19 ↑ (258°)	11:03:30	+2:34
25	06:14 ↑ (101°)	17:20 ↑ (259°)	11:06:05	+2:35
26	06:12 ↑ (101°)	17:21 ↑ (259°)	11:08:41	+2:35

Ek 4: Şubat 2015 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri (devamı)

27	06:11 ↑ (100°)	17:22 ↑ (260°)	11:11:17	+2:36
28	06:09 ↑ (100°)	17:23 ↑ (260°)	11:13:54	+2:36



Ek 5: Mart 2015 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri

2015	Gün doğumu/ gün batımı		Gün uzunluğu	
Mart	Gün doğumu	Gün batımı	Gün doğumu	Gün batımı
1	06:08 ↑ (99°)	17:24 ↑ (261°)	11:16:31	+2:37
2	06:06 ↑ (99°)	17:25 ↑ (261°)	11:19:08	+2:37
3	06:05 ↑ (98°)	17:26 ↑ (262°)	11:21:46	+2:37
4	06:03 ↑ (98°)	17:28 ↑ (262°)	11:24:24	+2:38
5	06:02 ↑ (97°)	17:29 ↑ (263°)	11:27:03	+2:38
6	06:00 ↑ (97°)	17:30 ↑ (263°)	11:29:42	+2:38
7	05:59 ↑ (96°)	17:31 ↑ (264°)	11:32:21	+2:39
8	05:57 ↑ (96°)	17:32 ↑ (264°)	11:35:01	+2:39
9	05:55 ↑ (95°)	17:33 ↑ (265°)	11:37:40	+2:39
10	05:54 ↑ (95°)	17:34 ↑ (265°)	11:40:20	+2:39
11	05:52 ↑ (94°)	17:35 ↑ (266°)	11:43:00	+2:40
12	05:51 ↑ (94°)	17:36 ↑ (266°)	11:45:41	+2:40
13	05:49 ↑ (93°)	17:37 ↑ (267°)	11:48:21	+2:40
14	05:47 ↑ (93°)	17:38 ↑ (267°)	11:51:02	+2:40
15	05:46 ↑ (92°)	17:39 ↑ (268°)	11:53:42	+2:40
16	05:44 ↑ (92°)	17:41 ↑ (268°)	11:56:23	+2:40
17	05:43 ↑ (91°)	17:42 ↑ (269°)	11:59:04	+2:40
18	05:41 ↑ (91°)	17:43 ↑ (270°)	12:01:45	+2:40
19	05:39 ↑ (90°)	17:44 ↑ (270°)	12:04:26	+2:40
20	05:38 ↑ (90°)	17:45 ↑ (271°)	12:07:06	+2:40
21	05:36 ↑ (89°)	17:46 ↑ (271°)	12:09:47	+2:40
22	05:34 ↑ (89°)	17:47 ↑ (272°)	12:12:28	+2:40
23	05:33 ↑ (88°)	17:48 ↑ (272°)	12:15:09	+2:40
24	05:31 ↑ (88°)	17:49 ↑ (273°)	12:17:49	+2:40
25	05:29 ↑ (87°)	17:50 ↑ (273°)	12:20:30	+2:40
26	05:28 ↑ (87°)	17:51 ↑ (274°)	12:23:10	+2:40

Ek 5: Mart 2015 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri (devamı)

27	05:26 ↑ (86°)	17:52 ↑ (274°)	12:25:50	+2:40
28	05:25 ↑ (86°)	17:53 ↑ (275°)	12:28:31	+2:40
29	06:23 ↑ (85°)	18:54 ↑ (275°)	12:31:10	+2:39
30	06:21 ↑ (85°)	18:55 ↑ (276°)	12:33:50	+2:39
31	06:20 ↑ (84°)	18:56 ↑ (276°)	12:36:29	+2:39



Ek 6: Nisan 2015 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri

2015	Gün doğumu/ gün batımı		Gün uzunluğu	
Nisan	Gün doğumu	Gün batımı	Gün doğumu	Fark
1	06:18 ↑ (84°)	18:57 ↑ (277°)	12:39:08	+2:39
2	06:16 ↑ (83°)	18:58 ↑ (277°)	12:41:47	+2:38
3	06:15 ↑ (83°)	18:59 ↑ (278°)	12:44:26	+2:38
4	06:13 ↑ (82°)	19:00 ↑ (278°)	12:47:04	+2:38
5	06:12 ↑ (82°)	19:01 ↑ (279°)	12:49:42	+2:37
6	06:10 ↑ (81°)	19:02 ↑ (279°)	12:52:19	+2:37
7	06:08 ↑ (81°)	19:03 ↑ (280°)	12:54:57	+2:37
8	06:07 ↑ (80°)	19:04 ↑ (280°)	12:57:33	+2:36
9	06:05 ↑ (80°)	19:05 ↑ (281°)	13:00:09	+2:36
10	06:04 ↑ (79°)	19:06 ↑ (281°)	13:02:45	+2:35
11	06:02 ↑ (79°)	19:07 ↑ (282°)	13:05:21	+2:35
12	06:01 ↑ (78°)	19:08 ↑ (282°)	13:07:55	+2:34
13	05:59 ↑ (78°)	19:10 ↑ (283°)	13:10:30	+2:34
14	05:57 ↑ (77°)	19:11 ↑ (283°)	13:13:03	+2:33
15	05:56 ↑ (77°)	19:12 ↑ (284°)	13:15:36	+2:33
16	05:54 ↑ (76°)	19:13 ↑ (284°)	13:18:09	+2:32
17	05:53 ↑ (76°)	19:14 ↑ (285°)	13:20:41	+2:31
18	05:51 ↑ (75°)	19:15 ↑ (285°)	13:23:12	+2:31
19	05:50 ↑ (75°)	19:16 ↑ (286°)	13:25:42	+2:30
20	05:49 ↑ (74°)	19:17 ↑ (286°)	13:28:12	+2:29
21	05:47 ↑ (74°)	19:18 ↑ (286°)	13:30:40	+2:28
22	05:46 ↑ (73°)	19:19 ↑ (287°)	13:33:08	+2:27
23	05:44 ↑ (73°)	19:20 ↑ (287°)	13:35:35	+2:26
24	05:43 ↑ (72°)	19:21 ↑ (288°)	13:38:01	+2:26
25	05:41 ↑ (72°)	19:22 ↑ (288°)	13:40:26	+2:25
26	05:40 ↑ (72°)	19:23 ↑ (289°)	13:42:50	+2:24

Ek 6: Nisan 2015 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri (devamı)

27	05:39 ↑ (71°)	19:24 ↑ (289°)	13:45:13	+2:22
28	05:37 ↑ (71°)	19:25 ↑ (290°)	13:47:35	+2:21
29	05:36 ↑ (70°)	19:26 ↑ (290°)	13:49:56	+2:20
30	05:35 ↑ (70°)	19:27 ↑ (290°)	13:52:15	+2:19



Ek 7: Mayıs 2015 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri

2015	Gün doğumu/ gün batımı		Gün uzunluğu	
Mayıs	Gün doğumu	Gün batımı	Gün doğumu	Fark
1	05:33 ↑ (69°)	19:28 ↑ (291°)	13:54:33	+2:18
2	05:32 ↑ (69°)	19:29 ↑ (291°)	13:56:50	+2:16
3	05:31 ↑ (69°)	19:30 ↑ (292°)	13:59:06	+2:15
4	05:30 ↑ (68°)	19:31 ↑ (292°)	14:01:20	+2:14
5	05:29 ↑ (68°)	19:32 ↑ (292°)	14:03:33	+2:12
6	05:27 ↑ (67°)	19:33 ↑ (293°)	14:05:44	+2:11
7	05:26 ↑ (67°)	19:34 ↑ (293°)	14:07:54	+2:09
8	05:25 ↑ (67°)	19:35 ↑ (293°)	14:10:02	+2:08
9	05:24 ↑ (66°)	19:36 ↑ (294°)	14:12:08	+2:06
10	05:23 ↑ (66°)	19:37 ↑ (294°)	14:14:13	+2:04
11	05:22 ↑ (66°)	19:38 ↑ (295°)	14:16:16	+2:03
12	05:21 ↑ (65°)	19:39 ↑ (295°)	14:18:17	+2:01
13	05:20 ↑ (65°)	19:40 ↑ (295°)	14:20:17	+1:59
14	05:19 ↑ (65°)	19:41 ↑ (296°)	14:22:14	+1:57
15	05:18 ↑ (64°)	19:42 ↑ (296°)	14:24:09	+1:55
16	05:17 ↑ (64°)	19:43 ↑ (296°)	14:26:03	+1:53
17	05:16 ↑ (64°)	19:44 ↑ (297°)	14:27:54	+1:51
18	05:15 ↑ (63°)	19:45 ↑ (297°)	14:29:43	+1:48
19	05:14 ↑ (63°)	19:46 ↑ (297°)	14:31:30	+1:46
20	05:13 ↑ (63°)	19:47 ↑ (297°)	14:33:14	+1:44
21	05:13 ↑ (62°)	19:48 ↑ (298°)	14:34:56	+1:42
22	05:12 ↑ (62°)	19:48 ↑ (298°)	14:36:36	+1:39
23	05:11 ↑ (62°)	19:49 ↑ (298°)	14:38:13	+1:37
24	05:10 ↑ (62°)	19:50 ↑ (299°)	14:39:47	+1:34
25	05:10 ↑ (61°)	19:51 ↑ (299°)	14:41:19	+1:31
26	05:09 ↑ (61°)	19:52 ↑ (299°)	14:42:48	+1:29

Ek 7: Mayıs 2015 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri (devamı)

27	05:08 ↑ (61°)	19:53 ↑ (299°)	14:44:15	+1:26
28	05:08 ↑ (61°)	19:54 ↑ (300°)	14:45:38	+1:23
29	05:07 ↑ (60°)	19:54 ↑ (300°)	14:46:59	+1:20
30	05:07 ↑ (60°)	19:55 ↑ (300°)	14:48:17	+1:17
31	05:06 ↑ (60°)	19:56 ↑ (300°)	14:49:32	+1:14



Ek 8: Haziran 2015 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri

2015 Haziran	Gün doğumu/ gün batımı		Gün uzunluğu	
	Gün doğumu	Gün batımı	Gün uzunluğu	Fark
1	05:06 ↑ (60°)	19:57 ↑ (300°)	14:50:44	+1:11
2	05:05 ↑ (60°)	19:57 ↑ (301°)	14:51:53	+1:08
3	05:05 ↑ (59°)	19:58 ↑ (301°)	14:52:58	+1:05
4	05:05 ↑ (59°)	19:59 ↑ (301°)	14:54:01	+1:02
5	05:04 ↑ (59°)	19:59 ↑ (301°)	14:55:00	+0:59
6	05:04 ↑ (59°)	20:00 ↑ (301°)	14:55:56	+0:55
7	05:04 ↑ (59°)	20:01 ↑ (301°)	14:56:48	+0:52
8	05:04 ↑ (59°)	20:01 ↑ (301°)	14:57:38	+0:49
9	05:03 ↑ (59°)	20:02 ↑ (302°)	14:58:24	+0:45
10	05:03 ↑ (58°)	20:02 ↑ (302°)	14:59:06	+0:42
11	05:03 ↑ (58°)	20:03 ↑ (302°)	14:59:45	+0:38
12	05:03 ↑ (58°)	20:03 ↑ (302°)	15:00:20	+0:35
13	05:03 ↑ (58°)	20:04 ↑ (302°)	15:00:52	+0:31
14	05:03 ↑ (58°)	20:04 ↑ (302°)	15:01:21	+0:28
15	05:03 ↑ (58°)	20:05 ↑ (302°)	15:01:45	+0:24
16	05:03 ↑ (58°)	20:05 ↑ (302°)	15:02:06	+0:21
17	05:03 ↑ (58°)	20:05 ↑ (302°)	15:02:24	+0:17
18	05:03 ↑ (58°)	20:06 ↑ (302°)	15:02:38	+0:13
19	05:03 ↑ (58°)	20:06 ↑ (302°)	15:02:48	+0:10
20	05:03 ↑ (58°)	20:06 ↑ (302°)	15:02:54	+0:06
21	05:04 ↑ (58°)	20:06 ↑ (302°)	15:02:57	+0:02
22	05:04 ↑ (58°)	20:07 ↑ (302°)	15:02:57	< 1s
23	05:04 ↑ (58°)	20:07 ↑ (302°)	15:02:52	−0:04
24	05:04 ↑ (58°)	20:07 ↑ (302°)	15:02:44	−0:08
25	05:05 ↑ (58°)	20:07 ↑ (302°)	15:02:32	−0:11
26	05:05 ↑ (58°)	20:07 ↑ (302°)	15:02:17	−0:15

Ek 8: Haziran 2015 gün doğumu gün batım ve gün uzunluğu bilgileri (devamı)

27	05:05 ↑ (58°)	20:07 ↑ (302°)	15:01:58	−0:18
28	05:06 ↑ (58°)	20:07 ↑ (302°)	15:01:35	−0:22
29	05:06 ↑ (58°)	20:07 ↑ (302°)	15:01:09	−0:26
30	05:06 ↑ (58°)	20:07 ↑ (302°)	15:00:39	−0:29

Kaynak: <https://www.timeanddate.com/sun/@738743?month=6&year=2015>

