

## ***Anemone coronaria* var. *coccinea*'da androgenesis çalışmaları için uygun çiçek tomurcuğu morfolojisinin tespit edilmesi**

### **Determination of suitable flower bud morphology for androgenesis studies in *Anemone coronaria* var. *coccinea***

**Esin ARI<sup>1</sup>, Saadet BÜYÜKALACA<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, 07100 – Antalya, Türkiye

<sup>2</sup> Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana, Türkiye

Sorumlu yazar (*Corresponding author*): Esin ARI, e-posta (*e-mail*): esinari@hotmail.com

#### MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 24 Mart 2010  
Düzeltilme tarihi 06 Temmuz 2010  
Kabul tarihi 12 Temmuz 2010

#### **Anahtar Kelimeler:**

Manisa lalesi  
Anter kültürü  
Uygun tomurcuk  
Tek çekirdekli mikrospor

#### ÖZ

Anemon cinsi içerisinde, en fazla kültürü ve ıslah çalışmaları yapılan tür *Anemone coronaria* L.'dir. Ancak türdeki yüksek heterozigoti nedeniyle, saf hatlara ulaşma süreci en az 8-10 yıl gerektirmektedir. Bu problem ıslahçıları haploidizasyon tekniklerine yöneltmiş ve şimdiye kadar yürütülen az sayıdaki haploidizasyon çalışmalarında androgenesis yöntemleri tercih edilmiştir. Ancak, bu çalışmalarda kullanılacak uygun tomurcuk morfolojisine ilişkin ayrıntılı bilgiye rastlanmamıştır. Çalışmada, doğal *A.coronaria* var. *coccinea* tomurcukları içerisindeki mikrosporların gelişim aşamalarını belirlemek ve bunlara göre tek çekirdekli mikrospora sahip uygun çiçek tomurcuğunun tanımını yapabilmek amacıyla, farklı büyüklükteki tomurcuklar morfolojilerine göre 10 gruba ayrılmış ve bu tomurcuklar içerisindeki mikrosporların gelişim aşamalarını belirlemek için farklı sitolojik ve histolojik boyama yöntemleri kullanılmıştır. Bulgulara göre, *A.coronaria* var. *coccinea* androgenesis çalışmaları için en uygun safhalar oldukları kabul edilen geç tetrad ve tek çekirdekli safhadaki mikrosporları, genellikle 2 ve 3 numaralı tomurcukların içerdikleri belirlenmiştir. Bu tomurcukların makroskopik göstergeleri ise; genç tomurcukların özellikle toprak yüzeyinde yeni gözükmeye başladığı sıralarda eğik durması ve çiçek sapıyla neredeyse paralele yakın şekilde oldukça dar bir açı oluşturmaması, ortalama 6x9 mm büyüklükte olmaları ve involukrum yaprakların henüz açılmaması nedeniyle tepallerin dışarıdan görünmemesi olarak tanımlanmıştır. Çalışmada ayrıca, bir tomurcuk içerisindeki anterlerin asenkronik gelişim biçimi gösterdiği, bir anter içerisindeki mikrosporların ise homojen şekilde geliştikleri tespit edilmiştir.

#### ARTICLE INFO

Received 24 March 2010  
Received in revised form 06 July 2010  
Accepted 12 July 2010

#### **Keywords:**

Poppy anemone  
Anther culture  
Suitable flower bud  
Uninucleate microspore

#### ABSTRACT

The most intensive cultivation and breeding studies conducted in the genus *Anemone* has been actualized in *Anemone coronaria* L. species. However, the inbreeding process takes at least 8-10 years because of high level of heterozygosity in the species. The trouble in the obtaining uniform pure lines has oriented the breeders towards the haploidization techniques. In few haploidization studies performed in *A.coronaria* so far, anther culture technique was preferred. But, it could not be found detailed literature about the morphology of suitable flower bud to be used in androgenesis studies. In the study, it was aimed to determine the developmental stages of microspores in the flower buds of wild *A.coronaria* var. *coccinea* and to describe the morphology of the suitable bud having uninucleate microspores. For this purpose, the flower buds in different size were separated into 10 groups. Different cytologic and histological dying techniques were used for identification of the microspores' developmental stages. According to the findings, the flower buds in the second and third group containing the microspores in the stages of late-tetrad and uninucleate were determined to be the most suitable buds for androgenesis studies of *A.coronaria* var. *coccinea*. The morphological markers of them have been described as: Young buds stands curved especially when they first appears on the soil surface and creates a quite narrow angle almost parallel with the pedicels. They are approximately 6x9 mm in size and their tepals do not seen from the outside since the involucrem leaves are closed. Additionally, it was determined that the microspores in an anther are homogeneously developed while the anthers within a bud show asynchronous development.

## 1. Giriş

*Anemone* cinsi içinde ıslah çalışmalarının en fazla yapıldığı tür *Anemone coronaria* L.'dir. Kültürü yapılan anemonların gerçek atası Akdeniz ülkelerinde doğal olarak yetişen *A. coronaria*'nın çeşitli varyeteleridir (Meynet 1993). Daha önce yapılan çalışmalarda, *A. coronaria*'nın doğal varyeteleri ile kültür çeşitlerinin melezlenmesinden elde edilen F<sub>1</sub> hibritlerindeki büyük çap ve çiçek boyutu, heterosis ıslahının önemini ortaya koymuştur (Horovitz 1977).

Dünyada 400 yılı aşkın bir süredir kültürü yapılan bu türdeki ıslah çalışmaları yakın zamana kadar klasik ıslah yöntemleri ile yürütülmüştür. Ancak büyük oranda yabancı tozlanan bir tür olması nedeniyle, *A. coronaria* yüksek oranda heterozigotiye sahiptir ve homozigot hatlara ulaşmak en az 8-10 yıl zaman gerektirmektedir. Uniform hatlara ulaşmadaki bu problem, ıslahçıları ve araştırmacıları haploid bitki elde etmeye yöneltmiştir. *A. coronaria* türünde şimdiye kadar yapılan sınırlı sayıdaki haploidi çalışmalarında anter kültürü tercih edilmiştir (Sunderland ve Dunwell 1977; Arı 2006; Laura ve ark. 2006).

*In vitro* haploid uyartım yöntemlerinden olan androgenesiste, bitkinin erkek üreme organları olan anter veya mikrosporlar yapay ortamlarda kültüre alınmaktadır. Yöntemin temel esası, haploid hücre kaynağının (mikrospor) varlığına dayanmaktadır. Temel prensip; normal koşullarda erkek gameti oluşturacak olan mikrospor hücresinin gametofitik gelişimini durdurarak, çeşitli uyartılar yardımıyla embriyojenik yönde gelişmeye zorlamaktır (Emiroğlu 1982).

Aksi bildirilmedikçe, androgenesis çalışmalarında, genel kabul olarak tek çekirdekli gelişim aşamasında bulunan mikrosporlar kültüre alınmaktadır. Bu safhadaki mikrosporları içeren uygun çiçek tomurcuğu morfolojisini belirlemek için tomurcuk şekli ve büyüklüğü ile mikrosporların gelişme safhası arasında bir ilişki kurulmaktadır.

*A. coronaria* androgenesis çalışmaları için en uygun mikrospor ve tomurcuk safhasının ne olduğu ve nasıl tespit edildiğine ilişkin, literatürde ayrıntılı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, yapılması planlanan ve nitekim 2005 yılında tamamlanan *A. coronaria* var. *coccinea* anter kültürü çalışmamız (Arı 2006) için öncelikle tek çekirdekli mikrosporları barındıran tomurcuk morfolojisinin ayrıntılı şekilde belirlenmesi gerekmiştir.

Bu nedenle bu çalışmada, doğal *A. coronaria* var. *coccinea* tomurcukları içerisindeki mikrosporların *in vivo* gelişim aşamalarının belirlenmesi ve bunlar arasından tek çekirdekli safhadaki mikrosporlara sahip uygun çiçek tomurcuğunun morfolojik yönden tanımlanması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

Çalışma, 2002-2003 yıllarında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Sitoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

### 2.1. Materyal

Bitkisel materyal olarak; Türkiye florasında yaygın şekilde yetişen ve "Manisa Lalesi" olarak da bilinen *Anemone coronaria* L. türünün, Adana'da doğal yayılış gösteren bir *A. coronaria* var. *coccinea* (kırmızı çiçekli varyete) popülasyonundan toplanan tomurcukları kullanılmıştır.

Popülasyondaki çiçek tomurcukları, daha önce yapılan ön çalışmalar ışığında, Şubat-Mart aylarındaki iki aylık vejetasyon

süresinin 2. haftasında sabah saat 6-7 arasında toplanmıştır. Tomurcuklar, uzun boylu, kalın saplı ve gösterişli çiçeklere sahip genotiplerden toplanarak cam kavanozlar içerisinde biriktirilmiş ve vakit kaybetmeden laboratuvara getirilmiştir.

### 2.2. Metot

#### 2.2.1. Çiçek tomurcuklarının gruplandırılması

İçerindeki mikrosporların *in vivo* gelişim aşamalarını belirlemek ve buna göre uygun bir tomurcuk tanımlaması yapabilmek amacıyla farklı morfolojilere sahip doğal *A. coronaria* var. *coccinea* tomurcukları, büyüklük ve gelişim durumları göz önüne alınarak 10 gruba ayrılmıştır. Bu gruplarda; tomurcuk eni, alt involukrum yaprak ucundan boğuma kadar olan tomurcuk uzunluğu, boğum eni, üst involukrum yaprak kaldırılınca tomurcuğun dip kısmı ile boğum arasındaki uzaklık, involukrum yaprak durumu, tepal görünüm durumu ile antosiyanin başlangıcı gözlemlerinden oluşan morfolojik özellikler saptanmıştır. Farklı büyüklükteki 10 tomurcuktan, tomurcuk büyüklüklerini daha yakından gösterebilmek amacıyla ilk 6 tomurcuğun görüntüsü Şekil 1'de sunulmuştur.

#### 2.2.2. Uygun çiçek tomurcuğu morfolojisinin tespiti

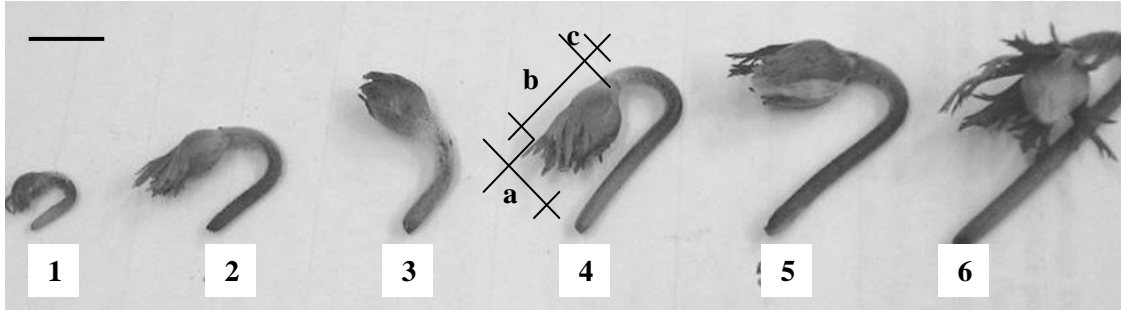
*A. coronaria* androgenesis çalışmaları için en uygun mikrospor safhası ve çiçek tomurcuğu büyüklüğünün ne olduğuna ilişkin ayrıntılı bir çalışma olmadığı için androgenesis çalışmalarında genel kabul gören tek çekirdekli mikrospor safhasını içeren tomurcuk morfolojisi belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak bunu belirleyebilmek için öncelikle *in vivo* mikrospor gelişiminin tüm aşamalarının tespit edilmesi gerekmiştir. Bu amaçla büyüklük ve gelişim durumlarına göre 10 gruba ayrılan *A. coronaria* var. *coccinea* tomurcuklarının her bir grubunda, aynı morfolojiye sahip 3'er tomurcukta mikroskopik inceleme yapılmıştır. Bu 3 tomurcuğun her birisinde ise 5 ayrı anter, farklı boyama yöntemleri ile hazırlanan ezme preparatlar halinde mikroskop altında incelenmiştir. Dolayısıyla, ilk etapta pratik özelliği nedeniyle tercih edilen asetokarmin boyama yönteminde, her bir grupta 15 olmak üzere, 10 tomurcuk grubu için toplam 150 anterde gözlem yapılmıştır. Ancak bu yöntemle hazırlanan ezme preparatlar anterler içerisindeki mikrospor gelişim safhalarını izlemek için yetersiz kalınca, farklı yöntemler çalışmaya dahil edilmiştir. Yani aynı sayıdaki anterler sırasıyla Feulgen, Etidium Bromid, Lakto-Propionik-Orsein ve Hematoksilin boyama yöntemleri ile hazırlanan preparatlarda da ayrıca incelenmiştir.

Tomurcuklar içindeki mikrosporların *in vivo* gelişim safhalarını belirlemede kullanılan farklı sitolojik ve histolojik yöntemlerin ayrıntıları aşağıda açıklanmıştır:

**Asetokarmin ile boyama:** Canlı materyallerde hızlı bir şekilde tek çekirdekli mikrospor safhasını tespit etmek amacıyla kullanılan yöntemler arasında en pratik metod olarak bilinen bu yöntemde, farklı büyüklükteki canlı tomurcuklardan alınan anterler lam üzerine yerleştirilmiş ve bisturi ucu yardımıyla anterlerin içerisindeki mikrosporlar serbest hale getirilmiştir. Üzerine 1-2 damla asetokarmin damlatıldıktan sonra üstü lamelle kapatılan ezme preparatlar ışık mikroskopunda incelenmiştir.

**Asetokarmin hazırlanışı:** 55 ml saf su içerisine 45 ml glasiyel asetik asit ilave edilerek kaynatılmış ve sonra bu karışıma 1 g karmin eklenecek filtre edilmiştir.

**Feulgen ile boyama:** Bu yöntem için Darlington ve La Cour (1963)'un metodundan faydalanılmış ancak yöntemin



**Şekil 1.** Sitolojik inceleme yapılmak üzere morfolojilerine göre gruplandırılan farklı büyüklükteki doğal *A. coronaria* var. *coccinea* tomurcukları. Bar:1 cm, a: tomurcuk eni, b: alt involukrum yaprak ucundan boğuma kadar olan tomurcuk uzunluğu, c: boğum enidir. Tomurcuklara ait ortalama a, b, c boyutları Çizelge 2’de verilmiştir.

boyamada yetersiz kalması nedeniyle asetokarmin yöntemiyle kombine edilmiştir. Bunun için involukrum yaprakları ve tepalleri soyulmuş farklı büyüklükteki canlı *A. coronaria* tomurcukları 1 N HCl içinde 60°C’deki su banyosunda 10-12 dakika süreyle hidrolize edilmiştir. Hidroliz sonrası tomurcuklar oda sıcaklığında yine 1 N HCl ile bir kez durulanıp bu solüsyondan çıkartılmıştır. Tomurcuklar daha sonra Feulgen çözeltisi içerisinde oda sıcaklığındaki karanlık bir ortamda 2 saat bekletilmiş ve boyama işlemine geçilmiştir. Bunun için Feulgen çözeltisinde bekletilen tomurcuklardan pens yardımıyla alınıp lamlara yerleştirilen anterlerin üzerine 1-2 damla asetokarmin damlatılmış ve anterler çizilerek içerisindeki mikrosporların serbest hale gelmesi sağlanmıştır. Lamelleri kapatılan ezme preparatlarda daha sonra ışık mikroskobunda gözlem yapılmıştır.

**Feulgen hazırlanışı:** 200 ml kaynamış saf su içine 1 g Fuchin Basic eklenmiş ve daha sonra karışımın sıcaklığı 50°C’ye düşürülmüştür. Karışım filtre kağıdı ile süzülükten sonra soğutulup üzerine 25 ml 1 N HCl ilave edilmiştir. Çözelti oda sıcaklığına geldiğinde 1,5 g  $K_2S_2O_5$  (potasyum - meta - bisülfid) eklenip karıştırılmış, bunun da üzerine 0,5 g aktif karbon ilave edilmiştir. Daha sonra bu çözelti iyice karıştırılıp filtre kağıdıyla tekrar süzülüş ve sonuçta saydam renkli bir sıvı elde edilmiştir.

**Ethidium Bromide ile boyama:** Bu yöntem için Samancı ve ark. (1998)’nin çalışmalarında kullandıkları metottan yani Ethidium Bromide (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenanthridium bromide) (EtBr) ile boyama yönteminden yararlanılmıştır. Bu amaçla, farklı büyüklükteki canlı tomurcuklardan alınan anterler lamlar üzerine yerleştirilip mikrosporları serbest hale getirildikten sonra üzerlerine 1-2 damla farklı konsantrasyonlardaki EtBr çözeltilerinden damlatılmıştır. Lamelleri kapatılan ezme preparatlarda daha sonra floresan ışık mikroskobunda gözlem yapılmıştır.

**EtBr hazırlanışı:** Öncelikle saf su ile EtBr’in % 0,1’lik stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon 0, 10 ve 50 kez sulandırılmıştır. Ayrıca canlı materyallerle çalışıldığı için geçirgenliğin daha fazla artırılması amacıyla, her 50 ml’lik EtBr çözeltisine 2 damla % 0,1’lik Triton-100 solüsyonundan ilave edilerek karıştırılmıştır.

**Lakto-Propionik-Orsein ile boyama:** Çalışmanın bu aşaması Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sitoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Uzaklık nedeniyle canlı materyalde çalışılmayacağı için farklı büyüklükteki tomurcuklar, ayrı kavanozlar içinde FPA (fenol-propionikasit-alkol) fiksasyon sıvısında oda sıcaklığında beklemeye alınmıştır. Sitolojik çalışma başlangıcında kavanozdaki tomurcuklar önce % 70’lik etil alkol içerisinde

yıkılmış ve daha sonra pens yardımıyla tomurcuklardan alınan anterler lam üzerine yerleştirilmiştir. Anterlerin mikrosporları serbest hale getirildikten sonra üzerine 1-2 damla lakto-propionik-orsein damlatılmıştır. Üstü lamelle kapatılan ezme preparatları daha sonra ışık mikroskobunda incelenmiştir.

**FPA hazırlanışı:** Eşit orandaki formaldehit ve propionik asitten oluşan 100 ml’lik karışıma 2 gr orsein eklenerek filtre edilmiş, daha sonra çözelti % 45’lik olacak şekilde sulandırılmıştır.

**Lakto-Propionik-Orsein hazırlanışı:** Eşit orandaki laktik asit ve propionik asitten oluşan 100 ml’lik karışıma 2 g orsein eklenerek filtre edilmiş, daha sonra çözelti % 45’lik olacak şekilde sulandırılmıştır.

**Kesit alma yöntemi:** FPA fiksasyon sıvısı içinde muhafaza edilen farklı büyüklükteki tomurcuklardan, kesit alma yöntemi kullanılarak mikrotomda ince kesitler alınmıştır. Bunun için Stösser ve ark. (1985) ile Eti (1987)’nin çalışmalarında kullandıkları yöntemler kombine edilmiştir. Yöntemin ilk aşamasında, tomurcuklar Stösser ve ark. (1985)’na göre % 70, % 85, % 95 ve % 100’lük Johansen karışımları içinde üçer saat bekletilmiştir. Yöntemin bundan sonraki aşamaları, boyama aşamasında Hematoksilin boya çözeltisinin kullanıldığı Eti (1987)’nin çalışmasına göre gerçekleştirilmiştir.

**Johansen Karışımları:** Bu karışımlar Çizelge 1’e göre hazırlanmıştır.

**Hematoksilin hazırlanışı:** 1 g Hematoksilin % 96’lık 6 ml etil alkol içerisinde eritilmiştir. Başka bir kaptaki 12,5 g potasyum alüminyum sülfat 100 ml suda eritilmiş ve bu karışıma 0,18 g  $KMnO_4$ , 25 ml gliserin ile 25 ml metanol eklendikten sonra, diğer kaptaki hematoksilin de ilave edilerek stok boya çözeltisi hazırlanmıştır. Boyama için 1 birim stok çözelti, 10 birim saf suyla seyreltilerek kullanılmıştır.

**Çizelge 1.** Johansen karışımları (Stösser ve ark. 1985).

Alkol Karışım Konsantrasyonu (%)	Saf Su (ml)	% 96’lık Etil Alkol (ml)	Tersiyer Butil Alkol (ml)
70	300	500	200
85	150	500	350
95	-	450	550
100	-	200	800

### 3. Bulgular

#### 3.1. Çiçek tomurcuklarının gruplandırılması

İçerisindeki mikrosporların *in vivo* gelişim aşamalarını belirlemek ve androgenesis çalışmalarında kullanılacak uygun bir tomurcuk tanımlaması yapabilmek amacıyla 10 gruba ayrılan farklı büyüklükteki tomurcuklarda ölçülen morfolojik

özellikler Çizelge 2 de verilmiştir.

### 3.2. Uygun tomurcuk safhasının tespiti

*A. coronaria* var. *coccinea*'da tek çekirdekli mikrosporlara sahip uygun tomurcuk morfolojisinin tespiti için öncelikle farklı büyüklükteki tomurcuklar içerisinde bulunan mikrosporların *in vivo* gelişim aşamaları, farklı sitolojik ve histolojik boyama yöntemleri ile belirlenmiştir (Şekil 2).

Belirlenen *in vivo* mikrospor gelişim aşamalarına geçmeden önce, doğal *A. coronaria* var. *coccinea* tomurcukları ile ilgili vurgulanması gereken önemli bir nokta; bir tomurcuk içindeki anterlerin büyüklük ve gelişim yönünden homojen olmadıklarıdır. Horovitz ve ark. (1975, 1991), *A. coronaria*'da her bir çiçekte ortalama 2.000.000 polen taşıyan çok sayıda stamen bulunduğunu, bunların 7 veya daha fazla sıra halinde dizildiğini ve bunlardan ortadaki 2 veya 3 sıranın diğerlerinden daha önce geliştiğini kaydetmiştir. Bir tomurcuk içerisindeki bu asenkronik anter gelişimleri, bu çalışmada yapılan histolojik analiz ile de ortaya konulmuştur. Şekil 3, sitolojik incelemeye alınan 2 no'lu tomurcuk içerisindeki anterlerde görülen 3 farklı mikrospor gelişim aşamasını göstermektedir. Bununla birlikte, bir anter içerisindeki mikrosporların homojen gelişim gösterdiklerinin belirlenmesi de dikkat çeken bir diğer bulgu olmuştur.

Çalışmada kullanılan doğal *A. coronaria* var. *coccinea* tomurcuklarındaki anterlerin asenkronize gelişim yapısı göstermesi nedeniyle kesin bir tomurcuk büyüklüğü önerisinde bulunmanın zor olduğu düşünülmekle birlikte, vurgulanmak istenen konunun daha iyi anlaşılabilmesi için morfolojilerine göre 10 gruba ayrılan tomurcuklarda tespit edilen *in vivo* mikrospor gelişim aşamalarına aşağıda yer verilmiştir:

1 no'lu tomurcukta; anterler içerisindeki mikrosporlarda, mikrospor ana hücrelerine (Şekil 2a), erken - geç arası tetrat safhasında (Şekil 2b, 2c), tek çekirdekli safhada (Şekil 2d, 2e) ve çift çekirdekli safhadaki (Şekil 2g) mikrosporlara rastlanmakla birlikte, en fazla erken tetrat safhası gözlemlenmiştir.

2 no'lu tomurcukta; mikrospor ana hücreleri, erken-geç arası tetrat, erken-geç arası tek çekirdekli (Şekil 2f), çift çekirdekli mikrosporlar ile olgun polen taneleri (Şekil 2h) de tespit edilmiş, ancak tetrat ve erken tek çekirdekli safhadaki mikrosporlara daha yaygın rastlanmıştır.

3 no'lu tomurcukta; erken-geç arası tetrat, tek çekirdekli, geç tek çekirdekli, çift çekirdekli safhalardaki mikrosporlardan

başka olgun polen taneleri (Şekil 2h) de gözlenmiş, bununla birlikte en fazla tek çekirdekli mikrospor safhasına rastlanmıştır.

4 no'lu tomurcukta; tetrat-geç tetrat, tek çekirdekli, geç tek çekirdekli, çift çekirdekli safhalardaki mikrosporlar ile olgun polen taneleri tespit edilmiş, ancak çoğunlukla geç tek çekirdekli ve erken çift çekirdekli mikrosporlar gözlemlenmiştir.

5 no'lu tomurcukta; tek çekirdekli den başlayıp olgun polen tanelerine kadar olan safhalar izlenmekle beraber çoğunlukla olgun polen tanelerine rastlanmıştır. Bu nedenle 5. ve bundan sonraki (6., 7., 8., 9. ve 10.) tomurcuklar, anter kültüründe kullanılmayacak geç aşamadaki tomurcuklar olarak değerlendirilmiştir.

Tomurcuklardan tesadüfi alınan anterlerin farklı boyama yöntemleri ile hazırlanan preparatlarında yapılan bu gözlemler Çizelge 3'te özetlenmiştir.

Çizelgeye göre, sitolojik gözlem amacıyla morfolojilerine göre gruplandırılan tomurcuklar arasından; anter kültürü için en uygun safha olduğu düşünülen geç tetrat safhasındaki veya tetrat safhasından yeni çıkmış tek çekirdekli safhadaki mikrosporları, 2 ve 3 no'lu tomurcuklar içermektedir. Bu tomurcukların morfolojik göstergesi ise bir geofit olması dolayısıyla eğik duran genç tomurcukların genellikle toprak yüzeyinde yeni gözükmeye başlamış olması ve çiçek sapı ile neredeyse paralele yakın şekilde oldukça dar bir açı oluşturması, ortalama olarak 6 x 9 mm büyüklükte olmaları ve involukrum yaprakların henüz açılmaması nedeniyle tepallerin dışarıdan görünmemesi olarak tanımlanmıştır.

Mikrosporların gelişim aşamalarının belirlenmesi için kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesine gelince; ilk etapta, tek çekirdekli mikrospor safhasını tespit etmek amacıyla en pratik yöntem olarak bilinen asetokarmin yöntemi kullanılmış, ancak bu yöntemle hazırlanan ezme preparatlar mikrospor gelişim safhalarını izlemek için yetersiz kalmıştır. Diğer aşamalara göre daha kolay seçilebileceği düşünülen tetrat veya tek çekirdekli mikrospor safhaları bile bu yöntemle hazırlanan bazı preparatlarda ancak ek işlemlerden (preparatın ısıtılması, damlatılan boya içerisinde demir çivi değiştirilmesi gibi) sonra kısmen izlenebilmiş, fakat daha ileri aşamaları görüntülemek için yeterli netlik elde edilememiştir.

Asetokarmin yönteminin yetersiz kalması üzerine başvurulan feulgen yöntemiyle, geç tek çekirdekli mikrospor safhası ve olgun polen aşamalarının tespit edilebilmesine rağmen hidroliz aşamasından kaynaklandığı düşünülen bazı

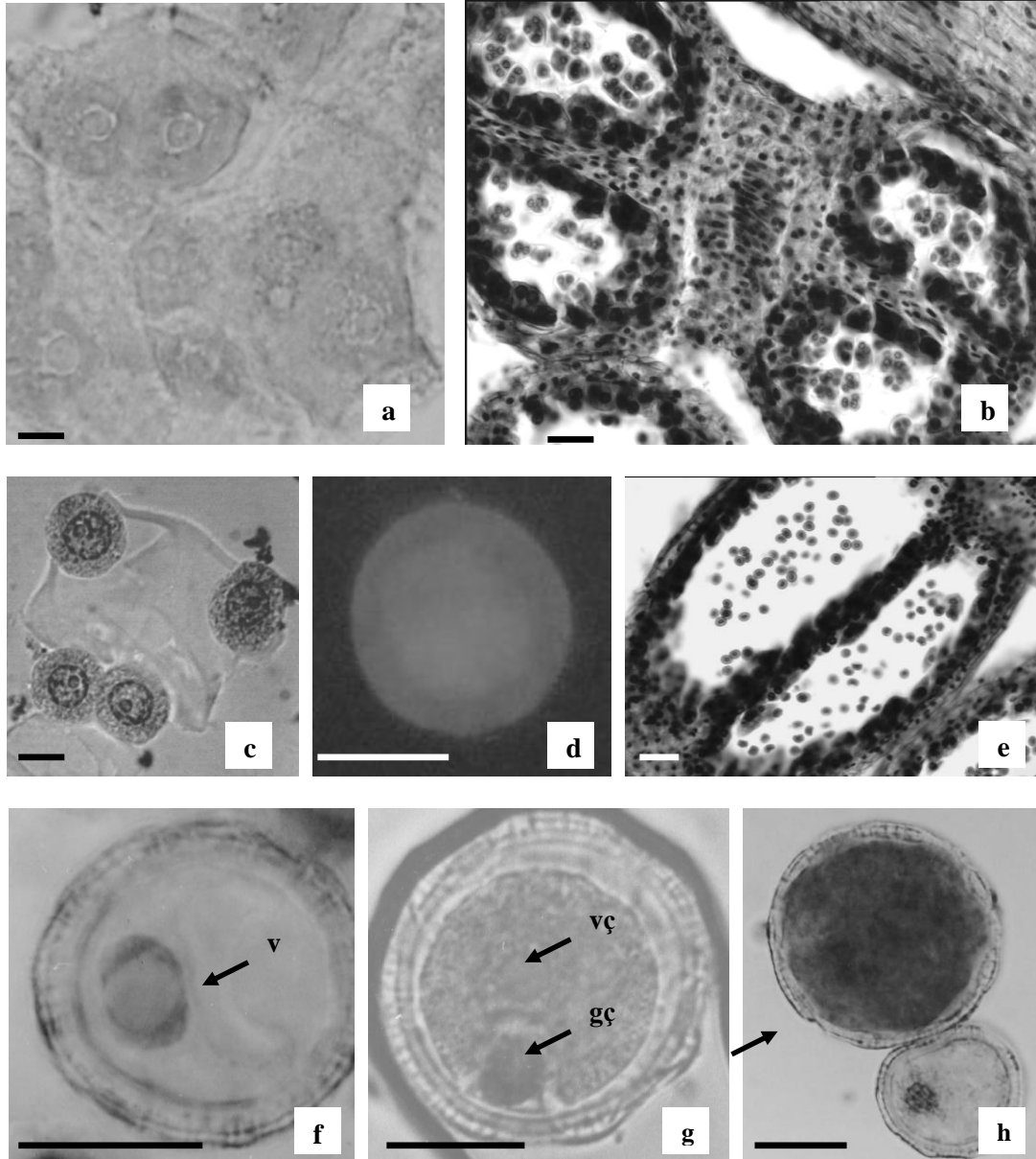
**Çizelge 2.** Farklı büyüklükteki *A. coronaria* var. *coccinea* tomurcuklarının morfolojik özellikleri.

Tom. No	a* (mm) içten***/dıştan	b* (mm)	c* (mm)	d* (mm)	İnvolukrum Yaprak Durumu (A=Açık) (K=Kapalı)	Tepal Görünüm Durumu (+:Görünüyor) (:Görünmüyor)	Antosiyanın Başlangıcı** (+: Var) (-: Yok)
1	4,30 / 4,80	7,40	4,6	1,07	K	-	-
2	4,70 / 5,64	7,73	5,47	1,20	K	-	-
3	5,10 / 5,84	10,70	6,91	1,88	K	-	-
4	5,30 / 6,20	12,75	7,04	1,61	K	-	+
5	5,80 / 6,25	14,80	8,13	1,45	A	+	+
6	6,30 / 6,30	15,38	7,77	2,10	A	+	+
7	7,22 / 7,96	17,00	10,18	2,10	A	+	+
8	7,85 / 8,94	16,25	9,10	1,95	A	+	+
9	8,80 / 9,41	19,87	9,82	3,20	A	+	+
10	9,82 / 10,67	23,75	11,42	3,45	A	+	+

\*: a: tomurcuk eni, b: alt involukrum yaprak ucundan boğuma kadar olan tomurcuk uzunluğu, c: boğum eni, d: üst involukrum yaprak kaldırılınca tomurcuğun dip kısmı ile boğum arasındaki uzaklık

\*\*, \*\*\*: İnvolutrum yapraklar kaldırıldıktan sonra ölçülen bir değer ve gözlem





**Şekil 2.** *Anemone coronaria* var. *coccinea* tomurcuklarında belirlenen farklı *in vivo* mikrospor gelişim aşamaları. Resim a-c-g lakto-propionik-orsein, b-e hematomksilin, d ethidium bromid, f-h ise feulgen yöntemi ile boyanmıştır.

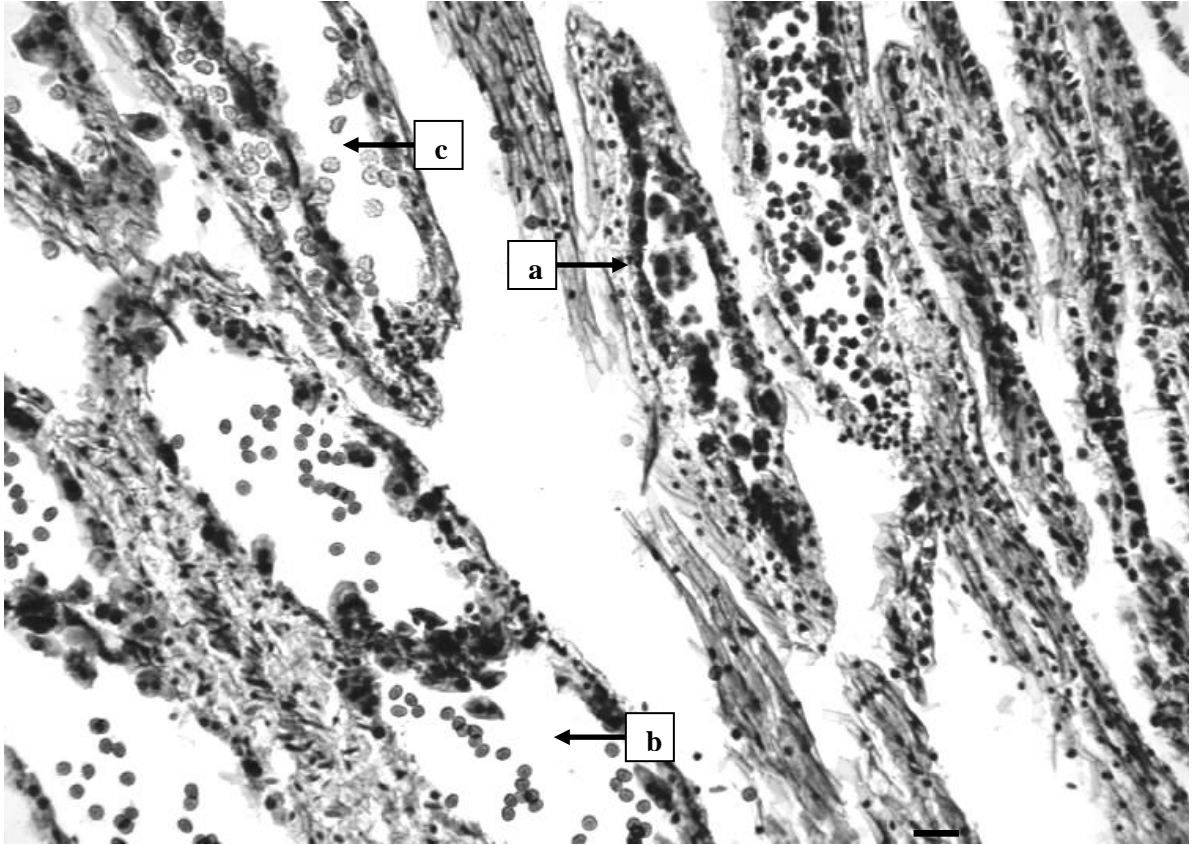
- a. Mikrospor ana hücreleri (Bar: 50 µm)  
 b. Tetrat safhasındaki mikrosporları içeren anter (Bar: 100 µm)  
 c. Geç tetratta kalloz duvarından yeni dağılan profazdaki mikrosporlar (Bar: 30 µm)  
 d. Anter kültürü için uygun aşamadaki tek çekirdekli mikrospor (Bar: 20 µm)  
 e. Tek çekirdekli mikrospora sahip uygun aşamadaki anter (Bar: 100 µm)  
 f. Geç aşamadaki tek çekirdekli mikrospor (v: vakuol) (Bar: 20 µm)  
 g. Mitoz geçirmiş 2 çekirdekli mikrospor (vç:vejetatif çekirdek, gç:generatif çekirdek) (Bar: 20 µm)  
 h. Olgun polen tanesi (Bar: 20 µm)

olumsuzluklar nedeniyle farklı gelişim aşamalarının takibi mümkün olmamış, dolayısıyla bu yöntem de yetersiz bulunmuştur. Feulgen yönteminde hidroliz sırasındaki ilave veya eksik 1 dakikalık süre bile yöntemin etkinliği açısından türden türe büyük önem taşıdığı için bu aşamanın süresinin çok iyi tespit edilmesi gerekmektedir. Feulgen yönteminde metod iyi bir şekilde oturtulmuş olsa bile, pratik olmadığı için en azından bu tür için kısa sürede, tekrarlanabilir sonuçların alınabileceği farklı yöntemlerin denenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Mikrospor gelişim aşamalarını pratik şekilde tespit edebilecek

bir yöntem arayışıyla kullanılan ethidium bromide yöntemindeki farklı konsantrasyon denemelerinden en iyi sonuç, Triton-100 katkılı seyreltilmemiş % 0,1'lik stok solüsyondan elde edilmiştir. Bu denemede, *in vivo* mikrospor gelişiminin tetrat ve tek çekirdekli mikrospor aşamaları çok net görüntülenirken, diğer aşamaların aynı netlikte tespit edilememesine rağmen yöntemin geliştirilmesi mümkündür.

Lakto-propionik-orsein boyama yönteminde yapılan incelemelerde, *in vivo* mikrospor gelişiminin tüm aşamaları izlenebilmiştir. Dolayısıyla bu yöntem oldukça pratik bulunmuştur. Nitekim bazı kaynaklarda (Anonymous 1997) da



Şekil 3. 2 no'lu *A. coronaria* var. *coccinea* tomurcuğunda tespit edilen farklı mikrospor gelişim aşamalarına sahip anterler. Bar: 100 µm; a: tetrat aşaması, b: tek çekirdekli mikrospor aşaması, c: olgun polen aşamasını göstermektedir.

Çizelge 3. Farklı büyüklükteki *A. coronaria* var. *coccinea* tomurcuklarında, mikrospor gelişim safhalarının görülme durumları ve her tomurcukta en fazla gözlenen mikrospor gelişim safhası.

Tom. No	Farklı Mikrospor Gelişim Safhalarının Tomurcuklarda Görülme Durumları (+: Var, -: Yok)							En Fazla Gözlenen Mikrospor Gelişim Safhası
	Mikrospor Ana Hücresi	Erken Tetrat Safhası	Tetrat Safhası	Geç Tetrat Safhası	Erken-Geç Arası Tek Çekirdekli Safha	Erken-Geç Arası Çift Çekirdekli Safha	Olgun Polen Tanesi	
1	+	+	+	+	+	+	-	Erken Tetrat Safhası
2	+	+	+	+	+	+	+	Geç Tetrat ve Erken Tek Çekirdekli Safha
3	-	+	+	+	+	+	+	Tek Çekirdekli Safha
4	-	-	+	+	+	+	+	Geç Tek Çekirdekli ve Erken Çift Çekirdekli safha
5	-	-	-	-	+	+	+	Olgun Polen Tanesi
6	-	-	-	-	+	+	+	Olgun Polen Tanesi
7	-	-	-	-	-	+	+	Olgun Polen Tanesi
8	-	-	-	-	-	+	+	Olgun Polen Tanesi
9	-	-	-	-	-	-	+	Olgun Polen Tanesi
10	-	-	-	-	-	-	+	Olgun Polen Tanesi

bu yöntemin çok etkili olduğu ve asetokarmin veya aseto-orsein yöntemlerinin çalışmadığı türlerde denenmesi gerektiği bildirilmiştir.

Kesit alma yönteminde ise *in vivo* mikrospor gelişimlerinin tüm aşamaları tespit edilebilmiştir. Oldukça uzun zaman alan ve hiç de pratik olmayan bu metod, yine de; sitolojik düzeyde tespit edilemeyen bazı görüntüleri histolojik düzeyde daha geniş bir çerçevede ortaya koyabilmesi özelliği ile son derece yararlı bulunmuştur.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Androgenesis çalışmalarını etkileyen en önemli faktörlerin başında mikrosporların gelişim safhası yer almaktadır. Çünkü

uygun safhadaki mikrosporlar kültüre alınmadıkça, diğer kültür şartları mükemmel dahi olsa polen embriyogenesi gerçekleşmeyecektir. Optimum mikrospor safhası türe, genotipe, donör bitkinin yetiştirme koşullarına veya kullanılan androgenesis tekniğine göre değişiklik gösterdiğinden (Ferre ve Keller 1997), her genotip için bu konuda bir ön çalışma yapılması ve çalışmanın pratikliğini sağlama yönünden optimum mikrospor safhasını içeren tomurcuk morfolojisinin tanınımının yapılması gerekmektedir.

*A. coronaria* androgenesis çalışmaları için en uygun mikrospor ve tomurcuk safhasının ne olduğu ve nasıl tespit edildiği ile ilgili bu çalışmanın başladığı 2002 yılına kadar literatürde rastlanan tek bilgi, Sunderland ve Dunwell (1977)'in

"A. coronaria anter kültüründe tek çekirdekli mikrospor safhasına sahip anterleri kullandıkları" ifadesidir. Daha sonra Laura ve ark. (2006), ticari A. coronaria çeşitlerinde yürüttükleri anter kültürü çalışmasında, uygun tomurcuk safhasını belirlemek için asetokarmin yöntemini kullandıklarını ve bu uygulama sonucu, polen tetratları ve en yüksek tek çekirdekli mikrospor oranını, 2-3 cm uzunluğundaki çiçeklerden elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmada bu çiçeklerin, eğik bir sap ucundaki 1 cm den kısa tomurcuklara sahip oldukları ve tepallerin de çiçek yaprağı yani involukrum yapraklar içerisinde bulunduğu belirtilmiştir.

Farklı sitolojik ve histolojik boyama yöntemlerinin kullanıldığı bu çalışma sonucunda da hemen hemen benzer tomurcuk morfolojisi tanımlanmıştır.

Doğal bir A. coronaria var. coccinea popülasyonundan toplanan ve büyüklükleri ile gelişim durumları göz önüne alınarak 10 gruba ayrılan tomurcuklar arasında, anter kültürü çalışmalarında kullanmak için en uygun safhalar oldukları düşünülen geç tetrat ve tek çekirdekli safhadaki mikrosporları, genellikle 2 ve 3 numaralı tomurcukların içerdikleri belirlenmiştir. Bu tomurcuklara ait makroskopik göstergeler ise; genç tomurcukların özellikle toprak yüzeyinde yeni gözükmeye başladığı sıralarda eğik durması ve çiçek sapı ile neredeyse paralele yakın şekilde oldukça dar bir açı oluşturması, ortalama olarak 6 x 9 mm büyüklükte olmaları ve involukrum yaprakların henüz açılmaması nedeniyle tepallerin dışarıdan görünmemesi olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada, A. coronaria var. coccinea için anter kültüründen direkt pollen embriyogenesinin hedeflendiği çalışmalar için 2 ve 3 numaralı tomurcuklar uygun bulunmuştur. Bu noktada, A. coronaria'nın 7 veya daha fazla sıra halinde dizili stamenlere sahip olduğu ve bunlardan ortadaki 2 veya 3 sıranın diğerlerinden daha önce geliştiği (Horovitz ve ark. 1975, 1991) hatırlanacak olursa; yapılacak anter kültürü çalışmalarında, uygun tomurcuk içerisinde tek çekirdekli mikrospora sahip anterler hangi sıralarda belirlenmişse, genellikle o sıralardaki anterler kültüre alınmalıdır. Çalışmamızda yapılan gözlemlerde ise, uygun bulunan 2 ve 3 numaralı tomurcuklarda, geç tetrattan tek çekirdekli safhaya kadar olan mikrospor gelişim aşamalarını içeren anterlerin, genellikle tomurcukların orta kısmında dizili olan 3. 4. ve 5. sıralarda yer aldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte; A. coronaria da mayoz bölünme safhalarında rastlanan çekirdek bölünmesi düzensizlikleri (Karaca ve Seğmen 1970) nedeniyle, özellikle anterlerden kallus yoluyla indirekt embriyogenesis veya mikrospor kültürü çalışmaları içinse daha erken aşamadaki mikrosporların kullanılmasının daha yararlı olabileceği düşüncesiyle, 2 numaralı tomurcuk büyüklüğünün üzerinde durulması tavsiye edilebilir.

Bu konuyla ilgili olarak Summers ve ark. (1992)'nin domateste yaptıkları anter kültürü çalışmasında; profaz-I, zigoten-diyakinez, metafaz-I, telofaz-II, tek çekirdekli ve iki çekirdekli mikrospor safhalarına sahip anterlerden kallus oluşturan anter sayısı ve kallus çapları belirlenmiştir. Leptoten safhasındaki mikrospora sahip anterler % 84 oranında kallus oluştururken, tek çekirdekli safhadaki mikrosporları içeren anterlerde ise sadece % 4 oranında kallus meydana gelmiştir. Yine domateste, Bal (2002)'in bildirdiğine göre Gresshoff ve Doy (1972), erken mayoz bölünme ile tetrat safhalarında mikrosporları taşıyan anterlerin kültüre almada en uygun dönem olduğunu kaydetmiştir. Dolayısıyla yapılacak indirekt embriyogenesis veya mikrospor kültürü çalışmaları için elverişli mikrospor safhasını kaçırmamak amacıyla, tomurcuğun biraz

daha erken aşamalarının kullanılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte Zamir ve ark. (1980), mikrospor gelişim aşamaları ile tomurcuk boyu arasındaki ilişkinin her zaman geçerli kabul edilemeyeceğini kaydetmiştir. Fan ve ark. (1988) da aynı görüşü paylaşmış ve tomurcuk boyu ile mikrospor gelişimi arasındaki bağlantının, çevre koşulları ve genotip tarafından kolayca değiştirilebileceğini bildirmiştir. Hava sıcaklığı ve ışıklandırma durumu başta olmak üzere çeşitli çevre faktörlerinin etkisiyle, özellikle doğal türlerde tomurcuk toplama zamanının, vejetasyonun farklı dönemlerine göre değişebileceği bilinmektedir. Farklı vejetasyon dönemlerinde bir popülasyondan toplanan tomurcuklardaki mikrosporların gelişim safhaları değişkenlik gösterdiği gibi, aynı dönemde farklı popülasyonlardan toplanan tomurcuklarda da mikrosporların gelişim safhaları değişmektedir. Nitekim deneme amacıyla yaptığımız bir çalışmada; Antalya'da yetiştirilen Jerusalem F<sub>1</sub> hibrit çeşidi, İzmir Menemen'den selekte edilmiş doğal A. coronaria var. cyanea popülasyonu ile bu çalışmanın materyalinin toplandığı doğal Adana popülasyonundan aynı hafta içerisinde toplanan tomurcuklarda yapılan sitolojik gözlemler sonucu, anter kültürü çalışmaları için uygun olabilecek 3 farklı tomurcuk morfolojisi belirlenmiştir. Bu nedenle özellikle doğal bitkilerde, çiçek tomurcuklarının toplandığı dönemdeki çevre koşullarının mikrospor gelişim aşamalarını ve buna bağlı olarak haploid embriyo oluşumunu etkileyeceği kabul edilirse, materyalin toplandığı döneme göre uygun tomurcuk morfolojisi sık sık gözden geçirilmeli ve anterler buna göre kültüre alınmalıdır.

Anter kültürü çalışmalarını olumsuz yönde etkileyen önemli faktörlerden birisi de; bir petri içerisinde, farklı gelişim aşamalarındaki anterlerin kültüre alınmasıdır. Çünkü bu durumda, ileri gelişim aşamadaki anterlerin ortama yaydıkları fenolik bileşikler, genç anterlere toksik etkide bulunabilmektedir.

Çalışmamızda yapılan sitolojik incelemeler sonucu bulunan diğer önemli bir bulgu; Anemone coronaria var. coccinea da bir tomurcuk içerisindeki anterlerin asenkronik gelişim modu gösterirken, bir anter içerisindeki mikrosporların ise homojen olarak geliştiklerinin tespit edilmesidir. Bu durumda yapılacak anter kültürü çalışmalarında, her ne kadar, uygun safhada olduğu düşünülen benzer anterler kültüre alınsa da, bu benzer anterler içerisindeki mikrosporların aynı gelişim aşamasında olmayacağı zaten bu çalışmadaki sitolojik incelemelerle de ortaya konulmuştur. Dolayısıyla, çalışmada materyal olarak kullanılacak tüm anterlerin uygun aşamada kültüre alınabileceğini söylemek doğru olmaz. Bu tespit üzerine, türün özelliğinden kaynaklanan bu olumsuzluğun anter kültürü başarısını doğrudan etkileyeceği kabul edildiğinde, haploid bitki elde etmek amacıyla diğer androgenesis yöntemi olan mikrospor kültürüne yönelmek belki bir şans olabilir. Nitekim, literatüre yansımamış olsa da Anonymous (2003)'ün bildirdiğine göre, Hollanda'daki Wageningen Üniversitesi'nde A. coronaria'da mikrospor embriyogenesi elde edilmiştir. Bu çalışmanın ayrıntıları bilinmese de, mikrospor kültürü tekniğinde kullanılabilen yoğunluk gradyanı santrifüjleme yöntemi birçok araştırmacı (Nitsch ve Norrel 1973; Rashid ve Reinert 1980; Fan ve ark. 1988; Guo ve Pulli 2000; Supena ve ark. 2006) tarafından uygulanmıştır. Bu tekniğin aynı gelişim safhasındaki homojen mikrosporları kültüre almaya olanak sağlaması; mikrospor kültürünü, doğal bir A. coronaria var. coccinea tomurcuğundaki yaklaşık 150-180 anter (Arı ve ark. 2003, 2005) için söz konusu olan asenkronize anter



gelişiminden kaynaklanan olumsuzluğu bertaraf etmede avantajlı bir duruma getirmektedir.

Çalışmada kullanılan farklı sitolojik ve histolojik boyama yöntemlerinin değerlendirilmesine gelince; *A. coronaria*'da bundan sonra yapılacak androgenesis çalışmaları sırasında, *in vivo* mikrospor safhalarının hızlı ve pratik şekilde tespit edilmesinde lakto-propionik-orsein boyama yöntemi tavsiye edilebilir. Ancak son zamanlardaki sitoloji çalışmalarında hem canlı hem de fikse edilmiş materyallerdeki kullanım kolaylığı ve hızlı sonuçlar vermesi nedeniyle özellikle DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol2e-H Cl) boyama yöntemi (Coleman ve Goff 1985; Vergne ve ark. 1987) başta olmak üzere DNA flor-krom boyama yöntemleri tercih edilmektedir. Dolayısıyla bundan sonraki çalışmalar için daha pratik, hızlı ve güvenilir sonuçlar veren bu yöntemlere başvurulması önerilebilir.

### Teşekkür

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından, FBE 2002-D200 proje numarasıyla desteklenmiş olan Doktora Tezi'nin bir bölümüdür. Sitolojik çalışmalarda yardımcıları için Sayın Prof. Dr. Sinan ETİ, Prof. Dr. Fatma ÜNAL, Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU ve Zir. Y. Müh. Muzaffer İPEK'e teşekkürlerimizi sunarız.

### Kaynaklar

- Anonymous (2003) Output 4: Developing new approaches for cassava breeding integrating biotechnology tools and quantitative genetics principles. [http://www.cgiar.org/publications/annual/pub\\_ar2003.html](http://www.cgiar.org/publications/annual/pub_ar2003.html). Accessed 15 December 2003.
- Anonymous (1997) Lacto – Propionic - Orcein Staining. Wheat Genetic Resource Center. <http://www.k-state.edu/wgrc/Protocols/Cytogenetics/acetoorcein.html>. Accessed 26 August 2000.
- Ari E, Buyukalaca S, Gok P, Eti S (2005) Some cytologic observations on pollen grains of wild poppy anemone varieties of Turkey. *Acta Horticulturae* 673: 699-703.
- Arı E, Büyükalaca S, Gök P, Eti S (2003) İki Manisa lalesi varyetesinde çiçek tozu canlılık ve çimlenme oranları ile üretim miktarlarının belirlenmesi. Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Antalya, s. 509-511.
- Arı E (2006) Türkiye'de doğal olarak yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*'da anter kültürü çalışmaları. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bal U (2002) Domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill.) izole edilmiş mikrospor kültürü, ovaryum kültürü ve *Solanum sisymtrifolium* Lam. ile tozlama yöntemleri ile haploid embriyo oluşumunun uyartılması. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Coleman AW, Goff LJ (1985) Applications of fluorochromes to pollen biology. 1. Mithramycin and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as vital stains and for quantitation of nuclear DNA. *Stain Technology* 60: 145-154.
- Darlington CD, La Cour LF (1963) Methoden der Chromosomen Untersuchungen. Frankische Verlagshandlung. W. Keller and Ca. Stuttgart.
- Emiroğlu Ü (1982) Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yardımcı Ders Kitabı, Yayın No: 450, Bornova, İzmir.
- Eti S (1987) Über das pollenschlauchwachstum und die entwicklung der samenanlagen in beziehung zum fruchtansatz und zur fruchtqualitaet bei der mandarinensorte "Clemantine" (*Citrus reticulata* Blanco) Dissertation Univ. Hohenheim. 127 s.
- Fan Z, Armstrong KC, Keller WA (1988) Development of microspores in vivo and in vitro in *Brassica napus*. *Protoplasma*, 147: 191-199.

- Ferrie AMR, Keller WA (1997) Production of haploids in *Brassica* spp. via microspor culture. *Plant Tissue Culture Manuel* E6: 1-17. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Gresshoff, P.M. and C.H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107:161-170.
- Guo YD, Pulli S (2000) Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Reports* 19: 875-880.
- Horovitz A (1991) The pollination syndrome of *Anemone coronaria* L.: An insect-biased mutualism. *Acta Horticulturae* 288: 283-287.
- Horovitz A, Galil J, Zohary D (1975) Biological Flora of Israel 6: *Anemone coronaria* L. *Israel Journal of Botany* 24: 26-41.
- Horovitz A (1977) Variable traits in wild *Anemone coronaria* L. in Israel and their potential values to floriculture. *Israel Journal of Botany* 26: 43.
- Karaca T, Seğmen Y (1970) İzmir yöresinde Manisa Lalesi (*Anemone coronaria* L.) ile ilgili araştırmalar. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 7: 3-23.
- Laura M, Safaverdi G, Allavena A (2006) Androgenetic plants of *Anemone coronaria* derived through anther culture. *Plant Breeding* 125: 629 – 634.
- Meynet J (1993) *Anemone*. In: Hertogh A, Le Nard M (Eds), *The Physiology of Flower Bulbs*. Elsevier Science Publications, Amsterdam, pp. 211-218.
- Nitsch C, Norrel B (1973) Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans l'anthere ou isole de l'anthere. – *Compt. Rend.Acad.Sci. Paris. Ser. D* 276: 303-306.
- Rashid A, Reinert J (1980) Selection of embryogenic pollen from cold-treated buds of *Nicotiana tabacum* var. Badischer Burley and their development into embryos in cultures. *Protoplasma* 105: 161-167.
- Samancı N, Kurum R, Boyacı F, Biner B (1998) Anter kültürü çalışmaları için elverişli tomurcuk safhasının saptanmasında kullanılabilecek boyama yöntemi. 2. Sebze Tarımı Sempozyumu, Tokat, s. 157-162.
- Shtereva LA, Zagorska NA, Dimitrov BD, Kruleva MM, Oanh HK (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) II: Factors affecting induction of androgenesis. *Plant Cell Reports* 18: 312-317.
- Stösser R, Kaşka N, Anvari SF, Eti S (1985) Bahçe Bitkilerinde Dölleme Biyolojisi Uygulamalı Kurs Notları, 18-22 Mart 1985, (Basılmamış), Adana.
- Summers WL, Jaramillo J, Bailey T (1992) Microspore developmental stage and anther length influence the induction of tomato anther callus. *Hortscience* 27: 838-840.
- Sunderland N, Dunwell JM (1977) Anther and Pollen Culture. In: Street HE (Ed), *Botanical Monographs, Volume 11: Plant Tissue and Cell Culture* (2nd Edition), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 223-266.
- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E, Custers JBM (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.) *Plant Cell Reports* 25:1-10.
- Vergne P, Delvallee I, Dumas C (1987) Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using dapi and membrane permeabilization. *Biotechnic and Histochemistry* 62: 299-304.
- Zamir D, Jones RA, Kedar N (1980) Anther culture of male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants. *Plant Science Letters* 17: 353-361.