

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PATLİCAN (*Solanum melongena* L.)’DA MİKROSPOR KÜLTÜRÜNDE
OVARYUM KO-KÜLTÜR YÖNTEMİNİN HAPLOİD EMBRİYO
OLUŞUMUNUN UYARTILMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

Buse ÖZDEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

2012

**PATLİCAN (*Solanum melongena* L.)’DA MİKROSPOR KÜLTÜRÜNDE
OVARYUM KO-KÜLTÜR YÖNTEMİNİN HAPLOİD EMBRİYO
OLUŞUMUNUN UYARTILMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

Buse ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**Bu Tez 2011.02.0121.005 no’lu proje olarak Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir.**

2012

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PATLİCAN (*Solanum melongena* L.)’DA MİKROSPOR KÜLTÜRÜNDE
OVARYUM KO-KÜLTÜR YÖNTEMİNİN HAPLOİD EMBRİYO
OLUŞUMUNUN UYARTILMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

Buse ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 03/08/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (.95.) not takdir edilerek oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Naci ONUS (Danışman)



Doç. Dr. Ersin POLAT



Yrd. Doç. Dr. Kamile ULUKAPI



ÖZET

PATLİCAN (*Solanum melongena* L.)’DA MİKROSPOR KÜLTÜRÜNDE OVARYUM KO-KÜLTÜR YÖNTEMİNİN HAPLOİD EMBRİYO OLUŞUMUNUN UYARTILMASI ÜZERİNE ETKİSİ

Buse ÖZDEMİR

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Temmuz 2012, 63 Sayfa

Bu araştırma, “Faselis F₁”, “Amadeo F₁” ve “Aydın Siyahı” olmak üzere üç farklı patlıcan çeşidi kullanılarak, mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo uyartımı elde etmede etkili bir protokol geliştirmek amacıyla yapılmıştır. Embriyo oluşumunun uyarılması için, ovaryum ko-kültür sisteminin patlıcanda mikrospor kültürü üzerine etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Ayrıca mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo elde etmek için yapılan denemelerde, uygun tomurcuk gelişme devresi ve optimum mikrospor izolasyon yönteminin belirlenmesine çalışılmıştır.

Bu amaçla, ilk olarak uygun mikrospor gelişme dönemi belirlenmiştir. Bu tomurcuklardan çıkarılan anterler 35°C’de 8 gün karanlık koşullarda 0.3 M mannitol solüsyonu içinde ön uygulamaya maruz bırakılmıştır. Ön uygulama işleminden sonra NLN ortamında izole edilip kültüre alınan mikrospora haploid embriyo oluşumunu uyartmak için ilk olarak 5 mg/l 2,4-D + 5 mg/l KIN ve 5 mg/l NAA+ 5 mg/l BAP hormon konsantrasyonlarını içeren kültür ortamlarının etkileri araştırılmıştır. Bu ortamlarda Aydın Siyahı çeşidinde herhangi bir gelişme gözlenmezken, Faselis ve Amadeo çeşitlerinde ise yalnızca simetrik çekirdek bölünmesi uyartılabilmektedir. Ovaryum ko-kültür denemeleri için, buğday ovaryumlarının bu kültür ortamlarına ilave edilmesiyle Faselis ve Amadeo çeşitlerinde simetrik bölünme yanında çok çekirdekli

yapıların oluşumu, Aydın Siyahı'nda ise simetrik bölünme uyartılmıştır. Ancak hiçbir çeşitte, ortam ve koşulda mikrosporlardan embriyo oluşumu sağlanamamıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Patlıcan, haploidi, mikrospor kültürü, ovaryum ko-kültür

JÜRİ: Prof. Dr. A. Naci ONUS (Danışman)

Doç. Dr. Ersin POLAT

Yrd. Doç. Dr. Kamile ULUKAPI

ABSTRACT

THE EFFECTS OF OVARY CO-CULTURE SYSTEM TO INDUCE HAPLOID EMBRYO FORMATION ON EGGPLANT (*Solanum melongena* L.) MICROSPORE CULTURE

Buse ÖZDEMİR

M. Sc. Thesis in Department of Horticultural Science

Adviser: Prof. Dr. A. Naci ONUS

July 2012, 63 Pages

In this study, three different eggplant cultivars (Faselis F₁, Amadeo F₁ and Aydın Siyahı) have been used to develop an efficient protocol for haploid embryo induction. Ovary co-culture system was carried out to determine the its effects on eggplant microspore culture to induce embryo formation. The experiments were also performed to determine the optimal stage of bud development and identify the suitable microspore isolation method.

To serve the purpose, first of all the most suitable microspore development stage was determined. Anthers were isolated in 0.3M mannitol solution and exposed to pretreatments for 8 days in darkness at 35⁰C. After pretreatments, microspores were cultured in NLN medium supplemented with 5 mg/l 2,4D + 5 mg/l KIN ve 5 mg/l NAA+ 5 mg/l BAP. While no improvement was obtained in cv. Aydın Siyahı microspores, symmetrically divisions were obtained in cv. Faselis and Amadeo microspores. When wheat ovaries were added to culture medium for ovary co-culture system, isolated microspores of cv.'s Faselis and Amadeo were induced to divide symmetrically and formed multinucleated structures. On the other hand, in cv. Aydın Siyahı were induced to divide only symmetrically. No regeneration was obtained from any cultivar used under the experimental conditions.

KEY WORDS: Aubergine, haploidy, microspore culture, ovary co-culture

COMMITTEE: Prof. Dr. A. Naci ONUS (Adviser)

Assoc. Prof. Dr. Ersin POLAT

Asst. Prof. Dr. Kamile ULUKAPI

ÖNSÖZ

Solanaceae familyasına ait bir sebze türü olan patlıcan (*Solanum melongena* L.) dünyada ve ülkemizde ekonomik açıdan büyük öneme sahiptir. Patlıcan ülkemizde en fazla yetiştiriciliği yapılan yazlık sebzelerden biri olup, serada ve açıkta geniş alanlarda yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmaktadır.

Ülkemizde açıkta ve serada yetiştiriciliği yaygın olarak yapılan bu türün, kalite ve verim yönünden iyileştirilmesi, hastalık ve zararlılara dayanıklı, erkenci, gelecekteki olası tüketim alışkanlıklarına uygun çeşitlerin elde edilmesi ıslah amaçlarının büyük kısmını oluşturmaktadır.

Dünya da olduğu gibi ülkemizde de yeni çeşitlerin geliştirilmesi için ıslah çalışmaları başlatılmış ve klasik ıslah yöntemleri kullanılarak yeni çeşitler ıslah edilmiştir. Klasik ıslah yöntemleriyle hibrit tohum üretiminde, saf hatları (homozigot) elde etmede; ıslah çalışmalarının uzun yıllar alması, hibrit üretiminin zorluğu ve yavaşlığı, yurtdışından tohum girişi gibi nedenlerden dolayı hızlı ve ucuz metotlara gereksinim duyulmaktadır. Saf hatların, zaman alıcı ve maliyetli, seleksiyon ve melezlemeye dayalı klasik metotlarla üretilmesine alternatif olarak dihaploid (DH) bitkileri elde etmede biyoteknolojik yaklaşımlarla belirli türlerde homozigot hatların üretimini hızlandırmak mümkün olmuştur. Bu anlamda haploidi çalışmaları ıslah çalışmalarında kullanılan biyoteknolojik çalışmaların başında gelmektedir. Özellikle *in vitro* haploid bitki elde etme yöntemlerinden biri olan androgenesis, ıslah çalışmalarında heterozigot materyallerden hızlı bir şekilde homojen hatlar elde etmek ve geleneksel F₁ hibritlerini üretmek için ıslahçılar tarafından çok sık kullanılmaktadır. Böylece ıslah süresi kısaltmakta ve klasik ıslahta zaman alan veya görülmesi mümkün olmayan resesif genlerin kontrol ettiği özellikler ortaya çıkmaktadır.

Erkek gametten haploid bitki elde etme (androgenesis) yönteminden biri olan mikrospor kültürü, henüz olgunlaşmasını tamamlamamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterlerden, bu mikrosporların izole edilerek *in vitro* kuşullarda kültüre alınmasıyla yapılmaktadır. Mikrospor kültürü yoluyla edilen bitkiler normal kromozom sayısının yarısına sahip

olmakta ve kolhisin uygulaması ile kromozom sayıları iki katına çıkartılarak %100 saf hatlar elde edilebilmektedir. Böylece kısa bir sürede elde edilen bu saf hatlar yeni çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılabilmektedir.

Mikrospor kültür sistemlerindeki ilk hücre bölünmesi, embriyo oluşumu için gerekli olan diğer hücre bölünmelerinin başlangıcını oluşturmaktadır. Bu tür bölünmeler farklı hormon kombinasyonları, ortamlar, katılaştırıcılar, iyileştirme faktörleri, aminoasitler ve ortama eklenen diğer maddelerden etkilenmektedir. Bu amaçla mikrospor kültürüyle haploid embriyo oluşumunu artırmak için kullanılan yöntemlerden biriside ovaryum ko-kültür yöntemidir. Ovaryum ko-kültür yöntemiyle, mikrospor kültüründe kültür ortamında, diğer çoğalabilen doku veya organları, özellikler ovaryumları, kullanmanın dikkat çekici avantajları olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışma ile ekonomik değeri yüksek olan patlıcanda mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo elde etmek için uygun tomurcuk gelişme devresinin ve mikrospor gelişme aşamasının ve optimum mikrospor izolasyon yönteminin belirlenmesine ilave olarak embriyo oluşumunun uyarılması için besin ortamı bileşimi ve yapısı üzerine buğday ve arpa gibi monokotiledon bitkilerde çalışılmış ancak dikotiledon bitkilerde son derece sınırlı araştırma bulunan ovaryum ko-kültür sisteminin, patlıcanda mikrospor kültürü üzerine etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada gerekli olan patlıcan bitkileri Gento Tohumculuk Firmasına ait seralarda, buğday bitkileri ise Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'na ait arazide ve Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'na ait serada saksılarda yetiştirilmiştir. Mikrospor kültürü aşaması ise Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doku Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tezimde mikrospor kültürü konusunda çalışma fırsatı sağlayan ve çalışmamın başından sonuna kadar ilgi ve desteğini esirgemeyen, en zor anlarımda beni teşvik eden danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Naci ONUS'a ne kadar teşekkür etsem azdır.

Tezime büyük katkısı olan, çalışmam boyunca özellikle mikrospor gelişim aşaması ve sayımında benden bilgi ve desteğini esirgemeyerek gösterdiği ilgi ve katkılarından dolayı hocam Sayın Prof. Dr. Nurgül ERCAN'na, güler yüzüyle, eleştirileriyle her konuda bana cesaret veren, hem lisans hem de yüksek lisans aşamamda her konuda yardımcı olan hocam Yrd. Doç. Dr. Kamile ULUKAPI'ya, tez jürimde bulunarak yaptığı katkılardan dolayı Doç. Dr. Ersin POLAT'a, bitkisel materyalin yetiştirilmesi ve tomurcukların temininde Gento Tohumculuk Firmasına özellikle Ziraat Yüksek Mühendisi Ahmet SEÇİM'e, buğday tohumu temininde Ziraat Mühendisi Süleyman KANLI'ya, buğday ekimi için arazi temininde sayın hocam Prof. Dr. Kenan TURGUT'a, arazi kısmında yardımlarından dolayı Dr. Yaşar ÖZYİĞİT'e teşekkür ederim.

Ayrıca bana ailem kadar yakın olan, beni düşünen, destekleyen, stresli olduğum her anıma katlanan, çalışmalarımda bir şekilde yardımlarını gördüğüm dostlarım Arş. Gör. Gülden YILMAZ'a, Ziraat Yüksek Mühendisi Rudil BAYYURT'a, Arş. Gör. Elvan SERT'e, Arş. Gör. Tuğçe ÖZSAN'a, Ziraat Yüksek Mühendisi Ece AYDINER'e, İlker ÇELİK'e, Ali KAİM'e, yüksek lisansımız boyunca bizlere bir abla kadar yakın olan ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Sara DEMİRAL'a, Arş. Gör. Esmâ GÜNEŞ'e, Arş. Gör. Sabriye ATMACA'ya, Arş. Gör. Gizem ŞAHİN'e ve eğitim hayatımdan bu yana Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda görevli hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve idari personeline sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı başarıyla gerçekleştirmem için gerekli malzemelerin alınmasını maddi yönden destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisansım boyunca benden hoşgörü ve desteklerini esirgemeyen, tezimin her anını benimle beraber hisseden çok sevgili annem Fatma ÖZDEMİR'e, babam Mehmet ÖZDEMİR'e ve ablam Eylem ÖZDEMİR'e ne kadar teşekkür etsem azdır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	14
2.1. Androgenesis.....	14
2.2. Ovaryum Ko-kültür.....	28
3. MATERYAL VE METOT.....	33
3.1. Materyal.....	33
3.2. Metot.....	34
3.2.1. Sitolojik çalışmalar.....	34
3.2.1.1. Çiçek tomurcuklarının gruplandırılması.....	34
3.2.1.2. Uygun tomurcuk safhasının belirlenmesi.....	34
3.2.2. Mikrospor kültürü aşamaları.....	35
3.2.2.1. Tomurcukların ve başakların sterilizasyonu.....	35
3.2.2.2. Anterlere yapılan ön uygulamalar.....	35
3.2.2.3 Mikrosporların izolasyonu.....	36
3.2.2.4. Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi.....	39
3.2.2.5. Mikrosporların kültüre alınması.....	42
3.2.3. Deneme sonuçlarının değerlendirilmesi.....	44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	45
4.1. Sitolojik Çalışmalar.....	45
4.1.1. Mikrospor kültürü için uygun tomurcuk gelişme devresi, mikrospor gelişme dönemi.....	45
4.1.2. Mikrospor kültürü aşamaları.....	51
5. SONUÇ.....	57
6. KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C.....:	Santigrad derece
mm.....:	milimetre
mg/l.....:	miligram/litre
ml.....:	mililitre
Mt.....:	metrik ton
µm.....:	mikrometre
l	litre
%.....:	yüzde
dk.....:	dakika

Kısaltmalar

2,4D.....:	2,4-dikloro fenoksi asetik asit
BAP	Benzil amino purin
CaNO ₃ .4H ₂ O.....:	Kalsiyum nitrat tetrahidrat
CoCl ₂ . 6H ₂ O.....:	Kobalt klorür heptahidrat
CuSO ₄ . 5H ₂ O.....:	Bakır sülfat pentahidrat
DH.....:	Double haploid
F ₁:	Filial Generation 1
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
H ₃ BO ₃:	Borik asit
IAA	Indol-3-asetik asit
KH ₂ PO ₄:	Potasyum fosfat
KIN	Kinetin
KNO ₃:	Potasyum nitrat
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....:	Magnezyum sülfat heksahidrat
MnSO ₄ . 4H ₂ O.....:	Mangan sülfat tetrahidrat
MS	Murashige ve Skoog kültür ortamı
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O.....:	Disodyum molibdat hidrat

NAA	Naftalen asetik asit
NaFeEDTA.....:	Sodyum demir EDTA
NH ₄ NO ₃:	Amonyum nitrat
NLN.....:	Nitsch ve Nitsch (1967) tarafından geliştirilen Lichter (1981,1982) tarafından modifiye edilen besin ortamı
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....:	Çinko sülfat heksahidrat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Haploid bitki üretim yöntemleri (Forster vd 2007).....	10
Şekil 2.1. Mikrosporların <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> koşullarda gösterdikleri alternatif yollar (Coşkun 2011).....	16
Şekil 2.2. Anter kültüründe farklı <i>in vitro</i> gelişim alternatiflerini gösteren diyagram (Segui-Simarro ve Nuez 2007).....	20
Şekil 3.1. Faselis F ₁ (a), Aydın Siyahı (b) ve Amadeo (c) patlıcan çeşitlerinden bir görünüm.....	33
Şekil 3.2. Steril kabin içinde besi ortamının sterilizasyonunun yapılışı.....	38
Şekil 3.3. Mikrospor süspansiyonunun süzülmesinde kullanılan elek sistemi.....	38
Şekil 3.4. Thoma lamının şematik çizimi.....	40
Şekil 3.5. Thoma lamında sayım yapılan kareler.....	40
Şekil 3.6. Sayıma alınan hücrelerin şematik görünümü.....	41
Şekil 3.7. Ortama ilave edilecek buğday ovaryumlarının mikroskop altındaki görüntüsü (a ve b). Ovaryum ko-kültür denemesi (c).....	43
Şekil 3.8. Orbital çalkalayıcı üzerine alınan petriler.....	43
Şekil 4.1. Aydın Siyahı çeşidine ait gruplandırılmış tomurcukların görünümü.....	45
Şekil 4.2. Faselis F ₁ çeşidine ait gruplandırılmış tomurcukların görünümü.....	47
Şekil 4.3. Amadeo F ₁ çeşidine ait gruplandırılmış tomurcukların görünümü.....	48
Şekil 4.4. Patlıcanda tetrat aşamasındaki mikrosporlar.....	48
Şekil 4.5. Patlıcanda tek çekirdekli aşamadaki mikrosporlar.....	49
Şekil 4.6. Patlıcanda çift çekirdekli aşamadaki mikrosporlar.....	49
Şekil 4.7. Buğdayda tek çekirdekli aşamadaki mikrosporlar.....	50
Şekil 4.8. Patlıcanda simetrik bölünme gösteren mikrosporlardan bir görünüm.....	56
Şekil 4.9. Patlıcanda çok çekirdekli yapı gösteren mikrosporlardan bir görünüm.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye ve Dünya patlıcan üretimi (Anonim 2012).....	3
Çizelge 1.2. Patlıcan üreticisi ilk on ülkenin yıllara ve üretim miktarına göre sıralanışı (Anonim 2012).....	3
Çizelge 3.1. Mikrospor izolasyonu ve kültüre alınmasında kullanılan sıvı NLN ortamının bileşimi.....	37
Çizelge 3.2. Mikrospor kültüründe kullanılan ortam içerikleri.....	42
Çizelge 4.1. Faselis, Amadeo ve Aydın Siyahı çeşitlerinde tomurcuk uzunlukları ve bu uzunluklara ait tomurcuk özellikleri.....	46
Çizelge 4.2. Temel kültür ortamı ve ekli diğer bileşiklerin mikrospor gelişimine etkileri.....	55

1. GİRİŞ

Solanaceae familyası dünyada olduğu kadar ülkemizde de en fazla yetiştirilen sebze türlerini içerisinde bulundurmaktadır. Bu familya yaklaşık olarak 90 cins ve 3000-4000 türden oluşmaktadır (Knapp vd 2004). *Solanacea* familyasına ait bir sebze türü olan *Solanum melongena* L. ($2n=24$), eggplant, aubergine, guinea squash ve brinjal olarak belli başlı isimlerle yaygın olarak bilinen patlıcan bitkisi; dünyanın çeşitli ılıman ve tropik bölgelerinde yetişen ekonomik olarak önemli bir sebzedir. Anavatanı Hindistan olarak ifade edilmekle birlikte, İndo-Burma orijinli bir bitki olarak tanımlanmaktadır. İkinci derecedeki gen merkezinin de Çin olduğu yönünde kayıtlar bulunmaktadır (Kalloo 1993).

Vural vd (2000) tarafından bildirildiğine göre; anavatanı Güneydoğu Asya olan patlıcan, önce Araplar tarafından Akdeniz havzasına getirilmiş, oradan İspanya'ya geçmiş, Türkler tarafından da Balkanlar üzerinden Avrupa'ya yayılmıştır. Patlıcanın Anadolu'ya 16. yüzyılın sonlarında ve 17. yüzyılın başlarında girdiği Zhukowsky tarafından bildirilmiştir. Patlıcanın yenedünyaya geçişi ise yine İspanyollar vasıtasıyla mümkün olmuştur (Tunçay 2007).

Solanum cinsine ait, 'Eggplant' adı altında; üzüksü meyve yapısında etli meyveleri bulunan, kültürü yapılan veya yabani çok sayıdaki tür anlaşılmaktadır. Bu bitkilerin meyveleri; acımsı tatları, hafif tatlı veya keskin baharatlı kokularıyla değer taşımaktadır. Bu bitkilerin değişik kısımları yemeğe tat veren bir çeşni olarak kullanılabildiği gibi, meyveleri taze olarak, pişirilerek veya kurutularak tüketilmektedir. Yaprakları eğer dikensiz olursa hafif acılık özelliğine sahip olduklarından ıspanak gibi pişirilir ve yenir. Sebze olarak tüketiminin dışında, yüksek alkaloid içermeleri nedeniyle bu türler çok önceden dini törenlerde ve geleneksel tıpta şifa kaynağı olarak da kullanılmıştır (Ellialtıoğlu 2012a).

S.melongena çok geniş bir fenotipik varyasyona sahip olmasıyla tanınmakla birlikte, yetiştirdikleri coğrafi orijinlerine göre çok belirgin farklılıklar sergilemektedirler. Meyvelerinin ağırlığı birkaç gramdan birkaç kilografa kadar

değişebilmektedir. Meyve şekilleri ise, ovoid, globular, oblong, yarı-uzun, uzun, çok uzun ve yılan gibi kıvrılan bir şekilde (serpentine) olabilmektedir. Meyve rengi yeşil, benekli yeşil, beyaz, pembe, pembeye dönük eflatun, eflatun, çizgili, mor veya siyah olabilmekte ve meyveler olgunlaştıkça kahverengimsi sarı veya parlak sarı renge dönmektedir. Meyvenin görünüşü (parlak veya mat), çanak yaprakların (kaliks) sertliği ve büyüklüğü de varyasyon görülen karakterlerdendir. Güneydoğu Asya’da, yeşil veya hafif eflatun renkli küçük meyvelere sahip olan primitif çok sayıda çeşit bulunmaktadır. Akdeniz havzasındaki patlıcanlar oldukça geç olgunlaşan ve çok kuvvetli bitkilere sahip, meyveleri sert dokulu olan çeşitlerden oluşmaktadır (Ellialtıoğlu 2012a).

Dünya patlıcan üretim miktarı yıldan yıla artış göstermiştir. Dünya Patlıcan üretimindeki ilk 10 ülke neredeyse hiç değişmemekle birlikte, Türkiye’nin patlıcan üretim miktarında bir azalma görülmektedir. Dünyadaki patlıcan üretiminin büyük kısmının Asya’ya ait olduğu; Türkiye’nin tek başına tüm Avrupa ülkelerinin toplam patlıcan üretimine yakın bir değerde patlıcan üretimi gerçekleştirdiği görülmektedir. 2010 yılına ait FAO istatistikleri incelendiğinde Türkiye’nin 846,998 ton’luk üretim değeri ile dünyadaki patlıcan üreticisi ülkeler arasında önemli bir yerinin olduğu görülmektedir. Ülkemiz, patlıcan üreticisi ülkeler arasında Çin, Hindistan, Mısır ve İran’da sonra üretim değeriyle beşinci sırada yer almaktadır (Anonim 2012) (Çizelge 1.1, Çizelge 1.2).

Çizelge 1.1. Türkiye ve dünya patlıcan üretimi (Anonim 2012)

	Türkiye	Dünya
Yıllar	Üretim (ton)	Üretim (ton)
2000	924,000	27,401,959
2002	955,000	29,528,398
2004	900,000	31,184,457
2006	924,165	33,166,676
2008	813,686	39,805,363
2010	846,998	41,840,989

Çizelge 1.2. Patlıcan üreticisi ilk on ülkenin yıllara ve üretim miktarına göre sıralanışı
(Anonim 2012)

2000		2005		2010	
Ülke	Üretim (Mt)	Ülke	Üretim (Mt)	Ülke	Üretim (Mt)
Çin	13,780,708	Çin	17,025,102	Çin	24,501,936
Hindistan	8,120,000	Hindistan	8,600,800	Hindistan	10,563,000
Türkiye	924,000	Mısır	1,000,000	Mısır	1,229,790
Mısır	708,840	Türkiye	930,000	İran	888,500
Irak	529,000	İran	781,968	Türkiye	846,998
Japonya	476,900	Irak	439,000	Endonezya	482,305
İtalya	357,031	Japonya	395,700	Irak	387,435
İran	300,000	İtalya	338,803	Japonya	330,100
Endonezya	270,748	Endonezya	333,328	İtalya	302,551
Sudan	227,000	Filipinler	187,793	Filipinler	208,252

Ülkemizin hemen hemen bütün bölgelerinde patlıcan yetiştiriciliği yapılmakla birlikte, açıkta yazlık sebze olarak Karadeniz, İç ve Doğu Anadolu'nun bazı kesimleri haricinde yetiştirilmekte olup, kış ve bahar aylarında da örtü altı tarımında yetiştiriciliği yapılmaktadır. Yoğun olarak patlıcan üretimi yapılan bölgeler Ege, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve Marmara bölgeleridir. Yetiştirilen ürünün büyük bir bölümü iç pazarda taze olarak tüketilmekte, az bir kısmı ihraç edilmektedir. Örtüaltı tarımı söz konusu olduğunda ise patlıcan, seralarda yetiştirilen ürünler sıralamasında domates, hıyar ve biberden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (Abak 1993).

Dünyada ve ülkemizde sebze üretiminde üstün nitelikli çeşitler yüksek verimleri, homojenlik ve meyve kaliteleri, erkencilikleri, bitki hastalık ve zararlarına dayanıklılıkları, depolama ve taşımaya uygunlukları gibi üstün özellikleri nedeniyle önemli bir endüstri haline gelmiş ve üreticiler tarafından vazgeçilmez olmuştur. (Anonim 2010). Sebze üretiminde üstün nitelikli çeşitlerin kullanılmasıyla birlikte verim artışlarının elde edilmesi, bitki ıslahı çalışmalarının büyük önem kazanmasına yol açmıştır.

Ülkemizde açıkta ve serada yetiştiriciliği yaygın olarak yapılan ve önem taşıyan sebze türlerinden biri olan patlıcanın; kalite ve verim yönünden iyileştirilmesi, hastalık ve zararlılara dayanıklı, erkenci, gelecekteki olası tüketim alışkanlıklarına uygun ve yüksek kalite ve miktarda ürün verebilecek çeşitlerin elde edilmesi ve çevreden kaynaklanan sıcaklık, tuzluluk, kuraklık ve benzeri streslere dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ıslah çalışmalarının amaçlarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır.

Ülkemizde sebze sektörünün temelini oluşturan tohum sektörü son 15 yılda büyük gelişme göstermiş, bir yandan yurt içi tohumluk üretimini artırmak diğer yandan da yerli sebze tohumculuğunun geliştirilmesi konusunda özel sektör önemli çalışmalar yapmıştır. 1985'li yıllardan itibaren kurulmaya başlayan bazı tohum şirketlerinin çabaları ile yerli sebze tohumu üretimi azda olsa artış göstermiştir ve yapılan ıslah çalışmalarıyla genetik yönden üstün vasıflı hibrit çeşitler elde edilmiştir. Ancak hibrit çeşitlerin geliştirilmelerinin zor ve maliyetli olması, yüksek biyoteknolojinin ıslahta

kullanılması ve sürekli değişen pazar istekleri nedeniyle sektör kendini dünyadaki rekabetçi yapının içinde bulmuştur (Anonim 2010).

Bu nedenle ülkemizde sebze türlerinde oldukça gecikmiş olarak başlayan ve klasik yöntemlerle uzun yıllara ihtiyaç duyan bitki ıslahı çalışmalarının hızlandırılması gerekmektedir. Islah edilmiş ve genellikle F_1 olarak üretimde kullandığımız çeşitler %100 saf hatların melezlenmesiyle elde edilir. Bitki ıslahında kullanılan geleneksel yolla, bu şekildeki ebeveyn kombinasyonunun elde edilmesinde amaçlara uygun olarak seçilmiş ebeveyn bitkiler arasında yapılan melezlemelerle işe başlanmakta ve istenilen karakter kuruluncaya kadar birçok generasyon kendileme ve melezleme işlemleri yapılmaktadır. Geleneksel ıslah yöntemi her ne kadar pek çok üründe uygulanıyorsa da zaman ve kaynak kullanımı bakımından dezavantajlara sahiptir (Boyacı 2001).

Seleksiyon ve melezlemeye dayalı klasik ıslah metotlarının kullanılmasıyla üstün nitelikli çeşitlerin elde edilmesinde yaşanan bazı kısıtlamalar yanında biyoteknoloji alanındaki gelişmeler ve bu tekniklerin doğrudan ve dolaylı olarak ıslah çalışmalarında kullanılması, yeni çeşitlerin geliştirilmesinde biyoteknolojik yöntemlerden yararlanma imkânı sağlamıştır. Bu anlamda haploidi çalışmaları bitki ıslahında kullanılan biyoteknolojik yöntemlerin başında gelmektedir.

Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler adı verilmektedir. Haploid bitki elde etme işlemine haploidizasyon, haploid bir bitkinin kromozom sayısının (n) bazı kimyasal maddelerle katlanmasıyla, türün normal kromozom sayısına ($2n$) yeniden kavuşturulması ve mutlak homozigot bitkilerin elde edilmesi işlemine ise dihaploidizasyon adı verilmektedir (Ellialtıoğlu vd 2001).

Haploid bitkiler kök, gövde, dal, yaprak, çiçek ve bazı durumlarda meyveler de vererek normal gelişim gösterirler. Ancak haploid bireyler morfolojik olarak diploidlerin küçültülmüş örnekleri olup 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. Bununla birlikte, dominansi söz konusu olmadığından haploid bitkiler genetik açıdan mükemmel deneysel materyallerdir (Emiroğlu 1982, Er 1992, Çağlar ve Abak 1999, Ellialtıoğlu vd 2001). Bu özellikleriyle normalde hiçbir tarımsal değer taşımayan haploid bitkiler; bitki ıslahı, genetik, sitolojik, fizyolojik, biyolojik ve biyokimyasal çalışmalar için son derece önemli ve değerli materyallerdir.

“Haploid bitkilerin ıslah çalışmalarında araştırmacılara sağladığı avantajları Ellialtıoğlu vd (2001), aşağıdaki gibi gruplandırmışlardır:

1. Haploidleri kullanmanın en başta gelen avantajı, tam bir homozigotiye çok kısa bir sürede elde etme olanağını sunmasıdır. Dihaploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmalarını yapmak kolaylaşmakta ve sonuca daha çabuk ulaşılabilmektedir. Yabancı döllenmiş türlerde heterozigoti oranı çok yüksek olduğundan bunlarda homozigot hatların elde edilmesi için 10-12 generasyon boyunca kendilemeler yapmak gerekmekte; kendine döllenmiş türlerde bile aynı amaçla 5-7 generasyon kendileme işlemine gereksinim duyulmaktadır. Dihaploidizasyon yöntemi devreye girdiğinde homozigot hatlara bir generasyonda ulaşmak olasıdır.
2. Dioik türlerde veya kendileme depresyonu nedeniyle klasik yöntemlerle homozigotiye ulaşmanın zor olduğu lahana ve çilek gibi türlerde, dihaploidizasyon yöntemi kullanılarak bu sorun bir generasyonda çözülebilir,
3. Çok yıllık meyve ağaçları ve orman bitkileri gibi tohumdan çiçeklenmeye kadar oldukça uzun bir gençlik kısırlığı olan türlerde de haploidizasyon önem kazanmaktadır. Bu türlerde kendilemeler mümkün olsa bile, homozigotinin elde edilmesi oldukça uzun bir sürede gerçekleşmektedir.

4. F_1 hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde homozigot hatlar arasında üstün kombinasyon yeteneği verenlerin belirlenmesi yöntemi kullanıldığından, haploidinin hibrit çeşit ıslahında özel bir önemi bulunmaktadır. Dihaploid bitkilerden elde edilen safhatlar F_1 hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilirler.
5. Kombinasyon ıslahında da sonuca çok kısa sürede ulaşmayı sağlayan haploidi sayesinde, F_1 kademesindeki melez bitkilerden haploid çekerek; farklı genotiplerde bulunan ve tek bir genotipte toplanması arzu edilen özelliklere sahip bitkiler kazanmak mümkündür.
6. Haploidizasyon, resesif mutasyonların açığa çıkartılmasında başvurulacak en etkin yöntemdir. Haploid bitkilerde resesif genler, dominant genler tarafından örtülemeyeceğinden, mutlak homozigotiye sahip olan dihaploid hatlarda genetik açılımı izlemek basit bir işlem haline gelmektedir.
7. Haploid bitkiler, somatik hibridizasyon işleminin diploid protoplastlara göre daha kolay yapılabilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca iki haploid protoplastın birleşmesinin sonucu “diploid” olacağından; protoplast kültürü kullanılarak yapılan somatik hibridizasyon tekniğinin bilinen dezavantajlarının büyük bir kısmı böylece ortadan kalkacaktır.
8. Haploidler ve bunların katlanması ile geliştirilen dihaploidler sitolojik, fizyolojik ve genetik açıdan önemli deneysel materyallerdir.
9. Islah etkinliğinin artırılması, haploidizasyonun sağladığı en önemli avantajlar arasındadır.
10. Yonca ve patates gibi tetraploidlerin bulunduğu türlerde haploidizasyon, diploid bitkilerin üretiminde kullanılabilmektedir. Elde edilen diploidler ticari olarak ilginç olabileceği gibi; bu yolla bazı tetraploid ürünlerde; yabancı türler ile kültür

çeşitleri arasında diploid seviyede melezleme yaparak kombinasyon yoluna gidilebilmektedir.

11. Kendilemenin olanaksız olduğu bazı dioik türlerde haploid uyartımı ve bunu takip eden kromozom katlamasıyla saf erkek bitkiler elde etmek mümkündür. Kuşkonmaz (*Asparagus officinalis*) bu uygulama için iyi bir örnektir. Kuşkonmaz bitkisinde, erkek bireyler dişi bireylerden daha erkenci ve daha yüksek verimlilerdir. Dişi (XX) ve erkek (XY) bitkiler melezlendiğinde %50 dişi, %50 erkek kuşkonmaz bitkiler elde edilir. Erkek kuşkonmazların anterlerinden çekilen haploidlere (X ve Y) kromozom katlanması sonucu süper erkek (YY) bitkiler elde edilir ve bunlar vegetatif olarak çoğaltılabilir. Dişi bitkiler (XX) süper erkek bitkilerle melezlendiğinde de sadece erkek bitkiler (XY) oluşur.

12. Haploid bitkiler, farklı patojenler ve patojenlerin fizyolojik ırklarına karşı *in vitro* seviyede seçime olanak vermekte, hastalıklara dayankıllık çalışmalarında zaman, yer ve maddi kazanç sağlamaktadır.

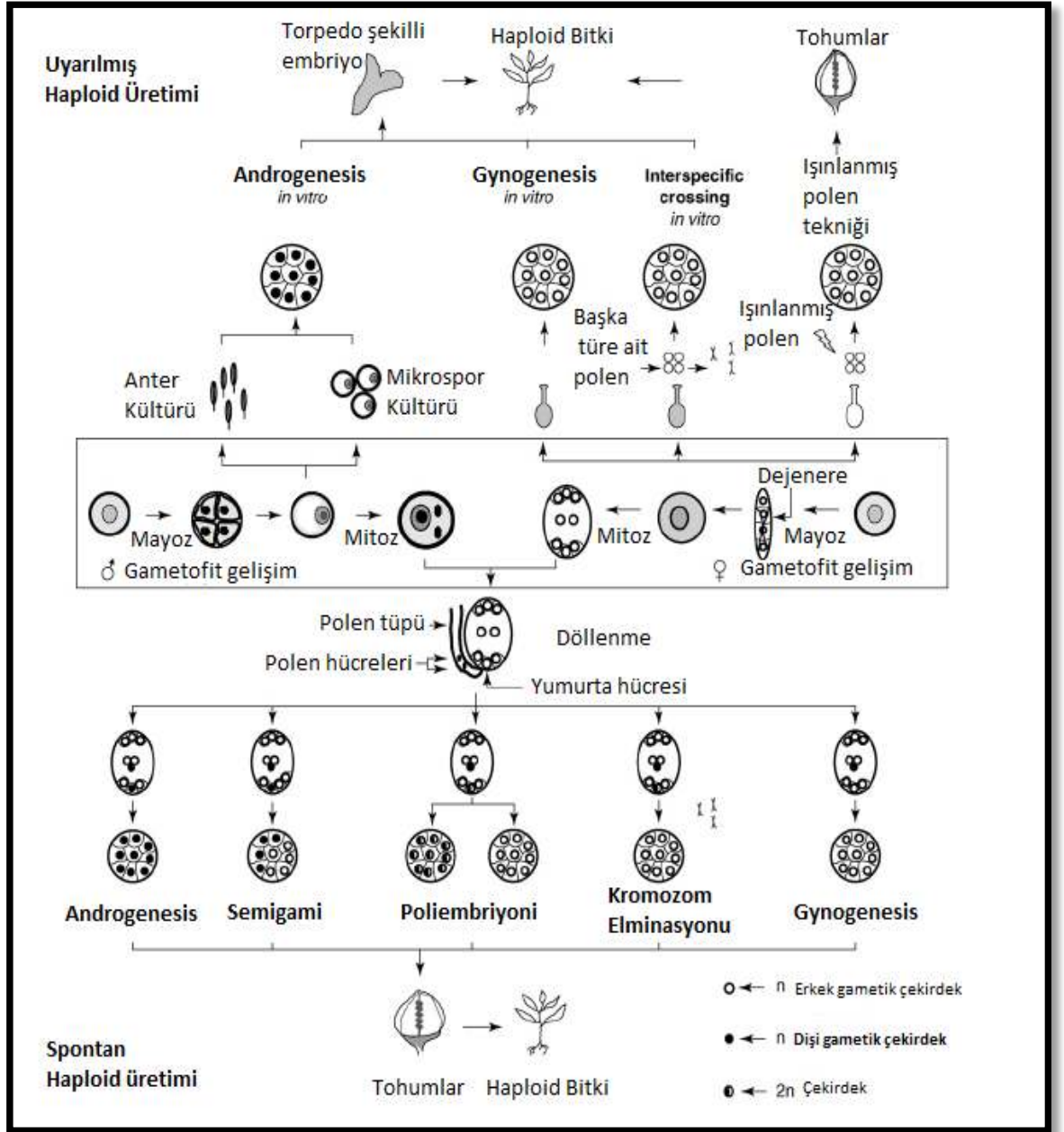
13. Dihaploid (DH) hatların güncel uygulamalarından biri de gen haritalarının çıkartılmasında kullanımlarıdır. DH hatlardan oluşan bir populasyonda; heterozigoti nedeniyle ortaya çıkan intermedier ekspresyonlara rastlanmaz. Bu nedenle de fenotipik işaretleyicilerin (marker) tanımlanması çok daha etkin olabilmektedir. DH hatlarda herhangi bir gen, ister bitki isterse marker seviyesinde olsun (genellikle RFLP ile belirlenmektedir); 1:1 oranında açılacaktır. Bu durum, özellikle poligenik olarak kontrol edilen bir karakterin haritası çıkartılıyorsa önem taşımakta ve kolaylık sağlamaktadır.”

Bu çalışmaların etkin şekilde yürütülebilmesi için yeterli miktarda ve kolayca elde edilebilmeleri gereken haploidler 3 yolla meydana gelmektedir. Bunlardan ilki doğada androgenesis, gynogenesis, semigami, polyembriyoni veya kromozom eliminasyonu yollarından birisi ile oluşan spontan haploidlerdir (Şekil 1.1). Haploidlerin doğada spontan olarak ortaya çıkma sıklığı % 0.001–0.01 gibi çok düşük düzeyde olup

türlere ve hatta genotiplere göre değişmektedir. Birçok türde de spontan haploidi oluşumuna hiç rastlanmamaktadır. Bugüne kadar ancak 100 kadar türde spontan haploidlere rastlanmıştır. Pratik bir ıslah çalışması planlandığında bu spontan haploid oluşum oranı çok düşük düzeylerde kalmakta ve gereksinim duyulan haploid bitkilerin elde edilmesi için yetersiz olmaktadır (Berber 2009).

Uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlamanın geciktirilmesi, abortif veya ışınlanmış polenlerle tozlama, sıcaklık şokları, değişik kimyasallar, hormon uygulamaları, “X” veya “UV” ışınları ile *in situ* uyartımla da haploid bitkiler elde edilebilir (Şekil 1. 1).

Diğer bir yöntem ise *in vitro* uyartımla laboratuvar koşullarında haploid bitki elde edilmesidir. Haploid bitkilerin *in vitro* uyartımla elde edilmesinde kullanılan başlangıç materyalleri gametlerdir. Esas olarak, haploidlerin elde edilebilmesi için iki yöntem bulunmaktadır: ya embriyo kesesindeki haploid yapıdaki hücrelerin – çoğunlukla yumurta hücresinin- uyarılması sayesinde dişi gametten; ya da polen rejenerasyonu yoluyla erkek gametten *in vitro* koşullarda bitki oluşumunu sağlamaktır (Ellialtıoğlu 2000) (Şekil 1. 1).



Şekil 1.1. Haploid Bitki Üretim Yöntemleri (Forster vd 2007).

Erkek gametten haploid bitki elde etme (androgenesis), henüz olgunlaşmasını tamamlamamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterlerin *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla anter kültürü veya bu mikrosporların anterlerden izole edilerek *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla mikrospor kültürü ile yapılmaktadır. Haploidi çalışmalarının başlangıç yıllarında ağırlıklı olarak anter kültürü kullanılmış olmakla birlikte devam eden yıllarda mikrospor

kültürü tercih edilen yöntem haline gelmiştir. Mikrospor kültürü anter kültürüne göre daha karmaşık bir teknik olmasına rağmen birçok türde daha başarılı sonuçlar verebilmektedir (Tuncer ve Yanmaz 2007).

Mikrospor kültür tekniği anter kültürüne göre daha karmaşık olmasına rağmen mikrospor kültürü çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu avantajları şu şekilde sıralamak mümkündür:

“1. Anter kültüründe, mikrosporlardan başka anter çeperi, septum veya tapetum gibi diploid yapıya sahip anter dokularından da embriyo oluşması durumuyla karşılaşılabilir. Oluşan diploid embriyoların yaşama kuvvetleri, her zaman haploidlere oranla daha fazla olmakta ve haploid embriyolarla istenmeyen bir rekabete girmektedirler. Mikrospor kültürü yapılarak, diploid yapıya sahip anter dokuları ortamdaki uzaklaştırılmakta ve böylece donör bitkinin yapısına sahip embriyo regenerasyon olasılığı tamamen ortadan kaldırılmaktadır.

2. Anter kültüründe mikrosporlar, besin ortamındaki maddeleri anter çeperinden geçtikten sonra alabilir. Mikrospor kültüründe ise besin maddelerinin mikrospora taşınmasında engel olarak görülebilecek anter çeperi uzaklaştırıldığından, mikrosporların besin ortamıyla doğrudan teması sağlanmış olmaktadır.

3. Anterde bulunan bazı engelleyici maddeler [absisik asit (ABA) veya toksik maddeler], anter çeperiyle birlikte ortamdaki uzaklaştırılacağından sorun olmaktan çıkmaktadırlar.

4. Tek bir mikrospordan doğrudan embriyoya dönüşüm sağlanabildiğinden gen transferi çalışmaları için çok uygun bir kültür yöntemidir. *Agrobacterium* aracılığı ile genetik transformasyon çalışmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır.

5. Biyotik veya abiyotik kökenli stres koşullarına dayanıklılık amaçlandığında *in vitro* seleksiyon için çok uygun bir yöntemdir.

6. Mikrosporlar, mutasyon araştırmaları ve genetik manipölasyonlar için anterlere göre daha uygun bir başlangıç materyalidir. Ayrıca diğerk bir üreme hücresi olan ovaryuma göre de sayısal bakımından daha avantajlıdır.

7. Kültür koşullarında embriyo oluşumunu izlemek, anter kültürüne göre daha kolay olmaktadır.

8. Daha fazla sayıda homojen materyal ile çalışma olanağı sağlar ve sayısal olarak haploid embriyo verimi, bazı türlerde anter kültürüne oranla daha yüksektir. Örneğın, mikrospor kültürü kolzada embriyo üretimi bakımından anter kültürüne göre çok daha verimlidir (Ellialtıoğlu vd 2001).”

Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitkilerin elde edilmesine; genotip, donör bitkilerin büyüme koşulları ve yaşı, mikrsoporların gelişme dönemi, çiçek tomurcuklarının, anterlerin veya mikrosporların çeşitli ön uygulamalara tabi tutulması, mikrosporların izolasyon yöntemi, kültür ortamının besin kompozisyonu, kültür ortamında mikrospor yoğunluğu, kültür odası koşulları başarıyı etkileyen önemli faktörlerdendir.

Mikrospor kültür sistemlerindeki ilk hücre bölünmesi, embriyo oluşumu için gerekli olan diğerk hücre bölünmelerinin başlangıcını oluşturmaktadır. Bu tür bölünmeler farklı hormon kombinasyonları, ortamlar, katılaştırıcılar, iyileştirme faktörleri, aminoasitler ve ortama eklenen diğerk maddelerden etkilenmektedir (Patel vd 2004). Son yıllarda mikrospor kültür ortamına ovaryum eklenerek (ovary co-culture) yapılan çalışmalar oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Dunwell (2010), mikrospor kültür ortamında, diğerk çoğalabilen doku veya organları, özellikle ovaryumları, kullanmanın monokotiledon bitkilerde mikrospor embriyogenesi artırmada dikkat çekici avantajları olduğunu belirtmiştir. Bu amaçla mikrospor kültürüyle haploid embriyo oluşumunu artırmak için kullanılan yöntemlerden biriside ko-kültür yöntemidir. Ovaryum ko-kültür yöntemiyle kültür ortamına ovaryumların eklenmesinin mikrospor kültürü için bir ön koşul olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir.

Bu çalışma ile ekonomik değeri yüksek olan patlıcanda mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo elde etmek için besin ortamı bileşimi ve yapısı üzerine buğday ve arpa gibi monokotiledon bitkilerde çalışılmış ancak dikotiledon bitkilerde son derece sınırlı araştırma bulunan ovaryum ko-kültür sisteminin etkisinin ortaya konması ve bunun yanında mikrospor kültüründe uygun tomurcuk gelişme devresi ve mikrospor gelişme aşamasının ve optimum mikrospor izolasyon yönteminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Androgenesis

Bitki ıslahı, belirli bir bitkisel materyalden üreme yeteneği olan ve daha üstün bazı özellikler taşıyan yeni bitki grupları yaratmak amacıyla yapılan tüm işlemleri içine alır. Doku kültürü olarak adlandırılan *in vitro* yetiştirme teknikleri, geleneksel ıslah yöntemlerinde karşılaşılan sorunların bir kısmının çözümüne olanak tanımakta, uzun ıslah sürecini kısaltmakta ve zaman tasarrufu sağlamaktadır. Bitki doku kültürleri konusunda Dünya’da ki ilk çalışmalar 19. yüzyılın sonunda başlamış ve 20. yüzyılın yarısından itibaren de tarımda uygulanabilir hale gelmiştir (Abak 1988).

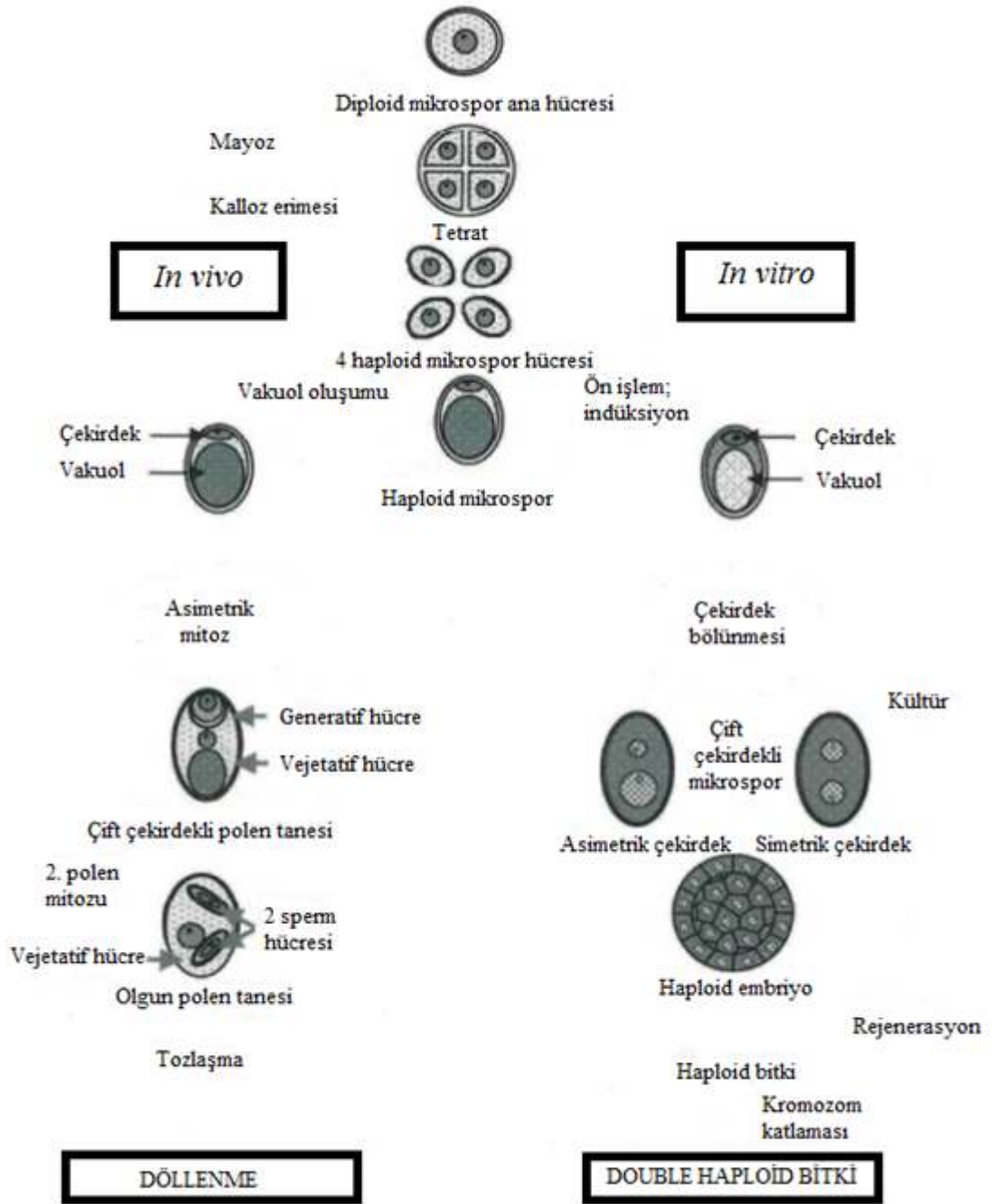
Pierik (1987)’in bildirdiğine göre, bitkilerdeki doku kültürü çalışmalarının temeli, ilk olarak Schwann ve Schleiden’in 1838 yılında totipotensi teorisini öne sürmeleri ile atılmıştır. Genel olarak bitkiler, hücrel totipotensi için olağanüstü bir potansiyele sahiptir ve çekirdeğini muhafaza ettiği sürece herhangi farklılaşmış bir bitki hücresi, embriyojenik şartlara dönme ve tam olarak yeni bir bitki oluşturma yeteneğindedir. Hücrel totipotensinin en çarpıcı örneklerinden birisi androgenesistir (Arı 2006).

Bitkilerin yaşam döğüsü, sporofit (diploid) ve gametofit (haploid) nesillerin birbirini izlemesiyle devam etmektedir. Sporofitler, erkek ve dişi gametlerin döllenme ürünüdür ve her bir ebeveyninden gelen bir set kromozom içerir ve genomik yapısı $2n$ ’dir. Sporofitler mayoz bölünme ile haploid sporları meydana getirirler. Bu sporlar mitozla bölünerek çok hücreli erkek ve dişi haploid bitki dölünü, yani gametofitleri oluşturur. Gametofitler mitoz ve hücrel farklılaşmasıyla gelişir ve gametleri üretir (Forster vd 2007).

Androgenesisin 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 modda gelişmesini zorlamaktır (Arı 2006).

Normal polen gelişimi mikrosporogenesis ve mikrogametogenesis olmak üzere iki aşamalıdır. Mikrosporogenesis, mikrospor ana hücresinin oluşumu ve ardından mayoz bölünme sonucunda haploid mikrosporların oluşmasıyla, mikrogametogenesis ise mikrospordan çekirdek ve hücre bölünmeleri ile sperm hücrelerinin oluşumuyla meydana gelmektedir (Emiroğlu 1982).

Sunderland ve Dunwell (1977)'in bildirdiğine göre, mikrosporogenesis; anter lokusu içindeki diploid bir mikrospor ana hücresi, mikrospor tetradı oluşturmak üzere mayoz girer. Mikrospor ana hücresine ait kallos duvarının dağılmasıyla tetrad sporları serbest hale gelir. Mikrogametogenesis ise, her bir mikrosporun devam eden gelişimi ile asimetrik bölünmeye (I. polen mitozu = I. haploid mitoz) giren hücre içindeki tek çekirdek, hücrenin periferik yönüne doğru hareket eder. İki hücreli polen taneciğinin oluşumuyla sonuçlanan bu bölünme sayesinde her biri haploid çekirdeğe sahip ve farklı görevlerden sorumlu küçük bir generatif hücre ile büyük bir vejetatif hücre meydana gelir. I. polen mitozundan hemen öncesi ile hemen sonrası arasındaki bir zaman diliminde, mikrosporlar potansiyel gametofitik gelişimleri yönünden kararsızdırlar. Polen taneciğinin bu kararsız gelişim periyodu sırasında uygulanacak çeşitli stres faktörleri gametofitik programı engelleyip, sporofitik genlerin ekspresyonunu başlatabilir. Dolayısıyla, polen tanecikleri gametofitik moddan, sporofitik gelişim moduna geçebilirler (Arı 2006).



Şekil 2.1. Mikrosporların *in vivo* ve *in vitro* koşullarda gösterdikleri alternatif yollar (Coşkun 2011).

Bitki haploid araştırmaları, gametik kromozom sayısını ($2n$ yerine n) taşıyan gelişmiş bitkilerden kolhisin uygulamalarıyla kromozom sayılarının iki katına çıkarılmasıyla sporofitlerin üretilebileceğinin keşfiyle başlamıştır (Forster vd 2007). İlk doğal sporofitik haploid *Datura stramonium* L.'de Bergner tarafından 1921 yılında gözlenmiş ve Blakeslee vd (1922) tarafından rapor edilmiştir. Bitki ıslahı ve genetik araştırmalarında haploidlerin öneminin anlaşılmasından sonra spontan haploidlerin sayısı giderek büyümüş ve çeşitli türlerde nadiren meydana gelen haploidlerin seçilmiş örneklerinin bir listesi Dunwell (2010) tarafından bildirilmiştir. İlk doğal haploidlerin tanımlanmasından yaklaşık 40 yıl sonra Guha ve Maheshwari (1964) *Datura innoxia*'da *in vitro* koşullarda olgunlaşmamış anterlerden haploid bitki elde etmenin mümkün olduğunu keşfetmişler ve bu keşif özellikle *Solanaceae*, *Brassicaceae* ve *Gramineae* familyalarında anter kültürü için daha fazla ve kapsamlı araştırmaların yolunu açmıştır (Germana 2011).

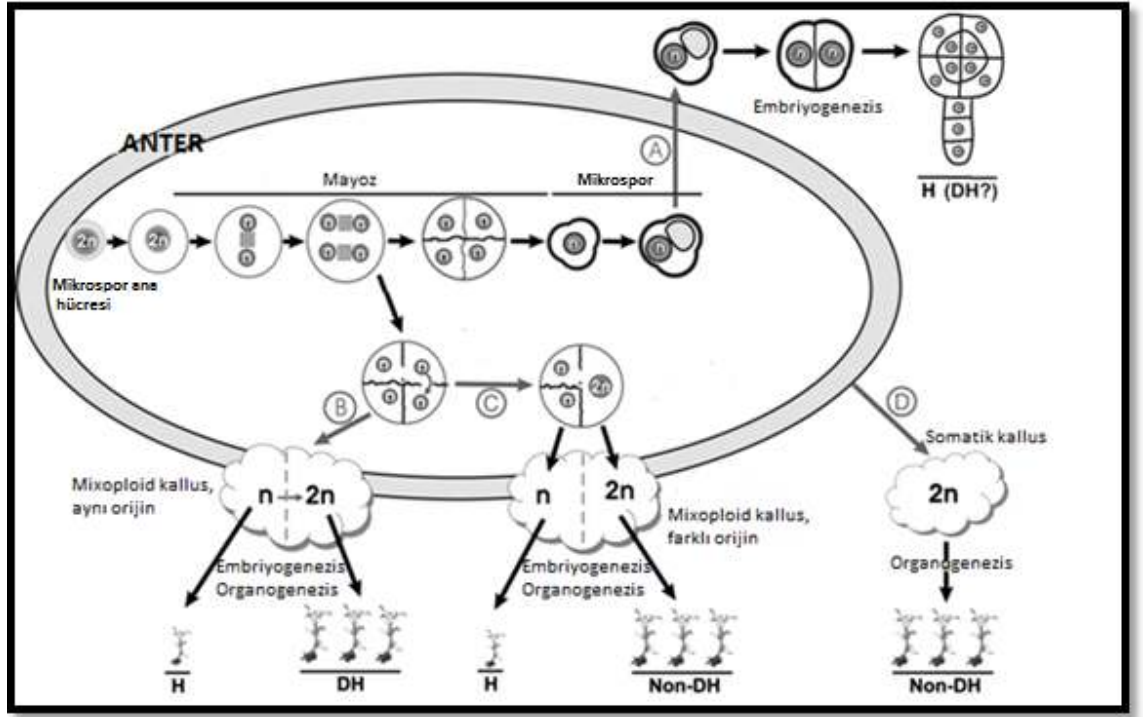
Maluszynski vd (2003), bildirdiğine göre yaklaşık olarak 250 üründe double haploid bitki elde etmek üzere geliştirilmiş protokoller ve yöntemler bulunmaktadır. Bu bitkiler arasında ağırlıklı olarak buğday, arpa, çeltik, kanola, tütün, mısır gibi tek yıllıklar ve mandarin gibi çok yıllıklar bulunmaktadır. Günümüzde double haploid elde edilmiş türlerin sayısı artmış olmakla birlikte tütün, arpa ve kanola gibi model türler dışında DH elde edilme oranı tüm tür ve familyalar için son derece düşüktür. Bu durum özellikle ekonomik ve agronomik önemi fazla olan *Solanaceae* familyasında üzerinde daha belirgindir. Dünyada yaygın olarak üretilen, ekonomik önemi çok büyük olan ve genellikle F_1 melez ıslahı yöntemleriyle istenilen özelliklerin kazandırıldığı bu familyaya ait türlerde, haploidiye yönelik araştırmalar açısından yetersiz bir yaklaşım gözlenmekte ve DH teknoloji henüz bu türlerin bazıları için uygulanabilir değildir. Haploidi tekniğinin başarısı genotip, donör bitkilerin büyüme koşulları ve yaşı, polen tanesinin gelişme safhası, çiçek tomurcuğı veya anterlerin ön muameleye tabi tutulması, kültür ortamının besin kompozisyonu, kültür odası koşulları, kültür kabının özellikleri, kültüre alınan mikrosporların sayısal yoğunluğu, eksplantasyon ve anter duvarının aktivitesine bağılı olarak değişmektedir (Segui-Simarro vd 2011).

Dünya tarımında *Solanaceae* familyasının ekonomik yönden büyük önemi olmasına rağmen DH teknoloji bu familyaya ait sebze türleri için henüz etkili bir şekilde uygulanamamaktadır. *Solanaceae* familyasına ait beş ana tür arasında (biber, tütün, patates, patlıcan ve domates) yalnızca tütünde yeterli ilerleme sağlanmış ve mikrospor embriyogenesis çalışmaları için model bir sistem olarak bu türün değerlendirilmesini sağlanmıştır. Şu anda rutin olarak ve kabul edilebilen bir verimlilikte DH üretmek için tütünde anter ve mikrospor kültürü protokolleri geliştirilmiştir. Patateste ise model bir sistem olarak kabul edilemese de anter ve mikrospor kültüründen haploid indüksiyonu mevcuttur. Bu beş türden geriye kalan domates, biber ve patlıcan ise hala haploidi tekniği için inatçı türler olarak kabul edilmekte ve tanımlanmaktadır. Bazı durumlarda bu türlerde DH bitkiler elde edilmesine rağmen, sonuçlar tütünde elde edilen verimlilikten hala uzaktır. *Solanaceae* familyası içerisinde yer alan türler arasında var olan belirli bir genetik yakınlığa rağmen haploidi açısından türler arasında oldukça fark bulunmaktadır (Segui-Simarro vd 2011).

Patlıcanda haploid bitki üretimiyle sonuçlanan spontan partonogenez hiç bildirilmemiştir. Androgenesisle ilgili olarak, patlıcanda bazı genotiplerden anter kültürü yoluyla olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Anter kültüründen bitki rejenerasyonu elde edilen ilk rapor 1973'de Raina ve Iyer tarafından rapor edilmiştir. Daha sonra Chinese Research Group Haploid Breeding (1978), Isouard vd (1979), Misra vd (1983), Chambonnet (1988); Dumas de Vaultx and Chambonnet (1982) tarafından yapılan çalışmalarda haploid ve DH bireylerin üretimi rapor edilmiştir (Rotino 1996). İlk rapordan neredeyse 40 yıl sonra, patlıcanda anter kültürü çalışmaları çeşitli laboratuvar ve özel şirketler tarafından uygulanmıştır ve şu anda bazı çeşitlerden ve somatik hibritlerden saf DH ve dihaploid hatlar, anter kültüründe Dumas de Vaultx ve Chambonnet tarafından yayınlanan protokolün modifiye edilmiş versiyonu esas alınarak geliştirilmektedir. Patlıcanda anter kültürü tekniğinin uygulanmasına rağmen, bu method pratik kullanımı sınırlayıcı bir takım engeller taşımaktadır. Bunlar, anter dokularından embriyo ve somatik kallusların oluşumu, anter başına sadece birkaç tane mikrospordan elde edilen embriyo oluşumuyla sınırlı bir verimlilik elde edilmesi, kontrol edilemeyen salgıların polen kesesini saran tapetum tabakasına etkileriyle kültür koşullarına kontrolünü engellemesidir (Segui-Simarro vd 2011). Patlıcan kalın anter

duvarlarının bulunması büyüme düzenleyicilerinde içerisinde bulunduğu besi ortamı içeriklerinin anter lokusuna geçişine engel olmakta ve embriyo oluşturabilecek mikrospor oranını düşürmektedir. Ayrıca anter kültüründe anter duvarı tarafından çevrili polen kesesi içinde oluşan mikrospor embriyogenesinin ilk aşamasının çalışılmasını engellemektedir. Tüm bu sınırlamalar mikrosporların direk izolasyonu ve kültüre alınmasıyla aşılabilmektedir. Kolza, tütün ve arpada iyi kurulmuş bir protokolle izole edilmiş mikrospor kültürü ile bir anterden izole edilen mikrospordan yüzlerce embriyo elde etmek mümkündür. Bu tekniğin birçok avantajına rağmen, patlıcanda mikrospor kültürüyle ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Collonnier vd 2001).

Anter kültürü yoluyla mikrospordan androgenetik rejenerasyonun uyartılmasında mikrospor kültürüne göre birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bunlardan en belirginini; Şekil 2.2’de de görüldüğü gibi anter duvarı ya da kültüre alma esnasında anterden uzaklaştırılmamış filament parçaları gibi somatik dokuların tek başına ya da mikrospor kaynaklı kallusla birlikte rejenere olmasıdır. Böyle bir durumda ya somatik kallus hızla gelişerek mikrospor kaynaklı haploid kallus gelişimini ve rejenerasyonunu engeller ve sonuçta sadece somatik dokudan rejenerasyon meydana gelir ya da haploid ve somatik kallus birlikte rejenere olur ve miksaploid rejenerantlar ortaya çıkabilir (Bal 2002).



Şekil 2.2. Anter kültüründe farklı *in vitro* gelişim alternatiflerini gösteren diyagram (Segui-Simarro ve Nuez 2007).

Mikrospor kültürü yoluyla bu şekilde haploid bitkilerin elde edilmesinde birçok faktör etkilidir. Mikrospor kültüründen elde edilecek başarıyı etkileyen faktörlerin bir bölümü genetik olup, mikrosporların alındığı donör bitkilerin genotipine bağlıdır. Diğer bir bölümü ise, mikrospor kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki çevre koşullarıyla ilişkilidir (Çoşkun 2011). Genotip, donör bitkilerin büyüme koşulları ve yaşı, mikrosporların gelişme dönemi, çiçek tomurcuklarının, anterlerin veya mikrosporların çeşitli ön uygulamalara tabi tutulması, mikrosporların izolasyon yöntemi, kültür ortamının besin kompozisyonu, kültür ortamında mikrospor yoğunluğu, kültür odası koşulları başarıyı etkileyen önemli faktörlerdendir.

Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982), androgenik bitkiler üretmek ve patlıcan ıslah programlarında DH hatların başarılı bir şekilde entegrasyonunu sağlamak için güvenilir bir protokol oluşturmuşlardır. Bu metoda göre, uygun büyüme hormonları eklenen başlangıç C ortamına alınan anterler kültürün ilk sekiz gününde 35°C’ de

karanlıkta bekletilmişlerdir. Daha sonra petri kapları 25°C' de 16 h aydınlıkta bekletilmiştir. Bundan 13 gün sonra anterler R farklılaştırma ortamına transfer edilmiştir. Embriyolar kültür başlangıcından 1 ay sonra anterlerden görünür hale gelmiştir ve embriyo üretimi 3-4 ay sürmüştür. Gelişimlerinin devamı için 4-6 mm uzunluğunda iyi gelişen embriyolar hormon içermeyen V3 ortamında kültüre alınmıştır. Buradan elde edilen bitkicikler, *in vitro* koşullarda kolaylıkla çoğaltılmış veya toprağa transfer edilmiştir (Rotino 1996).

Karakullukçu ve Abak (1992a), dört değişik patlıcan genotipini kullanarak, bu genotiplerin anter kültürüne verdikleri yanıtları incelemiştir. Denemede Halep Karası, Adana Topağı, Birecik Yerlisi, Black Beauty çeşitleri kullanılmıştır. Anter kültürü için en uygun mikrospor gelişme dönemi olarak, daha önceki çalışmalarında belirledikleri I. polen mitozundan hemen sonraki mikrsporları içeren anterleri kültüre almışlardır. Besin ortamı olarak Chambonet (1985) tarafından önerilen ortamı kullanılmış ve ortama 5'er mg/l kinetin ve 2,4D ile %12 oranında sakaroz ilave etmişlerdir. Kültüre aldıkları anterleri ilk 8 gün karanlıkta 35°C'de ve daha sonra 12. güne kadar 25°C'de beklettikten sonra transfer ortamına şaşırtarak 25°C'deki iklim odasında inkübe etmişlerdir. Aynı besin ortamlarında kültüre aldıkları farklı çeşitlere ait anterler; kallus oluşumu, gelişme oranı ve embriyo oluşturma ile embriyoların bitkiye dönüşümü bakımından incelenmiştir. Yerli genotiplerden Halep Karası, anter kültüründe oldukça iyi performans göstermiştir. Bu çeşitten % 7.8 oranında embriyo ve % 4.4 oranında haploid bitki elde etmişlerdir. Denemede yer alan diğer çeşitlerin anterlerinden % 12.8 ile % 22.9 arasındaki oranlarda gelişme saptandığını, ancak bu anterlerden embriyo ve ya embriyo benzeri bir farklılaşma olmadığı yalnızca kallus dokusunun geliştiğini bildirmişlerdir. Böylece patlıcanda anter kültüründe genotipler arasında androgenesise verilen yanıt bakımından farklılık bulunduğunu gözlemlemişlerdir.

Karakullukçu ve Abak (1992b), patlıcanda anter kültürün yaptıkları çalışmada, farklı sıcaklık şoklarının etkilerini araştırmışlar ve bu uygulamanın anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler arasında yer aldığını belirtmişlerdir. Chambonet tarafından önerilen besin ortamlarında, uygun aşamadaki anterleri izole ederek kültüre almışlardır. Araştırmada, kültüre alınan anterlerin bir kısmını 25°C'ye, diğerlerini ise 30 °C'ye veya

35 °C'ye ayarlanan karanlık etüvlere koymuşlar ve bu sıcaklıklarda 4 ya da 8 gün süreyle bekletmişlerdir. Tüm çeşitlerde sıcaklık derecesi ve süresi arttıkça anter gelişme oranlarının da arttığı, 35 °C'de karanlıkta 8 gün süre ile tutulan anterlerdeki gelişme oranının diğer uygulamalara göre en yüksek değerleri verdiği bildirilmiştir. Ayrıca Nisan ve Haziran aylarında yaptıkları çalışmada diğer bir sonuç olarak da, verici bitkilerin yetiştirilme koşullarının anter kültürü üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, patlıcanda kısa gün ve düşük sıcaklık koşullarında yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerin hem gelişme oranlarını yaz periyodunda yetiştirilenlerden daha düşük bulduklarını hem de embriyo elde edemediklerini belirtmişlerdir.

Matsubara vd (1992), anter kültürü yöntemi ile patlıcan ve biber de polen embriyo ve kallus oluşumunu araştırdıkları çalışmalarında patlıcan çeşidi olarak Wase Shinkura, biber çeşidi olarak C. Wonder çeşidini kullanmışlardır. Her iki türde de tek çekirdekli aşamada mikrosporları içeren anterleri kültüre alan araştırmacılar, farklı konsantrasyonlarda 2,4D ve KIN MS temel besin ortamlarını kullanmışlardır. Patlıcanda yaptıkları anter kültürü çalışmalarında, 5°C, 35°C ve ilk olarak 5°C daha sonra 35°C sıcaklıkları 24 ve 48 saatlik sürelerde uygulamışlar ve ardından da 25°C'de bekletmişlerdir. Patlıcanda genel olarak 35°C'de 24 saat bekletilen uygulamada %4.9 ile en yüksek oranı saptamışlardır. En yüksek embriyo oranını 0.1 mg/l 2,4D ve 0.1 mg/l KIN içeren ortamda elde etmişlerdir. Patlıcandan elde edilen embriyoların kallusdan gelişen embriyolar olduğunu, kök ucu kromozom sayımı ile bunların 35 tanesinin haploid diğerlerinin diploid ve anöploid olduklarını belirlemişlerdir.

Karakullukçu ve Abak (1993a)'ın patlıcanda uygun tomurcuk aşamasını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 4 farklı çeşidin, 8 farklı büyüklük ve gelişme devresindeki anterler ile sitolojik incelemeler yapmışlardır. En elverişli gelişme dönemi olan birinci polen mitozundan hemen önceki devrede, tomurcuklarda taç yaprakların seviyesinin çanak yaprakların birleşme noktasında bulunduğu, anter renginin ise yeşilden yeşilimsi sarı renge dönüştüğü saptanmıştır. Bu devrede tomurcuk uzunluklarının çeşitlere bağlı olarak 22.4-24.7 mm, tomurcuk çaplarının ise 10.8-12.5 mm olduğu belirlenmiştir. Bu denemede belirlenen tomurcuk büyüklüğü esas alınarak yapılan çalışmada kullanılan 4 çeşitten sadece Baluori F₁ çeşidinden embriyo ve

bitkicikler elde edildiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada tomurcuk büyüklüğü ve morfolojik görünüm yanında anter renginin de elverişli dönemin belirlenmesinde önemli bir kriter olduğunu ifade etmişlerdir. *In vitro* kültüre alındığında hacimce genişleyip gelişme gösteren anterlerin, yeşilimsi sarı renkte oldukları; yeşil renkli anterlerin erken, sarı ve koyu sarı renkteki anterlerin ise geç dönemde bulundukları belirlenmiştir.

Karakullukçu ve Abak (1993b)'ın uygun tomurcuk aşamasını belirledikleri çalışmalarının devamı olan araştırmada, şeker ve büyüme düzenleyicilerinin etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar ilk 12 gün boyunca %12 sakkaroz uygulamasının diğerlerinden daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Aktif karbonun embriyo oluşumuna olumlu bir etkisinin gözlenmediği çalışmada, kinetin + 2,4-D kombinasyonlarının, diğer hormon kombinasyonlarına göre daha iyi cevap verdiği belirtilmiştir. Çalışmanın değişik aşamalarında 5 mg/l kinetin+ 5 mg/l 2.4D ve %12 sakkaroz kullanılan ortamlarda %12.1 (Baluroi F₁ cv.), %1.5 (Kemer cv.) ve %3.8 (Halep Karası cv.) oranlarında embriyo elde edildiği bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, direk embriyogenesis sonucu embriyoların meydana geldiği anterlerde kallus oluşmadığını göz önüne alarak kallus oluşumunun direk embriyogenesisi engellediği sonucuna varmışlardır. İlk dikim ortamında sitokinin veya oksin miktarının tek yönlü olarak artmasının kallus oluşum oranını arttırdığı, dengede olmaları halinde kallusların nispeten daha az oluştuğu gözlenmiştir.

Miyoshi (1996), 3 farklı F₁ patlıcan çeşidi kullanarak yaptığı çalışmada, patlıcanda izole edilen mikrosporların ab initio kültürlerinden morfojenik kalluslar elde edildiğini rapor etmiştir. Taç yaprakları yeşilimsi beyaz ve çanak yapraklardan daha kısa olan ve sarımsı beyaz anterleri içeren tomurcuklar toplanmış ve bunların erken çift çekirdekli ve geç tek çekirdekli mikrosporların karışık bir populasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Bu anterlerden izole edilen mikrosporlar 25- 35°C'de karanlıkta 0-6 gün inkübe edilmiştir. Kallus indüksiyonunda başlangıç kültür periyodunda yüksek sıcaklıkta sukroz açlığının etkisini araştırmak için izole edilen mikrosporların yarısı 25°C ve 35°C'de distile suda kültüre alınırken, diğer yarısı 25°C ve 35°C'de %2 sukroz içeren NLN ortamında kültüre alınmıştır. Yüksek sıcaklık ve sukroz açlığı

uygulamalarının birlikte uygulanmasının (35°'de 3 gün) izole edilen mikrosporlarda kallus oluşumu için vazgeçilmez olduğu bildirmiştir. Mikrosporlar %2 sakkaroz ve 0.5 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren NLN ortamında karanlıkta yeniden kültüre alınmıştır. Bundan 4 hafta sonra mikrospordan elde edilen küçük kalluslar 4 mg/l zeatin ve 0.2 mg/l IAA içeren MS ortamına sürgün rejenerasyonu için transfer edilmiş ve ploidy seviyesini belirlemede 12 tane rastgele seçilmiş rejenerantlardan kök uçlarında kromozom sayımı ile belirlenmiştir. Rejenerantlardan sadece birinin haploid, 7 tanesi diploid, 3 tanesi triploid ve bir tanesinin tetraploid olduğunu belirlemişlerdir.

Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz (2000), Kemer patlıcan çeşidinde tomurcuklara uygulanan soğuk şoku ve besin ortamına katılan aktif kömürün, anterlerdeki içsel absisik asit (ABA) miktarı üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada; uygulanan soğuk şokları (+ 4°C de 80 saat ve + 9°C de 9 gün) ve aktif kömürün (% 0.1, 1 ve 2), patlıcan anterlerindeki ABA miktarını azaltırken, embriyogenesise olumlu etki yapmadığını ve embriyoların sadece kontrol ortamlarından elde edildiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, anterlerdeki ABA miktarının az veya çok olmasının anter kültüründeki başarı üzerinde tek başına etkili bir faktör olmadığı da ifade edilmiştir.

Alpsoy ve Şeniz (2007)'in, yaptıkları çalışma 1994-1999 yılları arasında yürütülmüş olup, araştırmada 8 hibrit çeşit (Baluroi, Barbentane, Bellissima, Ancha, Leila, Mileda, Munica ve Purpurea), 6 standart çeşit (Pala, Kemer, Adana, Topan, Manisa ve Aydın Siyahı) ve yerli bir populasyon olan Urfa Yerlisi olmak üzere toplamda 15 patlıcan genotipi materyal olarak kullanılmıştır. Donör bitkilerin fideleri gelişme periyoduna bağlı kalınarak ya tarlaya ya da seraya dikilmiş olup, tek çekirdekli mikrosporları içeren anterlere sahip çiçek tomurcukları dikim zamanına bağlı olarak farklı dönemlerde toplanmıştır. 1994 ve 1996 yıllarında %3 sakkaroz ve farklı konsantrasyonlardaki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiş MS ortamı, 1996 ve 1998 yıllarında %12 sakkaroz ile 4 mg/l NAA ve 1 mg/l kinetin içeren MS ortamı kullanılmış olup, C ortamı ise %12 sakkaroz ve 5 mg/l 2,4D ve 5 mg/l kinetin içermektedir. Transfer ortamı olarak 0.1 mg/l kinetin ve %12 sakkaroz içeren R ortamı kullanılmıştır. Tüm ortamlara %0.7 agar ilave edilmiş olup pH 5.7 olarak ayarlanmıştır. Kültüre alınan anterler, 1994 ve 1995 yıllarında direkt olarak 25°C ve 16 h gün uzunluğunda inkübe

edilirken, 1996 ve 1998 yıllarında 35°C’de 8 gün bekletildikten sonra 25°C ve 16h gün uzunluğuna transfer edilmiştir. Anterler 4 gün daha aynı ortamlarda bekletildikten sonra 12. günde aynı sıcaklık ve gün uzunluğunda R transfer ortamına aktarılmıştır. 1994, 1995, 1996 ve 1998 yıllarında yapılan denemelerde 15 genotip içinde yalnızca 5 (Kemer, Urfa Yerlisi, Adana, Barbentane ve Leila) tanesinden haploid embriyo ve bitkicik elde edilmiştir. 1994 yılında ortalama kallus oluşum oranı %30 olmasına karşın, haploid embriyo oluşumuna rastlanılmamıştır. 1995 yılındaki denemelerde Pala, Kemer, Topan ve Aydın Siyahı çeşitleri kullanılmış olup, 4 farklı büyüme hormonu kombinasyonu kullanılarak sırasıyla kallus oluşum oranı 15.15, 20.00, 24.00 ve 26.42 % olarak belirlenmiştir. Çalışmada haploid embriyolar ve bitkicikler anterlerin ilk sekiz gün karanlıkta 35°C de bekletildiği 1996 ve 1998 yıllarında elde edilmiştir. 1996 ve 1998 yıllarında yapılan çalışmalarda hem 4 mg/l NAA ile 1mg/l kinetin ilave edilen MS ortamı hem de 5 mg/l 2,4-D ve 5 mg/l kinetin ilave edilen C ortamı kullanılmıştır. 1996 da Kemer, Baluroi ve Urfa yerlisi kullanılmış olup kallus oluşum oranları %5.56 ve %49.98 arasında değişmiştir. Ayrıca Kemer çeşidi ve Urfa yerlisi popülasyonunda haploid embriyo ve bitkicik elde edilmiştir. Kemer çeşidin de, embriyoların C ve MS ortamlarında oluşum oranı sırasıyla %3.67 ve 2.05, Urfa yerlisinde ise 4.91 ve 1.84 olarak belirtilmiştir. 1998 kurulan denemelerde de embriyolar elde edilmiş olup, Adana çeşidinde MS ortamında %1.58, Barbentane çeşidinde C ve MS ortamlarında sırasıyla %2.72 ve 2.63, Leila çeşidinde ise C ortamında 2.43% olarak belirtilmiştir. Sonuçta bu embriyolardan bitkicik eldesi gerçekleştirilmiştir.

Bal vd (2009) tütünde mikrospor embriyogenezi başlatmak için kullanılan protokolü modifiye ederek patlıcanda test etmişlerdir. Tütünde, tek çekirdekli mikrosporlar 33°C’de mannitol içeren B ortamında 6 gün kültüre alınarak stres uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Mikrosporlar, sonra daha da gelişmeleri için maltoz içeren AT3 ortamına transfer edilmiştir. Burada yapılan denemelerde Bambino patlıcan çeşidinde geç tek çekirdekli ve çift çekirdekli mikrosporlar B ortamında ön kültüre alınmış ve ardından sırasıyla +4°C, 25°C ve 33°C’de iki gün boyunca inkübe edilmişlerdir. Ön uygulamadan sonra, mikrosporlar 0.25 M maltoz içeren AT3 ortamına transfer edilmiş ve 25°C karanlıkta bekletilmiştir. Simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapıların varlığı bir ve iki hafta sonra çekirdek boyası DAPI ile kontrol edilmiştir.

Çekirdeklerde simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapılar yalnızca 32°C’de 2 gün ön uygulama yapılan çekirdekli mikrosporlarda gözlemlenmiştir. Bu koşullar altında çok çekirdekli yapıların sıklığı % 19.4 olarak tespit edilmiştir. Patlıcanda simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapıların oluşumunda modifiye edilmiş tütün protokolünün etkili olduğunu belirlenmiştir. Bu patlıcanda tütün sisteminin tamamıyla uyum için bir temel olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Başay vd (2010) yaptıkları çalışmada; yaz döneminde Yalova koşullarında serada yetiştirilen Topan-374, Aydın Siyahı, Halep Karası yerli patlıcan çeşitleri ile Teorem F₁, Bonica F₁, Munica F₁ hibritleri ve ayrıca *S. torvum* ile *S. sodomium* yabancı türlerinden temin edilen uygun aşamadaki tomurcuklara anter kültürü uygulamışlardır. Dumas de Valux ve ark. (1982)’nın önerdiği C (callus) ve R (regeneration) ortam bileşimleri denemelerde kullanılan besin ortamı olmuştur. Anterler, inkübasyon için Karakullukçu (1991)’ya göre önce 35°C’deki etüvde ilk 8 gün boyunca karanlıkta tutularak, daha sonra ise 25°C sıcaklık ve 16 saat gün uzunluğuna ayarlanmış iklim dolabına alınmışlardır. Bu ortamda 4 gün daha bekletilen anterler, 12. günden sonra transfer (R) ortamına aktarılmışlardır. Anterler bundan sonra iklim dolabında 25°C sıcaklık ve 16 saat gün uzunluğunda gelişmeye bırakılmışlardır. Anterler, kültür ortamında gelişmeye bırakıldıklarında, gelişme olarak kabul edilen olgu; anterlerin kültür ortamına alındıktan sonra şişerek farklılaşmaları veya bozulma, kuruma olmaksızın canlılıklarını sürdürmeleridir. Kuruyan, büzüşen ve kararan anterler ise gelişmeyen anterler olarak nitelendirilmiştir. Bu bağlamda en düşük anter gelişimi % 38.4 oranı ile *S.sodomium* yabancı türünde tespit edilirken, en yüksek anter gelişim oranı % 91.4 ile Bonica F₁ çeşidinde belirlenmiştir. Dikim yapılan çeşitler ve türlerde belli miktarlarda kallus oluşumu görülmüştür, en düşük kallus oluşumu % 10.6 oranı ile *S.torvum* yabancı türünde, en yüksek kallus oluşum oranı ise % 30.8 ile Teorem F₁ çeşidinde izlenmiştir. Anter kültüründe doğrudan embriyo oluşumu gerçekleşebildiği gibi bazen kallus oluşumunun ardından embriyo oluşumu da meydana gelebilmektedir. Teorem F₁ çeşidi ile *S. torvum* ve *S. sodomium* yabancı türlerinde kallus oluşumunun ardından embriyo oluşumu sağlanamamıştır. Denemede en düşük embriyo oluşumu %1.25 oranı ile Aydın Siyahı çeşidinden, en yüksek embriyo oluşumu % 14.2 oranı ile Bonica F₁ çeşidinden elde edilmiştir. Bonica F₁ çeşidi %14.29 oranında bitki

oluşumuyla en yüksek performansı göstermiştir. Bu çalışmada ayrıca; Ankara koşullarında önceki yıllarda çok sayıda denemede yer alan ve embriyo oluşumu hiç sağlanamamış olan Aydın Siyahı çeşidinden Yalova ekolojisinde %1.25 oranında da olsa ilk kez haploid bitki elde edilmiş olması; genotip etkisinin yanı sıra donör bitkinin yetiştirme koşullarının, anter kültüründen alınan sonucu etkileyen önemli bir faktör olduğunu göstermiş olmasıdır.

Ellialtınoğlu vd (2012b), bitkisel materyal olarak Kemer ve Aydın Siyahı patlıcan çeşitlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, farklı dönemlerde yetiştirilen bitkilerden alınan anterleri kültüre almışlar ve aynı zamanda mikrosporları da yapısal olarak incelemişlerdir. Bu çeşitlerde S-polen varlığı ile haploid embriyo oluşumu arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Anter dikimi tamamlanan petri kutuları karanlıkta 35°C’de yüksek sıcaklık şokuna tabi tutulmuş, 8 gün bu koşullarda bekletildikten sonra 12. günün sonunda kadar 25°C’de sıcaklık ve 16 saatlik fotoperiyodik düzene ayarlanmış iklim odasına alınmışlardır. “DDV-C” ortamı üzerinde 12 günlük süresini tamamlayan anterler şaşırtma ortamı olan “DDV-R” ortamına transfer edilmiş, bu kültürler 3 ay boyunca 25°C sıcaklık ve 16/8 saatlik fotoperiyodik düzende inkübe edilmişlerdir. Ayrıca anter kültürü için tomurcukların toplandığı günlerde eşzamanlı olarak anthesis dönemindeki çiçeklerden olgun polenler toplanmış ve bunlar S polen sayımı için %2’lik asetokarmin ile boyanmıştır. Boyanan polenler açık ve koyu renkte olma durumuna göre S poleni veya G poleni olarak nitelendirilmiştir. İlk kez yaz periyodunda Ankara koşullarında açık arazide, bir kez de sonbahar döneminde ısıtılmayan cam serada yetiştirilen patlıcan bitkilerinden alınan anterler kullanılarak yapılan anter kültürü denemelerinde sadece Kemer çeşidinde *in vitro* haploid embriyo oluşumu elde edilebilmiştir. Aydın Siyahı patlıcan çeşidinde embriyo oluşumu sağlanamamıştır. Kemer çeşidinde ise sadece yaz periyodunda yetiştirilen bitkiler kullanıldığında farklı iki yıl % 6.6 ve % 4.5 oranlarında embriyo oluşumu elde edilmiştir. Aydın Siyahı patlıcan çeşidinin, Kemer çeşidine göre daha fazla S poleni bulundurduğu görülmüştür. Ancak S polen varlığı daha az bulunan Kemer çeşidinde haploid embriyo oluşturma oranı daha yüksek bulunmuştur. Böylece, S poleni frekansının yüksek olmasının embriyo veriminin artırılması için yeterli olmayabileceği belirtilmiştir.

2.2. Ovaryum Ko-kültür

Kohler ve Wenzel (1985), arpada mikrospor kültür ortamında ovaryumların belirli bir süre tutulmasının, kallus oluşumu ve rejenerasyon üzerine olan etkisini incelemişler ve ortamda 10 adet ovaryumun 7 gün süreyle bulundurulmasının mikrospor embriyogenesis üzerine olumlu etkilerini bildirmişlerdir. Araştırmacılara göre, ovaryum ko-kültür esnasında büyümeyi uyarıcı bileşikler ortama salınmış ve salgılanan bu maddeler mikrosporlarda bölünme, kallustan rejenerasyon ve bitki oluşumunu teşvik etmiştir. Kültür ortamında bulunan ve ovaryumdan salgılandığı kabul edilen faktörler incelendiğinde düşük molekül ağırlıklı ve biyolojik özellikleri dolayısıyla bunların hormonal özellikte olabileceği ifade edilmiştir.

Ovaryumların kimyasal etkisi tam olarak bilinmemesine karşın, Hu ve Kasha (1997) ovaryumlardan fenil asetik asit (PAA) veya onun analogları gibi bir oksinin salgılandığını bildirmiştir. Fenil asetik asitin (PAA) oksin benzeri aktivitesi ilk olarak Haagen-Smit ve Went (1935) ve Zimmerman ve Wilcoxon (1935) tarafından 1930'ların ortalarında tanımlanmıştır. PAA, IAA ile aynı biyolojik etkiyi göstermiş fakat IAA ya göre çok daha yüksek konsantrasyonlarda aktif olduğu görülmüştür. Wigthman ve Lighty (1982) ayrıca altı farklı bitkiden alınan bitki özütlerinde PAA'ı belirlemiş ve yabani yulaf koleoptil analizinde PAA'ın oksin aktivitesini göstermişlerdir. İncelenen bitkilerde PAA, IAA dan 4-6 kez daha fazla konsantrasyonda meydana gelmiş olup, PAA' nın morforegulator etkisinin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca enzimatik aktivite ve ifadedeki etkileri araştırılmış ve yapılan çalışmalarda PAA' in oksinlerin taşınmasını düzenlemede rol oynadığı da ispatlanmıştır. Leuba ve ark. (1989)'da PAA nın doku kültürü ortamında stabil olduğunu bildirmişlerdir (Leuba ve LeTourneau 1990).

Hu ve Kasha (1997), buğdaya mikrospor kültüründe; ovaryum ilave edilen ortamların, ilave edilmemiş ortamlara göre embriyogenesisi arttırdığını belirtmişlerdir. Denemelerde 'Chris', 'Sinton', 'Marquis', 'Veery'S' ve 'Ciano' olmak üzere beş farklı yazlık buğday çeşidi ve dört F₁ genotipi kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda üç farklı kültür ortamı ve farklı oranlarda PAA (2 mg/l ve 4 mg/l)'in etkilerini incelemişlerdir. Kültür ortamına eklenen ovaryumlar hem soğuk ön işlem (+4°C'de 1 hafta

buzdolabında) hem de ön işleme tabi tutulmadan doğrudan kullanılmıştır. Ovaryumlar kültür ortamlarında, farklı sayıda (10-20) ve farklı sürelerde (7, 14, 21 ve 30 gün) bekletilerek etkileri karşılaştırılmıştır. Kültür ortamı olarak, 2 mg/l PAA bulunan kültür ortamı buğday mikrospor kültürüne en iyi cevap veren ortam olarak belirtilmiştir. Embriyogenesisde meydana gelen artışı ise ortamda bulunan fenil asetik asit (PAA) veya analoglarına bağlı olarak gerçekleştiğini ve bunların ovaryum tarafından salgılandığını bildirmişlerdir. Ayrıca ortama dışarıdan ilave edilen 4 mg/l PAA'nın buğdayda ovaryum ko-kültürü ile aynı etkiyi gösterdiğini bildirmişlerdir. Kültür ortamına eklenen ovaryumların, soğuk önışlem uygulanmış veya taze olması arasında önemli bir fark görülmemiştir. Petri başına 20 adet ovaryumun eklenmesinin diğer uygulamalara göre daha yüksek sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Bekletme süreleri incelendiğinde ise, 21 günden sonraki petri kaplarında embriyo oluşumunun diğer sürelerle göre çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

De Buyser ve Piccard (1997), buğdayda anter kültüründe pozitif etkiye sahip olduğunu işaret ettiklerini belirterek anter kültürüne duyarlı olan bazı makarnalık buğday çeşitlerinde sorunu çözmeye yönelik olarak, kültür ortamında ovaryumların iyileştirici etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda özellikle anter kültürüne tepki vermeyen buğday çeşitlerinde, ovaryum ko-kültürün yararlı etkisini ortaya çıkarmışlardır.

J'Aiti vd (1999), bazı makarnalık buğday çeşitlerinde ovaryum ko-kültürünün anter kültürü üzerine etkilerini araştırmışlardır. Ovaryumların ortam koşullarına yararlı etkisinin, ovaryum tarafından kültür ortamına salınan maddelerin anterler üzerine olumlu etkisinin olmasıyla açıklamışlardır.

Li ve Devaux (2001), arpada mikrospor kültüründe embriyo ve bitki regenerasyonu oluşumunda ovaryumların etkisini araştırmışlardır. 0.3 M mannitol, 0.3 M mannitol + 10 mM CaCl₂ ve B ortamı kullanılarak üç farklı önışlem uygulamış ve 4 gün bekletildikten sonra, mikrosporlar izole edilmiştir. Mikrosporlar, FW1B sıvı ortamında 26°C'de 7-8 gün inkübasyona alınmış ve inkübasyon ortamına farklı sayı (0-20) ve sürelerde (0, 10, 20, 30 ve 40 gün) ovaryumlar konulmuştur. B ortamının

mikrospor embriyogenesisinde en iyi sonucu verdiği görölmüştür. Ovaryum kullanılan denemelerde, 5 adet ovaryum ve 20 gün kültür ortamında tutulan ovaryumlardan embriyo oluşumu ve bitki regenerasyonunda en iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Zheng vd (2002), buğdayda mikrospor kültüründe, kültür ortamına ilave edilen ovaryumların mikrospor embriyogenesis üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada ovaryumların kültür ortamındaki etkisini, kültür ortamındaki bulunma sürelerini ve yoğunluklarını ve taze ovaryum ile kültüre alınmış ovaryumların doubled haploid bitki üretimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Anterlerden izole edilen mikrosporlar kültür ortamına hem taze ovaryumlar hem de NPB-99 ortamında kültüre alınmış ovaryumlar ile birlikte konulmuştur. Ovaryumların kültür ortamındaki süreleri (4, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 37 ve 40 gün) ve yoğunlukları (2, 5, 10, 15, 20 ve 30 adet) karşılaştırılmıştır. Mikrospor kültür tekniğine cevap verebilen genotiplerden izole edilen mikrosporlarda, taze ovaryumlar kullanılarak elde edilen androgenik embriyo miktarında artmaş olmasına rağmen, aynı koşullarda tekniğe dirençli genotiplerde bu başarı elde edilememiştir. 7 ve 10 gün süreyle ovaryumlarla kültüre alınan mikrospordan en fazla embriyo miktarı elde edilmiştir. Mikrospor kültür tekniğine cevap verebilen genotiplerde mikrospor embriyogenesisini artırmak için ortama taze ovaryum eklenmesi yararlı olmuştur.

Patel vd (2004), arpa ve buğdayda mikrospor kültür tekniğı ile embriyo oluşumu ve yeşil bitki regenerasyonunu arttırmaya yönelik çalışmalar yapmışlardır. Araştırmacılar mikrospor kültüründe androgenesis de doğal olarak meydana gelen bitki hormonu PAA'nın yararlı etkilerini bildirerek, PAA'nın gametofitlerden elde edilen eksplantlarla aynı tarz iyileştirici rol oynadığını ifade etmişlerdir. En uygun ortam ve hormon kombinasyonlarını araştırırken; araştırmaların ilk serisinde, kültür ortamları, büyüme regülatörleri ve kültür ortamına ovaryum eklenmesi ile oluşan embriyo ve bitki regenerasyonu oranları karşılaştırmışlar ve ovaryum ko-kültürün PAA gibi etkilerini incelemişlerdir. İki çeşit kültür ortamı (CHB ve MC17) ve dört farklı bitki büyüme düzenleyici (1 mg/l PAA, 2 mg/l PAA, 4 mg/l PAA ve 0.5 mg/l 2,4-D) kullandıkları denemelerde; hem ovaryum eklenerek hem de ovaryum yokluğunda elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, CHB kültür ortamı ve 0.5 mg/l 2,4-D bitki

büyüme düzenleyicisi ilave edilmiş besin ortamında en iyi embriyo ve yeşil bitki regenerasyonu elde edilmiştir. Ovaryum eklenmeyen ortamlarda ise embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Böylece, Patel vd (2004), ilk denemelerden elde edilen verilerle; Hu ve Kahsa (1997), Mejza vd (1993), Patel vd (1994), Liu vd (2002) tarafından rapor edildiği gibi, buğdayda başarılı bir mikrospor kültürü için ovaryum ko-kültürün kritik olduğunu ortaya koymuşlardır. Biyokimyasal karakterizasyonlarla, ovaryumdan elde edilen iyileştirme faktörlerinin oksin gibi davrandığını bildirmişlerdir. Böylece doğal bir oksin olan PAA'nın gametofitlerden elde edilen iyileştirme faktörü için kullanışlı bir yardımcı olabileceği düşünülmüş ve özellikle buğday ve arpada başarılı bir mikrospor kültürü için ovaryum ko-kültür uygulanmasının bir ön koşul olduğu belirtilmiştir.

Letarte vd (2006), buğdayda mikrospor kültürü tekniğinde kültür ortamına eklenen Larcol ve arabinogalaktan-proteinlerinin (AGP) embriyo oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. 0.4 M mannitolde, 7 gün, 4°C'de, karanlıkta önışleme tabi tutulan başaklardan izole edilen mikrosporlar, MMS4 (MS + 2 g/l PAA, 0.5 mg/l kinetin, 90 g/l maltoz, 355 mg/l U2.5 amino asit karışımı ve 975 mg/l glutamin) kültür ortamına alınmıştır. Ayrıca kültür ortamına çeşitli konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 50 ve 100 mg/l) Larcol ve AGP ve 1 hafta 4°C'de saklanmış 8 tane ovaryum da eklenmiştir. Ovaryum ve 10, 25 ve 50 mg/l Larcol bulunan ortamlarda, her iki çeşitte de yüksek oranda embriyo oluşturmuştur. Ortama ilave edilen AGP'nin ise, mikrosporların embriyo oluşumunu ve yeşil bitki regenerasyonunu artırdığı belirtilmiştir. En fazla yeşil bitki oluşumu, 10 mg/l AGP kullanılan ortamlarda elde edilirken, 10 mg/l Larcol ile 1 mg/l AGP kullanılan ortamlardan elde edilen yeşil bitki sayısı eşit olduğu görülmüştür. Ayrıca, buğday ovaryumları tarafından arabinogalaktan proteinlerinin salgılandığını düşündüklerini bildirmişlerdir.

Broughton (2008), değişik buğday çeşitlerinde ovaryum ko-kültür kullanarak basit bir anter kültürü protokolü geliştirmiş ve başlangıç ortamına ovaryumların eklenmesinin embriyo benzeri dokuların, yeşil ve albino bitkilerin üretimini önemli bir şekilde artırdığını tespit etmiştir. Başlangıç ortamına 5 ovaryum eklendiği zaman, her bir buğday başağı için embriyo benzeri dokuların ortalama sayısının 7.6 dan 501'e ve yeşil bitki sayısı ise 0.6'dan 8.9'a yükseldiğini bildirmiştir.

Lantos vd (2009), biberde mikrospor kültüründe; ayrı ayrı biber ovaryumları, buğday ovaryumları ve ovaryum bulunmayan ortamların embriyogenesis üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada 3 tane Macar ('Szegedi 80', 'Szegedi 178' ve 'Reme'ny') ve 3 tane İspanyol ('Jeromin', 'Jariza' ve 'Jaranda') çeşit kullanılarak, çiçek tomurcukları tetrat, geç tek çekirdekli aşama, %80 geç tek çekirdekli ve %20 erken çift çekirdekli ve polen tanecikleri olmak üzere 4 farklı gelişim aşamasına ait çiçek tomurcuklarını toplamışlardır. Mikrospor kültüründe başarıda en yüksek veri, %80 geç tek çekirdekli ve %20 erken çift çekirdekli gelişim aşamadaki mikrosporları içeren anterlerden elde edilmiştir. Tomurcuklardan çıkarılan anterler, 5 ml 3 M mannitol solüsyonu ve 200 mg/l cefotaxime içeren petri kaplarında 32°C'de 7 gün karanlıkta ön uygulamaya tabi tutulmuştur. İzolasyonu gerçekleştirilen mikrosporlar %9 maltoz, 1,000 mg/l glutamin, 0.5 mg/l kinetin, 0.5 mg/l 2,4D ve 200 mg/l cefotaxime içeren W14 ortamında kültüre alınmıştır. Mikrospor süspansiyonunun konsantrasyonu mililitrede 3×10^4 mikrospor olacak şekilde ayarlanmıştır. Ovaryum ko-kültür çalışmalarında 'CY-45' buğday çeşidi kullanılmış ve başakları tozlanmadan 2 gün önce toplanmış ve 7 adet ovaryum, biberden izole edilen mikrosporların bulunduğu petri kaplarına ilave edilmiştir. Buğday veya biber ovaryumları bulunan ortamlarda, mikrospor duvarlarından meydana gelen çok hücreli koloniler kültürün ikinci haftasında gözlemlenmiş ancak ovaryum bulunmayan ortamlarda herhangi bir koloni oluşumu tespit edilmemiştir. Biber ovaryumlarının bulunduğu ortamda çoklu hücre doku gelişimi kültürün üçüncü haftasında durmasına rağmen, buğday ovaryumlarının bulunduğu ortamda gelişim devam etmiş ve 5-6 hafta sonra iyi gelişmiş embriyolar gözlemlenmiştir. Böylece androgenesis geliştirmek için monokotlarda kullanılan ovaryum ko-kültürün dikotiledon bitkilerde ilk kez kullanımı rapor edilmiştir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak patlıcan ve buğday kullanılmıştır. Patlıcan için gerekli bitki materyali Gento Tohumculuk firması tarafından temin edilen seralarda g z ve bahar döneminde yetiştirilen patlıcan bitkilerinden sağlanmıştır. Patlıcan  eşidi olarak “Faselis F₁”, “Aydın Siyahı (standart çeşit)” ve “Amadeo F₁”  eşitleri kullanılmıştır. Ovaryum ko-kültür için ise “Panda” buğday çeşidi kullanılmıştır. Buğday bitkisinin ovaryumları için Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalına ait tarlada ve Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’na ait serada saksılarda yetiştiricilik yapılmıştır.



şekil 3.1. Faselis F₁ (a), Aydın siyahı (b) ve Amadeo (c) patlıcan çeşitlerinden bir görünüm

3.2. Metot

3.2.1. Sitolojik çalışmalar

3.2.1.1. Çiçek tomurcuklarının gruplandırılması

Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki elde etmek için ilk olarak sitolojik gözlemlerle tek çekirdekli mikrosporları bulunduran tomurcuklar seçilmelidir. Tomurcuk büyüklüğü ve morfolojik görünümüleri çeşitler, yetiştirme koşulları ve bitki yaşına göre değişiklik gösterebileceğinden dolayı, farklı genotiplerde tomurcuk ve anterlerde kesin bir sınıflandırma yapmak her zaman kolay olamamaktadır. Bundan dolayı çalışmamızda tek çekirdekli mikrosporları bulunduran tomurcukları seçebilmek için, her bir genotip için minimum ve maksimum tomurcuk uzunluğu digital kumpasla belirlendikten sonra, tomurcuk uzunluğuna göre 7 farklı gruba ayrılmıştır. Ayrıca aynı uzunlukta tomurcukların farklı morfolojik görünüme sahip olmasından dolayı sınıflandırmada Karakullukçu ve Abak (1993a)'ın kullandıkları, anter kültüründe elverişli tomurcuk döneminin belirlenmesi amacıyla yapılan sınıflandırmadaki morfolojik özelliklerden de yararlanılmıştır.

3.2.1.2. Uygun tomurcuk safhasının belirlenmesi

Mikrospor kültürü çalışmalarında uygun tomurcuk safhasını belirlemek için morfolojik şekillerine ve büyüklüklerine göre sınıflandırılan tomurcukların anterlerdeki mikrospor oluşum aşamalarını belirlemek amacıyla Samancı vd (1998)'nin kullandıkları, son zamanlarda bazı sitoloji çalışmalarında hem canlı hem de fikse edilmiş materyallerdeki kullanım kolaylığı ve hızlı sonuçlar vermesi nedeniyle DNA florkrom boyama yöntemlerinden biri olan Ethidium Bromide (EtBr) ile boyama metodundan yararlanılmıştır. Ethidium Bromide'in saf suyla hazırlandığı % 0.1 lik stok solüsyonu kullanılmıştır. Farklı büyüklükteki canlı tomurcuklardan alınan anterler lamlar üzerine yerleştirilerek, toplu iğne yardımıyla mikrosporlar serbest hale getirildikten sonra üzerine bir iki damla EtBr çözeltisinden damlatılarak floresan mikroskopunda gözlemler yapılmıştır.

Ayrıca buğday ovaryumlarının kültür için uygun olduğu aşama geç tek çekirdekli mikrosporları içeren başaklar olarak belirlenmiştir. Bu aşamadaki mikrosporları içeren anterlerin bulunduğu başaklardan ovaryumlar çıkarılarak ortama alınmıştır (Hu ve Kasha 1997). Bu amaçla sitolojik inceleme için başağın orta kısmındaki çiçeklerden alınan anterler, üzerine bir damla etidyum bromid damlatılmış lam üzerinde hafif parçalandıktan sonra üzerine lamel kapatılmış ve hazırlanan preparat mikroskop altında incelenmiştir (Özü 2006).

3.2.2. Mikrospor Kültür Aşamaları

3.2.2.1. Tomurcukların ve başakların sterilizasyonu

Steril kabin içerisinde patlıcan tomurcuklarının sterilizasyonu için, tomurcuklar bir iki damla Tween 20 damlatılan %10 ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 10 dakika bekletilmiş ve ardından 5 kez ve her seferde birer dakika olmak üzere steril distile su ile durulanmıştır (Miyoshi 1996). Buğday ovaryumlarının alınacağı başaklar ise önce % 96'lık alkol ile 1 dakika çalkalanmış, daha sonra yüzey gerilimini azaltmak için, içine birkaç damla Tween 20 ilave edilmiş olan, % 10'luk sodyum hypoklorit çözeltisi içinde 15 dakika süre ile çalkalanarak sterilize edilmişlerdir. Bu işlemlerden sonra basaklar 4 kez steril destile su ile yıkanmıştır (Özü 2006).

3.2.2.2. Anterlere yapılan ön uygulamalar

Çalışmamızda, patlıcanda yapılan anter kültürü çalışmalarında olumlu etkisi olduğu bildirilen ilk sekiz günlük sürede 35°C (Karakullukçu ve Abak 1992b, Matsubara vd 1992) sıcaklık ön uygulaması ve şeker açlığı olarak adlandırılan mannitol ön uygulaması beraber uygulanmıştır. Sterilizasyonu tamamlanan tomurcuklardan izole edilen anterler, filtre ile sterilizasyonu yapılmış Lantos vd (2009) 5 ml 0.3M mannitol solüsyonu içeren 60 mm çapındaki petri kaplarına aktarılmış ve 35°C'de ilk sekiz gün karanlıkta inkübe edilmiştir (Lantos vd 2009).

3.2.2.3. Mikrosporların izolasyonu

Mikrosporların anterlerden izole edilmesi ve kültüre alınmasında kültür ortamı olarak, *Brassica* türlerinde ve *Solanum melongena*'da (Miyoshi 1996) olumlu sonuçlar verdiği bildirilen, Nitsch&Nitsch (1967) tarafından geliştirilen ve Lichter (1981, 1982) tarafından mikrospor kültürü için modifiye edilen NLN ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.1) (Bal 2002).

Mannitollü ön uygulama ortamından alınan tomurcuklardan her izolasyonda 20 adet tomurcuk kullanılmıştır. Tomurcuklar, filtre ile sterilizasyonu (Şekil 3.2) yapılmış %9 maltoz içeren (Lantos vd 2009) ve büyüme düzenleyicisi içermeyen, pH'sı 6.5 olan NLN ortamı içerisinde bir cam baget yardımıyla ezilerek mikrosporların serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra elde edilen mikrospor 40 µm'lik elekten geçirilmiştir (Şekil 3.3). Bu işlem sonunda parçalanmış anterlerden kaynaklanan somatik dokular elekte kalmış ve mikrosporların çok büyük bir bölümü izolasyon ortamı içerisinde süspansiyon oluşturacak şekilde alttaki beherde toplamıştır. Mikrosporların izolasyonu esnasında somatik dokuların parçalanmasından dolayı ortama salınan ve mikrospora zarar verebilecek olan fenolik maddelerin bu süspansiyondan uzaklaştırılması amacıyla mikrospor süspansiyonları santrifüj tüplerine alınıp mikrosporların çökmesini sağlamak üzere 1000 devir/dakika da 3 dakika süreyle santrifüjleme işlemine tabi tutulmuştur. Her seferinde izolasyon ortamı ve mikrosporların safiyeti yükselmiş ve üçüncü yıkama sonrasında mikrosporlar kültür ortamına alınmıştır.

Çizelge 3.1. Mikrospor izolasyonu ve kültüre alınmasında kullanılan sıvı NLN ortamının bileşimi

Bileşik	Miktar (mg/l)
Makro Elementler	
KH_2PO_4	125
KNO_3	125
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125
Mikro Elementler	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
H_3BO_3	10.00
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	18.95
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.00
FeNaEDTA	36.70
Vitaminler	
L-Serine	100.00
Myo-inostol	100.00
L-Glutamine	800.00
Glutathione reduced	30.00
Nitotink asit	5.00
Glycine	2.00
Folik asit	0.50
Pyrodoksin-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.50
D (+) - Biotin	0.05



Şekil 3.2. Steril kabin içinde besi ortamının sterilizasyonunun yapılışı

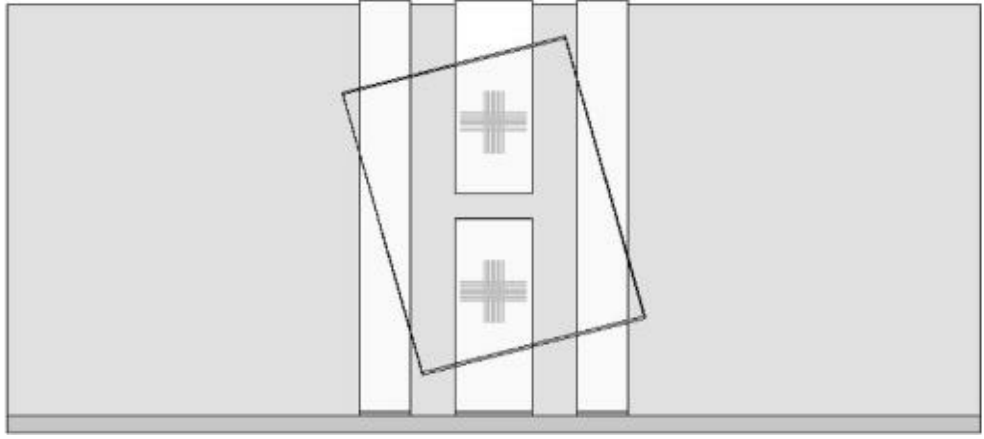


Şekil 3.3. Mikrospor süspansiyonunun süzülmesinde kullanılan elek sistemi

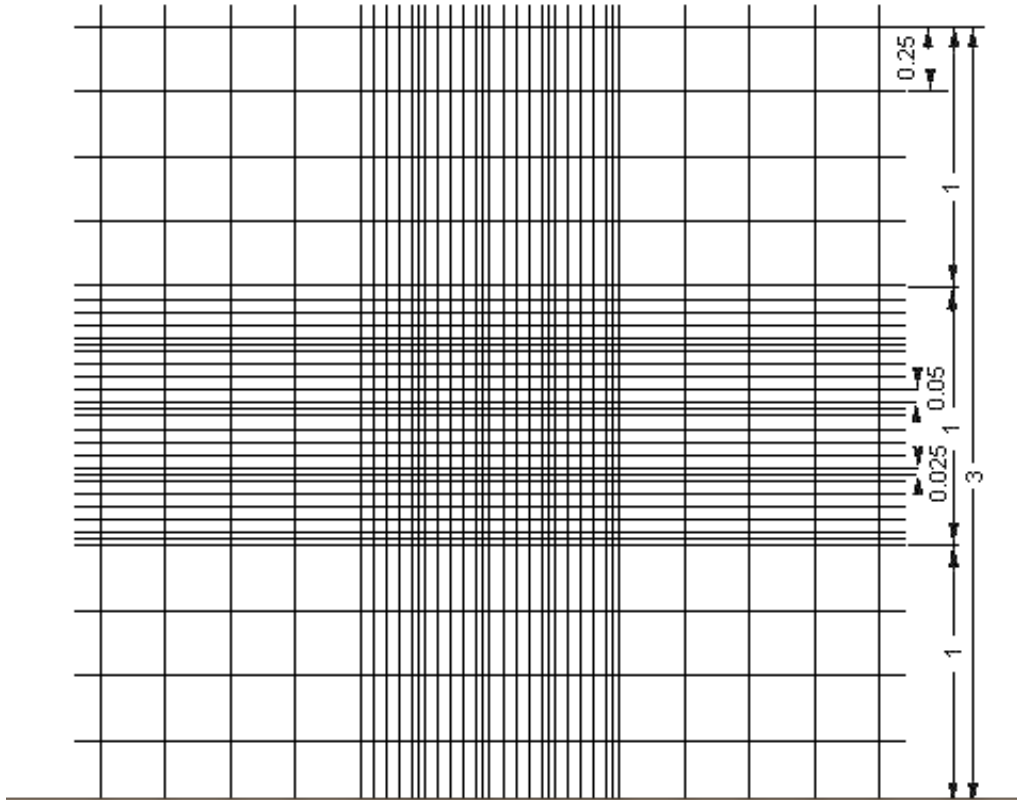
3.2.2.4. Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi

Mikrosporların belirli yoğunlukta kültüre alınmaları gerekmektedir. Bu amaçla son santrifüjleme (yıkama) işleminden sonra kültür ortamına alınan mikrosporların yoğunluğu patlıcan da daha önce mikrospor kültüründe bildirilen 2×10^5 adet olacak şekilde ayarlanmıştır (Bal vd 2009). Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesinde thoma lamında sayım yapılmıştır. Bu amaçla santrifüj tüpünde bulunan mikrospor süspansiyonundan bir damla alınmış ve thoma lamında sayım yapılarak mikrospor yoğunluğu belirlenmiştir.

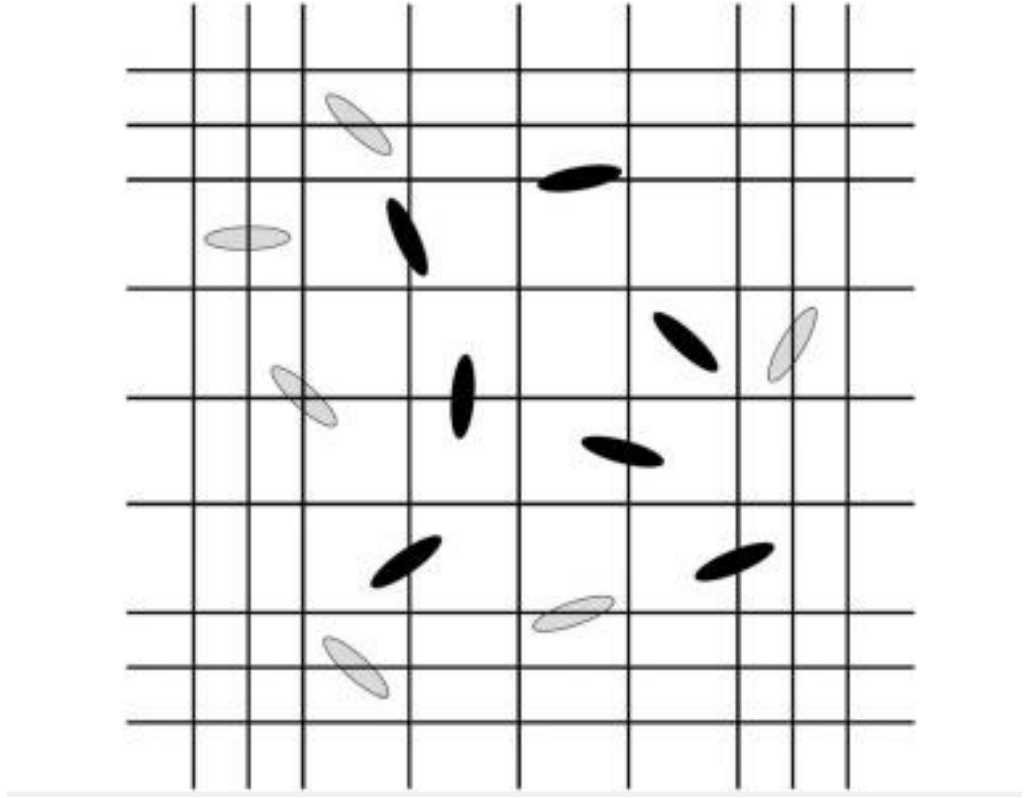
Thoma lamının esası 0.1 mm^3 hacimde sayım yapılmasıdır. Thoma lamının şematik çizimi Şekil 3.4’de verilmiştir. Thoma lamının üzerinde çukur bir kısım vardır. Kültür buraya aktarılır üzerine lamel kapatıldığında bu çukurda 0.1 mm yüksekliğinde bir sıvı kalır. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir (Şekil 3.5). Thoma lamında 16 büyük kare, her bir büyük karede ise 25 adet küçük kare olmak üzere toplam 400 adet küçük kare bulunmaktadır. Sayım bu karelerde yapılır. Bir küçük karenin kenarları $1/20 \text{ mm}$ (0.05 mm) olup derinliği $1/10 \text{ mm}$ (0.1 mm)’dir. Buna göre; bir küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi $= 0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.00025 \text{ mm}^3 = 1/4000 \text{ mm}^3$ ’dür. Bir sayım alanında $16 \times 25 = 400$ küçük kare olduğuna göre toplam sayım alanının hacmi $= 400 \times 0.00025 \text{ mm}^3 = 0.1 \text{ mm}^3$ olmaktadır (Tuncer 2010).



Şekil 3.4. Thoma lamının şematik çizimi



Şekil 3.5. Thoma lamında sayım yapılan kareler



Şekil 3.6. Sayıma alınan hücrelerin şematik görünümü

Şekil 3.6’da sayıma alınan hücrelerin şematik görünümü verilmiştir. Mikroskop altında sayım yapılırken, küçük karelerin üst ve sağ taraflarındaki kare çizgilerine teğet olan veya çizgileri kesen hücreler sayıma alınır (siyah hücreler), fakat küçük karelerin alt ve sol tarafındaki kare çizgilerine teğet veya çizgileri kesen hücreler (gri hücreler) sayıma alınmaz.

Thoma lamı ile sayım sonucu $A \times 10.000$ formülü ile hesaplanır. Burada $A = 16$ büyük karede sayılan mikrospor sayısı adedidir. 10.000 ise 0.1 mm^3 ’deki sayım sonucu 1 ml’deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir (Gürgün ve Halkman 1990). Derinliği belli ve genellikle 0.1 mm olan lam çukurda bulunan ve en $\times$ boy $\times$ derinlik kombinasyonunun belirlediği hacimde (0.1 mm^3) bulunan mikrospor sayısı belirlenmiş ve çaprazlama 8 büyük kare sayılıp sonuç 2 ile çarpılarak 0.1 mm^3 ’deki değer bulunmuştur. Toplam 16 büyük karede sayılan mikrospor sayısı 10.000 ile çarpılarak 1 ml’de bulunan mikrospor sayısı belirlenmiştir. Bu sayım sonucundan hareketle örneğin alındığı hacimdeki mikrospor sayısına

ulaşılmıştır (Tuncer 2010). Bu amaçla denemelerimizde, son santrifüjleme işleminden sonra oluşan mikrospor çökeltisi, taze NLN ortamıyla ml'de 2×10^5 mikrospor içerecek şekilde yeniden süspansiyon haline getirilerek mikrospor yoğunluğu ayarlanmıştır.

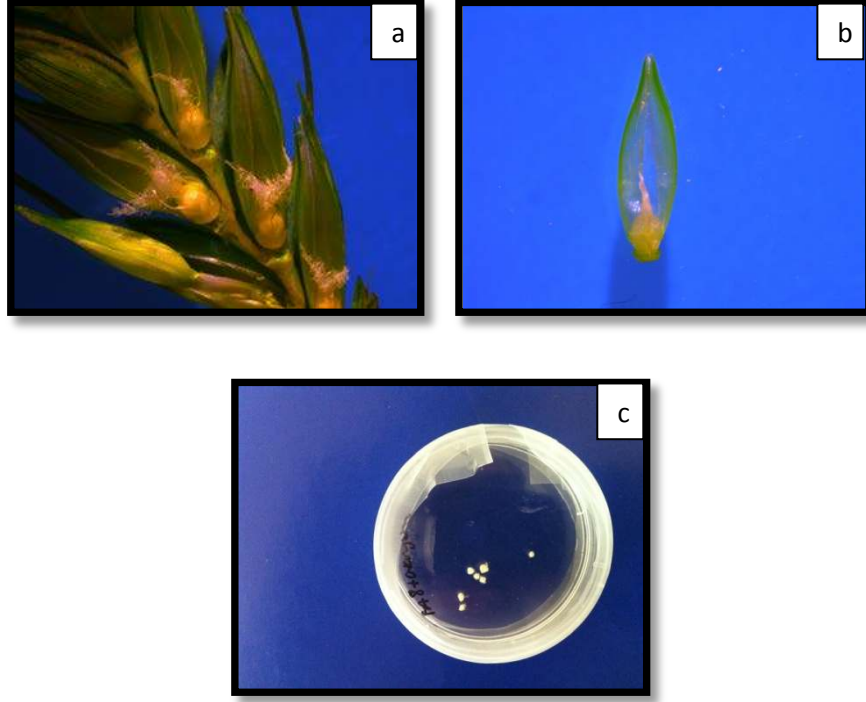
3.2.2.5. Mikrosporların kültüre alınması

Bu temel kültür ortamında olumlu özellikleri bildirilmiş olan büyüme düzenleyicilerinin ve ovaryum ko-kültürün etkileri araştırılmıştır. Mikrosporların kültüre alınması için üç farklı deneme kurulmuştur. Bunların birincisinde hormon kombinasyonları, ikincisinde ovaryum ko-kültür çalışmaları için buğday ovaryumları ve üçüncüsünde hormon ve buğday ovaryumlarının kombinasyonları denenmiştir.

Kültür ortamı olarak ilk denemede NLN ortamı bitki büyüme düzenleyicileri ve buğday ovaryumları olmaksızın tek başına; bitki büyüme düzenleyicilerinden Karkullukçu ve Abak (1993b)'ın anter kültüründe en iyi sonucu aldıkları 0.5 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l KIN kombinasyonu ve Miyoshi (1996)'ın mikrospor kültüründe yaptığı çalışmada kullandığı 0.5 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP'ın bulunduğu fakat buğday ovaryumlarının bulunmadığı şekliyle; yalnız NLN ortamı, büyüme düzenleyicileri içeren NLN ortamı ve buğday ovaryumlarının kombinasyonları şekliyle altı ayrı ortam olarak etkileri araştırılmıştır (Çizelge 3.2). Ovaryum ko-kültür denemeleri için, tek çekirdekli mikrosporları içeren anterlerin bulunduğu başaklardan ovaryumlar çıkarılmış ve ortama alınmıştır. Böylece buğday ovaryumlarının haploid embriyo oluşumuna etkisinin belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla Lantos (2009)'un biberde mikrospor kültüründe yaptıkları ovaryum ko-kültür çalışmasında olduğu gibi kültür ortamlarına 7 adet ovaryum ilave edilmiştir.

Çizelge 3.2. Mikrospor kültüründe kullanılan ortam içerikleri

NLN	NLN + Ovaryum
NLN+ 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l KIN	NLN+ 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l KIN + ovaryum
NLN+ 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP	NLN+ 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP + ovaryum



Şekil 3.7. Ortama ilave edilecek buğday ovaryumlarının mikroskop altındaki görüntüsü (a ve b). Ovaryum ko-kültür denemesi (c)



Şekil 3.8. Orbital çalkalayıcı üzerine alınan petriler

3.2.3. Deneme sonuçlarının değerdendirilmesi

Mikrosporların embriyogenik gelişim moduna girip girmediklerini belirlemek amacıyla simetrik çekirdek bölünmesi gösteren mikrosporların ve çok çekirdekli yapıların varlığı araştırılmıştır. Sonuçlar sayısal olarak ifade edilme yerine, izlenmek istenilen durumun varlığı ya da yokluğuna göre pozitif ya da negatif işaretlemeyle değerdendirilmiştir.

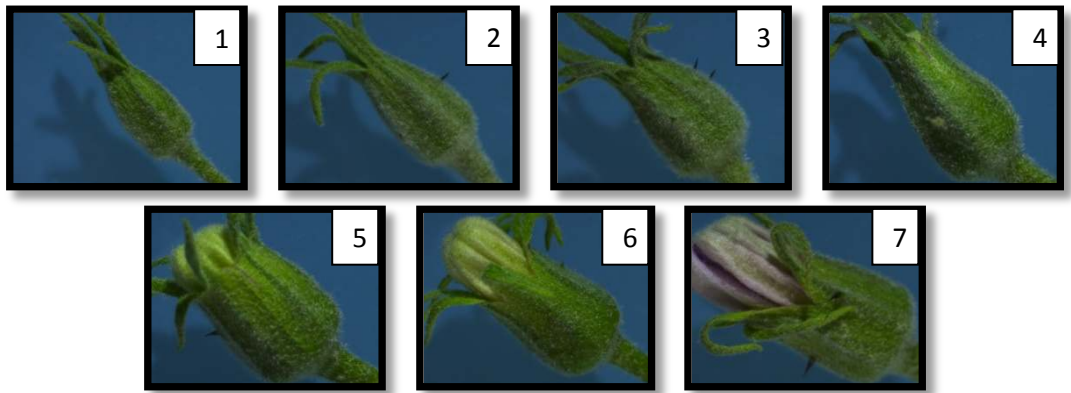
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sitolojik Çalışmalar

4.1.1. Mikrospor Kültürü İçin Uygun Tomurcuk Gelişme Devresi, Mikrospor Gelişme Dönemi

Çalışmanın bu kısmında tek çekirdekli mikrospor gelişme aşamasındaki tomurcukları belirlemek amacıyla bitkilerde çiçeklenmenin başlamasından itibaren hasat edilen tomurcuklar, her bir çeşit için minimum ve maksimum tomurcuk uzunluğu belirlendikten sonra belirli aralıklarla tomurcuk uzunluğuna göre 7 farklı gruba ayrılmış ve bu uzunluklardaki tomurcukların morfolojik görünüşleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Aydın Siyahı çeşidinde, 1.gruptaki tomurcukların tetrat aşamasında çok sayıda mikrospor belirlenmiştir. 2. gruptaki tomurcukların çoğunluğu tetrat aşamasında olmak üzere tetrat ve tek çekirdekli aşamada mikrosporları, 3. gruptaki tomurcukların çoğunluğu tek çekirdekli olmak üzere tetrat ve tek çekirdekli mikrosporları, 4. gruptaki tomurcukların çoğunluğu tek çekirdekli olmak üzere tek ve çift çekirdekli mikrosporları içerdiği belirlenmiştir. 5. gruptaki tomurcukların çift çekirdekli mikrosporları içerdiği belirlenmiş ancak bunun yanı sıra tek çekirdekli mikrospora da rastlanılmıştır. 6. gruptaki tomurcuklarda çift çekirdekli mikrosporlar, 7. gruptaki tomurcuklarda ise çoğunlukla olgun polenler saptanmıştır (Şekil 4.1).

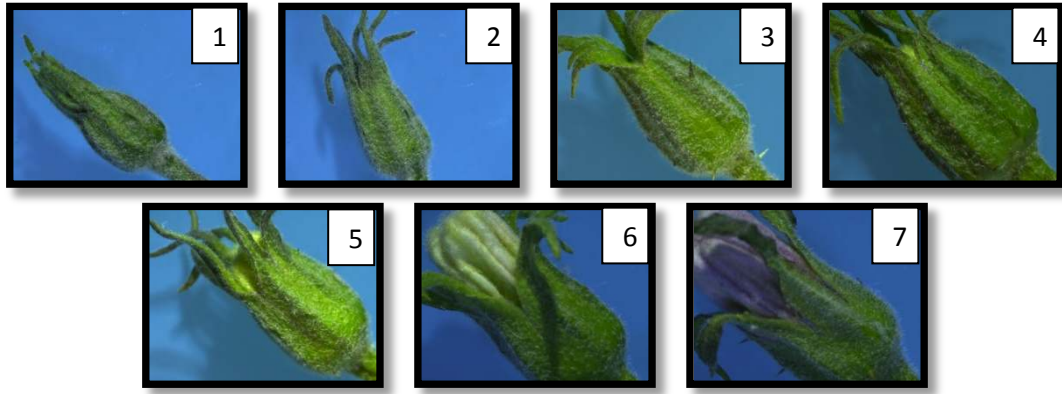


Şekil 4.1. Aydın Siyahı çeşidine ait gruplandırılmış tomurcukların görünümü

Çizelge 4.1. Faselis, Amadeo ve Aydın Siyahı çeşitlerinde tomurcuk uzunlukları ve bu uzunluklara ait tomurcuk özellikleri

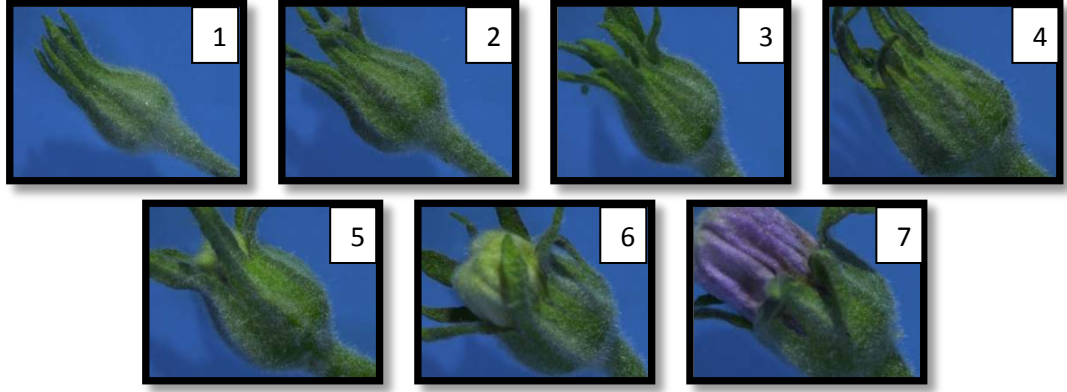
Tomurcuk Gelişme Dönemi	Çeşitler	Tomurcuk Boyu (mm)	Tomurcuk Özellikleri
1	Faselis	8-9	Tomurcuklar küçük ve kapalı, anter rengi çok açık yeşil
	Aydın Siyahı	8-9	
	Amadeo	8-9	
2	Faselis	10-11	Tomurcuklarda çok hafif açılma var ancak yaprakların ucu açılmadan taç yapraklar görünmüyor anterler sarı yeşil
	Aydın Siyahı	10-11	
	Amadeo	10-11	
3	Faselis	12-13	Taç yapraklar hafifçe görünmeye başlamış, anterler yeşilimsi sarı
	Aydın Siyahı	12-13	
	Amadeo	12-13	
4	Faselis	14-15	Taç yapraklar birleşme yeri seviyesinde ve hafifçe görünüyor, anterler yeşilimsi sarı
	Aydın Siyahı	14-15	
	Amadeo	14-15	
5	Faselis	16-17	Taç yaprakların seviyesi çanak yaprakların birleşme noktasını geçmiştir
	Aydın Siyahı	16-17	
	Amadeo	16-17	
6	Faselis	17-18	Taç yaprakların seviyesi çanak yaprakların birleşme yerini geçmiştir, anterler sarı
	Aydın Siyahı	17-18	
	Amadeo	17-18	
7	Faselis	19 ve üzeri	Tomurcuklar açılmak üzere taç yapraklar pembe, anterler koyu sarı, kenarları mor çizgili
	Aydın Siyahı	19 ve üzeri	
	Amadeo	19 ve üzeri	

Faslis F₁ çeşidinde, 1.gruptaki tomurcukların tetrat aşamasında çok sayıda mikrospor belirlenmiştir. 2. gruptaki tomurcukların çoğunluğu tetrat aşamasında olmak üzere tetrat ve tek çekirdekli aşamada mikrosporları, 3. gruptaki tomurcukların çoğunluğu tek çekirdekli olmak üzere tetrat ve tek çekirdekli mikrosporları, 4. gruptaki tomurcukların çoğunluğu tek çekirdekli olmak üzere tek ve çift çekirdekli mikrosporları içerdiği belirlenmiştir. 5. gruptaki tomurcukların çift çekirdekli mikrosporları içerdiği belirlenmiş ancak bunun yanı sıra tek çekirdekli mikrosporlar da rastlanılmıştır. 6. gruptaki tomurcuklarda çift çekirdekli mikrosporlar, 7. gruptaki tomurcuklarda ise çoğunlukla olgun polenler saptanmıştır (Şekil 4.2).



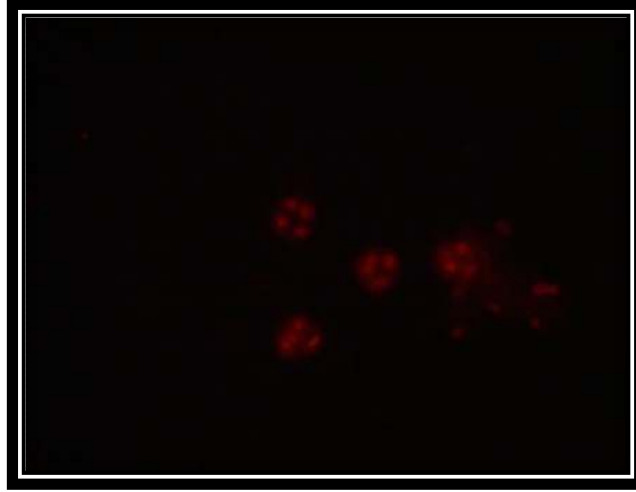
Şekil 4.2. Faselis F₁ çeşidine ait gruplandırılmış tomurcukların görünümü

Amadeo çeşidinde, 1.gruptaki tomurcukların tetrat aşamasında çok sayıda mikrospor belirlenmiştir. 2. gruptaki tomurcukların çoğunluğu tetrat aşamasında olmak üzere tetrat ve tek çekirdekli aşamada mikrosporları, 3. gruptaki tomurcukların çoğunluğu tek çekirdekli olmak üzere tetrat ve tek çekirdekli mikrosporları, 4. gruptaki tomurcukların çoğunluğu tek çekirdekli olmak üzere tek ve çift çekirdekli mikrosporları içerdiği belirlenmiştir. 5. gruptaki tomurcukların çift çekirdekli mikrosporları içerdiği belirlenmiş ancak bunun yanı sıra tek çekirdekli mikrosporlara da rastlanılmıştır. 6. gruptaki tomurcuklarda çift çekirdekli mikrosporlar, 7. gruptaki tomurcuklarda ise çoğunlukla olgun polenler saptanmıştır (Şekil 4.3).

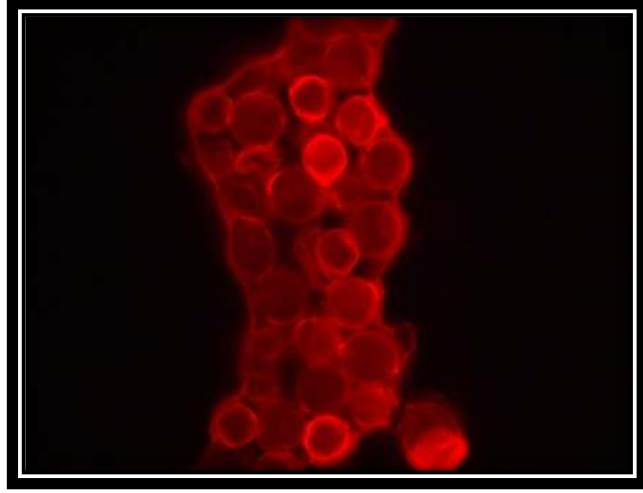


Şekil 4.3. Amadeo F₁ çeşidine ait gruplandırılmış tomurcukların görünümü

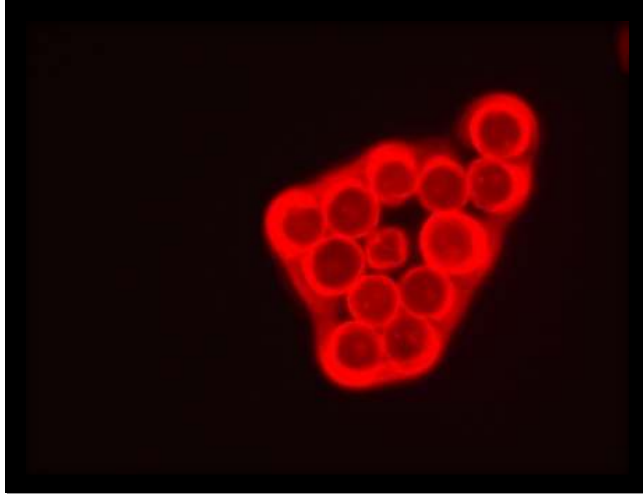
Çalışmada 7 farklı gelişme dönemindeki tomurcuklarda mikrospor gelişme dönemi ethidium bromide boyama yöntemiyle çekirdeksel DNA materyali boyanarak, tetrat aşamasındaki mikrosporlar, tek çekirdekli aşamadaki mikrosporlar ve çift çekirdekli aşamadaki mikrosporlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6).



Şekil 4.4. Patlıcada tetrat aşamasındaki mikrosporlar

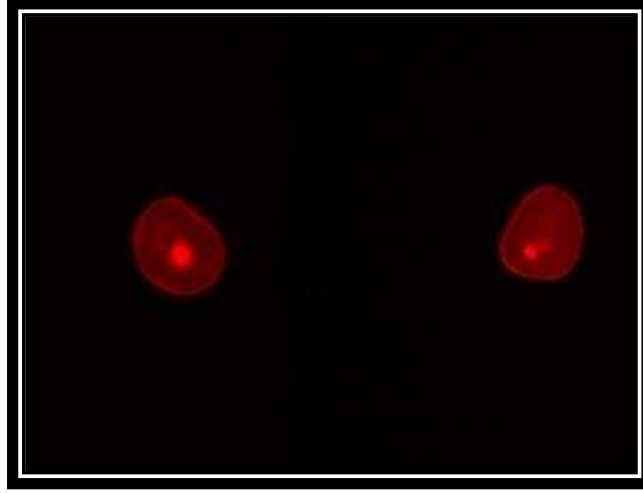


Şekil 4.5. Patlıcada tek çekirdekli aşamadaki mikrosporlar



Şekil 4.6. Patlıcada çift çekirdekli aşamadaki mikrosporlar

Buğdayda ise, ovaryum ko-kültür çalışmalarında kullanılan ovaryumlar, kültüre alınan mikrosporların izole edildiği anterlerle aynı başaktan alınmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda orta geç çekirdekli ve erken çift çekirdekli mikrosporları içeren anterlerin bulunduğu başaklar kullanılmıştır. Uygun safhada bulunan mikrosporların başaklar yaprak kınından çıkmamış ve anterlerin açık yeşil olduğu aşamada tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Buğdayda tek çekirdekli aşamadaki mikrosporlar

Mikrospor kültür tekniğinin başarıyla uyartılmasında etkili olan en önemli faktörlerden birisi, anterlerin donör bitkiden izole edildiği dönemdir. *Solanaceae* familyasındaki birçok bitki türünde mikrospor çekirdeğinin mitoz bölünmeye başlamasından hemen önceki dönem, mitoz bölünme aşaması veya hemen bu aşamayı izleyen bölünme sonrası dönem androgenesise en iyi cevap veren dönemler olarak belirtilmiştir (Qin ve Rotino 1995, Vagera 1990). Dolayısıyla anterlerin donör bitkiden izole edildiği anda mikrosporların içinde bulundukları gelişme dönemi embriyo oluşumunu etkilemektedir.

Karakullukçu ve Abak (1993a) patlıcanda yaptıkları uygun tomurcuk aşaması çalışmalarında, farklı gelişme dönemlerindeki anterlerin kültürdeki gelişme durumlarını incelemiş ve 1. polen mitozundan hemen önceki aşamada tek çekirdekli mikrosporları veya bölünme aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerin en yüksek gelişme oranını verdiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca, tomurcuk büyüklüğü ve morfolojik görünüm yanında anter renginin de elverişli dönemi belirlemede önemli bir kriter olduğunu ifade etmişlerdir.

Samancı vd 1998 yılında yaptıkları çalışmada; patlıcan, domates ve biber türlerinde uygun tomurcuk aşamasının belirlenmesi için ethidium bromid ile boyama yönteminin kolay ve hızlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Elde ettiğimiz bulgulara, uygun mikrosporları içeren tomurcukların büyüklüklerinde çeşitler arasında önemli sayılabilecek bir farklılık saptanmamıştır ve yapılan sitolojik gözlemler sonucunda tüm çeşitlerde mikrosporogenesis aşamalarının tomurcukların çok küçük oldukları dönemde görüldüğü, diğer aşamalarda bulunan tomurcukların genç veya olgunlaşmakta olan çiçek tozlarını içerdiği tespit edilmiştir. Mikrospor kültüründe, uygun aşama olarak belirlenen tek çekirdekli mikrosporları içeren anterlerin bulunduğu tomurcukları belirlemenin başarıyı etkileyen önemli faktörlerden biri olması nedeniyle mutlaka belirlenmesi gerekmektedir. Ethidium Bromide ile boya yöntemi hızlı ve kolay sonuç alınabilecek bir yöntemdir. Ancak tomurcuk büyüklüğünün çeşitler, yetiştirme koşulları ve bitki yaşına göre değişiklik gösterebileceğinden dolayı; kullanılan bitkisel materyal ve çevre koşullarından meydana gelebilecek farklılıkların çalışmadaki etkilerini azaltmak için her kültür işleminden önce tomurcuklarda sitolojik gözlemler yapılmalı ve uygun aşamadaki mikrosporları içeren anterleri bulunduran tomurcuklarla çalışılmalıdır.

4.1.2. Mikrospor Kültürü Aşamaları

Mikrospor kültüründe başarı, çok büyük bir oranda mikrosporların alındığı bitkilerin genotipine bağlıdır. Haploid embriyo oluşum oranı, türlere ve tür içinde de genotiplere göre değişiklik göstermektedir. Şimdiye dek çalışılmış olan bitki türlerinde; aynı kültür koşulları altında, mikrosporların kültür tekniğine yanıtları bakımından genotipler arasında büyük farklılıklar gözlenmiştir.

Mevcut çalışmada Faselis ve Amadeo çeşitleri, Aydın Siyahı çeşidine göre daha iyi sonuç vermiştir. Faselis ve Amadeo çeşitlerinde simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapılardan söz edilebilirken, Aydın siyahı çeşidinde simetrik bölünme söz konusu olsa bile, çok çekirdekli yapıların varlığından bahsetmek mümkün olmamıştır (Çizelge 4.2). Ellialtıoğlu vd (2012b) ve Başay vd (2010) yaptıkları anter kültürü çalışmalarında Aydın Siyahı çeşidini kullanmışlar ve bu çeşitte diğer çeşitlere göre embriyo oluşumunun çok düşük bir frekansda gerçekleştiği veya hiç embriyo oluşumunu elde

edilmediđi belirtilmiřtir. Bizim aldıđımız sonuřlar dođrultusunda da Aydın Siyahı řeřidinin androgenesise tepkisinin dűřűk olduđu sűylenebilir.

Mikrospor kűltűrűnde uygun dűnemde toplanan mikrosporlara yapılan űn iřlem uygulamalarının oldukça űnemli etkileri vardır. Mikrosporlardan haploid embriyo oluřumunu uyarmak amacıyla tomurcuk, anter veya anterlerden izole edilen mikrosporlara sıcaklık řokları, karbonhidrat ve azot ařlıđı, yűksek pH, ethanol, kolhisin ve gama ıřını gibi uygulamalar yapılarak haploid embriyo oluřumu uyarılabilmektedir (Touraev vd 1997). Yapılan űniřlemlerin amacı sadece mikrospor embriyogenesisini arttırmak deđil, aynı zamanda olgun embriyoların ve yeřil bitkilerin oluřabileceđi en iyi kalitedeki mikrosporları elde etmektir. Bu yűzden tek bir űniřlem uygulaması yerine iki veya daha fazla yűntemi bir arada kullanmak mikrospor kűltűrűnde bařarıyı daha da fazla arttırabilmektedir (Liu vd 2002).

Sıcaklık řokları dűřűk veya yűksek sıcaklık uygulamaları řeklinde yapılmaktadır. *Solanaceae* familyasına ait bitkilerde androgenesis űzerine yűksek sıcaklık řoklarının olumlu etkileri daha űnceki řalıřmalarda belirtilmiřtir. Patlıcanda yapılan anter kűltűrű řalıřmalarında anterlerin ilk sekiz gűnlűk sűrede ve 35°C' de karanlıkta tutulmasının kallus ve embriyo oluřumu iřin gerekli olduđu belirtilmiřtir (Dumas de Vaultx ve Chambonnet 1982, Karakullukçu ve Abak 1992, Matsubara vd 1992). Roberts-Oehlschlager and Dunwell (1990)'ın belirttiđine gűre řeker ařlıđı olarak adlandırılan mannitol uygulamasının ise mikrosporlarda sadece besin yetersizliđine yol ařtıđı dűřűnűlse de, hűcre duvarı oluřumunu durdurarak normal mikrospor geliřimini engellediđi de gűrűlműřtir (Cořkun 2011).

Řalıřmamızda da uygun mikrospor ařamasındaki mikrosporları iřeren anterlere 35°C'de 8 gűn karanlıkta sıcaklık ve 0.3 M mannitol uygulaması řeklinde ikili űn iřlem uygulanmıřtır. Herhangi bir űn iřlem uygulanmayan anterlerden izole edilerek kűltűre alınan kontrol grubu mikrosporlarına gűre űn uygulama yapılan anterlerden izole edilen mikrosporlarda simetrik bűlűnen mikrosporlar ve çok çekirdekli yapıların oluřumu gűzlemlenmiřtir. Bu durum Miyoshi (1996) ve Bal (2009) yaptıkları mikrospor kűltűrű

alışmalarında sıcak ve açlık n uygulamalarını birlikte uyguladıkları çalışma ile uyum içerisindedir.

Mikrospor kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri mikrosporların konulduğu kültür ortamıdır. Mikrospor kültür sistemlerindeki ilk hücre bölünmesi, embriyo oluşumu için gerekli olan diğer hücre bölünmelerinin başlangıcını oluşurmaktadır. Bu tür bölünmelerin farklı hormon kombinasyonları, ortamlar, katılaştırıcılar, iyileştirme faktörleri, aminoasitler ve ortama eklenen diğer maddelerden etkilendiği bildirilmektedir (Patel vd 2004).

Mikrospor kültüründe başarılı sonuçlar elde etmek için, kültür ortamındaki bitki büyüme düzenleyicilerinin oldukça önemi vardır. Çalışmamızda da n uygulama işlemine tabi tutulan anterlerden izole edilen mikrosporlar, kültür ortamı olarak NLN ortamının kullanıldığı ilk denemede bitki büyüme düzenleyicileri ve buğday ovaryumları olmaksızın tek başına kullanılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak NLN ortamının tek başına kullanıldığı uygulamada hiçbir çeşitte simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapılara rastlanılmamıştır. NLN ortamına 0.5 mg/l 2.4D ve 0.5 mg/l kinetin ilave edilen ortamlarda, Faselis ve Amadeo eşidinde simetrik çekirdek bölünmesi gözlemlenirken çok çekirdekli yapılardan bahsetmek mümkün olmamıştır. Aydın Siyahı eşidinde ise simetrik çekirdek bölünmesi gözlemlenememiştir. NLN ortamına 0.5 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP ilave edilen ortamlarda, yine Aydın siyahı çeşidinde simetrik çekirdek bölünmesi gzlemlenmemişken, Faselis ve Amadeo eşitlerinde simetrik çekirdek bölünmeleri gözlemlenmiş ancak çok çekirdekli yapılar elde edilememiştir (izelge 4.2, şekil 4.8, 4.9). Bu çalışmada da alınan sonuçlar doğrultusunda, patlıcanda anter kültüründe Karkulluku ve Abak (1993b)'ın, Miyoshi (1996)'nin ise mikrospor kültüründe en iyi sonucu aldıkları hormon kombinasyonlarının olumlu etkileri gözlenmiştir.

Son yıllardaki araştırmalar, sadece temel kültür bileşikleri üzerine değil aynı zamanda hormon eşitleri, ortama ilave edilen farklı proteinler ve ovaryumlar üzerine yoğunlaşmıştır (oşkun 2011). Özellikle kültür ortamına ovaryum eklenerek (ovary co-culture) yapılan çalışmalar oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Dunwell (2010),

mikrospor kültür ortamında, diğer çoğalabilen doku veya organları, özellikle ovaryumları, kullanmanın monokotiledon bitkilerde mikrospor embriyogenesi artırmada dikkat çekici avantajları olduğunu belirtmiştir.

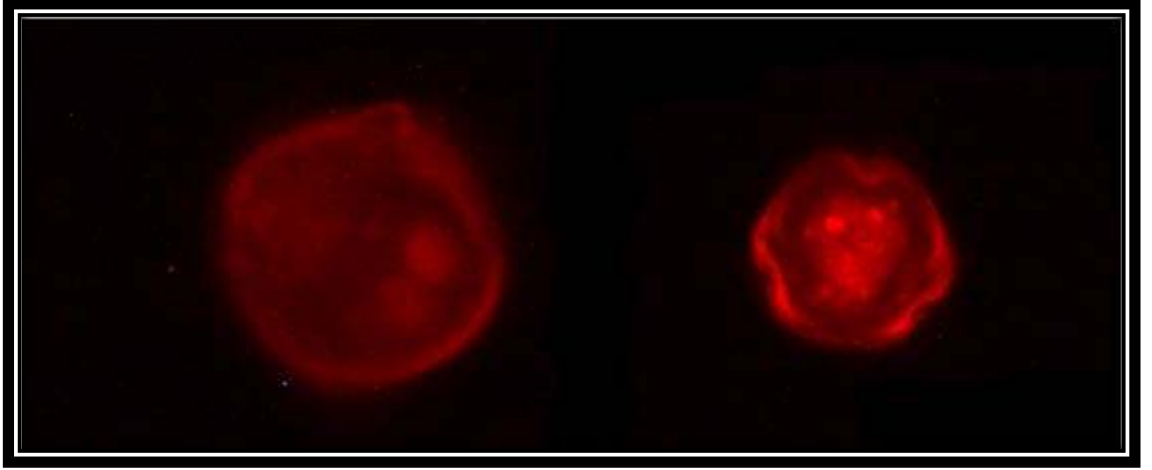
Ovaryum ko-kültür çalışmalarında ise yalnız NLN ortamı, büyüme düzenleyicileri içeren NLN ortamı ve buğday ovaryumlarının kombinasyonlarını içeren ortamlarda mikrosporlar kültüre alınmıştır. Bu amaçla Lantos (2009)'un biberde mikrospor kültüründe yaptıkları ovaryum ko-kültür çalışmasında olduğu gibi kültür ortamlarına 7 adet ovaryum ilave edilmiştir. NLN ortamına ovaryumların ilave edilmesiyle normalde yalnız NLN ortamının kullanıldığı ortamlarda hiçbir çeşitte gelişme gözlemlenemezken, ovaryum ilave edildiğinde Faselis ve Amadeo çeşitlerinde simetrik çekirdek bölünmeleri gözlenmiştir. NLN ortamına ilave edilen 0.5 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l kinetin hormonları ve ovaryumların etkisinin araştırıldığı denemelerde; Faselis ve Amadeo çeşitlerinde simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapılardan basetmek mümkün olurken, Aydın Siyahı çeşidinde de simetrik bölünmeler gözlemlenmiştir. NLN ortamına ilave edilen 0.5 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP hormonları ve ovaryumların etkisinin araştırıldığı denemelerde ise, her üç çeşitte de simetrik bölünmeler gözlemlenirken, çok çekirdekli yapılardan bahsetmek mümkün olmamıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.8, 4.9).

Ön koşul ortamında, diğer çoğalabilen doku veya organları, özellikle ovaryumları, kullanmanın dikkat çekici avantajları olduğu belirtilmiştir. Mikrospor kültür ortamına ovaryum eklenmesi, bölünen mikrospor sayısını ve embriyo oluşumunu önemli düzeyde artırmıştır (Dunwell, 2010). Kohler ve Wenzel (1985), Ziauddin vd (1992), Mejza vd (1993), Touraev vd (1996), Hu ve Kasha (1997), J'Aiti vd (1999), Zheng vd (2002), Patel vd (2004) ve Broughton (2008) yaptıkları çalışmalarla arpa ve buğdayda başarılı bir mikrospor kültürü için ovaryum eksplantları ile yapılan iyileştirmelerin ön koşul olduğunu ve ovaryumların mikrospor kültüründe başarı için kritik bir bileşen olduğunu belirtmişlerdir. Son zamanlarda benzer şekilde, Lantos vd (2009) tarafından biber (*Capsicum annuum* L.)' de buğday ve biber ovaryumları kullanılarak yapılan ko-kültürün yararlı etkileri rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmada

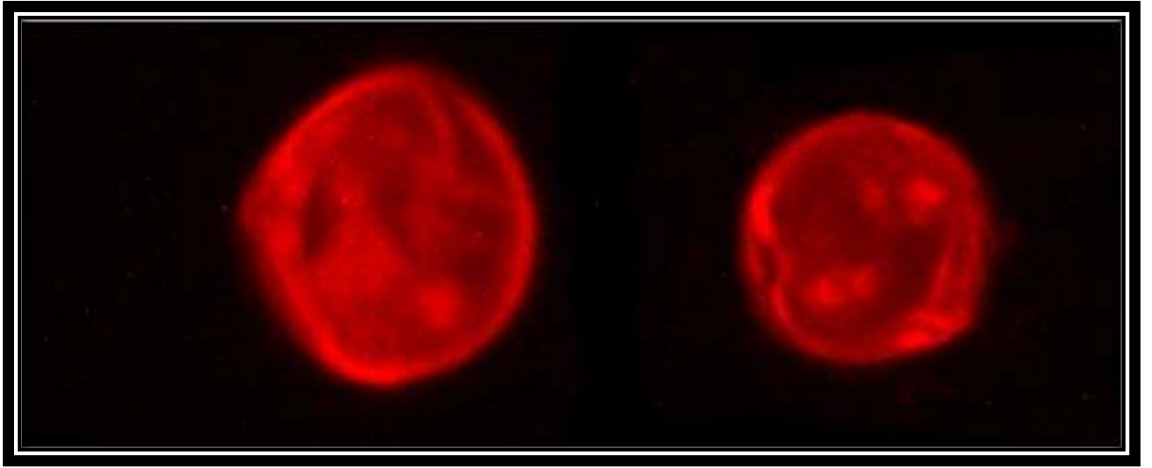
da patlıcanda mikrospor kültüründe, simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapıların oluşumunda kültür ortamına eklenen ovaryumların olumlu etkileri gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2. Temel kültür ortamı ve ekli diğer bileşiklerin mikrospor gelişimine etkileri

ÇEŞİT						
Kültür Ortamı	Faselis		Amadeo		Aydın Siyahı	
	Simetrik Bölünme	Çok Çekirdekli Yapılar	Simetrik Bölünme	Çok Çekirdekli Yapılar	Simetrik Bölünme	Çok Çekirdekli Yapılar
NLN	-	-	-	-	-	-
NLN + 0,5 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l KIN	+	-	+	-	-	-
NLN + 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP	+	-	+	-	-	-
NLN + 0,5 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l KIN + ovaryum	+	-	+	-	-	-
NLN + 0,5 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l KIN + ovaryum	+	+	+	+	+	-
NLN + 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP + ovaryum	+	-	+	-	+	-



Şekil 4.8. Patlıcanda simetrik bölünme gösteren mikrosporlardan bir görünüm



Şekil 4.9. Patlıcanda çok çekirdekli yapı gösteren mikrosporlardan bir görünüm

5. SONUÇ

Bu çalışmada ovaryum ko-kültür çalışması için buğday ovaryumları ve 2,4D, kinetin, NAA ve BAP büyüme düzenleyicileri kültür ortamına ilave edilerek; patlıcanda mikrospor kültürü üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada üç farklı patlıcan çeşidinde uygun gelişim aşamasında bulunan mikrosporları içeren anterlerin bulunduğu tomurcuklar toplanmıştır. Bu tomurcuklardan çıkartılan anterler 35oC’de karanlık koşullarda 8 gün filtre ile sterilizasyonu yapılmış 0.3 M mannitol solüsyonu içinde ön uygulamaya tabi tutulmuştur. Ön işlem uygulamasından sonra mikrosporlar anterlerden izole edilerek NLN ortamında, 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l KIN ve 0.5 mg/NAA + 0.5 mg/l BAP büyüme düzenleyicileri içeren NLN ortamında ve bu ortamlarla buğday ovaryumlarının kombinasyonlarını içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Ön uygulama işleminden sonra NLN ortamında izole edilip kültüre alınan mikrospora haploid embriyo oluşumunu uyartmak için ilk olarak 5 mg/l 2,4D + 5 mg/l KIN ve 5 mg/l NAA+ 5 mg/l BAP hormon konsantrasyonlarını içeren kültür ortamlarının etkileri araştırılmıştır. Bu ortamlarda Aydın Siyahı çeşitlerinde herhangi bir gelişme gözlenmezken, Faselis ve Amadeo çeşitlerinde ise yalnızca simetrik çekirdek bölünmesi uyartılabilmektedir. Ovaryum ko-kültür denemeleri için, bu kültür ortamlarına ovaryum ilave edilmesiyle Faselis ve Amadeo çeşitlerinde simetrik bölünme yanında çok çekirdekli yapıların oluşumu, Aydın Siyahı’nda ise simetrik bölünme uyartılmıştır. Böylece ovaryum ilave edilmeyen ortamlarda simetrik çekirdek bölünmesi elde edilse bile çok çekirdekli yapıların oluşması, ovaryum ko-kültür sisteminin dikkat çekici avantajları olduğunu göstermiştir. Ancak hiçbir çeşitte, ortam ve koşulda mikrospordan rejenerasyon sağlanamamıştır.

Patlıcanda mikrospor kültüründe simetrik çekirdek bölünmesi ve çok çekirdekli yapıların oluşumunu uyartan bu sitemde çok hücreli yapıların ortaya çıkışını yüksek oranda uyartmak, haploid embriyo elde etmek ve elde edilen embriyolardan rejenerasyonunu sağlamak amacıyla sitematik olarak incelenmesi faydalı olacaktır.

Mikrospor kültürlerinin fungal ya da bakteriyel kontaminasyona çok hassas olması, yaptığımız çalışmada iki farklı türün kullanılması ve bu tekniğin bize çok yeni

olması; mevcut çalışmada başlangıçta denemeye alınan birçok kültür ortamının kaybedilmesiyle neden olmuştur. Böylece mikrosporların embriyogenik gelişim moduna girip girmediklerini belirlemek amacıyla simetrik çekirdek bölünmesi gösteren mikrosporların ve çok çekirdekli yapıların varlığı ve ya yokluğundan bahsetmek mümkün olmuştur. Sonuçların sayısal olarak ifade edilmesi yerine, izlenmek istenilen durumun varlığı ya da yokluğuna göre pozitif ya da negatif işaretlemeyle değerlendirilmiştir. Bu durumda istatistiksel anlamda bir analiz elde edilememiş olsa da, tek başına önemli bir katkı olarak değerlendirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- ABAK, K. 1988. Türkiye’de bitki ıslahı çalışmalarında *in vitro* tekniklerden yararlanma. I. Uluslararası Tarım ve Biyoteknoloji Sempozyumu. 1-3 Haziran, Adana, 1-7.
- ABAK, K. 1993. Yazlık sebzeler ve örtü altı yetiştiriciliği raporu (*Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminaceae* ve *Compositae*). Türkiye Bahçe Bitkileri Alt Sektörünün Gözden Geçirilmesi Projesi, Hazırlık Çalışması: Bahçe Bitkileri Üretiminin Bölgesel Özellikleri. Adana, ss 23.
- ALPSOY, H.C. and SENİZ, V. 2007. Researches on the *in vitro* androgenesis and obtaining haploid plants in some eggplant genotypes. *Acta Horticulturae* 729:137–141
- ANONİM, 2010. TSÜAB- TÜRKTED Ortak Çalışma Grupları Grup Raporu. http://www.turkted.org.tr/images/rapor_tsuab.pdf.
- ANONİM, 2012. www.fao.com
- ARI, E. 2006. Türkiye’de doğal olarak yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*’da anter kültürü çalışmaları, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- BAL, U. 2002. Domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill.) izole edilmiş mikrospor kültürü, ovaryum kültürü ve *Solanum sisymbriifolium* Lam. ile tozlama yöntemleri ile haploid embriyo oluşumunun uyartılması, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- BAL U., ELLİALTIOĞLU S. and ABAK K. 2009. Induction of symmetrical nucleus division and multi-nucleate structures in microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.) cultured *in vitro*. *Scientia Agricola*, 66: 535-539.
- BAŞAY, S., ELLİALTIOĞLU, Ş. ve ŞENİZ, V. 2010. Yerli ve yabancı patlıcan çeşitlerinde anter kültürü yoluyla haploid embriyo oluşumu. VIII. Sebze Tarımı Sempozyumu, 23-26 Haziran 2010, Van. Bildiri Kitabı (Eds, Yaşar, F., Çavuşoğlu, Ş., Biçim, M.) ss 588-590.
- BERBER, M. 2009. Kabuksuz çekirdek kabaklarında (*Cucurbita pepo* L. var. *styriaca*) ışınlanmış polenle tozlama yöntemiyle haploid üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- BOYACI, H. F. 2001. Sebze ıslahında *in vitro* teknikler ve biyoteknolojinin kullanım alanları. *Derim Dergisi*, 18 (4): 180-189.

- BROUGHTON, S. 2008. Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 95: 185-195.
- COLLONNIER, C., FOCK, I., KASHYAP,V., ROTINO, G.L., DAUNAY, M.C., LIAN, Y., MARISKA, I.K., RAJAM, M.V., SERVAES, A., DUCREUX, G. and SIHACHAKR, D. 2001. Application of Biotechnology in Eggplant. *Plant Cell,Tissue and Organ Culture*, 65: 91-107.
- ÇAĞLAR, G. ve ABAK, K. 1999. Hıyarda (*Cucumis sativus* L.) *in situ* uyartım sonucu elde edilen haploid embriyolardan *in vitro* haploid bitki oluşturma.Tr. J. of Agriculture and Forestry, 23: 283-290.
- ÇOŞKUN, Y. 2011. Mikrospor kültürü ile makarnalık buğday bitkisinde (*Triticum durum* Desf.) embriyo üretimi ve bitki regenerasyonu, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta.
- DE BUYSER, J. and PICARD, E. 1997. Obtention de plantes chlorophylliennes haploïdes de blé dur et blé tendre par culture de microspores isolés. Actes des VIème Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologie- Génie génétique des plantes de l'AUPELF-UREF du 30 juin au 3 juillet 1997. Collection Université Francophones, edition ESTEM. (p. 536)
- DUNWELL, J. M. 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 377-424.
- ELLİALTIOĞLU, Ş. 2000. Haploid bitkilerin bitki ıslahı programlarında kullanımı. Biki Islahı Kursu, Seminer Notları (Yayımlanmamış), Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Nisan 2000, Samsun.
- ELLİALTIOĞLU, Ş. ve TIPIRDAMAZ, R. 2000. Patlıcan anter kültüründe içsel absizik asit miktarını azaltıcı uygulamaların androgenetik embriyo oluşumuna etkisi. *Biyoteknoloji(KÜKEM) Dergisi*.24(1):23-32.
- ELLİALTIOĞLU, Ş., SARI, N. ve ABAK, K. 2001. Haploid bitki üretimi. Mehmet BABAOĞLU, Ekrem GÜREL, Sebahattin ÖZCAN, Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü.Vakfı Yayınları, Konya, 137-189.
- ELLİALTIOĞLU, Ş. 2012a. Patlıcan ıslahı. <http://www.ziraatciyiz.biz/patlican-islahi-pdf-t3194.html?t=3194>
- ELLİALTIOĞLU, Ş., BAŞAY, S. ve KUŞVURAN, Ş. 2012b. Patlıcanda polen dimorfizmi ve anter kültürü ilişkisinin incelenmesi. Tarım Sempozyumu, Çankırı. 21-23 Nisan 2012(Poster)
- EMİROĞLU, Ü., 1982. Haploidi ve bitki ıslahındaki önemi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, yardımcı ders kitabı, Ofset Basım Evi, Bornova, İzmir.

- ER, C., 1992. Bitki ıslahında doku kültürleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara. 83 ss.
- FORSTER, B.P., HERBERLE-BORS, E., KASHA, K.J. and TOURAEV, A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12(8):368–375
- GERMANA, M. A. 2011. Anther culture for haploid and Double Haploid production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 104:283-300.
- GÜRGÜN, V. ve HAALKMAN, A.K. 1990. Mikrobiyolojide sayım yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği, yayın no 7, 2. Baskı, Ankara.
- HU, T. and KASHA, K.J. 1997. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. *Plant Cell Reports*, 16: 520-525
- J'AITI, F., BENLHABIB, O., SHARMA, H.C., EL JAAFARI, S. and EL HADRAMI, I. 1999. Genotypic variation in anther culture and effect of ovary co-culture in durum wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 59: 71-76
- KALLOO, G. 1993. Eggplant (*Solanum melongena* L.). Genetic improvement of vegetable crops. Pergamon Press, pp 587-604.
- KARAKULLUKÇU, Ş. ve ABAK, K. 1992a. Bazı patlıcan çeşitlerinin anter kültürüne tepkileri. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı*, 42: 7-12.
- KARAKULLUKÇU, Ş. ve ABAK, K. 1992b. Farklı sıcaklık şoklarının patlıcanda anter kültürü yoluyla embriyo oluşumu üzerine etkisi. Türkiye I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 13-16 Ekim, İzmir.
- KARAKULLUKÇU, Ş. ve ABAK, K. 1993a. Patlıcanda anter kültürü üzerinde araştırmalar: I. elverişli tomurcuk gelişim döneminin belirlenmesi. *Doğa-Turkish Journal of Agricultural and Forestry*, 17: 801-810.
- KARAKULLUKÇU, Ş. ve ABAK, K. 1993b. Patlıcanda anter kültürü üzerinde araştırmalar: I. Şeker ve büyümeyi düzenleyicilerin etkileri. *Doğa- Turkish Journal of Agricultural and Forestry*, 17: 811-820.
- KNAPP, S., BOHS, L., NEE, M. and SPOONER D.M. 2004. Solanaceae—a model for linking genomics with biodiversity. *Comp Funct Genom*, 5: 285–291.
- KOHLER, F. and WENZEL, G. 1985. Regeneration of isolated barley microspores in conditioned media and trials of characterize the responsible factor. *J. Plant Physiol*, 121: 181-191.

- LANTOS, C., JUHASZ, A.G., SOMOGYI, G., OTVOS, K., VAGI, P., MIHALY, R., KRISTOF, Z., SOMOGYI, N. and PAUK, J. 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 97: 285-293.
- LETARTE, J., SIMION, E., MINER, M. and KASHA, K. J. 2006. Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Reports*, 24:691-698.
- LEUBA, V. and LETOURNEAU, D. 1990. Auxin activity of phenylacetic acid in tissue culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 9:71-76.
- Lİ, H. and DEVAUX, P. 2001. Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Reports*, 20, 475-481.
- LIU, W., ZHENG, M.Y., POLLE, E.A. and KONZAK, C.F. 2002. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Science*, 42:686-692.
- MATSUBARA, S., HU, K. and MURAKAMI, K. 1992. Embryoid and callus formation from pollen grains of eggplant and pepper by anther culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 61: 69-77.
- MEJZA, S.J., MORGANT, V., DIBONA D.E. and WONG, J.R. 1993. Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports*, 12: 149-153.
- MIYOSHI, K. 1996. Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports*, 15: 391-395.
- ÖZÜ, M. E. 2006. Donör bitkilerin yetiştirme koşulları ve farklı kültür sıcaklıklarının ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) anter kültüründe haploid bitki rejenerasyonuna etkileri üzerine bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- PATEL, M., DARVEY, N.L., MARSHALL, D.R. and BERRY, J. O. 2004. Optimization of culture conditions for improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture. *Euphytica*, 140: 197-204.
- QIN, X. and ROTINO, G.L., 1995. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes, *Acta Horticulturae*, 402: 313-316.
- ROTINO, G.L., 1996. Haploidy in eggplant. In: Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (Eds.), *In vitro Production in Higher Plants*, vol. 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 115-141.

- SAMANCI, N., KURUM, R., BOYACI, F. ve BİNER, B. 1998. Anter kültürü çalışmaları için elverişli tomurcuk safhasının saptanmasında kullanılabilecek boyama yöntemi. 2. Sebze Tarımı Sempozyumu, 28-30 Eylül, Tokat.
- SEGUI-SIMARRO, J.M. and NUEZ, F. 2007. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58 (5), 1119–1132.
- SEGUI-SIMARRO, J.M.; CORRAL-MARTINEZ, P.; PARRA-VEGA, V.; GONZALEZ-GARCIA, B. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Rep*, 30(5): 765-778.
- TOURAEV, A.; INDRIANTO, A.; WRATSCHKO, I.; VİCENTE, O. and HEBERLE-BORS, E. 1996. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high tempature. *Sexual Plant Reproduction*, 9:209-215.
- TOURAEV, A.; VINCENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Science Review*, 2: 297–302.
- TUNCER, B.; YANMAZ, R. 2007. Haploid Bitki Elde Etme Yollarından Biri: Mikrospor Kültürü. *Alatarım*, 6(2): 1-8.
- TUNCER B. 2010. Farklı uygulamaların lahanalarda mikrospor kültürü yoluyla embriyo uyartımına etkisi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- TUNÇAY, B., 2007. Patlıcanda (*Solanum melongena* L.) somatik embriyogenezis ve organogenezis üzerine bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- VAGER, J., 1990. Pepper (*Capsicum* spp.): *In vitro* induction of haploids. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 12: 374-392.
- ZHENG, M. Y., WENG, Y., LIU, W. and KONZAK, C. F. 2002. The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 20:802-807.
- ZIAUDDIN, A., MARSOLAIS, A., SIMION, E. and KASHA, K. J. 1992. Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). *Plant Cell Reports*, 11: 489-4.

ÖZGEÇMİŞ

Buse ÖZDEMİR 02.07.1985 yılında Balıkesir’de doğmuştur. İlkokulu Konya’da, ortaokul ve lise öğrenimini Karaman’ın Ermenek ilçesinde tamamlayarak, 2004 yılında lisans öğrencisi olmayı hak kazandığı Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği Programı’ndan, 2009 yılında Ziraat Mühendisi unvanını alarak mezun olmuştur. Yine 2009 yılının Eylül ayında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlayarak, aynı yılın Aralık ayında Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır ve halen aynı anabilim dalında görevine devam etmektedir.