

ANTER KÜLTÜRÜ YOLUYLA HAPLOİD BİTKİ ELDESİ

Nurgül ERCAN¹

Filiz (YILDIRIM) BOYACI¹

Beyza BİNER¹

Özet: Anter kültürü 20 yıldan beri kullanılan etkili bir tekniktir. Anter kültürünün en büyük avantajı homozigot hatların kısa sürede elde edilebilmesidir. F₁ hibrit üretimi yapılacak homozigot hatlar vejetatif olarak uniform şekilde çoğaltılarak hibrit tohum eldesi için potansiyel bir araç sağlamaktadır. Kültürde başarının türlere bağlı olması ve yalnızca kültüre cevap verebilecek gen kaynaklarının kullanılabilir olması tekniği sınırlandıran bir faktördür. Androjenetik double haploidler patlıcan (*Solanum melongena* L.), biber (*Capsicum annuum* L.), arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve turp (*Brassica napus* L.) türlerinin geliştirilmesi için dünyada yoğun olarak kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Anter kültürü, in vitro culture, androgenesis, mikrospor kültürü, polen-embriyo

Obtainment Of Haploid Plant Via Anther Culture

Abstract: Within 20 years of its discovery, anther culture became a powerful technique which, has begun to have an impact on cultivar release. The short time required to develop completely homozygous lines is the mayor advantage of anther culture. Anther culture provides the potential tool to develop homozygous inbreds for F₁ hybrid production without sacrificing uniformity, thereby converting propagation from vegetative to hybrid seed. A limitation of the technique is that it can be used only on competent germplasm, which depends on the species. In variuos programs around the world, androgenetic duobled haploids are being used extensively for cultivar development in eggplant (*Solanum melongena* L.), pepper (*Capsicum annuum* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), and rape (*Brassica napus* L.).

Key Words: Anther culture, in vitro culture, androgenesis, mikrospor culture, pollen-embriyo

GİRİŞ

Yeni üstün nitelikli çeşitlerin elde edilmesi için teknolojik yeniliklerin yer aldığı ıslah çalışmalarında kullanılacak yöntemlerin başında bitki doku kültürü gelmektedir. Bitki doku kültürü teknikleri içerisinde, haploid bitkiler elde edilmesini sağlayarak ıslah çalışmalarına hizmet eden anter kültürü ayrı bir öneme sahiptir.

Günümüzde haploid bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan teknik anter kültürü tekniğidir. Bu tekniğin diğer in vitro haploid bitki elde etme tekniklerine göre avantajı; bir anter içerisinde binlerce mikrosporum bulunması ve uygun bir in vitro sistem ortaya konabildiğinde bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir.

Erkek gametten haploid bitki elde etmeye yönelik ilk çalışmaların 1953 yılında Tulecke tarafından başlatılmasından sonra, Guha ve Maheswari'nin de olgunlaşmamış polen tanelerinden haploid yapıda embriyolar elde ettiklerini bildirmeleri, konu ile ilgili araştırmaların hızla yoğunlaşmasını sağlamış ve günümüzde pekçok türde bu yöntemle elde edilen bitkiler hızla kullanılmaya başlanmıştır (2).

Anter kültürünün temel prensibi polen danesini direkt olarak bitki oluşturmaya zorlamaktır. İn vitro kültür öncesindeki birçok fizyolojik etmen, ön uygulamalar, inkübasyon koşulları, besi ortamının yapısı ve bileşimi gibi çok sayıda faktör anter kültüründeki başarıyı etkilemektedir (5,9). Bunların yanı sıra en önemli etmenlerden birisi de, tomurcukların alındığı zaman, içerisinde buldukları gelişme dönemidir. Birçok bitki türünde mikrospor çekirdeğinin mitoz bölünmeye başlamasından hemen önceki dönem, mitoz bölünme aşaması veya bu aşamayı izleyen bölünme sonrası dönemde en iyi cevap veren dönemler olarak belirlenmiştir. Bu dönemlerin yanı sıra Greshoff ve Doy, *Lycopersicon esculentum* ve *Vitis vinifera* türlerinde mayoz bölünmenin değişik aşamalarında haploid dokular oluşturmayı gerçekleştirmişler, ancak en iyi

sonuçların tetradları içeren anterlerden alındığını vurgulamışlardır (1).

Tomurcukların morfolojik yapıları çeşitlere göre farklılık göstermektedir. Biberlerde anter kültüründe yapılan çalışmalarda 2.6-5.0 mm çapında ve açık yeşil renkli petalleri olan tomurcukların olgunlaşmamış tek çekirdekli mikrosporları içerdiği ve bu dönemdeki mikrospordan olumlu sonuçlar alındığı bildirilmektedir. Türkiye'de yetiştirilen uzun meyveli biber çeşitlerinde ise polen mitozundan hemen önce veya mitoz bölünmenin profaz safhasındaki mikrosporları içeren anterler 3.6-4.0 mm çapındaki tomurcuklarda yer almaktadır. Taç yaprak seviyesinin çanak yaprak seviyesini geçtiği bu aşamanın anter kültürü için en uygun dönem olduğu belirtilmiştir (1).

Patlıcanlarda anter kültüründe yapılan çalışmalarda en iyi sonuçlar tek çekirdekli mikrospor döneminde yani I. polen mitozu safhasında alınmıştır. Bu dönemdeki tomurcuklarda petaller henüz tam olarak görünmemekte fakat kaliksin parçalara ayrıldığı noktaya ulaşmaktadır (1).

Bugün 26 familyadan 60 cinse ait 171 bitki türünde haploid bitkilerin elde edilmesi başarılmıştır. Çin'de yapılan araştırmalarda anter kültürü tekniği kullanılarak 81 çeltik çeşit ve hattı, 20 buğday çeşit ve hattı ve 100 mısır hattı geliştirilmiştir. 1985 yılında Fransa'da Avrupa'nın anter kültürü yoluyla geliştirilmiş ilk buğday çeşidi 'Florin' adı ile tescil edilmiştir (16).

Anter kültürü yapmak için; kapalı olan çiçek tomurcukları sterilize edildikten sonra, tomurcuk ince bir pens yardımı ile açılarak stamenler dışarı çıkartılır ve bir petri kabına konulur. Filamentler dikkatli bir şekilde stamenlerden ayrılırlar ve böylece serbest hale getirilen anterler katı ve sıvı kültür ortamına yerleştirilir. Filamentler ayrılmadan anterler kültüre alınırsa bu dokudan diploid yapılar gelişebilmektedir(3). Anter izole edilirken çok dikkatli davranmak ve anteri yaralamamak gerekir. Yaralı anterler kallus oluşturma eğiliminde olduğundan, bunların kültüre alınmaması gerekmektedir. Kültürler 24-27°C sıcaklık ve günde 14 saat yaklaşık

2000 lüks'lük bir aydınlatma rejimine sahip odada inkübasyona alınır.

Bitki türüne bağlı olmakla beraber, polen bitkiciklerinin oluşması için yaklaşık 3-8 hafta gereklidir. Ortalama 5 cm boyuna gelen bitkicikler gıda ortamından alınır, yıkanarak agar artıklarının bitkiden uzaklaştırılması sağlanır ve içinde otoklavlanmış harç bulunan saksılara saşırılır. Kültür ortamından farklı bir ortama alınan bitkilerde ölümü azaltabilmek için, bir hafta kadar bitkilerin üzerlerinin beaker kapları ile örtülmesi faydalı olmaktadır (8).

Anterlerden Haploid Bitki Oluşumu

Haploidler izole edilmiş anterlerden başlıca iki yolla üretilmektedir.

1. Direkt olarak: Polen danesinden yani mikrospordan direkt olarak bir embriyo farklılaşması (embriyogenesis).

2. İndirekt olarak: İlk önceleri polen danesinden bir kallus gelişimi olmakta ve sonra embriyo yada sürgün rejenerasyonu gerçekleşmektedir (organogenesis) (10).

Polenden haploid bitkilerin oluşumu

a- Polen danesinde çekirdek bölünmesi ile büyük bir vejetatif çekirdek ve küçük bir generatif çekirdek oluşur (7). Oluşan generatif çekirdek dejenere olur veya dormant duruma geçer. Vejetatif çekirdek bölünmeye devam eder ve haploid bitkiyi oluşturur. Genellikle polenden haploid bitki oluşumu bu yolla gerçekleşmektedir.

b- Bazen vejetatif çekirdek dejenere olur veya dormant duruma geçer. Generatif çekirdek bölünerek haploid bitkiyi oluşturur. Bu yolla haploid bitki oluşumu çok yaygın değildir. Hyoscyamus bitkisinde bu yolla haploid bitki oluştuğu saptanmıştır.

c- Bazı durumlarda polen danesindeki çekirdek, mitoz bölünme ile eşit büyüklükte iki özdeş çekirdek oluşturur. Bu iki simetrik çekirdeğin ya ikisi de bölünerek haploid bitkiyi oluştururlar veya iki çekirdek birleşerek diploid bir çekirdek oluşturur ve bu

çekirdeğin bölünmesi ile diploid homozigot bitkiler oluştururlar (8).

Anter kültürü ile çok sayıda haploid bitki elde edilmekle birlikte diploid veya farklı ploidi seviyesine sahip kimeralı bitkilerde gelişebilmektedir. Bunun nedeni:

1- Mikrospor ilk mitozda benzer çekirdek oluşturur ve bunların birleşmesiyle homozigot diploid embriyo gelişir.

2- Anterlerdeki diploid dokuların rejenerasyonu nedeni ile diploidler gelişebilmektedir.

3- Haploidlerin doğal olarak kromozomlarının katlanması ile kendiliğinden $2n$ kromozom taşıyan diploid bireyler oluşturabilmektedir (Endomitosis).

4- Mayoz sırasında meydana gelen anormallikler de ploidi düzeyinin farklılaşmasına yol açabilmektedir (14).

Anter Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler

Anter kültürü tekniğinin geliştirildiği ilk yıllarda anter kültürü yoluyla haploid bitkilerin elde edilmesinin yalnızca Solanaceae ve Gramineae gibi belirli bazı bitki familyalarındaki türlerde mümkün olabileceği düşünülmüştür. Fakat bugün bunun böyle olmadığı, diğer familyalardan bitki türlerinde de düşük frekansta da olsa anter kültürü yoluyla haploid bitkilerin elde edilebileceği ortaya çıkmıştır.

Bugün anter kültürü tekniğinin uygulanmasında bazı problemler bulunmaktadır. Bu problemler:

a- Bazı ekonomik önem taşıyan bitkilerde örneğin pamukta henüz anter kültürü tekniği ile haploid bitkilerin elde edilmesi mümkün olmamıştır.

b- Soya fasulyesi, buğday, arpa ve mısır gibi bazı önemli kültür bitkilerinde anterlerden haploid bitki oluşma frekansı çok düşüktür.

c- Anter kültürü ile elde edilen bazı haploid bitkiler genetik ve kromozomal dengesizlik göstermektedir.

d- Buğday, arpa gibi ekonomik öneme sahip bitkilerde anter kültürü ile elde edilen

haploid bitkiler arasında yaşama gücünde olmayan albino (bitkide klorofil oluşmaması) bitkiler ortaya çıkmaktadır.

e- İn vitro büyüme ve gelişmenin ardından embriyo aborsiyonu gözlenebilir.

f- Diplod ve tetraploidler yapılar da haploidler gibi rejenera olurlar.

g- Kallus oluşumu kendiliğinden yada düzenleyici kullanımı ile olmaktadır ki düzenleyici zararlıdır.

h- Haploid bitkilerin diploidlerden ayırımı ile homozigotların üretiminde sitogenetik araştırmalar gereklidir. Bazen ayırımlar genetik markerlarla mümkündür.

Günümüzde yukarıda sayılan problemlerle ilgili olarak yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Bu araştırmalarda anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler optimize edilmeye çalışılmaktadır. Anter kültüründe başarıyı etkilediği saptanan faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir (14).

1. Genotip

Anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisi bitki genotipidir. Farklı bitki türleri ve aynı türün farklı genotiplerinin anter kültürüne farklı reaksiyon gösterdiği birçok araştırmada gözlenmiştir. Örneğin, 215 ekmeklik buğday çeşidi ile sürdürülen araştırmalarda ancak 93 genotipten yeşil haploid bitkiler elde edilebilmiştir. Geriye kalan 122 çeşitte ise yeşil haploid bitki elde edilememiştir.

2. Donör Bitkilerin Fizyolojik Durumu ve Yaşı

Genellikle, donör bitkinin fizyolojik durumu ve yaşının anter kültüründe başarıyı etkilediği gözlenmiştir. Çiçek gelişim sezonunun başlangıcında genç çiçeklerden alınan çiçekler içindeki anterler büyüme periyodunun daha geç dönemlerinde alınan çiçeklerdeki anterlere göre anter kültürü için daha uygundur. Ayrıca tahıllarda ana saptan alınan anterler, kardeş sürgünlerden alınan anterlere göre anter kültüründe daha farklı reaksiyon göstermektedir.

Donör bitkilerin anterlerin alındığı döneme kadar çok iyi beslenmesi ve optimum ışık koşullarında muhafaza edilmeleri gerekir. Suni ışığın güneş ışığının yerini alması mümkün değildir. Bu nedenle eğer donör bitkiler kapalı yerlerde yetiştirilecekse, suni ışıkla desteklenen seralar tercih edilmelidir.

Polen gelişmesi sırasında donör bitkilerin herhangi bir strese maruz kalmamaları için, donör bitkiler çiçek gelişim döneminin başlangıcında yeni saksılara aktarılmalı ve polen gelişim döneminde optimum şekilde beslenmelidir. Donör bitkilerden anterlerin alınmasından 3-4 hafta öncesinden itibaren bitkilere herhangi bir pestisid uygulamasından kaçınılmalıdır.

3. Polen Gelişim Dönemi

Anter kültüründe başarılı sonuç almak için, polenin herhangi bir devresinin mi veya yalnızca bir devresinin mi önemli olduğu konusunda pek çok araştırmalar yapılmıştır.

Genellikle bir devrenin kritik olduğu; bununda türden türe değişmek üzere tetrad, uninukleat, mikrospo, ilk polen mitozu veya olgun polen daneleri olabileceği belirlenmiştir. Yani anter kültüründe, sonucu polenin sitolojik devresi büyük ölçüde etkilemektedir (8). Polenin canlılığını tesbit etmek için Fluorescein diacetate, polen gelişim safhasını tesbit etmek içinde Acetocarmine yöntemleri kullanılmaktadır (5,6,15).

Mayoz bölünmesinden hemen sonra oluşan tetradlar ve olgun polenlerden de bazı durumlarda haploid bitkiler elde edilebilmesine karşılık, genellikle en yüksek haploid bitki frekansı, içindeki polenler tek çekirdekli dönemde bulunan anterlerin kültüründen elde edilmektedir. Anter kültüründe anterler içinde bulunan polenlerin gelişme dönemi, alınan anter örneklerinden hazırlanan preperatların mikroskop altında incelenmesi ile belirlenir (4).

4. Anterlere Soğuk uygulaması

Birçok bitki türlerinde anterler kültüre alınmadan önce belirli bir süre soğuk koşullarda muhafaza edildiklerinden polenlerden kallus oluşum frekansı büyük bir artış göstermektedir. Buğday anterleri kültüre alınmadan önce 1-4°C'de 48 saat tutulduğunda anterlerden kallus oluşma frekansı iki kat artmıştır. Uygulanacak soğukun derecesi ve süresi bitki türlerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin mısır bitkisinde anterlerin 7 gün 4°C'de 7 gün de 8°C'de tutulduktan sonra kültüre alınmaları en iyi sonucu vermesine karşılık, buğday anterlerinin 3-4 gün süre ile 4°C'de tutulması yeterli olmaktadır. Arpada ise anterlerin 3-4 hafta 4°C'de tutulması gerekir (13).

Haploidi eldesinde yapılan ön uygulamalarda özellikle düşük sıcaklığın önemli olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda ana bitkinin genç çiçek tomurcuklarından alınan anterlere, düşük sıcaklık uygulamasının embriyogenesi teşvik ettiği gözlenmiştir. Düşük sıcaklık, generatif ve vejetatif çekirdeğin oluşumundan ziyade mikrosporlarda ilk çekirdek bölünmesinde iki özdeş çekirdeğin oluşumunu etkilemektedir. Bir başka uygulama olarak; embriyo yada kallusun daha kolaylıkla oluşabilmesi için anter duvarının kesilmesi tavsiye edilmektedir.

5. Besi ortamının bileşimi ve yapısı

Besi ortamının bileşimi, sadece anter kültüründe başarıyı değil, aynı zamanda polen gelişiminin şeklini (direkt embriyogenesis veya kallus oluşumu) de belirleyen önemli bir faktördür. Tütün ve Hyoscyamus gibi bitkilerde polen embriyogenesi mineral maddeler ve şeker içeren basit ortamlarda gerçekleştirilebilir. Buğday, arpa, mısır ve çeltik gibi tahıl türlerinde ise düşük konsantrasyonda auxin içeren besi ortamlarında polenlerden direkt embriyogenesis ile haploid bitkiler elde edilebilir. Bu türlerde yüksek konsantrasyonda auxin içeren kompleks besi

ortamları polenlerden kallus oluşumunu teşvik eder.

Hem besi ortamının ozmozunu düzenleyen hemde karbon kaynağı olan şekerler anter kültüründe genellikle 0.058-0.12 M konsantrasyonlarında kullanılır. Buğday, arpa, çeltik, ve patateste yüksek konsantrasyonlardaki şeker anter kültüründeki başarıyı arttırmaktadır.

Tütün ve buğdayda besi ortamına ilave edilen patates eksrakıtı gibi maddeler anter kültüründe oluşan haploid bitki frekansını arttırmaktadır.

Ayrıca bazı bitki türlerinde besi ortamına 5-20 gr/l konsantrasyonlarında ilave edilen aktif karbonun anter kültüründe başarıyı olumlu yönde etkilediği ortaya çıkmıştır.

Önemli besi ortamlarının bileşimleri ilgili literatürlerde bulunmaktadır. Katı ortamın çok yoğun olarak kullanılmasına rağmen son zamanlarda sıvı ortamında kullanımı artmıştır. Modifiye edilmiş MS ve Nitsch (1969) makro tuz ortamları sık kullanılmaktadır. Ortamın pH'sı otoklavlanmadan önce genellikle 5.8'e ayarlanmaktadır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumunu sınırlamasına rağmen bazı durumlarda oksin, sitokin ve veya ikisinin kombinasyonlarına ihtiyaç duyulmuştur. Bitki büyüme düzenleyicileri, özellikle oksin ve sitokinler androgenik gelişmeyi uyarma konusunda en fazla etkiye sahip faktörlerdendir (11). Büyüme maddelerinin dışında aktive edilmiş kömürde kullanılmaktadır. Aktif kömür yalnızca dejenere olan kahverengi anterlerden toksik madde absorbe etmekle kalmayıp aynı zamanda embriyogenesis'i önleyen ABA'yi de absorbe etmektedir (14)

Sıvı ortamda anter kültürü için çok uygun bulunmuştur. Sıvı ortamda anterler ortam üzerinde durmaktadır. Anterlerden serbest kalan polen daneleri petrinin dibine inmekte ve burada embriyo oluşumu meydana gelmektedir. Hatta sıvı ortamın ince bir tabakasında anterler daha iyi gelişmektedirler ki; aktive edilmiş kömür ve agar karışımının üzeri sıvı ortamlarla kaplanıp kullanıldığı zaman

gelişme çok daha iyi olmaktadır. Bu sistem çift tabakalı yöntem olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte besin ortamının bileşiminde anter kültürünün farklı gelişim safhaları için modifiyeye ihtiyaç duyulabileceği hatırlanmalıdır (14).

6. Kültür Koşulları

Anterlerin kültür edildiği ortamlardaki sıcaklık ve ışık gibi fiziksel faktörler polenlerden kallus oluşumu ve direkt embriyogenesi etkilemektedir. Bu fiziksel faktörler; gün uzunluğu, ışıklanma, ışık kalitesi, karanlık/aydınlık halkası, gece gündüz sıcaklığı, CO₂ beslenmesi in vitro kültür sırasında androgenesiste önemli rol oynamaktadır (14).

Genellikle anter kültüründe kültür sıcaklığı bitki türlerine bağlı olarak 25-30°C arasında değişir. Kültür sıcaklığı artırıldığında buğday ve kolza gibi bitkilerde polenlerden kallus oluşumunun arttığı gözlenmiştir. 8 gün süre ile 33°C'de tutulan buğday anter kültürleri daha sonra 25°C'de kültür edildiklerinde polenlerden kallus oluşumunda büyük bir artış göstermiştir.

Mikrospor (Polen) Kültürü

Anterlerden izole edilmiş mikrosporların kültürü yoluyla haploid bitki elde edilmesi özellikle kolza gibi bazı bitki türlerinde başarı ile uygulanmaktadır. Polen kültürünün tekniği güç olmakla birlikte anter kültürüne göre bazı avantajlara sahiptir:

1- Polen kültüründe anter duvarı uzaklaştırıldığı için mikrospor dışındaki hücrelerden (anter duvarı, tapetum hücreleri) diploid rejenerantların elde edilme şansı azalır.

2- Mikrosporlar direkt olarak besi ortamına temas ettikleri için besi ortamından daha iyi yararlanabilirler.

3- Anterlerin içerdiği inhibitör (ABA) ve toksik maddeler elemine olduğu için bunların etkisi çok büyük bir problem değildir.

4- Anterlerden kallus oluşumuyla birlikte kimera görülebilirken polen kültüründe daha seyrek görülmektedir. Tek bir polenden gelişen kallusun genotipi tektir, oysa anter pek çok polen içerdiğinden dolayı oluşan kallusta kimera olma ihtimali polen kültürüne göre çok daha yüksektir.

5- Polenden direkt embriyo oluşum oranı çok daha yüksektir.

6- Embriyo oluşumu anter kültürüne kıyasla polen kültüründe daha sık gözlenmektedir.

Polen kültürünün bütün bu avantajları ve konu üzerindeki çalışmalara rağmen, tek bir polen danesinden haploid bitki elde etmek oldukça güçtür. Çünkü besin ortamı anter kültürü için kullanılana göre çok daha karmaşıktır. Ancak polen kültüründe başarı sağlanan tür ve çeşit sayısı sınırlıdır. Şimdiye kadar yapılan polen kültürlerinde başarı sağlanan türler; Lycopersicon lycopersicum, Nicotiana tabacum ve Petunia hybrida'dır (14).

SONUÇ

Diploid bitkilerden elde edilen haploid bitkiler, genetik ve biyokimyasal çalışmalar için basit bir sistem sağlamaktadır. Klasik yöntemlerle homozigot hatların eldesi için uzun yıllara gerekirken anter kültürü ile elde edilebilecek haploid bitkilerin kimyasallarla katlanmasıyla bu sonuca tek generasyonda ulaşmak mümkündür.

KAYNAKLAR

1. ABAK, K., Biber Islahında Anter Kültüründen Yararlanma. Bitki Islahı Simpozyumu Bildiri Özetleri. 15-17 Ekim 1986 İzmir.
2. ABAK, K., Karakullukçu, Ş., Patlıcanda Anter Kültürü Üzerine Araştırmalar. I.Elverişli Tomurcuk Gelişim Dönemi- nin Belirlenmesi Doğa-Tr. J. of Agricultural and Forestry, 17 (1993), 801- 810, 1993.
3. BAJAJ, Y. P. S., Haploids in Crop Improvement I. Biotechnology in

- Agriculture and Forestry 12. Vol 12, 372-380, 1990.
4. CHAMBONNET, D., Obtention Of Haploid Plants in Vegetable. Advantages in Breeding Programmes. I. Uluslararası Tarımve Biyo- teknoloji Simpozyumu. 1-3 Haziran 1988.
 5. DIXON, R. A., Plant Cell Culture. IRL Press Limited P.O. Box 1, Eynsham, Oxford OX8. 133, England, 21-33, 1985.
 6. DÜZGÜNEŞ, O., Ekingen, M. R., Genetik. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayın 555, Dres Kitabı 187, Sh 329, 1974.
 7. EMİROĞLU, Ü., Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. Yardımcı Ders Kitabı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ofset Basım Evi 1982, Bornova, İzmir. 3-17.
 8. GÖNÜLŞEN, N., Bitki Doku Kültürleri ve Uygulama Alanları. T. C. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No: 78. Sh: 33, 1987.
 9. HERMSEN, G. T., Ramanna, M. S., Haploidy and Plant Breeding. Phill. Trans. R. Soc. Lond. B 292, 499-507 (1981), Printed in Great Britain.
 10. KALLOO, Dr., Vegetable Breeding, Volume III, CRC Press, Inc Boca Raton, Florida, Sh: 136-140, 1986.
 11. KARAKULLUKÇU, Ş., Patlıcanda Anter Kültürü Üzerine Araştırmalar: II. Şeker ve Büyümeyi Düzenleyicilerin Etkisi Doğa-Tr. J. of Agricultural and Forestry 17(1993), 811-820, 1993.
 12. KARAKULLUKÇU, Ş., K. Abak, Farklı Sıcaklık Şoklarının Patlıcanda Anter Kültürü Yoluyla Embriyo Oluşumu Üzerine Etkisi. Türkiye I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Cilt II, 237-240, 1992.
 13. LU, C. S., H. C. Sharma, H. W. Ohm, Wheathar Anther Culture: Effects of Genotype and Enviromental Conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 24:233-236, 1991.
 14. PIERIK, R. L. M.; In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, P. O. Box 163, 3300AD Dordrect, The Netherlands (243-257), 1989.
 15. SUMMERS, W.L., J. Jaramillo, T. Bailey, Microspore Developmental Stage and Anther Lenght Influence the Induction of Tomato Anther Callus. Hortscience, 27(7), 838-840, 1992.
 16. VEILLEUX, R. E., Development of New Cultivars via Anther Culture. Hortscience, Vol 29(11), 1238-1241, 1994.