

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**FARKLI UYGULAMALARIN PATLİCAN (*Solanum melongena* L.)’DA  
MİKROSPOR KÜLTÜRÜ İLE HAPLOİD EMBRİYO VE BİTKİ ÜRETİMİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Buse ÖZDEMİR ÇELİK**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAHÇE BİTKİLERİ**

**ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**EYLÜL 2018**

**ANTALYA**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**FARKLI UYGULAMALARIN PATLİCAN (*Solanum melongena* L.)’DA  
MİKROSPOR KÜLTÜRÜ İLE HAPLOİD EMBRİYO VE BİTKİ ÜRETİMİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Buse ÖZDEMİR ÇELİK**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAHÇE BİTKİLERİ**

**ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**EYLÜL 2018**

**ANTALYA**

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

**FARKLI UYGULAMALARIN PATLİCAN (*Solanum melongena* L.)'DA  
MİKROSPOR KÜLTÜRÜ İLE HAPLOİD EMBRİYO VE BİTKİ ÜRETİMİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Buse ÖZDEMİR ÇELİK  
BAHÇE BİTKİLERİ  
ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
tarafından FDK-2017-1983 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**EYLÜL 2018**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI UYGULAMALARIN PATLİCAN (*Solanum melongena* L.)'DA  
MİKROSPOR KÜLTÜRÜ İLE HAPLOİD EMBRİYO VE BİTKİ ÜRETİMİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ

Buse ÖZDEMİR ÇELİK

BAHÇE BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 12/09/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

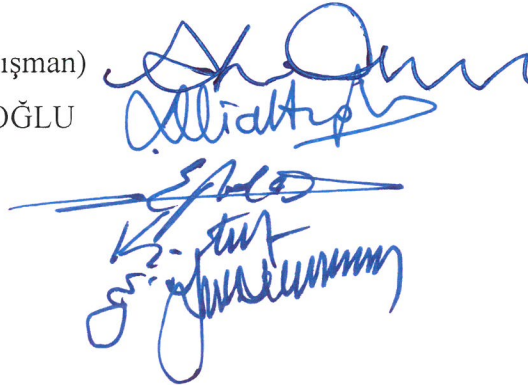
Prof. Dr. A. Naci ONUS (Danışman)

Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM



## ÖZET

### FARKLI UYGULAMALARIN PATLICAN (*Solanum melongena* L.)’DA MİKROSPOR KÜLTÜRÜ İLE HAPLOİD EMBRİYO VE BİTKİ ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

**Buse ÖZDEMİR ÇELİK**

**Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. A. Naci ONUS**

**Eylül 2018; 86 sayfa**

Araştırmada iki adet F<sub>1</sub> (“A117” ve “Amadeo”) patlıcan çeşidinde mikrospor kültürü yoluyla haploid ve DH bitki elde etme olanakları üzerine çalışılmıştır. Bu amaçla, ilk olarak uygun mikrospor gelişme dönemindeki mikrosporlar (çoğunluğu vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polen) anterlerden izole edilerek 35°C’de 3 gün karanlık koşullarda ön uygulamaya maruz bırakılmış ve ardından mikrosporlar % 2 sakkaroz, 0.5 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP, pH 5.9, içeren NLN ortamında kültüre alınmış ve bir ay boyunca 25°C’de karanlıkta bekletilmiştir. Bir ay sonunda mikrospor kültürü tekniğine çeşitlerinin tepkisinin belirlenmesi amacıyla, kültüre alma sırasında canlı mikrospor yüzdesi, ön uygulama sonrasında canlı mikrospor yüzdesi, toplam kallus sayısı/petri, 1 mm’den büyük kallus sayısı/petri ve elde edilen embriyo sayıları incelenmiştir. Mikrospor kültürü için “Amadeo” çeşidi kallus ve embriyo oluşumu oranları ile “A117” çeşide göre öne çıkmıştır. Çalışmada daha sonra kullanılan çeşitlerde mikrospor kültürü yöntemini geliştirmek amacıyla arabinogalaktan proteinlerinin, absisik asidin ve farklı hormon konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. AGP etkisini belirlemek amacıyla 10 mg/l, 1 mg/l ve 0.1 mg/l olarak belirlenen dozların patlıcanda mikrospor kültürü üzerine etkileri değerlendirilmiş ve AGP uygulamasının kullanılan çeşitlerde mikrospor kültürü üzerine teşvik edici herhangi bir etkisinin bulunmadığı görülmüştür. ABA’in etkisini belirlemek amacıyla ön uygulama süresince farklı dozlarda ve sürelerde mikrosporlara uygulanmıştır. İlk olarak farklı doz ve sürelerde uygulanan ABA’in mikrosporlarda stres uygulaması ardından kontrole göre mikrosporlarda canlılık üzerine etkileri araştırılmıştır. Her iki çeşitte de kontrole göre tüm ABA konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin mikrosporlarda canlılık yüzdesini artırıcı etkisinin olduğu belirlenmiştir. “A117” çeşidinde en yüksek mikrospor canlılığı yüzdesi 0.1 mg/l ABA’in 24 saat süreyle uygulanmasından elde edilmiştir. Amadeo çeşidinde ise 1 mg/l ABA’in 24 saat süreyle uygulanmasıyla canlılık yüzdesinde artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlardan hareketle 35°C’de 3 günlük ön uygulamanın ilk 24 saatinde “A117” çeşidinde 0.1 mg/l ABA, “Amadeo” çeşidinde ise 1 mg/l ABA uygulanarak mikrosporlar standart protokole göre kültüre alınmıştır. Bir ay sonunda “A117” çeşidinde hem kontrol ortamından hem de ABA uygulaması yapılan ortamlarda herhangi bir kallus gelişimi meydana gelmemiştir. “Amadeo” çeşidinde ise toplam kallus ve 1 mm’den büyük kallus sayıları değerlendirildiğinde; kontrol grubuyla ABA uygulaması arasında istatistiki olarak farklılık önemli bulunmamıştır. Denemenin son aşamasında 2,4-D ve kinetinin farklı konsantrasyonlarını içeren 16 farklı ortam kombinasyonu hazırlanmış ve bu ortamların etkisi incelenmiştir. Araştırma sonunda “A117” çeşidinde toplam kallus sayısı ve 1 mm’den büyük kallus sayısı açısından en

etkili ortam 12 numaralı ortam (0.5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN) olarak belirlenirken, “Amadeo” çeşidinde en fazla toplam kallus sayısı ve 1 mm’den büyük kallus sayısı kontrol ortamından elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan mikrospor kültürü tekniği değerlendirildiğinde mikrospordan elde edilen kallus ve embriyolardan başarılı bir şekilde bitki elde edilmiştir. “A117” çeşidinden 36 kallusdan 18 bitki, “Amadeo” çeşidinden ise 70 adet kallusdan 25 bitki elde edilmiştir. Mikrospor kültüründen elde edilen kalluslardan geliştirilen bitkilerin flow sitometri analizleri sonucunda ise bitkilerin ploidi seviyeleri diploid ve triploid olarak belirlenmiştir. Bu bitkilerde DH bitki oranı “A117” çeşidinde % 68 olarak, “Amadeo” çeşidinde ise % 60 olarak belirlenmiştir. Mikrospor kültüründen elde edilen embriyolardan ise yalnızca haploid bitkiler elde edilmiştir. Mikrospor kültüründen elde edilen bitkiler dış koşullara aktarılmış ve daha sonra arazi koşullarına dikilerek meyveleri olgunlaştığında meyveler hasat edilmiş bunlardan tohum üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tohumlar tekrar ekilerek bunlardan double haploid homozigot hatlar elde edilmiştir

**ANAHTAR KELİMELER:** Haploid, Mikrospor kültürü, Mikrospor embriyogenesis, Patlıcan, *Solanum melongena* L.

**JÜRİ:** Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF DIFFERENT APPLICATION TO INDUCE HAPLOID EMBRYO AND PLANT FORMATION ON EGGPLANT (*Solanum melongena* L.) MICROSPORE CULTURE

Buse ÖZDEMİR ÇELİK

PhD Thesis in Department of Horticulture Science

Supervisor: Prof. Dr. A. Naci ONUS

September 2018; 86 pages

In the study, two F<sub>1</sub> ("A117" and "Amadeo") eggplant cultivars were studied on the possibilities of obtaining haploid and DH plants by microspore culture. For this purpose, microspores were firstly isolated from the anthers of the appropriate microspore developmental stage (mostly vacuole microspores and young twin pollen) and subjected to pretreatment application at 35°C for 3 days in dark conditions. Afterwards microspores were incubated with 2 % sucrose, 0.5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP, pH 5.9, and incubated in the dark at 25°C for one month. At the end of one month in order to determine the responds of cultivars to microspore culture, percentage of alive microspores at 1st day of microspore isolation, percentage of alive microspores at the end of 3rd day after pretreatment, number of total calli/petri, 1 mm at the end of culture (1st day) number of callus/petri and number of embryos obtained were evaluated. Experimental results revealed that "Amadeo" was prominent in a comparison to "A117" variety in terms of callus and embryo formation rates. Later on in the study, the effects of arabinogalactan proteins (AGPs), abscisic acid (ABA) and different hormone concentrations were investigated in order to improve the microspore culture method. To determine the AGPs effect on microspore culture, different of doses (10 mg/l, 1 mg/l and 0.1 mg/l) were evaluated and AGP application was found to have no stimulating effect on microspore culture in the cultivars used. ABA was applied to microspores at different doses and durations throughout the pre-treatment period to determine ABA effects. First of all, after stress pre-treatment, the effects of ABA applied at different doses and durations was compared with control group in terms of microspore viability. It was determined that all applied ABA concentrations and durations in both cultivars enhanced the microspore viability percentage. The highest percentage of microspores viability percentage in the "A117" was obtained by application of 0.1 mg/l ABA for 24 hours. In the "Amadeo" cultivar, the increase in the viability percentage was recorded when 1 mg/l ABA was applied for 24 hours. Based on these findings, microspores were cultured in accordance with standard protocol with applications of 0.1 mg/l ABA for in "A117" and 1 mg/l ABA for in "Amadeo" cultivar in the first 24 hours of 3 days pre-treatment at 35°C. At the end of one month, no callus development occurred in the "A117" in both control and ABA application. When the total callus and callus numbers greater than 1 mm were evaluated in the "Amadeo" cultivar, no statistically significant difference was found between the control group and ABA applications. In addition to AGPs and ABA applications, effects of different doses of 2,4-D and kinetin added to media were investigated. For this purpose, 16 different media combinations containing different concentrations of 2,4-D and kinetin were prepared. At the end of the study,

while the most effective medium in terms of total number of calli and number of calli bigger than 1 mm was media 12 (0.5 mg / l 2,4-D +1 mg / l KIN), control medium gave the best result in terms of total number of calli and number of calli bigger than 1 mm for Amadeo. When the microspore culture technique used in the study was evaluated, the plantlets were successfully obtained from the calli and embryos obtained from microspores. A total of 18 plants from 36 calli for “A117” cultivar and 25 plants from 70 calli were obtained for “Amadeo” cultivar. The flow cytometry analyzes of the plants developed from the calli obtained from microspore culture revealed that the ploidy levels of obtained plants were diploid and triploid. The DH plant percentage of plants obtained from calli was determined as 68 % in the “A117” cultivar and 60 % in the “Amadeo” cultivar. On the other hand, only haploid plants were obtained from the embryos obtained from microspore culture. The plants obtained from the microspore culture were transferred to field conditions for selfing. After selfing obtained seeds were planted in the field conditions and the fruits were harvested when the fruits were mature. The obtained seeds were re-seeded to obtain double haploid homozygous lines.

**KEYWORDS:** Eggplant, Haploidy, Microspore Culture, Microspore Embryogenesis, *Solanum melongena* L.

**COMMITTEE:** Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM



## ÖNSÖZ

Tarih boyunca, kültür bitkilerinin kalitesi ve verimini iyileştirmek ve aynı zamanda farklı çevre koşullarına en uygun türleri seçmek için büyük çaba sarf edilmiştir. Bitkilerin doğrudan veya dolaylı olarak insanoğlu için birincil enerji ve besin kaynağı olması nedeniyle, bitki ıslahı bilimsel araştırmaların odak noktası olmuştur. Klasik bitki ıslahı yöntemlerinin uzun yıllardan beri kullanılmasıyla üstün verimli ve kaliteli birçok çeşit geliştirilmiş olmasına karşın, başta hastalık ve zararlılar olmak üzere bazı biyotik ve abiyotik koşullara karşı dayanıklılıkta henüz istenilen sonuç alınamamıştır. Bunu yanında klasik bitki ıslahı ile istenilen verim ve kalitede yeni çeşitlerin elde edilmesinde; ıslah çalışmalarının uzun yıllar alması, hibrit üretiminin zorluğu, yurtdışından tohum girişi gibi karşılaşılan bazı kısıtlamaların yanında, özellikle ıslah süreçlerini kısaltmak için doku kültürüne dayalı biyoteknolojik yöntemler geliştirilmiştir. Bu biyoteknolojik yöntemlerden haploid bitki elde etme yöntemleri ıslah çalışmalarında kullanılan biyoteknolojik yöntemlerin başında gelmektedir.

Bu çalışma ile haploid bitki elde etme yöntemlerinden biri olan mikrospor kültürü yöntemi ile patlıcanda haploid ve DH bitki elde etme olanakları üzerine çalışılmıştır. Bu amaçla farklı çeşitlerin bu yöntemle tepkisinin, farklı hormon konsantrasyonlarının, arabinogalaktan proteinleri ve abisik asit uygulamalarının patlıcanda mikrospor kültürü üzerine etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Ancak her türde mikrospor kültürü yoluyla kallus veya embriyo oluşumu sağlamamaktadır. Bazı türlerde mikrospor kültüründen bazı türlerde ise anter kültüründen daha yüksek başarı elde edilmektedir. Bu amaçla kullanılan çeşitlerin mikrospor embriyogenese tepkisinin belirlenmesi için anter kültürü çalışması da yapılarak bu iki yöntem patlıcanda mikrospor embriyogenese indüksiyonu açısından değerlendirilmiştir.

Doktora tezimde mikrospor kültürü konusunda çalışma fırsatı sağlayan ve çalışmalarım boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. A. Naci ONUS'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez İzleme Komitesi'nde yer alarak bana destek olan Sayın Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU ve Sayın Prof. Dr. Ersin POLAT'a teşekkürlerimi sunarım. Tezimin flow sitometri analizleri için göstermiş olduğu her türlü yardım ve katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Metin TUNA'ya, bitkisel materyalin yetiştirilmesi ve tomurcukların temininde özellikle Ziraat Yüksek Mühendisi Ahmet SEÇİM'e ve tüm GENETİKA Tohumculuk Firması çalışanlarına, eğitim hayatım boyunca yardımlarını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda görevli hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve idari personeline sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı bursiyeri olarak, tez çalışmalarımın bir bölümünü yurtdışında gerçekleştirme olanağı tanıyan TÜBİTAK- Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na sağladıkları destek için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca gösterdiği büyük anlayış, sabır ve desteğinden dolayı sevgili eşim İlker ÇELİK'e, her zaman yanımda olan sevgi, emek ve dualarını esirgemeyen annem Fatma ÖZDEMİR'e, babam Mehmet ÖZDEMİR'e, ablam Eylem ÖZDEMİR'e ve tüm aileme teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK TARAMASI .....	10
2.1. Mikrospor Embriyogenesis.....	10
2.2. Mikrospor Embriyogenesisi Etkileyen Faktörler.....	14
2.2.1.Genotip.....	14
2.2.2. Donör bitkinin yetiştirme koşulları ve fizyolojik durumu.....	17
2.2.3. Mikrospor/Polen gelişim aşaması.....	18
2.2.4. Kültür öncesi uygulanan stres uygulamaları.....	20
2.2.5. Besin ortamının içeriği ve yapısı.....	23
2.2.6. Kültür koşulları.....	31
2.2.7. Bitki rejenerasyonu.....	31
2.2.8. Kromozom katlama ve ploidi belirleme.....	32
3. MATERYAL VE METOT .....	34
3.1. Materyal .....	34
3.2. Metot .....	34
3.2.1. Mikrospor/polen gelişim aşamasının belirlenmesi.....	34
3.2.2. Sterilizasyon .....	35
3.2.3. Mikrospor kültürü.....	36
3.2.3.1. Mikrosporların izolasyonu.....	36
3.2.3.2. Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi .....	37
3.2.3.3. Mikrospora uygulanan ön uygulama.....	38
3.2.3.4. Mikrosporların kültüre alınması .....	38

3.2.3.4.1. Arabinogalaktan proteinleri denemesi.....	39
3.2.3.4.2. Absisik asit denemesi .....	40
3.2.3.4.3. Farklı hormon konsantrasyonları denemesi.....	40
3.2.3.5. Sitolojik gözlemler.....	41
3.2.3.6. Bitki rejenerasyonu.....	41
3.2.4. Anter kültürü.....	41
3.2.5. Flow sitometri analizleri.....	43
3.2.6. Kromozom katlaması ve bitkilerin dış koşullara alıştıırılması.....	44
3.2.7. Deneme sonuçlarının dğerlendirilmesi.....	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	46
4.1. Mikrospor/Polen Gelişim Aşamasının Belirlenmesi.....	46
4.2. Mikrospor Kültürü.....	49
4.2.1. Arabinogalaktan proteinlerinin etkisi.....	58
4.2.2. Absisik asit etkisi.....	59
4.2.3. Farklı hormon kombinasyonlarının etkisi.....	61
4.2.4. Bitki rejenerasyon oranı.....	64
4.3. Anter Kültürü.....	66
4.4. Flow Sitometri Analiz Sonuçları.....	68
5. SONUÇLAR .....	74
6. KAYNAKLAR .....	76
ÖZGEÇMİŞ	

## AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Farklı Uygulamaların Patlıcan (*Solanum melongena* L.)’da Mikrospor Kùltürü ile Haploid Embriyo ve Bitki Üretimi Üzerine Etkileri” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

12/09/2018

Buse ÖZDEMİR ÇELİK

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°C	: Santigrad derece
cm	: Santimetre
da	: Dekar
g	: Gram
ha	: Hektar
M	: Molar
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
mg	: miligram
mg/l	: Miligram/litre
ml	: Mililitre
µl	: mikrolitre
µm	: Mikrometre
N	: Normal
l	: Litre
%	: Yüzde
dk	: Dakika
.	: Ondalık ayraç

### Kısaltmalar

ABA	: Absisik asit
AGP	: Arabinogalaktan proteinleri
2,4-D	: 2,4-dikloro fenoksi asetik asit
BAP	: Benzil amino pürin
CaCL <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	: Kalsiyum klorür dihidrat

$\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	: Kalsiyum nitrat tetrahidrat
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	: Kobalt klorür heptahidrat
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	: Bakır sülfat pentahidrat
DAPI	: 4',6-Diamidino-2- Phenylindole, Dihydrochloride
DH	: Double haploid
F <sub>1</sub>	: Filial Generation 1
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
$\text{H}_3\text{BO}_3$	: Borik asit
HCl	: Hidroklorik asit
IAA	: Indol-3-asetik asit
KI	: Potasyum iyodür
KCl	: Potasyum klorür
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	: Potasyum fosfat
KIN	: Kinetin
$\text{KNO}_3$	: Potasyum nitrat
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Magnezyum sülfat hekzahidrat
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	: Mangan sülfat tetrahidrat
MS	: Murashige ve Skoog (1962)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Mono sodyum fosfat
$(\text{NaH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$	: Amonyum sülfat
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	: Disodyum molibdat hidrat
NAA	: Naftalen asetik asit
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	: Sodyum EDTA
NaOH	: Sodyum hidroksit
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Demir sülfat
NaFeEDTA	: Sodyum demir EDTA

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	: Amonyum nitrat
NLN	: Nitsch ve Nitsch (1967) tarafından geliştirilen Lichter (1981,1982) tarafından modifiye edilen besin ortamı
PEG	: Polietilen glikol
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Çinko sülfat heksahidrat
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> <i>In vivo</i> mikrospor/polen gelişimi ve mikrospor embriyogenesis indüksiyonu (Segui-Simarro ve Nuez 2008).....	11
<b>Şekil 2.2.</b> Mikrospor embriyogenesisin farklı gelişim yollarının şematik gösterimi. A, C ve E'de içi dolu daireler generatif hücreyi, içi boş daireler vejetatif hücreyi temsil etmektedir. C'de içi boş daire içine alınmış içi dolu daireler iki çekirdek arasındaki çekirdek füzyonunu göstermektedir. B ve D' de daireler ilk haploid mitoz gerçekleşmeden simetrik bölünen çekirdekleri temsil etmektedir (Raghavan 1997) .....	13
<b>Şekil 3.1.</b> Serada yetiştirilen patlıcan çeşitlerinden bir görünüm a) Amadeo F <sub>1</sub> çeşidi b) A117 F <sub>1</sub> çeşidi.....	34
<b>Şekil 3.2.</b> Steril kabin içinde sıvı besi ortamı sterilizasyonu .....	35
<b>Şekil 3.3.</b> Mikrosporların anterlerden izolasyonu a) Steril kabin içerisinde anterlerin sterilizasyonunun yapılışı b) Mikrospor izolasyonu amacıyla anterlerin ezilmesi c) Anter dokularının uzaklaştırılması amacıyla mikrospor süspansiyonunun süzülmesinde kullanılan 40 µm filtre sistemi d) Mikrospor pelleti elde etmek amacıyla santrifüj tüplerine alınan mikrospor süspansiyon .....	36
<b>Şekil 3.4.</b> Thoma lamının şematik çizimi .....	37
<b>Şekil 3.5.</b> Thoma lamında sayım yapılan kareler.....	38
<b>Şekil 3.6.</b> Flow sitometri için preparatların hazırlanışı.....	43
<b>Şekil 3.7.</b> Bitkilere <i>in vitro</i> kolhisin uygulaması ve köklendirme ortamına alınması.....	44
<b>Şekil 3.8.</b> Kolhisin uygulanması için kök kısımları alınmış bitkicikler.....	45
<b>Şekil 3.9.</b> Dış koşullara aktarılmadan önce köklenme gerçekleşen bitkiler .....	45
<b>Şekil 4.1.</b> <i>In vivo</i> mikrospor/polen gelişim aşamaları. a) tetrat b) genç mikrosporlar c) orta-geç mikrosporlar d) *vakuol mikrosporlar e) *genç çift çekirdekli polen f) orta-geç ve olgun polen (*mikrospor kültürü için uygun gelişim aşamaları.....	48
<b>Şekil 4.2.</b> A117 çeşidine ait farklı anter uzunluklarında bulunan farklı mikrospor/polen gelişim evrelerinin dağılımı.....	49
<b>Şekil 4.3.</b> Amadeo çeşidine ait farklı anter uzunluklarında bulunan farklı mikrospor/polen gelişim evrelerinin dağılımı .....	49
<b>Şekil 4.4.</b> Kültüre alınan vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polen .....	50
<b>Şekil 4.5.</b> Normal gametofitik gelişim gösteren polen (↖) ve gelişimlerini durduran mikrosporlar (↘) .....	51
<b>Şekil 4.6.</b> Mikrosporlarda görülen “yıldız benzeri” yapı.....	51
<b>Şekil 4.7.</b> Sporofitik gelişim gösteren mikrosporlarda simetrik bölünme .....	52



<b>Şekil 4.8.</b> Sporofitik gelişim gösteren ve bölünen mikrosporların ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....	52
<b>Şekil 4.9.</b> Sporofitik gelişim gösteren ve bölünen mikrosporlarda dört ve daha fazla hücreli mikrosporların flouresans mikroskop altındaki görüntüsü .....	53
<b>Şekil 4.10.</b> Sporofitik gelişim gösteren mikrosporlarda meydana çok çekirdekli yapılar ve globular embriyoların flouresans mikroskop altındaki görüntüsü .....	53
<b>Şekil 4.11.</b> Mikrospordan elde edilen kallus görüntüleri.....	53
<b>Şekil 4.12.</b> Amadeo çeşidinde mikrospordan elde edilen embriyolar .....	54
<b>Şekil 4.13.</b> A117 çeşidinde mikrosporların kültüre alındığı andaki canlılık oranlarını belirlemek amacıyla flouresans ve ışık mikroskobunda alınan görüntü .....	56
<b>Şekil 4.14.</b> A117 çeşidinde mikrospora stres uygulamasının ardından kültüre alınan mikrosporda canlılık oranlarını belirlemek amacıyla flouresans ve ışık mikroskobunda alınan görüntü.....	56
<b>Şekil 4.15.</b> Amadeo çeşidinde mikrosporların kültüre alındığı andaki canlılık oranlarını belirlemek amacıyla flouresans ve ışık mikroskobunda alınan görüntü .....	57
<b>Şekil 4.16.</b> Amadeo çeşidinde mikrospora stres uygulamasının ardından kültüre alınan mikrosporda canlılık oranlarını belirlemek amacıyla flouresans ve ışık mikroskobunda alınan görüntü.....	57
<b>Şekil 4.17.</b> Mikrospor kültüründen elde edilen 1 mm'den büyük kallusların rejenerasyon ortamına aktarılması .....	65
<b>Şekil 4.18.</b> Kallus rejenerasyon ortamında gelişen kallusların alt kültüre alınması .....	65
<b>Şekil 4.19.</b> Kalluslardan sürgün gelişimi ve elde edilen bitkicikler .....	66
<b>Şekil 4.20.</b> Patlıcanda anter kültürü a) Kültüre alınan anterlerde embriyo oluşumu b) Embriyoların rejenerasyon ortamına aktarılması c) Embriyolardan elde edilen bitkicikler d) Elde edilen bitkilerin dış koşullara alıştırılması.....	67
<b>Şekil 4.21.</b> Diploid patlıcan ve standart bitki (arpa) ile hazırlanan örneklerin oluşturduğu histogram görüntüsü.....	69
<b>Şekil 4.22.</b> Haploid patlıcan ve standart bitki (arpa) ile hazırlanan örneklerin oluşturduğu histogram görüntüsü.....	69
<b>Şekil 4.23.</b> Triploid patlıcan ve standart bitki (çavdar) ile hazırlanan örneklerin oluşturduğu histogram görüntüsü.....	70
<b>Şekil 4.24.</b> Amadeo çeşidinden elde edilen DH hatlar .....	71
<b>Şekil 4.25.</b> Amadeo çeşidinden elde edilen DH hatlar .....	72
<b>Şekil 4.26.</b> A117 çeşidinden elde edilen DH hatlar .....	73

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Son on yılda dünya patlıcan ekim alanı ve üretim miktarları* .....	2
<b>Çizelge 1.2.</b> Dünya üreticisi ilk 5 ülkenin yıllara göre ekim alanı ve üretim miktarları* .....	2
<b>Çizelge 1.3.</b> Türkiye bölgeler itibariyle patlıcan ekim alanı ve üretim miktarları*.....	3
<b>Çizelge 1.4.</b> Türkiye iller itibariyle patlıcan üretim miktarları* .....	4
<b>Çizelge 3.1.</b> Mikrosporların kültüre alınmasında kullanılan sıvı NLN ortamının bileşimi.....	39
<b>Çizelge 3.2.</b> Farklı hormon kombinasyonları denemesi için kullanılan 2,4 D ve kinetin konsantrasyonları .....	40
<b>Çizelge 3.3.</b> Dumas de Vault ve Chambonnet (1982) tarafından bildirilen “C” ve “R” ortamlarının kimyasal bileşimi .....	42
<b>Çizelge 4.1.</b> Patlıcan çeşitlerine ait canlı mikrospor oranları ve çeşitlerin mikrospor kültürüne tepkileri.....	55
<b>Çizelge 4.2.</b> A117 çeşidinde mikrospor kültürüne AGP'nin etkisi .....	58
<b>Çizelge 4.3.</b> Amadeo çeşidinde mikrospor kültürüne AGP'nin etkisi.....	58
<b>Çizelge 4.4.</b> ABA konsantrasyonu ve uygulama sürelerinin A117 çeşidinde ön uygulama sonrasında canlılık üzerine etkisi .....	60
<b>Çizelge 4.5.</b> ABA konsantrasyonu ve uygulama sürelerinin Amadeo çeşidinde ön uygulama sonrasında canlılık üzerine etkisi .....	60
<b>Çizelge 4.6.</b> ABA'in mikrospor kültürü üzerine etkisi.....	61
<b>Çizelge 4.7.</b> A117 çeşidinde farklı hormon konsantrasyonlarının toplam kallus ve 1mm'den büyük kallus sayısına etkisi .....	63
<b>Çizelge 4.8.</b> Amadeo çeşidinde farklı hormon konsantrasyonlarının toplam kallus ve 1mm'den büyük kallus sayısına etkisi .....	64
<b>Çizelge 4.9.</b> Patlıcanda anter kültürü sonuçları .....	67



## 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 ve bu türlerin çoğunluğu *Solanum* cinsine aittir (Knapp vd. 2004). Patlıcan, *Solanum melongena* L., *Solanaceae* ailesinin *Solanum* cinsine ait diploid ( $2n=2x=24$ ) bir sebze türüdür ve ülkemiz dahil pek çok ülkede ekonomik değere sahiptir. Patlıcanın dahil olduğu *Solanum* cinsi, domates, patates ve biber gibi ekonomik açıdan önemli bitkileri içermekte ve *Archaeosolanum*, *Bassovia*, *Leptostemonum*, *Lyciosolanum*, *Minon*, *Potatoe* ve *Solanum* olmak üzere yedi altcinsten oluşmaktadır. Patlıcan bu altcinslerin dördüne dahildir; *Leptostemonum*, *Solanum*, *Potatoe* ve *Archaeosolanum*. Altçins *Leptostemonum*, kültürü yapılan *S. melongena*, *S. macrocarpon* ve *S. aethiopicum* türleri de dahil olmak üzere birçok patlıcan türünü kapsamaktadır (Altaye 2015).

Patlıcan (*S. melongena* L.) dünyada eggplant, aubergine ve brinjal gibi belli başlı isimlerle yaygın olarak bilinirken diğer kültürü yapılan iki patlıcan türü gboma (*S. macrocarpon* L.) ve scarlet (*S. aethiopicum* L.) isimleriyle bilinmektedir. Kültürü yapılan patlıcan türleri ılıman iklim bölgelerinde tek yıllık iken tropik iklim bölgelerinde çok yıllık bir kültür bitkisidir. *S. melongena* L., yaygın olarak Asya ve Afrika kıtalarında olmak üzere Avrupa ve Amerika kıtalarında da üretilmekte ve kullanılmaktadır. *S. aethiopicum* L. ve *S. macrocarpon* L., bazı alanlarda özellikle Afrika kıtasında yerel olarak önemli kültür bitkileridir (Altaye 2015; Gramazio vd. 2018). Patlıcanın anavatanı Hindistan olarak ifade edilmekle birlikte, İndo-Burma orijinli bir bitki olarak tanımlanmakta ve ikinci derecedeki gen merkezinin de Çin olduğu yönünde kayıtlar bulunmaktadır. Patlıcan iyi bir vitamin ve mineral kaynağı olmasının yanı sıra toplam besin değeri bakımından da domates ile karşılaştırılabilir (Kalloo 1993).

Dünyada patlıcan üretim miktarı yıldan yıla artış göstermiştir. Çizelge 1.1'de görüldüğü gibi son on yılda dünyada patlıcan üretim miktarı önemli ölçüde artmış olup; 2016 yılına ait FAO verileri incelendiğinde dünyadaki toplam üretim miktarı 51 milyon tonu aşmıştır. 2007 yılında 1,653,708 ha alanda 37,632,732 ton üretim yapılırken, bu alan ve üretim miktarı 2016 yılında 1,793,978 ha alan ve 51,288,169 ton üretim miktarına ulaşmıştır. Bu durum ürünün gıda ve ekonomik değer açısından önemini göstermektedir. Dünyadaki en önemli patlıcan yetiştirici ülke 780,675 ha alandan 32,001,667 ton üretim miktarı ile Çin'dir. Hindistan, 664,000 ha alandan 12,552,000 ton üretim miktarı ile ikinci sırada yer almaktadır. Bunu 48,556 ha alanda 1,194,315 ton üretim miktarı ile Mısır takip etmektedir. Ülkemiz 44,829 ha alanda 854,049 ton üretim miktarı ile dördüncü sırada yer almaktadır (Çizelge 1.2). Dünyadaki en önemli patlıcan yetiştirici ülke olan Çin'in son on yıllık ekim alanı ve üretim miktarı değerlendirildiğinde ekim alanı 980,000 ha alandan 780,675 ha alana düşerken, üretim miktarı yaklaşık olarak iki kat artışla 17,500,000 tondan 32,001,667 tona yükselmiştir. Hindistan ve Mısır'da ekim alanlarının yanı sıra üretim miktarlarında da artış meydana gelmiştir. Ülkemiz ise patlıcan ekim alanını yaklaşık olarak iki kat artırmış olmasına rağmen üretim miktarını düşüren tek ülke olmuştur (Çizelge 1.2) (Anonim 1). Tarım ürünlerinde meydana gelen üretim artışı, ekim alanlarının ve/veya birim alandan elde edilen verimin artırılması ile mümkün olmaktadır. Bu durumda dünyadaki önemli patlıcan üretici ülkelerde ekim alanlarında bir azalma meydana gelmesine karşın artan

üretim miktarlarının, birim alandan elde edilen verimin artırılması ile mümkün olduğu düşünülmektedir.

**Çizelge 1.1.** Son on yılda dünya patlıcan ekim alanı ve üretim miktarları\*

Yıllar	Ekim Alanı (ha)	Üretim miktarı (ton)
2007	1,653,708	37,632,732
2008	1,606,351	39,811,457
2009	1,691,286	43,477,117
2010	1,717,642	44,073,890
2011	1,752,393	45,005,712
2012	1,803,765	46,951,760
2013	1,854,094	48,880,838
2014	1,853,340	49,976,051
2015	1,800,655	50,577,940
2016	1,793,978	51,288,169

\*: Anonim 1

**Çizelge 1.2.** Dünya üreticisi ilk 5 ülkenin yıllara göre patlıcan ekim alanı ve üretim miktarları\*

Ülkeler	2016		2011		2006	
	Ekim alanı (ha)	Üretim miktarı (ton)	Ekim alanı (ha)	Üretim miktarı (ton)	Ekim alanı (ha)	Üretim miktarı (ton)
<b>Çin</b>	780,675	32,001,667	736,130	26,507,000	980,000	17,500,000
<b>Hindistan</b>	664,000	12,552,000	680,000	11,896,000	559,700	9,364,300
<b>Mısır</b>	48,556	1,194,315	45,020	1,166,430	46,440	1,180,280
<b>Türkiye</b>	44,829	854,049	25,330	821,770	29,315	924,165
<b>İran</b>	24,783	677,730	19,078	563,715	17,965	464,189

\*: Anonim 1

Ülkemizin hemen hemen bütün bölgelerinde patlıcan yetiştiriciliği yapılmaktadır. Açıkta yazlık sebze olarak yetiştirilmekte, kış ve bahar aylarında ise örtüaltı tarımında yetiştiriciliği yapılmaktadır. TÜİK verilerine göre 2015 yılında ülkemizde yapılan 805,259 tonluk patlıcan üretimi içinde 365,637 ton üretim miktarı ile ilk sırayı Akdeniz Bölgesi almaktadır. Batı Karadeniz 116,629 ton üretim ile ikinci sırada yer alırken, bunu 96,359 ton üretim ile Ege ve 95,650 ton üretim ile Güneydoğu Anadolu Bölgesi izlemektedir (Çizelge 1.3). Ülkemizde patlıcan üretiminde Antalya ili ilk sırada bulunurken, bunu sırasıyla Mersin, Samsun, Hatay, Muğla ve Bursa illeri izlemektedir (Çizelge 1.4). Türkiye’de toplam patlıcan üretiminin % 31’i örtüaltında yetiştirilmektedir ve örtüaltı patlıcan yetiştiriciliğinin en yoğun olarak yapıldığı bölge Akdeniz Bölgesi’dir. Örtüaltı tarımı söz konusu olduğunda ise patlıcan, seralarda yetiştirilen ürünler sıralamasında domates, hıyar ve biberden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (Anonim 2).

**Çizelge 1.3.** Türkiye bölgeler itibariyle patlıcan ekim alanı ve üretim miktarları\*

<b>Bölgeler</b>	<b>Ekim Alanı (da)</b>	<b>Üretim miktarı (ton)</b>
<b>Akdeniz</b>	73,496	365,637
<b>Batı Karadeniz</b>	38,586	116,629
<b>Ege</b>	32,624	96,359
<b>Güneydoğu Anadolu</b>	34,984	95,650
<b>Doğu Marmara</b>	16,257	45,086
<b>Batı Marmara</b>	14,660	34,817
<b>Batı Anadolu</b>	6,673	19,035
<b>Ortadoğu Anadolu</b>	6,980	13,921
<b>Kuzeydoğu Anadolu</b>	2,807	3,960
<b>Orta Anadolu</b>	4,534	10,466
<b>Doğu Karadeniz</b>	2,086	2,890

\* Anonim 2

**Çizelge 1.4.** Türkiye iller itibariyle patlıcan üretim miktarları\*

İller	Üretim miktarı (ton)
<b>Antalya</b>	160,999
<b>Mersin</b>	112,842
<b>Samsun</b>	87,274
<b>Hatay</b>	47,456
<b>Muğla</b>	33,205
<b>Bursa</b>	32,144
<b>Adana</b>	29,920
<b>Gaziantep</b>	29,555
<b>Balıkesir</b>	25,909
<b>Şanlıurfa</b>	24,769
<b>İzmir</b>	23,035
<b>Diyarbakır</b>	20,256

\* Anonim 2

Patlıcan üretiminin yoğun olarak yapıldığı ülkelerde, patlıcan çeşitlerinin ıslahına yönelik çalışmalar önemli bir yer tutmaktadır. Nitekim patlıcanda geliştirilmiş olan hibrit çeşitler çok uzun yıllardan beri sürdürülen ıslah çalışmalarının bir sonucudur (Sekara vd. 2007). 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 kalite özellikleri nedeniyle önemli bir endüstri haline gelmiş ve üreticiler tarafından vazgeçilmez olmuştur. Klasik ıslah yöntemlerinden yararlanılarak patlıcan çeşitlerinin ıslahına yönelik çalışmaların ana hedefi; hastalık ve zararlılara, abiyotik stres koşullarına ve herbisitlere dayanım, partenokarpi, verimi, kalitesi ve besin değeri yüksek, pazar ihtiyaçları ve tüketici tercihlerine uygun çeşitler geliştirmektir. Sebze üretiminde verimin ve kalitenin daha yüksek düzeylere eriştirilebilmesi için yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Ancak dünyada ekonomik öneme sahip patlıcan çeşitlerinin genellikle biyotik ve abiyotik streslere karşı yeterli direnç düzeyine sahip olmaması üreticilere verim kaybı olarak yansımaktadır.

Dünyada ve ülkemizde sebze üretiminde halen yaygın olarak uygulanmakta olan klasik ıslah metotları ile geliştirilen hibrit çeşitler % 100 saf hatların melezlenmesiyle elde edilmektedir. Bitki ıslahında kullanılan klasik yöntemlerle, 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. Klasik bitki

ıslahı, üzerinde çalışılan popülasyondaki genetik çeşitlilik ile doğru orantılıdır ve bu çeşitliliğin daha da artırılması gerekmektedir. Ancak genetik tabanda meydana gelen daralma nedeniyle tür içi genetik çeşitliliğin sınırlı kalmasından dolayı klasik ıslah yöntemlerinden elde edilen başarı sınırlanmaktadır (Tanur Erkoyuncu 2013). Bunun yanında klasik ıslah çalışmalarıyla uzun yıllara ihtiyaç duyularak geliştirilen hibrit çeşitlerin elde edilmesinin zor ve maliyetli olması ve sürekli değişen pazar istekleri nedeniyle her ne kadar pek çok üründe uygulanıyor olsa da zaman ve kaynak kullanımı açısından dezavantajlara sahiptir. Patlıcanda klasik ıslah yöntemleri kullanılarak söz konusu stres faktörlerine karşı dayanıklılığın sağlanamaması yanında doku kültürü, genetik mühendisliği ve moleküler biyoloji gibi biyoteknolojik yöntemlerin doğrudan ve dolaylı olarak bitki ıslahında kullanılması, yeni çeşitlerin geliştirilmesinde yaşanan kısıtlamaların aşılmasında bu yöntemlerden yararlanma olanağı sağlamıştır (Kashyap vd. 2003). Bu nedenle günümüzde bitki ıslahı çalışmalarını hızlandıran ve tamamlayan biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılması gerekmektedir. Bitki ıslahında kullanılan bu yeni tekniklerden birisi, kısa sürede homozigot hatların elde edilmesine olanak sağlayan haploid (H) ve double haploid (DH) tekniğidir.

Haploid bitkiler, somatik hücrelerindeki kromozom sayısı ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilerdir. Haploid bir bitkinin kromozom sayısının (n) bazı kimyasal maddelerle iki katına çıkarılarak türün normal kromozom sayısına (2n) yeniden kavuşturulmasıyla normal gamet ve tohum üretimi sağlanmaktadır. Bu bitkiler ise ‘double haploid bitkiler’ olarak adlandırılmaktadır (Ellialtıoğlu vd. 2001).

Haploid bitkiler dış görünüş açısından kök, gövde, dal, yaprak, çiçek ve bazı durumlarda meyveler de vererek diploid bir bitkideki tüm organlara sahiptir ve normal gelişim göstermektedirler. Bununla birlikte haploid bitkiler morfolojik olarak diploidlerin küçültülmüş örnekleridir ve zayıf, güçsüz, bodur ve daha küçük yapılı bitkiler olup gelişimleri daha yavaştır. Yaprakları dar ve küçük, gövde ve dallarda boğum araları kısa ve çiçeklenme süresi daha uzun olmasına rağmen küçük çiçek açan, polen oluşturamayan bu bireyler kısırdir ve tohum bağlayamazlar. Plastid sayıları az, stomaları daha küçüktür ve birim alanda daha fazla stoma taşırlar (Emiroğlu 1982; Er 1992; Çağlar ve Abak 1999; Ellialtıoğlu vd. 2001). Haploid bitkiler bu özelliklerinden dolayı tarımsal açıdan önemli olmamalarına rağmen; bitki ıslahı, genetik, sitolojik, fizyolojik, biyolojik ve biyokimyasal çalışmalar için son derece önemli materyallerdir (Arı 2006).

Günümüzde çeşit geliştirme çalışmalarında kullanılan haploid bitki üretim teknikleri, bitki ıslahında önemli avantajlara sahiptir. Haploid bitkilerin en başta gelen avantajı, tam bir homozigotiyi çok kısa sürede elde etme olanağı sağlamasıdır. Homozigot hatları elde etmek için yabancı döllen türlerde 10-12 generasyon, kendine dölenen türlerde 5-7 generasyona ihtiyaç duyulan kendileme süresini bir generasyona indirerek mutlak homozigotluğu sağlar. Dioik türlerde veya kendileme depresyonu nedeniyle klasik yöntemlerle homozigotluğa ulaşmanın zor olduğu türlerde, çok yıllık meyve ağaçları ve orman bitkileri gibi uzun bir gençlik kısırlığı olan türlerde haploidi önem kazanmaktadır. Haploidi ile elde edilen saf hatlar F<sub>1</sub> hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilir (Ellialtıoğlu vd. 2001). DH bitkilerin genotipleri homozigot olduğundan heterozigot bitkilerde resesif olan karakterler homozigot olarak ifade edilebilir. Heterozigot genotiplerde resesif durumda birçok önemli gen bulunmakta ve



bu genler DH bitkilerde dominant genlerin etkisinden kurtulmuş olarak fenotipte ifade edilebilirler (Ellialtıoğlu vd. 2001; Coşkun 2011).

Haploidler doğada spontan olarak oluşabilmekle birlikte, oluşumları çeşitli yöntemlerle de uyartılabilir. Haploidlerin genetik ve bitki ıslahı açısından önemi uzun bir süredir bilinmekle beraber kullanımları, doğada kendiliğinden ortaya çıkış sıklığı çok düşük olduğundan, uzun bir süre kısıtlı kalmıştır. Doğada spontan sporofitik haploidler ilk kez *Datura stramonium* L. bitkisinde belirlenmiştir (Blakeslee vd. 1922) ve daha sonra birçok bitki türünde spontan haploidlere rastlanmıştır (Maluszynski vd. 2003; Dunwell 2010). Spontan haploidler doğada androgenesis, ginogenesis, semigami, polyembriyoni veya kromozom eliminasyonu yollarından birisi ile oluşmakta ve ortaya çıkma sıklığı % 0.001–0.01 gibi düşük seviyelerde kalmaktadır. Spontan haploidlerin oluşumu türlere ve hatta genotiplere göre değişmekle birlikte birçok türde ise doğal haploid oluşumuna hiç rastlanılmamaktadır. Pratik bir ıslah çalışması planlandığında bu spontan haploid bitkilerin oluşum oranı çok düşük düzeylerde kalmakta ve gereksinim duyulan haploid bitkilerin elde edilmesi için yetersiz olmaktadır. Haploid bitkiler ayrıca, uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlamamanın geciktirilmesi, abortif veya ışınlanmış polenlerle tozlama, sıcaklık şokları, değişik kimyasallar, hormon uygulamaları, “X” veya “UV” ışınları ile *in situ* uyartımla da elde edilebilir (Bal 2002; Arı 2006).

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 (ginogenesis); ya da mikrospor rejenerasyonu yoluyla erkek gametten (mikrospor embriyogenesis) *in vitro* koşullarda bitki oluşumunu sağlamaktır (Ellialtıoğlu 2000). *In vitro* uyartım metotlarından mikrospor embriyogenesisinde bitkinin erkek üreme organları (anter veya mikrospor), ginogenesisinde ise bitkinin dişi üreme organları (ovül veya ovaryum) yapay besin ortamlarında kültüre alınmaktadır. Her iki yöntemde de temel prensip; normal koşullarda mikrospor veya megaspor hücresinin gametofitik gelişimini durdurarak, çeşitli uyartılar yardımıyla embriyonik gelişmeye zorlamaktır (Arı 2006).

Bu çalışmada, *in vitro* haploid bitki elde etme yöntemlerinden olgunlaşmamış erkek gametofitlerden haploid embriyogenesis üzerine odaklanılmıştır. Gametik embriyogenesisin bu formunu tanımlamak için androgenesis, mikrospor embriyogenesis ve polen embriyogenesis dahil birçok farklı terim kullanılmıştır. Mikrospor veya polen embriyogenesis terimlerinin kullanımı bu sürecin başlamış olduğu yapıya bağlıdır (Raghavan 1986; Reynolds 1997; Touraev vd. 1997). Androgenesis terimi sıkça kullanılmasına rağmen bazı yazarlar bu terimden haploid bitkilerin *in vivo* koşullarda kendiliğinden oluşum şeklini ifade etmek amacıyla klasik olarak da kullanıldığı için kaçınılmaktadırlar (Olmedilla 2010; Soriano vd. 2013). Bu çalışmada, birçok yazar gibi embriyoyu oluşturan hücrelerin gelişim aşaması ne olursa olsun olgunlaşmamış erkek gametofitin *in vitro* kültürünü işaret eden ve daha yaygın olarak kullanılan “mikrospor embriyogenesis” terimi kullanılmıştır.

Mikrospor embriyogenesis, henüz olgunlaşmasını tamamlamamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş mikrosporları bulduran anterlerin *in vitro*

koşullarda kültüre alınmasıyla anter kültürü veya bu mikrosporların anterlerden izole edilerek somatik dokular olmaksızın doğrudan sıvı bir ortamda *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla mikrospor kültürü ile yapılmaktadır. Anter kültürü haploid üretimi için en yaygın kullanılan yöntemdir. Mikrospor kültürü ise anter kültürüne göre daha karmaşık bir yöntem olmasına karşılık genellikle tercih edilen bir yöntemdir. Mikrospor kültürü anter kültürünün bazı olumsuz özelliklerini ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir ve çeşitli avantajlar sunmaktadır (Ferrie ve Caswell 2011). Anter kültürü yoluyla mikrospor embriyogenesisin uyartılmasında yaşanan problemler değişik şekillerde olabilmektedir. Bunlardan en belirginini, anter duvarı ya da kültüre alma esnasında anterden uzaklaştırılmamış filament parçaları gibi somatik dokuların tek başına ya da mikrospor kaynaklı kallusla birlikte rejenerasyon olmasıdır. Böyle bir durumda kallus ya somatik dokudan meydana gelir ya da haploid ve somatik kallus birlikte rejenerasyon olur ve miksaploid rejenerantlar ortaya çıkabilir (Bal 2002). Mikrospor kültüründe ise anter duvarına ait içerik uzaklaştırıldığı için somatik hücrelerden rejenerasyon meydana gelme olasılığı tamamen ortadan kaldırılmaktadır. Anter kültüründe mikrosporlar ortamdaki besin maddelerini anter duvarından geçtikten sonra alabilmektedir. Mikrospor kültüründe ise mikrosporlar ortamdaki besin maddeleri ile doğrudan temas halinde olduklarından besin maddelerini daha iyi bir şekilde alabilmektedir. Ayrıca mikrosporların doğrudan gözlenmesi ile mikrospor kültüründe haploid verimi ve embriyogenesisinde rol oynayan faktörler daha iyi kontrol edilmektedir. Mikrospor/polen tanecikleri arasındaki rekabet kültür ortamında mikrospor yoğunluğunun optimize edilmesiyle azaltılabilmektedir. Bunların yanında mikrosporlar, gen transferi, mutasyon araştırmaları ve genetik manipülasyonlar, biyotik veya abiyotik kökenli stres koşullarına dayanıklılık amaçlandığında *in vitro* seleksiyon için anterlere göre daha uygun bir başlangıç materyalidir (Ellialtıoğlu vd. 2001; Omedilla 2010; Tuncer 2010; Coşkun 2011; Ferrie ve Caswell 2011). Mikrospor kültürünün avantajlarına rağmen, günümüzde birçok türde bu yöntemle haploid bitki rejenerasyonu sağlamak zordur.

Mikrospor embriyogenesis ile ilk *in vitro* haploid bitki oluşumu Guha ve Maheshwari (1964) tarafından *Solanaceae* familyasına ait *Datura innoxia* anterlerinde yapılan çalışma ile elde edilmiştir. Bu çalışmanın ardından kısa bir süre sonra *Nicotiana* bitkisinde anter kültürü ile haploid bitki elde edilmiştir (Nitsch ve Nitsch 1969). Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitkilerin elde edilmesi ilk kez *Nicotiana* bitkisinde anter dokusundan salınan mikrosporlardan (shed-mikrospor kültürü) Nitsch (1974) tarafından bildirilmiştir. 1982 yılında Lichter (1982), *Brassica* çiçek tomurcuklarından izole edilmiş mikrospor kültür sistemini geliştirmiştir. Bu öncü çalışmalardan sonra, bu olgu angiospermlerde 250'den fazla tür için bildirilmiştir (Maluszynski vd. 2003). Bunlardan yalnızca dört tanesi, kolza (*Brassica napus* L.), tütün (*Nicotiana tabacum* L.), arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve buğday (*Triticum aestivum* L.) model sistem olarak kabul edilebilecek yeterlilikte cevap vermiştir (Maraschin vd. 2005a). Ancak, *Solanaceae* familyasına ait bazı türlerde olduğu gibi agronomik olarak önemli birçok bitki hala mikrospor embriyogenesisine karşı inatçıdır ve bunun nedeni hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Segui-Simarro ve Nuez 2008).

Haploidinin uyartımı birçok türde uzun zamandan bu yana başarıyla uygulanıyor olmasına rağmen, benzer başarıyı *Solanaceae* familyasındaki patlıcan ve diğer bazı sebzelerde görmek bugüne kadar mümkün olmamıştır. *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 değerlendirilmesi sağlanmıştır. Şu anda rutin olarak ve kabul edilebilen bir verimlilikte DH bitkiler elde etmek için tütünde anter ve mikrospor kültürü protokolleri geliştirilmiştir. Patates ise model bir sistem olarak kabul edilmese de anter ve mikrospor kültüründen haploid indüksiyonu mevcuttur. Bu beş türden geriye kalan domates, biber ve patlıcan gibi agronomik olarak önemli olan türler ise mikrospor embriyogenesisine karşı inatçı türler olarak kabul edilmekte ve tanımlanmaktadır. Bazı durumlarda bu türlerde DH bitkiler elde edilmesine rağmen, sonuçlar tütünde elde edilen verimlilikten hala çok uzaktır (Segui-Simarro vd. 2011).

Patlıcanda haploid bitki üretimiyle sonuçlanan partenogenetik spontan haploid bitki oluşumu hiç bildirilmemiştir (Rotino 1996). Patlıcanın ekonomik önemine rağmen mikrospor embriyogenesis üzerine gelişmeler hala yetersiz görülmektedir. Patlıcan mikrospor embriyogenesis indüksiyonu için inatçı bir tür olarak değerlendirilmesine rağmen DH bitkiler elde etmek mümkündür. Ancak yöntemin etkinliği sınırlıdır ve indüklenebilir genotip sayısı hala yetersizdir (Segui-Simarro vd. 2011). Mikrospor embriyogenesisle ilgili olarak, bazı patlıcan genotiplerinde anter kültürü yoluyla olumlu sonuçlar elde edilmiştir ve anter kültüründen bitki rejenerasyonu üzerine ilk rapor 1973 yılında yayınlanmıştır (Raina ve Iyer 1973). İlk raporun yayınlanmasından sonra patlıcanda anter kültürü yoluyla haploid veya DH bireylerin elde edildiği çalışmalar farklı araştırma grupları tarafından bildirilmiştir (Isouard vd.1979; Dumas de Vaultx ve Chambonnet 1982; Misra vd.1983; Borgel ve Arnaud 1986; Rotino vd.1987; Tuberosa vd. 1987; Rotino 1996; Rotino vd. 2005; Alpsy ve Seniz 2007; Salas vd. 2011,2012; Başay vd. 2010; Başay ve Ellialtıoğlu 2013). Günümüze kadar anter kültürü üzerine yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda Dumas de Vaultx ve Chambonnet (1982) tarafından yayınlanan protokolün modifiye edilerek hazırlanmış versiyonlarına dayanarak DH hatlar elde edilmiştir. Patlıcanda anter kültürü ile yapılan bazı başarılı çalışmalara rağmen bu yöntemin pratik kullanımını kısıtlayan bir takım dezavantajlar bulunmaktadır (Segui-Simarro vd. 2011; Salas vd. 2012). Anter kültüründeki bu sınırlamaların mikrosporların doğrudan izolasyonu ve kültüre alınmasıyla aşılabileceği düşünülmektedir. Ancak mikrospor kültürünün sağladığı avantajlara rağmen patlıcanda mikrospor kültürü ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır (Gu 1979; Miyoshi 1996; Bal vd. 2009; Corral-Martinez ve Segui-Simarro 2012,2014).

Mikrosporları embriyogenesisine doğru saptırmada, indüklenebilir mikrospor sayısı ve mikrospor başına elde edilen embriyo sayısı her tür için farklı birçok faktörün etkisi altında bulunmaktadır. Genel olarak mikrosporların normal gamet üreten yollarından sporofitik gelişime doğru saptırma üzerine elde edilecek başarı genetik kontrol altında olduğu için mikrosporların alındığı donör bitkilerin genotipine bağlıdır. Diğer bir bölümü ise, mikrospor kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki koşullarla ilgilidir. Mikrospor kültüründe başarılı bir protokol elde edebilmek için bu faktörler optimize edilmelidir. Ekonomik açıdan önemli bitkilerde, bu faktörler hakkında bilgi eksikliği mikrospor embriyogenesis indüksiyonu ve DH bitki üretimi için güvenilir ve etkili bir yöntem elde etmede üstesinden gelinmesi gereken ciddi bir eksiklik olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu durum patlıcan için de geçerli bir durumdur.

Bu çalışma ile iki farklı patlıcan çeşidinde mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo ve bitki rejenerasyonu elde etmek için yöntemin optimizasyonunu sağlamak ve etkinliğini artırmak üzerine gereken araştırmaları yapmak hedeflenmiştir. 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 çalışmayla patlıcanda mikrospor kültürü tekniğinin tüm basamaklarında; tomurcuk ve anter uzunluğu ile mikrospor/polen gelişimi arasındaki ilişki, mikrospor kültürü ve bitki rejenerasyonu üzerine ayrıntılı çalışmalar yapmak ve özellikle farklı hormon konsantrasyonlarının, arabinogalaktan proteinlerinin (AGP) ve absisik asit uygulamalarının patlıcanda mikrospor kültürü üzerine etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Ancak her türde mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo oluşumu sağlanamamakla birlikte bazı türlerde mikrospor kültürü bazı türlerde ise anter kültüründen daha yüksek başarı elde edilmektedir. Bu amaçla kullanılan çeşitlerin mikrospor embriyogenesise tepkisinin belirlenmesi için anter kültürü çalışması da yapılarak bu iki yöntem patlıcanda mikrospor embriyogenesis indüksiyonu açısından değerlendirilmiştir.

## 2. KAYNAK TARAMASI

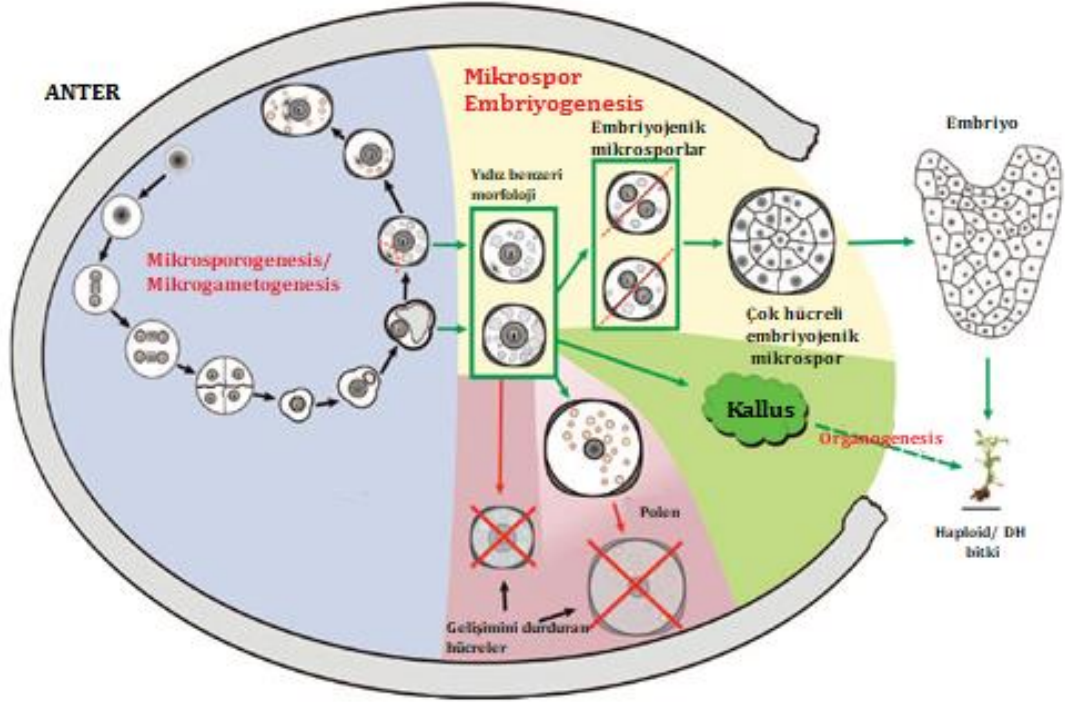
### 2.1. Mikrospor Embriyogenesis

Bitkilerde embriyogenesis üreme için başarılı bir strateji olarak zaman içinde gelişmiş benzersiz bir süreçtir (Maraschin vd. 2005a). Bitkilerin çoğunluğu tarafından embriyogenesis erkek ve dişi gametlerin birleşmesinden (döllenmeden) sonra ovülde meydana gelir ve tek hücreli zigot oluşumu ile başlar. Bitki embriyogenesisi zigottan başka çok çeşitli hücre tiplerinden *in vivo* veya *in vitro* gelişebilme yeteneğine sahiptir. Bitkiler zigot dışındaki hücrelerden embriyo oluşturma yeteneği de dahil olmak üzere yüksek düzeyde gelişimsel plastisite ile karakterize edilir. Bu olgu totipotensi olarak adlandırılır ve bitkiler hücrel totipotensi için olağanüstü bir potansiyele sahiptir (Reynolds 1997). Bitkilerde *in vitro* totipotensinin iki ana tipi bulunmaktadır ve eksplant kaynağına göre ayırt edilmektedir. Somatik embriyogenesis vejetatif dokulardan uyarılır ve donör bitki ile aynı ploidi seviyesinde ve genetik kompozisyonda bitkiler üretilir (Zimmerman 1993; Kashyap vd. 2003). Totipotensinin başka bir formu gametofitik embriyogenesisidir. Bunun için erkek ya da dişi gametler veya onlarla ilişkili yardımcı hücreler embriyo oluşturmak için uyarılır (Reynolds 1997; Bohanec 2009; Segui-Simarro 2010; Germana 2011a,2011b). Bu hücrelerin mayoz sonrası elde edilmesi nedeniyle kültürden elde edilen embriyolar bitkinin haploid segregant açılım generasyonunu oluşturmaktadır.

Bitkilerin yaşam döngüsü, haploid gametofit ve diploid sporofit generasyonların birbirini izlemesi yoluyla devam etmektedir. Sporofitler, erkek ve dişi gametlerin döllenme ürünüdür ve her bir ebeveynden gelen bir set kromozom içerir ve genomik yapısı  $2n$ 'dir. Gametofitik safhada ise anter lokuslarındaki mikrospor ana hücreleri, erkek gametofitlerin veya polen taneciklerinin oluşumuyla sonuçlanan mayoz ve mitoz bölünmeler geçirmektedir (Forster vd. 2007; Zheng 2003). Erkek gametofit gelişimi diploid mikrospor ana hücrelerinin mayoz bölünmesi sonucunda haploid mikrosporların oluşumuyla başlar ve mikrosporogenesis olarak adlandırılır. Bu mikrosporlar, mikrogametogenesis adı verilen diğer aşamada ise; her biri üç hücreli erkek gametofiti oluşturmak için iki mitotik bölünmeye maruz kalmaktadır. İlk mitotik bölünme, büyük bir vejetatif hücre ve küçük bir generatif hücreyi oluşturmak için tek hücreli mikrosporun asimetrik olarak bölündüğü birinci polen mitozudur (IPM). Daha sonra generatif hücre erkek gameti oluşturmak üzere ikinci polen mitozuna (IIPM) uğrar ve iki sperm hücresi ve bir vejetatif hücre ile üç hücreli polen taneciği meydana gelir (Bohajwani ve Razdan 1996; Reynolds 1997; Touraev vd. 1997; Borg vd. 2009). Türlerle bağlı olarak, IIPM anter içinde IPM'dan hemen sonra gerçekleşirken; bazı türlerde ise polen çimlenmesi sırasında gerçekleşmektedir (Reynolds 1997). Bazı stres faktörlerinin uygulanmasının sonucunda, mikrosporlar gametofitik safhadan sporofitik safhaya doğru bir gelişime saptırılabilir ve bunun sonucu olarak "embriyoid" adı verilen embriyo benzeri yapılar meydana gelebilmektedir (Reynolds 1997; Touraev vd. 2001). Bu haploid embriyolar, ya kendiliğinden ya da kromozom katlama maddeleri ile muamele edildikten sonra homozigot DH bitkilere dönüştürülebilir (Şekil 2.1).

Stres uygulamalarına maruz kalan mikrosporlar, normal gamet üreten yollarından saparak aşağıdaki yollardan birini takip etmektedirler. Birçok mikrospor hemen gelişimini durdurur ve/veya ölürken bazı mikrosporlar genellikle 14. ve 15. günde gelişimini durdurmadan ve ölmeden önce olgun poleni meydana getiren polen

benzeri gelişim tipini takip eder. Diğer bazılarının ise stres uygulamaları ile etkili bir biçimde bölünmeleri uyarılır, bazı durumlarda ve genotipe bağlı olarak, çok hücreli, haploid kallus benzeri yapılar meydana gelir. Uygun koşullar altında bunlardan organogenesis yoluyla haploid veya DH bitkiler üretmek mümkündür. Diğer mikrosporlar ise doğrudan embriyogenesis kararlıdır ve mikrospordan elde edilen embriyo haline gelmek için farklı seviyelerde birçok değişikliğe maruz kalırlar (Şekil 2.1) (Segui-Simarro ve Nuez 2008).



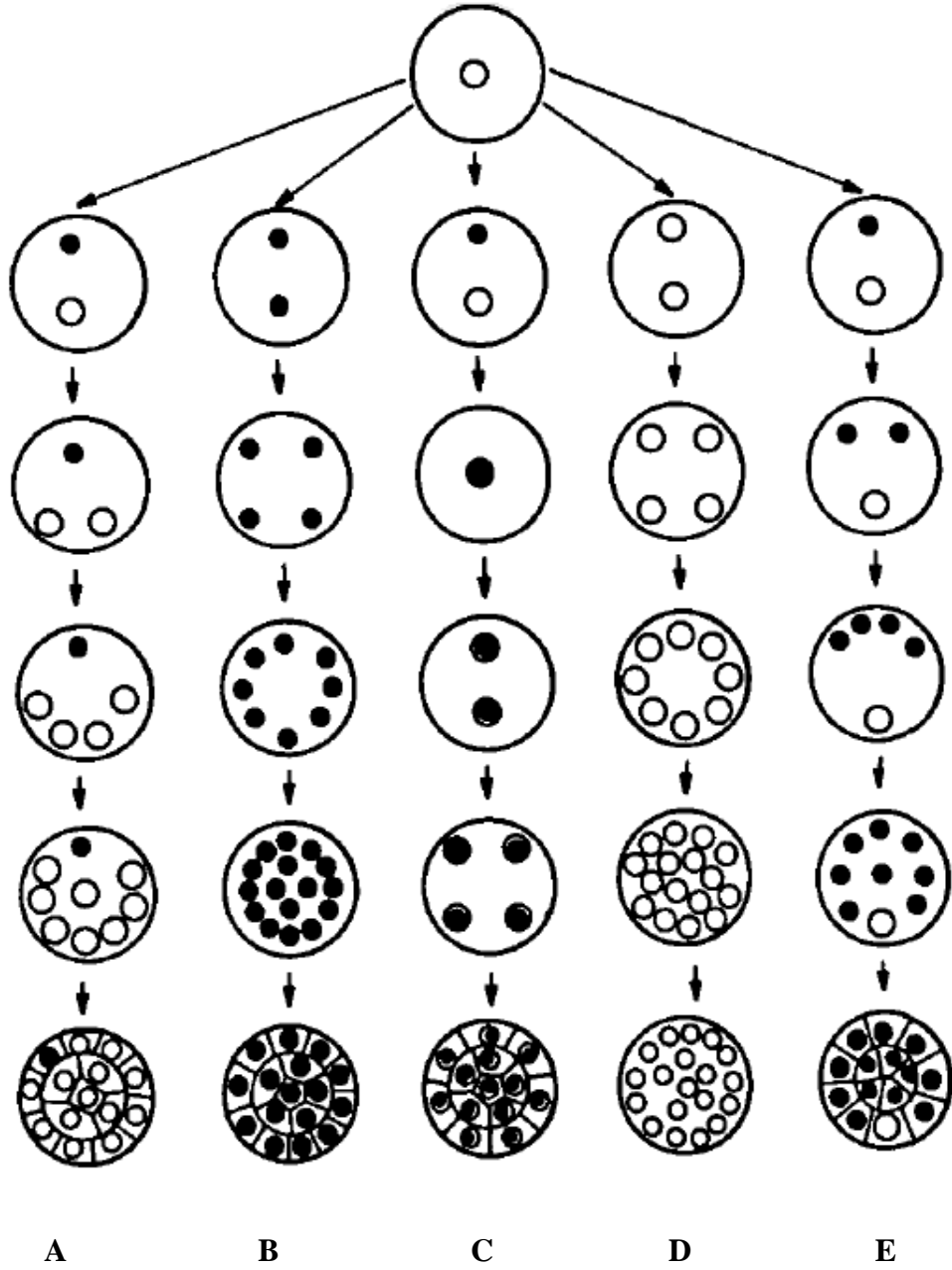
**Şekil 2.1.** *In vivo* mikrospor/polen gelişimi ve mikrospor embriyogenesis indüksiyonu (Segui-Simarro ve Nuez 2008)

Mikrospor embriyogenesis üzerine temel çalışmalar yalnızca kültüre alınan mikrospordan haploid bitkiler üretmek için model sistemler olarak kabul edilen kolza, arpa, tütün ve buğday olmak üzere birkaç bitki türünde detaylı olarak ele alınmıştır ve indüksiyon koşullarında mikrosporda meydana gelen değişikliklere ilişkin açıklamalar büyük oranda bu türler üzerinde yürütülen çalışmalara dayanmaktadır. Embriyonik gelişime yönelmiş bir mikrospor, erkek gametofite geliştirmekte olan normal bir mikrospor ile ayırt edilecek karakteristik özellikler göstermektedir. Bu ayırt edici özellikler ayrıntılı çalışmalar yapılan bitki türlerinin çoğunda yaygın olarak gözlemlenmiştir (Silva 2012).

Stres uygulamalarının ardından embriyonik hale gelmesi için indüklenen mikrosporların hücre boyutlarında bir artış meydana gelmektedir. Normal mikrosporların oldukça küçük boyutu ile karşılaştırıldığında stresle indüklenen mikrospordaki bu artış, genişleyen tüm hücrelerin embriyonik gelişim yoluna devam etmemesine rağmen genellikle embriyjenik yeterlilik elde etme ile ilişkili kabul edilmektedir ve birçok bitki

türünde embriyonik potansiyel kazanma ile ilişkili olmuştur (Hoekstra vd. 1992; Touraev vd. 1996a,b; Maraschin vd. 2005a). Hücre boyutunun yanı sıra, embriyonik potansiyelle ilişkili diğer bazı morfolojik işaretler de bulunmaktadır. Embriyonik gelişime doğru yönelen mikrosporlarda, çekirdek hücrenin merkezine doğru yeniden konumlanır ve vakuollerin etrafı sitoplazmik uzantılarla çevrenir. Bu birçok türde indüklenen mikrosporlarda embriyonik gelişimin erken geçici morfolojik işareti olarak kabul edilen “yıldız benzeri” bir morfoloji sağlar (Zaki ve Dickinson 1991; Touraev vd. 1996a,b; Touraev vd. 2001; Indrianto vd. 2001; Maraschin vd. 2005a,b). Bu yapıların daha sonra simetrik olarak bölünerek iki eşit çekirdek oluşturması genel olarak embriyonik gelişimle özdeşleşmiştir (Zaki ve Dickinson 1991). Ancak mikrosporların embriyonik gelişimde takip ettiği gelişim modu sadece tek çekirdekli aşamadaki mikrosporların simetrik bölünmesi şeklinde olmamakta, farklı gelişim modları da gözlenebilmektedir (Bal 2002).

Raghavan (1997) embriyo gelişimini desteklediği düşünülen mikrosporların takip edebileceği beş ana yolu tanımlamıştır (Şekil 2.2). Çok çekirdekli yapılar, tek çekirdekli mikrosporun simetrik bölünmesiyle (B yolu) veya genç polen taneciklerinde vejetatif hücre ve/veya generatif hücrenin bölünmesiyle meydana gelebilmektedir (A ve E yolları). Bunların dışında bazı bitkilerde, bölünmeden önce vejetatif hücre ile generatif hücre arasında nükleer füzyon meydana gelmesi (C yolu) ve bir sinsityum (D yolu) oluşumu da tanımlamıştır. Mikrosporun bölünmesi ile oluşan sporofitik yapılar genellikle *B. napus* (Zaki ve Dickinson 1991), buğday (Indrianto vd. 2001), arpa (Pulido vd. 2005) ve tütünde (Sunderland ve Wicks 1971) tespit edilmiştir. Tek çekirdekli mikrosporların gametofitik gelişimde, asimetrik olarak bölünmesiyle vejetatif ve generatif hücre meydana geldikten sonra sporofitlerin vejetatif hücrelerden oluşumu da yaygın olarak bildirilmiştir (Fan vd. 1988; Reynolds 1993; Sunderland 1974). Generatif ve vejetatif çekirdeklerden oluşan çok çekirdekli yapılar *B. napus* (Fan vd. 1988), soya fasulyesi (Kaltchuk-Santos vd. 1997), buğday (Reynolds 1993, Szakacs ve Barnabas 1988), tritikale (Gonzalez ve Jouve 2005) ve biber (Kim vd. 2004) dahil olmak üzere çeşitli türlerde bildirilmiştir. Bu farklı gelişim modları genellikle eksplant kaynağı olarak kullanılan erkek gametofitin gelişim evresi ve stres uygulamalarına bağlı olarak türlere göre değişen frekanslarda aynı kültürde bir arada bulunabilir. Bu gelişim yollarının tümünün canlı embriyoların oluşumuna yol açıp açmadığı hakkında hala çok fazla bilgi mevcut değildir. Örnek olarak, buğdayda olgunlaşmamış tek çekirdekli mikrosporun simetrik bölünmesinin embriyo oluşumuna yol açacağı ancak hem generatif hem de vejetatif çekirdeği içeren sporofitik yapıların kallus oluşumuyla sonuçlanacağı ileri sürülmektedir (Szakacs ve Barnabas 1988). Bununla birlikte, bu ve diğer türlerdeki bu sonucu destekleyecek çalışmalar halen eksiktir ve farklı bölünme yollarının embriyoların oluşumuna veya diğer gelişim yollarına katkısı bilinmemektedir.



**Şekil 2.2.** Mikrospor embriyogenesisinin farklı gelişim yollarının şematik gösterimi. A, C ve E'de içi dolu daireler generatif hücreyi, içi boş daireler vejetatif hücreyi temsil etmektedir. C'de içi boş daire içine alınmış içi dolu daireler iki çekirdek arasındaki çekirdek füzyonunu göstermektedir. B ve D'de daireler ilk haploid mitoz gerçekleşmeden simetrik bölünen çekirdekleri temsil etmektedir (Raghavan 1997)



## 2.2. Mikrospor Embriyogenesi Etkileyen Faktörler:

Diğer doku kültürü tekniklerinde olduğu gibi mikrosporlarda embriyonik yanıtı etkileyen birçok iç ve dış faktör vardır (Smykal 2000; Wang vd. 2000; Datta 2005; Dunwell 2010). Mikrosporları embriyogenese doğru saptırmada, her tür için farklı bir dizi faktör bir arada olmalıdır çünkü embriyogenesis sadece optimum koşullar geçerli olduğunda meydana gelmektedir. Mikrospor embriyogenesisinde embriyo indüksiyonu, olgunlaşması ve bitki rejenerasyonunun başarısı genotip, donör bitki fizyolojisi, mikrospor/polenin gelişim evresi, ön uygulamalar ve kültür koşulları gibi iç ve dış faktörlere bağlıdır.

### 2.2.1. Genotip

Donör bitkinin genotipi hem *in vitro* (Datta 2005) hem de *in vivo* (Prigge vd. 2012) haploid bitki üretiminin etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerdendir. Günümüze kadar çalışılmış bitki türlerinde; aynı familyadaki türler arasında, aynı zamanda bir tür içindeki çeşitler ve aynı çeşide ait bireyler arasında kallus ve embriyo rejenerasyonu açısından farklılıklar gözlenmiştir (Segui-Simarro ve Nuez 2008). Örneğin aynı familyada, *B. napus* gibi bir tür mikrospor embriyogenesis için model olarak kabul edilirken, *A. thaliana* gibi bir tür bu süreç için inatçı olabilmektedir (Olmedilla 2010). Aynı tür içinde de yüksek, düşük veya hiç yanıt vermeyen genotipler bulunmaktadır (Miah vd. 1985; Ferrie vd. 1995; Rudolf vd. 1999; Salas vd. 2011).

Tuberosa vd. (1987), 8 farklı patlıcan hattı ve bunların arasında yaptıkları melezlemelerden elde ettikleri 16 melez genotipte anter kültürü çalışması yapmışlardır. Anter kültürü çalışmasında Dumas de Valux ve çalışma arkadaşları (1981,1982) ve Chambonet (1985) tarafından önerilen protokol ve besi ortamı kullanılmıştır. 8839 adet anter kültüre alırken, bunların 4662 tanesi sera koşullarında ve 3977 tanesi tarla koşullarında yetişen bitkilerden elde etmişlerdir. Kullanılan 8 farklı patlıcan hattından kültüre alınan 100 anterden elde edilen en yüksek yeşil bitki oranı 13.7 olarak belirtilirken, bu oranı melez genotiplerde 32.1 yeşil bitki olarak bildirmişlerdir. Anter kültürü yoluyla elde edilen 328 bitkiden 77 adet DH, 250 adet haploid ve bir tane de triploid bitki elde edildiğini bildirmişlerdir.

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 mikrosporları içeren anterleri kültüre almışlardır. Besin ortamı olarak Chambonet (1985) tarafından önerilen ortamı kullanılmışlar ve ortama 5'er mg/l kinetin ve 2,4-D ile % 12 oranında sakkaroz 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 aktararak 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 veya embriyo benzeri bir farklılaşma olmadığı yalnızca kallus dokusunun geliştiğini bildirmişlerdir. Böylece patlıcanda anter kültüründe genotipler arasında androgenesis verilen yanıt bakımından farklılık bulunduğunu gözlemlemişlerdir.

Başay vd. (2010), yerli patlıcan çeşitleri “Topan-374”, “Aydın Siyahı”, “Halep Karası” ile “Teorem F<sub>1</sub>”, “Bonica F<sub>1</sub>”, “Munica F<sub>1</sub>” hibritleri ve ayrıca *S. torvum* ile *S. sodomium* yabancı türlerini yaz döneminde Yalova koşullarında serada yetiştirmişlerdir. Anter kültürü çalışmalarında Dumas de Valux ve Chambonnet (1982)’in önerdiği C ve R ortamlarını kullanmışlardır. Anterlere sıcaklık uygulaması için Karakullukçu (1991) tarafından bildirilen yöntemine göre önce 35°C’deki etüvde ilk 8 gün boyunca karanlıkta bekletmişler, daha sonra ise 25°C sıcaklık ve 16 saat gün uzunluğuna ayarlanmış iklim dolabına almışlardır. Bu ortamda 4 gün daha bekletilen anterler, 12. günden sonra R ortamına aktarılmıştır. 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 F<sub>1</sub>” 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 F<sub>1</sub> çeşidinde izlenmiştir. Anter kültüründe doğrudan embriyo oluşumu gerçekleşebildiği gibi bazen kallus oluşumunun ardından embriyo oluşumu da meydana gelebilmektedir. Teorem F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub>” çeşidinden elde edilmiştir. “Bonica F<sub>1</sub>” çeşidi % 14.29 oranında bitki oluşumuyla da en yüksek performansı göstermiştir.

Salas vd. (2011), 12 farklı patlıcan genotipinin anter kültürüne karşı tepkilerini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada, Dumas de Vault ve Chambonnet (1982)’in önerdiği protokolü kullanmışlardır. Deneme sonunda genotipleri elde edilen kallus, embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu açısından değerlendirmişlerdir. Kullanılan genotiplerden bir tanesi hariç tümünde 100 anterden 12.5-45.8 arasında değişen oranlarda kallus meydana geldiğini, ancak bu kalluslardan organogenesis veya embriyogenesis yoluyla bitki elde edilemediğini bildirmişlerdir. Kallus oluşumunun aksine; kullanılan genotipler arasında yalnızca 5 tanesinden (“ANS3”, “ANS26”, “Bandera”, “Ecavi” ve “IVIA371”) 100 anterden 0.7-60.9 arasında değişen oranlarda embriyo elde etmişlerdir. Bu genotiplerden elde edilen embriyolardan ise sadece “ANS26”, “Bandera” ve “Ecavi” ‘den sırasıyla 100 anterden 1.0, 2.7 ve 5.8 bitki elde edilebilmiştir. Ayrıca 3 ay boyunca “Bandera” çeşidinden elde edilen embriyoları flow sitometri ile analiz etmişlerdir. Elde edilen embriyoların % 17.9 ‘u haploid ve yaklaşık yarısı (% 46.4) diploid olarak belirlenmiştir.

Başay ve Ellialtıoğlu (2013) yılında yaptıkları çalışmada bazı patlıcan çeşitlerinin ve ıslah hatlarının anter kültürüne karşı tepkilerini ve androjenik performansı düşük ve yüksek genotipleri belirleyerek bu genotipleri birbiri ile

melezledikten sonra melez genotiplerin androjenik performansını değerlendirmişlerdir. *Verticillium dahliae* Kleb'e tolerans gösteren “Topan”, “Halep Karası” ve “Teorem F<sub>1</sub>” çeşitleri ile 2 ıslah hattı [“Vd-1” ve “Vd-2 (LS 2346)”] çalışmanın ilk bölümünde bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. Deneme sonucunda “Topan” ve “Halep Karası” çeşitlerinden sırasıyla % 4.16 ve % 2.63 oranında embriyo elde etmişler ve diğer kullanılan genotiplere göre androjenik kapasitelerinin daha iyi olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle “Topan” ve “Halep Karası” çeşitlerini donör ebeveyn olarak kullanmışlar ve diğer 3 genotiple (“Teorem F<sub>1</sub>”, “Vd-1” ve “Vd-2”) melezlemiştir. Denemelerde sadece “Topan × Teorem F<sub>1</sub>” ve “Teorem F<sub>1</sub> × Topan” melezlerinden sırasıyla % 0.87 ve % 2.57 embriyo oluşumu elde etmişlerdir. Haploid embriyo gelişimi ve bitki oluşumunun ise sırasıyla % 0.69 ve % 2.57 oranlarında olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma ile genotip farklılığının anter kültürü başarısında son derece etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2012), 4 farklı patlıcan genotipinin (“Bandera”, “Ecavi”, “ANS-3” ve “Cristal”) mikrospor kültürüne karşı tepkilerini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada, mikrosporları anterlerden izole edilerek Miyoshi (1996) tarafından bildirilen ortam ve protokole göre kültüre almışlardır. Mikrospor kültürü sürecini ışık mikroskobu ile izlemişler ve bu sürecin kullanılan dört genotip için benzer olduğunu bildirmişlerdir. Stres uygulanmasından 5 gün sonra, bazı mikrosporda mikrospor embriyogenesisin ilk morfolojik belirteçlerinden yıldız benzeri morfoloji ve simetrik bölünmeler tespit etmişlerdir. Diğer bazı mikrosporların ise gametofitik gelişime devam ederek, olgun polen benzeri yapılar haline geldiğini gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, mikrosporların çoğunun herhangi bir morfolojik değişim göstermediğini belirtmişlerdir. Kültürün ilk 5 günü içinde çok çekirdekli yapıları tanımlamışlardır. 15 ve 20. günler arasında bu çok hücreli yapılar, yuvarlak ve yoğun görünümleri ve farklılaşmış protoderm benzeri bir tabakanın varlığıyla açıkça ayırt edilebilen küresel embriyo benzeri yapılara dönüşmüştür. 20. günden sonra, küresel embriyo benzeri yapıların varlığının azaldığı ve embriyonik gelişimde daha fazla ilerleme kaydedilmediğini bildirmişlerdir. Bunun yerine mikroskobik kallus benzeri düzensiz yapıların varlığı artmıştır. Bir ay sonra tüm genotiplerden yalnızca kallus elde edildiğini bildirmişler ve her genotip için petri başına elde edilen kallus sayısına göre her çeşidin etkinliğini belirlemişlerdir. Mikrospor kültürüne yanıt açısından genotipler arasında farklılıklar gözlemlemişler ve en iyi yanıt veren çeşidin “Bandera” olduğunu belirlemişlerdir. Böylece, “Bandera” çeşidini bu ve daha sonraki çalışmalarda farklı analizler için referans bitki olarak seçmişlerdir.

Mikrospor embriyogenesis çalışmalarında her tür için androjenik kabiliyet açısından yüksek genotiplerin tanımlanması bu sürecin geliştirilmesi ve DH bitki üretiminin yararlı bir teknoloji haline getirilmesi için önemli bir adımdır. Bu, farklı türlerdeki birçok araştırmanın amacı olmuştur (Ferrie ve Caswell 2011). Örneğin, *Brassica napus* cv. Topas hattı DH4079 (Ferrie ve Keller 1995), *Brassica rapa* cv. CV-2 (Ferrie vd. 1995), arpada Igri çeşidi (Hoekstra vd. 1992) ve buğdayda Chris, Pavon 70 ve Bob White genotipleri (Kasha vd. 2003), temel ve uygulamalı araştırmalarda ve yeni çeşitlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan yüksek embriyonik genotiplerden bazılarıdır. Ancak ekonomik açıdan önemli diğer türlerde de yüksek oranda cevap veren genotiplerin tanımlanması bu sürecin daha iyi anlaşılmasına ve daha evrensel bir uygulamaya yol açacağı için arzu edilen bir olaydır. Patlıcanın dünya tarımındaki önemine rağmen yüksek embriyonik cevap veren türlerin sayısı hala çok sınırlıdır.

Rivas-Sendra vd. (2017) yaptıkları çalışmada “Bandera” çeşidinde mikrospor kültürü tekniğini kullanarak 80 DH bireyden oluşan bir popülasyon elde etmişlerdir. Bu DH popülasyonunda morfolojik karakterizasyon için yaprak, çiçek, meyve, tohum ve tohum çimlenme oranı özelliklerini değerlendirmişler ve aynı zamanda androjenik potansiyellerini belirlemek amacıyla anter ve mikrospor kültürü çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Donör bitki olarak kullanılan “Bandera” çeşidinden 100 anterden 146.5 embriyo elde etmişlerdir. DH bitkilerden ise 100 anter için 0 ile 237.5 arasında değişen oranlarda embriyo elde etmişlerdir. 237.5 embriyo/100 anter oranıyla en yüksek cevabı DH36 hattından elde etmişlerdir. Mikrospor kültüründe de aynı şekilde “Bandera” çeşidinden 65.1 kallus/ml elde ederken; DH36 hem “Bandera” çeşidinden hem de kullanılan diğer DH hatlardan 267.36 kallus/ml oranıyla en yüksek cevap veren genotip olmuştur. Böylece DH36 hattının temel ve uygulamalı araştırmalarda mikrospor embriyogenesis sürecinin çalışılmasını kolaylaştırmada model bir hat olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

### 2.2.2. Donör bitkinin yetiştirme koşulları ve fizyolojik durumu

Donör bitkinin genotipi mikrospor embriyogenesis için uygun olsa da, mikrospordan haploid embriyo oluşumunu elde edebilmek için; donör bitkinin fizyolojik evresi, büyüme koşulları, bitki yaşı ve anterlerin toplandığı bitkinin kısmı, mikrospor embriyogenesis indüksiyonunun etkinliğini etkileyen faktörler olarak bulunmuştur.

Donör bitkilerin fizyolojik evresi, haploid indüksiyonunun etkinliğini doğrudan etkilemektedir. Çiçeklenme periyodunun başlangıcında genç bitkilerden alınan anterlerin büyüme periyodunun daha geç dönemlerinde alınan anterlerden daha olumlu sonuçlar verdiği genel olarak kabul edilmektedir (Bhojwani ve Razdan 1996). Ancak *Brassica napus* L. ve *Brassica rapa* L.’da yaşlı bitkilerden alınan tomurcukların, embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu yeteneği bakımından genç ve sağlıklı bitkilerden elde edilenden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Takahata vd. 1991; Burnett vd. 1992).

Donör bitkilerin yetiştirildiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu ve kalitesi, günlük ışıklenme süresi, havadaki CO<sub>2</sub> konsantrasyonu ve bitkinin beslenme koşulları başta olmak üzere tüm çevresel faktörler donör bitkilerin fizyolojik süreçleri ve böylece mikrospordan elde edilecek başarı üzerine etkili olmaktadır (Ellialtıoğlu vd. 2001). Datta (2005) donör bitkilerin kontrollü çevre koşullarında yetiştirildiğinde, tarlada yetiştirilen bitkilere oranla daha yüksek rejenerasyon elde edilebileceğini bildirmiştir. Büyükalaca vd. (2004) biberde yaptıkları anter kültürü çalışmalarında; serada yetiştirilen bitkilerin açıkta yetiştirilen bitkilere göre daha yüksek performans gösterdiğini kaydetmişlerdir. Karakullukçu ve Abak (1992b) yaptıkları çalışmada, donör bitkilerin yetiştirilme koşullarının anter kültürü üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. 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. Ellialtıoğlu vd. (2001) göre ise genel olarak normal yetiştirme sezonunda ve açıkta yetiştirilen bitkilerin yetiştirme dönemi dışında, serada ve iklim odasında yetişen bitkilere oranla pek çok bitki türünde anter kültüründe başarı şanslarının yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Elliältiođlu vd. (2012), 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 alınmıştır. “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 edilmiştir. 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 (sporofitik polen) veya G poleni (gametofitik polen) olarak nitelendirilmiştir. İlk olarak yaz periyodunda Ankara koşullarında açık arazide, sonrada 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.

Aynı türe ait çeşitler ile yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar alınması donör bitkinin yetiştirme koşullarının mikrosporların verimi üzerine etkisini gözler önüne sermektedir. Dumas de Vault ve Chambenet (1982) “Dourga” adlı bir patlıcan çeşidinin anter kültüründe yüksek oranda haploid embriyo oluşturduğunu bildirirken; aynı çeşitle yapılan anter kültürü çalışmasında Tuberosa vd. (1987) ile Rotino vd. (1987) embriyo oluşturma yeteneği açısından düşük bir başarıya sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. Karakullukçu (1991) ise aynı çeşidin hiç embriyo oluşturmadığını bildirmiştir. Aynı şekilde Başay vd. (2010) yaptıkları çalışmada 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 edildiğini ve genotip etkisinin yanı sıra donör bitkinin yetiştirme koşullarının anter kültüründen alınan sonucu etkileyen önemli bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Yukarıda verilen diğer örneklerde de görüldüğü gibi ne yazık ki, genotip ve büyüme koşulları arasındaki etkileşimler de rol oynadığı için, tüm türlere veya genotiplere uygulanacak genel bir kural bulunmamaktadır.

### 2.2.3. Mikrospor/Polen gelişim aşaması

Mikrospor embriyogenesisin etkileyen en önemli faktörlerden birisi, kültürün başlangıcında mikrosporların/polenlerin içinde buldukları gelişim aşamasıdır. Çoğu bitki türü için, mikrosporların androjenik indüksiyona duyarlı oldukları zamanın, geç tek çekirdekli (vakuol) mikrosporları ve erken çift çekirdekli poleni içeren, ilk polen mitozundan hemen önceki ve hemen sonraki dönem içinde olduğu bildirilmiştir

(Reynolds 1997). Ancak bazı bitki türlerinde mayoz bölünmeyle birlikte tetratların oluşumundan başlayan ve I. polen mitozundan sonra nişasta depolanmasından hemen önceki döneme kadar süren bir zaman dilimi içinde olduğu belirtilmiştir (Summers vd. 1992; Binarova vd. 1997; Silva Lauxen vd. 2003; Segui-Simarro ve Nuez 2005; Bakos vd. 2007; Soriano vd. 2007). Ayrıca kültür koşullarıyla mikrospor embriyogenesisin uyarılmasında etkili olan uygun mikrospor/polen gelişim aşaması arasında bir ilişki bulunduğu da bildirilmiştir. Anter kültürü için indüklenbilir aşamanın mikrospor kültürüne göre daha erken aşamalarda olması gerektiği gösterilmiştir. Anter dokularının mikrosporlar için besin kaynağı olması ve strese karşı koruyucu etkisinden dolayı, erken aşamadaki mikrosporlar için daha iyi bir ortam sağlayabileceği belirtilmiştir. Anter duvarının mikrosporların kültür ortamıyla doğrudan ilişkisini engellemesi nedeniyle daha erken aşamaların kullanılmasıyla indüksiyon zamanının geciktirilmesi önerilmiştir (Duijs vd. 1992; Hoekstra vd. 1992; Salas vd. 2012).

Anterlerin içerdiği mikrosporların/polenlerin hangi gelişim aşamasında bulunduğunu belirlemek için en uygun morfolojik kriterlerden birinin tomurcuk veya anter uzunluğunun olduğu belirtilmektedir. Genel olarak birçok bitki türünde mikrospor/polen gelişim aşaması ile tomurcuk ve anter uzunluğu arasında yakın bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Kasperbauer ve Wilson 1979; Summers vd. 1992; Silva Lauxen vd. 2003; Segui-Simarro ve Nuez 2005; Salas vd. 2012).

Anterler içerisindeki mikrosporların/polenlerin gelişme dönemini tespit etmek amacıyla sitolojik gözlemler yapılması gerekmektedir. Ancak bazı türlerde mikrosporlar/polenler aynı anter içerisinde kültüre alma esnasında farklı gelişim safhasında bulunabilmektedir. “Asenkronize” gelişim olarak adlandırılan bu yapıdan dolayı doğru aşamadaki mikrosporları bulduran anterlerin ve tomurcukların morfolojik olarak tanımlanması, tomurcuk ve anterlerin seçimini daha hızlı ve güvenilir hale getirmektedir (Bal 2002; Segui-Simarro ve Nuez 2005; Bhowmik vd. 2011; Salas vd. 2012; Parra-Vega vd. 2013).

Karakullukçu ve Abak (1993a)’ın patlıcanda uygun tomurcuk aşamasını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 4 farklı çeşitte, 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 F<sub>1</sub>” 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 buldukları belirlenmiştir.

Salas vd. (2012), patlıcanda tomurcuk ve anter uzunluğu ile mikrospor/polen gelişim dönemi arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, mikrospor/polen gelişim aşamalarını 7 farklı aşamada (tetrat, genç, orta ve geç (vakuol)

mikrospor ve genç çift çekirdekli, orta-geç ve olgun polen) incelemiştir. Yapılan sitolojik gözlemler sonucunda, patlıcanda mikrospor ve polenlerin gelişim aşaması ile tomurcuk ve anter uzunluğu arasında bir ilişki olduğunu belirlemiştir. Kullanılan genotiplerde vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polen aşamasını en fazla yüzdeyle içeren tomurcuk ve anter uzunlukları, *S. aethiopicum* hariç tüm genotiplerde sırasıyla 8 ile 16 mm arasında ve 4 ile 7 mm arasında değiştiği, *S. aethiopicum* için ise 6 mm tomurcuk uzunluğunun ve 3 mm anter uzunluğunun uygun olduğu belirlenmiştir. Ayrıca en uygun mikrospor/polen gelişim aşamasını maksimum yüzdeyle içeren anterler, anter uzunluğunun kullanılmasıyla 1 mm kadar dar bir uzunluk aralığında belirlenebileceği için tomurcuk uzunluğuna göre daha hassas bir kriter olduğu bildirilmiştir. Denemede ayrıca patlıcanda mikrospor/polen gelişim aşamalarının anter ve mikrospor kültürü etkileri üzerine ayrıntılı bir çalışma yürütülmüştür. Mikrospor kültürü için en uygun aşamanın vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polen olduğunu, anter kültürü için ise genç ve orta-geç mikrosporların daha iyi yanıt verdiklerini belirtmişlerdir.

Summers vd. (1992) domateste anter kültürü üzerine yaptıkları çalışmada farklı mikrospor gelişim safhalarını (leptotene, zygotene, metaphase-I, tek çekirdekli ve çift çekirdekli) içeren 1.6-4 mm arasındaki uzunluklardaki anterlerin farklı genotiplerde anter kültürü üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışmada, anterler içerisinde bulunan mikrosporlar ne kadar erken safhada bulunurlarsa, o kadar fazla oranda kallus elde edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, sabah ve öğleden sonra olmak üzere gerçekleştirilen tomurcuk alım zamanının androjenik kallusların çap veya sayısına önemli bir etkisi bulunmazken; anter veya tomurcuk uzunluğunun androgenesis üzerine önemli etkisi olduğu ve uygun mikrospor safhasını belirlemede anter uzunluğunun tomurcuk uzunluğuna göre daha uygun bir kriter olduğu bildirilmiştir.

#### 2.2.4. Kültür öncesi uygulanan stres uygulamaları

Mikrospor embriyogenesis çalışmalarında mikrospor gelişimini gametofitik gelişimden sporofitik gelişime doğru yönlendirmek için, hemen hemen tüm türlerde tetikleyici bir stres uygulaması gerekli bir faktör olarak görülmektedir. Stres uygulamaları bitki, çiçek ve çiçek tomurcukları, kültüre alınan anterlere ve mikrospora uygulanabilir (Touraev vd. 1997). Mikrospor embriyogenesisi indüklemek için en yaygın kullanılan stres uygulamaları, sıcaklık şokları, şeker açlığı, kolhisin uygulamalarıdır. Ancak bazı durumlarda bu stres uygulamalarının bir kombinasyonu gerekebilmektedir (Shariatpanahi vd. 2006).

Sıcaklık şokları genellikle düşük ve yüksek sıcaklık uygulamaları şeklinde uygulanmaktadır. Genel olarak sıcaklık derecesi ve süresi türlere göre farklılık göstermektedir. Yüksek sıcaklık uygulamaları genellikle, birkaç saatten birkaç güne değişen bir süre boyunca 31 ila 37 °C arasındaki sıcaklıklarda anterlere veya izole edilmiş mikrospora uygulanmaktadır. Dumas de Vault ve Chambonnet (1982) patlıcanda anter kültüründen embriyo uyartımı için yüksek sıcaklık uygulamalarını denemişler ve embriyo oluşumu için gerekli bir uygulama olduğunu belirlemiştir. Soğuk şokları ise birkaç günden birkaç haftaya kadar 4 ila 10 °C'de gerçekleştirilir ve izole edilmiş mikrospora veya anterlere aynı zamanda tomurcuklara, çiçek salkımlarına ve hatta donör bitkiye uygulanabilmektedir (Islam ve Tuteja 2012; Shariatpanahi vd. 2006). Uygulanan soğuk şoku mikrospor embriyogenesisi tetikleme yanında yaşlanma sürecini yavaşlatarak mikrosporların hayatta kalma oranını

artırmaktadır (Shariatpanahi vd. 2006). Şeker açlığı, mikrosporları veya anterleri, mannitol gibi metabolize edilemeyen karbon kaynaklarını içeren ortamlarda kültüre alarak (Touraev vd. 1996b; Lantos vd. 2009) veya patlıcanda belirtildiği gibi distile su içerisinde mikrosporları doğrudan kültüre alınmasıyla uygulanabilir (Miyoshi 1996). Açlık stresinin mikrospor kültüründe ana etkenlerinden biri, normal olarak ilk polen mitozundan sonra gametofitik gelişimde vejetatif hücre, hücre döngüsünün G1 fazında duraklarken (Binarova vd. 1993); bu uygulamayla genç polen tanelerinde vejetatif çekirdek hücre döngüsüne yeniden girer ve hücre bölünmeleri meydana gelir (Zarsky vd. 1992). Bu stres uygulamaları dışında; atmosferik basınç, kolhisin, yüksek pH, gama ışınlanması, hipertonic şok, absisik asit uygulamaları, oksinler ve diğer bazı indükleyici kimyasallar gibi uygulamalar farklı türlerde bildirilmiştir (Maraschin vd. 2005a; Shariatpanahi vd. 2006).

Karakullukçu ve Abak (1992b), patlıcanda anter kültürü üzerine yaptıkları çalışmada, farklı sıcaklık şoklarının etkilerini araştırmışlar ve bu uygulamanın anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler arasında yer aldığını belirtmişlerdir. Araştırmada, kültüre alınan anterlerin bir kısmını 25°C, diğerlerini ise 30°C 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.

Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz (1999) tarafından yapılan çalışmada, Kemer patlıcan çeşidinde tomurcuklara soğuk şoku uygulaması ve besin ortamına ilave edilen aktif kömürün, anterlerdeki içsel ABA miktarı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Soğuk uygulamasının (+ 4°C de 80 saat ve + 9°C de 9 gün) ve aktif kömürün (% 0.1, % 1 ve % 2) anterlerdeki ABA miktarını azalttığını ancak embriyogenesis üzerine olumlu bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Ayrıca, anterlerdeki ABA miktarının az veya çok olmasının anter kültüründen elde edilen başarı üzerinde tek başına etkili bir faktör olmadığını bildirmişlerdir.

Miyoshi (1996), 3 farklı F<sub>1</sub> patlıcan çeşidi kullanarak yaptığı çalışmada, patlıcanda izole edilen mikrosporların kültürlere alınmasıyla 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 sakkaroz 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 sakkaroz içeren NLN ortamında kültüre alınmıştır. Stres uygulamasının ardından mikrosporlar % 2 sakkaroz ve 0.5 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren NLN ortamında karanlıkta yeniden kültüre alınmıştır. Yüksek sıcaklık ve sakkaroz açlığı uygulamalarının birlikte uygulanmasının (35°C'de 3 gün) izole edilen mikrosporlarda kallus oluşumunu teşvik ettiğini bildirmiştir. Mikrosporların kültüre alınmasından 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 edilmiştir. Elde edilen bitkilerde ploidi seviyesini belirlemek amacıyla 12 tane rastgele seçilmiş rejenerantların kök uçlarında kromozom sayımı gerçekleştirilmiştir. Rejenerantlardan sadece birinin



haploid, 7 tanesi diploid, 3 tanesi triploid ve bir tanesinin tetraploid olduğunu belirlemiştir.

Matsubara vd. (1992), anter kültürü yöntemi ile patlıcan ve biberde 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 2,4-D ve KIN içeren 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 2,4-D ve 0.1 mg/l KIN içeren ortamdan elde etmişlerdir. Patlıcandan elde edilen embriyoların kalluslardan gelişen embriyolar olduğunu, kök ucu kromozom sayımı ile bunların 35 tanesini haploid diğerlerinin diploid ve anöplid olduklarını belirlemişlerdir.

Bal vd. (2009) patlıcanda mikrospor kültürü üzerine yapmış oldukları çalışmada tütünde mikrospor embriyogenesi başlatmak için kullanılan bir protokolü modifiye ederek denemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmada, “Bambino” patlıcan çeşidinde geç tek çekirdekli ve çift çekirdekli mikrosporları B ortamında ön kültüre almış ve ardından 4°C, 25°C ve 33°C olmak üzere farklı sıcaklıklarda 2 gün boyunca inkübe etmişlerdir. Ön uygulamadan sonra, mikrosporlar 0.25 M maltoz içeren AT3 ortamında kültüre alınmış ve 25°C karanlıkta bekletilmiştir. Simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapıların varlığı bir ve iki hafta sonra DAPI ile boyanarak kontrol edilmiştir. Mikrosporlarda meydana gelen simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapılar yalnızca 32°C’de 2 gün ön uygulama yapılan 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. Böylece patlıcanda mikrospor kültüründe tütün için geliştirilen protokolün temel olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Tuncer (2010) beyaz baş lahanada (*B. oleracea* var. *capitata* subvar. *alba*), yaprak lahanada (*B. oleracea* var. *acephala*) ve süs lahanasında (*B. oleracea* var. *acephala* cv. Chidori Red F<sub>1</sub>) mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo elde etme olanakları üzerine çalışmışlardır. Bu amaçla NLN-13 ortamında izole edilip kültüre alınan mikrosporlarda haploid embriyo oluşumunu uyartmak amacıyla 2 sıcaklık (32°C ve 35°C’de 2 gün), 2 kolhisin dozu (50 mg/l ve 100 mg/l), ortam yenileme (NLN-16 / NLN-13, NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-16, NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-13) ile yaprak lahanada (100 Gy, 300 Gy) ve süs lahanasında (50 Gy, 75 Gy, 100 Gy, 300 Gy) gama ışını uygulamalarının etkisini araştırmışlardır. 12. ve 19. gün sayım ortalamalarına göre, embriyo oluşumunu uyartmada yaprak lahanada 35°C (5.0 embriyo/petri), Erciş lahanasında 32°C (4.3 embriyo/petri) etkili bulunmuş, “Yalova-1” baş lahanada çeşidi ve süs lahanasının ise sıcaklık yönünden seçici olmadığını saptamışlardır. Kolhisin ve sıcaklık uygulamalarının birlikte yapıldığı denemelerde doz ve sıcaklık etkilerinin bulunması nedeniyle faktörler bağımsız değerlendirilememiştir. Bununla birlikte “Yalova-1” baş lahanada çeşidinde 32°C+50 mg/l kolhisin (5.3 embriyo/petri), süs lahanasında 35°C+50 mg/l kolhisin (9.4 embriyo/petri) uygulamalarından daha yüksek embriyo sayısı elde edilmiştir. Yaprak ve süs lahanasında gama ışını uygulamalarının etkisi de sıcaklığa bağlı olarak değişim

göstermiştir. Işınlanmış tomurcukların 4°C’de kuru ve sıvı (NLN-13) ortamda bekletildiği uygulamalardan yaprak lahanada kuru, süs lahanasında ise sıvı koşullarda bekletmenin yine sıcaklığa bağlı olarak uyartımı sağlamada etkisi görülmüştür. Ortam yenileme uygulamalarının etkisi lahana türlerine göre farklılık göstermekle birlikte kolhisin katılmış ortam yenileme uygulamasının (Erciş lahanasında 3.9 embriyo/petri) daha etkili olabileceği görülmüştür. Süs lahanasının ise ortam yenileme uygulamasına olumlu cevap vermediğini bildirmişlerdir.

Coşkun (2011) dört farklı durum buğdayı *Triticum durum* Desf. cvs. “Kızıltan-91”, “Ç-1252”, “Mirzabey 2000” ve “Kundurdu-1149” genotiplerini kullanılarak yaptıkları çalışmada, mikrospor kültürü yoluyla embriyoid ve bitki rejenerasyonu elde etmede etkili bir protokol geliştirmeyi amaçlamışlardır. Ayrıca, mikrospor kültür tekniğine cevabının yüksek olduğu bilinen ekmeklik buğday genotipi *Triticum aestivum* L. cv. “Gün-91” çalışmada kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Makarnalık ve ekmeklik buğday genotiplerinde beş farklı önışlem uygulaması [1. soğuk önışlem (+4°C), 2. 0.4 M mannitol (+4°C) a. ovaryumsuz, b. ovaryum eklenmiş, 3. 0.4 M sorbitol (+4°C), 4. 0.4 M mannitol (oda sıcaklığı)] kullanılmıştır. Tüm genotiplerde bölünen mikrospor sayısına, embriyoid benzeri yapılara, 2 mm’den büyük ve küçük embriyoid sayısına, yeşil ve albino bitki rejenerasyonuna ve toplam bitki rejenerasyonuna ait sonuçlar karşılaştırılmıştır. Makarnalık ve ekmeklik buğday çeşitlerinde embriyoid oluşumu ve toplam bitki rejenerasyonunda en iyi sonuçlar 0.4 M mannitol ve +4°C önışlem uygulaması ile “Gün-91” çeşidinden elde edilmiştir. Makarnalık buğday genotipleri arasından ise en fazla embriyoid oluşumu “Kızıltan-91” çeşidinde görülmüştür. En fazla bitki rejenerasyonu “Kundurdu-1149” çeşidinden elde edilmiştir. Genotipler ile önışlem uygulamaları arasındaki etkileşimin önemli olduğunu bildirmişlerdir.

### 2.2.5. Besin ortamının içeriği ve yapısı

Mikrospor embriyogenesis tekniğinde kullanılan besin ortamı embriyo oluşumunda etkili faktörlerin başında gelmektedir. Mikrospor embriyogenesisine cevabın aynı türdeki farklı genotipler arasında bile farklılık göstermesinden dolayı, ortak bir besin ortamı kullanmak çok zor olmakla birlikte etkili bir kültür ortamı geliştirmek de kolay değildir. Bununla birlikte, W-14, NLN, AT3 ve A2 besin ortamları genellikle farklı türler için kullanılmaktadır. Örneğin, başlangıçta *Brassica napus* L. için geliştirilen NLN ortamı, *Apiaceae* ve *Solanaceae* familyalarına ait türlerde, tütün için geliştirilen A2 ortamı da buğdayda yapılan çalışmalarda kullanılmıştır (Murovec ve Bohanec 2012).

Mikrospor embriyogenesis üzerine besin ortamı bileşenleri, ortamdaki karbon ve azot kaynakları, bitki büyüme düzenleyicileri, ozmolarite ve ortamın pH’sı oldukça önemli rol oynamaktadır. Kültür ortamında karbon kaynağı olarak mikrospor kültüründe sıklıkla maltoz ve sakkaroz kullanılmakla birlikte, türü ve konsantrasyonu türlere göre farklılık göstermektedir. Bunun yanı sıra galaktoz, maltoz ve sakkaroz karışımı, glukoz, glukoz ve sakkaroz karışımı, mannitol gibi uygulamalarda bulunmaktadır (Dias 2001, Arı 2006). Genel olarak bütün ortamlarda şekere yer verilmekte ve besin ortamlarında ozmotik basıncı ayarlayıcı bir etkisi olduğu bilinmektedir (Coşkun 2011). Kültür ortamında kullanılan şeker oranı bazı bitki türlerinde % 2-4 (Miyoshi 1996) ve bazılarında ise % 10-13 (Kim vd. 2008; Custers 2003) olarak kullanılmaktadır. Farklı türlerde kullanılan şeker orandaki bu ayrımın,

olgun polenin *Solanaceae* ve *Liliaceae*'deki gibi iki hücreli veya *Gramineae* ve *Cruciferae*'daki gibi üç hücreli olmasına bağlı olduğu düşünülmekte ve ilk grubun düşük ozmotik basınca, ikinci grubun ise yüksek ozmotik basınca ihtiyaç duyduğu belirtilmektedir (Arı 2006).

Mikrospor embriyogenesisinde başarılı sonuçlar elde etmek için, kültür ortamındaki bitki büyüme düzenleyicileri ve bunların konsantrasyonları da oldukça önemlidir. Kültür ortamındaki bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonunu oluşturmak genotipe, donör bitkinin kalitesine, ön işlem uygulamalarına ve kültür ortamındaki mikrosporların fizyolojik durumuna göre değişmektedir. Kültür ortamındaki bitki büyüme düzenleyicilerinin türünü ve konsantrasyonunu ayarlamak mikrospor embriyogenesisden elde edilecek başarıyı artırmak için oldukça önemli olmuştur (Coşkun vd. 2011).

Mikrospor embriyogenesisin oluşumunu sağlamak için ön uygulama ve kültür ortamlarında yukarıdaki maddeler dışında; Ficoll (Cistue vd. 2009), absisik asit (Van Bergen vd. 1999), fenil asetik asit (PAA) (Hu ve Kasha 1997; Ingram vd. 2000) gümüş nitrat (Büyükalaca vd. 2004) ovaryum (Lantos vd. 2009; Özdemir 2012) polietilen glikol (PEG) (Ferrie ve Keller 2007; Corral-Martinez ve Segui-simarro 2012) brassinosteroidler (Ferrie vd. 2005; Corral-Martinez ve Segui-Simarro 2014), arabinogalaktan proteinleri (AGP) (Letarte vd. 2006; Tang vd. 2006) gibi birçok katkı maddesi kullanılmaktadır.

Mikrospor embriyogenesis çalışmalarında indüksiyon ve/veya kültür ortamına ilave edilen ABA'in embriyogenesis üzerine etkileri bildirilmiştir. Imamura ve Harada (1980) tütünde (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) ABA ve mannitolün kısa süreyle uygulanmasının etkilerini araştırmışlardır. Sterilizasyonu yapılan anterler, 1 ila 4 gün boyunca ABA ( $10^{-5}$  M) ve mannitol (0.5 M) içeren H sıvı ortamı içerisinde bekletilmiştir. Bu uygulamalarının ardından anterler 3 kez steril distile su ile yıkandıktan sonra, % 0.8 agar ve % 0.4 aktif karbon içeren H ortamı içerisinde kültüre alınmıştır. 4 günlük ABA uygulamasının bitkicik oluşumunu inhibe ederken 1 günlük ABA uygulamasının anter başına üretilen bitkicik sayısında en yüksek ortalamaya sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ortama mannitol (0.5 M) ilavesiyle uygulanan su stresi, kontrol ile karşılaştırıldığında uyarıcı bir etki göstermiştir. Anterlere 1 ve 2 gün mannitol uygulanması ile polen başına ng cinsinden içsel ABA konsantrasyonları araştırılmıştır. Su stresinden 1 gün sonra içsel ABA seviyesi 0.059 ng/polen' dan 0.120 ng/polen'a yükseldiği ve 2 günlük uygulamadan sonra 0.053 ng/polen'a düştüğünü belirlemişlerdir. Kontrolde ise aynı denemede ABA seviyelerinde hafif bir artış gözlemlenmiştir. Mannitol içeren ortam anterlerde su stresine neden olmuş ve ABA seviyesinin artırılmasında etkili olmuştur. Bu deneme sonuçlarına ve daha önceki gözlemlerine göre sürekli ABA uygulaması yerine kısa süreli uygulamanın bitkicik oluşumunu artırdığını belirtmişlerdir. ABA düzeyindeki geçici artışın indüksiyon döneminde polen embriyogenesis de uyarıcı bir etki yarattığını ve kültür ortamında ABA'in sürekli varlığının somatik ve polen embriyogenesis oluşumu için inhibe edici olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, tütün polen embriyogenesisine ilişkin olarak, polen taneciklerinde ABA konsantrasyonunun belirli bir seviyede tutulması gerektiği ve ABA'in diğer büyüme düzenleyici maddeler ile ilişkili olarak önemli bir rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. ABA'in etkilerinden birinin m-RNA sentezinin inhibisyonu olduğunu böylece ABA uygulamasının, gametofitik gelişim için gerekli

olan belirli RNA'ların sentezini engellemiş olabileceğini bunun da polenin normal gametofitik gelişimini bloke ederek sporotifik gelişimi uyarılabileceğini düşündüklerini bildirmişlerdir.

Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982), androjenik bitkiler üretmek ve patlıcan ıslah programlarında DH hatların başarılı bir şekilde kullanılmasını 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 12 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 ve dış koşullara aktarılmıştır.

Rotino vd. (1987) sekiz farklı indüksiyon ortamında farklı genotiplerin anter kültürüne tepkilerini inceledikleri çalışmada, tek çekirdekli çiçek tomurcuklarını ilkbahar ve yaz aylarında tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerden toplamışlardır. Anter kültürü çalışmasında kullanılan kültür ortamı Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982) tarafından bildirilen kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda IAA, NAA, zeatin ve glukoz eklenmesi ile modifiye edilmiştir. Kültüre alınan 9.050 tane anterden 531 iyi gelişmiş androjenik embriyo elde edilmiştir. Anter kültürüne verilen yanıt bakımından genotipin etkisinin açık olduğu bildirilmiştir. "1L. V. Barbantel" en iyi performans gösterirken, diğer çeşitler hibritlerden daha az ortalama vermişlerdir. Ayrıca F<sub>1</sub> melezi "Ronde de Valence x Dourga" Chambonnet (1985) tarafından elde edilen sonuçların aksine hiç embriyo vermediği bildirilmiştir. Ayrıca ortamdaki hormon içeriğinin, farklı genotiplerin androjenik sürecinde güçlü bir etkisi olduğu görülmüştür. Örneğin NAA ve zeatin "1L. V. Barbantel" ve hibrit "TWIR78 X Viserbal" çeşidinde embriyo yüzdesinin artmasına neden olmuştur. Sakkaroz ve glukozun etkinliği söz konusu olduğunda yüksek konsantrasyonların etkili olduğu ancak daha fazla araştırma yapılması gerektiğini bildirmişlerdir. Kültür ortamında uygun bir oksin ve sitokinin dengesinin sağlanmasıyla patlıcan genotiplerinde *in vitro* anter yanıtının artırılmasının sağlanabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerine ilişkin verilerin mevcut olmadığı ancak daha önceki çalışmalarda benzer bir deneyde haploid ve diploidlerin yüzdeleri sırasıyla % 65 ve % 35 olduğunu bildirmişlerdir.

Karakullukçu ve Abak (1993b)'ın uygun tomurcuk aşamasını belirledikleri çalışmalarının devamı olan çalışmada, 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 2,4-D ve % 12 sakkaroz kullanılan ortamlarda % 12.1 ("Baluroi F<sub>1</sub>"), % 1.5 ("Kemer") ve % 3.8 ("Halep Karası") 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 sitokin veya oksin miktarının tek yönlü

olarak artmasının kallus oluşum oranını arttırdığı, dengede olmaları halinde kallusların nispeten daha az oluştuğu gözlenmiştir.

Hu vd. (1995), buğdayda *Triticum aestivum* L. cv. “Chris” çeşidini kullanarak mikrospor kültürü üzerine farklı ön işlem, izolasyon yöntemleri ve kültür ortamında farklı PAA konsantrasyonlarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada anterler farklı ön işlem solüsyonlarında [0.4 M mannitol, FHG ortamı makro elementleri ve 0.4 M mannitol + FHG ortamının makro elementleri] farklı sürelerde (4, 7, 10 ve 12 gün) tutulmuştur. Ayrıca ön işlem uygulamalarında farklı konsantrasyonlarda ABA’in (0, 1.5, 3.0, 4.5 ve 6 mg/l) etkileri araştırılmıştır. Mikrosporların izolasyonunda dört farklı yöntem ve kültür ortamında 6 farklı konsantrasyonda PAA (0, 1, 2, 4, 7 ve 10 mg/l) kullanılmıştır. Çalışmada ön uygulama solüsyonu olarak 0.4 M mannitol + FHG ortamının makro elementlerinin birlikte kullanılması başarılı sonuç verirken, ön işlem süresi olarak en iyi sonuç 7 günlük uygulamadan elde edilmiştir. Ön işlem solüsyonlarına farklı konsantrasyonlarda ABA uygulaması sonucunda ölçülen çeşitli parametrelerde en yüksek ortalama 3 ile 6 mg/l arasındaki konsantrasyonlardan elde edilmiştir. Ayrıca ABA’in buğdayda mikrospor kültüründe yeşil bitki rejenerasyonu üzerine olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir. İzolasyon yöntemi olarak vorteks kullanılmasıyla en iyi sonuçlar elde edilirken, kültür ortamında 4 mg/l PAA kullanılması en iyi sonucu vermiştir.

Hoekstra vd. (1997) arpada (*Hordeum vulgare* L. cv. İgri) yaptıkları çalışmada androgenesis üzerine ön uygulama ortamı, mannitol ve kalsiyumun konsantrasyonlarının etkilerini incelemişlerdir. Anterler önişleme tabii tutulmadan doğrudan kullanıldığında herhangi bir bitki gelişimi gözlenmezken, su içerisinde tutulmasıyla düşük oranlarda bitki üretiminin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Önişlem uygulamasında mannitol kullanılmasının ise bitki üretimini önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir. Optimum embriyo oluşumu yaklaşık 20 mM CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda elde edilirken, yaklaşık 30 mM CaCl<sub>2</sub> de optimal bitki üretimi gerçekleşmiştir. Anterler içerisinde 0.37 M mannitol ve 10<sup>-2</sup> M CaCl<sub>2</sub>, 10<sup>-3</sup> M MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10<sup>-3</sup> M KNO<sub>3</sub>, 2 x10<sup>-4</sup> M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10<sup>-6</sup> M KI ve 10<sup>-7</sup> CuSO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O (440 mOs.kg<sup>-1</sup>) içeren ön uygulama çözeltilerinde 4 gün bekletildikten sonra anterler 350 mOs.kg<sup>-1</sup> Ficoll bulunmayan ortam I 'e transfer edilmiştir. Ön uygulama sırasında ABA'in etkisini belirlemek için, anterler 10<sup>-7</sup> M ABA varlığında ön uygulama çözeltilerinde farklı sürelerde (1, 2, 3, 4 gün) inkübe edilmiştir. ABA'in çeşitli gelişimsel süreçlerde yer aldığı ve çeşitli stresler tarafından indüklendiği bilindiği için, ABA ve ABA biyosentez inhibitörü fluridonun androgenesis indüksiyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Fluridon, başlangıçtan itibaren 40 mg/l'lik bir konsantrasyonda ilave edilerek ve 24 saatlik bir uygulamadan sonra ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Deneme sonunda ABA'in embriyo oluşumu üzerinde çok az etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir. Ancak fluridonun anter ön uygulama ortamına ilave edilmesinin androgenesis indüksiyonunda yeşil bitki üretiminde düşüş meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Böylece ön uygulama sırasında optimum bitki üretimi için içsel ABA sentezinin gerekli olduğu ve ABA'in etkisinin sadece polenin gametotifik gelişimini engellemesiyle sınırlı olmadığı sonucuna varmışlardır.

Van Bergen vd. (1999) arpada yaptıkları çalışmada aynı mannitol ön uygulaması ve kültür koşulları altında, “İgri” çeşidinin rejenerasyon verimliliğinin “Digger” çeşidine göre yaklaşık 10 kat daha yüksek olduğunu ve bunun anterlere uygulanan ön uygulama sonrasında canlı mikrospordaki farklılık ile ilişkili olduğunu

düşündüklerini bildirmişlerdir. Bu nedenle iki çeşit üzerine farklı ön uygulama koşullarının etkisini incelemişlerdir. Her iki çeşitte, su, CPW çözeltisi ve mannitol ön uygulamalarında için, mikrospor canlılığının sırasıyla mannitol > CPW tamponu > su olduğu ve ayrıca rejenerasyon verimliliği arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Mannitol ön uygulamasında “İgri” çeşidinde içsel ABA miktarındaki artışın “Digger” çeşidinden çok daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Mannitol ön uygulaması sırasında ABA ilavesi, hem canlılık hem de rejenerasyon verimi yüzdelelerini artırmıştır. CPW çözeltisi ön uygulama koşulları altında, ABA'in eklenmesi rejenerasyon verimliliğini önemli ölçüde uyardığı ve ABA konsantrasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, “Digger” çeşidi “İgri” çeşidine göre ABA'e daha az duyarlıydı. Her iki çeşitte de ABA uygulamasının, rejenerasyon etkinliği üzerine daha az etkisi olan su ve CPW çözeltisinde, canlılık yüzdesinin artmasına ve/veya çift çekirdekli mikrosporların sayısını azalması üzerine etkisi olduğu bildirilmiştir. Deneme sonucuna göre, “İgri” ve “Digger” çeşitlerindeki rejenerasyon verimliliğindeki farkın, mannitol ön uygulaması ile içsel ABA üretim düzeylerindeki farklılıklardan ve ABA'e karşı duyarlılıkları ile ilişkili olduğunu düşünmektedirler. ABA'in muhtemelen etkilerinden birinin de hücre ölümünün önlenmesine bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Bal (2002), domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill) tek çekirdekli mikrosporları içeren çiçek tomurcuklarını *in vitro* şartlarda 0.3 M mannitol içeren ön kültür ortamında 10°C' de 7 gün boyunca karanlıkta ön uygulamaya tabi tutulduktan sonra, mikrosporlar izole edilerek 0.5 mg/l BAP ve 0.5, 1.0, 1.5 mg/l NAA ve 2, 4 ml/l Lactalbumin hydrolysate içeren NLN ortamlarında kültüre alındığında simetrik çekirdek bölünmesi ve çok çekirdekli yapıların oluşumunun uyarıldığını belirtmişlerdir. Lactalbumin hydrolysate yerine Casein hydrolysate'ın denendiği ikinci bir denemede ise “Falcon”, “Invictus” ve “Gökçe” çeşitlerinden 5 ve 10 g/l Casein hydrolysate'ın bulunduğu NLN + 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA kültür ortamlarında da simetrik çekirdek bölünmesi ve çok çekirdekli yapıların oluşumunun uyarıldığını, ancak hiçbir ortam ve koşulda mikrospordan rejenerasyonun gerçekleşmediğini bildirmişlerdir.

Kasha vd. (2003), buğdayda mikrospor kültüründe önemli faktörlerden birinin ortamdaki AGP'nin varlığı olduğunu bildirmişler ve mikrospor kültür ortamında AGP ve ovaryumların etkisini araştırmışlardır. “Pava 79” çeşidi ile yapılan bir çalışmada kültürden 10 gün sonra mikrospor canlılığını, 30 gün sonunda ise embriyo oluşumunu incelemişlerdir. AGP ve ovaryum bulunmayan ortamda mikrospor canlılığının % 18.8'e kadar düştüğünü ve çok çekirdekli yapılarının oluşumunun uyarıldığını ancak embriyo oluşumunun gözlemlenmediğini belirtmişlerdir. Ovaryum bulunan fakat AGP bulunmayan ortamda mikrospor canlılığının % 35.5 ve embriyo oluşumunun 1650 olduğunu bildirmişlerdir. 10 mg/l AGP ve ovaryum bulunan ortamda mikrospor canlılığının % 78.3, embriyo oluşumunun 4250, 10 mg/l AGP bulunan ancak ovaryum bulunmayan ortamda ise mikrospor canlılığının % 77.8, embriyo oluşumunun ise 50 olduğunu tespit etmişlerdir. Böylece kültür ortamında AGP'nin tek başına yeterli olmadığı, ovaryumların da mutlaka kültür ortamında kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Letarte vd. (2006), buğdayda mikrospor kültürü üzerine yaptıkları çalışmada kültür ortamına eklenen Larcol ve AGP'nin etkisini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan genotiplere ait başaklar, 4°C'de 0.4 M mannitolde 7 gün süreyle karanlıkta önışleme alındıktan sonra, mikrosporlar izole edilerek MMS4 indüksiyon ortamında

kültüre alınmıştır. Kültür ortamına çeşitli konsantrasyonlarda Larcol ve AGP (1, 5, 10, 25, 50 ve 100 mg/l) ilave edilmiştir. Ayrıca kültür ortamında Larcol ve AGP ile birlikte 1 hafta 4°C’de saklanmış 8 tane ovaryum da eklenmiştir. 10, 25 ve 50 mg/l Larcol ile birlikte kültür ortamında ovaryumların bulunmasıyla, her iki çeşitte de yüksek oranda embriyo oluşumu elde edilmiştir. Kültür ortamına ilave edilen 10 mg/l AGP’nin ise, mikrospordan embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonunu önemli derecede artırdığı belirtilmiştir. 10 mg/l’den sonraki konsantrasyonlarda ise embriyo sayısında herhangi bir değişimin olmadığını bildirmişlerdir.

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 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 ve % 12 sakkaroz ile 5 mg/l 2,4-D ve 5 mg/l kinetin içeren C ortamı kullanılmıştır. 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 16h 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 tanesinden (“Kemer”, “Urfa Yerlisi”, “Adana”, “Barbentane” ve “Leila”) 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 yılında “Kemer”, “Baluroi” ve “Urfa yerlisi” genotipleri kullanılmış olup kallus oluşum oranları % 5.56 ve % 49.98 arasında değişmiştir. Ayrıca “Kemer” çeşidi ve “Urfa yerlisi” popülasyonundan haploid embriyo ve bitkicik elde edilmiştir. “Kemer” çeşidinde, 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, elde edilen embriyo oranları “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.

Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2012) farklı ozmotiklerin patlıcanda mikrospor kültüründen elde edilen kallus sayısına etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla PEG, mannitol ve sakkaroz (normal karbon kaynağı) içeren ortamlar kullanılmışlardır. Deneme sonucunda kontrol olarak kullanılan % 2 sakkaroz yerine % 2 PEG kullanıldığında, kallus üretimi kontrol ortamına göre önemli ölçüde azalmıştır. % 2 sakkaroz yerine % 2 mannitol kullanıldığında ise, kültür sonunda hiçbir gelişim gözlenmemiştir. % 1 PEG ve % 1 sakkarozun birlikte kullanılması ile yalnızca sakkaroz kullanılan kontrol ortamına göre 2.5 kat daha fazla kallus elde etmişlerdir. Bu pozitif etkinin, toplam kallus ağırlığı ve kallus büyüklüğü üzerine de etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bunun aksine % 1 sakkaroz ve % 1 mannitol ilavesi kallus sayısını, ağırlığını ve büyüklüğünü önemli ölçüde azaltmıştır. Böylece, kültür ortamında sakkarozun başlangıç ozmotik basıncını PEG ilavesiyle arttırmanın, kallus indüksiyonunu önemli ölçüde artırdığını, mannitol ile birlikte kullanıldığında ise olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sakkarozun yerine sadece PEG veya mannitol kullanılması olumsuz etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Lantos vd. (2012), 2 biber genotipinde mikrospor kültürü üzerine yaptıkları çalışmada, B5 ortamında 2,4-D (0, 0.1, 0.2 ve 0.5 mg/l) ve kinetinin (0, 0.2 ve 0.5 mg/l) 12 farklı kombinasyonunun mikrospordan elde edilen embriyo ve kallus, kallus/embriyo oranı ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Deneme sonuçlarına göre büyüme düzenleyicilerinin, mikrospor embriyogenesis indüksiyonu için gerekli olmadığı ancak mikrospor kültürünün etkinliği ve mikrospordan elde edilen embriyo ve kallusların kalitesi ve miktarı üzerinde genel bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre, genotip “257”de mikrospor kültüründe en yüksek embriyo üretimi büyüme düzenleyici içermeyen ortamdan elde edilirken, “253” genotipinde ise 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l kinetin içeren ortamdan elde edilmiştir. Her iki genotipte de 0.1 mg/l 2,4-D ve 0,2 mg/l kinetin kombinasyonunu içeren ortamdan en yüksek bitki rejenerasyon oranının elde edildiğini belirtmişlerdir.

Yuan vd. (2012) yaptıkları çalışmada beyaz lahanada (*Brassica oleracea* var. *capitata*) mikrospor embriyogenesisi geliştirmek amacıyla pH, MES ve arabinogalaktan proteinlerinin etkilerini araştırmışlardır. Beyaz lahanada yüksek pH (6.2 veya 6.4) genotiplerin çoğunda özellikle “Zhonggan No. 8” genotipinde mikrospor kültüründen embriyo elde etmek için etkili olmuştur. MES ve arabinogalaktan proteinlerinin, mikrospor kültüründen elde edilecek embriyo verimi üzerine etkileri beş genotipten dördünde test edilmiştir. Bu dört genotip için MES veya AGP’lerin tek başına ortama eklenmesi etkili olmadığı ve mikrospordan elde edilen embriyoların sıklığının hala düşük olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, 10 mg/l AGP ve 3 mM MES kombinasyonu, pH 6.4, özellikle “Zhonggan No.8” çeşidinde yaklaşık 35 kat olmak üzere mikrospor embriyogenesisi artırdığı bildirilmiştir.

Ahmadi vd. (2014) *Brassica napus* L.’de mikrospor kültürü üzerine stres hormonları absisik asit (ABA), jasmonik asit (JA) ve salisilik asidin (SA) etkilerini araştırmıştır. “Regent” çeşidini kullandıkları çalışmada üç farklı süre (6, 12 ve 24 saat) ve farklı konsantrasyonlarda ABA, JA ve SA (0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 ve 5.0 mg/l)’in mikrospor kültürü üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 12 saat süreyle 0.5 mg/l ABA uygulamasının kontrole göre mikrospor embriyogenesisi yaklaşık üç kat ve bitki rejenerasyonu % 68 oranında arttırdığını bildirmişlerdir. ABA uygulamasının ayrıca, test edilen tüm konsantrasyonlarda ikincil embriyo oluşumunu azalttığı ancak yüksek



seviyelerde, örneğin 1 mg/l 24 saat uygulamasının, kallus oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. En yüksek embriyo verimi (286.0 embriyo/petri), 24 saat boyunca 1.0 mg/l JA kullanılmasıyla elde etmişler ve 12 saat boyunca 0.5 mg/l JA uygulanan kültürlerde en yüksek bitki rejenerasyonunu (% 54) gözlemlemişlerdir. Ayrıca 24 saat boyunca 5.0 mg/l JA uygulaması, rejenerasyon ortamında mikrospordan elde edilen embriyoların çimlenmesini % 21 oranında azaltmıştır. 6 saat boyunca 0.2 ve 0.5 mg/l SA uygulamasıyla sırasıyla 184.0 ve 193.4 embriyo/petri elde edilmiş ve kontrol (136.2 embriyo/petri) ile karşılaştırıldığında mikrospor embriyogenesi artırdığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, SA'nin bitki rejenerasyonu, ikincil embriyo oluşumu ve kallus oluşumu üzerine bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar uygun konsantrasyon ve inkübasyon süresi seçildiğinde mikrospor embriyogenesi ve bitki rejenerasyonunun ABA, JA ve SA ile geliştirilebileceğini bildirmişlerdir.

Corral-Matinez ve Segui simarro (2014) patlıcanda mikrospor kültürü etkinliğini artırmak için "Bandera" çeşidini kullanarak mikrospor kültürü üzerine absisik asit, epibrassinolid, polietilen glikol, arabinogalaktan proteinlerinin tek başına veya birlikte kombinasyonlarını standart mikrospor kültür protokolüne ilave ederek etkilerini incelemişlerdir. Ayrıca standart protokolde kültür ortamında bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılan BAP ve NAA'nin farklı konsantrasyonlarının etkilerini incelemişlerdir. Kültür ortamında her bir kimyasalın tek başına kullanılmasıyla ABA, EBr ve AGP'nin optimal konsantrasyonları belirlendikten sonra, AGP ile birlikte kullanıldığında etkilerini araştırmışlardır. PEG konsantrasyonu olarak daha önce yaptıkları çalışmada belirledikleri oranı kullanmışlardır. Deneme sonuçlarına göre AGP'nin, mikrospor embriyogenesi etkinliğini artırmak, embriyoların kallus benzeri yapılara dönüşümünü azaltmak ve organojenik kallus etkinliğini artırmak için rutin olarak kullanılması gerektiği belirledikleri için tüm kombinasyonlarda AGP'ni kullanmışlardır. Kullanılan kimyasalların AGP ile kombinasyonunda AGP'nin tek başına veya EBr ve/veya PEG ile birlikte kallus üretimi üzerine olumlu etkileri olduğunu bildirmişlerdir ve özellikle PEG ve AGP'nin birlikte kullanımı tavsiye etmişlerdir. Ayrıca standart protokolde kullanılan iki büyüme düzenleyicisi olan BAP ve NAA'nin (1X) konsantrasyonlarını ve 0.5X, 0.2X, 2X ve 5X oranlarında değiştirmenin etkisini değerlendirmişlerdir. Standart protokolde kullanılan 1X konsantrasyonun 0.2X oranında azaltılmasıyla elde edilen BAP ve NAA konsantrasyonlarının kallus sayısı ve büyüklüğü açısından daha iyi sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir. Araştırma sonuçlarının tümünü değerlendirdiklerinde standart protokolde % 1 sakkaroz , % 1 PEG ve 1600 mg/l AGP ilave edilmesi, BAP ve NAA konsantrasyonlarının beşte birine düşürülmesi ile optimize edilmesinin olumlu olacağını belirtmişlerdir.

Makowska vd. (2017) arpada anter kültürü etkinliğini artırmak amacıyla AGP'nin etkisini araştırmışlardır. Anter kültüründe indüksiyon ortamında 10 mg/l AGP kullanımı toplam bitki rejenerasyonunu 2.8 kat artırmıştır. AGP'in kültürün ilk başlangıcından stres uygulamasından itibaren uygulanmasıyla ise rejenerasyon oranının kontrole göre 6.6 kat arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ile arpada androjenik bitkilerin üretiminde AGP'nin olumlu etkisinin doğrulandığını bildirmişlerdir.

### 2.2.6. Kültür koşulları

Mikrospor embriyogenesisinde kültürlerin inkübe edildiği ortamın ışık niceliği ve niteliği veya sıcaklık gibi çevresel koşullar, haploid embriyo indüksiyonu ve gelişimi üzerine etki eden diğer faktörlerdir. Kültür koşulları, kullanılan yöntem (anter ve mikrospor) ve kullanılan genotipe göre farklılık göstermektedir. Ancak mikrospor kültüründe genellikle başlangıçta ve kültür süresince genellikle karanlık koşullar ve 20-30°C'ler arasında sıcaklık önerilmektedir. Mikrosporlardan kallus ve/veya embriyo oluşumu gerçekleştikten sonra ise daha yüksek ışık yoğunluğuna sahip koşullar önerilmektedir (Miyoshi 1996; Lantos vd. 2009; Ellialtıoğlu 2000).

### 2.2.7. Bitki rejenerasyonu

Mikrospor embriyogenesis uyarıldıktan sonra, mikrosporlardan haploid bitki oluşumu direk veya indirek olmak üzere başlıca iki yolla olmaktadır. Direk olarak, mikrosporlardan doğrudan embriyo gelişir ve zigotik embriyolara benzer şekilde globüler, kalp şekilli, torpedo ve kotiledon embriyo aşamaları meydana gelir. Mikrosporlardan embriyolar elde edildikten sonra, genellikle bitkilere dönüşümlerini teşvik etmek amacıyla katı bir çimlenme ortamına aktarılırlar. İndirek olarak ise, mikrosporlardan ilk olarak bir kallus gelişimi meydana gelmekte ve daha sonra bu kalluslardan embriyogenesis veya organogenesis yoluyla haploid veya DH bitkilerin elde edilmesi mümkün olmaktadır. DH bitkilerin direk olarak embriyolardan elde edildiği türlere kolza, arpa, tütün ve mısır; indirek olarak kalluslardan elde edildiği türlere ise kahve, yenedünya, çavdar, yulaf, Anemone, domates ve patlıcan örnek verilebilir (Segui-Simarro 2010).

Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2012) mikrosporlardan elde edilen kalluslardan bitki rejenerasyonunu artırmak için daha önce farklı araştırmacılar tarafından bildirilen ve patlıcanda mikrospor, anter ve protoplastlardan elde edilen kallus veya embriyolardan bitki rejenerasyonu sağlamak için kullanılan sekiz farklı ortamın etkisini test etmişlerdir. Her bir ortamın etkisini belirlemek amacıyla toplam 60 kallus kullanılmış ve kalluslar iki haftada bir alt kültüre alınmıştır. Kültürden altı hafta sonra gelişen kallus yüzdesi, sürgün elde edilen kallus yüzdesi ve köklenme gerçekleşen kallus yüzdesi parametreleri değerlendirilerek kullanılan ortamların etkinlikleri belirlenmiştir. Kallus gelişimi ve sürgün üretimi açısından en iyi sonuçlar M1 ve M4 ortamlarından elde edilmiştir. Buna karşılık, köklenme için en iyi ortamın M5 ortamı olduğu belirtilmiştir. Bitki rejenerasyonu en fazla % 6.9 ile M4 ortamından ardından % 3.45 ile M5 ortamından elde edilmiştir. M4 ortamında 100 kallus için 6.9 bitki elde edilirken, 41.4 adet sürgün gelişimi elde edilmiştir. Daha sonra kök oluşturmayan bu sürgünler M5 ortamına transfer edilmiş ve bunlardan % 19 oranında köklenme sağlanarak 7.9 bitki daha elde etmişlerdir. Böylece 100 kallus için toplamda 14.8 bitki elde etmişlerdir. Deneme sonucunda araştırmacılar patlıcanda mikrosporlardan elde edilen kalluslardan bitki rejenerasyonunda, kallus gelişimi ve sürgün üretimi için ilk olarak M4 ortamın ve daha sonra köklenme için M5 ortamının kullanılmasını tavsiye etmektedirler.

Rivas-Sendra vd. (2015) yaptıkları çalışmada, patlıcanda mikrosporlardan elde edilen kalluslardan bitki rejenerasyonunu artırmayı amaçlamışlardır. Farklı ortam kompozisyonlarının organogenesis indüksiyonu, sürgün oluşumu ve uzamasının teşvik

edilmesinde ve kök oluşumunda etkisini değerlendirmişlerdir. Daha önce patlıcanda mikrosporlardan elde edilen kalluslardan bitki elde etmede etkili olduğu bildirilen % 2 sakkaroz, % 0.8 agar, 0.2 mg/l IAA ve 4 mg/l zeatin içeren M1 ortamı (Miyoshi 1996) ve % 3 sakkaroz, % 0.4 Phytigel, 0.1 mg/l IAA ve 2 mg/l zeatin içeren M4 (Corral-Martinez ve Segui-Simarro 2012) organogenesis indüksiyonu için değerlendirilmiştir. M1 ortamı kalluslardan sürgün oluşumu için M4 ortamından daha etkili bulunmuş ancak sürgün büyümesi ve uzaması için iki ortamda yeterli bulunmamıştır. Bu amaçla M1 ortamında 1855 kallus üretimi gerçekleştirilerek 555 sürgünü M11, M12, M13 ve M14 ortamlarına aktararak bu ortamların sürgün büyümesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda M11 ortamı (bazal MS ortamı) bitki rejenerasyonu için en iyi ortam olarak belirlenmiştir. Böylece mikrosporlardan elde edilen kalluslardan sürgün oluşumu için ilk olarak M1 ortamında kültüre alınmasını ve daha sonra elde edilen sürgünlerden bitki oluşumunu desteklemek için M11 ortamına transfer edilmesini önermişlerdir.

### 2.2.8. Kromozom katlama ve ploidi belirleme

Mikrospor embriyogenesis yoluyla elde edilen bitkiler haploid, diploid, triploid veya tetraploid gibi farklı ploidi seviyelerinde olabilir ve bu bitkilerin ıslah programlarında kullanılmadan önce ploidi seviyelerinin tanımlanması gerekmektedir. Bitkilerde ploidi belirlemenin birçok yöntemi bulunmakta ve bunların birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Mikrospor embriyogenesis sonucu elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerini tespit etmek amacıyla flow sitometri (Ochatt 2008), kromozom sayımı (Maluszynska 2003) ve moleküler markörler (Malik vd. 2011) kullanılabilir. Bitki morfolojisi, stoma veya kloroplast sayımı gibi diğer bazı daha az güvenilir yöntemler de mevcuttur (Dwivedi vd. 2015).

Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2012), “Bandera” çeşidinden mikrospor kültürü yoluyla elde edilen kallus ve bitkilerin ploidi seviyelerini flow sitometri ile analiz etmişlerdir. Analiz edilen toplam 41 farklı kallus içinde haploid kallus bulunmazken, 2 adet kallusun diploid, 3 tanesinin de tetraploid olduğunu ve diğer 36 adet kallusun miksaploid olduğunu belirlemişlerdir. Ancak farklı kalluslardan elde edilen 20 adet bitkiden, 4 tanesinin haploid, 1 tanesinin tetraploid, 3 tanesinin miksaploid ve bitkilerin çoğunluğunun (12 adet) diploid olduğunu bildirmişlerdir. Mikrospor kültürü, haploid mikrosporların izolasyonu ve kültüre dayanan bir teknik olduğu için elde edilen tüm kallus ve bitkilerin orijininin mikrosporlar olduğu ancak diploid kallus ve bitkiler için teorik olarak somatik kökenli olma olasılığını değerlendirmek için SSR markörlerle elde edilen diploid bitkileri analiz etmişlerdir. Daha önce “Bandera” bitkisinde heterozigot olarak nitelendirilen altı SSR markörü (CSM19, CSM33, CSM36, CSM40, CSM58 ve CSM63) kullanmışlardır. İlk olarak “Bandera” bitkilerinden rastgele seçilen 12 donör bitkiyi test etmişler ve altı SSR lokusunun tüm bitkiler için heterozigot olduğunu belirlemişlerdir. Ardından, 8 adet rastgele seçilmiş dört diploid ve dört miksaploid bitkiyi analiz etmişler ve bu bitkilerin altı SSR markörü için homozigot olduğunu belirlemişlerdir. Böylece elde edilen hem DH bitkilerde hem de miksaploid bitkilerin başlangıçta haploid kökenli mikrosporlardan elde edildiğini teyit etmişlerdir.

Rivas-Sendra vd. (2015) yaptıkları çalışmada mikrospor kültürü sonucunda elde ettikleri bitkileri dış koşullara aktarmış ve ploidi seviyelerini flow sitometri ile analiz etmişlerdir. Mikrosporlardan elde edilen 88 bitkiden, 5 tanesinin (% 5.7) haploid olduğunu, 61 tanesinin (% 69.3) diploid ve 18 tanesinin (% 20.5) daha yüksek ploidler gösterdiğini ve 4 tanesinin ise ploidi seviyelerinin kesin bir şekilde belirlenemediğini bildirmişlerdir. Diploid bitkiler, CorralMartinez ve Segui-Simarro (2012) 'de tarif edilen prosedür kullanılarak SSR markörleri ile analiz edilmiştir. Bu markörlerin daha önce "Bandera" donör bitkileri için heterozigot olduğunun kanıtlandığını ve analiz edilen 61 diploid bitkinin tüm SSR markörleri için homozigot olarak bulunduğunu bildirmişlerdir.

Kromozom katlanması, genotipe (Barnabas vd. 1999; Henry 1998) ve *in vitro* kültür koşullarına (Kasha vd. 2001; Shim vd. 2006) bağlı olarak mikrospor embriyogesisden sonra spontan olarak meydana gelebilmektedir. Spontan olarak meydana gelen katlama, endomitoz veya çekirdek füzyonu ile meydana gelebilmektedir (Segui-Simarro ve Nuez 2008). Spontan DH bitkilerin sıklığı yeterince yüksek olmadığına, kromozom katlaması amacıyla antimitotik etkili kimyasallar kullanılmaktadır. Bunlar arasında kolhisin, en çok kullanılan kimyasaldır. Bu antimitotik etkili kimyasalların uygulanma şekli, dozu ve süresi hücre süspansiyonu, besi ortamı veya eksplantların içinde bulunduğu ön besin ortamı gibi farklı koşullara, kallus dokusuna, aksiler tomurcuğa, tepe tomurcuğuna ya da *in vitro* bitkicik veya çeliklere, bitki köküne olmak üzere bitkinin çeşitli organlarına göre değişmektedir.

Ellialtıoğlu vd. (2006), anter kültüründen elde ettikleri haploid patlıcanların katlanması amacıyla *in vitro* ve *in vivo* kolhisin uygulamalarını karşılaştırmışlardır. *In vitro* uygulamalarında % 0.5'lik ve % 1'lik kolhisin çözeltisinde tüm sürgünler 1 ve 2 saat bekletilip tekrar ortama aktarılmış, *in vivo* uygulamalarında ise yine aynı dozdaki kolhisin çözeltileri pamuklara emdirilmiş ve boğumlarda 1 ve 2 saat süre ile uygulanmıştır. Her uygulamada 10'ar adet haploid bitki ile çalışılmış, *in vitro* uygulamalarda % 0.5'lik kolhisinin her iki süresinde de % 70 oranında dihaploidizasyon sağlanırken, % 1'lik dozda 1 saat bekletmede % 30 oranında, 2 saat bekletmede ise % 20 oranında dihaploidizasyon sağlanmıştır. *In vivo* uygulamalarında % 0.5 kolhisin solüsyonu ve 2 saat boğumda bekletme ile % 1 kolhisin çözeltisi ve 1 saat boğumda bekletme % 100 dihaploidizasyon sağlamıştır. % 1'lik çözeltide 2 saat boğumda bekletme % 70 oranında, % 0.5'lik çözeltide 1 saat bekletme ise % 60 oranında diploid bitki oluşturmuştur. Araştırmacılar, uygulama kolaylığı ve erken çiçeklenme yönünden *in vitro* kolhisin uygulamasını avantajlı bulurken, katlanma oranının yüksekliği ve uygulama yapılan bitkilerin tümünden uygun doz ve sürede yanıt alınabilmesi bakımından *in vivo* kolhisin uygulamalarını elverişli bulmuşlardır.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

Bu araştırmada bitkisel materyal olarak iki adet F<sub>1</sub> patlıcan eşidi “A117 F<sub>1</sub>”, ve “Amadeo F<sub>1</sub>” kullanılmıştır. Patlıcan için gerekli bitkisel materyal Genetika Tohumculuk firması tarafından seralarda yetiştirilen patlıcan bitkilerinden sağlanmıştır.



(a)



(b)

**Şekil 3.1.** Serada yetiştirilen patlıcan çeşitlerinden bir görünüm a) Amadeo F<sub>1</sub> eşitidi b) A117 F<sub>1</sub> eşitidi

#### 3.2. Metot

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültür Laboratuvarı ve İklım Odalarında ve Genetika tohumculuğa ait seralarda yürütülen bu tez çalışması süresince iki adet F<sub>1</sub> patlıcan çeşitinde mikrospor ve anter kültürü çalışmaları yürütülmüştür.

##### 3.2.1. Mikrospor/Polen gelişim aşamasının belirlenmesi

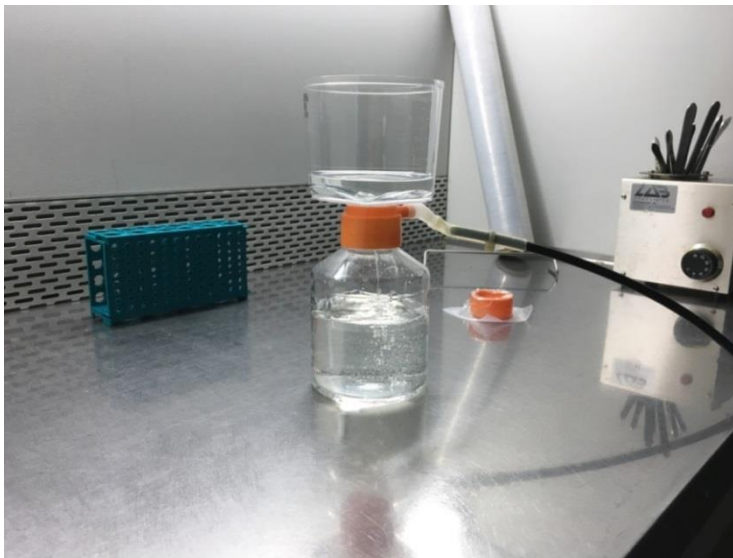
Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki elde etmek için ilk olarak sitolojik gözlemlerle uygun aşamadaki mikrosporları bulunduran tomurcuklar seçilmelidir. Çalışmada mikrospor kültürü çalışmalarında genel kabul gören vakuol mikrospor ve geç çift çekirdekli polen aşamalarını içeren tomurcuk ve anter uzunlukları belirlenmeye çalışılmıştır. Tomurcuk büyüklüğü ve morfolojik görünümleri çeşitler, yetişme koşulları ve bitki yaşına göre değişiklik gösterebileceğinden dolayı, farklı genotiplerde tomurcuk ve anterlerde kesin bir sınıflandırma yapmak her zaman kolay olmamaktadır. Ancak mikrospor embriyogenesis çalışmalarında uygun mikrospor/polenler ile tomurcuk ve anter uzunluğu arasında bir ilişki kurulmaktadır (Salas vd. 2012). Bundan dolayı çalışmamızda uygun gelişim aşamasındaki

mikrosporları bulunduran tomurcukları seçebilmek için her bir çeşit için minimum ve maksimum tomurcuk uzunluğu dijital kumpasla belirlenmiştir. Farklı boyutlardaki tomurcukların ve anterlerin içerdiği mikrospor/polen gelişim evresinin dağılımını belirlemek için çeşit başına 50 tomurcuk analiz edilmiştir. Genel olarak, incelenen tomurcuktaki bütün anterlerin aynı gelişim aşamasında mikrosporlar/polenler içerdiği varsayılmaktadır. Bu nedenle, belirli bir tomurcuktan bir anter çıkarılarak, dijital kumpas ile ölçüm yapıldıktan sonra lam üzerine alınmıştır. Jilet yardımıyla parçalara ayrılan anter üzerine bir iki damla su damlatılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu altında gözlemlenmiştir. Sitolojik gözlemler sırasında, mikrospor/polen gelişim aşamaları Salas vd. (2012) tarafından bildirilen 7 farklı aşamada (tetrat, genç, orta ve geç (vakuol) mikrospor ve genç çift çekirdekli, orta-geç ve olgun polen) incelenmiştir. Aynı uzunluk aralığında bulunan anterler için farklı mikrospor/polen gelişim aşamalarının yüzdeleri hesaplanmıştır.

### 3.2.2. Sterilizasyon

**Besin ortamlarının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu:** Mikrospor kültüründe kullanılacak sıvı besi ortamlarının sterilizasyonu steril kabin içerisinde 0.22 µm poroziteli filtreler kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.2). Anter kültürü ve mikrospor kültür çalışmalarından elde edilen kallus ve embriyolardan bitki rejenerasyonu için kullanılan katı besi ortamlarının sterilizasyonu otoklavda 20 dakika boyunca 1.5 atm basınçta 121°C'de tutularak gerçekleştirilmiştir. Sıcakta bozulan vitaminlerin, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve diğer maddelerin sterilizasyonu ise steril kabin içinde 0.22 µm poroziteli şırınga filtreler kullanılarak yapılmıştır.

**Tomurcuk ve anterlerin sterilizasyonu:** Anter kültürü çalışmalarında uygun mikrospor aşamasını içeren tomurcuklar kullanılırken mikrospor kültürü çalışmalarında tomurcuklardan çıkarılan anterler kullanılmıştır. Tomurcuk ve anterlerin sterilizasyonu steril kabin içerisinde ilk olarak % 70'lik etil alkolde 30 saniye süreyle bekletildikten sonra 10'luk sodyum hipoklorit içerisinde 5 dakika bekletilmiş ve ardından 3 kez steril distil su ile durulanarak sterilize edilmiştir (Şekil 3.3 a).



Şekil 3.2. Steril kabin içinde sıvı besi ortamı sterilizasyonu



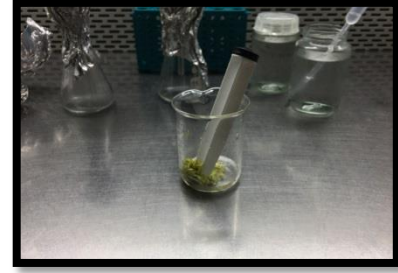
### 3.2.3. Mikrospor kültürü

#### 3.2.3.1. Mikrosporların izolasyonu

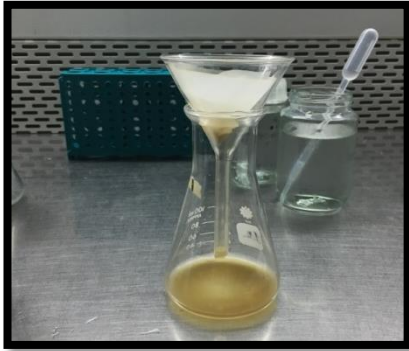
Gelişimin uygun aşamasındaki anterler (çoğunluğu vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polenleri içeren anterler) belirlenen uzunluklarda dijital kumpas yardımıyla seçilmiştir. Sterilizasyondan sonra, anterler steril distil suda ezilmiş (Şekil 3.3 b), anter dokularına ait içerik 40 µm filtre ile süzülmüştür (Şekil 3.3 c). Bu işlem sonrasında parçalanmış anterlerden kaynaklanan somatik dokular filtre üzerinde kalmış ve mikrosporların büyük bölümü süspansiyon oluşturacak şekilde alttaki erlenmayer içinde toplanmıştır. Mikrosporların izolasyonu esnasında somatik dokuların parçalanmasıyla ortama salınan ve mikrospora zarar verebilecek olan fenolik maddelerin bu süspansiyondan uzaklaştırılması amacıyla mikrospor süspansiyonları santrifüj tüplerine alınarak mikrosporların çökmesinin sağlanması için 850 rpm de soğutmalı santrifüjde (+4°C'de) 5 dakika santrifüjleme işlemine tabi tutulmuş ve santrifüj işlemi iki kez daha tekrarlanmıştır.



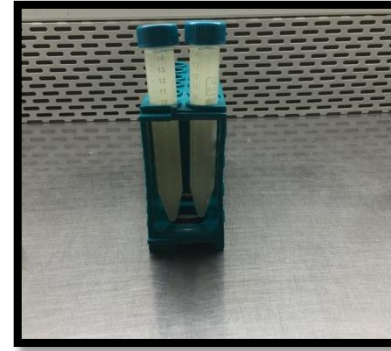
(a)



(b)



(c)

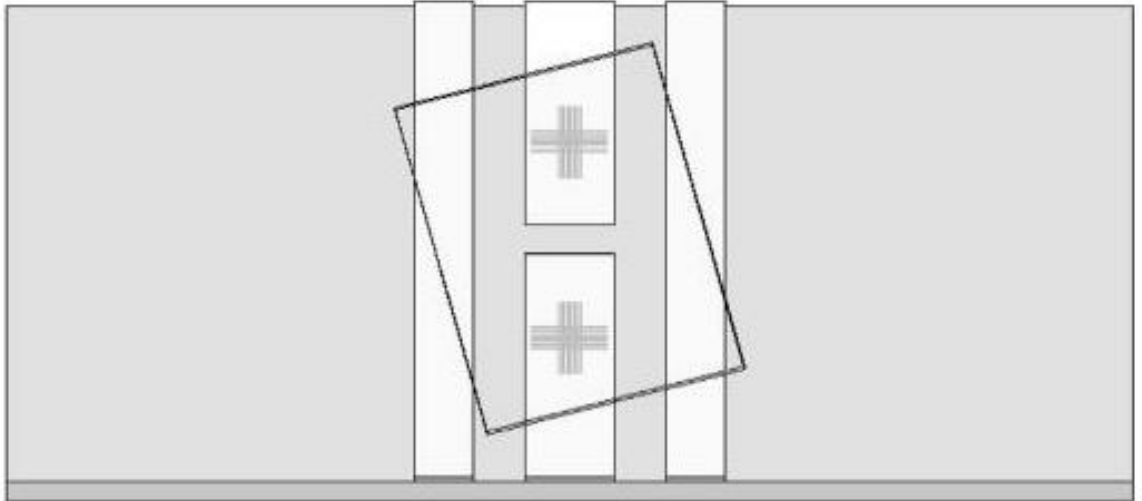


(d)

**Şekil 3.3.** Mikrosporların anterlerden izolasyonu a) Steril kabin içerisinde anterlerin sterilizasyonunun yapıldığı b) Mikrospor izolasyonu amacıyla anterlerin ezilmesi c) Anter dokularının uzaklaştırılması amacıyla mikrospor süspansiyonunun süzülmesinde kullanılan 40 µm filtre sistemi d) Mikrospor peleti elde etmek amacıyla santrifüj tüplerine alınan mikrospor süspansiyonu

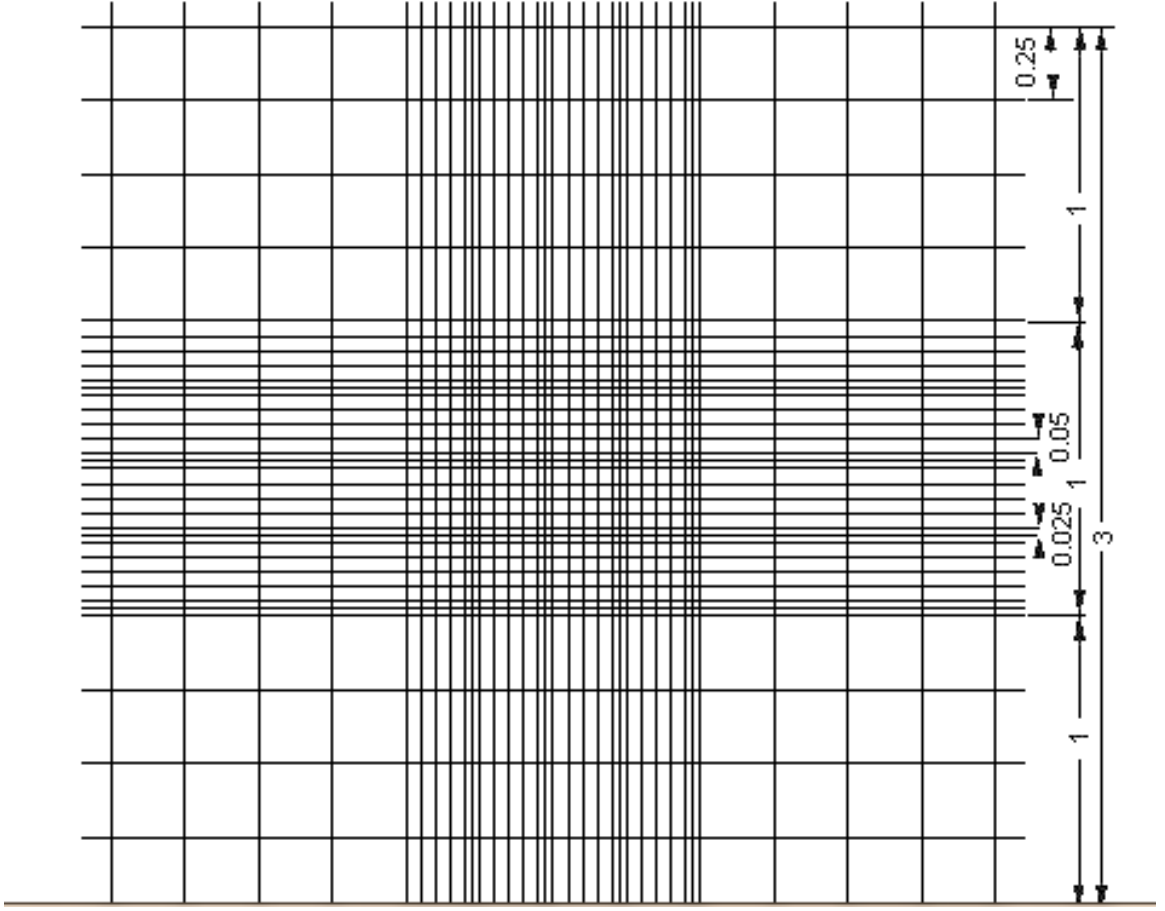
### 3.2.3.2. Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi

Mikrospor kültüründe mikrosporların belirli bir yoğunlukta kültüre alınması gerekmektedir. Bu amaçla son santrifüjleme işleminin ardından elde edilen mikrospor peleti steril distil su içinde süspansiyon haline getirilmiştir. Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi için thoma lamında sayım yapılmıştır. Thoma lamının esası  $0.1 \text{ mm}^3$  hacimde sayım yapılmasıdır. Thoma lamının şematik çizimi Şekil 3.4’de verilmiştir. Thoma lamının üzerinde çukur bir kısım vardır. Santrifüj tüpünde bulunan mikrospor süspansiyonundan bir damla alınarak bu çukur kısma aktarılmış ve üzerine lamel kapatılarak ışık mikroskobu altında cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiş sayım yapılacak alanda mikrospor sayımı gerçekleştirilmiştir (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 yapılmaktadır. Bir küçük karenin kenarları  $1/20 \text{ mm}$  ( $0.05 \text{ mm}$ ) olup derinliği  $1/10 \text{ mm}$  ( $0.1 \text{ mm}$ )’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. Thoma lamı ile sayım sonucu  $A \times 10,000$  formülü ile hesaplanır. Burada  $A = 16$  büyük karede sayılan mikrospor sayısı adedidir.  $10,000$  ise  $0.1 \text{ mm}^3$ ’deki sayım sonucu  $1 \text{ ml}$ ’deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir (Tuncer 2010). Thoma lamında iki adet sayım yapılacak kare alan bulunmaktadır. Her iki alanda da 8 büyük karede sayım yapılarak elde edilen değerlerin ortalaması alınarak 2 ile çarpılmış ve  $0.1 \text{ mm}^3$ ’deki değer bulunmuştur. Toplam 16 büyük karede sayılan mikrospor sayısı  $10,000$  ile çarpılarak  $1 \text{ ml}$ ’de bulunan mikrospor sayısı belirlenmiştir. Bu sayım sonucundan hareketle örneğin alındığı hacimdeki mikrospor sayısına ulaşılmıştır. Bu amaçla denemelerimizde, son santrifüjleme işleminin ardından elde edilen mikrospor süspansiyonu, Miyoshi (1996) tarafından bildirilen  $500,000$  mikrospor/ml içerecek şekilde yeniden süspansiyon haline getirilerek mikrospor yoğunluğu ayarlanmıştır.



Şekil 3.4. Thoma lamının şematik çizimi





Şekil 3.5. Thoma lamında sayım yapılan kareler

### 3.2.3.3. Mikrospora uygulanan ön uygulama

Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesinin ardından 3 cm'lik steril petri kaplarına 1 ml mikrospor süspansiyonu koyularak mikrospora kültüre alınmıştır. Çalışmamızda patlıcanda yapılan mikrospor kültürü çalışmalarında olumlu etkisi bildirilen ilk üç günlük sürede 35°C 'de karanlıkta bekletilerek sıcaklık uygulaması ve su içinde kültüre alınmasıyla şeker açlığı uygulaması beraber uygulanmıştır (Miyoshi 1996; Corral-Martinez ve Segui-Simarro 2012, 2014).

### 3.2.3.4. Mikrospora kültürüne alınması

35°C 'de 3 gün boyunca karanlıkta bekletilen mikrospora bu sürenin sonunda ilk olarak Miyoshi (1996) tarafından belirtilen ve patlıcanda mikrospor kültüründen kallis elde edildiği bilinen tek ortam olan; % 2 sakkaroz, 0.5 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP, pH 5.9, içeren NLN ortamında (Lichter 1982) kültüre alınarak çalışmada kullanılan çeşitlerin mikrospor kültürüne tepkileri incelenmiştir. Çizelge 3.1.'de mikrospora kültürüne alınmasında kullanılan sıvı NLN ortamının bileşimi verilmiştir. Kültüre alınan petri kapları 25°C'de bir ay boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Mikrosporların kültüre alınmasında kullanılan sıvı NLN ortamının bileşimi

Bileşikler	Miktar (mg/l)
<b>Makro Elementler</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125
KNO <sub>3</sub>	125
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	125
<b>Mikro Elementler</b>	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	18.95
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0.25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.00
FeNaEDTA	36.70
<b>Vitaminler</b>	
L-Serine	100.00
Myo-inostol	100.00
L-Glutamine	800.00
Glutathione reduced	30.00
Nitotik asit	5.00
Glycine	2.00
Folik asit	0.50
Pyrodoksin-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.50
D (+) - Biotin	0.05

### 3.2.3.4.1. Arabinogalaktan proteinleri denemesi

Arabinogalaktan proteinlerinin (AGP) etkisini belirlemek amacıyla 10 mg/l, 1 mg/l ve 0.1 mg/l olarak belirlenen farklı dozlarda AGP uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla 1 mg/ml ve 0.1 mg/ml şeklinde iki tane AGP stok çözeltileri hazırlanmış ve stok solüsyonlar filtre sterilizasyonu ile sterilize edilmiştir. Stok solüsyon -20°C sıcaklıkta karanlık koşullarda saklanmıştır. Mikrosporların kültüre alınmasıyla stok solüsyonlardan 10 mg/l, 1 mg/l ve 0.1 mg/l dozlarında olacak şekilde petri kaplarına eklenmiştir.

### 3.2.3.4.2. Absisik asit denemesi

Absisik asitin etkisini belirlemek amacıyla farklı dozlarda ve sürelerde absisik asit uygulaması mikrospora uygulanan ön uygulama esnasında yapılmıştır. 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 ve 5 mg/l olmak üzere farklı dozlarda ve 24, 48 ve 72 saat olmak üzere farklı sürelerde uygulanmıştır. Denemenin ilk aşamasında farklı doz ve sürelerde uygulanan ABA'in stres uygulaması ardından kontrole göre mikrosporda canlılık üzerine etkileri araştırılmıştır. Daha sonra ise mikrosporda canlılık üzerine etkili olan konsantrasyon ve sürelerde mikrospor kültürü denemeleri kurulmuştur. ABA'in stok solüsyonu oda sıcaklığında karanlıkta etanol (%99) içerisinde çözülerek, 1 mg/l ve 0.1 mg/l olmak üzere iki farklı konsantrasyonda stok hazırlanmıştır. Stok solüsyonların pH'sı 6 olacak şekilde 1 N NaOH ve 1 N HCl ile ayarlanmış ve filtre sterilizasyonu ile sterilize edilmiştir. Stok solüsyon -20°C sıcaklıkta karanlık koşullarda saklanmıştır (Ahmadi vd. 2014).

### 3.2.3.4.3. Farklı hormon kombinasyonları denemesi

Patlıcanda mikrospor kültürü üzerine farklı hormon konsantrasyonlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemede, NLN ortamına 2,4-D ve kinetin farklı dozları ilave edilmiş ve bu ortamların etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 2,4-D ve kinetin farklı konsantrasyonlarını içeren 16 farklı ortam kombinasyonu hazırlanmıştır. Stres uygulamasının ardından mikrospora bu ortamlarda kültüre alınmıştır. Toplam 16 uygulamadan oluşan hormon konsantrasyonları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Farklı hormon kombinasyonları denemesi için kullanılan 2,4-D ve kinetin konsantrasyonları

<b>1</b> = 0.1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l KIN	<b>9</b> = 0.5 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l KIN
<b>2</b> = 0.1 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l KIN	<b>10</b> = 0.5 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l KIN
<b>3</b> = 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l KIN	<b>11</b> = 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l KIN
<b>4</b> = 0.1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN	<b>12</b> = 0.5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN
<b>5</b> = 0.2 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l KIN	<b>13</b> = 1 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l KIN
<b>6</b> = 0.2 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l KIN	<b>14</b> = 1 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l KIN
<b>7</b> = 0.2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l KIN	<b>15</b> = 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l KIN
<b>8</b> = 0.2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN	<b>16</b> = 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN

### 3.2.3.5. Sitolojik gözlemler

Kültüre alınan mikrosporların canlılığını test etmek amacıyla FDA ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Mikrospor kültüründen alınan örneklerde mikrospor canlılığı flouresans mikroskop altında bakılmıştır. Bu amaçla mikrosporlar izole edildikten hemen sonra ve 3 günlük sıcaklık uygulamasının ardından FDA ile boyanarak mikrosporların canlılıkları incelenmiştir. Ayrıca ön uygulama esnasında farklı dozlarda ve sürelerde absisik asit uygulaması denemelerinde her doz ve her uygulama süresi için ilk gün ve 3 günlük stres uygulaması sonunda mikrospor canlılıkları hesaplanmıştır. Çekirdek bölünmeleri ve embriyonik gelişim gösteren mikrosporları incelemek için DAPI boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla mikrospor süspansiyonundan 200 µl alınarak 8000 rpm de 2 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen mikrospor peletine 10 µl DAPI solüsyonu eklenmiş ve flouresans mikroskop altında inceleme yapılmıştır (Custers 2003).

### 3.2.3.6. Bitki rejenerasyonu

Mikrosporların kültüre alınmasından bir ay sonra mikrospordan kallus ve embriyo oluşumu meydana gelmiştir. Bir ay sonunda mikrospordan elde edilen 1 mm'den büyük kalluslardan bitki rejenerasyonunu teşvik etmek amacıyla; Miyoshi (1996) ve Rivas-Sendra vd. (2015) tarafından bildirilen % 2 sakkaroz, % 0.8 agar, 0.2 mg/l IAA ve 4 mg/l zeatin içeren MS (Murashige ve Skoog 1962) (M1) ortamında kültüre alınmış ve 25°C sıcaklıkta bitki rejenerasyonu gözlenene kadar bekletilmiştir. Daha sonra Rivas-Sendra vd. (2015) tarafından bildirildiği üzere elde edilen sürgünler kök oluşumunun sağlanması için bazal MS ortamına transfer edilmiştir. Amadeo çeşidinden elde edilen embriyolar ise % 0.8 agar ve 30 g/l sakkaroz içeren MS ortamına aktarılmıştır (Başay ve Ellialtıoğlu 2013).

### 3.2.4. Anter kültürü

Uygun aşamadaki mikrosporları içeren ve sterilizasyonu tamamlanan tomurcuklardan anterler steril kabin içerisinde bistüri ve pens yardımıyla çıkartılarak Dumas de Vault ve Chambonnet (1982) tarafından bildirilen protokol göre ilk olarak içerisinde C besi ortamı bulunan petri kaplarına alınmıştır. Petri kapları 35°C'de 8 gün karanlıkta ve ardından 4 gün süreyle 25°C'de aydınlıkta bekletilmiştir. 12. günün sonunda anterler R rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. C ve R ortamlarının kimyasal bileşimi Çizelge 3.3'de verilmiştir. Daha sonra anterlerden elde edilen embriyolar 30 g/l sakkaroz ve % 0.8 agar içeren MS ortamına aktararak embriyolardan bitki oluşumu sağlanmıştır (Başay ve Ellialtıoğlu 2013).

**Çizelge 3.3.** Dumas de Vault ve Chambonnet (1982) tarafından bildirilen C ve R ortamlarının kimyasal bileşimi

<b>Bileşikler</b>	<b>C (mg/l)</b>	<b>R (mg/l)</b>
<b>KNO<sub>3</sub></b>	2150	2150
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1238	1238
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	412	412
<b>CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b>	313	313
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	142	142
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O</b>	50	50
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O</b>	38	38
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	34	34
<b>KCl</b>	7	7
<b>MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	22130	20130
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	3625	3225
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	3150	1550
<b>KI</b>	0.695	0.330
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b>	0.188	0.138
<b>CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O</b>	0.016	0.011
<b>CoCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O</b>	0.016	0.011
<b>Fe-EDTA</b>		
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	1865	1865
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	1390	1390
<b>Pyridoxin HCL</b>	5500	5500
<b>Nicotinic acid</b>	0.700	0.700
<b>Thiamine HCL</b>	0.600	0.600
<b>Calcium panthotenate</b>	0.500	0.500
<b>Glycine</b>	0.100	0.100
<b>Biotine</b>	0.005	0.005
<b>Myo-inositol</b>	50300	50300
<b>Vitamin B<sub>12</sub></b>	0.030	-
<b>Sakkaroz</b>	120	30
<b>Kinetin</b>	5	0.1
<b>2,4-D</b>	5	-
<b>AGAR</b>	8	8
<b>pH</b>	5.9	5.9

### 3.2.5. Flow sitometri analizleri

Flow sitometri analizleri Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Flow sitometri analizleri için örneklerin hazırlanmasında genç bitki yaprakları kullanılmıştır. Preparatlar Tuna (2013) 'nın metoduna göre hazırlanmıştır ve kısaca aşağıdaki adımları içermektedir. Bitkilerden elde edilmiş 0.5 cm<sup>2</sup> büyüklüğündeki sağlıklı yaprak dokuları bir petri kabına yerleştirilmiş ve üzerlerine 500 µl izolasyon buffer ilave edilmiştir. Yaprak dokuları keskin bir jilet ile 30-60 saniye süresince küçük parçalara ayrılana kadar parçalanmıştır (Şekil 3.6). Bu şekilde hazırlanmış örnek petri kabı içerisinde 10-15 saniye çalkalanmıştır. Çalkalama işleminden sonra 30-90 saniye kadar petri kabında bekletilen örnek Partec marka 50 µl CellTrics filtre ile süzülerek tüp içerisine aktarılmıştır. Daha sonra tüp içerisine daha önceden hazırlanmış 2 ml DAPI boyama solüsyonu ilave edilerek ışısız bir ortamda 30-60 dakika analiz edilene kadar bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler flow sitometri cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçların yorumlanmasında referans bitki olarak arpa ve çavdar bitkileri kullanılmıştır.



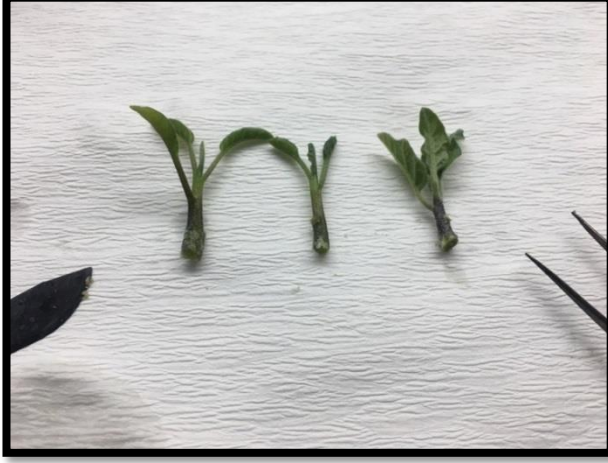
Şekil 3.6. Flow sitometri için preparatların hazırlanışı

### 3.2.6. Kromozom katlaması ve bitkilerin dış ortama alıştırılması

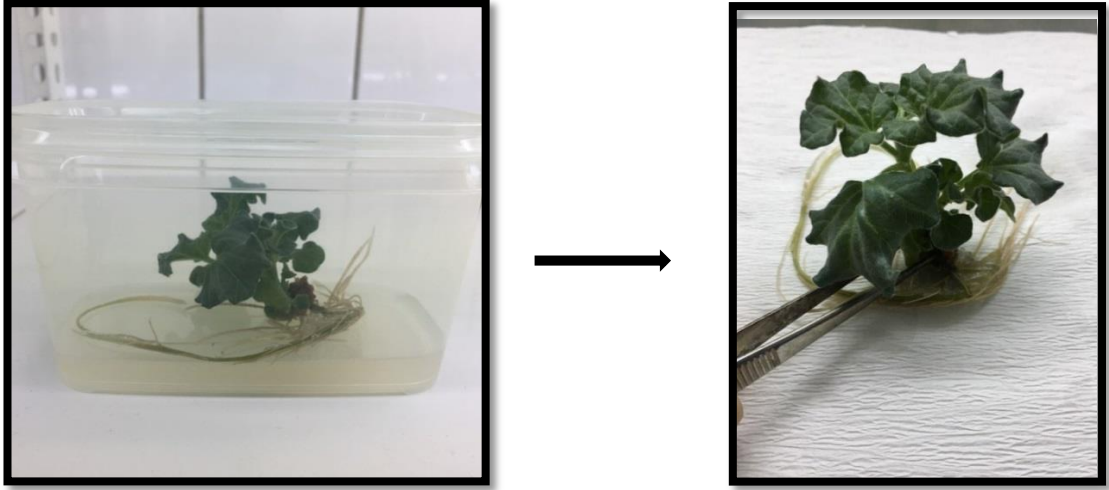
Flow sitometri analizi sonucunda haploid olduğu belirlenen bitkilerde kromozom katlaması yapılmıştır. Kromozom katlaması *in vitro* koşullarda Ellialtıoğlu (2006) tarafından bildirilen % 0.5'lik kolhisin solüsyonu içerisinde 2 saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7). Kök kısımları kesilen bitkicikler (Şekil 3.8), kromozom katlaması amacıyla kolhisin uygulandıktan sonra köklenmelerini sağlamak için 30 g/l sakkaroz ve % 0.8 agar içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Köklenmesi gerçekleşen bitkiler (Şekil 3.9), Genetika tohumculuğa ait alıştırma seralarında ilk olarak saksılara aktarılmış ve daha sonra arazi koşullarına dikilerek meyveleri olgunlaştığında meyveler hasat edilmiş bunlardan tohum üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tohumlar tekrar ekilerek bunlardan double haploid homozigot hatlar elde edilmiştir.



Şekil 3.7. Bitkilere *in vitro* kolhisin uygulaması ve köklendirme ortamına alınması



Şekil 3.8. Kolhisin uygulanması için kök kısımları alınmış bitkicikler



Şekil 3.9. Dış koşullara aktarılmadan önce köklenme gerçekleşen bitkiler

### 3.2.7. Deneme sonuçlarının değerlendirilmesi

Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 yinelemeli olarak ve her yinelemede 3 tekrür olacak şekilde kurulmuştur. Mikrospor kültüründe canlı mikrosporların yüzde oranı, mikrosporların izole edildiği gün ve stres uygulaması sonunda hesaplanmıştır. Mikrospor kültürü denemelerdeki kallus ve embriyo sayısı mikrosporların izole edilmesinden 30 gün sonra elde edilmiştir. Kalluslar iki özelliğe göre sayılmıştır; petri başına toplam kallus sayısı ve 1 mm'den büyük (> 1mm) kallus sayısı. Sadece 1 mm'den büyük kalluslar bitki rejenerasyon ortamına alınmıştır ve elde edilen bitki sayısı hesaplanmıştır. Çeşitlere ait canlı mikrospor yüzde oranı, petri başına toplam kallus ve 1 mm'den büyük kallus sayısı, embriyo sayısı ve elde edilen toplam bitki sayımları her bir uygulama için ayrı ayrı yapılmıştır. Anter kültürü çalışmalarında ise her çeşit için anterlerden elde edilen embriyo ve embriyolardan elde edilen bitki yüzde oranları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma testine göre değerlendirilmiştir.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Mikrospor/Polen Gelişim Aşamasının Belirlenmesi

Bu çalışmada iki adet patlıcan çeşidinde mikrospor embriyogenesisine en duyarlı mikrospor/polen gelişim aşamalarını içeren anterleri belirlemek için; farklı uzunluktaki tomurcuk ve anterler içerisinde bulunan mikrospor/polenlerin *in vivo* gelişim aşamaları incelenmiştir. Bu amaçla belirli uzunluktaki tomurcuk ve anterlerin içerdiği mikrospor/polen gelişim aşamasının belirlenmesinde her çeşit için 50 tomurcuk kullanılmıştır. Sitolojik gözlemler sırasında, anterler içerisindeki mikrospor/polen gelişim aşamaları Salas vd. (2012) tarafından bildirilen 7 farklı aşamada (tetrat, genç, orta ve orta-geç (vakuol) mikrospor ve genç, orta-geç ve olgun polen) ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Patlıcanda incelenen *in vivo* mikrospor/polen gelişim aşamaları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

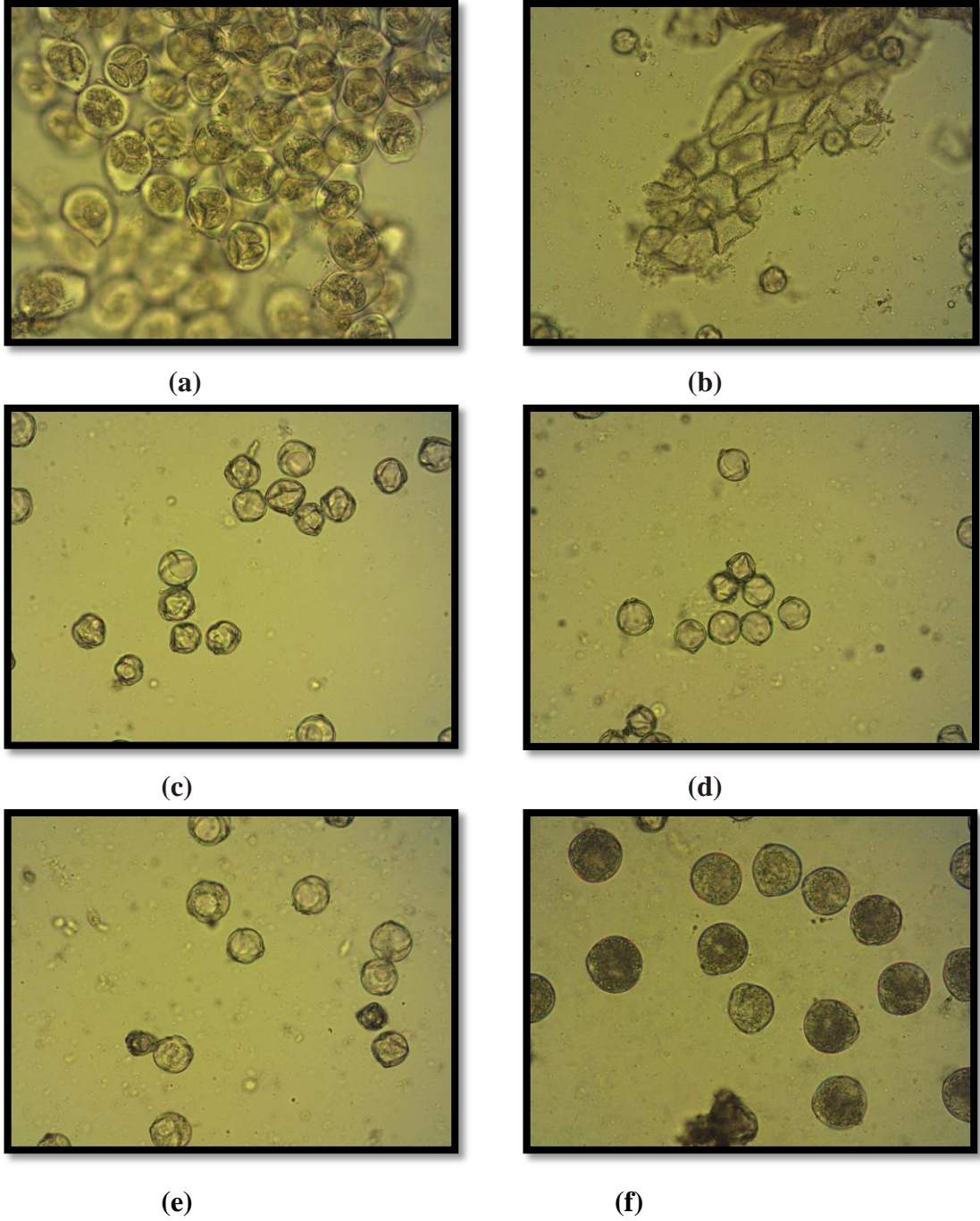
Elde ettiğimiz bulgular, tomurcuk ve anter uzunluğunun kullanılan çeşide göre değişim gösterdiğini; mikrospor kültürü için en uygun olduğu belirlenen vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polen (Şekil 4.1 d,e) aşamasını maksimum yüzdeyle içeren tomurcuk uzunlukları A117 çeşidinde 9-12.5 mm arasında değişirken; anter uzunluklarının 5-6 mm arasındaki uzunluklarda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Amadeo çeşidinde ise tomurcuk ve anter uzunluğu sırasıyla 8.5-12.5 mm ve 5-6.5 mm arasında uzunluklarda değiştiği görülmüştür (Şekil 4.3). Tomurcuk ve anter uzunlukları değerlendirildiğinde; anter uzunluğu kullanılarak 1 mm gibi bir uzunluk aralığında mikrospor/polen aşamasının daha hassas belirlenmesinden dolayı mikrospor kültürü çalışmalarında belirlenen uzunluktaki anterler kullanılmıştır.

Bazı türlerde mikrosporlar/polenler aynı anter içerisinde kültüre alma esnasında farklı gelişim safhasında bulunabilmektedir (Segui-Simarro ve Nuez 2005; Salas vd. 2012). Mikrospor/polen gelişim aşaması yönünden bir anter içerisindeki asenkronize mikrospor gelişimleri bu çalışmada da belirlenmiştir. Anterler içerisindeki mikrospor popülasyonu çok genç evreler dışında, farklı mikrospor/polen aşamalarını içeren karışık popülasyonları içermekteydi. Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de sırasıyla A117 ve Amadeo çeşitleri için sitolojik incelemeye alınan farklı uzunluktaki anterlerde görülen farklı mikrospor/polen gelişim aşamaları yüzdelerini gösterilmektedir. Yapılan çalışma sonucunda belli uzunluktaki anterlerin içerisindeki mikrospor/polen gelişim aşamaları yüzdelerinin de her çeşit için farklı olduğu belirlenmiştir.

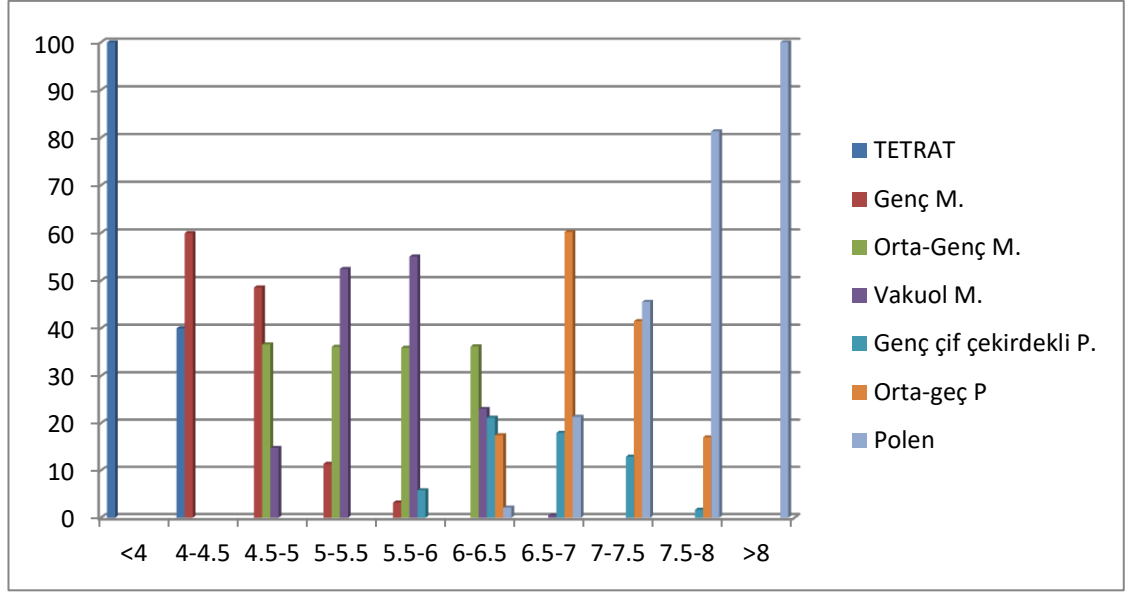
Mikrospor kültürü çalışmalarında ilk aşama, en uygun dönemdeki mikrosporları içeren anterlerin belirlenmesidir. Bu bağlamda, ilk polen mitozundan hemen önceki ve hemen sonraki dönemdeki mikrosporların embriyogenesisine doğru saptırmak için en uygun aşamada olduğu hakkında geniş bir görüş birliği vardır (Reynolds 1997; Touraev vd. 2001; Segui-Simarro ve Nuez 2008). Diğer bir deyişle, bu aşamaların vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polen aşamaları olduğuna inanılmaktadır. Ancak belirtilen bu mikrospor/polen aşamalarının türler arasında farklılık gösterebileceği de belirtilmiştir (Raghavan 1986). Patlıcanda anter kültürüyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda, genellikle tek çekirdekli, geç tek çekirdekli (vakuol mikrosporlar) ve genç çift çekirdekli polen aşamalarının kullanıldığını bildirmiştir (Tuberosa ve ark., 1987, Salas ve ark., 2011, Basay ve Ellialtıoğlu, 2012). Bununla birlikte, Salas vd. (2012), patlıcanda mikrospor/polenin gelişim aşamaları üzerinde yaptıkları ayrıntılı çalışmada

mikrospor kültürü için vakuol mikrosporlar ve genç çift çekirdekli polen aşamalarının kullanılmasını, anter kültüründe ise daha erken aşamalar olan genç ve orta-geç mikrosporları içeren anterlerin kullanılmasını önermişlerdir. Bizim çalışmamızda da mikrospor kültürü için vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polen gelişim aşamalarına sahip anterler dikkate alınmıştır.

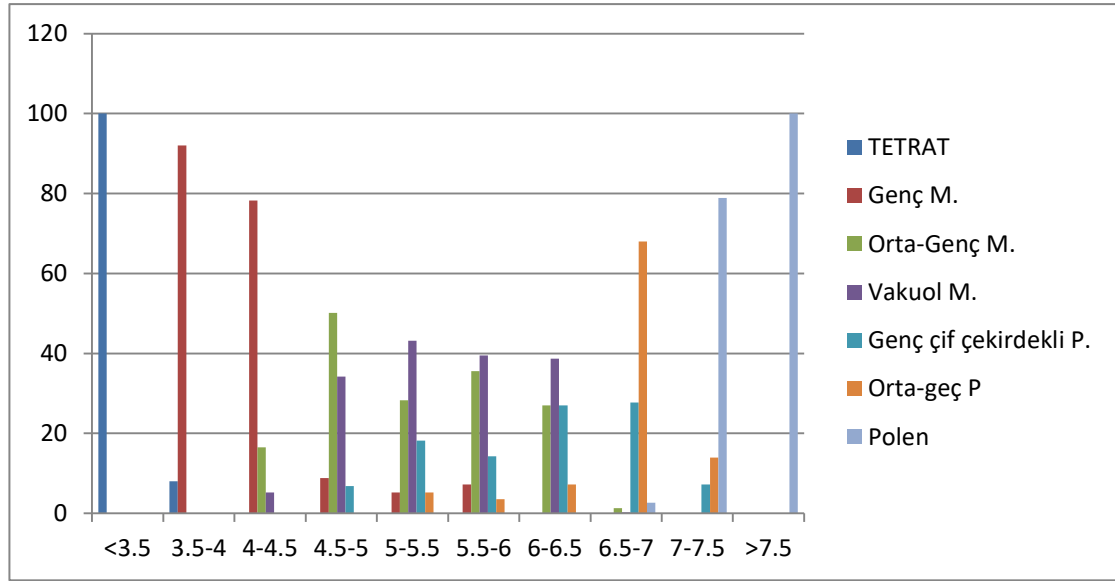
Hemen hemen tüm türler için mikrospor/polen gelişim evresi ile tomurcuk ve anter uzunluğu arasında bir korelasyon kurmanın mümkün olduğu bildirilmiştir (Kasperbauer ve Wilson 1979; Summers vd. 1992; Silva- Lauxen vd. 2003; Segui-Simarro ve Nuez 2005; Salas vd. 2012; Parra-Vega vd. 2012). Tomurcuk ve anter uzunlukları, uygun aşamadaki tomurcuk ve anterlerin seçimi ve toplanmasında büyük kolaylık sağlamakta, bu nedenle tomurcuk ve anter uzunluklarıyla mikrospor gelişim aşamasının arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması büyük önem taşımaktadır. Patlıcanda, uygun gelişim aşamasındaki anterleri içeren tomurcuklar, genellikle farklı araştırmacılar tarafından görsel tanımlayıcılar ile tanımlanmıştır ve bunların aynı bitkinin genotipleri ve hatta tomurcukları arasında varyasyonlar gösterebileceği de belirtilmiştir (Dumas de Vaultx ve Chambonnet, 1982; Tuberosa ve ark., 1987; Rotino, 1996). Karakullukçu ve Abak (1993a), 4 farklı çeşitte yaptıkları çalışmada tomurcuk uzunluklarının çeşitlere bağlı olarak 22.4-24.7 mm olduğunu belirlemişlerdir. Ellialtıoğlu vd. (2012) yaptıkları çalışmada kullandıkları genotiplerde uygun dönemdeki mikrosporları içeren tomurcuk uzunluğunun 15-17 mm olduğunu, petallerin sepal ayırım seviyesine ulaştığı ve anter renginin yeşilimsi sarı olduğunu belirlemişlerdir. Salas vd. (2012), patlıcanda tomurcuk ve anter uzunluğu ile mikrospor/polen gelişim evreleri arasında bir korelasyon olduğunu, tomurcuk ve anter uzunluğunun kullanılmasını önermişlerdir. Nitekim çalışmamızda da tomurcuk ve anter uzunluklarıyla mikrospor/polen gelişim aşaması arasında ilişki olduğu belirlenmiş ve Salas vd. (2012) sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir. Mikrospor kültüründe, anter uzunluğunun kullanılmasıyla direk olarak anterlerde ölçüm yapılması ve mikrosporların bu anterlerden izole edilebilmesinden dolayı bu yöntem hızlı, pratik ve güvenilir bulunmuştur. Bununla birlikte bu ve diğer çalışmalarda dikkat çeken önemli bir nokta ise kullanılan çeşitlere göre farklı tomurcuk ve anter uzunluklarının önerilmesinden dolayı, her çeşit için çalışmanın başında uygun mikrospor/polen gelişim aşamasını içeren tomurcuk ve anter uzunluklarının tespit edilmesinin gerekli olduğunu söylemek mümkündür.



**Şekil 4.1.** *In vivo* mikrospor/polen gelişim aşamaları. a) tetrat b) genç mikrosporlar c) orta-geç mikrosporlar d) \*vakuol mikrosporlar e) \*genç çift çekirdekli polen f) orta-geç ve olgun polen (\*mikrospor kültürü için uygun gelişim aşamaları)



**Şekil 4.2.** A117 çeşidine ait farklı anter uzunluklarında bulunan farklı mikrospor/polen gelişim evrelerinin dağılımı

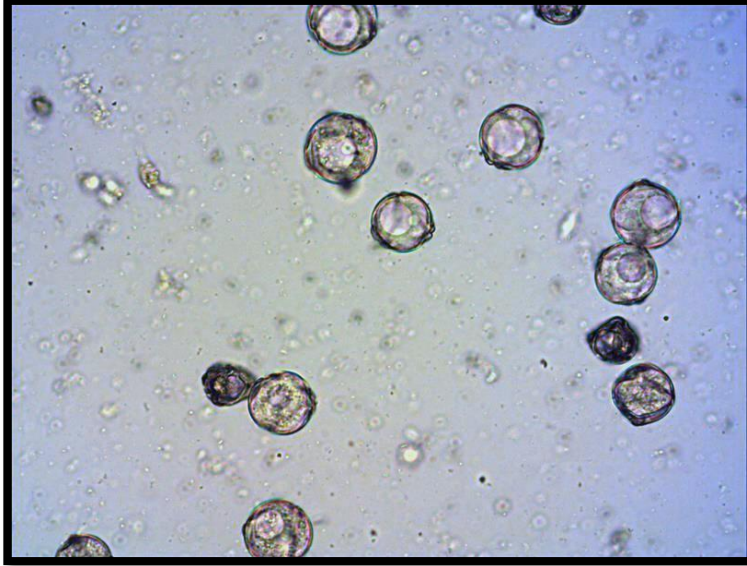


**Şekil 4.3.** Amadeo çeşidine ait farklı anter uzunluklarında bulunan farklı mikrospor/polen gelişim evrelerinin dağılımı

#### 4.2. Mikrospor kültürü

Denemenin birinci basamağında, A117 ve Amadeo çeşitlerinde Miyoshi (1996) tarafından bildirilen protokole göre mikrospor kültürü denemeleri gerçekleştirilmiştir. Mikrospor kültürü yoluyla mikrosporların tüm gelişim süreci ışık ve flouresans mikroskobu altında incelenmiştir. Gelişim sürecinin kullanılan çeşitlerin her ikisinde de aynı olduğu tespit edilmiştir. Mikrospor kültürünün yapıldığı aşamada kültüre alınan mikrosporların çoğunluğu vakuol mikrospor veya genç çift çekirdekli polen aşamasındaydı (Şekil 4.4). Stres uygulamalarına maruz kalan mikrosporlardan birçoğu hemen gelişimini durdurur ve/veya ölürken; herhangi bir morfolojik değişim

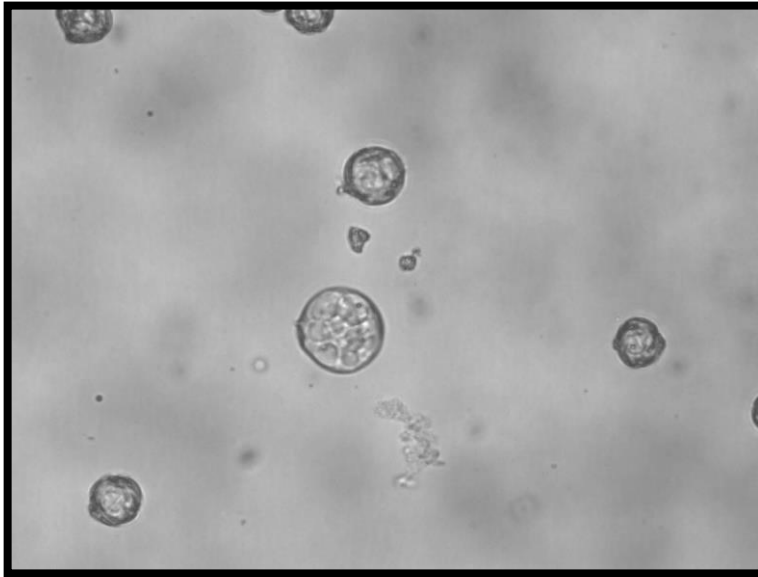
göstermemiş ve başlangıçta kültüre alındığı halde kalmıştır (Şekil 4.5). Bazıları ise olgun poleni meydana getirmek üzere gametofitik gelişimi takip etmişlerdir (Şekil 4.5). Diğer bazı mikrosporların ise stres uygulamaları ile etkili bir biçimde bölünmeleri uyarılmıştır. Bu mikrosporlarda stres uygulamasından sonra ilk olarak bazı türlerde mikrosporların sporofitik gelişiminin başlangıç göstergelerinden biri olduğu kabul edilen “yıldız benzeri” yapılar tespit edilmiş (Şekil 4.6) ve mikrosporlarda simetrik bölünmeler gözlenmiştir (Şekil 4.7). Stres uygulamasının ardından 25°C de bekletildiği kültürün ilk haftasında dört ve daha fazla hücreli mikrosporlar belirlenmiştir (Şekil 4.8, 4.9) ve yaklaşık 10 gün sonra çok hücreli yapılar meydana gelmiştir (Şekil 4.10). Amadeo çeşidinde ilk dört hafta boyunca bu çok hücreli yapıların bazılarının globular embriyolara dönüştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.10). Buna paralel olarak, düzensiz kallus benzeri yapılar da gözlenmeye başlanmıştır (Şekil 4.11). Daha sonraki süreçte globular embriyolardan bazı durumlarda embriyo elde edilmesine karşılık büyük çoğunluğunun kallus meydana getirdiği gözlenmiştir. A117 çeşidin de ise herhangi bir embriyo oluşumu gözlenmezken bir ay sonunda mikrospordan yalnızca kallus oluşumu meydana gelmiştir.



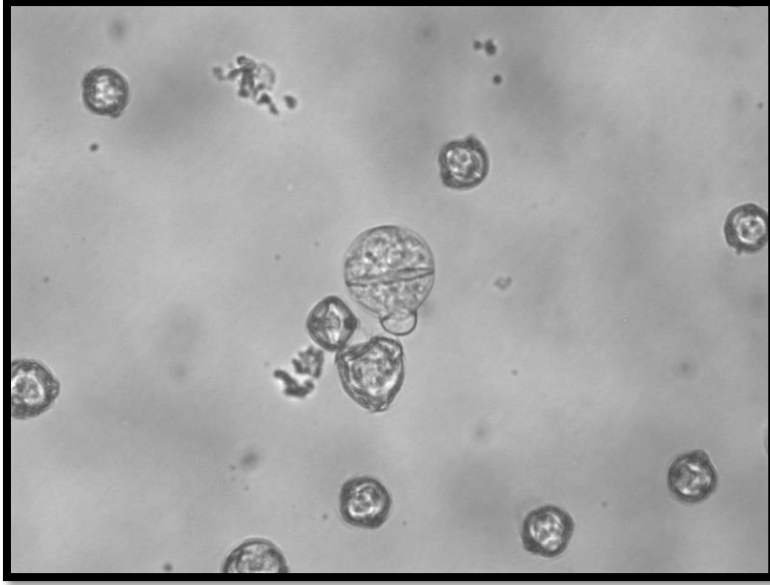
Şekil 4.4. Kültüre alınan vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polen



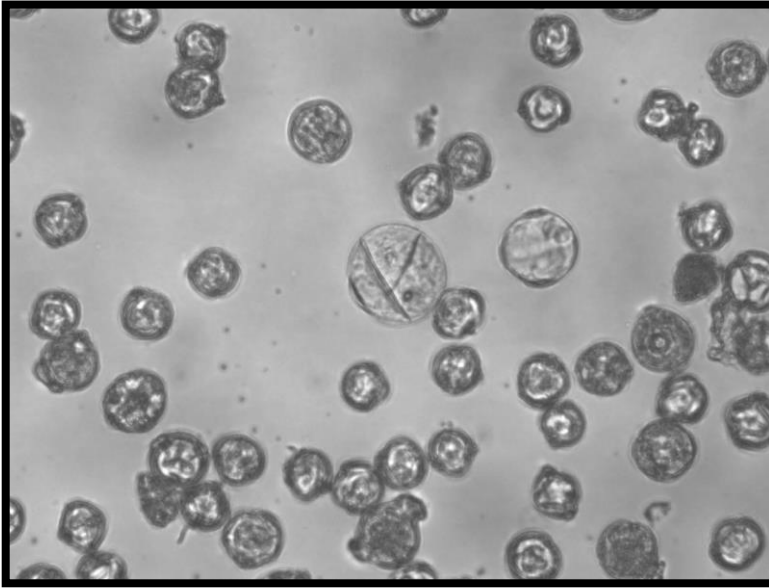
Şekil 4.5. Normal gametofitik gelişim gösteren polen (↔) ve gelişimlerini durduran mikrosporlar (↘)



Şekil 4.6. Mikrosporelerde görülen “yıldız benzeri” yapı

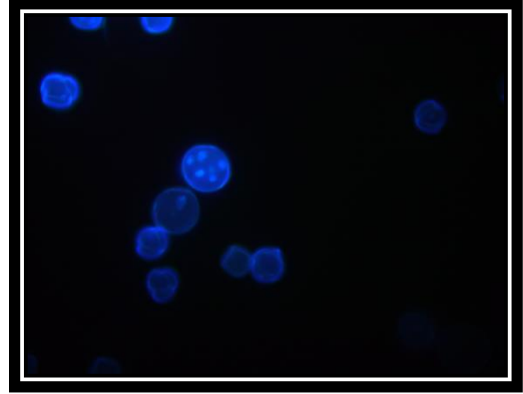
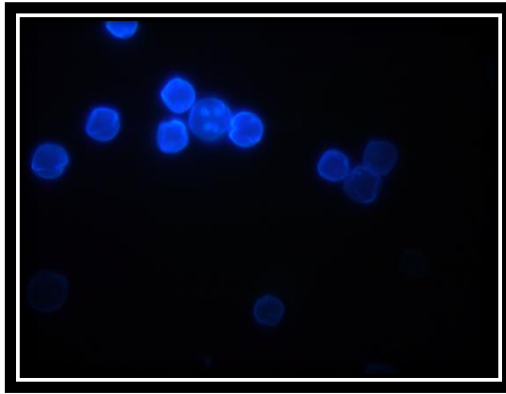


**Şekil 4.7.** Sporofitik gelişim gösteren mikrosporlarda simetrik bölünme

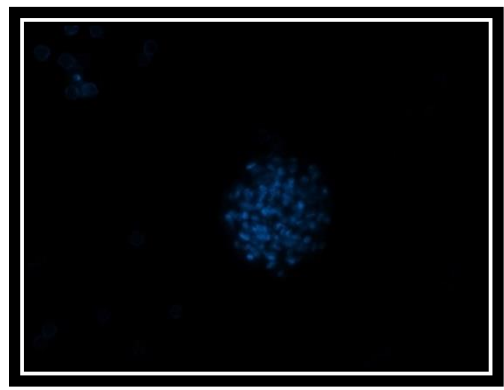
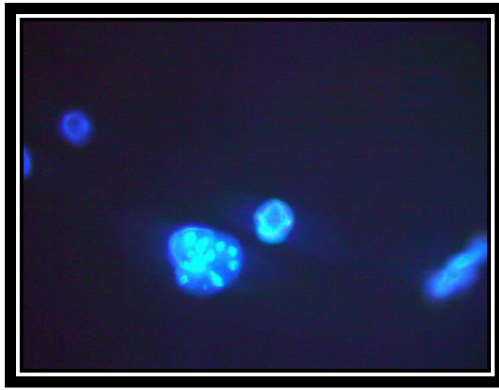


**Şekil 4.8.** Sporofitik gelişim gösteren ve bölünen mikrosporların ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

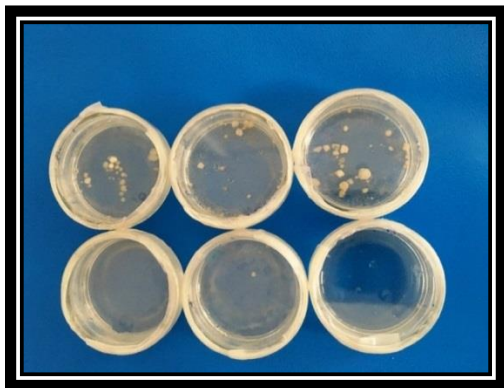
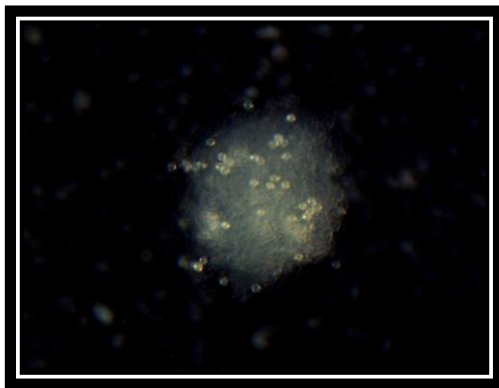




**Şekil 4.9.** Sporofitik gelişim gösteren ve bölünen mikrosporlarda dört ve daha fazla hücreli mikrosporların flouresans mikroskop altındaki görüntüsü

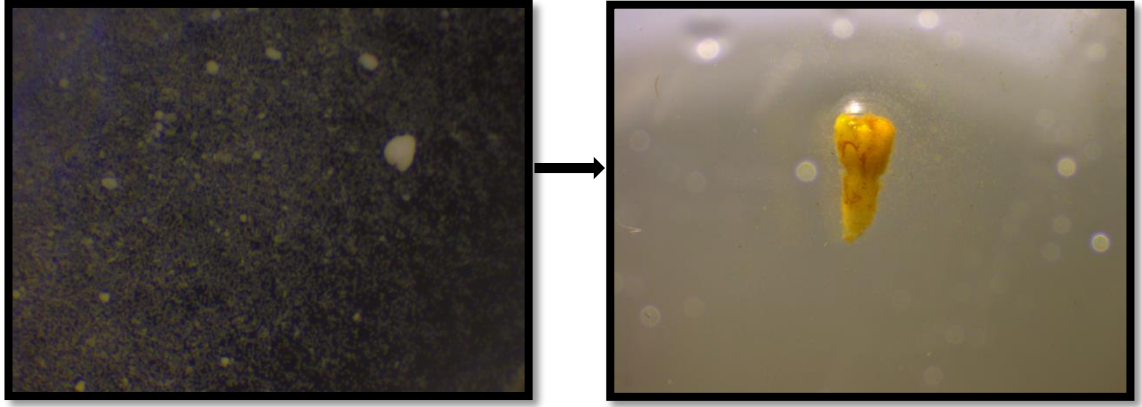


**Şekil 4.10.** Sporofitik gelişim gösteren mikrosporlarda meydana çok çekirdekli yapılar ve globular embrioların flouresans mikroskop altındaki görüntüsü



**Şekil 4.11.** Mikrosporlardan elde edilen kallus görüntüleri





**Şekil 4.12.** Amadeo çeşidinde mikrospordan elde edilen embriyolar

Doğrudan embriyogenesisine gitmek üzere genetiksel olarak programlanmış olan mikrosporarlar, embriyo haline gelmek için farklı seviyelerde birçok değişikliğe maruz kalmaktadırlar. Bu değişiklikler çerçevesinde, mikrosporarlar önemli ölçüde büyür, hücre merkezine doğru çekirdek yeniden konumlanır, sitoplazma belirginleşir ve büyük vakuol küçük parçalara ayrılır (Touraev vd. 2001). Bu düzenlemeler birçok türde indüklenen mikrosporalarda embriyojenik gelişimin geçici ve erken morfolojik işareti olarak kabul edilen yıldız benzeri bir morfoloji sağlar. Diğer bir morfolojik gösterge ise androgenesis indüksiyonunda çekirdeğin yeniden konumlanmasının ardından gözlenen simetrik bölünmelerdir ( Indrianto vd. 2001; Maraschin vd. 2005b; Segui-Simarro ve Nuez 2008; Corral-Martinez ve Segui-Simarro 2012). Bu çalışmada da kullanılan çeşitlerde stres uygulamasıyla birlikte yıldız benzeri morfoloji, simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapıların oluşumunun gözlenmesiyle her iki çeşitte de bazı mikrosporarların sporofitik gelişime doğru yönlendiği belirlenmiştir.

Denemenin birinci basamağında mikrospor kültürü tekniğine A117 ve Amadeo çeşitlerinin tepkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu iki patlıcan çeşidinde mikrospor kültürü sonucunda; kültüre alma sırasında (1.gün) canlı mikrospor yüzde oranı, ön uygulama sonrasında (3. gün) canlı mikrospor yüzde oranı, toplam kallus sayısı/petri, 1 mm'den büyük kallus sayısı/petri ve elde edilen embriyo sayısı Çizelge 4.1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Kültüre alınan mikrosporalarda canlılık önemli bir konu olup; bu çalışmada da kullanılan iki farklı çeşide ait mikrospor canlılıkları FDA ile boyanarak tespit edilmiştir. Canlı olan mikrosporarlar flouresans ışık altında parlak görünmektedir. Bizim çalışmamızda mikrosporarların izolasyonundan hemen sonra (1.gün) ve stres uygulamasının sonunda (3. gün) mikrospor canlılıkları incelenmiştir. Mikrosporarların kültüre alındığı andaki sonuçlara göre A177 çeşidinde mikrosporarların % 8.75 oranında, stres uygulaması sonunda ise % 1.55 oranında canlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13,4.14). Amadeo çeşidinde ise kültüre alındığı anda mikrosporarların % 19.77oranında, stres uygulaması sonunda ise % 14.23 oranında canlı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.15,4.16). Mikrospor kültürü çalışmalarında kültüre alınan mikrosporarların stres uygulamaları ve kültür boyunca canlılıklarını kaybettiği farklı türlerde bildirilmiştir (Obert vd. 2000; Maraschin vd. 2003; Makowska vd. 2017). Bizim çalışmamızda da FDA ile kültüre alınan mikrosporalarda canlılıklar tespit edilmiş ve özellikle stres uygulamasının ardından mikrosporarların canlılıklarını kaybettiği belirlenmiştir.

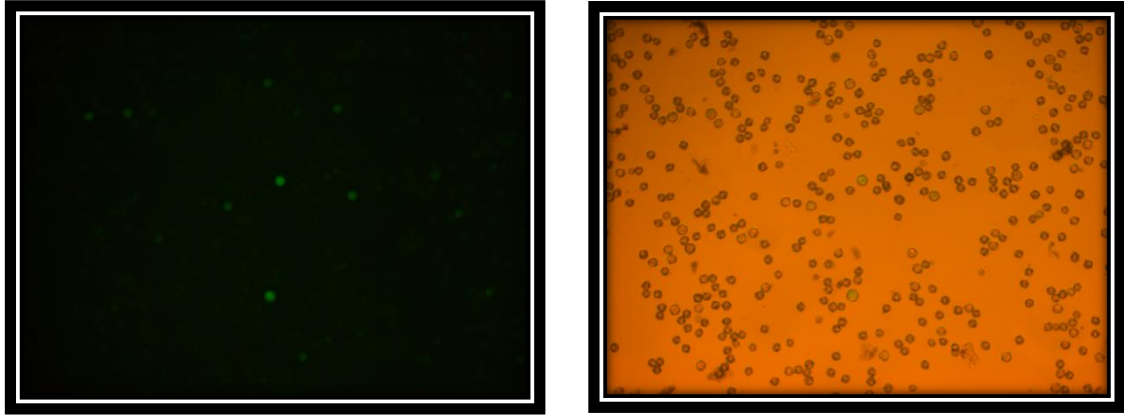
Araştırmada bir ay sonunda mikrospordan toplam kallus ve 1 mm'den büyük kallus sayımları ayrı ayrı yapılmıştır. Amadeo çeşidinde toplam kallus sayısı 19.44 kallus/petri olarak belirlenirken, A117 çeşidinde 1.11 kallus/petri olarak belirlenmiştir. 1 mm'den büyük kallus değerleri ise A177 çeşidinde 0.89 kallus/petri ve Amadeo çeşidinde 15.89 kallus/petri olduğu gözlemlenmiştir. A117 çeşidinde embriyo oluşumu meydana gelmezken, Amadeo çeşidinde ortalama 0.56 embriyo/petri elde edilmiştir.

Mikrospor embriyogenesisde başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birinin genotip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Datta 2005; Segui-Simarro ve Nuez 2008). Patlıcanda hem anter kültürü hem de mikrospor kültüründe kallus, embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonunun büyük ölçüde donör bitkinin genotipine bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Tuberosa vd. 1987; Karakullukçu ve Abak 1992a; Salas vd. 2011,2012; Corral-Martinez ve Segui-Simarro 2012; Rivas-Sendra vd. 2015). Farklı bitki türlerinde de aynı kültür koşulları altında, mikrospordan kültür tekniğine olan cevapları bakımından genotipler arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Miah vd. 1985; Ferrie vd. 1995b; Hoekstra vd. 1992; Ferrie ve Keller 1995). Bizim çalışmamızda da mikrospor kültürü yoluyla elde edilen kallus ve embriyo oranları arasında önemli farklılıklar elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan genotiplerden kallus elde edilmesine karşın Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2012,2014) ve Rivas-Sendra (2015) tarafından mikrospor kültürüne iyi yanıt veren "Bandera" çeşidinde saptanan değerler altındadır. Ancak Amadeo çeşidinden ilk defa Miyoshi (1996) tarafından bildirilen kültür ortamında düşük bir oranda da olsa embriyo elde edilmiştir. Araştırmamızda literatürde bildirilen değerlerden farklı olmasına neden olarak kullanılan genotiplerin farklılığı, donör bitkilerin yetiştirme koşulları ve laboratuvar koşullarının farklı olması gösterilebilir.

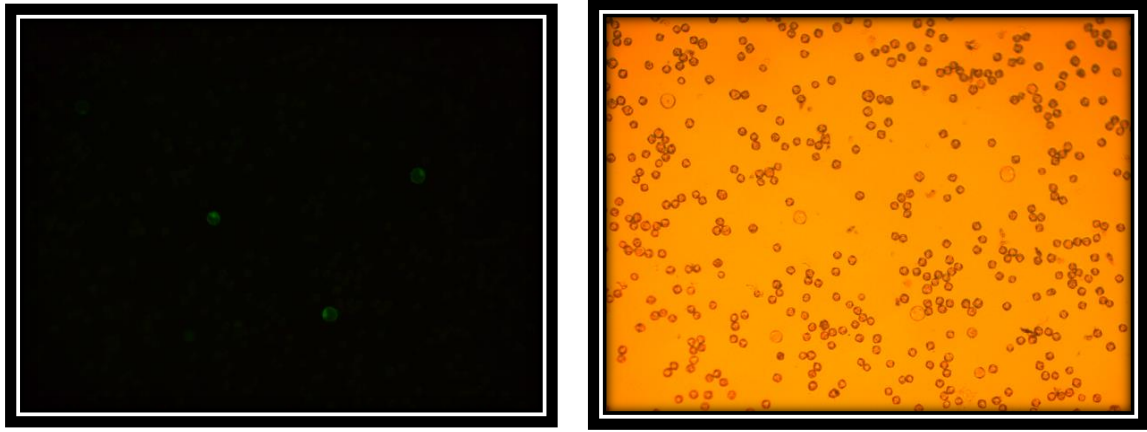
**Çizelge 4.1.** Patlıcan çeşitlerine ait mikrospordaki canlılık oranları ve çeşitlerin mikrospor kültürüne tepkileri

Genotip	1. gün Canlı mikrospor (%)	3. gün Canlı mikrospor (%)	Toplam Kallus/petri	> 1 mm büyük kallus/petri	Embriyo sayısı/petri
A117	8.75b	1.55b	1.11b	0.89b	0.00b
Amadeo	19.77a	14.23a	19.44a	15.89a	0.56a

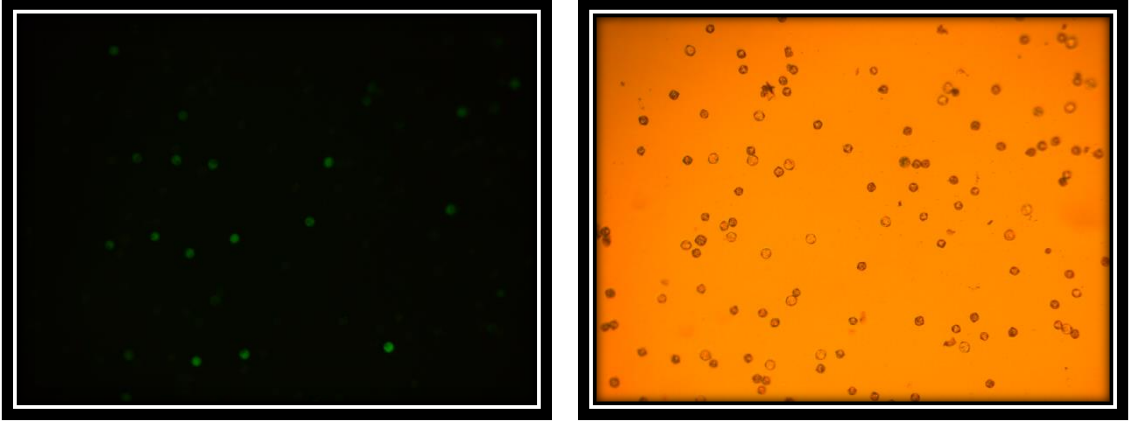
\*Her bir karakter sütununda ayrı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.



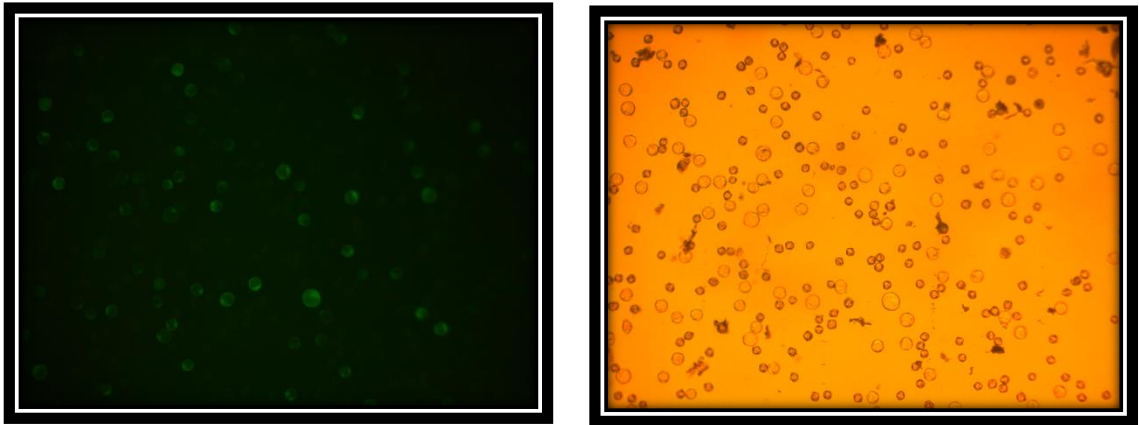
**Şekil 4.13.** A117 çeşidinde mikrosporların kültüre alındığı andaki canlılık oranlarını belirlemek amacıyla flouresans ve ışık mikroskobunda alınan görüntü



**Şekil 4.14.** A117 çeşidinde mikrospora stres uygulamasının ardından kültüre alınan mikrosporda canlılık oranlarını belirlemek amacıyla flouresans ve ışık mikroskobunda alınan görüntü



**Şekil 4.15.** Amadeo çeşidinde mikrosporların kültüre alındığı andaki canlılık oranlarını belirlemek amacıyla flouresans ve ışık mikroskobunda alınan görüntü



**Şekil 4.16.** Amadeo çeşidinde mikrospora stres uygulamasının ardından kültüre alınan mikrosporda canlılık oranlarını belirlemek amacıyla flouresans ve ışık mikroskobunda alınan görüntü

#### 4.2.1. Arabinogalaktan proteinlerinin etkisi

Arabinogalaktan proteinlerinin (AGP) etkisini belirlemek amacıyla 10 mg/l (AGP1), 1 mg/l (AGP2) ve 0.1 mg/l AGP(3) olarak belirlenen dozlarda AGP'nin patlıcanda kullanılan çeşitlerde mikrospor kültürü üzerine etkileri araştırılmıştır. Mikrosporların kültüre alınmasından bir ay sonra kültüre alınan mikrosporlardan her iki çeşitte de yalnızca kallus oluşumu meydana gelmiş herhangi bir embriyo oluşumuna rastlanmamıştır. Bir ay sonunda petri başına toplam kallus ve 1 mm'den büyük kallus sayıları değerlendirildiğinde; A117 çeşidinde kontrol grubuyla uygulanan dozlar açısından istatiki olarak farklılık önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.2). Amadeo çeşidinde ise toplam kallus bakımından en yüksek sonucu 26.00 kallus/petri ortalama değer ile kontrol grubu vermiştir. 1 mm'den büyük kallus sayısı açısından ise herhangi bir farklılık belirlenmemiştir (Çizelge 4.3). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde AGP uygulamasının kullanılan çeşitlerde mikrospor kültürü üzerine teşvik edici herhangi bir etkisinin bulunmadığı görülmektedir.

**Çizelge 4.2.** A117 çeşidinde mikrospor kültürüne AGP'nin etkisi

Çeşit	AGP Konsantrasyon	Toplam Kallus/petri	> 1mm kallus /petri
A117	Kontrol	2.67	2.33
	AGP1	2.11	1.44
	AGP2	1.89	1.78
	AGP3	2.33	2.00

**Çizelge 4.3.** Amadeo çeşidinde mikrospor kültürüne AGP'nin etkisi

Çeşit	AGP Konsantrasyon	Toplam Kallus/petri*	> 1mm kallus /petri
AMADEO	Kontrol	26.00a	18.33
	AGP1	21.67b	18.67
	AGP2	22.33b	17.67
	AGP3	25.00ab	16.67

\*Her bir karakter sütununda ayrı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir

AGP; kök, yaprak, çiçek ve tohumlar dahil olmak üzere hemen hemen tüm bitki organlarında bulunmaktadır. AGP embriyogenesis, hücre çoğalması gibi bitki büyümesi ve gelişmesinde rol almaktadır (Makowska vd. 2017; Yuan vd. 2012). AGP'nin mikrospor embriyogenesis üzerine olumlu etkileri birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Kasha vd. 2003; Letarte vd. 2006; Yuan vd. 2012; Corral-Martinez ve Segui-Simarro 2014; Makowska vd. 2017). Yapılan bu çalışmalarda hem patlıcanda

hemde diğer türlerde AGP'nin mikrospor embriyogenesi teşvik ettiği bildirilmesine rağmen bu çalışmada kullanılan 10 mg/l, 1 mg/l ve 0.1 mg/l AGP uygulamalarının mikrospor kültürü çalışması yapılan bu çeşitlerde herhangi bir teşvik edici etkisi olmamıştır. Kasha vd. (2003) mikrospor kültür ortamında AGP'nin tek başına yeterli olmadığını bildirmişlerdir. Dolayısıyla patlıcanda farklı çeşitlerde, farklı ortam kompozisyonlarında AGP'nin farklı konsantrasyonlarının ortama eklenmesinin denenmesi tavsiye edilebilir.

#### 4.2.2. Absisik asitin etkisi

Absisik asitin etkisini belirlemek amacıyla farklı dozlarda ve sürelerde absisik asit uygulaması mikrospora uygulanan ön uygulama esnasında yapılmıştır. 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 ve 5 mg/l olmak üzere farklı dozlarda ve 24, 48 ve 72 saat olmak üzere farklı sürelerde uygulanmıştır. Denemenin ilk aşamasında farklı doz ve sürelerde uygulanan ABA'nin mikrosporda stres uygulaması ardından kontrole göre mikrosporda canlılık üzerine etkileri araştırılmıştır. Kontrol ve her ABA uygulaması için FDA boyaması ile mikrosporda canlılık yüzde oranı hesaplanmıştır

ABA konsantrasyonları ve uygulama sürelerine ait bulgular Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'de verilmiştir. Çizelgelerden görüleceği gibi, her iki çeşitte de kontrole göre tüm ABA konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin mikrosporda canlılık yüzdesini artırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. A117 çeşidinde en yüksek mikrospor canlılığı yüzdesi 0.1 mg/l ABA'nin 24 saat süreyle uygulanmasından elde edilmiştir (Çizelge 4.4). Amadeo çeşidinde ise 1 mg/l ABA'nin 24 saat süreyle uygulanmasıyla canlılık yüzdesinde artış meydana gelmiştir (Çizelge 4.5). Bu sonuçlardan hareketle A117 çeşidinde 35°C'de 3 günlük ön uygulamanın ilk 24 saatinde kültüre alınan mikrospora 0.1 mg/l ABA uygulanmış ve 24 saat sonunda mikrospordan ABA'nin uzaklaştırılması amacıyla santrifüjleme işlemi yapılmış ve ardından tekrar su içinde bekletilmiştir. Ön uygulamanın ardından standart protokole göre kültüre alınmıştır. Bir ay sonunda A117 çeşidinde hem kontrol ortamından hem de ABA uygulaması yapılan ortamlarda herhangi bir kallus gelişimi meydana gelmemiştir. Amadeo çeşidinde ise 1 mg/l ABA'nin 24 saat süreyle uygulanmasıyla, toplam kallus ve 1 mm'den büyük kallus sayıları değerlendirildiğinde; kontrol grubuyla ABA uygulaması arasında istatistiki olarak farklılık önemli bulunmamıştır. ABA uygulaması ayrıca Amadeo çeşidinde embriyo oluşumunu teşvik etmemiştir (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.4.** ABA konsantrasyonu ve uygulama sürelerinin A117 çeşidinde ön uygulama sonrasında canlılık üzerine etkisi

ABA Konsantrasyonu (mg/l)	ABA Uygulama Süresi		
	24 s (%)	48 s (%)	72 s (%)
<b>0</b>	1.54 e	1.54 e	1.54 e
<b>0.1</b>	<b>5.77 a</b>	3.38bcde	2.70 cde
<b>0.2</b>	5.06 ab	3.72 bc	2.81cde
<b>0.5</b>	1.98cde	3.32bcde	2.14cde
<b>1</b>	3.6bcd	3.49bcd	1.57e
<b>2</b>	3.54bcd	2.98cde	3.38bcde
<b>5</b>	2.18cd	1.74de	3.43bcde

\*Her bir karakter sütununda ayrı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark  $p<0.05$  düzeyinde önemlidir.

**Çizelge 4.5.** ABA konsantrasyonu ve uygulama sürelerinin Amadeo çeşidinde ön uygulama sonrasında canlılık üzerine etkisi

ABA Konsantrasyonu (mg/l)	ABA Uygulama Süresi		
	24 s (%)	48 s (%)	72 s (%)
<b>0</b>	2.18def	2.18def	2.18def
<b>0.1</b>	2.44def	3.39cdef	2.11def
<b>0.2</b>	4.35cde	4.59cd	2.88def
<b>0.5</b>	4.19cde	4.71bcd	3.76cdef
<b>1</b>	<b>7.99a</b>	2.55def	6.99ab
<b>2</b>	5.69abc	2.76def	7.08ab
<b>5</b>	4.39cde	1.88ef	2.96f

\*Her bir karakter sütununda ayrı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark  $p<0.05$  düzeyinde önemlidir.

**Çizelge 4.6.** ABA 'in mikrospor kültürü üzerine etkisi

Çeşit	ABA konsantrasyonu/süresi	Toplam Kallus/petri	>1mm kallus/petri
<b>A177</b>	Kontrol	0	0
	0.1 mg/l ABA / 24s	0	0
<b>Amadeo</b>	Kontrol	12.56	11.78
	1 mg/l ABA / 24 s	11.44	9.89

Mikrospor embriyogenesis, mikrosporların gametofitik gelişimden genellikle bir stres uygulaması ile sporofitik gelişime yönlendirildiği bir süreçtir. Mikrospor embriyogenesis çalışmalarında genel olarak tüm türlerde tetikleyici bir stres uygulaması gerekli bir faktör olarak görülmektedir (Shariatpanahi vd. 2006; Ferrie ve Caswell 2011). Mikrosporlarda uyarıcı bir stres uygulaması ABA biyosentezini düzenlemektedir. Imamura ve Harada (1980) tütünde anterlere mannitol uygulanması ile polen başına ng cinsinden içsel ABA konsantrasyonları yükseldiği belirlemiştir. Ayrıca araştırmacılar deneme sonuçlarına ve daha önceki gözlemlerine göre sürekli ABA uygulaması yerine kısa süreli uygulamasının bitkicik oluşumunu artırdığını belirtmişlerdir. ABA düzeyindeki geçici artışın indüksiyon döneminde polen embriyogenesisde uyarıcı bir etki yarattığını ve kültür ortamında ABA'in sürekli varlığının somatik ve polen embriyogenesis oluşumu için inhibe edici olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2014) yaptıkları çalışmada patlıcanda mikrospor kültüründe ABA'in etkisinin belirlemek için hem stres uygulamaları hem de kültür süresi boyunca ABA uygulamışlardır. ABA uygulamasından elde edilen sonuçlara göre, kallus sayısı, boyutu ve ağırlığı açısından en uygun konsantrasyonun  $0.5 \times 10^{-6}$  M olduğunu belirlemiştir. Bunun nedeninin düşük ABA konsantrasyonlarının mikrospor canlılığını arttırmak suretiyle veya ozmotik stres kaynaklı oksidatif hasarın etkisini azaltmasından kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Van Bergen vd. (1999) ise ABA'in ön uygulama sonrasında mikrosporlardaki canlılık üzerine etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bizim denemelerimizde de her iki çeşitte de sadece ön uygulama sırasında kısa süreli (24 saat) ABA uygulamasının mikrosporlarda canlılık üzerine olumlu etkisi belirlenmiştir. Ancak kallus oluşumu üzerine Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2014) aksine istatistiki düzeyde önemli bir farklılık görülmemiştir.

#### 4.2.3. Farklı hormon kombinasyonlarının etkisi

Bu araştırmada NLN ortamına 2,4-D ve kinetinin farklı dozları ilave edilmiş ve bu ortamların etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 2,4-D ve kinetinin farklı konsantrasyonlarını içeren 16 farklı ortam kombinasyonu hazırlanmıştır. Stres uygulamasının ardından mikrosporlar bu ortamlarda kültüre alınmıştır.



Mikrosporların kültüre alınmasından bir ay sonra elde edilen istatistiki değerlendirme sonuçları Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde her iki çeşit içinde toplam kallus ve 1 mm’den büyük kallus sayısı bakımından besin ortamlarının içerdiği hormon konsantrasyonları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. Çizelge 4.7 incelendiğinde A117 çeşidinde toplam kallus sayısı açısından, en yüksek kallus sayısı 12 numaralı ortamdan (2.33 kallus/petri) elde edilmiştir. 12 numaralı ortam 1, 4, 5, 6, 8, 10 numaralı ortamlarla istatistiksel olarak aynı grupta yer almış ancak 12 numaralı ortam kombinasyonunun A117 çeşidinde başarılı olduğu belirlenmiştir. Kontrol ortamının 5, 6, 8, 10 numaralı ortamlarla istatistiksel olarak farklılık göstermediği tayin edilmiştir. 15 numaralı ortamdan ise herhangi bir kallus oluşumu meydana gelmemiştir. 1 mm’den büyük kallus sayısı bakımından da benzer şekilde en yüksek ortalama değer 12 numaralı ortamdan (1.44 kallus/petri) elde edilirken en düşük değer ise 15 ve 16 numaralı ortamlardan elde edilmiştir. 1 mm’den büyük kallus sayısı bakımından kontrol ortamı ile diğer ortamlar arasında istatistiki olarak önemli farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.8 incelendiğinde ise Amadeo çeşidinde toplam kallus sayısı açısından, en yüksek kallus sayısı kontrol ortamından (19.33 kallus/petri) elde edilmiş ve kontrol ortamı diğer ortamlardan istatistiki açıdan önemli derecede farklı bulunmuştur. Bunu 10 numaralı (7 kallus/petri) ve 15 numaralı ortam (6 kallus/petri) izlemiştir. Diğer ortamlar Amadeo çeşidinde etkili bulunmamıştır. 1 mm’den büyük kallus sayısı bakımından aynı şekilde en yüksek değer kontrol ortamından (16.33 kallus/petri) elde edilmiş ve kontrol ortamı ile diğer bütün ortamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede fark belirlenmiştir. Bunu 10 numaralı ortam (7.00 kallus/petri) izlemiştir. Diğer kullanılan ortamlarda 1 mm’den büyük kallus sayısı bakımından istatistiksel bir fark tayin edilmemiştir.

Mikrospor embriyogenesis çalışmalarında kullanılan büyüme düzenleyiciler hem türlere göre hem de aynı tür içinde büyüme düzenleyicilerin cins ve dozları bakımından farklılıklar göstermektedir. Ancak genel olarak çoğu türde kültür ortamına ilave edilen hormonların mikrospor embriyogenesisi teşvik ettiği bilinmektedir. Genel olarak patlıcanda anter kültürü çalışmalarında farklı araştırmacılar tarafından oksin kaynağı olarak 2,4-D, NAA ve IAA kullanılırken, sitokinin olarak kinetin ve zeatin kullanılmıştır (Dumas de Vault ve Chambonnet 1982; Rotino vd. 1987; Alpsoy ve Şeniz 2007; Matsubara vd. 1992). Ancak Dumas de Vault ve Chambonnet (1982) tarafından bildirilen protokolda 2,4-D ve kinetin kombinasyonu birçok araştırmacı tarafından farklı çeşitlerde kullanılmış ve genotiplere göre farklı oranlarda embriyo, kallus ve bitki elde edilmiştir (Tuberosa 1987; Başay vd. 2010; Salas vd. 2011,2012; Ellialtıoğlu vd. 2012; Başay ve Ellialtıoğlu 2013). Mikrospor kültüründe ise şimdiye kadar mikrospordan kallus oluşumunu teşvik eden tek ortam Miyoshi (1996) tarafından; % 2 sakkaroz, 0.5 mg/l NAA ve 0.5 mg/L BAP büyüme düzenleyicilerini içeren NLN ortamıdır. Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2014) patlıcanda mikrospor kültürü etkinliğini artırmak amacıyla yaptıkları çalışmada; standart protokolda kültür ortamında bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılan BAP ve NAA’ın değişik konsantrasyonlarının etkilerini incelemişlerdir. Standart protokolda kullanılan 1X konsantrasyonun 0.2X oranında azaltılmasıyla elde edilen yeni BAP ve NAA konsantrasyonlarının kallus sayısı ve büyüklüğü açısından daha iyi sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda ise her çeşit için en yüksek kallus oluşum oranı farklı hormon konsantrasyonuna sahip ortamlardan elde edilmiştir. Bu da mikrospor

embriyogeneside her genotip için farklı hormonlar veya aynı hormonun farklı konsantrasyonlarının kullanılması gerektiği düşüncesini desteklemektedir. Bu sonuçlar, patlıcanda mikrospor kültürü için anter kültüründe elde edilen rutin protokolün elde edilmesi için farklı hormonlar ve konsantrasyonlarının, kültürü ortamlarında denenmesi gerekliliğinin açık bir kanıtıdır.

**Çizelge 4.7.** A117 çeşidinde farklı hormon konsantrasyonlarının toplam kallus ve 1 mm'den büyük kallus sayısına etkisi

Çeşit	Hormon konsantrasyonu no	Toplam kallus sayısı	> 1 mm büyük kallus sayısı
A117	KONTROL	1.11abcd	0.89abc
	1	1.78ab	1.11abc
	2	0.33bcd	0.33abc
	3	0.33bcd	0.22bc
	4	1.56abc	1.11abc
	5	1.22abcd	0.67abc
	6	1.44abcd	1.33ab
	7	0.89bcd	0.44abc
	8	1.33abcd	0.78abc
	9	0.63bcd	0.50abc
	10	1.44abcd	1abc
	11	0.67bcd	0.56abc
	12	2.33a	1.44a
	13	0.11cd	0.11c
	14	0.44bcd	0.44abc
	15	0.00d	0c
16	0.22cd	0c	

\*Her bir karakter sütununda ayrı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.

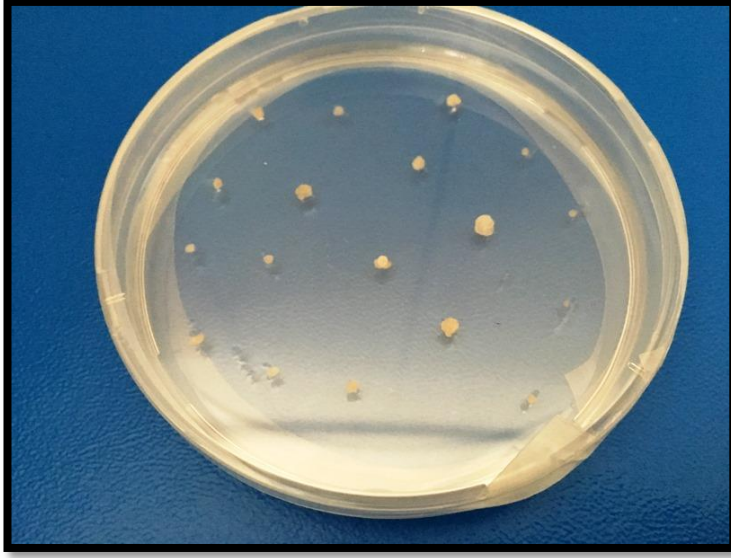
**Çizelge 4.8.** Amadeo çeşidinde farklı hormon konsantrasyonlarının toplam kallus ve 1mm'den büyük kallus sayısına etkisi

Çeşit	Hormon konsantrasyonu no	Toplam kallus sayısı/petri	>1 mm büyük kallus/petri
AMADEO	KONTROL	19.33a	16.33 a
	1	0.00d	0c
	2	0.00d	0c
	3	3.33bcd	2.33c
	4	0.67d	0.33c
	5	0.00d	0c
	6	0.00d	0c
	7	0.00d	0c
	8	0.33d	0.33c
	9	1.00cd	0.67c
	10	7.00b	7b
	11	0.00d	0c
	12	0.00d	0c
	13	3.00bcd	0c
	14	2.00bcd	0c
	15	6.00bc	3c
	16	0.00d	0c

\*Her bir karakter sütununda ayrı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.4. Bitki rejenerasyon oranı

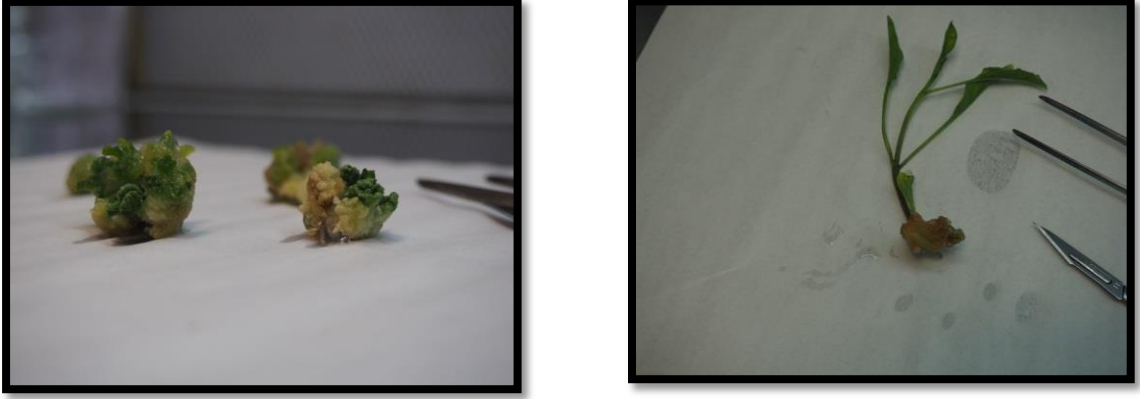
Mikrosporların kültüre alınmasından bir ay sonra mikrospordan A117 çeşidinden sadece kallus, Amadeo çeşidinden ise hem kallus hem de embriyo oluşumu meydana gelmiştir. Bir ay sonunda mikrospordan elde edilen 1 mm'den büyük kalluslar bitki rejenerasyonunu teşvik etmek amacıyla Miyoshi (1996) ve Rivas-Sendra vd. (2015) tarafından bildirilen % 2 sakkaroz, % 0.8 agar, 0.2 mg/l IAA ve 4 mg/l zeatin içeren M1 ortamında kültüre alınmış ve 25°C sıcaklıkta bitki rejenerasyonu gözlenene kadar bekletilmiştir (Şekil 4.17). Daha sonra Rivas-Sendra vd. (2015) tarafından bildirildiği üzere elde edilen sürgünler kök oluşumunun sağlanması için MS ortamına transfer edilmiştir (Şekil 4.18, 4.19). Deneme sonunda A117 çeşidinde kültüre alınan 36 kallusdan 18 bitki elde edilmiştir (% 50). Amadeo çeşidinden ise 70 kallusdan 25 bitki elde edilmiştir (%35). Bu oranlar Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2012) (% 14.8) ve Rivas-Sendra vd. (2015) (% 7.6) elde ettikleri oranlarla karşılaştırıldığında, bu çeşitlerden elde edilen kalluslardan kullanılan ortamlarda daha iyi sonuç elde edilmiştir. Amadeo çeşidinden toplamda elde edilen 5 embriyodan 3'ünde bitki oluşumu gerçekleşmiştir.



**Şekil 4.17.** Mikrospor kültüründen elde edilen 1 mm'den büyük kallusların rejenerasyon ortamına aktarılması



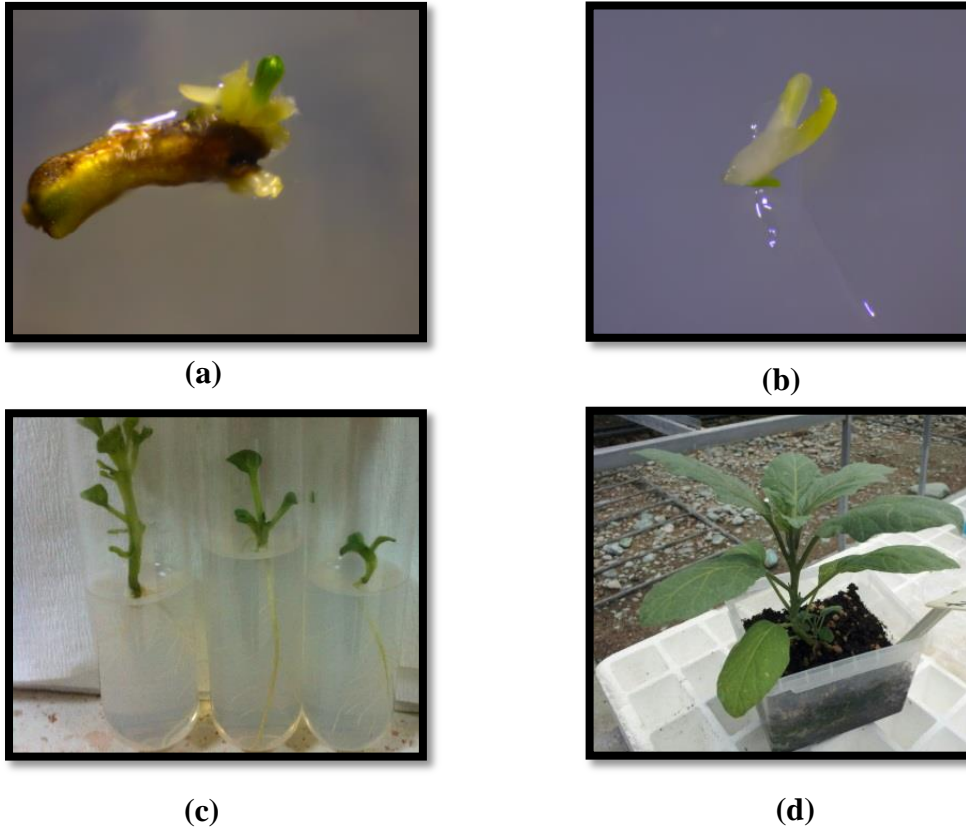
**Şekil 4.18.** Kallus rejenerasyon ortamında gelişen kallusların alt kültüre alınması



**Şekil 4.19.** Kalluslardan sürgün gelişimi ve elde edilen bitkicikler

### 4.3. Anter Kültürü

Bu çalışmada kullanılan iki adet patlıcan çeşidine ait anterler aynı deney koşulları altında kültüre alınarak, mikrospor embriyogenesise yanıtları açısından değerlendirilmiştir. Her bir çeşit için optimum anter uzunluğunu belirledikten sonra, bu uzunluklara karşılık gelen anterler Dumas de Vault and Chambonnet (1982) tarafından bildirilen protokole göre kültüre alınmıştır. Kültüre alınan anterlerde yapılan gözlemlerde anterlerde büyüme ve şişme meydana geldiği gözlenmiştir. Kültür başlangıcından dört hafta sonra yapılan gözlemlerde anterlerden embriyo gelişimi tespit edilirken herhangi bir kallus oluşumu meydana gelmemiştir. Kültür başlangıcından 6-7 hafta sonra elde edilen embriyolar rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Şekil 4.20' de anter kültüründe patlıcan anterlerinden embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu aşamaları gösterilmiştir. Anter kültürü çalışmaları sonucunda her bir çeşidin anter kültürüne verdikleri cevabı değerlendirmek için embriyo ve elde edilen bitki sayısı değerlendirilmiş ve analiz sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir. Araştırmada A117 çeşidinden % 42.68 oranında Amadeo çeşidinden ise % 9.96 oranında embriyo elde edilmiştir. Bu embriyolardan elde edilen bitki oranı ise sırasıyla % 41.33 ve % 57.64 olarak belirlenmiştir. Bu değerler Dumas de Vault ve Chambonnet (1982), Rotino vd. (1987), Tuberosa vd. (1987), Salas vd. (2011,2012) kullandıkları çeşitlerden elde ettikleri değerlere yakındır. Elde edilen sonuçlardan da görüldüğü gibi genotip faktörü elde edilen embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkili olmuştur. Anter kültüründe elde edilen embriyo ve bitki oluşumu genotiplere bağlı olarak farklılık göstermesi ile ilgili bulgularımız Dumas de Vault ve Chambonnet (1982), Misra vd. (1983), Rotino vd. (1987); Tuberosa vd. (1987), Rotino (1996), Alpsoy ve Seniz (2007), Salas vd. (2011,2012), Basay vd. (2010) ve Basay ve Ellialtıoğlu (2012)'nin bulgularını desteklemektedir.



**Şekil 4.20.** Patlıcanda anter kültürü a) Kültüre alınan anterlerden embriyo oluşumu b) Embriyoların rejenerasyon ortamına aktarılması c) Embriyolardan elde edilen bitkicikler d) Elde edilen bitkilerin dış koşullara alıştıırılması

**Çizelge 4.9.** Patlıcanda anter kültürü sonuçları

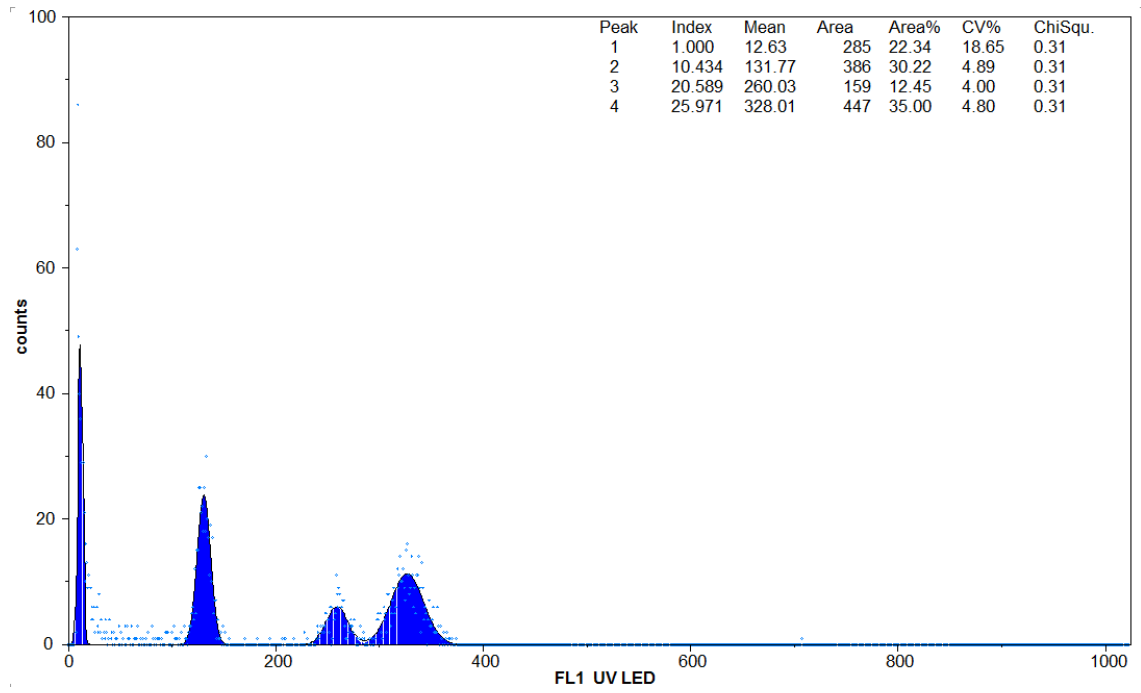
Çeşit	Anter uzunluğu (mm)	Kültüre alınan anter sayısı	Embriyo oluşumu (%)	Bitki oluşumu (anter %)	Bitki oluşumu (embriyo %)
A117	4.5-6.5	1579	42.68	16.81	41.33
Amadeo	4-6	853	9.96	5.73	57.64

Mikrospor embriyogenesis, henüz olgunlaşmasını tamamlamamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş mikrosporları bulunduran anterlerin *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla anter kültürü veya bu mikrosporların anterlerden izole edilerek somatik dokular olmaksızın doğrudan sıvı bir ortamda *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla mikrospor kültürü ile yapılmaktadır. Anter kültürü haploid üretimi için en yaygın kullanılan yöntemdir. Mikrospor kültürü ise anter kültürüne göre daha karmaşık bir yöntem olmasına karşılık genellikle tercih edilen bir yöntemdir. Patlıcanda anter kültüründen embriyo elde edilmesine karşın mikrospor kültüründen bazı durumlarda ve çok düşük bir oranda embriyo gelişimi elde edilmekle birlikte genel

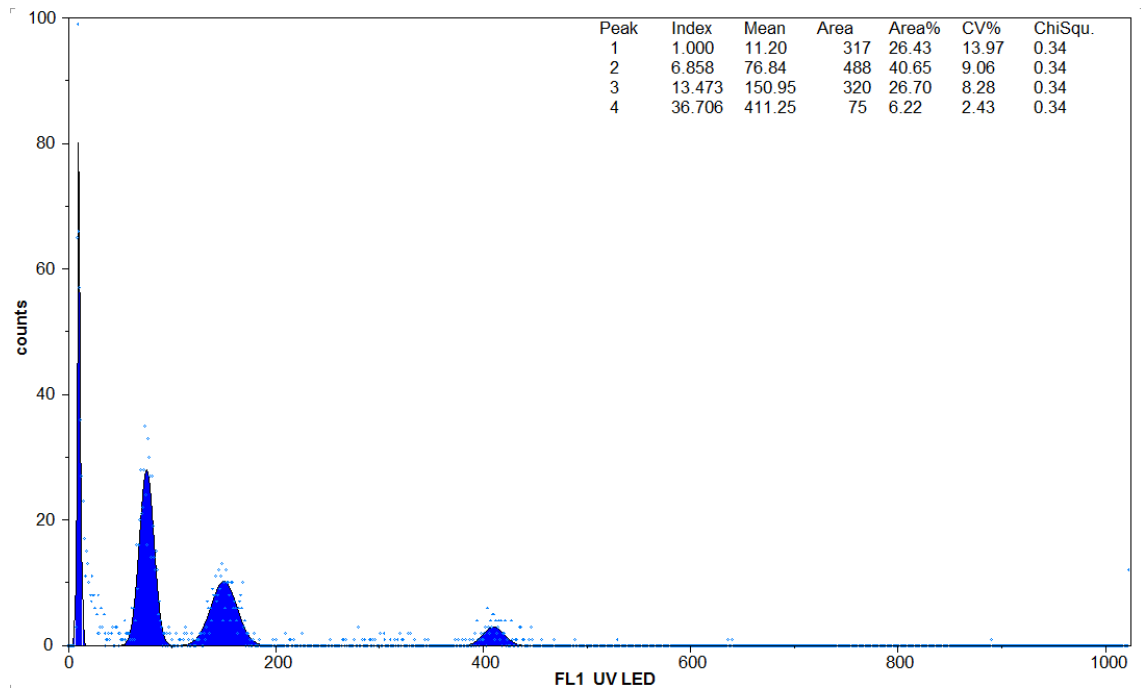
olarak kallus oluşumu meydana gelmektedir. Patlıcanda mikrospor kültüründe, mikrosporlarda sporofitik gelişimin göstergesi olan simetrik bölünmeler, çok çekirdekli yapılar ve bunun sonucunda globular embriyo benzeri yapıların meydana geldiği Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2012) tarafından bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da mikrosporlarda aynı gelişim evreleri gözlenmiş ve sonuç olarak bu embriyolar daha fazla gelişim göstermemiş, kallus benzeri yapılar haline gelmiştir. Gözlemlenen bu embriyonik tutulma ile ilgili birçok neden olabilir ancak bunun sebebinin büyük olasılıkla embriyonik gelişimin devamı için mikrospor kültüründe kullanılan deneysel koşulların (ön uygulama, besi ortamı, hormon kombinasyonlar vb.) uygun olmamasıdır. Anter kültüründe ise anter dokularının varlığının mikrosporların embriyoya dönüşümü için olumlu etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Anter duvarının mikrospor embriyogenesis gelişiminde önemli rol oynadığını birçok çalışmada da bildirilmiştir (Bhojwavi ve Razdan 1996).

#### 4.4. Flow Sitometri Analiz Sonuçları

Mikrospor embriyogenesis yoluyla elde edilen bitkilerin ploidi düzeyleri farklı olabilmektedir. Patlıcanda anter kültüründe yapılan çalışmalarda haloid, diploid, triploid olmak üzere farklı ploidi seviyelerinde bitki elde edildiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Tuberosa vd. 1987; Rotino vd. 1987; Matsubara 1992). Bizim sonuçlarımıza göre ise, anter kültüründen elde edilen bitkilerin flow sitometri ile analiziyle elde edilen sonuçlara göre tüm bitkilerin haploid olduğu belirlenmiştir (4.22). Mikrospor kültüründen elde edilen kalluslardan geliştirilen bitkilerdeki flow sitometri sonuçlarına ise diploid ve triploid bitkiler elde edilirken haploid bitki elde edilmemiştir (Şekil 4.21, 4.23). Bu bitkilerde DH bitki oranı A117 çeşidinde % 68 olarak Amadeo çeşidinde ise % 60 olarak belirlenmiştir. A177 çeşidinden mikrospor kültürü yöntemiyle elde edilen embriyolardan meydana gelen bitkilerin ise haploid olduğu belirlenmiştir. Corral-Martinez ve Segui-Simarro (2012) ve Rivas-Sendra vd. (2015) mikrosporlardan elde edilen kalluslardan sırasıyla % 60 ve % 70 oranında DH bitkiler elde etmiştir. Araştırma sonucunda elde ettiğimiz bulgular bu araştırmacılarla uyum içindedir. Hem mikrospor kültürü hem de anter kültüründen elde edilen bitkiler Genetika tohumculuğa ait alıştırma seralarında ilk olarak saksılara aktarılmış ve daha sonra arazi koşullarına dikilerek meyveleri olgunlaştığında meyveler hasat edilmiş bunlardan tohum üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tohumlar tekrar ekilerek bunlardan double haploid homozigot hatlar elde edilmiştir (Şekil 4.24, 4.25, 4.26).

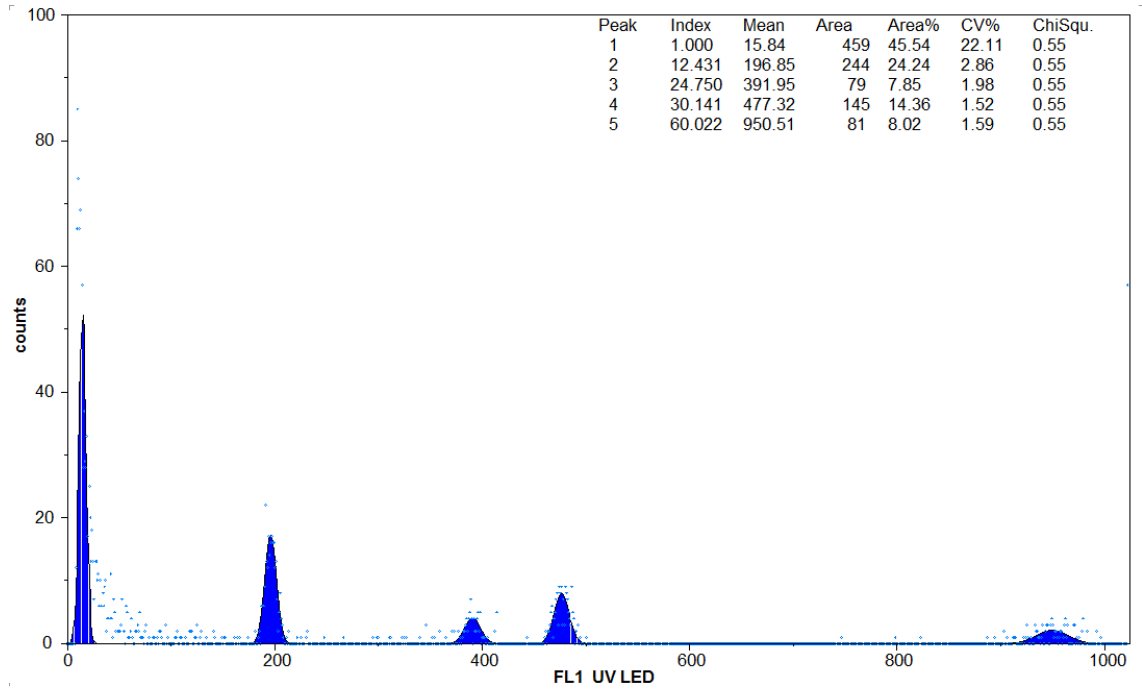


**Şekil 4.21.** Diploid patlıcan ve standart bitki (arpa) ile hazırlanan örneklerin oluşturduğu histogram görüntüsü



**Şekil 4.22.** Haploid patlıcan ve standart bitki (arpa) ile hazırlanan örneklerin oluşturduğu histogram görüntüsü





**Şekil 4.23.** Triploid patlıcan ve standart bitki (çavdar) ile hazırlanan örneklerin oluşturduğu histogram görüntüsü



Şekil 4.24. Amadeo çeşidinden elde edilen DH hatlar





Şekil 4.25. Amadeo çeşidinden elde edilen DH hatlar





Şekil 4.26. A117 çeşidinden elde edilen DH hatlar

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada patlıcanda mikrospor kültürü tekniği kullanarak haploid ve DH bitki elde etmek amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Denemenin birinci basamağında mikrospor kültürü tekniğine A117 ve Amadeo çeşitlerinin tepkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu iki patlıcan çeşidinde mikrospor kültürü sonucunda; kültüre alma sırasında (1.gün) canlı mikrospor yüzde oranı, ön uygulama sonrasında (3. gün) canlı mikrospor yüzde oranı, toplam kallus sayısı /petri, 1 mm'den büyük kallus sayısı/petri ve elde edilen embriyo sayıları incelenmiştir. Mikrospor kültürü için Amadeo çeşidi kallus ve embriyo oluşumu oranları ile A117 çeşide göre öne çıkmıştır.

Denemenin daha sonraki aşamalarında kullanılan çeşitlerde mikrospor kültürü yöntemini geliştirmek amacıyla arabinogalaktan proteinlerinin, absisik asidin ve farklı hormon konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. AGP etkisini belirlemek amacıyla 10 mg/l, 1 mg/l ve 0.1 mg/l olarak belirlenen dozlarda AGP'nin patlıcanda mikrospor kültürü üzerine etkileri araştırılmıştır. Mikrosporların kültüre alınmasından bir ay sonra kültüre alınan mikrosporlardan her iki çeşitte de yalnızca kallus oluşumu meydana gelmiş herhangi bir embriyo oluşumuna rastlanmamıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde AGP'nin uygulamasının kullanılan çeşitlerde mikrospor kültürü üzerine teşvik edici herhangi bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.

ABA etkisini belirlemek amacıyla ise farklı dozlarda ve sürelerde ABA ön uygulama esnasında kültüre alınan mikrosporlara uygulanmıştır. Denemenin ilk aşamasında farklı doz ve sürelerde uygulanan ABA'in mikrosporlarda stres uygulaması ardından kontrole göre mikrosporlarda canlılık üzerine etkileri araştırılmıştır. Her iki çeşitte de kontrole göre tüm ABA konsantrasyonları ve uygulama süreleri mikrosporlarda canlılık yüzdesini artırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. A117 çeşidinde en yüksek mikrospor canlılığı yüzdesi 0.1 mg/l ABA'in 24 saat süreyle uygulanmasından elde edilmiştir. Amadeo çeşidinde ise 1 mg/l ABA'in 24 saat süreyle uygulanmasıyla canlılık yüzdesinde artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlardan hareketle A117 çeşidinde 35°C'de 3 günlük ön uygulamanın ilk 24 saatinde kültüre alınan mikrosporlara 0.1 mg/l ABA, Amadeo çeşidinde ise 1 mg/l ABA uygulanmıştır. Bir ay sonunda A117 çeşidinde hem kontrol ortamından hem de ABA uygulaması yapılan ortamlarda herhangi bir kallus gelişimi meydana gelmemiştir. Amadeo çeşidinde ise toplam kallus ve 1 mm'den büyük kallus sayıları değerlendirildiğinde; kontrol grubuyla ABA uygulaması arasında istatistiki olarak farklılık önemli bulunmamıştır. Böylece yapılan çalışma, ABA'in stres uygulaması sırasında kullanılmasıyla mikrosporlarda canlılık üzerine olumlu etkilerinin ortaya konması yönünden önemlidir.

Denemenin son aşamasında 2,4-D ve kinetinin farklı dozları ilave edilmiş ve bu ortamların etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 2,4-D ve kinetinin farklı konsantrasyonlarını içeren 16 farklı ortam kombinasyonu hazırlanmıştır. Araştırma sonunda A117 çeşidinde toplam kallus sayısı ve 1 mm'den büyük kallus sayısı açısından en etkili ortam 12 numaralı ortam olarak belirlenirken, Amadeo çeşidinde ise en fazla toplam kallus ve 1 mm'den büyük kallus sayısı kontrol ortamından elde edilmiştir. Bu sonuçlar her genotip için farklı hormonlar veya aynı hormonun farklı konsantrasyonlarının kullanılması gerektiği düşüncesini desteklemekle birlikte mikrospor kültüründe başarıyı etkileyen önemli faktörlerden biri olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan iki adet patlıcan çeşidinde, anter kültürü çalışmalarında aynı deney koşulları altında anterler kültüre alınarak, mikrospor embriyogenesise yanıtları açısından değerlendirilmiştir. Anter kültüründe her iki çeşitten de embriyo ve bitki elde edilmiştir. Buna karşılık mikrospor kültüründen doğrudan embriyo elde edilememesinin nedeni olarak kullanılan deneysel koşulların mikrospor kültüründen doğrudan embriyo elde etmek için uygun olmadığı sonucuna varılmaktadır. Bu olumsuzluğun bertaraf edilmesi için mikrospor kültüründe ortam optimizasyonu üzerine çalışmalar yapılmasının önemli bir adım olacağı düşünülmekte ve ileride denenmesi önerilmektedir.

Çalışmada kullanılan mikrospor kültürü tekniği değerlendirildiğinde mikrosporlardan elde edilen kallus ve embriyolardan başarılı bir şekilde bitki elde edilmiştir. A117 çeşidinden 36 kallusdan 18 bitki, Amadeo çeşidinden ise 70 adet kallusdan 25 bitki elde edilmiştir. Mikrospor kültüründen elde edilen kalluslardan geliştirilen bitkilerdeki flow sitometri sonuçlarına göre diploid ve triploid bitkiler elde edilirken haploid bitki elde edilmemiştir. Bu bitkilerde DH bitki oranı A117 çeşidinde % 68 olarak Amadeo çeşidinde ise % 60 olarak belirlenmiştir. Mikrospor kültüründen elde edilen embriyolardan ise haploid bitkiler elde edilmiştir. Anter kültüründen elde edilen bitkilerin tümünün haploid olduğu belirlenmiştir. Hem mikrospor kültürü hem de anter kültüründen elde edilen bitkiler Genetika tohumculuğa ait alıştırma seralarında ilk olarak saksılara aktarılmış ve daha sonra arazi koşullarına dikilerek meyveleri olgunlaştığında meyveler hasat edilmiş bunlardan tohum üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tohumlar tekrar ekilerek bunlardan double haploid homozigot hatlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda DH teknolojisinin patlıcanda ıslah programlarını hızlandıran ve tamamlayan güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Patlıcanda mikrospor kültürü ile yapılan çalışmalar genelde son yıllarda artmış olmakla birlikte, yeni protokollerin geliştirilmesine ve standart hale getirilmesine halen ihtiyaç duyulmaktadır. Geliştirilecek olan metotların ıslah programlarında farklı genotipler için rutin olarak uygulanacak etkin ve güvenilir bir teknoloji haline getirilmesi gerekmektedir. Böylece gelecek vaat eden bir teknik olan mikrospor kültürü üzerine yapılan çalışmalarda önemli bir boşluk doldurulmuş olacaktır. Bu mevcut çalışmanın da ileride bu yönde yapılacak çalışmalar için önemli bir kaynak olacağı ve diğer araştırmacılara yol göstereceği düşünülmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

- Ahmadi, B., Shariatpanahi, M. E. and Teixeira da Silva, J. A. 2014. Efficient induction of microspore embryogenesis using abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 116: 343–351.
- Alpsoy, H.C. and Seniz, V. 2007. Researches on the *in vitro* androgenesis and obtaining haploid plants in some eggplant genotypes. *Acta Horticulturae*, 729:137–141.
- Altay, T. 2015. Determination of genetic diversity and population structure in eggplant. MSc Thesis, Izmir Institute of Technology, İZMİR, 50 p.
- Anonim 1: <http://www.fao.com> [Son erişim tarihi: 01.08.2018].
- Anonim 2: <http://www.tuik.gov.tr> [Son erişim tarihi: 01.08.2018].
- Arı, E. 2006. Türkiye’de doğal olarak yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*’da anter kültürü çalışmaları. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 169s.
- Bakos, F., Fabian, A. and Barnabas, B. 2007. Isolated microspore cultures of a Hungarian durum wheat (*Triticum turgidum* L.) cultivar, Martondur 1. *Acta Agronomica Hungarica*, 55 (2): 157-164.
- 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, Tekirdağ, 156s.
- Bal U., Ellialtıoğlu 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.
- Barnabas, B., Obert, B. and Kovacs, G. 1999. Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Rep*, 18: 858-862.
- Başay, S., Ellialtıoğlu, Ş. ve Şeniz, V. 2010. Yerli ve yabancı patlıcan çeşitlerinde anter kültürü yoluyla haploid embriyo oluşumu. VIII. Sebze Tarımı Sempozyumu, ss 588-590, 23-26 Haziran, Van.
- Başay, S. and Ellialtıoğlu, Ş. 2013. Effect of genotypical factors on the effectiveness of anther culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Turk J Biol*, 37: 499-505.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. 1996. Haploid Production. Studies in Plant Science, 5. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, A Revised Edition. Elsevier, Amsterdam, 467 pp.
- Bhowmik P, Dirpaul J, Polowick P, Ferrie A (2011) A high throughput Brassica napus microspore culture system: influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 106: 359-362.

- Binarova, P., Hause, G., Cenklová, V., Cordewener, J.H. and Campagne, M.L. 1997. A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sex. Plant Reprod.*, 10: 200-208.
- Binarova, P., Straatman, K., Hause, B., Hause, G., and Van Lammeren, A. 1993. Nuclear DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspores and pollen of *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 9-16.
- Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E. and Bergner, A.D. 1922. A haploid mutant in the Jimson weed *Datura stramonium*. *Science* 55: 646-647.
- Bohanec, B. 2009. Doubled haploids via gynogenesis. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds) *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, Dordrecht, pp 35–46.
- Borg, M., Brownfield, L. and Twell, D. 2009. Male gametophyte development: a molecular perspective. *J Exp Bot*, 60:1465–1478.
- Borgel, A. And Arnaud, M. 1986. Progress in eggplant breeding, use of haplomod. *Capsicum Newsl*, 5:65–66.
- Burnett, L., Yarrow, S. and Huang, B. 1992. Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspores of *Brassica rapa* L. ssp. *oleifera*. *Plant Cell Rep.*, 11: 215–218.
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu, N., Abak, K., Ekbiç, E. and Kılıç, N. 2004. Effect of Silver Nitrate and Donor Plant Growing Conditions on Production of Pepper (*Capsicum annuum* L.) Haploid Embryos via Anther Culture. *Europ. J. Hort. Sci.*, 69 (5): 206-209.
- Cistue, L., Ramos, A., Castillo, A.M., and Romagosa, I., 1994. Production of Large Number of Doubled Haploid Plants from Barley Anthers Pretreated with High Concentrations of Mannitol. *Plant Cell Reports*, 13: 709-712.
- Cistue, L., Romagosa, I., Battle, F. and Echavarri, B. 2009. Improvements in the production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 28: 727-735.
- Corral-Martinez, P. and Segui-Simarro, J.M. 2012. Efficient production of callus-derived doubled haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Euphytica*, 187:47–61.
- Corral-Martinez, P. and Segui-Simarro, J.M. 2014. Refining the method for eggplant microspore culture: effect of abscisic acid, epibrassinolide, polyethylene glycol, naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine and arabinogalactan proteins. *Euphytica*, 195: 369–382.
- Coşkun, Y. 2011. Mikrospor kültürü ile makarnalık buğday bitkisinde (*Triticum durum* Desf.) embriyo üretimi ve bitki regenerasyonu. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 115s.
- Custers, J.B.M. 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). In:



- Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants: a manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp 185–194
- 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.
- Datta, S.K. 2005. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Curr. Sci.*, 89: 1870–1878.
- Dias, J.S. 2001. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on brocolli microspore culture embryogenesis. *Euphytica*, 119: 389-394.
- Duijs, J., Voorrips, R., Visser, D. and Custers, J. 1992. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 60:45–55
- Dumas de Vaulx, R. and Chambonnet, D. 1982. Culture *in vitro* d'anthères d'aubergine (*Solanum melongena* L.): stimulation de la production de plantes au moyen de traitements à 35°C associés à de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie*, 2: 983-988.
- Dunwell, J. M. 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 377-424.
- Dwivedi, S.L., Britt, A.B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H.D. and Ortiz R. 2015. Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnol Adv*, 33: 812- 829.
- Ellialtıoğlu, Ş. ve Tıpırdamaz, R. 1999. Patlıcan anter kültüründe içsel absizik asit miktarını azaltıcı uygulamaların androjenetik embriyo oluşumuna etkisi. *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 24(1):23-32.
- Ellialtıoğlu, Ş. 2000. Haploid bitkilerin bitki ıslahı programlarında kullanımı. Bitki Islahı Kursu, Seminer Notları. Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, (yayınlanmamış), Samsun.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K. 2001. Haploid bitki üretimi. Mehmet Babaoğlu, Ekrem Gürel, Sebahattin Özcan (Editörler), Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü.Vakfi Yayınları, Konya, s. 137-189.
- Ellialtıoğlu, Ş., Başay, S. ve Kaşvuran, Ş. 2006. Anter kültüründen elde edilen haploid patlıcanların katlanması amacıyla kullanılan *in vitro* ve *in vivo* kolhisin uygulamalarının karşılaştırılması, VI. Sebze Tarımı Sempozyumu, 19- 22 Eylül, Kahramanmaraş, 386-390.
- Ellialtıoğlu, Ş., Başay, S. ve Kuşvuran, Ş. 2012. Patlıcanda polen dimorfizmi ve anter kültürü ilişkisinin incelenmesi. *TABAD*, 5: 149–152.
- Emiroğlu, Ü. 1982. Haploidi ve bitki ıslahındaki önemi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, yardımcı ders kitabı, Ofset Basım Evi, Bornova, İzmir, 38s.
- Er, C. 1992. Bitki ıslahında doku kültürleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayını, Ankara, 83 s.
- Fan, Z., Armstrong, K. and Keller, W. 1988. Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. *Protoplasma*, 147:191–199.

- Ferrie, A.M.R., Epp, D.J. and Keller, W.A. 1995. Evaluation of *Brassica rapa* L. genotypes for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line. *Plant Cell Rep*, 14: 580-584.
- Ferrie, A.M.R. and Keller, W.A. 1995. Microspore Culture for Haploid Plant Production. In: Gamborg OL, Phillips GC (eds) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 155-164.
- Ferrie, A.M.R. and Keller, W.A. 2007. Optimization of methods for using polyethylene glycol as a non-permeating osmoticum for the induction of microspore embryogenesis in the *Brassicaceae*. *In Vitro Cell Dev Biol -Plant* 43:348–355
- Ferrie, A.M.R., Dirpaul, J., Krishna, P., Krochko, J. and Keller, W.A. 2005. Effects of brassinosteroids on microspore embryogenesis in *Brassica* species. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41:742–745
- Ferrie, A.M.R. and Caswell, K.L. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 104:301–309.
- 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. 2011a. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 104: 283-300.
- Germana, M. A. 2011b. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep*, 30: 839-857.
- Gonzalez, J. and Jouve, N. 2005. Microspore development during *in vitro* androgenesis in triticale. *Biol Plant*, 49:23–28.
- Gramazio, P., Prohens, J., Plazas, M., Mangino, G., Herraiz, F.J., Garcia-Fortea, E. and Vilanova, S., 2018. Genomic tools for the enhancement of vegetable crops: a case in eggplant. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 46 (1): 1-13.
- Gu, S.R. 1979. Plantlets from isolated pollen cultures of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Bot Sin*, 21: 30–36.
- Guha, S. and Maheshwari, S. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204: 497.
- Henry, Y. 1998. Origin of microspore-derived dihaploid and polyhaploid *in vitro* plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4: 127-135.
- Hoekstra, S., van Zijderveld, M.H., Louwerse, J.D., Heidekamp, F. and van der Mark, F. 1992. Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Science*, 86: 89–96.
- Hoekstra, S., Vanbergen, S., Vanbrouwershaven, I. R., Schilperoort, R. A. and Wang, M. 1997. Androgenesis in *Hordeum vulgare* L: effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. *Plant Sci.*, 126: 211–218.
- Hu, T.C., Ziauddin, A., Simion, E. and Kasha, K.J., 1995. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a defined media I. Effects of pretreatment, isolation methods, and hormones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*,

31: 79-83.

- 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.
- Imamura, J. and Harada, H. 1980. Effects of abscisic acid and water stress on the embryo and plantlet production in anther culture of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun. *Z PflanzenPhysiol* 100: 285–289 (1980).
- Indrianto ,A., Barinova, I., Touraev, A. and Heberle-Bors, E. 2001. Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta*, 212: 163–174.
- Ingram, H.M., Power, J.B., Lowe, K.C., and Davey, M.R., 2000. Microspore –Derived Embryo Induction from Cultured Anthers of Wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 235-238.
- Islam, S.M.S. and Tuteja, N. 2012. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Sci.*,182: 134-144.
- Isouard, G., Raquin, C. and Demarly, Y. 1979. Obtention de plantes haploides et diploides par culture *in vitro* d'anthers d'aubergine (*Solanum melongena* L.). *C R Acad Sci*, 288: 987-989.
- Kaloo, G. 1993. Eggplant (*Solanum melongena* L.). Genetic improvement of vegetable crops. *Pergamon Press*, pp 587-604.
- Kaltchuk-Santos, E., Mariath, J.E., Mundstock, E., Hu, C-y. and Bodanese- Zanettini, M.H. 1997. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 49:107–115.
- Karakullukçu, Ş. 1991. Değişik patlıcan genotiplerinde *in vitro* androgenesis ve haploid bitki oluşumunu uyarıcı bazı etmenler üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-131.
- 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.
- Kasha, K.J., Hu, T.C., Oro, R., Simion, E. and Shim, Y.S. 2001. Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. *J Exp Bot*, 52: 1227-1238.
- Kasha, K.J., Simion, E., Miner, M., Letarte, J. and Hu, T.C. 2003. Haploid wheat

- isolated microspore culture protocol. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 77-82.
- Kasperbauer, M. J. and Wilson, H. M. 1979. Haploid plant production and use. In: Durbin, R. D (Ed.). *Nicotiana* procedures for experimental use. Washington, DC : USDA Technol. Bul. 1586. pp. 33-39.
- Kashyap, V., Vinod Kumar, S., Collonnier, C., Fusari, F., Haicour, R., Rotino, G.L., Sihachakr, D. and Rajam, M.V. 2003. Biotechnology of eggplant. *Scientia Hort.* 97(1): 1-25.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D.I. and Lee, K.M. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 77:63–72.
- Kim, M., Jang, I.C., Kim, J.A., Park, E.J., Yoon, M. and Lee, Y. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper ( *Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep*, 27: 425-434.
- 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.
- 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 Organ Cult.*, 97: 285–293.
- Lantos ,C., Juhasz, A.G., Vagi, P., Mihaly, R., Kristof, Z. and Pauk, J. 2012. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnol Rep*, 6:123–132.
- 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 Rep*, 24:691–698.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 105: 427-434.
- Makowska, K., Kałużniak, M., Oleszczuk, S., Zimny, J., Czaplicki, A. and Konieczny, R. 2017. Arabinogalactan proteins improve plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 131: 247–257.
- Malik, A., Cui, L., Zhang, S. and Chen J.f. 2011. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. *Horticultural Science*,38: 27-34.
- Maluszynska, J. 2003. Cytogenetic tests for ploidy level analyses — chromosome counting. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 391-395.
- Maluszynski, M., Kasha, K.J. and Szarejko, I. 2003. Published protocols for other crop plant species. In: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I. (Eds.),

- Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 309–336.
- Maraschin, S.F., de Priester, W., Spaink, H.P. and Wang, M. 2005a. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Exp Bot*, 56: 1711–1726.
- Maraschin, S.F., Vennik, M., Lamers, G.E.M., Spaink, H.P. and Wang, M. 2005b. Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals positiondetermined cell death within pro-embryos. *Planta*, 220: 531–540.
- 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.
- Miah, M.A.A., Earle, E.D., Khush, G.S. 1985. Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet*, 70: 113-116.
- Miyoshi, K. 1996. Callus induction and plantlet formation trough culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports*, 15: 391-395.
- Misra, N.R., Varghese, T.M., Maherchandani, N. and Jain, R.K. 1983. Studies on induction and differentiation of androgenic callus of *Solanum melongena* L. pp 465-468. Sen, S.K., Giles, K.L. eds. Plant cell culture in crop improvement. *Plenum Press*, New York, 502p.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-497.
- Murovec, J. and Bohanec, B. 2012. Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: Abdurakhmonov, I. (Ed.), Plant Breeding. InTech Europe, Croatia. ISBN: 978-953-307-932-5, pp. 87–106.
- Nitsch, J.P. and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85–87.
- Nitsch, C. 1974. La culture de pollen isolé sur milieu synthétique. *CR Acad. Sci. Paris*, 278: 1031-1034.
- Ochatt, S.J. 2008. Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry Part A*, 73A: 581-598.
- Olmedilla, A. 2010. Microspore embryogenesis. *Plant Development Biology – Biotechnological Perspectives*, Springer Verlag, vol. 2, pp. 27–44.
- Özdemir, B. 2012. Patlıcan (*Solanum melongena* L.)’da mikrospor kültüründe ovaryum ko-kültür yönteminin haploid embriyo oluşumunun uyartılması üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 64s.
- Parra-Vega V, González-García B and Seguí-Simarro, J.M. 2013. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiol Plant* 35: 627-633
- Prigge V, Xu X, Li L, Babu R, Chen S, Atlin GN, Melchinger AE (2012) New Insights into the Genetics of in vivo Induction of Maternal Haploids, the Backbone of Doubled Haploid Technology in Maize. *Genetics* 190: 781-793

- Pulido, A., Bakos, F., Castillo, A., Valle's, M., Barnabas, B. and Olmedilla, A. 2005. Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. *J Struct Biol*, 149:170–181.
- Raghavan, V. 1986. Pollen embryogenesis. In: Barlow PW, Green PB, Wylie CC (eds) Embryogenesis in angiosperms: a developmental and experimental study. Cambridge University Press, New York, pp 152–189.
- Raghavan, V. 1997. Molecular Embryology of Flowering Plants. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Raina, S.K. and Iyer, R.D. 1973. Differentiation of diploid plants from pollen callus in anther cultures of *Solanum melongena* L. *Z Pflanzenzucht*, 70: 275-280.
- Reynolds, T.L. 1993. A cytological analysis of microspores of *Triticum aestivum* (*Poaceae*) during normal ontogeny and induced embryogenic development. *Am J Bot*, 80:569-576.
- Reynolds, T.L. 1997. Pollen embryogenesis. *Plant Mol Biol*, 33: 1-10.
- Rivas-Sendra, A., Corral-Martinez, P., Camacho-Fernandez ,C. and Seguí-Simarro, J.M. 2015. Improved regeneration of eggplant doubled haploids from microspore-derived calli through organogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 122:759–765.
- Rivas-Sendra, A., Campos-Vega, M., Calabuig-Serna, A., and Seguí-Simarro, J. M. 2017. Development and characterization of an eggplant (*Solanum melongena*) doubled haploid population and a doubled haploid line with high androgenic response. *Euphytica*, 213:89.
- Rotino, G.L., Falavigna, A. and Restaino, F. 1987. Production of anther-derived plantlets of eggplant. *Capsicum Newsl*, 6:89–90.
- 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.
- Rotino, G.L., Sihachakr, D., Rizza, F., Vale, G., Tacconi, M.G., Alberti, P., Mennella, G., Sabatini, E., Toppino, L., D'Alessandro, A. and Acciarri, N. 2005. Current status in production and utilization of dihaploids from somatic hybrids between eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relatives. *Acta Physiol Plant*, 27: 723-733.
- Rudolf, K., Bohane, B. and Hansen, M. 1999. Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breed*, 118: 237–241.
- Salas, P., Prohens, J. and Seguí-Simarro, J.M. 2011. Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species. *Euphytica*, 182:261–274.
- Salas, P., Rivas-Sendra, A., Prohens, J. and Seguí-Simarro, J.M. 2012. Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica*, 184:235–250.

- Segui-Simarro, J.M. and Nuez, F. 2005. Meiotic metaphase I to telophase II is the most responsive stage of microspore development for induction of androgenesis in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Acta Physiol Plant*, 27:675–685.
- Segui-Simarro, J.M. and Nuez, F. 2008. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134: 1–12.
- Segui-Simarro, J.M. 2010. Androgenesis revisited. *Bot Rev*, 76:377–404.
- Segui-Simarro, J.M., Corral-Martinez, P., Parra-Vega, V. and Gonzalez-Garcia, B. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Rep*, 30(5): 765-778.
- Sekara, A., Cebula, S. and Kunicki, E. 2007. Cultivated eggplants – origin, breeding and genetic Resources, a review. *Folia Hort*. 19: 97–114.
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A (2006) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol Plant* 127: 519-534
- Shim, Y.S., Kasha, K.J., Simion, E. and Letarte, J. 2006. The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. *Protoplasma*, 228: 79-86.
- Silva Lauxen, M., Kaltchuk-Santos, E., Hu, C.Y., Callegari-Jacques, S.M. and Bodanese-Zanettini, M.H. 2003. Association between floral bud size and developmental stage in soybean microspores. *Brazilian Archives of Biology and Technol*, 46: 515–520.
- Silva, T.D. 2012. Microspore embryogenesis. In: Sato KI (ed) *Embryogenesis*, InTech. Accessed 21 May 2016.
- Smykal, P. 2000. Pollen embryogenesis – the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biol Plant*, 43: 481–489.
- Soriano, M., Cistue, L., Valles, M.P. and Castillo, A.M. 2007. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 91: 225-234.
- Soriano, M., H. Li and K, Boutilier. 2013. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod.*, 26: 181-196.
- Summers, W. L., Jaramillo, J. and Bailey, T. 1992. Microspore developmental stage and anther length influence the induction of tomato anther callus. *Hort. Sci.*, 27: 838-840.
- Sunderland, N. And Wicks, F.M. 1971. Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *J Exp Bot*, 22:213–226.
- Sunderland, N. 1974. Anther culture as a means of haploid induction. In: Kasha KJ (ed) *Haploids in higher plants: advances and potential*. The University of Guelph,

Guelph.

- Szakacs, E. and Barnabas, B. 1988. Cytological aspects of in vitro androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) using fluorescent microscopy. *Sex Plant Reprod*, 1:217–222.
- Takahata, Y., Brown, D.C.W. and Keller, W.A. 1991. Effect of donor plant age and inflorescence age on microspore culture of *Brassica napus* L. *Euphytica*, 58: 51–55.
- Tanur Erkoyuncu, M. 2013. Bazı arpa genotiplerinde doku kültürü uygulamaları ile haploid bitki üretiminin ve embriyo kültürünün araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 72s.
- Tang, X.C., He, Y.Q., Wang, Y., Sun, M.X. 2006. The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *J Exp Bot*, 57:2639–2650.
- Touraev, A., Pfosser, M., Vicente, O. and Heberle-Bors, E. 1996a. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/ pollen embryogenesis. *Planta* 200, 144–152.
- Touraev, A., Indrianto, A., Vicente, O., Wratschko, O. and Heberle-Bors, E. 1996b. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction*, 9: 209–215.
- Touraev, A., Vicente, O. and Heberle-Bors, E. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Plant Sci*, 2:297–302.
- Touraev, A., Pfosser, M. and Heberle-Bors, E. 2001. The microspore: a haploid multipurpose cell. *Adv Bot Res.*, 35:53–109.
- Tuberosa, R., Sanghinetti, M.C. and Conti, S. 1987. Anther culture of eggplant *Solanum melongena* L. lines and hybrids. *Genetica Agraria*, 41:267–274.
- Tuncer, B. 2010. Farklı uygulamaların lahanalarda mikrospor kültürü yoluyla embriyo uyartımına etkisi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara, 96s.
- Tuna, M. 2015. Flow sitometri ve tarımsal araştırmalarda kllanımı. 3. Flow Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı Uygulamalı Eğitim Programı, Seminer Notları. Namık Kemal Üniversitesi, (yayınlanmamış), Tekirdağ.
- Van Bergen, S., Kottenhagen, M.J., van der Meulen, R.M. and Wang, M. 1999. The role of abscisic acid in induction of androgenesis: a comparative study between *Hordeum vulgare* L-cvs. Igri and Digger. *J Plant Growth Regul*, 18:135–143.
- Wang, M., van Bergen, S. and Van Duijn, B. 2000. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiol*, 124: 523–530.



- Yuan, S., Su, Y., Liu, Y., Fang, Z., Yang, L., Zhuang, M., Zhang, Y. and Sun, P. 2012. Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 110:69–76.
- Zaki, M.A.M. and Dickinson, H.G. 1991. Microspore-derived embryos in *Brassica*: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sexual Plant Reproduction*, 4:48–55.
- Zarsky, V., Garrido, D., Rihová, L., Tupy, J. and Heberle-Bors, E. 1992. Derepression of the cell cycle by starvation is involved in the induction of tobacco pollen embryogenesis. *Sex Plant Reprod* 5: 189-194.
- Zheng, M.Y. 2003. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 213-230.
- Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis. *The Plant Cell*, 5: 1411–1423.

## ÖZGEÇMİŞ

**BUSE ÖZDEMİR ÇELİK**

**buse@akdeniz.edu.tr**



### ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2009-2012	Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2004-2009	Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya

### MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi
2009- 2018	Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya

### ESERLER

#### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Özdemir B., Ulukapi K., Onus A.N., "Evaluation of Salinity Tolerance Level of Some Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars", International Journal of Agriculture Innovations and Research, vol.5, no.2319-1473, pp.247-251, 2016

Ulukapi K., Özdemir B., Onus A.N., "Evaluation of Biochemical and Dimensional Properties of Naturally Grown *Capparis spinosa* var. *spinosa* and *Capparis ovata* var. *palaestina*", International Journal of Agriculture Innovations and Research, vol.5, pp.195-200, 2016

Ulukapi K., Özdemir B., Onus A.N., "Determination of Proper Gamma Radiation Dose in Mutation Breeding in Eggplant (*Solanum melongena* L.)", Advances in

Environmental and Agricultural Science, Dubai, Birleşik Arap Emirlikleri, 22-24 Şubat 2015, pp.149-154

**Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler**

Özdemir,B., Onus, A.N. 2011. Sebze Tohumu Islah Çalışmalarında Haploid Bitkilerin Kullanımı ve Elde Etme Yöntemleri, Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, 1/163-168.

Ulukapı,K., Özdemir,B., Onus A.N. 2012. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Tohumlarının Tuza Tolerans Düzeylerinin In Vitro Koşullar Altında Belirlenmesi, 9. Ulusal Sebze Tarımı Sempozyumu, 1/286-289