

16569

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEĞİŞİK PATLİCAN GENOTİPLERİNDE *in vitro* ANDROGENESİS
VE HAPLOİD BİTKİ OLUŞUMUNU UYARICI BAZI ETMENLER ÜZERİNDE
ARAŞTIRMALAR

Şebnem KARAKULLUKÇU

DOKTORA TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

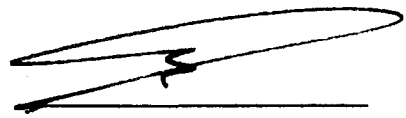
Bu tez 8/11/1991 tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından
100.(Yüz).Not Takdir Edilerek Oybirliği/Özellikle ile Kabul
Edilmiştir.



Prof. Dr. Kazım ABAK



Prof. Dr. Atilla GÜNAY



Prof. Dr. Vedat ŞENİZ



ÖZET

Doktora Tezi

DEĞİŞİK PATLICAN GENOTİPLERİNDE *in vitro* ANDROGENESİS VE
HAPLOİD BİTKİ OLUŞUMUNU UYARICI BAZI ETMENLER ÜZERİNDE
ARAŞTIRMALAR

Şebnem KARAKULLUKÇU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr.Kazım ABAK
1991, Sayfa:136

Jüri: Prof.Dr.Kazım ABAK
Prof.Dr.Atila GÜNAY
Prof.Dr.Vedat ŞENİZ

Patlıcanda anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde çalışılmıştır. Değişik patlıcan genotiplerinde besin ortamına katılan şeker, aktif karbon, büyümeyi düzenleyicilerin etkileri araştırılmıştır. Ayrıca anterlere, kültüre almadan önce yapılan soğuk uygulamaları ve kültürün ilk devresinde yapılan sıcak uygulamaları ile donör bitkilerin yetiştirme koşullarının etkileri de araştırılmıştır.

Yapılan sitolojik incelemelerde anter kültürü için en

elverişli gelişme döneminin birinci polen mitozundan hemen önceki dönem olduğu belirlenmiş, bu dönemdeki tomurcuklarda ta yaprakların seviyesinin çanak yaprakların birleşme noktasında bulunduğu, anter renginin ise yeşilimsi sarı renkte olduğu gözlenmiştir.

Patlıcanda androgenesis olayının genotiple yakın bir ilişki içinde olduğu görülmüştür. Denemelerde yer alan çeşitler içerisinde Halep Karası ve Baluroi F₁ çeşitlerinden haploid bitki elde edilmiş, Prelane F₁ ve Kemer eşitlerinde de embriyolar oluşmuş ancak bitkiye dönüşüm grekleşmemiştir. Diğer eşitlerden (Dourga, Pala, Adana Topağı, şeytan, Black Beauty, Marfa F₁, Fabina F₁, Galine F₁) haploid embriyo veya bitki elde edilememiştir.

İlk dikim ortamı olarak %12 oranında sakkaroz, 5mg/l Kinetin ve 5 mg/l 2,4-D katılan ve bileşimi **Chambonnet (1985)**'e göre hazırlanan ortam en iyi sonucu vermiştir. Aktif kömürün ve kültür öncesi tomurcuklara soğuk uygulamasının olumlu etkisi olmamış; en iyi sonuç dikimi izleyen ilk 8 gün karanlıktta ve +35°C sıcaklıktta tutulan anterlerden elde edilmiştir.

Donör bitkilerin kısa gün ve düşük sıcaklık koşullarında yetiştirilmesi androgenesisini uyarıcı bir etki yapmamıştır. Haploid bitkiler; ilkbahar veya yaz başlangıcında çiçeklenmenin ilk dönemlerinde alınan tomuruklardan elde edilmiştir.

Çalışmanın değişik aşamalarında toplam 22 adet embriyo ve 13 adet haploid bitki elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Patlıcan, *Solanum melongena* L., anter kültürü, androgenesis, hormonlar, şeker, aktif kömür, genotip, sıcaklık şokları, donör bitki.

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATIONS ON SOME FACTORS INDUCING *in vitro*
ANDROGENESIS AND HAPLOID PLANT DEVELOPMENT IN DIFFERENT
EGGPLANT GENOTYPES

Şebnem KARAKULLUKÇU

Ankara University

Graduate School of Natural And Applied Sciences

Department of Horticulture

Supervisor : Prof.Dr. Kazım ABAK

1991, Page:136

Jury: Prof.Dr.Kazım ABAK

Prof.Dr.Atila GÜNAY

Prof.Dr.Vedat ŞENİZ

On the obtention of haploid plants by anther culture in eggplant was studied. Effects of sugar, active charcoal and plant growth regulators as well as cold shock treatments before culture and high temperature shock treatments after culture and the effects of growing conditions of donor plants were investigated.

In cytological investigation, the most available

development period for anther culture was found as the just previous period of 1st pollen mitosis. The petal levels of the buds in this period was found as the level of sepals and the color of anther was observed as greenish yellow.

A relationship between androgenesis and genotype in eggplants haploid plants could be obtained from Halep Karası and Baluroi F₁ experimental cultivars only embrioids occured in Prelane F₁ and Kemer cultivars, but not plants. No haploid embryos or plants could be obtained from the other cultivars (Dourga, Pala, Adana Topağı, Şeytan, Black Beauty, Marfa F₁, Fabina F₁, Galine F₁).

The establishment medium prepared as 12 % saccarose, 5 mg/l Kinetin and 5 mg/l 2,4-D according to **Chambonnet (1985)** gave the best results. There wasn't a positive effect of active charcoal and cold applications to the buds before the cultivation, the best result was obtained from 8 days darkness after the plantation and +35°C temperature applied anthers.

The propogation of the donor plants under short day and low temperature conditions didn't have a stimulative effect on androgenesis. The haploid plants were obtained from anthers of the young plants which were grown in spring or summer time.

In different stages of the research 22 embryos and 13 haploid plants are obtained.

Key Words: Eggplant, *Solanum melongena* L., anther culture, androgenesis, hormones, sugar, active charcoal, genotype, termique shocks, donor plant.

ÖNSÖZ

Solanaceae familyasına giren patlıcan (*Solanum melongena* L.), üretim alanı ve miktarı bakımından ülkemiz tarım potansiyelinde önemli yeri olan bir türdür.

Yıllık patlıcan üretim miktarımız 730.000 ton'la toplam sebze üretiminin % 5'ini karşılamakta (Anonymous, 1988); üretim alanı bakımından ise 44.000 ha'lık alanla toplam sebze üretim alanının %0,3'ünü kaplamaktadır (Anonymous, 1989). Gerek taze olarak, gerekse konserveye işlenerek veya kurutulularak değerlendirilen ve Türk mutfağında çok çeşitli kullanım şekilleriyle özel bir yeri olan patlıcanın üretimi yıllar içerisinde artış göstermektedir.

Son yıllarda ülkemizde yetiştirilen patlıcan çeşitlerinin bir bölümü, örtü altında yetiştirilenlerin ise tümüne yakını yurt dışından döviz karşılığı satın alınan F1 hibrit çeşitlerdir. Yerli çeşitlerimizin hemen hiçbiri düşük sıcaklık koşullarında meyve tutma özelliğine sahip değildir. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde yapılan bir çalışmada, yerli çeşitlerimizde kış aylarında serada çimlenme yeteneğinde canlı polen meydana gelme oranı çok düşük bulunmuş; gece minimum sıcaklığının sera içinde 13°C'ye ulaştığı Mart ayının sonundan itibaren çimlenme yeteneğinde canlı çiçek tozlarının oranı artmaya başlamıştır. Gerek yerli çeşitlerimizin hastalıklara dayanıklı hale getirilmesi, gerekse düşük sıcaklıklarda meyve tutma oranı yüksek yeni çeşitlerin elde edilerek dışarıya bağımlılıktan kurtulunması için ıslah

çalışmalarının başlatılması ve hızlandırılması gerekmektedir.

İslah çalışmalarında hızlı ve güvenilir sonuçların alınabilmesi için teknolojik gelişimlerden ve yeni yöntemlerden yararlanılması zorunlu hale gelmiştir. Çağımıza damgasını vuran ve tüm biyolojik konularda geniş olanaklar sunan biyoteknolojinin önemli dallarından birisi olan bitki doku kültürü teknikleri, bitki yetiştiricileri ve ıslahçılara büyük kolaylıklar sağlamaktadır.

Çalışmamızda değişik patlıcan genotiplerinde anter kültürü yoluyla haploid bitkilerin elde edilmesinde, polen embriyosu oluşumunu artırmak üzere bazı uygulamaların etkilerini belirlemek ve haploid bitki oluşum oranını yüksetmek amaçlanmıştır.

Elde edilen sonuçların geliştirilerek yeni çeşitlerin eldesinde kullanıldığını görmek bizim için mutluluk kaynağı olacaktır.

TEŞEKKÜR

Hızla gelişen doku kültürü tekniklerinden biri olan ve sebze ıslahı açısından büyük önem taşıyan anter kültürü konusunda beni çalışmaya yönlendiren Sayın hocam Prof.Dr.Kazım ABAK'a (Ç.Ü.Z.F.Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana) çalışmalarımın her aşamasında göstermiş olduğu yakın ilgi ve çok değerli katkıları için teşekkürlerimi sunarım.

Bir bölümü Adana'da yürütülen çalışmanın gerçekleştirilmesinde anlayış ve katkılarını gördüğüm Sayın hocam Prof.Dr.Mahmut AYFER'e (A.Ü.Z.F.Bahçe Bitkileri Bölümü Başkanı, Ankara); tez çalışmalarım süresince yapıcı öneri ve değerli katkılarından yararlandığım Sayın hocam Prof.Dr.Y.Sabit AĞAOĞLU'na (A.Ü.Z.F.Dekan Yardımcısı, Ankara) tezimin yazımı ve değerlendirilmesi aşamasında değerli görüşlerinden yararlandığım Sayın hocam Prof.Dr.Atila GÜNAY'a (A.Ü.Z.F.Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara) teşekkür ederim.

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde bitkilerin yetiştirilmesi ve denemelerin kurulması aşamasında Bölümün sera ve laboratuvarlarında çalışma olanağı sağlayan Sayın hocam Prof.Dr.Nurettin KAŞKA'ya (Ç.Ü.Z.F.Bahçe Bitkileri Bölümü Başkanı, Adana);

Çalışmanın bir kısmını oluşturan sitolojik gözlemler ve fotoğrafların çekilmesinde yardımcı olan değerli arkadaşım Ar.Gör.Uz.Birhan MARASALI'ya (A.Ü.Z.F.Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara), Ar.Gör.Uz.Cafer S.SEVİMAY'a (A.Ü.Z.F.Tarla Bitkileri Bölümü, Ankara), Y.Doç.Dr.Ziya ÖZCAN'a (A.Ü.Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji

Anabilim Dalı, Ankara) ve Ar.Gör.Uz.Nurhan BAKAR'a (A.Ü.Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara);

Tezimde yer alan grafiklerin hazırlanması ve basımında yardımcı olan Sayın Nurettin ELLİALTIOĞLU (T.C.Ziraat Bankası Genel Mdl., Menkul Değerler Müdürlüğü, Md.Yrd., Ankara) ve değerli personeline;

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan Laborant Handan KIRBAŞ'a (A.Ü.Z.F.Bahçe Bitkileri Bölümü,Ankara); tezimin yazımı gerçekleştiren Şengül UYGUN'a (Ç.Ü.Z.F.Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana);

Ayrıca tez çalışmam süresince bana yardımcı olan, bilgileri ve önerileri ile destekleyen Ankara Üniversitesi ve Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ndeki tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma; bu tezi mali yönden destekleyen TÜBİTAK Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu'na ve "NATO-TR Science for Stability" programı'na; maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli annem ve babama teşekkür ederim.

Ekim, 1991

Şebnem KARAKULLUKÇU

SİMGELER

μ	: mikron
N	: Normalite
mg/l	: miligram / litre
g/l	: gram/litre

KISALTMALAR

2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyaceticacid
IAA	: Indol asetik asit
NAA	: Naftalen asetik asit
BAP	: Benzil amino purin
MS	: Murashige ve Skoog
Kin.	: Kinetin
Zea.	: Zeatin
ABA	: Absizik asit
Dour.	: Dourga
Bal.	: Baluroi F1
Gal.	: Galine F1
Fab.	: Fabina F1
Mar.	: Marfa F1
Pre.	: Prelane F1
H.K.	: Halep Karası
A.T.	: Adana Topağı
B.Y.	: Birecik Yerlisi
B.B.	: Black Beauty

Embriyo Ol.Or.	: Embriyo oluşum oranı
Bitki Ol. Or.	: Bitki oluşum oranı
E.S.	: Embriyo sayısı
E.O.	: Embriyo oluşum oranı
B.S.	: Bitki sayısı
B.O.	: Bitki oluşum oranı
Sak.	: Sakkaroz
A. Kömür	: Aktif Kömür



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1. Fizyolojik etmenler	8
2.2. Anterlerin Alınma Zamanı.....	13
2.3. Ön Uygulamalar	14
2.4. Besin Ortamının Yapısı ve Bileşimi	18
2.5. Fiziksel Etmenler ve İnkübasyon Koşulları....	26
2.6. Genotip Etkisi	29
3. MATERYAL VE METOD.....	32
3.1. Materyal	32
3.2. Metod.....	33
3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi.....	33
3.2.2. Çiçek tomurcuklarının gruplandırılması.....	35
3.2.3. Sitolojik yöntemler.....	37
3.2.3.1. Mikrospor gelişme dönemlerinin belirlenmesi	37
3.2.3.2. Kök ucunda kromozom sayımı.....	39
3.2.3.3. İncelemelerin yapılması ve fotoğrafların çekimi.....	39
3.2.4. <i>In vitro</i> kültürler	40
3.2.4.1. Kullanılan genel yöntemler.....	40
3.2.4.1.1. Besin ortamlarının hazırlanması	40
3.2.4.1.2. Anterlerin çıkarılması ve dikim	43
3.2.4.1.3. Kültür koşulları	45
3.2.4.1.4. Haploid bitkilerin dış şartlara alış- tırılması.....	46

	<u>Sayfa</u>
3.2.4.1.5. Değerlendirme.....	46
3.2.4.2. Deneme gruplarında yapılan farklı uygulamalar	48
3.2.4.2.1. I.Deneme'de yapılan uygulamalar.....	48
3.2.4.2.2. II. Deneme'de yapılan uygulamalar.....	49
3.2.4.2.3. III. Deneme'de yapılan uygulamalar.....	49
3.2.4.2.4. IV. Deneme'de yapılan uygulamalar	50
3.2.4.2.5. V. Deneme'de yapılan uygulamalar	50
3.2.4.2.6. VI. Deneme'de yapılan uygulamalar.....	51
3.2.4.2.7. VII. Deneme'de yapılan uygulamalar	52
3.2.4.2.8. VIII. Deneme'de yapılan uygulamalar.....	53
4.SONUÇLAR.....	56
4.1. Mikrospor Gelişme Dönemlerinin Belirlenmesi..	56
4.2. I. Deneme Sonuçları	63
4.3. II. Deneme Sonuçları	67
4.4. III. Deneme Sonuçları	73
4.5. IV. Deneme Sonuçları	76
4.6. V. Deneme Sonuçları	78
4.7. VI. Deneme Sonuçları.....	82
4.8. VII. Deneme Sonuçları.....	85
4.9. VIII. Deneme Sonuçları.....	95
5. TARTIŞMA.....	104
6. KAYNAKLAR	119

1. GİRİŞ

Bitkilerden ayrılan organ, doku, hücre veya hücre kısımlarının steril koşullarda, yapay besin ortamlarında yetiştirilmesi, geliştirilmesi ve yeni bitkilere dönüştürülmesi işlemine bitki doku kültürleri adı verilmektedir.

İlk çalışmaları XIX. yüzyılın sonlarına rastlayan tarihlerde botanikçiler tarafından bitkisel dokularda yapılan doku kültürleri, günümüze kadar önemli gelişmeler kaydetmiş ve birçok bitki türünde çoğaltım ve ıslah amacıyla pratik olarak kullanılmaya başlamıştır.

Doku kültürlerinin sağladığı gelişmelerden bir bölümü de anter kültürü sayesinde gerçekleşmiştir. Anter kültürü esas olarak, içerisinde olgunlaşmamış çiçek tozlarını (mikrospor) bulunduran anterlerin tomurcuklardan izole edilerek *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına alınması ve burada olgunlaşmamış çiçek tozlarından haploid embriyolar elde edilmesi olayına verilen isimdir.

Bazı kimyasal maddeler yardımıyla kromozom sayısı iki katına çıkarılabilen ve bir generasyon sonunda % 100 homozigot bitki hatlarının elde edilmesini sağlayan haploid bitkiler birçok amaca hizmet etmektedirler. Bunlardan bazılarını şöylece özetlemek mümkündür:

* Seleksiyon ıslahında: Yetiştiriciliği yapılan karışık çeşitler veya populasyonlar kısa sürede saflaştırılabilmektedir. Elde edilen saf hatlar arazi koşullarında değişik lokasyonlarda denenerek birkaç yolda ilginç özellikleri olan adaptasyon yeteneği geniş çeşitler geliştirebilmektedir.

* Melezleme ıslahında: Başlangıç melezlemesinden sonra açılım generasyonlarında homozigotlaştırma için gerekli 6-7 generasyonluk süre, bir generasyona indirilebilmektedir. Bu yolla kombinasyon ıslahı süresini 12-13 yıldan 5-6 yıla indirmek olasıdır (Abak, 1986).

* Mutasyon ıslahında: Haploid bitkilerde veya hücrelerde ortaya çıkan mutasyonlar, bu bitkilerin kolaylıkla diploidleştirilebilmesi ve homozigot hale getirilmesi nedeniyle yeni çeşitlerin hızla geliştirilmesinde kullanılabilir. Haploid hücre kültürü, mutasyonlar ve hücre modifikasyonlarının incelendiği somatik hücre genetiği çalışmalarında çok elverişli bir yöntemdir (Reinert ve Bajaj, 1977). Ayrıca diploid materyale uygulanan mutagenlerin resesif yönde yarattığı mutasyonlar, bu materyalden çekilen haploidler yardımıyla ilk generasyonda belirlenebilmektedir.

* F1 hibrit gücü ıslahında: Bu yöntemle ebeveyn adayı olabilecek materyalin hazırlanması 5-6 generasyondan bir yıla indirilebilmektedir. Özellikle kendine uyuşmazlık gösteren türlerde olduğu gibi kendileme ile saf hatların oluşturulmasında gclklerle karşılaşıldığında veya doğal olarak yabancı dllendikleri için kendilenmiş saf hatların eldesi uzun süren türlerde anter kültürü devreye girerek süreyi kısaltmaktadır (Melchers ve Labib, 1970).

* Hastalıklara dayanıklı cesit ıslahında: Dayanıklı ve duyarlı çeşitlerin melezlenmesinden elde edilen bitkilerden anter kültürü ile elde edilen haploidler katlanmakta ve bu hatların çok sayıda ırka mukavemeti aynı anda kontrol edilebilmektedir (Abak, 1982; Abak, 1985).

Haploid bitkiler ayrıca genetik çalışmalarda (Pochard ve Dumas de Vaulx, 1971; Abak ve ark. 1982) ve fizyolojik araştırmalarda (Abak, 1983) da önemli avantajlar sağlamaktadır.

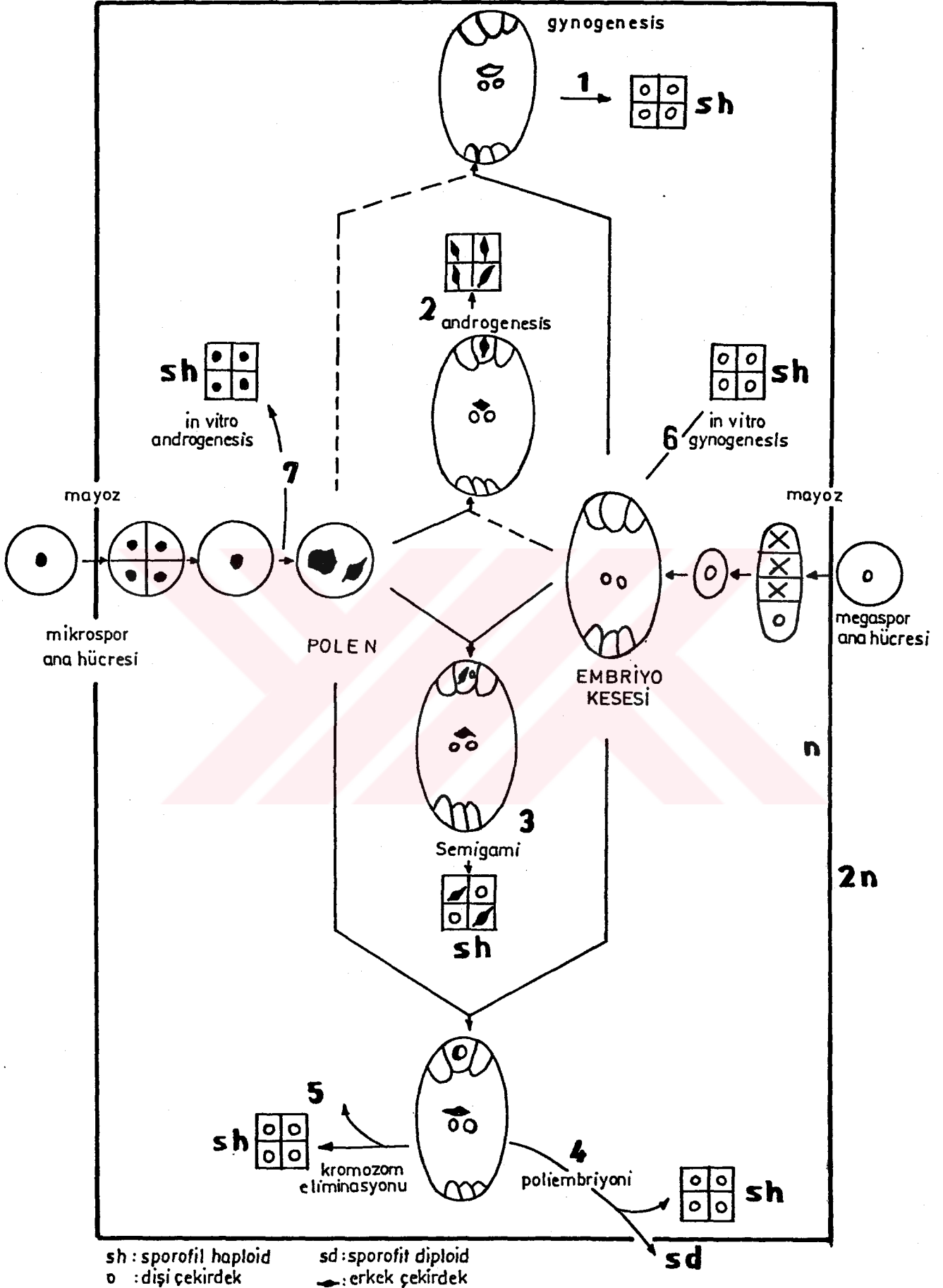
Haploid bitkiler; normal bir bitkide bulunan tüm organlara sahip olan, ancak hücrelerindeki kromozom sayısı bakımından indirgenmiş gametlerin yapısını gösteren bitkilerdir. Hücreleri diploidlere göre daha küçüktür. Boyları daha kısa, yaprakları dar ve küçük olan bu bitkilerin çiçekleri de küçük olup polen oluşturmamaları için kısırdır (Pochard ve Dumas de Vaulx, 1971).

Haploid bitkilerin doğada kendiliğinden oluşum yolları bulunmaktadır. Bunları 5 grupta toplamak olasıdır (Şek. 1.1).

* Birinci yol, dölleme olmaksızın yumurta hücresinin zigot gibi bölünmeye başlayarak haploid embriyo oluşturmalarıdır. Gynogenesis diye adlandırılan bu durumda; dişi ve erkek eşey hücreleri birleşmediği halde, embriyo kesesi sekonder çekirdekleri ile polen generatif çekirdeği birleşerek endospermi oluştururlar.

* İkinci yolda yumurta hücresinin döllemesinden önce çekirdeğin inaktif hale geçerek kaybolması söz konusudur. Bu şekilde oluşan haploidler, hücrelerinde sadece erkek gametin kromozom serisini içermektedirler ve bu olaya androgenesis adı verilmektedir.

* Erkek ve dişi eşey hücrelerinin birleşerek embriyo oluşumuna katıldığı halde, çekirdeksel erimenin meydana gelmediği semigami durumunda ana ve babaya ait sektörlerin bulunduğu kimeralı haploid bitkiler oluşmaktadır.



Şekil 1.1. Bitkilerde doğal ve uyartı yoluyla haploid oluşum yolları (Sauton, 1987; Gürsöz, 1990).

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Haploid bitkilerin elde edilmesine yönelik çalışmaların ilki 1922 yılında **Blakeslee** ve ark. tarafından *Datura stramonium* bitkisinde yapılmıştır. Bundan sonra bir yandan çiçeklere dışsal uygulamalar yaparak, diğer yandan da haploid eşey hücrelerini bulduran dokuları *in vitro* kültüre alarak haploid bitki elde etme çabaları sürdürülmüştür. Her iki cinsiyete ait gametlerde yürütülen çalışmalardan, dişi gametten haploid bitki elde etmeye yönelik olanlar 1960'lı yıllarda yoğunlaşmıştır. **Aalders**'in 1958 yılındaki çalışmalarını izleyen birçok araştırmadan sonra, dişi kökenli ilk haploid bitkiler **San Noeum (1976)** tarafından arpa bitkisinden elde edilmiştir. Günümüzde birçok bitki türünde yumurtalık kültürü tekniği yoluyla haploidi, geliştirilmeye ve ıslah programlarında kullanılabilir duruma getirilmeye başlanmıştır (**Dumas de Vaulx, 1979; Asselin de Beauville, 1980; Chambonnet ve Dumas de Vaulx, 1985; Hosenans ve Bossoutrot, 1983; Sauton, 1987**).

Dişi gametten haploid bitki elde etmeye yönelik çalışmalar Türkiye'de henüz oldukça yenidir. **Koç (1989)**, sitoplazmik erkek kısır bir şeker pancarı çeşidinde, steril koşullarda izole ettiği 1100 adet döllenmemiş ovul (yumurta hücresi)'den 7 adet haploid bitki elde edebilmiştir. Bir diğer çalışmada iri meyveli kavun çeşitleri (*Cucumis melo* var. *inodurus* ve *C. melo* var. *reticulatus*) ile karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) ışınlanmış polenlerle tozlamadan sonra partenogenetik haploid embriyoların elde

edilmesi ve bunların *in vitro* koşullarda bitkiye dönüştürülmesi amaçlanmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Gürsöz ve ark., 1991 a ve b). Işınlama yoluyla çimlenme yeteneği korunan ancak dölleme yeteneği engellenen polenlerin dişi organda uyartımlara yol açtığını, böylece embriyo kesesi içerisinde ya düzensiz hücre yığınları (kallus) ya da doğrudan embriyoların meydana geldiğini belirten araştırıcılar, bu yöntemle kavunda 327 adet ve karpuzda 17 adet haploid bitki elde ettiklerini bildirmektedirler.

Erkek gametten haploid bitki elde etme çalışmalarının ilki 1953 yılında Tulecke adlı araştırıcı tarafından *Ginkgo biloba* bitkisinde gerçekleştirilmiştir. Bu ilk haploid dokunun, olgun polen tanelerindeki vegetatif çekirdeğin birbiri ardına bölünmesi sonucunda meydana geldiği belirlenmiştir. Bunun ardından yine aynı araştırıcı *Taxus* bitkisi polenlerinden de haploid dokular elde etmeyi başarmıştır (Tulecke, 1959).

Torreya nucifera, *Ephedra foliata* ve *Pinus resinosa* bitkilerinde de benzer çalışmalar yapılmış (Vasil, 1980), ancak bu ilk çalışmalarda sadece haploid doku formuna kadar ulaşılmış bitki oluşumu meydana getirilememiştir. Yamada ve ark. (1963)'nın *Tradescantia reflexa* bitkisinde yaptıkları anter kültürü sonucunda, mikrospor ana hücrelerinden haploid dokular izole ettiklerini ilk kez rapor etmelerinden hemen sonra Guha ve Maheshwari 1964 yılında *Datura innoxia* bitkisinde anter kültürü yoluyla embriyo elde etmişler ve bunların orijininin olgunlaşmamış polen taneleri olduğunu belirlemişlerdir. 1967 yılında Bourgin ve Nitsch adlı

araştırmacıların da tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisinde haploid bitkileri elde etmelerinden sonra konu ile ilgili çalışmalar hızla artmıştır.

Anter kültüründe başarıyı etkileyen çok sayıda etken bulunmaktadır. Bunlar; donör bitkiden kaynaklanan fizyolojik etmenler, anterlerin alınma zamanı, tomurcuklara yapılan ön uygulamalar, besin ortamının yapısı ve bileşimi, kültür sırasındaki fiziksel etmenler ve inkübasyon koşulları ile bitkinin genotipik özellikleri olarak sıralanabilir.

2.1. Fizyolojik Etmenler

Anterlerin alındığı donör bitkinin içinde bulunduğu fizyolojik durum ve bunu etkileyen çevresel faktörler, anter kültüründe başarıyı etkileyen önemli konulardan birisidir.

Mevsimsel farklılıklar birçok bitki türünde anterlerin gösterdiği reaksiyonları önemli derecede etkilemektedir. **Dunwell ve Sunderland (1973)**, farklı mevsimlerde yetiştirilerek çiçeklenmeleri sağlanan patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkilerinde yaptıkları anter kültüründe; haziran sonundan itibaren çiçek açan bitkilerden alınan anterlerin nisan ve mayıs ayında çiçeklenen bitkilerden alınan anterlere göre daha yüksek oranda embriyo oluşturdıklarını bildirmektedirler. Ayrıca daha sıcak dönemde alınan anterlerden oluşan embriyoların fazla sayıda hücre içerdikleri ve daha büyük oldukları, yaşama oranlarının arttığı da belirtilmektedir. **Picard ve De Buyser (1973)** de buğday anter kültüründe mevsimsel farklılığın başarı üzerinde etkili rol oynadığına katılmaktadırlar.

Dunwell ve Perry (1973), tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkilerinde çiçeklenme döneminin başlangıcında alınan anterlerin en yüksek androgenik kapasiteye sahip olduklarını, çiçeklenmenin sonuna doğru anter kültüründe verimin azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu, yaşlı bitkilerde özellikle çiçeklenmenin son dönemlerinde küçük tomurcuklar oluşması ve bunların morfolojik olarak uygun dönemde gibi görünmelerine karşın anterlerin içerisinde mikrospor ve genç polenlerin heterojen bir karışım halinde bulunmalarına bağlamaktadırlar. **Anagnostakis (1974)** tütünde benzer biçimde ilk çiçeklerde % 15 oranında haploid üretimi elde ederken, bir hafta sonra alınan tomurcuklardan % 7, iki hafta sonra alınanlardan ise sadece % 2 oranında haploid üretimi gerçekleştirebilmiştir. **Dunwell (1976)**, bitki yaşı ve mevsimsel farklılıkların; anterlerin kültüre alınmasından sonraki ilk günlerde aktif olan anter duvarındaki indükleyici hormonların etkisinden kaynaklanabileceğini ileri sürmektedir.

Donör bitkilerin yetiştirildiği ortamdaki sıcaklık, gün uzunluğu ve ışık yoğunluğu gibi çevresel faktörler de anterlerden haploid embriyo elde edilmesinde etkili olmaktadır (**Sunderland ve Dunwell, 1974**). Nitekim **Dunwell (1976)**, tütünde en yüksek embriyo oluşumunun kısa gün ve yüksek ışık yoğunluğunda yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerde meydana geldiğini belirtmektedir. Nisbeten düşük sıcaklıklarda yetiştirilen kolza bitkilerinin de yüksek sıcaklıkta yetiştirilenlerden daha yüksek androgenik kapasiteye sahip oldukları belirlenmiştir (**Keller ve Stringham, 1978**). **Rashid (1983)** de tütünde kültürden önce

bitkileri düşük sıcaklıkta tutmanın haploid embriyo oluşum oranını artırdığını bildirmektedir.

Bitkideki androgenik potansiyel ile ilgili araştırmalar sırasında ilginç bazı bulgular ortaya çıkartılmıştır. İlk kez **Sunderland (1971)** tarafından, kültüre alınan tütün anterleri içerisinde sitolojik gözlemlerde daha açık renkli boyanan ve büyüklük bakımından farklılık gösteren polen tanelerinin varlığı saptanmıştır.

Daha sonra *in situ* olgunlaşmış anterlerin içerisinde çavdar (*Secale cereale*) (**Wenzel ve Thomas, 1974**) ve arpada (*Hordeum vulgare*) (**Dale, 1975**) polen taneleri arasında farklı yapılarda olanların bulunduğu belirlenmiştir. **Horner ve Street (1978)**, polen dimorfizmi olarak adlandırılan bu durumu şöyle açıklamaktadırlar: Polen dimorfizmi, anterlerin içerisinde iki farklı yönde gelişme potansiyeline sahip iki farklı morfolojide polen tanelerinin bulunmasını ifade etmektedir ve bu farklı gelişmelerden birisi gametofitik yönde, diğeri sporofitik yöndedir. Normal olarak bir angiosperm poleni büyük oranda gametofitik olarak gelişerek erkek gameti oluşturmaktadır. Bunun karşıtı olan sporofitik gelişim sonucunda (haploid sporofit) tam bitkiye dönüşme ise yalnızca kontrollu deneme koşullarında mümkündür.

Horner ve Mott (1979), tütün anterlerindeki embriyogenik yani sporofitik polen taneciklerinin (S-poleni) oranı ile kültüre alınan anterlerden elde edilen embriyo ve bitkiçik sayısını karşılaştırdıkları çalışmalarında, bu iki parametre arasında kesin bir korelasyon bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar polen taneciklerinin embriyo-

genik kapasitelerini tomurcukların ilk aşamalarında kazandıklarını ve embriyogenik polen oluşumunda bitkinin yetiştirildiği çevresel koşulların bu nedenle büyük önem taşıdığını vurgulamışlar, *in vitro* anter kültürü yoluyla embriyogenik polen tanelerinin frekansının artırılmadığını da eklemiştirler.

Heberle-Bors ve Reinert (1979) de donör bitkilerin yetiştirildiği koşulların embriyogenik polen tanesi sayısını etkilediğini belirtmektedirler. Tütün bitkilerinin serin koşullarda yetiştirilmesi halinde P-poleni diye adlandırılan embriyogenik polen tanelerinin arttığı ve anterlerden elde edilen embriyo oranının da yükseldiği bildirilmektedir (**Heberle-Bors, 1981**). Yine **Heberle-Bors (1982 a)**, 18°C'de yetiştirilen tütün bitkilerinin 24°C'ye götürülmesiyle, transfer anında polen tetradı döneminde olan tomurcuklardaki polen dimorfizminin yarı yarıya azaldığını belirlemiştir. Tütünde donör bitkilerin kısa gün ve düşük sıcaklıkta yetiştirilmesinin embriyogenik tanelerin sayısını artırdığını da bir başka çalışmasında (**Heberle-Bors, 1982 b**) rapor eden araştırmacı, bu koşulların çiçeklenmeyi teşvik ettiğini ve çiçekteki seks balansını dişilik yönüne doğru kaydardığını ileri sürmektedir. **Heslop-Harrison (1972)**'un belirttiği gibi kuvvetli çiçek oluşumunu uyarıcı koşulların çift cinsiyetli bitkilerde seks balansını dişilik yönünde etkilediği ve polen sterilitesini artırıcı yönde etki yaptığı görüşüyle yaptığı araştırmalarında **Heberle-Bors (1983)**; dişilik yönü ağır basan bitkilerde erkek gametlerin gelişimlerini tamamlayamadıklarını, steril formasyonlar ve muhtemelen embriyogenik polenler oluştuğunu ortaya koymuştur.

Embriyogenik polenlerin yapılarını inceledikleri araştırmalarında **Rashid ve ark. (1981)**, gametofitik polenlerin kalın bir exine tabakasına sahip olduklarını, ribozomca zengin, iyi gelişmiş mitokondriler içeren yoğun bir sitoplazmalarının bulunduğunu ve çimlenme özelliği gösterebildiklerini, buna karşılık embriyogenik polenlerin ince bir exine tabakasına sahip olduklarını, açık renkli sitoplazmalarının ribozom bakımından fakir olduğunu, mitokondrilerin kısıalıp kalınlaştığını ve çimlenme yeteneğinin bulunmadığını belirlemişlerdir. **Rashid (1983)**, embriyogenik potansiyel ve mitokondriyal kısıalma ve farklılaşma arasındaki paralel ilişkiyi, Leaver adlı araştırıcı tarafından belirlenen erkek kısırlığı ile mitokondriyal azalma arasındaki doğrusal ilişkiye benzeterak, mitokondrilerin bitkinin cinsiyet görünümü ve embriyonik potansiyeli üzerinde önemli etkilerinin bulunduğunu ileri sürmektedir.

Çevresel etkenlerin özellikle *in situ* mayoz bölünme devresindeki tomurcuklarda P- polenlerinin oluşumu üzerinde etkili olduğu anlaşılmıştır. Ancak evre koşullarının embriyogenik polen oluşumu üzerindeki etkisinden başka, anter duvarında bulunan bazı inhibitör maddelerin düzeyini de etkileyerek embriyo oluşumuna yön verdiği saptanmıştır (**Heberle-Bors, 1984**).

Düşük sıcaklıkların iek oluşumunu artırıcı etkisi ve buna paralel olarak polen embriyogenesisindeki artış 1984 yılında **Thurling ve Chay** tarafından kolza (*Brassica napus*) bitkisinde de gözlenmiştir.

Donör bitkilerin beslenme koşulları anter kültüründeki başarıyı etkileyebilmektedir. Örneğin tütün

bitkileri yetiştiricilik sırasında nitrojen açlığına maruz bırakıldığında cinsiyet balansı etkilenmekte ve embriyogenik polen tanelerinin sayıca artışına bağlı olarak embriyo oluşum oranı da artmaktadır (Heberle-Bors, 1985).

2.2. Anterlerin alınma zamanı

In vitro androgenesisin başarıyla uyartılması için en önemli konulardan birisi, anterlerin alındığı zamanda mikrosporların içinde buldukları gelişme dönemidir. Birçok bitki türünde mikrospor çekirdeğinin mitoz bölünmeye başlamadan hemen önceki dönem, mitoz bölünme aşaması veya hemen bu aşamayı izleyen bölünme sonrası dönemi en iyi cevap veren dönemler olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte bazı bitki türlerinde, örneğin *Nicotiana sylvestris*'te iki çekirdekli genç polen dönemi en iyi sonucu vermektedir (Sunderland ve Dunwell, 1974). *Hordeum vulgare* (arpa) (Clapham, 1971) ve *Atropa belladonna* (Rashid ve Street, 1973) gibi bazı türlerde ise tek çekirdekli genç mikrosporlar en yüksek embrioid oluşumunu sağlamışlardır. Bu dönemlerin yanısıra Greshoff ve Doy (1972b, 1974) adlı araştırmacılar *Lycopersicon esculentum* ve *Vitis vinifera* türlerinde mayoz bölünmenin değişik aşamalarında haploid dokular oluşturmayı gerçekleştirmişler, ancak en iyi sonuçların tetratları içeren anterlerden alındığını vurgulamışlardır.

Novak (1974) biber anter kültüründe 2.6-5.0 mm arasında büyüklüğe sahip ve açık yeşil renkli petalleri olan tomurcuklardan alınan anterlerin, olgunlaşmamış tek çekirdekli mikrosporları içerdiğini ve bu dönemdeki

mikrosporlardan olumlu sonuç alındığını bildirmektedir. **Sibi ve ark. (1979)**, yine biberlerde sepal ve petal boylarının eşit olduğu ya da petallerin biraz daha uzun olduğu dönemin, polen mitozu ile aynı dönem olduğunu ve anter kültürüne iyi cevap verdiğini bildirmişlerdir. **Abak (1983 b)** da benzer biçimde polen mitozundan hemen önce veya mitoz bölünmenin profaz aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerin uzun meyveli biber çeşitlerinde 3.6-4.0 mm çapındaki tomurcuklarda yer aldığını ve bu aşamanın biberde anter kültürü için en uygun dönem olduğunu belirtmektedir.

Raina ve Iyer (1973), patlıcanda anter kültürüne en iyi cevap veren polen gelişme döneminin, tek çekirdekli mikrospor dönemi olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı bulgular 1978 yılında patlıcan anter kültürü üzerinde çalışan "Research Group of Haploid Breeding" tarafından da elde edilmiştir. **Isouard (1981)**, **Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982)** ve **Chambonnet (1985)** de patlıcanda anter kültürü için en uygun polen gelişme döneminin mitoz bölünmenin hemen öncesindeki tek çekirdekli mikrospor dönemi olduğunu bildirmişlerdir. **Chambonnet (1985)**, birinci polen mitozu aşamasındaki patlıcan çiçek tomurcuklarının petallerinin henüz tam olarak görünmediğini, ancak kaliks'in parçalara ayrıldığı noktaya ulaşmış olduğunu kaydetmiştir.

2.3. Ön uygulamalar

Anter kültüründen daha yüksek oranda haploid bitkinin elde edilmesi için türlere göre değişen çok çeşitli sıcaklık şokları denenmiştir. Bu amaçla düşük sıcaklık dereceleri

(4-15°C) veya yüksek sıcaklık dereceleri (30-35°C) kullanılabilir.

Nitsch ve Norreel (1973)'in *D. innoxia* anterlerini 48 saat süreyle buzdolabında tutmaları ve bu anterlerden elde edilen verimin arttığını belirlemelerinden sonra soğukta ön uygulama ile ilgili denemeler yapılmaya başlanmıştır. Genel olarak soğuk uygulaması, anterlerin çıkarılmasından önce olgunlaşmamış çiçek tomurcuklarına yapılmaktadır.

Malhotra ve Maheshwari (1977), *Petunia hybrida* tomurcuklarını 6°C'de 48 saat süreyle tuttuklarında, aynı besin ortamındaki kontrol anterlerine göre 2 kez fazla sayıda embrioid elde etmişlerdir.

Rajasekaran ve Mullins (1979), asma çiçek tomurcuklarını +4°C'de 72 saat süreyle soğuk uygulamasına tabi tuttuktan sonra yapılan anter kültüründe normal gelişim gösteren embriyo ve bitkiler elde ederlerken, soğuk uygulaması yapılmayan anterlerden oluşan embriyoların gelişmesiyle bazı anormal yapılı bitkilerin meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Sunderland ve Dunwell (1974), soğuk uygulamasında sıcaklık derecesi ve sürenin önemli olduğunu vurgulamış; çok soğuk olmayan +7 ila +15°C gibi sıcaklıklarda uzun süre (7-14 gün) yapılan şoklamanın, daha düşük derecelerde kısa süre yapılan uygulamalardan daha etkili olduğunu ileri sürmüştür. Nitekim tütünde yapılan bir araştırmada çiçek tomurcuklarının +7°C'de 12-14 gün veya +9°C'de 7-9 gün bekletilmesi ve ardından anterlerin sıvı ortamda kültüre alınması en yüksek oranda embriyo oluşumunu sağlamış ve

+5°C'deki uygulamalardan daha iyi sonuç vermiştir. Soğuk uygulamaları en fazla birinci polen mitozundan hemen önceki dönemde etkili olmuş, bunu bölünme dönemi ve bölünmeden hemen sonraki dönem izlemiştir (Sunderland ve Roberts, 1979). Benzer bir şekilde *Hyoscyamus niger* bitkisinde de birinci polen mitozundan hemen önceki dönemdeki tomurcukların 15°C'de 5 gün boyunca tutulması, 7.5°C veya 5°C de değişik sürelerde bekletme uygulamasından daha iyi sonuç vermiştir (Sunderland ve Wildon, 1979).

Vasil (1980)'e göre, kültüre alınmadan önce anterlerin belli bir süre düşük sıcaklıkta tutulması, bunların metabolik aktivitelerini şiddetle azaltmaktadır. Bu durum, androgenik gelişme için uygun dönemdeki mikrosporların yüksek miktarda birikmesiyle sonuçlanmaktadır. Ayrıca soğuk şoku, tipik olmayan mitoz bölünmeye uğrayan mikrospor sayısını artırmakta; bunun sonucu olarak karakteristik bölünme ile vegetatif ve generatif hücrelerin oluşması yerine birbirinin aynısı veya benzeri hücreler oluşmaktadır. Bu hücreler bölünmeye devam ederek embrioidleri oluşturmaktadırlar.

Gupta ve Babbar (1980) adlı araştırmacılar da *Datura metel* L. bitkisinde tomurcuklara uygulanan üşütmenin kültürdeki başarıyı hangi yönde etkilediğini belirleyebilmek için yaptıkları araştırmalarında; 0±1°C'de 48 saat süreyle karanlıkta bekletilen tomurcuklardan çıkarılan anterlerin uygulama yapılmayanlara göre hemen hemen 3 kat daha fazla androgenik potansiyele sahip olduklarını bulmuşlardır. Ancak bu durum yalnızca % 15 oranında hindistan cevizi sütü içeren besin ortamlarında kendini göstermiş, bu maddenin olmaması halinde soğuk uygulamasının androgenesisini engelleyici

etkisinden söz edilebileceği belirtilmiştir.

Rashid (1983), soğuk uygulamalarının embriyogenik polen frekansını artırarak etkili olduğunu ileri sürmektedir. Embriyogenik polen farklılaşmasının iki aşamada gerçekleştiğini, yani önce bitki üzerinde başlayıp kültür ortamında tamamlandığını öne süren araştırmacı yapmış olduğu çalışmalardan birisinde soğuk uygulamasından elde edilen sonuçların, bitkinin yetiştirildiği iklimsel değerlerle ilişkili olarak ortaya çıktığını belirlemiştir. 24°C'de yetişen tütün bitkilerinden alınan tomurcuklarda en az 10 gün +10°C'de uygulama yapmak gerekirken, 18°C'de yetişen bitkilerden alınan anterler 7 gün süreyle +10°C'de tutulduğunda aynı sonuçlar elde edilebilmektedir (**Rashid ve Reinert, 1981**).

Chlyah ve Taarji (1984), domates anterlerine +4°C'de değişik sürelerde soğuk şoku uygulamış; ancak soğuk uygulaması yapılan anterlerden sadece yeşil renkli kallus meydana gelmiş, sürgün oluşumu sağlanamamıştır.

Kişniş anterlerinde soğuk uygulamasının androgenik gelişme üzerine etkilerini inceleyen **Bugara ve ark. (1985)**, +7°C'de 15 gün süreyle tutulan tomurcuklardan en iyi sonucun alındığını bildirmektedirler. Araştırmacılar, soğuk şoklarının içsel hormonların düzeyinde farklılıklar meydana getirerek etki yaptığını ileri sürmektedirler.

Mısır (*Zea mays*) bitkisinde de soğuk şoku androgenik kapasiteyi arttırmakta; +9°C'de 6-9 gün süreyle tutulan mısır anterlerinin en yüksek embriyo oluşumunu sağladığı bildirilmektedir (**Tsay ve ark. 1986**).

Morrison ve ark. (1986) da biber (*Capsicum annum* L.) tomurcuklarına kültüre almadan önce +4°C'de değişik

sürelerde soğuk uygulaması yapmışlar; Emerald Giant çeşidinin 24, 48, 100 ve 120 saat sürelerle soğuğa tabi tutulan anterlerinde embriyo oluşum frekansını sırasıyla % 0.8, % 27, % 47 ve % 13 olarak bulmuşlardır. En yüksek embriyo oluşumu 100 saat +4°C'te tutulan tomurcukların anterlerinden elde edilmiş, 120 saat uygulaması kallus oluşumunu artırarak embriyo oluşumunu olumsuz yönde etkilemiştir.

2.4. Besin Ortamının Yapısı ve Bileşimi

Erkek eşey hücrelerinden haploid bitkilerin oluşumunu uyarmak için değişik kültüre alma yöntemleri kullanılabilir. En çok kullanılan yöntem, tomurcuklardan çıkartılan anterlerin agar ile katılaştırılmış besin ortamı üzerine yerleştirilerek kültüre alınmasıdır (Nitsch ve Nitsch, 1969). Bundan başka sıvı besin ortamında anterlerin yüzdürülmesi (Wernicke ve Kohlenbach, 1976; Kohlenbach ve Wernicke, 1978; Morrison ve ark. 1986); anterden izole edilen mikrosporların kültürü (Nitsch, 1974; Heberle-Bors, 1981; Rashid, 1982) veya tüm çiçek tomurcuğunun sıvı ortamda kültüre alınması (Wilson ve ark. 1978) gibi değişik uygulamalar da bulunmaktadır.

Besin ortamının bileşimi, mikrosporların gametofitik gelişmeden androgenik gelişmeye geçişi için anahtar görevi yapmaktadır. *Nicotiana*'da yalnızca su-agar üzerinde bile androgenik gelişim sağlanabilirken (Kandeler, 1987), % 0.8 agarla jel haline getirilmiş % 2'lik sakkaroz çözeltisi de

aynı amaçla kullanılabilmektedir (Nitsch, 1971). Androgenik potansiyeli çok yüksek bir bitki türü olan tütün, vitamin ve büyüme düzenleyicilere ihtiyaç duymadan, şeker ve mineral madde içeren ortamlarda anter kültürü yapıldığında yüksek oranda bitkicik oluşturabilmektedir (Nitsch, 1972).

Temel besin ortamı olarak anter kültüründe en fazla kullanılan ortamlar arasında Murashige ve Skoog, White ve Nitsch ortamları yer almaktadır (Sink ve Padmanabhan, 1977). B5-Gamborg ortamı da bazı bitkilerde olumlu cevap vermektedir (Keller ve Armstrong, 1979).

Besin ortamındaki şeker oranı oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Normal olarak % 2-4 oranında kullanılan sakkaroz, birçok türde daha yüksek oranlarda (% 6-12) kullanılmaktadır. Yüksek şeker oranları, yalnızca gelişmenin ilk günlerinde kritik rol oynamaktadır ve anterlerin oksin içermeyen ortamlara transferi sırasında genellikle düşük düzeyde şeker içeren ortamlar kullanılmaktadır (Keller ve ark. 1975).

Sopory ve ark. (1978), *Solanum tuberosum*'da % 6 oranında sakkarozun kullanılması gerektiğini ortaya koymuşlar; Sopory (1979) yine patatesten yaptığı denemelerde % 6 sakkaroz konsantrasyonunda anterlerin % 40'ından fazlasının olumlu cevap verdiğini belirlemiştir. Araştırmacı, yüksek şeker konsantrasyonunun mikrospor bölünmesinin ilk dönemlerinde etkili olduğunu bildirmekte, bu etkinin sakkaroz yanında glukoz kullanarak tamamlanabileceğini de eklemekte ve ilk dört günden sonra anterleri % 2 sakkaroz içeren ortamlara şaşırtmak gerektiğini vurgulamaktadır.

Dumas de Vaulx ve ark. (1981) biberde anter kültürü için % 3 oranında sakkaroz kullanmayı, **Abak (1983 b ve c)** ise yine biberde ilk 12 gün süreyle %12, daha sonra % 3 sakkaroz içeren besin ortamını kullanmayı önermekte; buna benzer olarak patlıcanda da birçok araştırmacı ilk 12 gün anterlerin % 12 oranında sakkaroz içeren ortamlarda tutup, şaşırtma ortamında sakkaroz seviyesini % 3'e indirmek gerektiğini bildirmektedirler (**Isouard 1981; Dumas de Vaulx ve Chambonnet, 1982; Chambonnet, 1985; Tuberosa ve ark. 1987**).

Ayçiçeği (*Helianthus annuus*)'nde % 6 sakkaroz en iyi sonuçları verirken (**Mix, 1985**); mısırdaki (*Zea mays*) bu değer % 9 olarak bulunmuştur (**Tsay ve ark., 1986**).

Powell ve Uhrig (1987), *Solanum papita* türü patatesin anter kültüründe sakkaroz oranınının % 9 olması halinde en yüksek embrioid oluşumu olduğunu; ancak % 15 gibi yüksek konsantrasyonda sakkaroz içeren ortamdan da embrioid elde edilebildiğini bildirmektedirler.

Rotino ve ark. (1987 a), sakkarozun yanında aynı zamanda glukoz da kullandığı patlıcan anter kültüründen oldukça ilginç sonuçlar almıştır. % 6 oranında sakkaroz ve % 6.3 oranında glukozun birlikte kullanıldığı ortamlarda, kontrol olarak alınan % 12 ve % 3 sakkaroz konsantrasyonuna göre, bazı genotiplerde ortalama 100 kat fazla embrioid ve bitki oluşmuştur.

Reinert ve Bajaj (1977), şekerin ortamda osmotik basıncı ayarlayıcı bir rol oynadığını belirtmektedirler. Bunun yanında yüksek düzeydeki şekerin, enerji kaynağı olarak solunumu ve metabolik aktiviteyi artırarak hücre

bölünmesi ve embrioid oluşumunu artırabileceği de ileri sürülmektedir (Kandeler, 1987).

Demir elementi anter kültüründe etkili bileşiklerden birisidir. Özellikle oluşan embrioidlerin proembriyo aşamasından globular embriyo ve diğer gelişme aşamalarına geçişi süresince demirin önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Demirin Fe EDDA veya Fe EDDHA gibi şelat bileşikleri, ferrik sitrat gibi demir kaynaklarından çok daha etkili olmaktadır (Reinert ve Bajaj, 1977).

Besin ortamına katılan demirin anter kültüründe önemli bir yeri olduğunu bildiren Abak (1983 b), Türkiye orijinli biber çeşitlerinden embriyo elde edebilmek için yabancı biber çeşitlerinde kullanılan demir konsantrasyonunun iki katına çıkartılması gerektiğini saptamıştır.

Chambonnet ve Dumas de Vaulx (1983), patlıcan anter kültüründe ilk dikim ortamına katılan Vitamin B₁₂'nin de başarı için gerekli olduğunu, kullanma dozunda 5 kez yapılan artışın, oluşan embriyo sayısını da yaklaşık 5 kere daha fazlalaştırdığını belirtmektedirler.

Bitki büyüme düzenleyicileri, özellikle oksin ve sitokininler, androgenik gelişmeyi uyarma konusunda en fazla etkiye sahip faktörlerdendir. Ortamda oksinlerin bulunması, hızlı hücre çoğalması ve kallus oluşumuna neden olmaktadır. Birçok bitki türünde, yüksek aktivitesi olan bir oksin olan 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), sitokininlerle kombine halde kullanıldığında embriyogenesi teşvik etmektedir. Ancak ilk uyarıcı etkiden sonra, embriyoların gelişmesini engelleyici etki yapması nedeniyle (patlıcan: Research Group of Haploid Breeding, 1978;

asma: **Rajasekaran ve Mullins, 1979**) kültürün ilerleyen aşamalarında oksinsiz ortamlar kullanılmaktadır (**Collins ve Genouesi, 1982**).

Aktivitesi daha az olan IAA (Indole-3-aceticacid) gibi oksinlerin de bazı türlerde olumlu sonuçlar verdiği belirlenmiştir (**Seitz ve ark. 1985**).

Sitokininler, özellikle gelişmenin ileri safhalarında embrioidlerin bitkicik haline dönüştüğü dönemde etkin role sahip olmaktadır. Bu amaçla çok çeşitli sitokininler kullanılmakta, ancak Kinetin ve BAP (benzil amino purin) birçok türde sıklıkla kullanılan sitokinin olma özelliğini korumaktadırlar (**Reinert ve Bajaj, 1977**).

Raina ve Iyer (1973), patlıcan anter kültüründe Kinetinin değişik dozlardaki IAA, NAA ve 2.4-D ile hazırlanan kombinasyonlarının polen embriyogenesi üzerinde etkilerini araştırmışlar; uygulanan kombinasyonlar içerisinde IAA ve Kinetin'in 2 mg/l kullanıldığı uygulama grubundan sürgün oluşumu sağlanmış; ancak bu bitkilerin diploid yapıda oldukları belirlenmiştir.

Pekin araştırma grubu (**Research Group of Haploid Breeding, 1978**), kültürün erken dönemlerinde 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l Kinetin kombinasyonunda geliştirilen anterlerin daha sonra 0.005 mg/l NAA ve 1 mg/l Kinetin içeren düşük konsantrasyonlu bileşimlere alınmasıyla % 8-20 arasında bir oranla bitkicik elde edildiğini bildirmektedir.

Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982), ilk dikim ortamında Kinetin ve 2,4-D'yi 5'er mg/l dozunda kullandıklarında patlıcandan en yüksek embriyo verimini almışlardır. Araştırmacılar daha sonraki bir çalışmalarında

bu sonucu doğrular nitelikte bulgular elde etmişler ve 5 mg/l Kinetin ile 5 mg/l 2,4-D hormon kombinasyonu kullanarak; elde edilen bitki oranının % 55.5'e ulaştırılabileceğini kanıtlamışlardır (Chambonnet ve Dumas de Vaulx, 1983).

Rotino ve ark. (1987 a), 2,4-D yerine NAA kullanarak 5 mg/l NAA ve 5 mg/l Kinetin kombinasyonunda değişik patlıcan genotiplerden ortalama % 76.5 oranında embriyo elde etmişlerdir. Besin ortamlarına bazı aminoasitlerin ilave edilmesi de bazı durumlarda embrioid oluşumunu stimüle etmektedir. Örneğin Keller ve Armstrong (1977), *Brassica napus*'ta ortama 100 mg/l L-serine katıldığında % 1 oranında embriyogenik anter frekansına ulaşıldığını ve bunun oldukça başarılı bir sonuç olduğunu bildirmektedirler. Dunwell (1976) ise glutamin'in bütün anter kültüründe başarıyı etkilen anahtar niteliğinde bir aminoasit olduğunu ifade etmektedir.

Aminoasitlerden başka diğer bir takım organik kompleks bileşiklerin de besin ortamlarına katıldığı görülmektedir. Bu organik maddelerden bazıları hindistan cevizi sütü (Guha ve Maheshwari, 1964) ve patates ekstraktı (Sopory ve ark. 1978)'dir.

Anter duvarının indükleyici etkisi bulunduğunu öne süren ve besin ortamına anter ekstraktı ekleyen araştırmacılar da bulunmaktadır. Sharp ve Raskin (1972), domateste ilginç bir teknik denemişlerdir. "Besleyici doku kültürü" diye adlandırılabilir bu yöntemde anterler hazırlanan besin ortamına yatay olarak yerleştirilmiş ve üzerlerine filtre kağıdından hazırlanan diskler konmuş,

bunların üzerine de tek mikrospor tanecikleri süspansiyon halinde damlatılmıştır. Kontrol olarak da ortamla temas edecek şekilde filtre kağıdı diskleri ve üzerlerine polen taneleri konmuştur. İki haftalık bir süre sonunda anter üzerine yerleştirilen disklerde yeşil renkli parankima benzeri hücreler oluşmuş, kontrolde hiç gelişme olmamıştır. **Nitsch ve Norreel (1973)** adlı araştırmacılar ise *Datura innoxia* bitkisinde yaptıkları polen kültüründe besin ortamına anter ekstraktı katmışlar ve bu maddenin promotör görevi yaptığını belirlemişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda anter duvarında inkübasyon süresi boyunca "glutamin" seviyesinin 4-5 kez arttığı, "serin" miktarında da önemli değişiklikler olduğu saptanmıştır (**Maheswari ve ark., 1980**). Bu organik kompleks bileşiklerin, oynadıkları rol açık olmamakla birlikte, mikrosporların bölünmesini teşvik edici etki yaptıkları ileri sürülmektedir.

Besin ortamına aktif kömür katılması birçok bitki türünün anter kültüründe başarıyı artıran bir faktör olarak belirlenmiştir. **Anagnostakis (1974)**, besin ortamına % 1 oranında aktif kömür katıldığında haploid embriyo oluşum oranının % 15'den % 48'e yükseldiğini rapor etmiştir. **Wernicke ve Kohlenbach (1976)**, aktif kömür katılmış agarlı ortam üzerine sıvı ortam katarak hazırladıkları çift fazlı sistemin, jel halindeki agarlı ortamdaki çok daha iyi sonuç verdiğini belirtmektedirler. Araştırmacılar bir başka çalışmalarında sonuçlarını pekiştirmişler ve aktif kömürün agarın içinde bulunan engelleyici maddeleri absorbe ettiğini ileri sürmüşlerdir (**Kohlenbach ve Wernicke, 1978**).

Weatherhead ve ark. (1978), tütün anter kültürü denemelerinde aktif kömürün, besin ortamının otoklavda

sterilizasyonu sırasında sakkaroz tarafından açığa çıkarılan 5-hydroxymethylfurfural (HMF) maddesini tuttuğunu; ancak bu engelleyici maddelerin yanında NAA veya bazı sitokininlerin de aktif kömür tarafından absorbe edilebileceğini ve etkilerinin azalmasına neden olabileceğini ifade etmişlerdir. Heberle-Bors (1980) şelat gibi bazı önemli bileşiklerin de aktif kömür tarafından tutulabileceğine dikkat çekmiştir.

Fridborg ve ark., aktif kömürün fenolik bileşikleri de absorbe ederek *Allium* ve *Daucus* türlerinde somatik dokulardan embriyogenesi artırdığını belirlemişlerdir. Aktif kömürün anter kültüründeki olumlu etkisinin bir nedeninin de anter duvarındaki fenolik bileşiklerin tutulması olduğu ifade edilmektedir (Collins ve Genouesi, 1982).

Johansson (1983), *Anemone*, *Clematis*, *Nicotiana* ve *Papaver* türlerine ait anterleri ABA (Absizik asit) katılmış sıvı ortamlarda kültüre almış; ortamlardan bazılarını aktif kömürlü agar ortamlarının üzerine dökmüştür. Çift fazlı ve aktif kömürlü uygulamalarda ABA'nın engelleyici etkisinin en aza indiği belirlenmiştir.

Morrison ve ark. (1986), biber anterlerini ilk 12 günlük süreden sonra iki gruba ayırmışlar, bir grup anteri normal R ortamına transfer etmiş, diğer bir grup anteri ise çift fazlı R ortamına şaşırtmışlardır. % 2 oranında aktif kömür katılan agarla katılaştırılmış ortamın üzerine aynı bileşimde aktif kömürsüz sıvı ortam ilave edilmiş, bu sistemde çok yüksek embriyo oluşum oranı elde edilmiştir. Bu yöntem sayesinde hem anter duvarındaki engelleyici

maddelerin aktif kömür tarafından absorbe edildiği, hem de serbest hale geçen mikrosporların sıvı ortamda rahatlıkla embriyoya dönüşebildikleri ileri sürülmektedir. İki fazlı sistemlerin patates anter kültüründe de olumlu sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Powell ve Uhrig, 1987)

Ortam pH'sı ile ilgili verilerden, genel olarak 5.6-5.8 değerlerinin anter kültürü için uygun olduğu anlaşılmaktadır. Sopory ve Maheshwari (1976), *Datura* bitkisinde 4.5 ve 6.5 sınırları arasında en iyi embrioid oluşumunun pH 5.8'de elde edildiğini, sınır değerlere yaklaştıkça embrioid meydana gelmediğini bildirmektedirler. Chlyah ve Taarji (1984) ise domates anter kültüründe pH 4.6'dan 5.6'ya çıkartıldığında kallustan % 0.81 oranında sürgün oluşumu meydana geldiğini belirtmektedirler.

2.5. Fiziksel Etmenler ve İnkübasyon Koşulları

Tomurcuklardan çıkartılan anterlerin besin ortamıyla doğrudan doğruya temas etmesi gerekmektedir. Anterlerin besin ortamı üzerine yerleştirilme şekli, başarı için önemli konulardan birisidir. Sopory ve Maheshwari (1976), *Datura innoxia* bitkisinde ortam üzerine değişik pozisyonlarda yerleştirilen anterlerden dorsal (konveks yüzeyin ortamla teması) biçimde ortam yüzeyine yerleştirilenlerden en yüksek oranda embrioid elde edildiğini bildirmektedirler. Araştırmacılar anterlerin dik veya yatay konumda bir kısmının agarlı ortama batırılmasının oksijen yetersizliğine neden olabildiğini ve gelişmeyi engellediğini de eklemektedirler.

Arpa anterlerinin tek lokulusu ortama temas edecek biçimde yan pozisyonda yerleştirilmesi, oluşan kallus oranını artırmış, bu anterlerin üstte kalan lokulusu embrioid oluşumu bakımından çok verimli bulunmuştur (Shannon ve ark. 1985). Tsay ve ark. (1986) da mısır anterlerinin sırt üstü ortama yerleştirilmesinin, karın üstü yerleştirilmesinden çok daha iyi sonuç verdiğini bildirmektedirler.

Her bir kültür kabındaki anterlerin sayısal yoğunluğu ve kültür kabının büyüklüğü ile hacmi de anterlerin verdiği cevap üzerinde etkili olmaktadır. Anter çevresindeki atmosferin gaz bileşimi, CO₂ ve etilen yüzdesi androgenesisini etkileyebilmektedir (Wang ve ark., 1973). Johansson ve ark. (1982), dört farklı bitki türünde kültür ortamındaki CO₂ oranının artırılarak % 2 dolaylarında tutulmasının embrioid oluşumunu artırdığını bildirmektedirler.

Anterlerin tomurcuktan çıkartılması sırasında zararlanmamasına özen göstermek gerekmektedir. Bistüri veya pens tarafından zedelenmiş anterlerde somatik dokulardan kallus oluşturma olayı ile sık sık karşılaşılmaktadır. Ayrıca filamentlerin de aynı nedenle anterden uzaklaştırılması gerekmektedir (Reinert ve Bajaj, 1977).

İnkübasyon aşamasında ışık gereksinimi ve ışığın haploid bitki üretimindeki etkisi tam olarak netlik kazanmamıştır. İnkübasyon süresi boyunca aralıksız ışınlandırma genellikle engelleyici etki yapmaktadır. Işık konusundaki veriler türden türe çok büyük oranda değişiklik göstermektedir. Genel olarak fotoperiyodik olarak ışıklandırma yapılmaktadır (Gresshoff ve Doy, 1972 a;

Radojevic, 1978). Ancak birçok bitki türünde kültürün ilk günlerinde karanlık inkübasyon yapılmakta, daha sonra fotoperiyodik ışıklandırma sistemine geçilmektedir (Sunderland ve Roberts, 1977; Keller ve Armstrong, 1978; Dumas de Vaultx ve ark. 1981; Dumas de Vaultx ve Chambonnet, 1982; Abak, 1983 b; Mix, 1985). Kültürleri, embrioid formasyonu görülene kadar karanlık koşullarda bekleten araştırmacılar da bulunmaktadır (Rajasekaran ve Mullins, 1979; Perez-Bermudez ve ark., 1985). Noth ve Abel (1971), kırmızı ışığın tütün bitkisinde embrioid oluşmasına olumlu etkide bulunduğunu bildirirken; Sopory ve Maheshwari (1976), *Datura* bitkisinde kırmızı ışığın embrioid oluşumunu engellediğini belirlemişlerdir.

Anter ve mikrospor kültürleri genellikle 24-27°C arasında gelişmeye bırakılmakta, bununla birlikte birçok türde sıcaklığın 30°C'ye yükseltilmesiyle daha olumlu sonuçlar alınabilmektedir (Reinert ve Bajaj, 1977). Kültüre almadan önce tomurcuklara uygulanan soğuk şoklarından başka, kültüre aldıktan sonraki günlerde yüksek sıcaklık şokları, bazı türlerde olumlu sonuçlar vermektedir. Örneğin *Brassica* türlerine ait anterler, kültüre alındıktan sonra 3-14 gün süreyle 30-35°C'lerde karanlık koşullarda tutulduktan sonra 25°C'ye alındığında yüksek embrioid oluşumu sağlanmaktadır (Keller ve Armstrong 1978, 1979). Keller ve Stringham (1978), genotipik farklılıkların sıcaklık gereksinimleri üzerinde önemli etkisinin bulunduğu dikkat çekmektedirler.

Kültürün ilk günlerinde uygulanan sıcak şoku, biber ve patlıcan anter kültüründe de olumlu etki yapmıştır. +35°C'de

8 gün süreyle karanlık koşullarda bekletilen biber (**Dumas de Vaultx ve ark. 1981; Abak, 1983 b; Morrison ve ark. 1986**) ve patlıcan (**Dumas de Vaultx ve Chambonnet, 1982; Tuberosa ve ark., 1987; Rotino ve ark. 1987 a**) anterlerinin daha sonra + 25°C de, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyodik düzenine sahip iklim odalarında gelişmeye bırakılmalarının yararlı olduğu bildirilmektedir.

2.6. Genotip Etkisi

Doğada haploidlerin spontan olarak ortaya çıkmasında olduğu gibi mikrosporların embriyo formuna dönüşmesi veya *in vitro* haploid kallus oluşumu da genetik kontrol altında bulunmaktadır. **Nitsch (1969)**, 12 farklı *Nicotiana* türünde yaptığı anter kültüründe yalnızca 5 türden olumlu yanıt alabilmiştir. Araştırmacı poliploid türlerin, diploid türlere göre daha yüksek androgenik kapasiteye sahip olduklarını belirtmiştir. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde 18 hat içerisinde sadece 3 tanesi (**Gresshoff ve Doy, 1972 a**), *Lycopersicon esculentum*' da 43 farklı genotip arasından yine yalnızca 3 genotip (**Gresshoff ve Doy, 1972 b**) ve *Vitis vinifera* türünde ise 27 bitki hattından 3 tanesi (**Gresshoff ve Doy, 1974**) anter kültürüne cevap vermişlerdir. Benzer bir şekilde *Solanum* cinsinde yer alan 118 klon ve 9 türler arası melez genotipte yapılan anter kültürü çalışmasında da sadece 19 tür ve 4 adet türler arası melez genotipten polen bitkileri elde edilebilmiştir (**Irikura, 1975**).

Jacobsen ve Sopory (1978), *Solanum tuberosum* bitkisinde etkili bazı genlerin bir araya geldiği genotiplerde embriyo oluşumunun daha iyi olduğunu ileri

sürmektedirler. Araştırmacılar, anter kültürüne olumlu yanıt veren patates klonlarını belirleyerek bunlar arasındaki melezlemelerden geliştirilen genotiplerde yaptıkları anter kültürlerinde; melez bitkilerin ebeveynlerine göre daha yüksek oranda embriyo oluşturmaları sonucunda bu kaniya varmışlardır.

Ancak bazı çalışmalarda anter kültürüne yanıt vermediği belirlenen genotipler, bir başka çalışmada son derece olumlu sonuçlar verebilmektedir. Örneğin daha önceki bir çalışmada (Nitsch, 1969) herhangi bir gelişme göstermeyen bazı *Nicotiana* türlerinden **Tomes ve Collins (1976)** tarafından olumlu sonuçlar elde edildiği görülmektedir.

Ling ve ark. (1978), *Oryza sativa* (çeltik)'da erkek kısır genotiplerden haploid bitkiler elde ederken; **Zamir ve ark. (1980)** da *Lycopersicon esculentum* (domates)'un erkek kısır hatlarında anter kültüründen yanıt alınabildiğini bildirmektedirler. Araştırmacılar, domateste yalnızca ms³⁵ kısırılık genini içeren mutant bitkilerin haploid kallus ve bitki oluşturmalarını kaydetmektedirler.

Dunwell (1976) anter kültüründen elde edilen başarı konusunda genotipler arasında farklılık bulunduğunu önemle vurgulamakta ve bu farklılığın genotiplerin farklı içsel aminoasit profillerine sahip oluşundan kaynaklandığını ileri sürmektedir.

Heberle-Bors (1983) ise, androjenetik kapasitenin bitki genotipinde atipik polen (embriyogenik polen) bulunma oranıyla yakından ilişki içinde bulunduğunu belirtmektedir.

Abak (1983 b ve c), Avrupa orijinli biberlerde anter kültürü için kullanılan besin ortamında Türkiye orijinli

biber çeşitlerinin cevap vermediğini; ancak ortamdaki şeker miktarınının 3-4 katına, demir içeriğinin de iki katına çıkartılmasıyla Türk biber genotiplerinde anter kültürüne cevap alınabildiğini bildirmekte, genotipler arası farklılıklara dikkati çekmektedir.

Tuberosa ve ark. (1987), değişik ülkelerden toplanan sekiz farklı patlıcan çeşidi ve bunların arasında yapılan melezlemelerden elde edilen 16 melez genotipte anter kültürü yapmışlar ve embriyo oluşum oranlarını belirlemişlerdir. Ebeveynlerde en yüksek 17.3 embriyo/100 anter elde eden araştırmacılar, bazı melez genotiplerde 42.0 embriyo/100 anter sayısına ulaşmışlardır. Araştırmadaki ilginç bir bulgu da, **Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982)** tarafından anter kültürüne çok iyi yanıt verdiği bildirilen Fransız çeşidi "Dourga"nın açık arazide yetişen bitkilerinden embriyo elde edilememiş olmasıdır. Araştırmacılar, donör bitkilerin serada veya açık arazide yetiştirilmesinin genotip etkisinin ortaya çıkmasında önemli rol oynadığını, Dourga'nın serada yetişen bitkilerinden çok az da olsa (2.3 embriyo/100 anter) embriyo elde edilebildiğini bildirmektedirler.

Benzer bir sonuç **Rotino ve ark. (1987 b)** tarafından da elde edilmiştir. Bu araştırmacılar da Dourga çeşidinden olumlu yanıt alamamışlar ve genotip farklılığının anter kültüründeki başarıyı etkileyen önemli bir faktör olduğunu vurgulamışlardır.

3. MATERYAL ve METOD

Araştırma 1986-1991 yıllarında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde yürütülmüş, ancak çalışmaların bir bölümünde Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü olanaklarından da yararlanılmıştır. Değişik patlıcan genotiplerinde anter kültürü yoluyla haploid embriyo oluşumu üzerine sıcaklık şokları ve besin ortamı bileşimi gibi bazı uyarıcı faktörlerin etkileri araştırılmıştır. Bunların yanında farklı koşullarda yetiştirilen donör bitkilerin ve polen gelişme dönemlerinin androgenesis üzerindeki etkileri de incelenmiştir.

3.1. Materyal

Çalışmada yer alan denemelerde toplam 13 değişik patlıcan çeşidi kullanılmıştır. İlk iki denemede iki adet F1 hibrit (Baluroi F₁, Prelane F₁) ve iki yerli açık döllenmiş çeşit (Pala, Kemer) kullanılmıştır. Daha sonra yine yabancı kökenli açık döllenmiş bir çeşit olan Dourga denemelerde devreye sokulmuş, III. ve IV. denemelerde Baluori F₁, Pala ve Kemer çeşitleriyle birlikte yer almıştır. V. Deneme bir çeşit denemesi olduğundan dört yeni genotipten (Halep Karası, Adana Topağı, Birecik Yerlisi, Black Beauty) izole edilen anterler kültüre alınmışlardır. VI. Denemede fazla çeşit yetiştirilmekle birlikte yalnızca düşük sıcaklık koşullarında tomurcuk oluşturabilen dört yabancı hibrit çeşitten anter izole edilebilmiştir. Bu çeşitler Baluroi F₁,

Galine F₁, Fabina F₁ ve Marfa F₁'dir. Sıcaklık şoku uygulamalarının yer aldığı VII. Deneme'de ise Baluroi F₁, Dourga, Pala ve Kemer çeşitlerinin yanında Galine F₁, Fabina F₁, Halep Karası ve Adana Topağı çeşitleri de kullanılmıştır.

VIII. Denemede ise yedi değişik patlıcan genotipi yer almış, Fabina F₁, Galina F₁, Baluroi F₁, Halep Karası, Adana Toprağı, Pala ve Şeytan patlıcan çeşitleri anterleri kültüre alınmıştır.

Bitkilerin hem Ankara'da hem de Adana'da yetiştirilmesi ve denemelerin bu iki ilde yürütülmesi, zaman içerisinde bazı yeni çeşitlerin ülkeye girmesi ve yetiştiriciliğin artması, başlangıçta düşünülmeyen bu çeşitlerin devreye sokulması ile özellikle Adana'da yöre ekolojisine çok uygun bazı çeşitlerden çok sayıda çiçek tomurcuğu elde edilebilmesi gibi nedenlerle çeşit sayısı artmıştır. Ancak bununla birlikte dört esas çeşidin (Baluroi F₁, Dourga, Pala ve Kemer) tüm denemelerde yer almasına gayret edilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

Çalışmanın yürütüldüğü yıllar içerisinde bitkilerin yetiştirilmesi aşamasında aynı yöntemler izlenmiş, sadece tohum ekim zamanı ve bitkilerden tomurcukların toplanarak kültüre alınma zamanları farklı olmuştur. Tohumlar 2/3 toprak + 1/3 yanmış elenmiş ahır gübresi karışımından oluşan harçla doldurulmuş 20x30 cm boyutlarındaki plastik kasalara

ekilmişlerdir. Çimlenmeden sonra bitkiler ikişer adet gerçek yaprak oluşturduklarında önce polietilen torbalara şaşırtılmış, 5-6 yapraklı devreye ulaştıklarında da serada veya açık arazide hazırlanan yetiştirme parsellerine dikilmişlerdir. Dikimden sonra bitkilere normal bakım işlemleri uygulanmıştır. Yetiştiricilik sırasında bitki sağlığını korumak için zararlılara karşı düzenli ilaçlamalar (Basudin, DDVP) yapılmıştır.

I. ve II. Deneme'lerde yer alan bitkilerin tohumları Şubat 1986'da ısıtılan seradaki kasalara ekilmişlerdir. Bu bitkilerin yetiştirildiği serada şubat ve mayıs ayları arasında yapılan günlük rasatlar sonucunda bu süre içerisinde sera içi gündüz sıcaklığının 20-33°C'ler arasında değiştiği; gece sıcaklığının genellikle 18-27°C ler arasında bulunduğu belirlenmiştir (Anonymous, 1986). Isıtılan serada 70x40 cm aralık ve mesafe ile hazırlanan esas yerlerine 25 Mart'ta şaşırtılan patlıcan bitkilerinden mayıs ayı başından itibaren çiçek tomurcukları toplanarak denemelerde kullanılmıştır.

III. ve IV. Deneme'lerde kullanılan bitkilerin tohumları 15 Mart 1989'da ısıtılmayan cam serada kasalar içerisine ekilmiştir. 10 Mayıs 1989' da açık arazide hazırlanan parsellere 80 cm sıra arası, 40 cm sıra üzeri mesafe bırakılarak dikilmişlerdir. Temmuz ayının başından itibaren çiçek tomurcukları toplanmaya başlanmıştır.

V. Deneme'de kullanılan tomurcuklar ise tohumları şubat ayında ekilerek mart sonunda seradaki yerlerine dikilen ve Adana'da yetiştirilen bitkilerden alınmıştır. Tomurcuklar haziran ayı içerisinde toplanmıştır.

VI. ve VII. Deneme'lerde kullanılan bitkilerin tohumları 25 Eylül 1989'da Adana'da ısıtılmayan cam seralardaki kasalara ekilmişler, kasım ayının 20'sinde yine serada hazırlanan parsellere 70 x40 cm aralık-mesafe bırakılarak dikilmişlerdir. VII. Deneme'de kullanılan tomurcuklar Şubat 1990'da, VII. Deneme'de kullanılan tomurcuklar ise nisan ayı içerisinde toplanarak anterler izole edilmiş ve kültüre alınmışlardır.









VIII. Deneme'de yer alan bitkilerin tohumları 1990 yılı Ekim ayı başında yine Adana'da ısıtılmayan cam seradaki kasalara ekilmiş, Kasım ayının sonunda aynı serada bir önceki yetiştirme tekniği kullanılarak bitkiler yetiştirilmiştir. Nisan 1991 ayı içerisinde bu bitkilerden alınan tomurcuklardan anterler çıkartılarak denemelerde kullanılmıştır.

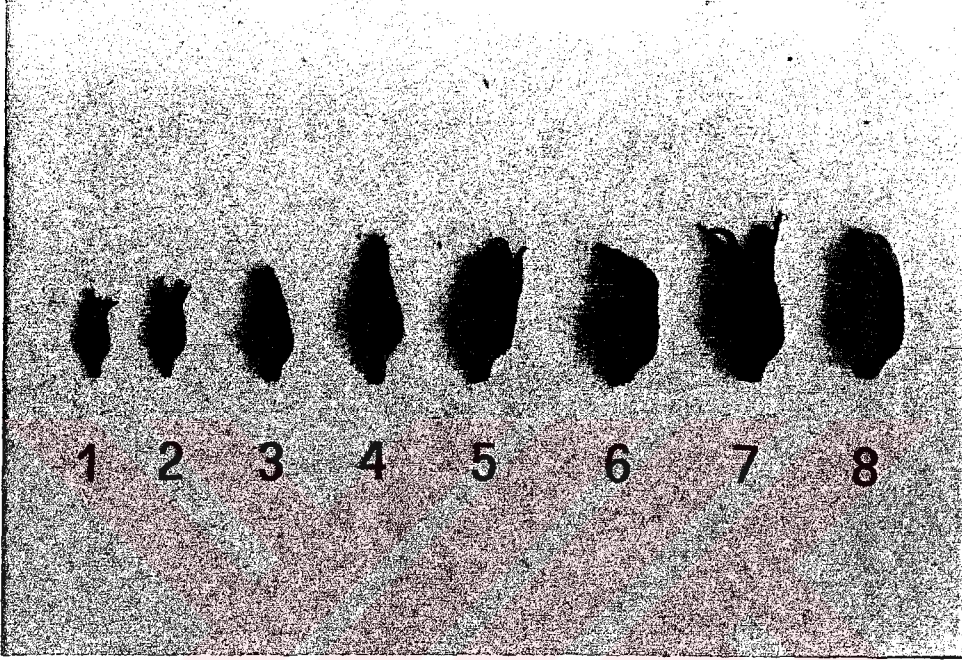
3.2.2. Çiçek tomurcuklarının gruplandırılması

Farklı büyüklüklerdeki çiçek tomurcuklarının içerisinde bulunan anterlerin gelişme aşamalarını belirleyebilmek amacıyla tomurcuklar önce kendi aralarında morfolojik özelliklerine göre gruplandırılmışlardır.

Dört farklı patlıcan çeşidinde (Baluroi F₁, Prelane F₁, Pala ve Kemer) morfolojik özelliklerine göre sekiz gruba ayrılan tomurcukların ve anterlerin büyüklükleri ile görünüşleri bir çizelge halinde gösterilmiştir (**Çizelge 3.1**). Sekiz farklı gelişme dönemine ayrılan çiçek tomurcuklarının görünüşleri de **Şek. 3.1**'de olduğu gibidir.

Çizelge 3.1. Sekiz farklı gelişme dönemine ayrılan dört değişik patlıcan çeşidinin morfolojik özellikleri

Tomurcuk Gelişme Dönemi	Çeşitler	Tomurcuk Boyu (mm) (a)	Tomurcuk Çapı (mm) (b)	Tomurcuk Görünümü (cv.Bal.F1)	Tomurcuk Özellikleri
1	Baluroi F ₁ Prelane F ₁ Pala Kemer	10.0±1.2 10.2±0.8 9.6±1.4 10.8±0.4	5.2±0.3 5.0±0.7 6.0±0.2 5.4±1.0		Tomurcuklar küçük ve kapalı anter rengi çok açık yeşil
2	Baluroi F ₁ Prelane F ₁ Pala Kemer	15.5±0.7 15.0±1.1 14.5±1.2 15.2±1.5	7.0±0.8 7.4±0.4 7.8±0.2 7.0±0.5		Tomurcuklar kapalı, uç kısımlarında hafif dilimlilik başlamış, anterler sarımsı yeşil
3	Baluroi F ₁ Prelane F ₁ Pala Kemer	17.3±1.8 18.1±0.6 16.8±1.2 17.7±1.4	8.4±0.6 8.2±0.3 9.1±0.4 8.6±0.7		Tomurcuklarda çok hafif açılma var, ancak çanak yaprakların ucu açılmadan taç yapraklar görünmüyor anterler sarı yeşil
4	Baluroi F ₁ Prelane F ₁ Pala Kemer	22.5±0.3 20.8±1.0 19.6±1.4 22.9±0.8	10.1±1.0 10.3±1.2 9.6±1.2 10.4±0.7		Taç yapraklar hafifçe görünmeye başlamış, anterler yeşilimsi sarı
5	Baluroi F ₁ Prelane F ₁ Pala Kemer	24.7±0.5 23.4±0.6 22.4±1.1 24.5±1.6	11.0±1.8 10.8±0.9 10.1±1.3 11.7±0.4		Çanak yapraklar açılmak üzere, taç yapraklar birleşme yerine gelmek üzere, anterler yeşilimsi sarı
6	Baluroi F ₁ Prelane F ₁ Pala Kemer	24.3±1.2 24.1±0.4 23.6±1.0 24.6±1.2	12.5±1.5 11.7±1.6 11.9±1.3 12.4±0.7		Taç yapraklar, çanak yaprakların birleşme yeri seviyesinde ve hafifçe görünüyor, anterler yeşil sarı
7	Baluroi F ₁ Prelane F ₁ Pala Kemer	20.4±2.7 23.2±1.6 20.1±2.0 20.8±1.7	13.6±1.0 12.7±1.2 13.4±0.4 13.8±0.6		Taç yaprakların seviyesi çanak yaprakların birleşme noktasını geçmiş, çanak yaprak uçları kıvrılmış anterler sarı
8	Baluroi F ₁ Prelane F ₁ Pala Kemer	23.4±1.3 24.3±1.2 22.6±1.0 24.0±0.7	13.9±1.3 13.2±1.6 13.1±0.4 14.7±0.2		Tomurcuklar patlamak üzere taç yapraklar pembe, anterler koyu sarı, kenarları mor çizgili



Şekil 3.1. Morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılan tomurcukların görünüşleri (cv. Baluroi F₁).

3.2.3. Sitolojik yöntemler

3.2.3.1. Mikrospor gelişme dönemlerinin belirlenmesi

Morfolojik şekillerine ve büyüklüklerine göre sınıflandırılan anterlerdeki mikrosporogenesis aşamalarını belirlemek amacıyla sitolojik gözlemler yapılmış, bu amaçla iki yöntemden yararlanılmıştır: parafin yöntemi ve asetokarmin yöntemi. Örneklerin dehidrasyonu aşamasında

kullanılan ksilol+alkol serileri, Algan (1981)'a uyularak hazırlanmış; diğer işlemler, Johansen (1940)'a göre yürütülmüştür. Dehidrasyon işleminden geçirilen farklı gelişme dönemlerindeki anterlerin parafine doyurulması amacıyla ilk aşamada 45°C de eriyen parafin kullanılmış; daha sonraki günlerde 57-60°C sıcaklıkta eriyen parafinle doyurma işlemi tamamlanmıştır. Parafine gömülen ve tahta bloklar üzerine yapıştırılan anterlerden Rotary mikrotom ile 10µ kalınlığında enine kesitler alınmıştır. Gliserin-albümin sürülmüş lamlara yapıştırılan kesitler, Johansen (1940)'de belirtilen Heidenhain demir hematoksilin tekniği kullanılarak boyanmışlardır. Boyama işleminden sonra preparatlar Kanada balsamı veya Entellan kullanılarak 24x32 mm boyutlarındaki lamellerle kapatılmışlar ve sabit preparat haline getirilmişlerdir.

Asetokarmin yönteminde örnekler önce Farmer tesbit çözeltilisinde (3 kısım alkol: 1 kısım glasiyal asetik asit) 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiş, bu sürenin sonunda % 70'lik etil alkol içinde birkaç kez çalkalandıktan sonra yine % 70'lik alkol doldurulan küçük cam şişelere konmuş ve bu şekilde saklanmışlardır. Elçi (1982)'ye göre hazırlanan % 1'lik asetokarmin ile boyama yapılacağı zaman, anterler bir lam üzerine konarak ok uçlu iğne ve pens yardımıyla mikrosporlar serbest hale getirilmiş ve bir damla asetokarminle karıştırılmışlardır. Lamel kapatıldıktan sonra preparatın üzerine bir kurutma kağıdı konarak bastırılmış ve 3-4 kez ispirto ocağında kaynatmadan ısıtılmıştır. Boyama işlemi tamamlanan preparatta mikröskopla gözlem yapılmıştır.

3.2.3.2. Kök ucunda kromozom sayımı

Kromozom sayımlarında Feulgen ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Anterlerden elde edilen bitkicikler serada dış koşullara alıştıırıldıktan sonra 7x7 cm boyutlarındaki küçük plastik saksılardan daha büyük saksılara şaşırılırken kök uçları kesilerek doymuş α -monobromonaftalin çözeltisine konmuşlardır. 16 saat süreyle bu çözeltide tutulan kök uçları daha sonra glasiyal asetik asite alınarak bu kez 30 dakika süreyle bekletilmişlerdir. Elçi (1982)'nin önerdiği biçimde % 70'lik etil alkole aktarılarak burada saklanan kök uçları, boyanmadan önce musluk suyunda 3 kez beşer dakika yıkanmış ve 60°C sıcaklıktaki etüvde 1 N Hidroklorik asitte 12 dakika bekletilmiştir. Feulgen ile boyanan kök uçlarının boyanması ve preparatların hazırlanmasında Elçi (1982) ve Sevimay (1986)'ın önerdikleri yöntem izlenmiştir. Araştırmacıların belirttiği biçimde boyada bir saat tutulan kök uçlarının koyu kırmızı-menekşe renkte boyanan kısımlarından preparatlar yapılmıştır. Bu amaçla kökün ucundaki 2-3 mm'lik kısmı jiletle kesilmiş, lam üzerine damlatılmış % 45'lik asetik asit damlası içinde parçalanarak dağıtılmış ve lamel kapatılmıştır.

3.2.3.3. İncelemelerin yapılması ve fotoğrafların çekimi

Hem parafin yöntemiyle hem de asetokarminle hazırlanan preparatlarda incelemeler ışık mikroskobunda yapılmıştır. Mikroskoptan çekilen fotoğraflar için 25 ASA'lık renkli veya siyah-beyaz Kodak Pan film kullanılmıştır. Mikroskoptan yapılan fotoğraf çekimlerinde preparatlar $45 \times 2.5 \times 1 = 112.5$ kez büyütülmüştür.

3.2.4. In vitro kültürler

3.2.4.1. Kullanılan genel yöntemler

3.2.4.1.1. Besin ortamlarının hazırlanması

Denemelerde kullanılan temel besin ortamının kompozisyonu Çizelge 3.2'de verilmiştir. Ortamın mineral madde bileşimlerinin seçiminde Chambonnet (1985)'ye uyularak patlıcan anter kültüründe en iyi sonuç verdiği bildirilen besin ortamı esas alınmıştır.

Çizelge 3.2. Patlıcanda anter kültürü için kullanılan besin ortamı

<u>Makro elementler (mg/l)</u>	(C ortamı)	(R ortamı)
	<u>İlk dikim ortamı</u>	<u>Sasırtma ortamı</u>
KNO ₃	2150	2150
NH ₄ NO ₃	1238	1238
MgSO ₄ .7H ₂ O	412	412
CaCl ₂ . 2H ₂ O	313	313
KH ₂ PO ₄	142	142
Ca (NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	50	50
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	38	38
(NH ₄) ₂ SO ₄	34	34
KCl	7	7
 <u>Mikro elementler (mg/l)</u>		
MnSO ₄ . H ₂ O	22.130	20.130
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	3.625	3.225
H ₃ BO ₃	3.150	1.150
KI	0.695	0.330
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.188	0.138

CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.016	0.011
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.016	0.011

Vitaminler ve Aminoasitler (mg/l)

Meso-inositol	50.300	50.300
Pyridoxine HCl	5.500	5.500
Nicotinique acid	0.700	0.700
Thiamine HCl	0.600	0.600
Ca-pantothenat	0.500	0.500
Vit.B ₁₂	0.030	-
Biotin	0.005	0.005
Glycin	0.100	0.100

Fe-selat (mg/l)

Na ₂ EDTA	18.65	18.65
FeSO ₄ . 7H ₂ O	13.90	13.90

Agar (Difro-Bacto) (g/l)	8	8
pH	5.8	5.8

Besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılan % 100 saf kimyasal maddelerin önce stok çözeltileri hazırlanmıştır. Organik maddelerin x100'lük stok çözeltileri -20°C'de derin dondurucuda, inorganik tuzların x10'lük stok çözeltileri +2 ve +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Bu koşullarda çözeltilerde biyolojik bulaşmaların kontrolü

başarılı olarak yapılabilmektedir (Street, 1973). Dikim yapılmasından bir gün önce stok çözeltilerden gerekli miktarlar alınıp karıştırılmış ve sulandırılarak esas besin ortamı hazırlanmıştır.

Ortamların pH'sı, agar ve şeker katılmasından önce 1 N HCl ve 1 N NaOH ile, patlıcan anter kültüründe olumlu sonuçlar verdiği bildirilen (Dumas ve Vaulx ve Chambonnet, 1982) ortamlardaki değer olan 5.8 olacak şekilde ayarlanmıştır. İlk dikim ortamındaki şeker miktarı ile büyüme düzenleyicilerin kullanım dozları, farklı uygulama gruplarında değişik düzeylerde tutulmuştur. Bu nedenle ilgili değerler 3.2.4.2. No.'lu bölümde verilmiştir.

Birbiri ardına yürütülen besin ortamı bileşimleri ile ilgili denemelerin tümü, anterlerin ilk dikimlerinin yapıldığı ve 12 gün boyunca üzerinde kaldıkları "C ortamı" içeriğindeki değişiklikler ile sınırlandırılmıştır.

Dikimden 12 gün sonra anterlerin transfer edildiği şaşırtma ortamı bileşimi ise tüm uygulamalarda sabit tutulmuştur. "R ortamı" olarak adlandırılan (Dumas de Vaulx ve Chambonnet, 1982) ortamda oksin bulunmamakta ve 0.10 mg/l Kinetin yer almaktadır. Bu ortamda şeker miktarı düşük düzeyde tutulmuş, % 3 oranında sakkaroz kullanılmıştır.

Mineral madde, vitamin, aminoasit ve büyüme düzenleyici karışımları tamamlanarak pH'sı ayarlanan ortamın sıcaklığı 80°C civarında iken şeker ve agar eklenmiş, ısıtma sırasında erlenmayerlerdeki ortamlar elektromanyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak içerisindeki

maddelerin erimeleri ve ortama eşit olarak dağılmaları sağlanmıştır. Bundan sonra erlenmayerlerin ağız alüminyum folye ile kapatılarak otoklava yerleştirilmiştir. **Gautheret (1959) ve Street (1973)**'e uyularak otoklavda sterilizasyon işlemi 121°C de 15 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir.

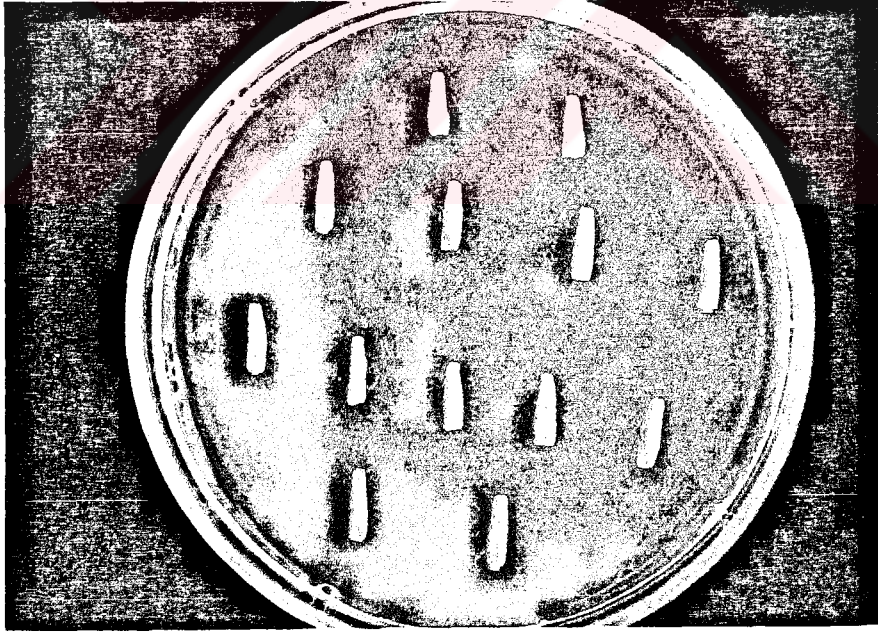
Kültüre alma işleminde kullanılan 8 cm çapındaki cam petri kapları, besin ortamlarından önce otoklavda 125°C de bir saat süreyle tutularak sterilize edilmiş ve izolasyon kabininde soğumaya bırakılmıştır. Besin ortamları, otoklavdan çıkarıldıktan sonra steril kabin içerisinde ve aseptik koşullarda, her bir petri kabına yaklaşık 10 ml düşecek şekilde doldurulmuştur. Ortamlar, petri kapları içerisinde 15-20 dakika kadar bekleyince agarın etkisiyle jel kıvamına ulaşmış ve dikime hazır hale gelmiştir.

Anterlerden gelişen bitkiciklerin geliştirilmesi için ise herhangi bir büyüme düzenleyici madde içermeyen, % 2 oranında sakkaroz ilave edilmiş, **Murashige ve Skoog (1962)** ortamı kullanılmıştır. Karışımları tamamlanıp pH'ları 5.7'ye ayarlanan, şeker ve agarı katıldıktan sonra kaynatılan ortamlar; 2.5x10 cm boyutlarındaki cam tüplere 10'ar ml doldurulmuş ve tüplerin ağız cam kapak ile kapatılmıştır. Tüplere eşit şekilde dağıtılan ortamlar sterilizasyon işleminden sonra dikime hazır hale getirilmişlerdir.

3.2.4.1.2. Anterlerin çıkartılması ve dikim

Polen embriyogenesi için en uygun mikrospor gelişme dönemine sahip anterleri içeren çiçek tomurcukları, birkaç

damla Tween 20 eklenmiş % 20'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 15 dakika süreyle dezenfekte edilmiş, daha sonra üç kez beşer dakika süreyle steril saf su ile durulanmıştır. Anterler, çiçek tomurcukları içerisinden bistüri ve kıvrık uçlu bir pens yardımıyla çıkartılmıştır. Anterlerin tomurcuktan çıkartılması sırasında hiçbir şekilde zedelenmemesine özen gösterilmiş, filamentler de dikkatlice kesilerek anterlerden uzaklaştırılmıştır. Anterler tomurcuktan çıkarıldıktan sonra bekletilmeden ince uçlu bir pens yardımıyla besin ortamı üzerine, dorsal yüzeyi ortamla temas edecek biçimde ve ortama batırılmaksızın yerleştirilmiştir. Şekil 3.2.'de dikim işlemi tamamlanmış bir petri kabı ve içerisinde henüz kültüre alınmış anterler görülmektedir.



Şekil 3.2. Tomurcuklardan izole edilerek besin ortamlarına dikilen anterlerin görünüşü

Her petri kabına iki adet çiçek tomurcuğundan çıkan anterlerin tümü dikilmiş, bu sayı 12 ila 15 arasında değişmiştir. Dikim işlemi tamamlanan petri kaplarının kapak kenarları ince plastik film şeritlerle kapatılmış ve dış atmosferle ilişkileri kesilmiştir. İzolasyon ve dikim aletleri çalışma sırasında sık sık önce % 96'lık etil alkole batırılarak ve hemen ardından aleve tutularak sterilize edilmişlerdir.

3.2.4.1.3. Kültür koşulları

Farklı şok uygulamalarının denendiği VII. Deneme grubundakiler hariç, dikim işlemi tamamlanan petri kaplarının tümü Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982) ve Chambonnet (1985)'ye uyularak + 35°C sıcaklığa ayarlanmış karanlık etüve yerleştirilmiştir. Kültürler burada 8 gün boyunca bekletilmişler, bu sürenin sonunda 25°C \pm 1.5' de kontrol edilen iklim odasına alınmışlardır. İklim odasındaki fotoperiyodik düzen 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Floresan lambaların ışık kaynağı olarak kullanıldığı odada, petri kaplarının tek sıralı olarak yerleştirildiği seviyedeki ışık şiddeti 2000 Lux değerinde ölçülmüştür. Bu koşullarda 4 gün daha bekletilerek dikimden sonra 12. gününü tamamlayan kültürler, yeniden laboratuvara getirilmiş, anterler hazırlanan şaşırtma ortamlarına (R) steril koşullarda transfer edilmişlerdir. R ortamına şaşırtılan anterler, iklim odasında aynı koşullarda gelişmeye bırakılmışlardır.

3.2.3.1.4. Elde edilen bitkilerin dış şartlara adaptasyonu

Tüplerde gelişmelerini tamamlayarak genç bitkicik görünümünü alan materyal, dış koşullara alıştırmak üzere tüplerden çıkartılıp saksılara dikilmiştir. Bu amaçla 7 cm çapında ve 7 cm yüksekliğindeki plastik saksılardan yararlanılmıştır. Saksılar 2/6 toprak + 1/6 yanmış elenmiş ahır gübresi + 3/6 torf ile hazırlanan yeni bir harçla doldurulmuştur. Harç, dikimden önce otoklavda 125°C de 1.5 saat tutularak sterilize edilmiştir. İlk sulama, steril saf su ile yapılmış, daha sonraki sulamalarda musluk suyu kullanılmıştır.

Dikimi yapılan saksılar gündüz sıcaklığı 20-25°C arasında değişen, gece sıcaklığı minimumu 15°C olan seraya, 10 dakikada bir kez olmak üzere ince zerrecikler halinde su püskürten "mist propagation" altına yerleştirilmişlerdir. Canlılığını sürdüren bitkiler bir hafta sonra buradan alınarak seranın bir başka köşesine yerleştirilmiş ve gelişmelerine devam ettirilmiştir.

3.2.4.1.5. Değerlendirme

Doku kültürlerinde kullanılan materyalin sayıları eşit olmadığı için çoğunlukla istatistiksel değerlendirme yapılamamaktadır. Bu çalışmada da aynı nedenle istatistiki analizler yapılamamış, değerlerin ortalamalarının veya oransal (%) değerlerinin verilmesiyle yetinilmiştir.

Tomurcuk büyüklükleri ve anter uzunlukları ile ilgili sayısal değerlerin yorumlanması ve standart sapmalarının hesaplanmasında **Düzgüneş (1963)** ve **Karman (1971)**' dan yararlanılmıştır.

Çalışmada esas olarak embriyo ve bitki oluşumu üzerinde durulmuştur. Bu nedenle gözlemlerde anterlerin gelişim oranı (%), embriyo oluşum oranı (%) gibi özelliklere dikkat edilmiştir.

Kültüre alınan anterler içerisinde hacim olarak genişleyen, renkleri sarımsı beyaz veya açık kahverengine dönüşen anterlerin geliştiği kabul edilmiş; kıvrılarak koyu kahverengine dönüşen, yumuşayan ve hafif büzülen anterler ise ölü anter olarak nitelendirilmiştir. **Chambonnet (1985)**'in de yaptığı gibi gelişen anterlerin sayısı, kültüre alınan anter sayısına bölünüp 100 ile çarpılarak % gelişme oranı hesaplanmıştır. Anterlerin duvarını çatlatarak dışarıya çıkan ve görülebilir duruma gelen embriyoların oluşum oranlarının hesaplanmasında da benzer bir yol izlenmiş; bu amaçla oluşan embriyo sayısı, kültüre alınan anter sayısına bölünmüş ve 100 ile çarpılmıştır. Böylece % embriyo oluşum oranı bulunmuştur.

Tam bitki haline dönüşen embriyoların kültüre alınan anter sayısına bölünmesiyle elde edilen değerlerin 100 ile çarpılması bitki oluşum oranını vermiştir.

% oranlarının belirlenmesinde, enfeksiyona uğrayan petrillerdeki anter sayıları düşüldükten sonra, enfektesiz anter sayıları esas alınmıştır.

Kallus oluşumunun besin ortamı yapısına göre değişiklik göstermesi, bazı ortamlarda yoğun kallus ortaya

çıkmasıyla denemelerde kallus oluşum şiddeti de değerlendirilmiştir. Ortalama 1 cm çapında kallus oluşturan kombinasyonlara "+", 1-2 cm çapında kallus oluşturanlara "++", 2 cm'den fazla kallus oluşturanlara ise "+++" işareti verilmiştir. Hiç kallus oluşumu göstermeyenler ise "-" işareti ile gösterilmiştir.

3.2.4.2 Deneme gruplarında yapılan farklı uygulamalar

3.2.4.2.1. I. Denemede yapılan uygulamalar

Değişik gelişme dönemlerinde bulunan patlıcan çiçek tomurcuklarındaki anterlerin içerisinde yer alan mikrosporların gelişimi bir yandan sitolojik olarak incelenirken, diğer yandan her gelişme dönemine ait anterler gruplandırılmış ve Chambonnet (1985) tarafından önerilen besin ortamına dikilerek burada *in vitro* gelişmeleri incelenmiştir.

Denemede yer alan Boluroi F₁, Prelane F₁, Pala ve Kemer çeşitlerine ait tomurcuklar, morfolojik görünümüne ve büyüklüklerine göre sekiz gruba ayrılmışlardır. Her çeşitten ve gelişme döneminden 30'ar adet tomurcuk alınmış; tomurcuklardan çıkarılan anterler steril koşullarda petri kaplarındaki ortamların üzerine yerleştirilmişlerdir.

3.2.4.1.3. No.'lu Bölüm'de açıklanan normal prosedüre uyularak inkübasyon koşullarında bekletilen kültürlerde anterlerin renk değişimleri, şişme veya kallus oluşturma durumları gözlenmiştir.

3.2.4.2.2. II. Denemede yapılan uygulamalar

Bir önceki denemede yer alan Baluroi F₁, Prelane F₁, Pala ve Kemer patlıcan çeşitlerinin en uygun gelişme dönemindeki tomurcukları toplanarak, bu denemede kullanılmıştır. Besin ortamı olarak Chambonnet (1985)'nin önerdiği temel besin ortamı esas alınmış; ancak büyüme düzenleyicilerin ve şekerin düzeyinde değişiklikler yapılmıştır. Kinetin ve 2,4-D'nin birlikte kullanıldığı ortamlarda iki farklı dozda (0.01 ve 5.0 mg/l) Kinetin ile yine iki değişik dozda (0.01 ve 5.0 mg/l) 2,4-D kombine edilmiştir. Ayrıca her hormon kombinasyonu iki farklı sakkaroz düzeyi (30 ve 120 g/l) ile çeşitlendirilmiştir.

Her uygulama grubu için çeşitlerden ayrı ayrı 10'ar adet tomurcuk toplanmış ve izole edilen anterler besin ortamlarına dikilmişlerdir. Tek çekirdekli mikrospor dönemi veya 1. polen mitozundan hemen önceki dönemde bulunan mikrosporları içeren anterlerin kullanıldığı bu denemede embriyo oluşumunun olup olmadığı gözlenmiş ve embriyo oluşum oranlarını belirlemek amaçlanmıştır.

3.2.4.2.3. III. Denemede yapılan uygulamalar

Ön deneme niteliğinde gerçekleştirilen ilk iki denemenin sonunda; bundan sonraki denemelerde Baluroi F₁, Pala ve Kemer çeşitlerinin yanında dördüncü çeşit olarak Dourga'nın kullanılmasına karar verilmiştir.

Bu denemede ilk dikim ortamına katılan farklı dozlardaki Kinetin ve 2,4-D'nin embriyo oluşumu üzerindeki

etkileri incelenmiştir. Bu amaçla 0.2, 1.0 veya 5.0 mg/l dozunda Kinetin içeren ortamlar, yine aynı düzeylerdeki 2,4-D ile çeşitlendirilmiş ve böylece ortaya çıkan dokuz farklı hormon kombinasyonunun anterlerin gelişme oranları, kallus oluşum şiddeti, embriyo ve bitki oluşumu üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

3.2.4.2.4. IV. Denemede yapılan uygulamalar

Patlıcan anter kültüründe besin ortamına katılan aktif kömürün polen embriyogenesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılan bu denemede önceki denemelerde en iyi sonucu veren 5 mg/l Kinetin + 5 mg/l 2,4-D ve 120 g/l sakkaroz içeren besin ortamına % 1 oranında aktif kömür eklenmiştir. Anterlerin bir kısmı, agarla jel haline getirilmiş aktif kömürlü ortamlara direkt temas edecek biçimde dikilmiş, bir diğer uygulama grubunda ise çift fazlı sistem diye adlandırılan yöntem uygulanmıştır. Bunun için % 1 oranında aktif kömür katılan ve agarla katılaştırılan ortamın üzerine, aynı bileşimde fakat aktif kömür ilave edilmeyen sıvı ortamdan 10 ml kadar eklenmiştir. Anterler bu sıvı ortam içerisinde yüzer durumda kültüre alınmıştır.

Baluroi F₁, Dourga, Pala ve Kemer patlıcan çeşitlerine ait anterlerin kullanıldığı denemede; anterlerdeki gelişme durumları izlenerek kaydedilmiştir.

3.2.4.2.5. V. Denemede yapılan uygulamalar

III. Deneme'de iyi sonuç alınan Kinetin + 2,4-D kombinasyonunu (5+5 mg/l) içeren besin ortamına (C₈), dört

adet yeni patlıcan genotipine ait anterler dikilmiş ve bunların gelişmeleri ile embriyo oluşturma durumları incelenmiştir. Yeni genotiplerden üç tanesi yerli (Halep Karası, Adana Topağı, Birecik Yerlisi) ve birisi de yabancı (Black Beauty) patlıcan çeşididir. Denemede aynı besin ortamı üzerinde kültüre alınan değişik genotiplerin anterlerinde kallus oluşumu, gelişme oranları ve embriyo oluşumu ile bitkiye dönüşüm durumları belirlenmiştir.

3.2.4.2.6. VI. Denemede yapılan uygulamalar

Düşük sıcaklık ve kısa gün koşullarında yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerin polen embriyogenesi üzerindeki etkisini belirleyebilmek amacıyla Şubat 1990 döneminde Adana'da ısıtılmayan seralarda yetiştirilen bitkilerden toplanan tomurcuklar bu denemede kullanılmıştır.

Donör bitkinin yetiştiği koşulların yanında ortama katılan değişik düzeylerdeki oksin ve sitokinlerin haploid embriyo oluşturma yönündeki etkilerini belirlemeyi amaçlayan bu denemede sitokin olarak Kinetin ve Zeatin, oksin olarak da yalnızca 2,4-D kullanılmıştır. Her üç hormon da 0.2, 1.0 veya 5.0 mg/l dozlarında kullanılarak dokuz adet Kinetin x 2,4-D ve dokuz adet Zeatin x 2,4-D kombinasyonu oluşturulmuştur. Böylece 18 değişik hormon kombinasyonunun temel besin ortamı aynı kalmak koşuluyla patlıcanda *in vitro* androgenesis üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Ortamlardaki şeker konsantrasyonu % 12 oranında sakkaroz olarak sabit tutulmuştur.

Bu denemede dört yabancı patlıcan çeşidi (Baluroi F₁, Galine F₁, Fabina F₁ ve Marfa F₁) kullanılmış; yerli genotiplerden Halep Karası, Adana Topağı, Pala, Kemer ile bir yabancı genotip (Dourga), serin koşullarda yeterli çiçek tomurcuğu oluşturamadıkları ve oluşan tomurcuklarda da anterlerin canlı olmaması nedeniyle denemede yer alamamıştır.

Denemede yer alan çeşitlerden, her bir ortam bileşimi için 20'şer adet aynı gelişme döneminde tomurcuk toplanmış; anterler steril şartlarda izole edilerek ortamların üzerine yerleştirilmişlerdir.

Kültüre alınan anterlerde inkübasyon süresi boyunca gelişme durumları, kallus oluşturma veya embriyo oluşum durumları ile renk değişimleri gözlenerek kaydedilmiştir.

3.2.4.2.7. VII. Denemede yapılan uygulamalar

Anterlerin kültüre alınmasını izleyen ilk 4 veya 8 günlük dönemdeki farklı sıcaklıkların anter gelişimi ve embriyo oluşumu üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için serada yetiştirilen bitkilerden Nisan 1990 ilkbahar döneminde toplanan tomurcuklardan çıkartılan anterler, embriyo ve bitki oluşumu sağlayan tek ortam olan C₈ kodlu ortam üzerine yerleştirilmişlerdir. Dikimi yapılan petri kaplarından bir kısmı 25°C'ye bir kısmı 30°C'ye ve diğer bir kısmı da 35°C'ye ayarlanan karanlık etüvlere konmuşlardır. Bu sıcaklıklarda 4 veya 8 gün süreyle bırakılan kültürlerden uygulama süresi tamamlananlar 25°C'deki fotoperiyodik ışıklanmaya sahip iklim odalarına

alınmışlardır. Burada 12. gününü tamamlayan anterler, daha sonra "R" transfer ortamına şaşırılmışlardır:

Bundan başka, kültüre alınmadan önce tomurcuklara soğuk şoku uygulanması halinde androgenesisin olumlu yönde etkilenip etkilenmediğini belirlemek amacıyla bir de soğuk şoku uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla tomurcuklar +4°C deki buzdolabında 12, 24 veya 48 saat süreyle ağız alüminyum folye ile kapatılmış cam beherlerde bekletilmişlerdir. Uygulama sonunda tomurcuklardan anterler çıkartılarak ortamlara yerleştirilmiş ve petriler +35°C'de karanlıkta 8 gün boyunca tutulmuşlardır. Diğer işlemlerde **Chambonnet (1985)**'nin yöntemi izlenmiş ve normal prosedüre uyulmuştur.

Sıcaklık şoku denemelerinde Baluroi F₁, Dourga, Pala ve Kemer çeşitlerinden başka 4 genotip daha (Galine F₁, Fabina F₁, Halep Karası, Adana Topağı) yer almıştır. Her genotipten her bir uygulama grubu için 15-20 adet tomurcuk kullanılmıştır.

Adana'da yapılan bu uygulamalardan sonra, haziran sonu, temmuz başında, Ankara'da yetiştirilen bitkilerde oluşan tomurcuklar alınmış, yüksek sıcaklık şokları yinelenerek denenmiştir. Bu kez denemelerde sadece Baluroi F₁, Dourga, Pala ve Kemer çeşitleri kullanılmıştır.

Bu denemelerin değerlendirilmesinde de diğerlerinde olduğu gibi anterlerdeki gelişme oranı, kallus oluşturma, embriyo oluşturma gibi özellikler dikkate alınmıştır.

3.2.4.2.8. VIII. Denemede yapılan uygulamalar

Ardarda yapılan ve beklenen sonuçlara ulaşılamayan uygulamalarda, yöntemden kaynaklanabilecek bazı

yetersizliklerin olabileceği düşüncesiyle kullanılan büyüme düzenleyicilerinde ve şeker içeriğinde bazı değişiklikler yapılması yoluna gidilmiştir. Başka ülkelerde elde edilen bazı yeni bulguların (Rotino ve ark., 1987 a ve b) ışığı altında hazırlanan ortamlarda mineral madde ve vitamin içerikleri sabit tutulmuş, şeker ve hormon katkılarında değişiklikler yapılmıştır. Ayrıca bazı ortamlara % 1 oranında aktif kömür de ilave edilmiştir. Yedi farklı bileşime sahip ortamların içerikleri aşağıda olduğu gibidir (Çizelge 3.3.)

Çizelge 3.3. VIII. Denemede yer alan besin ortamlarında değişik düzeylerde kullanılan maddelerin miktarları ve ortamların kodları

Maddeler	Ortam kodu						
	A	B	C	D	E	F	G
Kinetin (mg/l)	5	5	5	5	5	5	5
2.4-D (mg/l)	-	5	5	-	5	-	-
NAA (mg/l)	5	-	-	5	-	5	5
Sakkaroz (g/l)	120	120	60	60	120	120	60
Glukoz (g/l)	-	-	63	63	-	-	63
Aktif kömür (%)	-	-	-	-	1	1	1

Denemede yedi patlıcan genotipine ait anterler kullanılmıştır. Bunlardan üç tanesi yabancı kökenli olup F₁ hibrit çeşittir (Fabina F₁, Galine F₁, Baluroi F₁). Halep Karası, Adana Topağı, Pala ve Şeytan adlı yerli patlıcan

genotipleri ise denemede yer alan diğer çeşitleri oluşturmuştur. Her çeşitten, her uygulama grubu için eşit sayıda anter kullanılmaya gayret edilmiş, 10'ar adet tomurcuktan çıkarılan anterler ortamlar üzerine yerleştirilmiştir.

Deneme sonuçları, anter gelişim oranları ve embriyo oluşumu yönünden değerlendirilmiştir.



4. SONUÇLAR

4.1.Mikrospor Gelişme Dönemlerinin Belirlenmesi

Morfolojik özelliklerine göre sekiz grupta toplanan değişik gelişme aşamalarındaki tomurcuklara ait anterlerdeki mikrospor gelişim dönemlerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden birincisi parafin yöntemidir. Farklı büyüklüklerdeki anterlerin enine kesitlerinden elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

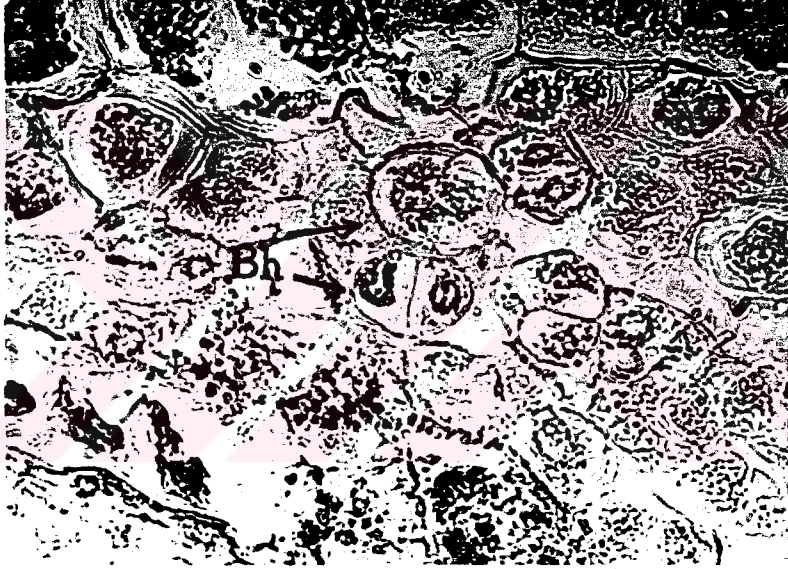
Tanımları 3.2.2'de yapılan tomurcuk gelişme aşamalarından 1 no'lu olana ait anterlerde yapılan gözlemlerde yalnızca mikrospor ana hücrelerine rastlanmıştır. Anter duvarındaki arkesporial tabakanın içeriye doğru verdiği hücrelerin oluşturduğu "primer sporogen tabaka" tarafından meydana getirildiği bildirilen



Şekil 4.1.Birinci aşama tomurcuklarındaki anterlerde mikrospor ana hücresi (Ma)

(Yentür, 1982) diploid yapıdaki mikrospor ana hücrelerinin, koyu bir hücre çeperine ve yine koyu renkli boyanan iri bir hücre çekirdeğine sahip olduğu görülmüştür (Şek.4.1).

İkinci aşamadaki tomurcukların anterlerinde çoğunlukla mayoz bölünme devresindeki hücreler ile bunun yanında tetrat oluşumunun ilk devrelerine rastlanılmıştır (Şek.4.2).



Şekil 4.2.İkinci aşama tomurcuklarındaki anterlerde mayoz bölünme (Bh: Bölünen hücre)

Üçüncü aşamadaki tomurcukların anterlerinden hazırlanan preparatlarda ise Şek.4.3.'de de görüldüğü gibi tetrat döneminde çok sayıda mikrospor belirlenmiştir. Ancak bunun yanı sıra bazı hücrelerde bölünmenin devam ettiği de görülmüştür.



Şekil 4.3.Üçüncü aşama tomurcuklardaki anterlerde tetrat döneminde mikrosporlar (Te)

Dördüncü aşamadaki tomurcukların anterlerinde yapılan sitolojik incelemelerde birbirinden ayrılmak üzere dört adet mikrospor içeren gelişmiş tetratlar ile bunların yanısıra tek çekirdekli haploid yapıdaki serbest hale geçmiş mikrosporların bulunduğu belirlenmiştir (Şek.4.4).

Beşinci aşama tomurcuklarında ise serbest durumda çok sayıda tek çekirdekli mikrospor bulunmuş, ancak bunun yanında, tetratlara da rastlanmıştır (Şek.4.5).

Altıncı gelişme dönemindeki tomurcukların anterlerinde 1. polen mitozu aşamasının değişik devrelerindeki mikrosporlar (Şek.4.6), yedinci aşamada ise iki çekirdekli genç polen taneciklerinin hakim olduğu (Şek.4.7) belirlenmiştir. Sekizinci aşamadaki tomurcuklarda çoğunlukla olgun polen tanecikleri saptanmıştır.



Şekil 4.4. Dördüncü aşama tomurcuklarındaki anterlerde, tetrat'ın son devreleri (Te:tetrat, Ms: tek çekirdekli mikrospor)



Şekil 4.5. Beşinci aşama tomurcuklarındaki anterlerde serbest kalmış tek çekirdekli mikrosporlar ve tetratlar (Ms: tek çekirdekli mikrosporlar, Te: tetrat)

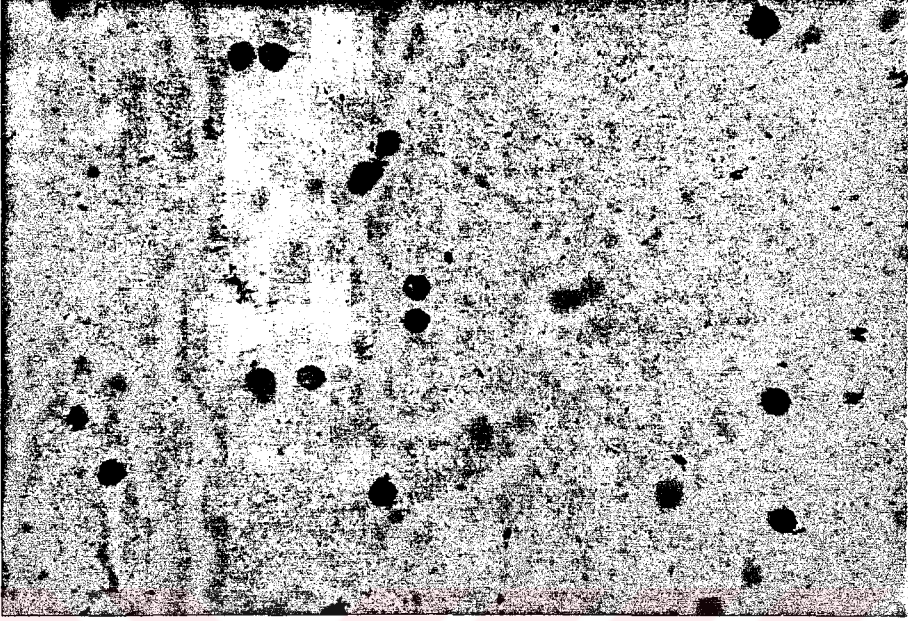


Şekil 4.6. Altıncı aşama tomurcuklarındaki anterlerde
1. polen mitozu devresindeki mikrosporlar
(Pm: polen mitozu)

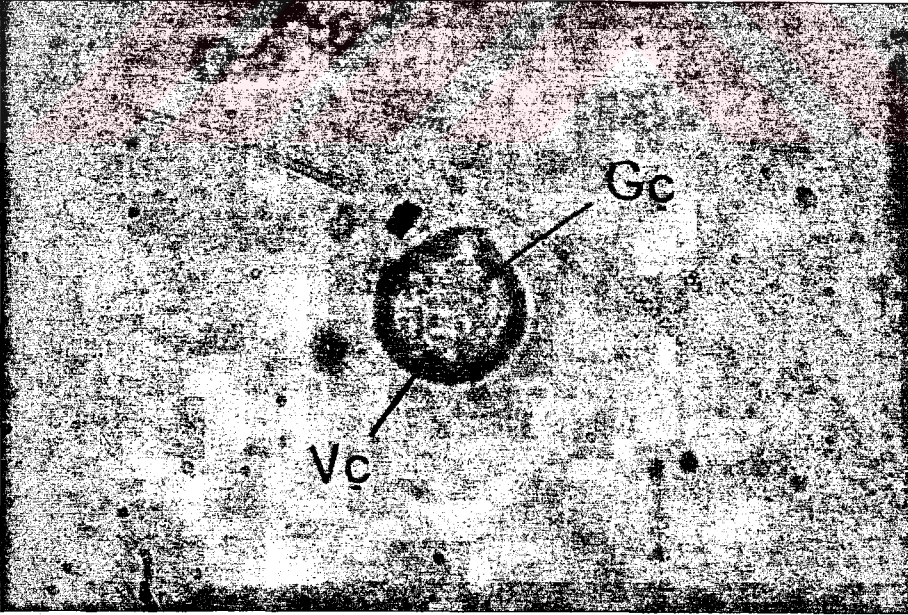


Şekil 4.7. Yedinci aşama tomurcuklarındaki anterlerde
iki evcikli genç polen tanecikleri (İp: iki
çekirdekli genç polen)

Parafin yöntemi ile gelişme aşamaları belirlenen tomurcuklarla aynı gelişme döneminde bulunan tomurcuklardan izole edilen anterlerin kültüre alınmasından sonra, elde edilen bulgular (Bölüm 4.2), anter kültürü için en elverişli dönemin 1. polen mitozundan hemen önceki dönem (5.dönem) olduğunu göstermiştir. Bu dönemdeki tomurcukların ortalama 23.8 ± 1.0 mm uzunluğunda ve 10.9 ± 1.2 mm genişliğinde olduğu belirlenmiştir. Ancak bu ölçümlerin yapıldığı çeşitler uzun meyve şekline sahip olduklarından birbirlerine yakın değerler vermişlerdir. Oysa ki Galine F₁ çeşidinde meyve şekli yuvarlak oval olduğundan tomurcuklar da daha kısa boylu ve geniş olmaktadır. Her çeşitteki morfolojik dönem ile mikrospor gelişme dönemi arasındaki ilişkinin belirlenerek kültüre alınacak tomurcukların seçilebilmesi için daha çabuk sonuç veren asetokarmin ile boyama yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla kültürü yapılacak her çeşitte, morfolojik olarak elverişli dönemlere yakın görülen büyüklükteki tomurcuklar toplanarak anterlerindeki mikrospor gelişme dönemleri incelenmiştir. Tek çekirdekli mikrosporların yoğun olarak bulunduğu morfolojik tomurcuk gelişme dönemi Dourga çeşidi hariç diğerlerinde birbirine çok benzer bulunmuş; taç yaprakların seviyesinin çanak yaprakların dilimlendiği noktaya ulaştığı ancak tam olarak görülmediği dönemde anter içerisinde çok sayıda mikrospor görülmüştür (Şek.4.8). Dourga çeşidinde ise bu morfolojik yapıdaki tomurcuklarda henüz tetrad döneminde mikrosporların bulunduğu belirlenmiş; taç yaprakların çanak yaprakların dilimlendiği noktayı 2-3 mm geçtiği aşamada tek çekirdekli mikrosporların yoğunluğunun arttığı görülmüştür.



Şekil 4.8. Aseto-karmin ile boyanmış tek çekirdekli mikrosporlar



Şekil 4.9. Vegetatif ve generatif çekirdekleri görülen bir polen tanesi (Vç: vegetatif çekirdek, Gç: generatif çekirdek)

ASIM
2004

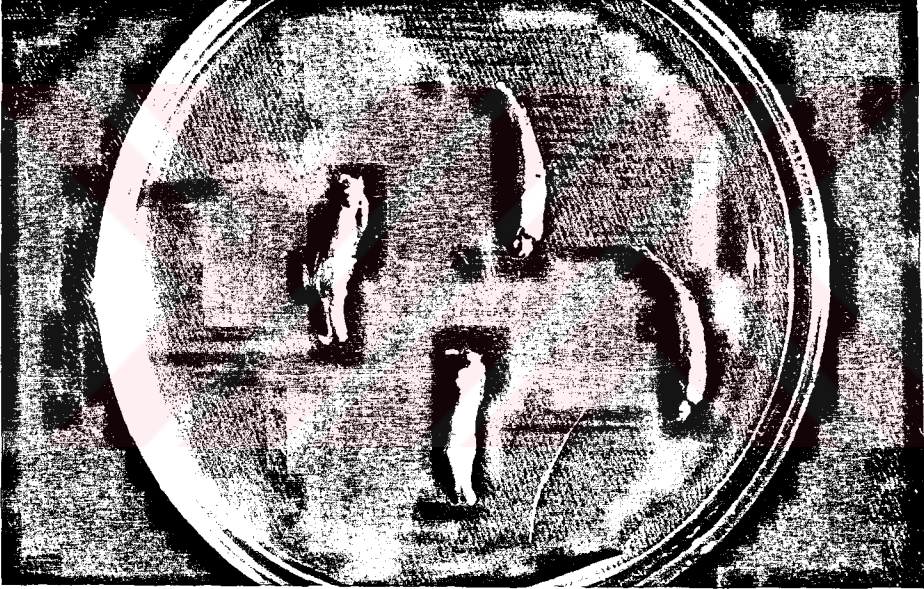
Aseto-karmin boyama yöntemi, parafin yöntemi kadar net ve açık görüntüler vermemekle birlikte, mikrospor gelişim evrelerinin belirlenmesinde yeterli sonuçlar sağlayabilmektedir. Örneğin Şek.4.9'da vegetatif ve generatif çekirdekleri ayırdedilebilen genç bir polen tanesi görülmektedir.

4.2. I.Deneme Sonuçları

Dört değişik patlıcan genotipine ait sekiz farklı büyüklükteki tomurcuklardan çıkarılan anterlerin besin ortamı üzerindeki gelişmeleri incelenmiştir. Denemede kullanılan çeşitlerin 1, 2 ve 3. tomurcuk gelişme dönemindeki anterlerinin hiçbiri 35°C'de 8 gün bırakıldıkları inkübasyon koşullarında gelişme göstermemişlerdir. Bu anterler, ilk iki gün içerisinde kararmışlardır. Tomurcuklardan çıkarıldıklarında beyaz-yeşil veya sarımsı yeşil renkte olan genç anterlerin kültür ortamında verdikleri yanıtta benzer olarak 7. ve 8. gelişme dönemindeki tomurcuklardan alındıklarında sarı veya koyu sarı renge sahip olan anterler de dikimden sonra 35°C deki etüve konulduktan birkaç saat sonra kararmaya başlamışlardır. İlk iki gün içerisinde bu anterler herhangi bir gelişme göstermeksizin kararmış ve uç kısımlarından yukarıya doğru kıvrılmışlardır.

Bir önceki bölümde (4.1.1) içerisinde değişik yoğunluklarda tek çekirdekli veya 1. polen mitozundan hemen önceki aşamada mikrosporları bulunduğunu belirlenen 4, 5 ve 6. tomurcuk gelişme dönemindeki anterlerin bir kısmı, besin

ortamına dikildikten sonra 35°C'deki sıcaklık uygulaması sırasında şişmeye başlamıştır. Bu gruptaki anterlerin bazıları sıcaklık şoku süresince ve kültürün ilerleyen inkübasyon aşamalarında renklerini kaybetmemiş ve açık sarı olan renklerini korumuş, ancak büyük çoğunluğu kahverengine dönüşmüştür. Şek.4.10' da kültüre alındıktan sonra şişerek gelişen, kahverengine dönüşen ve androgenik bir yapı gösteren anterler görülmektedir.



Şekil 4.10. Beşinci gelişme dönemindeki tomurcuklardan izole edilerek kültüre alınan ve gelişen androgenetik anterler (cv. Baluroi F₁).

1., 2., 3., 7. ve 8. gelişme dönemlerindeki anterlerin ilk günlerde nekroze olması ve gelişmemesi nedeniyle R ortamı üzerine yalnızca, 4., 5. ve 6. gelişme devresine ait anterler şaşırtılmıştır.

Baluroi F₁, Prelane F₁, Pala ve Kemer patlıcan çeşitlerinin tomurcuklarından alınan 4, 5 ve 6. gelişme dönemindeki anterlerin besin ortamındaki gelişme durumlarına ilişkin değerler **Çizelge 4.1**'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.Dört değişik patlıcan genotipinde 4, 5 ve 6. gelişme dönemindeki tomurcuklardan alınan anterlerin besin ortamı üzerindeki gelişme oranları

Çeşitler	Tomurcuk gelişme dönemi	Dikilen Anter Sayısı	Gelişen Anter Sayısı	Gelişme Oranı (%)	Kallus Oluşumu	Oluşan Embriyo sayısı	Embriyo Ol.Or. (%)
Baluroi F ₁	4	172	21	12.2	+	0	0.0
	5	161	48	29.8	+	0	0.0
	6	180	36	20.0	++	0	0.0
Prelane F ₁	4	153	18	11.8	+	0	0.0
	5	164	31	18.9	+	0	0.0
	6	178	36	20.2	+	0	0.0
Pala	4	130	14	10.8	+	0	0.0
	5	166	35	21.1	++	0	0.0
	6	142	16	11.3	++	0	0.0
Kemer	4	157	22	14.0	+	0	0.0
	5	163	37	22.7	++	0	0.0
	6	160	48	30.0	++	0	0.0

Çizelgeden de izlenebileceği gibi 5 ve 6. gelişme dönemindeki tomurcuklar, 4. gelişme dönemindeki tomurcuklardan daha fazla sayıda "gelişen anter yüzdesi"ne sahip olmuşlardır. 4. dönemdeki tomurcuklardan alınan

anterler, tüm çeşitlerin ortalaması itibariyle % 12.2 oranında gelişme göstermişlerdir. Bu değer 5. gelişme dönemindeki tomurcuklardan alınan anterlerde % 23.1 olarak bulunurken, 6. gelişme döneminde biraz azalmış ve % 20.4 olmuştur.

Çeşitlerin meyve şekline göre tomurcuk büyüklükleri veya uzunlukları arasında farklılıklar olmakla birlikte, genel olarak taç yaprakların seviyesinin çanak yaprakların birleşme yerinde olduğu 5. gelişme dönemi ile çanak yaprakların hafifçe açılmaya başladığı ve taç yaprakların 1-2 mm'lik kısmının görüldüğü dönem olan 6. gelişme dönemi, patlıcan anter kültürü yoluyla haploid embriyo elde etmek için en uygun dönemler olarak görünmüştür.

Çiçeklenme başladıktan bir ay kadar sonra bitkilerin yaşlanmasıyla birlikte, tomurcuk fenotipine bakılarak yapılan tomurcuk seçiminin zaman zaman yanıltıcı olduğu gözlenmiştir. Taç yapraklar ile çanak yaprakların birleşme yerinin aynı seviyede olduğu durumda toplanan bazı tomurcukların daha ileri gelişme aşamasındaki anterlere sahip olduklarına rastlanmıştır. Benzer bir durum, bitkinin aynı noktasından çıkan ikincil tomurcuklarda da gözlenmiştir. Bu gibi durumlar veya besin ortamına dikim aşamasında yapılacak ikinci bir seleksiyon için ayırdedici kriter olarak "anter rengi"nin göz önünde bulundurulabileceği belirlenmiştir. Yapılan gözlemlerde yeşilimsi-sarı renkteki anterlerin kültür koşullarında gelişme gösterdikleri; sarımsı-yeşil renktekilerin henüz erken dönemde oldukları, sarı veya koyu sarı renkli anterlerin ise genç polenlere sahip olan geç dönemde

buldukları gözlenmiştir. Erken veya geç dönemde bulunan anterler kültüre alındıklarında çok daha az yanıt vermektedirler.

4.3. II.Deneme Sonuçları

İkinci denemede, ilk denemede yer alan dört patlıcan çeşidinin anter kültürü için en uygun olarak belirlenen gelişme dönemindeki tomurcukları seçilerek, anterler değişik hormon ve şeker kombinasyonlarına sahip ortamlara dikilmişlerdir. Kinetin, 2,4-D ve sakkarozun ikişer farklı dozunu içeren sekiz değişik besin ortamına dikilen anterler arasından sadece Baluroi F₁ çeşidine ait olan anterlerden haploid embriyo ve bitki edilebilmiştir. Çizelge 4.2.'de besin ortamlarının hormon ve şeker bileşimleri, dikilen anter sayıları ile yalnızca Baluroi F₁ çeşidindeki embriyo ve bitkiye dönüşüm sayıları ve oranları gösterilmiştir.

C₁ ve C₂ ortamları üzerinde tüm çeşitlerde anterlerin bir kısmında şişme meydana gelmiştir. Anterlerin bazılarının yan kısımlarında çatlama olduğu, bir kısmının ise kıvrılıp siyahlaştığı görülmüştür. Hormonların düşük düzeyde tutulduğu bu ortamlarda kallus oluşumu çok az miktarda ortaya çıkmıştır.

C₃ ve C₄ no'lu ortamlarda sarı-kahverengi renk alan anterlerin bir kısmında şişme meydana gelmiş, özellikle sakkarozun 120 g/l dozunda kullanıldığı C₄ ortamında anterler patlayarak oluşan kallus dokusu dışarıya taşmıştır.

C₅ ortamında yeşilimsi renkteki anterler dikkati çekmiştir. Aynı durum C₆ ortamında da gözlenmiştir. Yoğun

Çizelge 4.2. Sekiz farklı ortamda kültüre alınan dört değişik patlıcan genotipinde dikilen anter sayıları ve Baluroi F1 çeşidinde embriyo ve bitki oluşum oranları

Ortam Kodu	Ortamdaki maddeler			Dikilen anter sayıları			Baluroi F1 çeşidinde (*)				
	Kin. mg/l	2,4-D mg/l	Sak. g/l	Bal.	Pre.	Pala	Kemer	Embriyo say.	Emb.ol. or. (%)	Bitki ol.	Bitki ol.or. (%)
C1	0.01	0.01	30	53	60	49	60	0	0.0	0	0.0
C2	0.01	0.01	120	58	60	52	58	0	0.0	0	0.0
C3	5.0	0.01	30	60	58	50	51	0	0.0	0	0.0
C4	5.0	0.01	120	60	60	47	60	0	0.0	0	0.0
C5	0.01	5.0	30	54	53	45	53	0	0.0	0	0.0
C6	0.0	5.0	120	60	60	43	60	0	0.0	0	0.0
C7	5.0	5.0	30	60	50	51	60	0	0.0	0	0.0
C8	5.0	5.0	120	58	51	51	60	7	12.1	4	6.9

(*) Sadece Baluroi F1 çeşidinden embriyo ve bitki oluşması nedeniyle, yalnızca bu çeşide ait değerler verilmiştir.

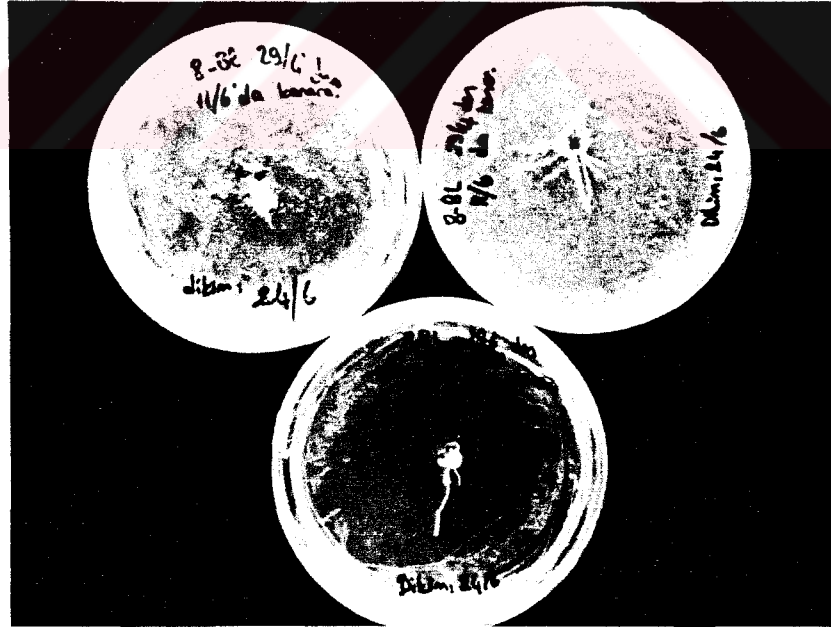
kallus oluşturan anterlerin yanında, bazı anterlerin başlangıçtaki büyüklüklerinin üç katı kadar büyüklüğe eriştikleri belirlenmiştir. Ancak hacim olarak büyüyen anterlerin iç kısımlarının boş olduğu, kallus veya embriyoya benzer bir oluşum bulundurmadıkları görülmüştür.

C7 ve C8 ortamlarında kallus oluşumu, C5 ve C6 ortamlarına göre daha az yoğun bulunmuştur. Tüm çeşitler ortalaması olarak anterlerin % 24.3'ü şişerek gelişme göstermişlerdir. Renkleri ise sarı-kahverengine dönüşmüştür. Nadiren bazı anterlerin yeşilimsi bir renkte ve kırılğan, sert bir doku şeklinde görüldükleri kaydedilmiştir. Baluroi F1 çeşidinin C8 no'lu ortam (5 mg/l Kinetin + 5 mg/l 2,4-D ve 120 g/l sakkaroz) üzerindeki anterleri içerisinden farklı petri kaplarındaki 3 adet anterinden toplam 7 adet embriyo ve embriyo benzeri yapı meydana gelmiştir. Bunlardan 2 embriyo ve 2 embriyo benzeri oluşum tek bir anterden, 1 embriyo ve 1 embriyo benzeri oluşum ikinci anterden, son embriyo ise üçüncü anterden oluşmuştur. **Şek.4.11'**de Baluroi F1 çeşidine ait anterden meydana gelerek gelişmesini sürdüren, embriyodan genç bitkiye dönüşüm aşamasında bir bitkicik görülmektedir.

Embriyo oluşan anterler incelendiğinde, bunların sarı-kahverengi ve parlak görünümlü oldukları; kallus oluşturmeyen anterlerden embriyo meydana geldiği gözlenmiştir. Embriyolar, anterlerin yan tarafında oluşan çatlama sonucunda görülebilir duruma gelmişlerdir. Anterin içinden çıktığı görülen embriyolar, steril şartlarda ortamla temas edecek pozisyona getirildikten sonra, burada bir süre geliştirilmişler, ardından da petri kaplarındaki MS ortamla-



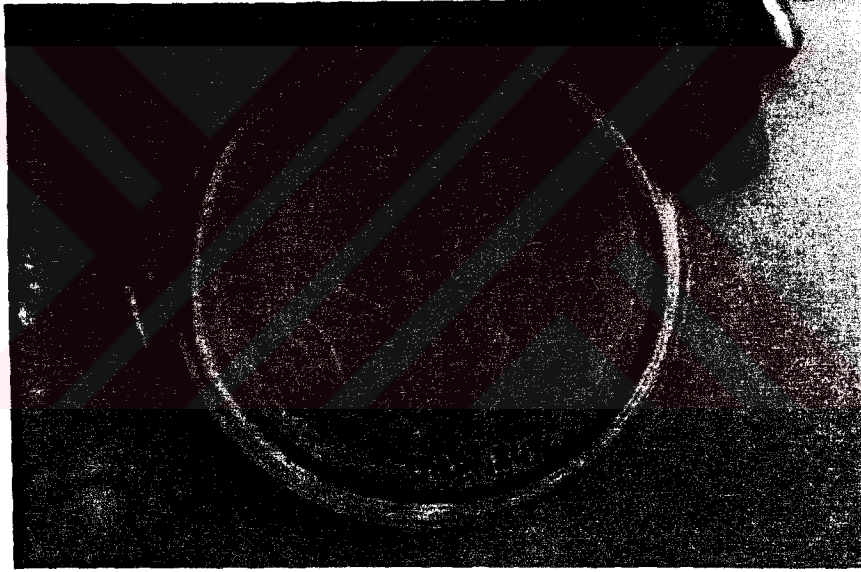
Şekil 4.11. Balouri F₁ çeşidinde anter kültürü yoluyla elde edilen bir haploid bitkicik



Şekil 4.12. Anterlerden çıkışlarından 14 gün sonra yeni ortamlara şaşırtılan ve burada gelişen haploid bitkicikler

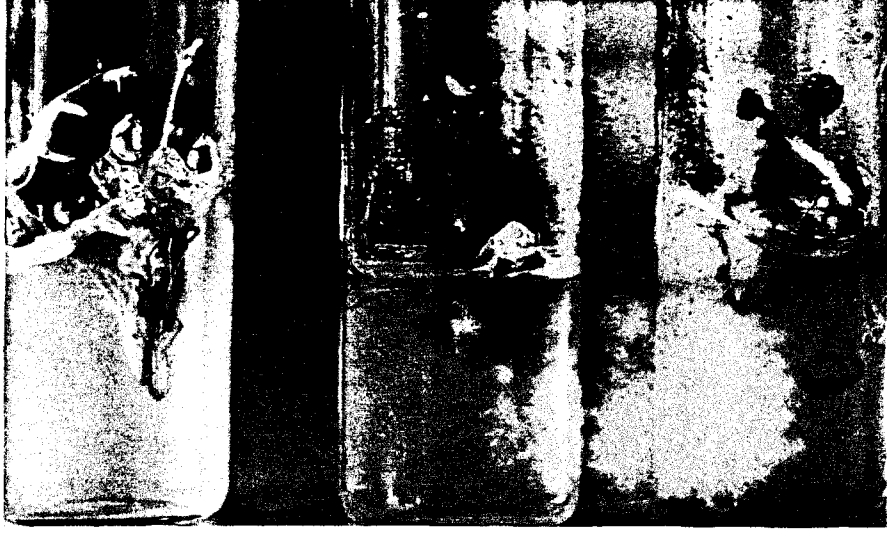
rına şaşırtılmışlardır. Şek.4.12' de anterlerden çıkışlarından 14 gün sonra petri kaplarındaki yeni ortamlara transfer edilen haploid bitkiciklerin durumu görülmektedir.

Şek.4.13' de ise MS ortamına şaşırtıldıktan üç hafta sonra bitkiciklerin gelişme durumu görülmektedir. Burada köklü ve yapraklı, sağlıklı tam bir bitki formuna dönüşen materyaller, daha sonra cam tüplere şaşırtılmışlar (Şek. 4.14), bu tüplerde geliştirilmişlerdir (Şek.4.15).



Şekil 4.13. MS ortamına şaşırtıldıktan üç hafta sonra haploid bir bitkiciğin gelişme durumu

Prelane F₁ çeşidinin anterlerinden bir tanesinde de C7 ortamında embrioid oluşumu farkedilmiş, ancak diğer ortama şaşırtılan bu doku normal bitkiye dönüşemeyerek dejenere olmuştur.



Şekil 4.14.Cam tüplere şaşırtılan bitkiciklerin gelişme durumları

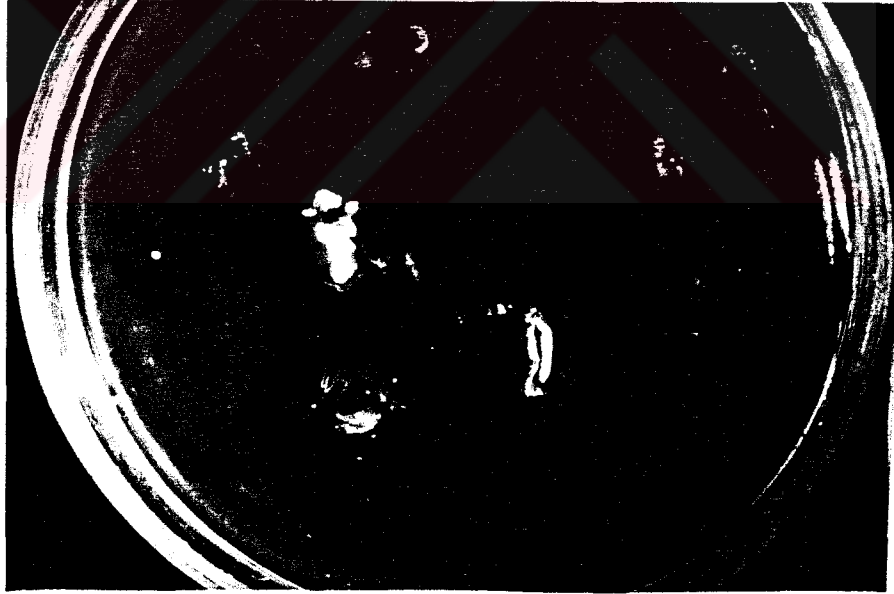


Şekil 4.15.Cam tüplerde gelişmelerinin 3. haftası içerisindeki patlıcan bitkicikleri

4.4. III.Deneme Sonuçları

Bu denemede Baluroi F₁, Dourga, Kemer ve Pala patlıcan çeşitlerinin dokuz değişik hormon kombinasyonunda anter kültürüne verdikleri yanıt incelenmiştir. Kinetin ve 2,4-D'nin üçer dozunun kombine edilmesiyle oluşturulan ortamların dört değişik genotipteki anter gelişimi ve embriyo oluşumu üzerindeki etkilerine ilişkin değerler Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

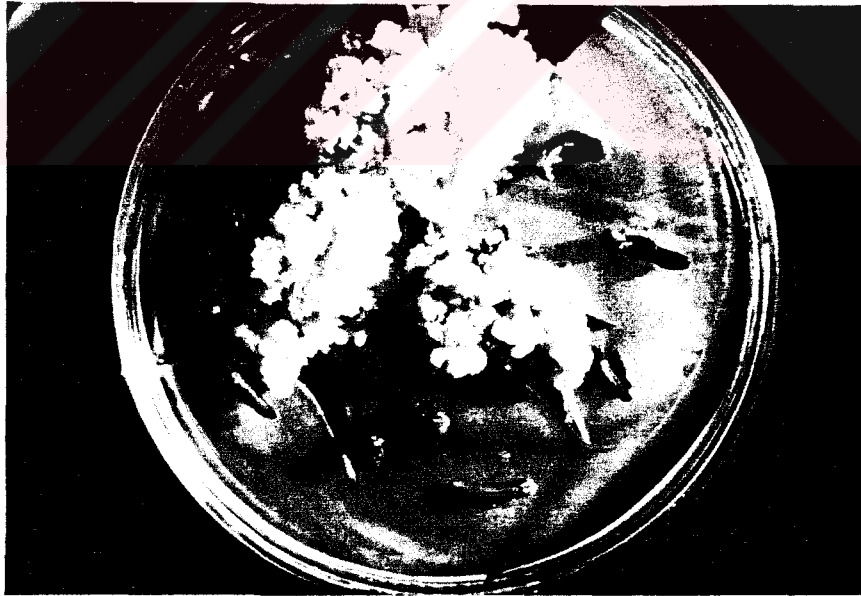
Bu denemede ilk kez Türkiye orijinli bir genotipten haploid embriyo elde etmek mümkün olmuştur. "Kemer" patlıcan çeşidinden anter kültürü yoluyla elde edilen embriyolar,



Şekil 4.16.Kemer patlıcan çeşidinde 5 mg/l Kinetin ve 1 mg/l 2,4-D kombinasyonunda oluşan embriyolar

5 mg/l Kinetin ve 1 mg/l 2,4-D katılan ortam üzerinde meydana gelmiştir. Şek.4.16'da Kemer patlıcan çeşidinde oluşan embriyolar görülmektedir.

Kemer çeşidinde farklı iki anterden oluşan iki adet embriyodan başka, Baluroi F₁ çeşidinde de yine aynı ortam üzerinde embriyo benzeri beyaz renkli oluşumlar dikkati çekmiştir. Diğer kombinasyonlara sahip ortamlarda anterler şişme ve gelişme gösterdikleri halde embriyo farklılaşması meydana gelmemiştir. Bununla birlikte özellikle kinetinin 5 mg/l dozunda kullanıldığı ortamlar üzerindeki anterler, yoğun bir kallus oluşumu gerçekleştirmişlerdir (Şek. 4.17). Denemede yer alan Dourga ve Pala çeşitlerinin anterleri hiçbir hormon kombinasyonunda embriyo meydana



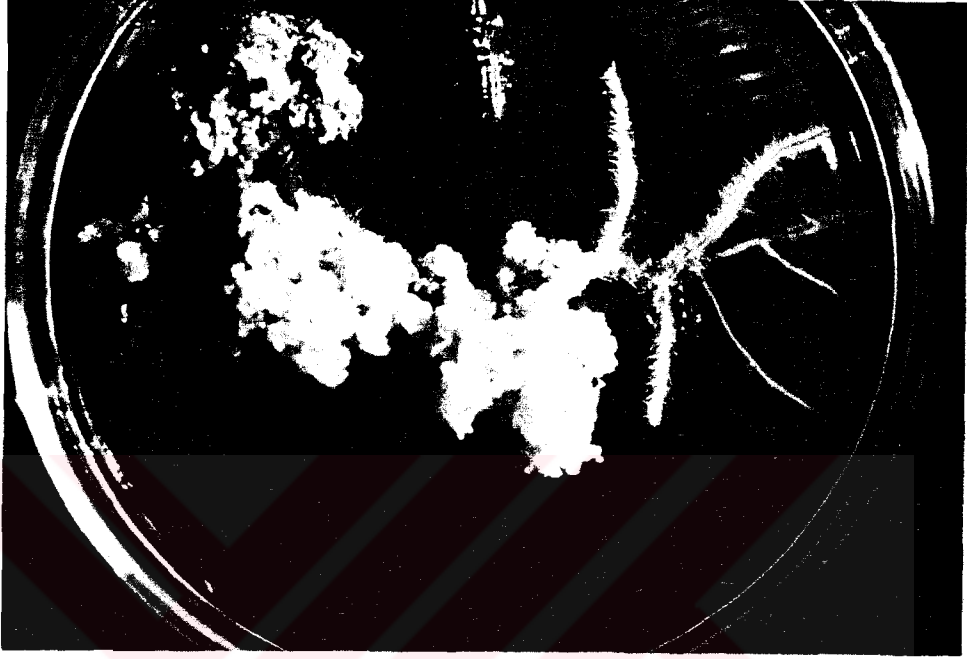
Şekil 4.17.5 mg/l Kinetin ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda Dourga çeşidinde kallus oluşumu.

Çizelge 4.3. Farklı düzeylerde Kinetin ve 2,4-D içeren ortamlarda kültüre alınan patlıcan anterlerinde gelişme oranları, kallus oluşumu, embriyo ve bitkiye dönüşüm durumları

Hormonlar Kin. 2,4-D (mg/l)	Dikilen anter sayısı		Gelişen anter sayısı		Ort. gel. Or. (%)	Kallus Oluş.	Kemer çeşidinde(*)							
	Dour. Bal. Kemer	Pala	Dour. Bal. Kemer	Pala			E.S. (n)	E.O. (%)	B.S. (n)	B.O (%)				
0.2	86	69	114	87	6	3	5.	4	5.1	+	0	0.0	0	0.0
0.2	73	102	93	95	11	4	22	5	11.6	+	0	0.0	0	0.0
0.2	95	86	109	90	3	8	6	9	6.9	++	0	0.0	0	0.0
1.0	0.2	105	73	104	65	5	24	14	15.0	+	0	0.0	0	0.0
1.0	1.0	164	85	90	93	3	0	10	4.7	++	0	0.0	0	0.0
1.0	5.0	68	90	96	90	7	29	31	24.4	++	0	0.0	0	0.0
5.0	0.2	114	122	168	104	13	36	17	15.6	+++	0	0.0	0	0.0
5.0	1.0	138	136	135	123	35	59	31	29.0	+++	2	1.5	1	0.7
5.0	5.0	105	90	116	111	18	40	57	30.5	++	0	0.0	0	0.0

(*) : Sadece Kemer çeşidinde embriyo ve bitki oluşumu meydana geldiğinden, yalnızca bu çeşide ait değerler verilmiştir.

getirmemişlerdir. Yalnızca Pala çeşidinde bir hormon kombinasyonunda (5 mg/l Kinetin ve 1 mg/l 2,4-D) kök oluşumu meydana gelmiştir (Şek.4.18).



Şekil 4.18.Pala çeşidinde kök ve yoğun kallus oluşumu
(Fk:filamentten oluşan kallus, Ak:anter-
den oluşan kallus, K: kök.)

4.5. IV.Deneme Sonuçları

Bir önceki denemede yer alan çeşitlerin anterleri, bu kez aktif kömür içeren agarlı besin ortamlarına veya çift fazlı sıvı ortama dikilmişlerdir. Çizelge 4.4.'de Baluroi F₁, Dourga, Pala ve Kemer patlıcan çeşitlerinden, iki farklı ortama dikilen anter sayıları gösterilmiştir.

Aktif kömür içeren agarlı ortama dikilen patlıcan anterleri, çeşitler arasında davranış farkı göstermeksizin

Çizelge 4.4. Aktif kömür katılan agarlı ve çift fazlı besin ortamları üzerinde dört farklı patlıcan çeşidi anterlerinin gelişme durumları.

Çeşitler	Dikilen Anter Sayısı		Gelişen Anter Sayısı	
	Agarlı A.kömür ortamı	Çift fazlı A.kömür ortamı	Agarlı A.kömür ortamı	Çift fazlı A.kömür ortamı
Baluroi F ₁	121	161	0	0
Dourga	132	124	0	0
Kemer	98	96	0	0
Pala	114	95	0	0

kültürün ilk günlerindeki sıcaklık uygulaması sırasında şişme veya gelişme gibi değişiklikler göstermemişler ve başlangıçtaki büyüklükleri kadar kalmışlardır. Anterlerin tümü kahverengi-siyah bir renk almıştır. Şaşırtma ortamına transfer etmek amacıyla pens ile dokunulduğunda anterlerin yumuşadığı ve canlılıklarını kaybettikleri görülmüştür. Bu duruma benzer olarak agarla katılaştırılmış aktif kömürlü ortam üzerine eklenen sıvı besin ortamına yerleştirilerek dikimden sonra sıcaklık uygulamasına tabi tutulan anterler de, uygulamanın henüz birinci gününde kararmış ve canlılıklarını yitirmişlerdir.

İlk 12 günlük inkübasyon süresi sonunda canlılıklarını sürdüremeyip kararan anterler ikinci bir ortama şaşırtılmamışlardır. Bu aşamadan sonra gözlemlere son verilmiştir.

4.6. V.Deneme Sonuçları

Daha önce yapılan denemelerde embriyo ve bitki elde edilen hormon kombinasyonuna (5 mg/l Kinetin + 5 mg/l 2,4-D) sahip besin ortamında yeni bazı genotiplerin verecekleri reaksiyonları belirleyebilmek amacıyla gerçekleştirilen bu denemeden elde edilen sonuçlar **Çizelge 4.5.**'de olduğu gibidir.

Çizelge 4.5.Dört yeni patlıcan genotipine ait anterlerin gelişme ve embriyo oluşturma durumları

Çeşit.	Dikilen anter sayısı	Gelişen anter sayısı	Gelişme Oranı (%)	Kallus oluşumu	Embriyo oluşumu	Embriyo ol. or. (%)	Bitki oluşumu	Bitki ol.or. (%)
H.K.	90	24	26.7	-	7	7.8	4	4.4
A.T.	140	32	22.9	+	0	0.0	0	0.0
B.Y.	73	10	13.7	++	0	0.0	0	0.0
B.B.	86	11	12.8	+	0	0.0	0	0.0

Bu denemede yerli genotiplerden "Halep Karası", oldukça iyi performans göstermiştir. Anılan çeşitten 7 adet embriyo meydana gelmiştir. Embriyo meydana gelme oranı % 7.8 olarak belirlenen Halep Karası çeşidinden elde edilen embriyolardan 4 tanesi bitki haline dönüşmüştür. **Şek.4.19'**da Halep Karası çeşidinde oluşan embriyolar görülmektedir.

Bitkicik haline gelen gelişmiş embriyolar MS ortamı içeren cam tüplere transfer edildikten sonra bunlardan mikro çelikler alınarak çoğaltma yoluna gidilmiştir. **Şek. 4.20'**de erlenmayer içerisinde tek bir bitkicikten geliştirilen aynı



Şekil 4.19.Halep Karası çeşidinde anter kültüründe oluşan embriyo ve bitkicikler

genotipe sahip patlıcan bitkicikleri görülmektedir.

Oluşan embriyolardan 4 tanesi aynı petri kabındaki iki farklı anterden elde edilmiştir. Bunlardan birisinde üç, diğerinden bir embriyo gelişmiştir. Diğer üç embriyo ise değişik petri kaplarındaki anterlerden birer birer elde edilmiştir. Toplam 7 adet oluşan embriyolardan 3 tanesi dejenere olarak bitki haline dönüşmemiştir.

Bitkicik haline dönüşenler dış koşullara uyum sağlama aşaması başarıldıktan sonra serada kontrollü koşullarda geliştirilmiştir (Şek.4.21)



Şekil 4.20.Halep Karası çeşidinde oluşan bir embriyodan çoğaltılan bitkicikler



Şekil 4.21.Halep Karası çeşidinden anter kültürü yoluyla elde edilen bitkiler.

Bu bitkilerin morfolojik yapıları, normal kromozom yapısına sahip patlıcan bitkilerden çok farklı olmuştur. Yaprakları çok küçük, gelişmesi daha yavaş olan bitkiler çiçek açmışlar, ancak bitkilerin fertil olmadıkları görülmüştür. Tüm bu özellikleri nedeniyle bitkilerin haploid kromozom yapısında oldukları kanısına varılmıştır. Nitekim bitkilerin kök uçlarında yapılan kromozom sayımlarında da $n=12$ olduğu, bitkilerin haploid yapıda oldukları belirlenmiştir (Şek.4.22).



Şekil 4.22.Halep Karası çeşidinden anter kültürü yoluyla elde edilen bitkilerin kromozom sayıları ($n=12$).

Denemede yer alan Adana Topağı, Birecik Yerlisi ve Black Beauty çeşitlerinin anterlerinde kallus gelişimi olmuş, ancak embriyo veya benzeri bir farklılaşma sağlanamamıştır.

4.7. VI.Deneme Sonuçları

Sitokinin olarak Kinetin ve Zeatin'in, oksin olarak da 2,4-D'nin yer aldığı denemede 18 farklı hormon kombinasyonu kullanılmıştır. Dört değişik yabancı patlıcan genotipinde anter kültürü yoluyla embriyogenesi uyarmak amacıyla, dikimden sonraki 12 günlük süre için besin ortamına katılan farklı düzeylerdeki "Kinetin + 2,4-D" ve "Zeatin + 2,4-D" kombinasyonlarının haploid embriyo oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Ayrıca minimum sıcaklık ortalamasının 8.5°C ve günlük ortalama sıcaklığın 20.4°C olduğu Şubat 1990 ayında cam serada yetiştirilen donör bitkilerden alınan anterlerin, kültür koşullarındaki performanslarının belirlenmesi denemenin bir diğer amacını oluşturmuştur.

Şubat 1990 döneminde Adana'da serada yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerle yürütülen denemenin sonuçlarına ilişkin değerler Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

"Kinetin + 2,4-D" kombinasyonlarında her iki maddenin dozları, III.Deneme'de kullanılan dozlar ile aynı tutulmuştur. Böylece Baluroi F₁, Dourga, Kemer ve Pala çeşitlerinin yaz aylarında alınan tomurcukları ile gerçekleştirilen önceki deneme sonuçları ile serin koşullarda yetişen bitkilerden alınan tomurcuklardan elde edilecek deneme sonuçlarının karşılaştırılabileceği düşünülmüştür. Ancak, Baluroi F₁ çeşidinin dışında kalan diğer üç çeşidin Şubat ayında çiçek tomurcuğu oluşturmamış olmaları, az sayıda oluşan tomurcuklardaki anterlerin de

Çizelge 4.6.Dört değişik yabancı kökenli patlıcan genotipine ait anterlerin 18 farklı hormon kombinasyonundaki gelişme durumları

Hormonlar Kin. 2,4-D (mg/l)	Dikilen anter sayısı		Gelişen anter sayısı		Ortalama Gelişme Or. (%)	Kallus Oluşumu	Embriyo Oluşumu					
	Bal. Gal.	Fab. Mar.	Bal. Gal.	Fab. Mar.								
0.2	120	103	79	104	11	7	10	12	9.8	+	0	
0.2	117	92	87	100	12	9	8	7	9.1	+	0	
0.2	120	96	89	92	9	5	6	14	8.6	++	0	
1.0	101	83	102	95	12	14	12	11	12.9	+	0	
1.0	112	85	117	97	17	15	9	16	13.9	++	0	
1.0	123	83	101	90	19	22	17	21	19.9	++	0	
5.0	93	90	98	86	13	11	19	11	14.8	+++	0	
5.0	110	86	104	95	26	19	16	16	19.5	++	0	
5.0	96	81	92	101	38	26	21	20	28.4	++	0	
Zeat. 2.4-D												
0.2	87	86	120	112	4	6	8	7	6.2	++	0	
0.2	109	82	101	106	6	9	11	10	9.0	++	0	
0.2	113	97	98	98	10	11	7	8	8.8	++	0	
1.0	96	102	97	91	5	5	11	12	8.5	+++	0	
1.0	83	91	81	116	9	7	10	5	8.4	+++	0	
1.0	98	87	99	98	12	16	7	9	11.5	+++	0	
5.0	87	110	116	89	10	17	8	13	11.9	++	0	
5.0	110	104	104	97	7	9	12	7	8.5	+++	0	
5.0	83	113	113	83	14	11	10	16	13.5	+++	0	

canlı polen meydana getirme oranlarının düşük bulunması nedeniyle Dourga, Kemer ve Pala çeşitleri denemede yer alamamışlardır. Bunların yerine tomurcuk oluşumu normal olan Galine F₁, Fabina F₁ ve Marfa F₁ çeşitlerinden alınan anterler denemede kullanılmıştır.

Bu dönemde yapılan çiçek tozu çimlendirme denemelerinde Marfa F₁, Fabina F₁, Baluroi F₁, Galine F₁ çeşitlerinde canlı çiçek tozu oranlarının % 20-40 arasında bulunduğu belirlenmiştir (Abak ve Güler, 1991).

Denemede yer alan çeşitlerin anterlerinden "Kinetin + 2,4-D" kombinasyonu içeren ortamlarda embriyo elde etmek mümkün olmamıştır. Her iki büyüme düzenleyici maddenin de 5 mg/l dozunda kullanıldığı ortamda da herhangi bir farklılaşmanın olmaması nedeniyle, patlıcan bitkilerini kısa gün ve düşük sıcaklık gibi stresli koşullarda yetiştirmenin anter kültüründe polen embriyogenesisini olumlu yönde etkilemediği kanısına varılmıştır.

Anterlerdeki gelişme oranları Kinetin'li ortamlarda, Zeatin içeren ortamlara göre daha yüksek bulunmuştur. Örneğin aynı dozda 2,4-D (5 mg/l)'ye sahip ortamlardan 5 mg/l Kinetin katılında % 28.4 oranında anter gelişmesi meydana gelirken; 5 mg/l Zeatin katıldığında gelişme oranı sadece % 13.5 olmuştur. Ayrıca tüm Kinetin'li ortamlardaki ortalama anter gelişme oranı % 15.1 olarak hesaplanırken, Zeatin'li ortamlardaki ortalama anter gelişme oranı % 9.6 bulunmuştur.

Besin ortamına Zeatin katıldığında, Kinetin içeren ortamlara göre daha yoğun kallus oluşumu meydana gelmiştir. Özellikle Zeatin'in 1.0 mg/l ve 5.0 mg/l dozlarında

kullanıldığı ortamlarda anterlerin kesilmiş filament uçlarından kallus oluşmasına karşılık, anterlerin çoğunluğu canlılığını uzun süre devam ettirememiş ve kıvrılıp kurumuşlardır.

Kısa gün ve düşük sıcaklık koşullarında yetiştirilen bitkilerden alınan anterler, değişik dozlarda "Kinetin + 2,4-D" veya "Zeatin + 2,4-D" kombinasyonlarını içeren ortamların hiçbirinde, hatta 5 mg/l Kinetin + 5 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda bile normal koşullarda elde edilene benzer gelişme ve embriyo oluşumunu gerçekleştirememişlerdir.

4.8. VII.Deneme Sonuçları

Dikimi izleyen günlerde anterlerin değişik sürelerde farklı sıcaklıklarda tutulmasının androgenesis üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bu denemede dört yabancı patlıcan çeşidi (Dourga, Baluroi F₁, Galine F₁, Fabina F₁) ile dört yerli patlıcan çeşidi (Pala, Kemer, Halep Karası, Adana Topağı) yer almıştır. Üç değişik sıcaklıkta iki farklı süre boyunca tutulan ortama yeni dikilmiş anterlerin gelişme durumları Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Tüm çeşitler birlikte düşünüldüğünde 25°C'de 4 gün boyunca karanlıkta tutulan anterlerde gelişme düşük oranda (% 6.0) meydana gelmiş ve kallus oluşumu görülmemiştir. 25°C'de 8 gün karanlıkta tutulduktan sonra inkübasyona devam ettirilen anterler ise biraz daha yüksek oranda (% 7.4) şişerek gelişmişler ve bir miktar kallus oluşturmuşlardır. Dikimi izleyen günlerde anterlerin tutulduğu sıcaklığın

Çizelge 4.7. Değişik sıcaklık şoku uygulamalarının sekiz farklı patlıcan genotipinde anter gelişme oranı, kallus ve embriyo oluşumu üzerine etkileri

Çeşitler	Uygulamalar*	Dikilen anter sayısı	Gelişen anter sayısı	Gelişme or. (%)	Kallus oluşumu	Embriyo ve bitki oluşumu
Dourga	a	100	6	6.06	-	0
	b	103	4	3.9	+	0
	c	86	17	19.8	+	0
	d	111	31	27.9	++	0
	e	79	28	35.4	+	0
	f	93	39	41.9	++	0
Baluroi F1	a	132	9	6.8	-	0
	b	118	12	10.2	+	0
	c	105	11	10.5	+	0
	d	141	23	16.3	+	0
	e	109	17	15.7	++	0
	f	118	19	16.1	++	0
Galine F1	a	91	3	3.2	-	0
	b	86	7	8.1	+	0
	c	102	19	18.6	+	0
	d	86	13	15.1	++	0
	e	81	25	30.9	++	0
	f	82	30	36.6	++	0
Fabina F1	a	110	4	3.6	-	0
	b	95	10	10.5	+	0
	c	83	12	14.5	+	0
	d	91	11	12.1	++	0
	e	85	16	18.8	+	0
	f	92	23	25.0	++	0

Çizelge 4.7'nin devamı

Çeşitler	Uygulamalar*	Dikilen anter sayısı	Gelişen anter sayısı	Gelişme or. (%)	Kallus oluşumu	Embriyo ve bitki oluşumu
Kemer	a	76	3	3.9	-	0
	b	85	5	5.9	+	0
	c	81	11	13.6	+	0
	d	83	9	10.8	+	0
	e	83	15	18.1	+	0
	f	85	13	15.3	+	0
Pala	a	79	7	8.9	-	0
	b	75	5	6.7	+	0
	c	86	10	11.6	+	0
	d	80	12	15.0	+	0
	e	76	19	25.0	++	0
	f	84	24	28.6	+	0
Halep Karası	a	105	8	7.6	-	0
	b	112	9	8.0	+	0
	c	109	20	18.3	+	0
	d	121	23	19.0	++	0
	e	120	26	21.7	+	0
	f	118	40	33.9	++	0
Adana Topağı	a	85	8	9.4	-	0
	b	86	7	8.1	+	0
	c	91	12	13.2	+	0
	d	100	19	19.0	+	0
	e	92	23	25.0	+	0
	f	90	31	34.4	++	0

(*) Uygulamalar:

a: 25°C de 4 gün

b: 25°C de 8 gün

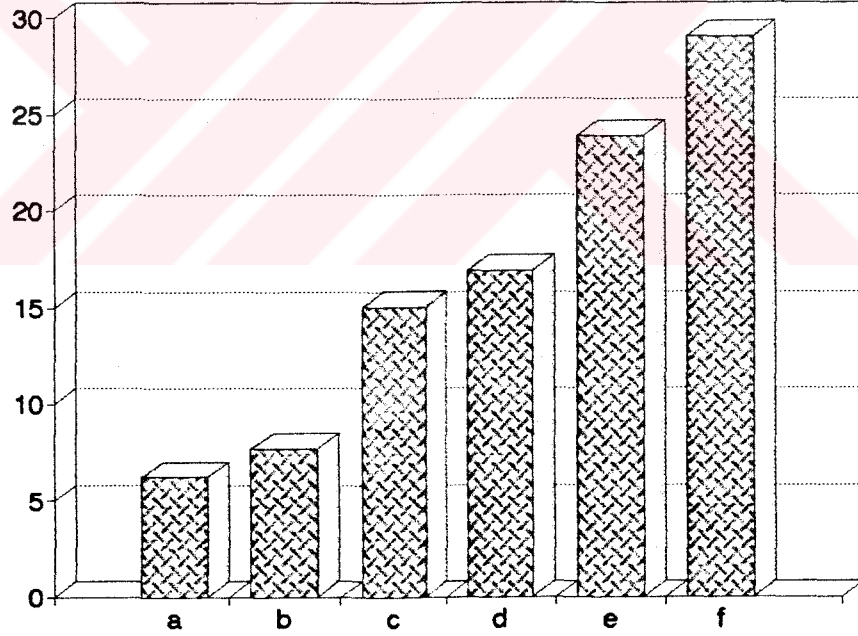
c: 30°C de 4 gün

d: 30°C de 8 gün

e: 35°C de 4 gün

f: 35°C de 8 gün

artmasıyla gelişen anter yüzdesinde de artış meydana gelmiştir **Şek.4.23'** de tüm çeşitlerin ortalaması üzerinden hazırlanan diyagramlardan da izlenebileceği gibi, sıcaklığın 30°C'ye yükseltilmesi anter gelişme oranını artırmıştır. 4 gün süreyle 30°C'de tutulan patlıcan anterlerinde gelişme oranı % 14.0 olarak bulunurken, 8 gün süreyle 30°C'de tutulan anterlerde gelişme oranı % 17.6'ya yükselmiştir. 35°C'de 4 gün süreyle karanlıkta bekletilen petri kaplarındaki anterler % 21.1 oranında şişme ve gelişme göstererek sıcaklığa paralel artışı sürdürmüşlerdir. bekletme süresinin 8 güne çıkartılmasıyla gelişme oranı artarak % 27.4 oranına ulaşmıştır.



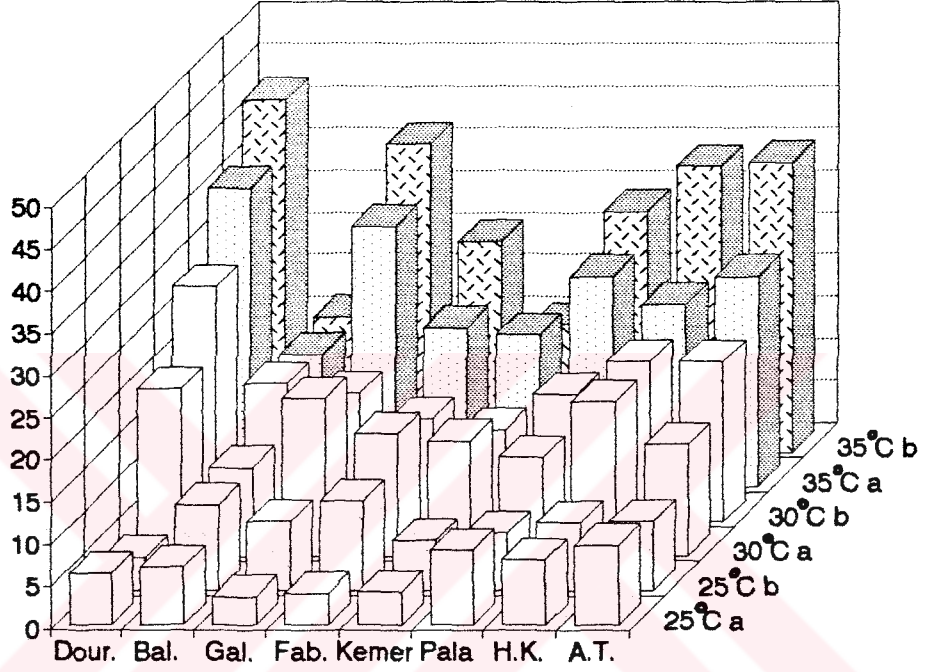
Şekil 4.23. Değişik sıcaklıklarda ve farklı sürelerde karanlıkta tutulan *in vitro* patlıcan anterlerinin gelişme oranları (%)

Sıcaklıktaki artışın, gelişme oranını artırmasının yanında aynı sıcaklıkta daha uzun süre karanlıkta tutma da gelişen anter sayısı üzerinde olumlu bir etki yapmıştır. Denemede uygulanan her üç sıcaklıkta da 8 gün boyunca karanlıkta bekletilen anterler, 4 gün süreyle bekletilenlerden daha yüksek gelişme yüzdelerine sahip olmuşlardır. Sonuç olarak en yüksek gelişme oranı tüm çeşitler ortalaması olarak % 27.4 ile 35°C' de 8 gün süre boyunca karanlıkta bekletilen anterlerden elde edilmiştir.

Aynı uygulamalara çeşitlerin verdikleri yanıtlar arasında da farklılıklar bulunmaktadır. Bununla birlikte **Şek.4.24** incelendiğinde de görüldüğü gibi tüm çeşitlerde sıcaklık artışı ile beraber gelişme oranlarında düzenli artış meydana gelmiştir. Aynı uygulama grubunda tüm çeşitlerden elde edilen değerlerin genelde birbirine yakın olduğu; sıcaklık ve inkübasyon süresindeki artışların anter gelişme oranı üzerinde olumlu etki yaptığı şekilden açıkça izlenebilmektedir.

Dikimi izleyen ilk günlerde yüksek sıcaklıklarda bekletme sonucunda anterlerde meydana gelen gelişmeye rağmen bu denemede embriyo veya haploid bitki elde etmek mümkün olamamıştır. Daha önceki denemelerde haploid bitki elde edilen kontrol ortamlarında da embriyo veya benzeri bir farklılaşma gözlenmemiştir.

Anterlerin izole edilerek kültüre alınmasından önce, tomurcuklara soğuk şoku uygulanması halinde de çok farklı sonuçlar alınmamıştır. +4°C'de buzdolabında 12, 24 veya 48 saat süreyle bekletilen tomurcuklardan izole edilen anterler kültüre alındıktan hemen sonra normal prosedüre uyularak



Şekil 4.24. Sekiz farklı patlıcan genotipine ait anterlerde, dikimi izleyen ilk günlerdeki değişik sıcaklık şoklarının gelişme oranı üzerine etkileri (a: 4 gün; b: 8 gün).

35°C'deki etüve yerleştirilmişlerdir. Burada 8 gün boyunca bekletilen anterlerin çeşitler arasında farklılık görülmeksizin ilk 2-3 gün içerisinde karardıkları belirlenmiştir. Anterler, polenlerin döküldüğü uç noktadan

itibaren kararmaya başlamış ve herhangi bir gelişme göstermeksizin siyahlaşmışlardır. Sekiz değişik patlıcan genotipinde elde edilen bu bulgular sonucunda, patlıcan tomurcuklarının kültürden önce soğuk şokuna tabi tutulmasının olumlu bir etkisinden söz edilemeyeceği kanısına varılmıştır.

Mayıs ayında Adana'da serada yetiştirilen bitkilerden alınan materyalle gerçekleştirilen bu denemelerde nisbeten yaşlanan donör bitkilerin kullanılmasının, sonuçları etkileyebileceği düşünülerek dikimi izleyen ilk günlerdeki sıcaklık şokları Ankara'da genç bitkilerle bir kez daha yinelenmiştir. Baluroi F1, Dourga, Kemer ve Pala çeşitlerinin yer aldığı bu denemeden elde edilen değerler **Çizelge 4.8**'de verilmiştir.

Adana'da yapılan denemelerde elde edilen bulgulara benzer olarak, 4 değişik genotiple yinelenen bu denemede de 25°C sıcaklıkta 4 veya 8 gün karanlıkta tutulan anterler oldukça düşük gelişme oranlarına sahip olmuşlardır (sırasıyla %5.1 ve % 8.9).

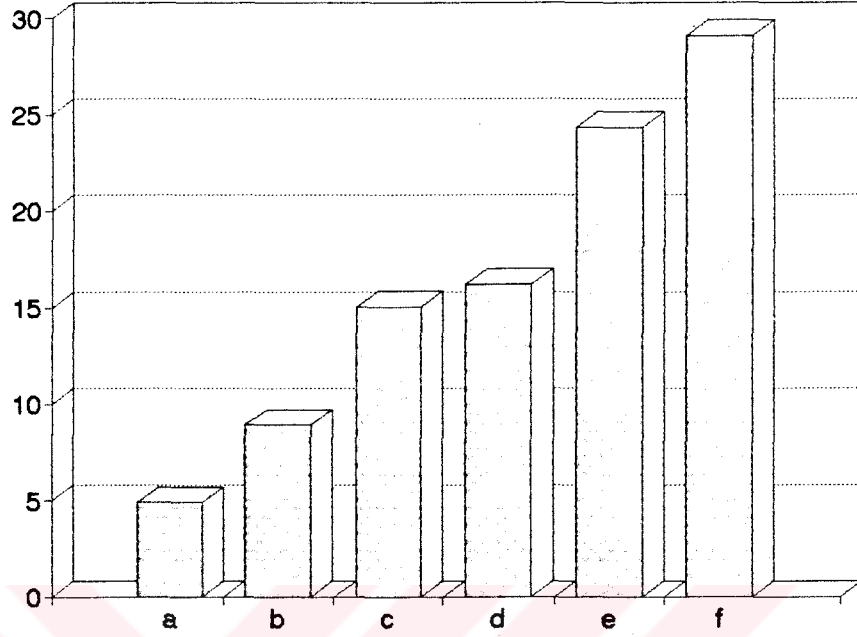
Tüm çeşitlerin ortalaması üzerinden hesaplanan değerlere göre hazırlanan **Şek.4.25**'de de görüleceği gibi sıcaklığın 25°C'den 30°C'ye yükseltilmesiyle anter gelişme oranları da artmıştır. 30°C'de 4 gün karanlıkta tutulan anterler ortalama % 15.1 oranında gelişirlerken aynı sıcaklıkta 8 gün süreyle karanlıkta bırakılan anterlerdeki gelişme oranı çok az bir farkla yüksek bulunmuştur (% 16.0). Sıcaklığın 35°C'ye yükseltilmesiyle şişerek gelişen ve canlılığını koruyan anterlerin yüzdesi artmış; bu sayı 4 gün karanlıkta inkübe edilenlerde % 24.3 olmuştur. 35°C'de 8 gün tutulan anterlerdeki gelişme oranı ise % 29.0'a ulaşmıştır.

Çizelge 4.8. Patlıcan anter kültüründe dikimi izleyen günlerde uygulanan yüksek sıcaklıkların gelişme ve embriyo oluşturma üzerindeki etkileri

Çeşitler	Uygulamalar*	Dikilen anter sayısı	Gelişen anter sayısı	Gelişme or. (%)	Kallus oluşumu	Embriyo ve bitki oluşumu	Embriyo ve bitki ol.or. (%) (**)
Baluroi F ₁	a	87	4	4.6	-	0	0.0
	b	95	7	7.4	+	0	0.0
	c	96	14	14.6	+	0	0.0
	d	100	18	18.0	++	0	0.0
	e	97	25	25.8	+	0	0.0
	f	93	23	24.7	++	2	2.15
Dourga	a*	96	5	5.2	-	0	0.0
	b	87	9	10.3	+	0	0.0
	c	84	12	14.3	+	0	0.0
	d	86	17	19.8	+	0	0.0
	e	90	20	22.2	++	0	0.0
	f	91	28	30.8	++	0	0.0
Pala	a	76	2	2.6	-	0	0.0
	b	87	6	6.9	+	0	0.0
	c	77	10	13.0	+	0	0.0
	d	110	10	12.7	+	0	0.0
	e	93	24	25.8	+	0	0.0
	f	93	31	33.3	++	0	0.0
Kemer	a	112	8	7.1	-	0	0.0
	b	101	11	10.9	+	0	0.0
	c	93	17	18.3	+	0	0.0
	d	98	14	14.3	+	0	0.0
	e	94	22	23.4	++	0	0.0
	f	106	29	27.4	++	0	0.0

(*) : Çizelge 4.7'nin altında verilmiştir.

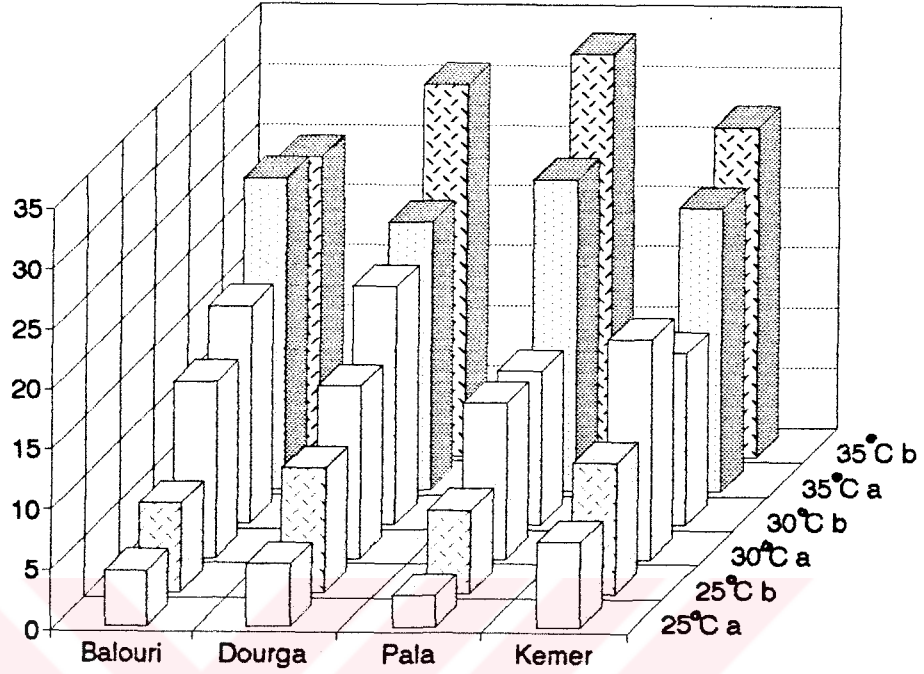
(**): Embriyo ve bitki oluşumları aynı sayıda olduğundan tek bir sütunda verilmiştir.



Şekil 4.25.Üç değişik sıcaklıkta farklı sürelerde karanlıkta tutulan in vitro patlıcan anterlerinin gelişme oranları (%)

Denemede yer alan çeşitlerin değişik sıcaklıklarda, önemsiz de olsa farklı değerler verdikleri belirlenmiştir. Ancak Şek.4.26'nın incelenmesinden görüleceği gibi her sıcaklık derecesinde çeşitler birbirlerinden az çok farklı değerler verseler de, sıcaklığın 25°C'den 35°C'ye doğru artması ile birlikte gelişme oranı da artmaktadır.

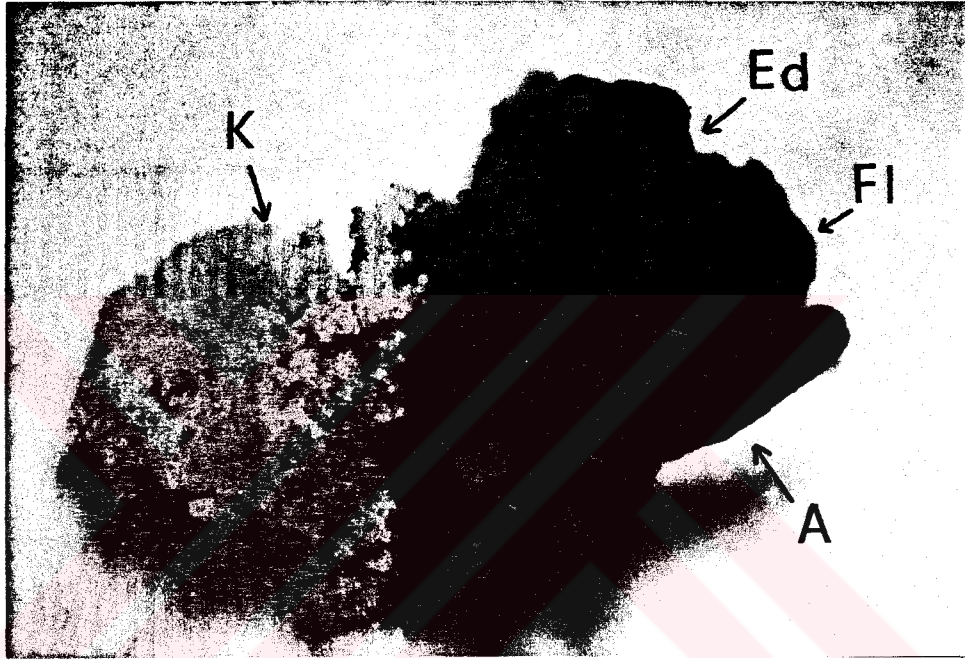
Ayrıca genel olarak her üç sıcaklık derecesinde de 8 gün süreyle karanlık koşullarda bekletilen anterlerin 4 gün süreyle bekletilenlerden daha yüksek değerler verdikleri bir kez daha doğrulanmıştır.



Şekil 4.26. Dört farklı patlıcan genotipine ait anterlerde, dikimi izleyen ilk günlerdeki değişik sıcaklık şoklarının gelişme oranı üzerine etkileri (a: 4 gün, b: 8 gün).

Bu denemede kontrol uygulaması olarak yer alan 35°C de 8 gün süreyle karanlıkta bırakılan anterlerden bazılarında embriyo benzeri farklılaşmalar gözlenmiştir. Baluroi F₁ çeşidinde iki farklı anterden birer tane embrioid elde edilmiştir. Kemer çeşidinin anterleri içerisinde de rengi yeşile dönüşmeyen, ancak beyaz renkli kalp şekilli embriyo benzeri yapılar belirlenmiştir. 35°C'de 8 gün karanlıkta bırakılan Baluroi F₁ çeşidine ait anterlerde önceleri beyaz renkli ve kalp şekilli embriyo görünümündeki oluşumlar, daha

sonra yeşil renge dönüşmeye başlamış; ancak büyüme ucu görülmeyen bu embrioidler gelişemeyerek dumura uğramışlardır (Şek.4.27).



Şekil 4.27. Baluroi F₁ çeşidinde meydana gelen ve daha sonra dejenere olan embrioid (Ed:Embrioid, Fl:Filament, A:Anter, K:Kallus)

4.9. VIII. Deneme Sonuçları

2,4-D ve NAA'in oksin; Kinetin'in de sitokinin olarak kullanıldığı, karbon kaynağı olarak sakkaroz ve glukoz'un yer aldığı, ayrıca aktif kömürün de eklendiği ortamlar üzerinde yürütülen sekizinci deneme ile ilgili bulgular

Çizelge 4.9'da sunulmuştur.

IV. Deneme sonucunda elde edilen bulgulara benzer biçimde bu denemede de aktif kömür katılan ortamlardaki anterler, gelişme veya hacimce büyüme ya da kallus oluşturma gibi herhangi bir tepki göstermemişlerdir. Ortam üzerine yerleştirildikleri büyüklük değişmeksizin renkleri kahverengi-siyaha dönüşen anterlerin, şaşırtma ortamına transfer zamanında yumuşamış oldukları ve canlılıklarını yitirdikleri anlaşılmıştır. Bu nedenle aktif kömür içeren ortamlara dikilen anterler, 12 gün sonra gerçekleştirilen şaşırtma aşamasında yeni ortamlara aktarılmamışlardır. Aktif kömürlü ortamlarda belirlenen bu olumsuz gelişme durumu konusunda genotipler arasında bir farklılık gözlenmemiştir.

Şek. 4.28'den de izlenebileceği gibi yedi değişik genotipe ait patlıcan anterlerinin aynı besin ortamları üzerindeki gelişme oranları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Aktif kömürlü ortamlarda gelişme olmaması nedeniyle bu ortamlara ilişkin değerler grafik üzerinde gösterilmemiştir.

Karbon kaynağı olarak sakkaroz ve glukozun birlikte kullanılmasıyla gelişme oranlarında artış meydana geldiği gözlenmiştir. İki farklı şekerin birlikte kullanıldığı C ve D ortamlarında Adana Topağı çeşidi dışındaki çeşitlerde gelişme oranları artmıştır. Şeytan çeşidi de D ortamında düşük performans göstermekle birlikte C ortamında en yüksek gelişme oranına sahip olmuştur.

Anter gelişmesi sakkaroz ve glukozun birlikte kullanıldığı ortamlarda daha yüksek oranlarda meydana gelmiş ve 5 mg/l Kinetin ve 5 mg/l 2,4-D içeren "B" ortamından embriyo elde edilebilmiştir.

Çizelge 4.9.Değişik patlıcan çeşitlerine ait anterlerin yedi farklı bileşimdeki ortam üzerindeki gelişme durumları

Çeşitler	Ortam- lar(*)	Dikilen anter sayısı	Gelişen anter sayısı	Geliş- me or. (%)	Kallus oluşumu	Embriyo oluşumu	Embriyo ol.or. (%)	Bitki oluşumu	Bitki ol.or. (%)
Galine F1	A	50	7	14.0	-	0	0.0	0	0.0
	B	48	9	18.8	+	0	0.0	0	0.0
	C	50	11	22.0	+	0	0.0	0	0.0
	D	51	10	19.6	-	0	0.0	0	0.0
	E	42	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	F	50	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	G	52	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
Fabina F1	A	48	8	16.7	-	0	0.0	0	0.0
	B	43	7	16.3	+	0	0.0	0	0.0
	C	41	12	29.3	+	0	0.0	0	0.0
	D	44	12	27.3	-	0	0.0	0	0.0
	E	42	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	F	43	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	G	43	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0

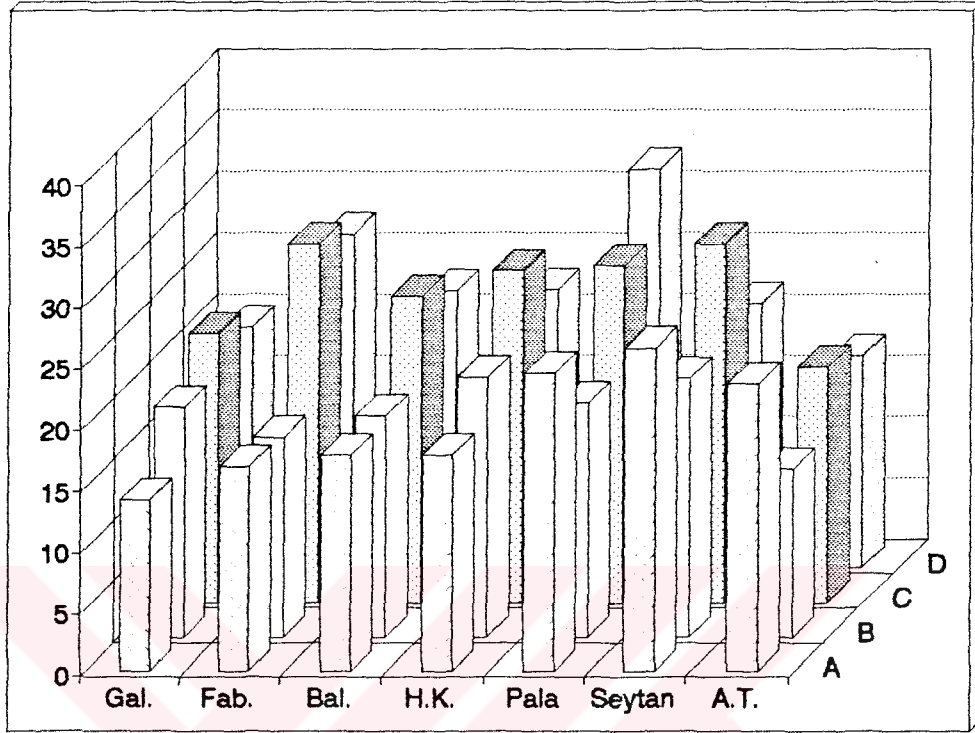
Çizelge 4.9'un devamı

Çeşitler	Ortam- lar	Dikilen anter sayısı	Gelişen anter sayısı	Geliş- me or. (%)	Kallus oluşumu	Embriyo oluşumu	Embriyo ol.or. (%)	Bitki oluşumu	Bitki ol.or. (%)
Baluroi F1	A	51	9	17.6	-	0	0.0	0	0.0
	B	50	9	18.0	+	0	0.0	0	0.0
	C	56	14	25.0	+	0	0.0	0	0.0
	D	53	12	22.6	-	0	0.0	0	0.0
	E	50	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	F	50	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	G	54	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
Halep Karası	A	51	9	17.6	-	2	3.9	0	0.0
	B	52	11	21.2	+	2	3.8	2	3.8
	C	48	13	27.1	-	0	0.0	0	0.0
	D	44	10	22.7	-	0	0.0	0	0.0
	E	53	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	F	50	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	G	51	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
Pala	A	41	10	24.4	-	0	0.0	0	0.0
	B	42	8	19.0	+	0	0.0	0	0.0
	C	40	11	27.5	+	0	0.0	0	0.0
	D	43	14	32.6	-	0	0.0	0	0.0
	E	45	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	F	40	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	G	42	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0

Çizelge 4.9'un devamı

Çeşitler	Ortam- lar*	Dikilen anter sayısı	Gelişen anter sayısı	Geliş- me or. (%)	Kallus oluşumu	Embriyo oluşumu	Embriyo ol.or. (%)	Bitki oluşumu	Bitki ol.or. (%)
Şeytan	A	53	14	26.4	-	0	0.0	0	0.0
	B	57	12	21.1	+	0	0.0	0	0.0
	C	58	17	29.3	-	0	0.0	0	0.0
	D	51	11	21.6	-	0	0.0	0	0.0
	E	56	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	F	55	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	G	53	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
Adana Topağı	A	50	12	23.5	-	0	0.0	0	0.0
	B	51	7	13.7	+	0	0.0	0	0.0
	C	52	10	19.2	+	0	0.0	0	0.0
	D	52	9	17.3	-	0	0.0	0	0.0
	E	51	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	F	51	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0
	G	48	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0

(*) Ortam kodları Bölüm 3.2.4.2.8.'de verilmiştir.



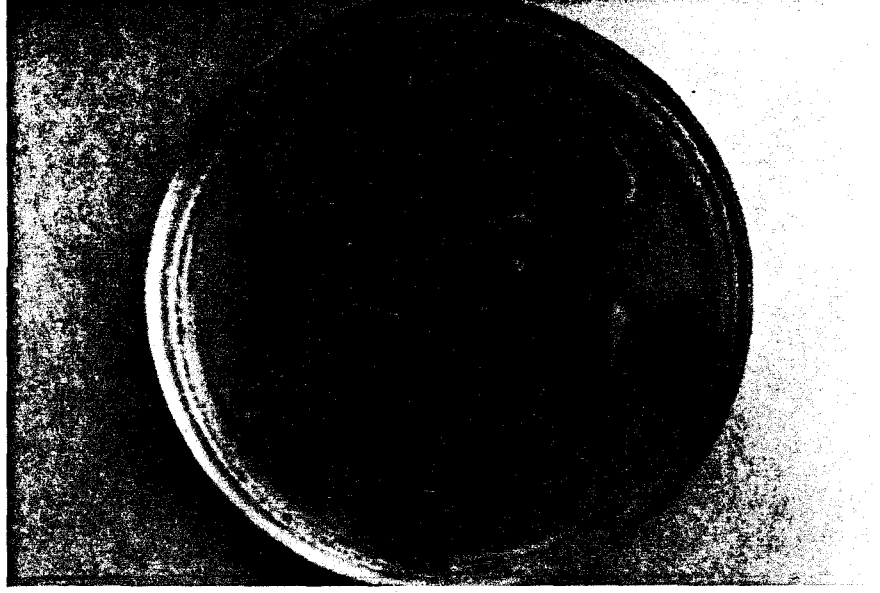
Şekil 4.28.Yedi patlıcan genotipine ait anterlerin dört farklı hormon ve şeker kombinasyonuna sahip ortamlardaki gelişme durumu

Daha önce yapılan V. Denemede de haploid embriyo veren Halep Karası çeşidi, diğer çeşitler arasında yine androgenik kapasiteyi gösteren çeşit olmuş ve iki adet haploid embriyo oluşturmuştur. Bu denemede Halep Karası çeşidinden elde edilen embriyo Şek.4.29'da görülmektedir.Ayrıca aynı çeşit 120 g/l sakkaroz ile 5 mg/l Kinetin ve 5 mg/l NAA içeren "A" ortamında da iki adet embriyo oluşturmuş; ancak bu embriyolar canlılıklarını sürdürememişlerdir. Şeytan patlıcan çeşidi "A" ortamı üzerinde rizogenesis yönünde gelişme göstermiş, anterden dışarı doğru gelişen kallustan kök oluşumu meydana gelmiştir.

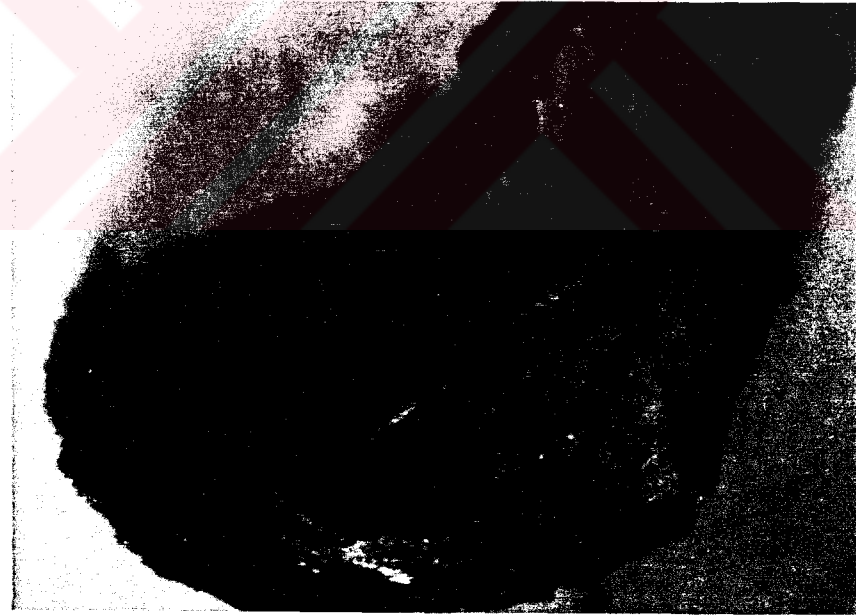


Şekil 4.29.Halep Karası çeşidinden "B" ortamında elde edilen embriyo ve embriyo veren anterin görünüşü.

Besin ortamına 2,4-D yerine NAA katılması anterlerin görünümünü etkilemiştir. NAA katılan ortamlarda anterler koyu kahverengine dönüşmemiş, açık kahverengi-sarımsı bir renk almışlardır. Ayrıca yine bu ortamlarda filamentlerin kesim yerleri ile anter duvarlarının bazı yüzeylerinde yeşil renge dönüşüm olmuştur (Şek.4.30). 2,4-D katılan ortamlardaki beyaz renkli yoğun kallus oluşumundan farklı olarak NAA içeren ortamlarda daha az yoğunlukta ve krem renginde bir kallus dokusu meydana gelmiştir. Bundan başka anterlerin iç kısımlarında oluşan açık yeşil renkli doku incelendiğinde bunların globular dönemdeki embrioidler olabileceği kanısına varılmıştır (Şek.4.31). Ancak bu



Şekil 4.30.NAA içeren ortamlarda gelişen patlıcan anterleri



Şekil 4.31.5 mg/l NAA içeren "A" ortamında Baluroi F1 patlıcan çeşidine ait bir anterin içerisindeki globular embriyoya benzer oluşumlar

farklılaşmaların dışında bir gelişme sağlanamamış; NAA içeren ortamlarda haploid embriyo ve bitki geliştirilememiştir.

Bu deneme sonucunda NAA'in patlıcan anter kültüründe 2,4-D'ye üstün özellikleri olduğu yönünde bir bulgu elde edilememiştir. Ayrıca sakkaroz ile glukozun bir arada kullanıldığı ortamlarda anter gelişme oranında artış olmakla birlikte embriyo oluşumu yönünde değişik bir etki sağlanamamıştır.

5. TARTIŞMA

Ülkemizde önemli boyutlarda yetiştiriciliği yapılan sebze türlerinden olan patlıcanda ıslah çalışmaları ve yeni çeşitlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Ancak geleneksel yöntemlerle yürütülen ıslah çalışmalarında uzun zamana gereksinim duyulmakta, bu nedenle ıslah ve çeşit geliştirmede teknolojik yeniliklerden yararlanan gelişmiş ülkeler ile rekabet şansımız azalmaktadır. İslah süresini kısaltmak amacıyla patlıcanda haploid bitki uyartımına yönelik olarak planlanan bu çalışmada anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi gerçekleştirilmiş ve androgenesisini uyarıcı bazı uygulamaların etkinlikleri üzerinde bilgiler elde edilmiştir.

Anter kültürü için elverişli tomurcuk gelişme dönemi

Kültüre alınacak anterleri taşıyan tomurcukların donör bitkilerin üzerinden toplanması aşamasındaki morfolojik görünümleri, bu tomurcukların seçimi ve toplanmasında büyük kolaylık sağlamakta; bu nedenle tomurcuğun morfolojik görünüşüyle mikrospor gelişim dönemleri arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda sekiz farklı gelişme döneminde gruplandırılan tomurcukların içerisindeki anterlerde mikrospor gelişme dönemleri belirlenmiştir. Buna paralel olarak yürütülen *in vitro* denemede farklı gelişme dönemlerindeki anterlerin kültürdeki gelişme durumları da incelenmiş ve 1. polen mitozundan hemen önceki aşamada tek çekirdekli mikrosporları veya bölünme aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerin en yüksek

gelişme oranlarını (sırasıyla %23.1 ve %20.4) verdikleri belirlenmiştir. 5. ve 6. tomurcuk dönemlerine karşılık gelen bu aşamalardaki tomurcuklarda çeşitlere bağlı olarak uzunluğun 22.4-24.7 mm, çapın ise 10.8-12.5 mm arasında olduğu ,taç yaprak seviyesinin çanak yaprakların dilimlenmeye başladığı noktada veya bunun 1-2 mm üzerinde bulunduğu saptanmıştır. Pekin araştırma grubu (**Research Group of Haploid Breeding,1978**) da patlıcanda anter kültürü için tek çekirdekli mikrospor döneminin elverişli olduğunu bildirirken; tomurcuk büyüklüğünün çeşitler, yetiştirme koşulları ve bitki yaşına göre değişiklik gösterebileceğini, bu nedenle taç yaprakların dilimlenip ayrılmaya başladığı dönemin kriter olarak alınması gerektiğini belirtmiştir. Benzer biçimde **Isouard ve ark. (1979)** ve **Chambonnet (1985)** adlı araştırmacılar da anter kültürü için patlıcan çiçek tomurcuklarının yukarıda tanımlanan morfolojik görüntüde olmaları gerektiği görüşünü paylaşmaktadırlar. Ancak donör olarak yaşlı bitkiler kullanıldığında morfolojik görünimleri uygun gibi görünmekle birlikte, anterlerin izole edilmesi amacıyla tomurcuklar açıldığında her zaman istenen anter dönemiyle karşılaşamayabilmektedir. Nitekim **Dunwell ve Perry (1973)** de bitkilerin yaşlanmasıyla birlikte uygun dönemde görünen tomurcuklardaki anterlerde mikrospor ve genç polen taneciklerinin heterojen bir karışım halinde bulunduğundan söz etmektedir.

Tomurcuk büyüklüğü ve morfolojik görünümün yanında anter renginin de elverişli dönemin belirlenmesinde önemli bir kriter olduğu görülmüştür. *In vitro* kültüre alındığında

hacimce genişleyip gelişme gösteren anterlerin, yeşilimsi sarı renkte oldukları; sarımsı yeşil renkli anterlerin erken, sarı ve koyu sarı renkteki anterlerin ise geç dönemde buldukları belirlenmiştir.

Genotiplerin androgenesise yanıtları

Anter kültüründe elde edilen başarı farklı genotipler arasında büyük dalgalanmalar göstermektedir. Çalışmamızda yer alan sekiz değişik denemede kullanılan patlıcan çeşitlerinin iki tanesinden (Halep Karası ve Baluroi F₁) haploid bitki elde edilebilmiş, diğer iki genotipte (Prelane F₁ ve Kemer) embrioid oluşmuş ancak bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir. Geri kalan çeşitlerden (Dourga, Pala, Adana Topağı, Şeytan, Birecik Yerlisi, Black Beauty, Fabina F₁, Galine F₁, Marfa F₁) embriyo veya bitki elde etmek mümkün olamamıştır.

Patlıcanda genotipler arasında büyük farklılıklar bulunduğu Tuberosa ve ark. (1987) ve Rotino ve ark. (1987 a) tarafından da önemle vurgulanmaktadır.

Çalışmanın başlangıcında ilk haploid bitkilerin elde edildiği Baluroi F₁ çeşidi, daha sonraki deneme gruplarındaki aynı uygulamalarda embriyo meydana getirmemiş, sadece VIII. Denemede yeniden bazı farklılaşmalar göstererek globular embriyolar oluşturmuştur. Benzer bir durum Halep Karası çeşidinde de ortaya çıkmıştır. V. Denemede %7.8 oranında embriyo ve %4.4 oranında haploid bitki elde edilen Halep Karası çeşidi, VII. Denemede %3.8 oranında haploid bitki meydana getirmiştir. Genotipik yapısı aynı olan bitkilerden alınan anterlerin farklı zamanlarda, aynı

uygulamalara değişik cevaplar vermesi oldukça ilginçtir. Bu durumun, donör bitkilerin yetiştirildiği iklimsel koşulların farklılığından kaynaklanabileceği akla gelmektedir. Nitekim **Heberle-Bors (1982 a ve b)**, aynı genotipe sahip bitkilerin farklı sıcaklık koşullarında yetiştirilmesinin, bitkideki embriyogenik polen sayısını etkilediğini ve buna bağlı olarak oluşan embriyo sayısının da değiştirdiğini bildirmektedir. Çevre koşullarının, donör bitkinin içsel aminoasit profilinin oluşmasını etkilediğini ve bunun da anter kültüründe elde edilen sonuçlara yansıdığını vurgulayan **Dunwell (1976)**'in görüşleri de bu kanımızı destekler niteliktedir. Donör bitkinin beslenme durumu ve yetiştirildiği iklimsel koşullardaki farklılıklar aynı genotiplerin değişik zamanlarda farklı sonuçlar vermesine neden olabilmektedir. Nitekim **Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982)** tarafından yüksek düzeyde androjenetik kapasiteye sahip bir çeşit olarak bildirilen "Dourga" çeşidi, **Tuberosa ve ark. (1987)**'nin yaptıkları çalışmada aynı performansı gösterememiş; bizim çalışmamızda da embriyo oluşumu meydana getirememiştir.

Donör bitkinin yetiştirilme koşulları

Kısa gün ve düşük sıcaklıkta ya da nitrojen açlığı gibi bitkinin gelişmek için gereksinim duyduğu bir takım faktörlerin kısıtlandığı stres koşullarında çift cinsiyetli bitkilerin cinsiyet balansının dişilik yönüne kaydığını ve böylece erkek gametlerin gelişimlerini tamamlayamayarak embriyogenik polenler oluştuğunu; ileri süren **Heberle-Bors (1983)**' un görüşünden hareketle kış aylarında Adana'daki

seralarda yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerle yapılan kültürlerden olumlu sonuç alınamamıştır. Bu dönemde yerli çeşitlerin çoğunda çiçek tomurcuğu dahi oluşamazken, tomurcuk oluşturan çeşitlerin anterleri kültür şartlarında istenen gelişmeyi gösterememişler ve bu dönemde hiçbir genotip ve besin ortamı kombinasyonundan embriyo elde etmek mümkün olamamıştır (VII.Deneme). Bu durum, çiçeklenmeyi artıran koşulların embriyogenik polen oluşturduğu ve patlıcan bitkisinin yüksek sıcaklık ve yüksek ışık yoğunluğu koşullarında çiçeklendiği göz önünde bulundurulduğunda açıklanabilmektedir.

Serada gelişmeye bırakılan aynı bitkilerde bahar döneminde oluşan tomurcukların anterleri kültüre alındığında yine embriyo elde edilememiştir (VII.Deneme). Bu durum, donör bitkilerin yaşı ilerledikçe anter kültüründe verimin azaldığını bildiren **Dunwell ve Perry (1973)** ve **Anagnostakis (1974)**'in bulguları ve görüşleriyle açıklanabilir. **Dunwell (1976)**, mevsimsel farklılıklar gibi bitki yaşının da anter duvarındaki indükleyici hormon düzeyini yakından etkilediğini; anterlerin bitkiden ayrıldıktan sonraki ilk günlerde aktif olan bu hormonların elde edilen sonucu doğrudan etkileyen faktörlerden biri olduğunu vurgulamaktadır. Aynı yılın ilkbahar aylarında Ankara'da yetiştirilen genç bitkilerin ilk tomurcukları ile yapılan denemede ise embriyo oluşumu ve bazı farklılaşmaların meydana geldiği saptanmıştır. Bu durumda genç bitkilerden alınan ilk tomurcukların androjenetik kapasitelerinin yaşlı bitkilerden alınan tomurcuklardan daha fazla olduğu sonucu çıkarılabilmektedir. Bu bulgularımız,

daha önce yapılan çalışmalar ve yukarıda belirtilen görüşlerle uyumaktadır.

Çevre koşulları, genetik farklılık ve bitki yaşı gibi faktörlerin dışında aynı bitkisel materyalle ekim yapılan petri kutuları arasında bile androjenetik güç farklılığı görülmüştür. **Chambonnet (1985)**, aynı tomurcuktaki bir anterle diğerleri arasında bile dalgalanmalar ortaya çıkabileceğini bildirmektedir. Araştırmacı bir çalışması sırasında aynı tomurcuktan çıkan 5 anterden ilkinden 198 adet, ikinci anterden 58, üçüncü anterden 8 adet embriyo geliştiğini, diğer anterlerden ise embriyo oluşmadığını rapor etmiştir.

Ortama katılan şekerin ve aktif kömürün etkisi

Anter kültüründen elde edilen başarı, genotipik ve fizyolojik özelliklere bağlı olmakla birlikte besin ortamı bileşimi de hiç kuşkusuz sonucu etkileyen en önemli faktörlerdendir. Ortama katılan bazı bileşikler, anter kültüründe özel bir öneme sahiptir. Çalışmamızda değişken olarak yer alan bu bileşiklerden birisi karbon kaynağı olan şekerdir.

II. Denemeden elde edilen bulgulara göre, ilk dikim ortamındaki sakkaroz miktarının %12'den az olması halinde embriyo oluşumunun meydana gelmediği belirlenmiştir. %12 sakkaroz içeren ortama dikilen anterler içerisinde Baluroi F1 çeşidinde %6.9 oranında bitki oluşumu elde edilmiştir. Bu sonuçlar, anter kültürü çalışmalarında ortamın şeker içeriğinin yüksek olmasını savunan **Vidalie (1984)**'nin görüşleri ile uyum içindedir. Bu görüşü savunan yazar, yüksek

şeker içerikli ortamların diploid hücreli dokuların çoğalmasını engellediğini, buna karşılık haploid hücrelerin bölünmesini teşvik ettiğini bildirmektedir. Ancak yüksek şeker seviyesi, yalnızca Kinetin ve 2,4-D'nin de yüksek konsantrasyonlarında (5 mg/l Kin. + 5 mg/l 2,4-D) etkili olmuştur. **Chambonnet ve Dumas de Vaulx (1983)**'nin yaptıkları çalışmada da benzer bulgular elde edilmiş, ilk dikim ortamında %3 oranında sakkaroz bulunması halinde bitki oluşum oranı %1.4 olurken, %12 sakkaroz kullanıldığında bitki oluşum oranı %55.5'e ulaşmıştır. **Abak (1983 b)**'ın biber türünde elde ettiği bulgular da bu doğrultudadır.

Literatürde şeker gereksiniminin bir kısmının sakkaroz, bir kısmının da glukoz olarak karşılanması ile ilgili olumlu sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte (**Rotino ve ark.,1987 a**), bizim çalışmamızda (VIII.Deneme) embriyo yine %12 sakkaroz kullanılan ortamlar üzerinde meydana gelmiştir. Bu konuda araştırmacıların da belirttiği gibi daha ayrıntılı çalışmalar yapılmasına gerek duyulmaktadır.

Çalışmalarımızda besin ortamına katılarak gelişme ve androgenesis üzerindeki etkileri araştırılan ikinci organik madde ise aktif kömürdür. Besin ortamına aktif kömür katılmasının anter kültüründe embriyogenesi artırdığı yolundaki bulgular (**Anagnostakis,1974; Morrison ve ark.,1986**) üzerine patlıcan anter kültüründe de ilk dikim ortamına % 1 oranında aktif kömür ilave edilmiştir. Ancak aktif kömür katılan ortamların hiçbirinde ilk sekiz günlük sıcaklık şoku uygulaması süresince anterlerde şişme veya gelişme meydana gelmemiştir. Çift fazlı sistemin denendiği

V. Denemede de benzer biçimde anterler kısa süre içinde canlılıklarını yitirmişlerdir. Oysa **Pelletier ve Ilami (1972)**, aktif kömürün anter duvarının yaşlanmasını engellediğini ve bu nedenle anter duvarının açık renkte kaldığını, kararmadığını bildirmektedir. *Nicotiana*, *Datura* ve *Capsicum* türlerinde aktif kömürün anter kültüründe olumlu etkisinden söz edilmekle birlikte, **Tsay ve ark. (1986)** mısır bitkisinde ortama aktif kömür katılmasının olumlu bir etkide bulunmadığını ve bizim çalışmamızdaki gibi olumsuz sonuç verdiğini belirlemişlerdir.

Büyüme düzenleyicilerin etkileri

Anter kültür yoluyla haploid embriyo elde edebilmek için gerekli koşulların tümünün var olması halinde bile sonuca ulaşabilmek için önemli bir adım daha vardır ki; bu da besin ortamının hormonal yapısı veya diğer bir deyimle oksin + sitokinin dengesidir. Çalışmamızda yer alan oksin + sitokinin kombinasyonlarında ilk dikim ortamında (C ortamı) sitokinin veya oksin miktarının tek yönlü olarak artmasının kallus oluşumuna yol açtığı, ancak her iki hormon grubunun dengede olması halinde kallus oranının nisbeten daha az olduğu gözlenmiştir. Özellikle Kinetin'e göre daha kuvvetli bir sitokinin olan Zeatin'in kullanıldığı kombinasyonlarda daha yoğun bir kallus oluşumu meydana gelmiştir. Zeatin'in 2,4-D ile birlikte yer aldığı deneme gruplarında yoğun kallus oluşumu, embriyo oluşumunu engellemiş ve bu ortamlar üzerindeki anterlerin hiçbiri androgenik gelişme gösterememiştir. Oksin olarak NAA'in kullanıldığı ortamlarda kallus oluşum düzeyi çok düşük bulunmuş, oluşan dokunun

yeşil renkli olduğu dikkate çekmiştir. Patlıcan anter kültüründe C ortamına katılan "Kinetin + 2,4-D", "Zeatin + 2,4-D" ve "Kinetin + NAA" kombinasyonlarında kallus oluşumu ve anterlerin gelişmeleri farklılık göstermiştir. "Kinetin + NAA" kombinasyonunda anterler açık renklerini koruyup yeşilimsi kallus oluştururken; "Zeatin + 2,4-D" kombinasyonundan krem renkli yoğun bir kallus dokusu gelişmiş; "Kinetin + 2,4-D" kombinasyonunun dengeli dozlarında ise anter gelişiminin yanında az miktarda kallus oluşmuştur. **Margara (1982)**, doku kültürü çalışmalarında kullanılan farklı oksin ve sitokinin etkinliklerinin, üzerinde çalışılan türlere göre değişebileceğini ve her kültür tipinde değişik etkilere yol açabileceğini bildirmektedir.

Direkt embriyogenesis sonucu embriyoların meydana geldiği anterlerde kallus oluşmadığı göz önüne alınırsa kallus oluşumunun direkt embriyogenesisi engellediği sonucu çıkartılabilir. Nitekim **Reinert ve Bajaj (1977)** da, besin ortamının büyümeyi düzenleyiciler bakımından zengin olmasının, mikrospor dışındaki anter duvarı veya filament gibi dokularda da bölünme ve çoğalmaya neden olduğunu ve bu nedenle yüksek düzeylerde büyüme düzenleyici kullanmaktan kaçınılması gerektiğini belirtmektedirler.

Çalışmamızda tam bitki haline dönüşen haploid embriyolar yalnızca 5 mg/l Kinetin + 5 mg/l 2,4-D katılan ilk dikim ortamlarından elde edilmiştir. Bu kombinasyon, **Chambonnet ve Dumas de Vaulx (1983)** ve **Chambonnet (1985)** tarafından da patlıcan anter kültüründe en iyi sonuçların alındığı kaydedilen kombinasyondur. Kemer çeşidinde 5 mg/l Kinetin + 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda,

Baluroi F₁ çeşidinde ise 5 mg/l Kinetin + 5 mg/l NAA içeren ortamda kültüre alınan anterlerden de embriyo meydana gelmekle birlikte bu embriyolar gelişmelerini istenen biçimde tamamlayamamış ve tam bir bitki haline dönüşmemişlerdir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar, değişik hormon bileşim ve konsantrasyonlarında patlıcanda haploid bitki elde ettiklerini rapor etmektedirler. Örneğin Pekin araştırma grubu (**Research Group of Haploid Breeding, 1978**) 0.25-2.0 mg/l düzeyinde 2,4-D ve 0.25-1.0 mg/l dozunda Kinetin katılan besin ortamlarında embriyo elde ederlerken; **Isouard ve ark. (1979)**, 0.1 mg/l NAA ve 0.2 mg/l BAP kullanarak olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. **Chambonnet (1985)**, biber, patlıcan ve domateste androgenesisin başlatılması için 2,4-D'nin mutlaka bulunması gerektiğini bildirmektedir.

Sok uygulamalarının etkisi

Birçok bitki türünün anter kültürüne çok düşük düzeylerde yanıt vermesi veya elde edilen sonuçların pratikte kullanmak için yetersiz oluşu; uzun yıllardır araştırmacıları anter kültüründe embriyo oluşumunu uyarıcı bazı uygulamalara doğru yöneltmiştir. Bunlardan bir bölümünü düşük veya yüksek sıcaklıkların kullanıldığı termik şoklar oluşturmaktadır.

Çalışmamızda yer alan VII. Denemede kültüre almadan önce 12, 24 veya 42 saat süreyle +4°C'de soğuk uygulamasına tabi tutulan tomurcuklardan alınan anterlerde gelişme meydana gelmemiş ve anterler kıvrılıp siyahlaşmışlardır. Bu

durum, soğuk uygulamalarının kahverengileşme ile ortaya çıkan anter duvarı yaşlanmasını engellediğini bildiren **Pelletier ve Ilami (1972)**'nin görüşleri ile uyuşmamaktadır. Ancak patlıcanda soğuk uygulamasının anterlerden elde edilen embriyo randımanının düşürdüğünü bildiren başka bulgular da vardır. Raquin adlı araştırmacı, patlıcan çiçek tomurcuklarının +3°C'de 48 saat tutulmasıyla embriyo oluşumunun önemli ölçüde azaldığını bildirmektedir (**Chambonnet, 1985**). **Chlyah ve Taarji (1984)**'nin domates tomurcuklarına yaptıkları +4°C'deki soğuk uygulamaları da sonuç vermemiş, sadece yeşil renkli kallus oluşumu elde edilebilmiştir. Aynı familyadaki bir başka tür olan biberde (*Capsicum annuum* L.) ise **Morrison ve ark. (1986)**'nin yaptıkları soğuk şoklarından çok olumlu sonuçlar alınmıştır. Araştırmacılar +4°C'de 100 saat tutulan tomurcuklardan izole edilen anterlerin yüksek bir embriyogenik kapasite gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmalardan, *Solanaceae* familyasına ait üç farklı türde, soğuk uygulamalarına karşı alınan yanıtların farklı olduğu anlaşılmaktadır. **Sunderland (1979)**, soğuk uygulamasında her bitki türü için iyi sonuç verecek sıcaklık derecesi ve sürenin belirlenmesi gerektiğini, birçok durumda çok soğuk olmayan +7 ila +15°C gibi sıcaklıklarda uzun süre yapılan uygulamaların daha iyi sonuç verdiğini bildirmiştir.

Hava sıcaklığının oldukça yüksek olduğu dönemlerde toplanan tomurcukların +4°C yerine daha yüksek derecelerde, daha uzun süreli soğuk şokuna tabi tutulmasının olumlu sonuçlar verebileceği düşüncesiyle, bu konuda yeni çalışmaların yapılması gerektiği inancındayız.

VII. Denemede kültüre alınan anterlerde ilk günlerde değişik yüksek sıcaklık uygulamaları yapılmıştır. 25, 30 veya 35°C sıcaklıklarda 4 veya 8 gün süreyle tutulan kültürlerden alınan sonuçlar; sıcaklık derecesi ve sıcakta bekletme süresi arttıkça anterlerdeki gelişme oranının da arttığını göstermiştir. Ardarda yapılan iki denemede de, aynı uygulama grubundaki çeşitler arasında farklılıklar bulunmakla birlikte, tüm çeşitlerde 35°C'de karanlıkta 8 gün süreyle tutulan anterlerdeki gelişme oranı diğer uygulamalara göre en yüksek değerleri vermiştir (% 17.4 ve %29.0). *Solanaceae* familyasında yüksek sıcaklık şoklarının androgenesis üzerinde önemli etkisinin bulunduğu daha önceki çalışmalarda da belirlenmiştir. Nitekim **Dumas de Vaulx ve ark. (1981)** biber, **Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982)** patlıcan türlerinin anter kültüründe, anterlerin ilk 8 günlük süreyle karanlıkta ve +35°C'de tutulmasının embriyo verimi için gerekli olduğunu; ancak bu sonucun ortamın Kinetin + 2,4-D kombinasyonu ile de yakından ilişkisi bulunduğunu bildirmektedirler. **Tuberosa ve ark. (1987)** ile **Rotino ve ark. (1987 a)** da patlıcanda aynı sıcaklık uygulamasını kullanmışlar ve bu uygulamanın patlıcanda androgenesisini uyaran önemli bir faktör olduğunu vurgulamışlardır.

Termik şokların hayvanlar aleminde de önemli etkisi bulunduğu dikkat çeken **Chambonnet (1985)**, etkin rolleri tam olarak bilinmeyen ancak termik şokların etkisi altında olan 10 kadar proteinin varlığını hatırlatmaktadır. Bu proteinlerin kromozomlar üzerinde özel bazı etkiler meydana getirebileceğinden söz eden araştırmacı; farelerde

partenogenesisin başlatılabilmesi için sıcaklık şoklarına gereksinim duyulduğunu, sıcaklığın hücre bölünmesini artırarak embriyogenesise ilk adım atmada promotör etki yaptığını kaydetmektedir.

Kültüre alınan anterlerin şişerek gelişmeleri, hücre bölünmesinin işareti sayılmaktadır. **Nitsch (1974)**'e göre mikrosporların bölünmesi ve hacimce genişleme ile androgenik bitki elde edilebilmesi arasında çok yakın bir ilişki bulunmaktadır. Bölünme meydana geliyorsa, androgenesis için bir ümit bulunduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle denemelerimizde anter gelişmesi bir kriter olarak alınmıştır. Gerçekten de özellikle sıcaklık uygulamaları sırasında, androgenik kapasite ile anter gelişmesi arasında bir ilişkinin bulunduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte gelişme oranının yüksekliği, embriyo oluşumunu gerektiren mutlak bir kriter değildir. Denemelerimizde yüksek gelişme oranı gösteren çeşitlerin çoğu embriyo oluşturamamış; buna karşılık Baluroi F₁ çeşidi VII. Denemenin ikinci tekrarında düşük bir gelişme oranı gösterdiği halde iki adet embriyo oluşturabilmiştir. Nitekim **Chambonnet (1985)** de, embriyogenik anter varlığı ile bitki oluşumu arasında direkt bir ilişkinin bulunmadığını, özellikle başlangıçta globüler oluşumlardan çoğunun gelişmelerinin sonradan bloke olduğunu, bazılarının kök oluşturup sürgün ucu veremediklerini bildirmiştir. Bu duruma bizim çalışmamızda da Pala ve Şeytan çeşitlerinde rastlanmıştır.

Birçok faktörün etkisi altında bulunan *in vitro* androgenesisin gerçekleşmesi için anterlerin kültüre

alınmasından sonra iki önemli aşama bulunmaktadır: Gelişme aşaması ve rejenerasyon aşaması. Hiç kuşkusuz her iki aşama da sonuca ulaşmada birbirini tamamlayan olayları kapsamaktadır. Bununla birlikte mikrosporların bölünmek üzere uyartılarak haploid hücre yığınlarının oluşumu ve embriyogenesise başlangıç olaylarının gerçekleştirildiği gelişme aşaması, anter kültüründeki evrelerin belki de en önemlisidir. Mikrospor çekirdeklerinde bölünme uyartılmazsa, rejenerasyon aşamasında zaten yapılacak birşey kalmamaktadır. Bu nedenle yapılan araştırmalar gelişme aşamasında yoğunlaşmış, anter kültüründe çalışan bilim adamlarının çoğu inkübasyon süresinin ilk dönemlerindeki uygulamalara yönelmişlerdir. Biz de süremizin elverdiği ölçüde yalnızca ilk gelişme ortamında bazı uygulamalar yaparak androgenesis oranını artırmaya çalıştık. Ancak ilk 12 günlük inkübasyon sonunda androgenik yapıda görünen ve çok iyi gelişen anterlerin R ortamlarına transferlerinden sonra bunlardan embriyo elde etme oranının düşük olması, bundan sonraki çalışmalarda R ortamı üzerinde de bazı değişiklikler yapılması gerektiği kanısını uyandırmıştır.

Patlıcanda anter kültürü yoluyla diploid bitkilerden haploid bitkilerin elde edilebildiği, daha önce yapılan çalışmalarda da bildirilmektedir (Raina ve Iyer,1973; Research Group of Haploid Breeding,1978; Isouard,1981; Dumas de Vaulx ve Chambonnet,1982; Chambonnet,1985; Rotino ve ark.,1987 b; Tuberosa ve ark.,1987).

Ülkemizde anter kültürü çalışmaları henüz oldukça yeni ve az sayıdadır. Çeşit geliştirme amacına yönelik olarak yapılan ilk anter kültürü çalışması biber bitkisinde **Abak (1983 b ve c)** tarafından gerçekleştirilmiş ve bu yolla elde edilen saf hatlar ıslah çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (**Abak,1986**). Ege Bölgesi tütünlerinde yeni çeşitlerin geliştirilmesinde de bu yöntemden yararlanıldığı (**Emiroğlu ve ark.,1986**),ve ayrıca patateste de ilk sonuçların alınmaya başlandığı (**M.B. Yıldırım, kişisel görüşme**) bildirilmektedir. Anter kültürü yoluyla patlıcanda da ülkemiz koşullarında ilk kez haploid bitkilerin elde edilmiş olması , F₁ hibrit çeşit ıslahı amacıyla yapılacak çalışmaların başlatılması ve yöntemin geliştirilmesi için bir başlangıç olacaktır.Ancak bilindiği gibi haploid bitkilerin ıslah programlarında kullanılabilmesi için istenildiği her zaman, dengeli olarak,bütün genotiplerde ve yeterli sayıda elde edilmeleri gerekmektedir. Bizim çalışmamızda elde edilen haploid embriyo oluşum randımanı henüz bir ıslah çalışmasında kullanılabilecek yükseklikte değildir. Haploid bitki oluşum randımanını yükseltecek yeni araştırmalara devam edilmesi gerekmektedir.

Bundan sonraki çalışmalarda C ortamının yanısıra özellikle rejenerasyon ortamı (R ortamı) üzerinde de bazı uygulamalar yapılmasının; ayrıca bitki yetiştirme koşullarının anterlerdeki embriyogenik polen (P poleni) oluşumu üzerindeki etkilerinin araştırılmasının ve bu polen tanecikleri ile embriyo oluşumu arasındaki ilişkilere yönelik çalışmaların yapılmasının yerinde olacağı görüşündeyiz.

6. KAYNAKLAR

- Aalders, K., 1958. Monoploidy in cucumbers. J.Hered. 49: 41-44.
- Abak, K., 1982. Biberlerde Kökboğazı Yanıklığına Dayanıklılığın Kalıtımı Üzerinde Araştırmalar. A.Ü.Ziraat Fak.Doçentlik Tezi, Ankara., 62 s.
- Abak, K., 1983 a. Biberde (*Capsicum annuum* L.) stomatal diffüzyon direnci ile *Phytophthora capsici*'ye dayanıklılık arasındaki ilişki. A.Ü.Ziraat Fak. Yıllığı; 33: 76-82.
- Abak, K., 1983 b. Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırmalar. A.Ü.Ziraat Fak.Yıllığı, Cilt: 33, (1-2-3-4), s:155-163
- Abak, K., 1983 c. Study on the anther culture in vitro of pepper (*Capsicum annuum* L.). Capsicum Newsletter 2: 72-73.
- Abak, K., 1985. "Serrano Criollo de Morelos" ve "PM 217" biber çeşitlerindeki *Phytophthora capsici*'ye dayanıklılık özelliklerinin düşük ve yüksek sıcaklıklarda değişimi. 4. Fitopatoloji Kongresi, 8-11 Ekim 1985, İzmir.
- Abak, K., 1986. Biber ıslahında anter kültüründen yararlanma. Bitki Islahı Simpozyumu. Bildiri Özetleri. 15-17 Ekim 1986, İzmir, s:64.

- Abak, K., Güler, H.Y., 1991. Değişik patlıcan genotiplerinin düşük sıcaklıkta polen verimlilikleri. (Yayınlanmamış araştırma sonuçları), Adana.
- Abak, K., Pochard, E., Dumas de Vaulx, R., 1982. Transmission of resistance to *Phytophthora capsici* on roots and stem of pepper plants: study of doubled haploid lines issued from the cross "PM 217 x Yolo Wonder" through anther culture. *Capsicum Newsl.* 1: 62-64.
- Algan, G., 1981. Bitkisel Dokular İçin Mikroteknik. Fırat Univ. Fen Fak. Yayınları. Bot. No:1. Matbaa Teknisyenleri Basımevi, İstanbul, 94 s.
- Anagnostakis, S.L., 1974. Haploid plants from anthers of tobacco-Enhancement with charcoal. *Planta*, 115: 281-283.
- Anonymous, 1986. Devlet Meteoroloji İşleri Genel Md. Zirai Met.ve iklim Rasatları Daire Bşkl. Sera Kayıtları. (Yayınlanmamış), Ankara.
- Anonymous, 1988. Tarımsal Yapı ve Üretim. T.C.Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Yayınları. Yayın No: 1416, Ankara.
- Anonymous, 1989. FAO Production Yearbook. Vol. 43, s:187.
- Asselin de Beauville, M., 1980. Obtention d'haploides in vitro a partir d'ovaires non fécondes de riz, *Oryza sativa* L. C. R. Acad. Sci. Paris, 290: 489-492.
- Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E., Bergner, A.D., 1922. A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science*, 55: 646-647.

- Bugara, A.M., Egorova, N.A., Reznikova, S.A., 1985. Effect of cold pretreatment on induction of androgenic development in coriander anthers. *Fiziologiya Rastanii*, 32 (3): 558-564.
- Bourgin, J.P., Nitsch, J.P., 1967. Obtention de *Nicotiana* haploides a partir d'etamines cultivees in vitro. *Ann. Physiol. Veget.* 9: 377-382.
- Chambonnet, D., 1985. Culture d'antheres in vitro chez trois Solanacees maraicheres: le piment (*Capsicum annuum* L.), l'aubergine (*Solanum melongena* L.), la tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) et obtention de plantes haploides. These (Doctorat), Academie de Montpellier, 90 pp.
- Chambonnet, D., Dumas de Vault, R., 1983. A new anther culture medium performant on various eggplant (*Solanum melongena* L.) genotypes. *Eucarpia Capsicum and Eggplant 83. V th Meeting*, 4-7 July 1983, Plovdiv, Bulgaria, 38-41.
- Chambonnet, D., Dumas de Vault, R., 1985. Obtention of embryons and plants from in vitro culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo*. *Cucurbit Genetics Cooperative.* 8: 66.
- Chlyah, A., Taarji, H., 1984. Androgenesis in Tomato. *Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement Symp. Czechoslovakia, Prague*, p: 241-242.

- Clapham, D., 1971. In vitro development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum*. Z. Pflanzenzüchtung 65: 285-292
- Collins, G.B., Genouesi, A.D., 1982. Anther culture and its application to crop improvement. In: "Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry" Ed: Tomes, D.T., Ellis, B.E., Harney, P.M., Kasha, K.I., Peterson, R.L. Publ. by the Univ. of Guelph, Ontario-Canada, 1-24.
- Dale, P.J. 1975. Pollen dimorphism and anther culture in Barley. *Planta* (Berl.) 127: 213-220.
- Dumas de Vaultx, R., 1979. Obtention des plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) après pollinisation par *Cucumis ficifolius* A. Rich. C.R. Acad. Sci., Paris, 289: 875-878.
- Dumas de Vaultx, R., Chambonnet, D., 1982. Culture in vitro d'anthers d'aubergine (*S.melongena* L.): Stimulation de la production de plantes qu moyen de traitements a +35°C associés a de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie*, 2 (10): 983-988.
- Dumas de Vaultx, R., Chambonnet, D., Pochard, E., 1981. Culture in vitro d'anthers de piment (*C.annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements a + 35°C. *Agronomie*, 1(10): 859-864.

- Dunwell, J.M., 1976. A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. *Envir. and Exp. Bot.* 16: 109-118.
- Dunwell, J.M., Perry, M.E. 1973. The influence of in vivo growth conditions of *Nicotiana tabacum* plants on the in vitro embryogenic potential of their anthers. *John Innes Annual Report.* 64.
- Dunwell, J.M., Sunderland, N., 1973. Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica* 22: 317-323.
- Düzgüneş, O., 1963. Bilimsel Araştırmalarda İstatistik Prensipleri ve Metodları. E.Ü.Z.F.Yayınları, E.Ü.Matbaası, Bornova, İzmir.
- Elçi, Ş., 1982. Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. Fırat Üniv.Fen-Edebiyat Fak. Yayınları, Biyoloji: 3, Elazığ, 165 s.
- Emiroğlu, Ü., Sekin, S., Bürün, B., 1986. Anter kültüründen yararlanarak Ege Bölgesi tütünleri için yeni hatların geliştirilmesi. Bitki Islahı Simp. Bildiri Özetleri, Ekim, 1986, İzmir.
- Gautheret, R.J., 1959. La culture des tissus vegetaux. Masson et Cie, Edit. Paris.
- Gresshoff, P.M., Doy, C.H., 1972 a. Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 259-264.

- Gresshoff, P.M., Doy, C.H., 1972 b. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* Mill. (Tomato). *Planta* (Berlin) 107: 161-170.
- Gresshoff, P.M., Doy, C.H., 1974. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera. *Z. Pflanzenphysiol.* 73: 132-141.
- Guha, S., Maheshwari, S.C., 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*. 204: 497.
- Gupta, S.C., Babbar, S.B., 1980. Enhancement of plantlet formation in anther cultures of *Datura metel* L. by pre-chilling of buds. *Z. Pflanzenphysiol.* 96: 465-470.
- Gürsöz, N., 1990. Kavun (*Cucumis melo* var. *inodorus* ve *reticulatus*) ve Karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf) Işınlanmış Polenle Uyartılan *in situ* Partenogenetik Embriyolardan *in vitro* Kültürü ile Haploid Bitki Eldesi. Ç.Ü.Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi, Adana, 60 s.
- Gürsöz, N., Abak, K., Pitrat, M., Rode, J.C., Dumas de Vaulx, R., 1991 a. Obtention of haploids induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) *Cucurbit Genetics Cooperative*, 14: 109-110.
- Gürsöz, N., Abak, K., Pitrat, M., Dumas de Vaulx, R., 1991 b. Kavunlarda (*Cucumis melo* L. var. *inodorus* Naud. ve *C. melo* var. *reticulatus* Naud.) partenogenetik haploid embriyo uyartımı ve bitki eldesi. *Doğa Tr.J.Agric. Forestry.* (Baskıda).

- Heberle-Bors, E., 1980. Interaction of activated charcoal and iron chelates in anther culture of *Nicotiana* and *Atropa belladonna*. *Z. Pflanzenphysiol.* 9: 339-347.
- Heberle-Bors, E., 1981. Über die Induktion der Embryogenese in vitro kultivierter Pollen des Tabaks (*Nicotiana tabacum*). DVG (Dissertationsdruck und Verlags), Sachsenheim, Berlin, s. 83.
- Heberle-Bors, E., 1982 a. In vitro pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. and its relation to pollen sterility, sex balance and floral induction of the pollen donor plants. *Planta*, 156: 396-401.
- Heberle-Bors, E., 1982 b. On the time of embryogenic pollen grain induction during sexual development of *Nicotiana tabacum* L. plants. *Planta* 156; 402-406.
- Heberle-Bors, E., 1983. Strategien für die Haploidenproduktion aus pollen. Sonderdruck aus Bericht über die Arbeitstagung 1983 der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtleiter. In Gumpenstein vom 22-24 Nov. 1983.
- Heberle-Bors, E., 1984. Genotypic control of pollen plant formation in *Nicotiana tabacum* L. *Theor. Appl. Genet.* 68; 475-479.
- Heberle-Bors, E., 1985. In vitro haploid formation from pollen: a critical review. *Theor. Appl. Genet.* 71: 361-374.
- Heberle-Bors, E., Reinert, J., 1979. Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum*: dependence upon pollen development. *Protoplasma* 9; 237-245.

- Heslop-Harrison, J., 1972. Sexuality in angiosperms. In: Steward, F.C. (Ed.), *Plant Physiology*, Academic Press. New York-London, 133-289.
- Horner, M., Mott, R.L., 1979. The frequency of embryogenic pollen grains is not increased by in vitro anther culture in *N. tabacum* L. *Planta*, 147: 156-158.
- Horner, M., Street, H.E., 1978. Pollen dimorphism - Origin and significance in pollen plant formation by anther culture. *Ann. Bot.* 42: 763-771.
- Hosenans, D., Bossoutrot, D., 1983. Induction of haploid plants from in vitro culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris* L.) *Z.Pflanzenzüchtung*, 91: 74-77.
- Irikura, Y., 1975. Induction haploid plants by anther culture in tuber-bearing species and inter specific hybrids of *Solanum*. *Potato Res* 18: 133-140.
- Isouard, G., 1981. Contribution a la mise au point de l'androgenese in vitro chez *Solanum melongena* L. et utilisation des haploides pour la definition du caryotype de l'espece. These, l'universite de Paris-Sud Centre D'Orsay, Paris, 90p.
- Isouard, G., Raquin, C., Demarly, Y., 1979. Obtention de plantes haploides et diploides par culture in vitro d'antheres d'aubergine (*Solanum melongena* L.) *C.R. Acad.Sci.Paris, Serie Dt* 288: 987-989.

- Jacobsen,E., Sopory,S.K., 1978. The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspore embryoids in anther cultures of *Solanum tuberosum* and dihaploid hybrids. *Theor.Appl. Genet.* 52; 119-123.
- Johansen,D.A., 1940. *Plant Microtechnique*. McCraw-Hill Book Company. New York, London, 523 s.
- Johansson,L., 1983. Effects of activated charcoal in anther cultures. *Physiol.Plant.* 59: 397-403.
- Johansson,L., Andersson,B., Eriksson,T., 1982. Improvement of anther culture technique: Activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO₂ concentration. *Physiol. Plant.* 54, 24-30.
- Kandeler,R., 1987. *Die Gewebekulturtechnik*. Üniv.für Bodenkultur, Institut für Botanik, Ders Notları.
- Karman,M., 1971. *Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler, Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları*. T.C.Tarım Bakanlığı Zirai Müc. ve Kar. Genel Müdl. Yayınları. Ticaret Matbaacılığı, İzmir.
- Keller,W.A., Armstrong,K.C., 1977. Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures. *Can.J.Bot.*55: 1383-1388.
- Keller,W.A., Armstrong,K.C., 1978. High frequency production of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures. *Z.Pflanzenzüchtung*, 80: 100-108.

- Keller, W.A., Armstrong, K.C., 1979. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. *Theor. Appl. Genet.* 55; 65-67.
- Keller, W.A., Rajhathy, T., Lacapra, J., 1975. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. *Can. J. Genet. Cytol.* 17: 655-666.
- Keller, W.A., Stringham, G.R., 1978. Production and utilization of microspore-derived haploid plants. In: "T.A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of Plant Tissue Culture 1978*, Univ. Calgary Press, Canada, pp. 113-122.
- Kohlenbach, H.W., Wernicke, W., 1978. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 86: 463-472.
- Koç, H., 1989. Döllenenmiş şeker pancarı ovulünden in vitro'da haploid bitki regenerasyonu üzerinde araştırmalar. *C.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5 (1) : 141-147.
- Ling, T.H., Huang, H.S., Liang, C.E., Chun, P.Y., 1978. The study of anther culture in "Three lines" breeding and utilization of heterosis in *Oryza sativa* subsp. *hsien*. *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*. Science Press, Peking, p: 213-226.
- Maheshwari, S.C., Tyagi, A.K., Malhotra, K., Sopory, S.K. 1980. Induction of haploidy from pollen grains in Angiosperms: the Current status. *Theor. Appl. Genet.* 58: 193-206.

- Malhotra,A.K., Maheshwari,S.C., 1977. Enhancement by cold treatment of pollen embryoid development in *Petunia hybrida*. Z.Pflanzenphysiol. 85: 177-180.
- Margara,J.,1982. Bases de la multiplication vegetative. INRA Publ.,Paris,262p.
- Melchers,G., Labib,G., 1970. Die Bedeutung haploider höherer Pflanzen für Pflanzenphysiologie und Pflanzenzüchtung. Berl.Deutsch.Bot.Ges.Bd. 83(11) 3/4, s:129-150.
- Mix,G., 1985. Antheren-Und Ovariienkultur von Sonnenblumen (*Helianthus annuus* L.). Landbauforschung Volkenrode, 35 Jahrg., Heft:3, Seite: 153-156.
- Morrison,R.A., Köning,R.E., Evans,D.A., 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. J.Plant Physiol. 126: 1-9.
- Murashige,T., Skoog,F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Nitsch,C., 1974. Pollen culture. a new technique for mass production of haploid and homozygous plants. In: "Haploids in Higher Plants-Advances and Potential" Ed: Kasha,K.J., Univ. of Guelph, p: 123-135.
- Nitsch,C., Noreel,B.S., 1973. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultivate dans l'anthere ou isole de l'anthere. C.R. Seanc. Acad.Sci. (Paris), Ser. D 276: 303-306.

- Nitsch, J.P., 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*.
Phytomorphology 19, 389-404.
- Nitsch, J.P., 1971. La production in vitro e'embryons haploides: Resultats et perspectives. In: Colloques Internationaux CNRS. Les Cultures de Tissus de Plantes. Strasbourg, 281-294.
- Nitsch, J.P., 1972. Haploid plants from pollen. Z. Pflanzenzüchtung 67: 3-18.
- Nitsch, J.P., Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163: 85-87.
- Noth, M.H., Abel, W.O., 1971. The development of haploid plants from immature microspores of various *Nicotiana* species. Z.Pflanzenzüchtung 65: 277-284.
- Novak, F.J., 1974. Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp. Z.Pflanzenzüchtung 72: 46-54
- Pelletier, G., Ilami, M., 1972. Les facteurs de l'androgeneses in vitro chez *Nicotiana tabacum*. Z.Pflanzenphysiol. 68: 97-114.
- Perez-Bermudez, P., Cornejo, M.J., Segura, J., 1985. Pollen plant formation from anther cultures of *Digitalis obscura* L. Plant Cell Tissue Organ Culture 5: 63-68.
- Picard, E., De Buyser, J. 1973. High Production of embryoids in anther cluture of pollen derived homozygous spring wheats. Ann. Amelior. Plantes 27(4): 483-488.
- Pochard, E., Dumas de Vaulx R., 1971. La monoploidie chez le piment. Z.Pflanzenzüchtung. 65: 23-46.

- Powell, W., Uhrig, H., 1987. Anther culture of *Solanum* genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 11: 13-24.
- Radojevic, L., 1978. In vitro induction of androgenic plantlets in *Aesculus hippocastanum*. *Protoplasma*. 96: 369-374.
- Raina, S.K., Iyer, R.D., 1973. Differentiation of diploid plants from pollen callus in anther cultures of *Solanum melongena* L. *Z. Pflanzenzüchtung*, 70: 275-280.
- Rajasekaran, K., Mullins, M.G., 1979. Embryos and Plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J. of Exp. Bot.* 30 (116): 399-407.
- Rashid, A., 1982. Induction of embryos in pollen cultures of *Nicotiana sylvestris*. *Physiol. Plant.* 56: 223-224.
- Rashid, A., 1983. Pollen dimorphism in relation to pollen plant formation. *Physiol. Plant.* 58: 544-548.
- Rashid, A., Reinert, J., 1981. Differentiation of embryogenic pollen in cold-treated buds of *Nicotiana tabacum* var. Badischer Burley and nutritional requirements of the isolated pollen to form embryos. *Protoplasma* 106: 137-144.
- Rashid, A., Siddiqui, A.W., Reinert, J., 1981. Ultrastructure of embryogenic pollen of *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma* 107: 375-385.
- Rashid, A., Street, H.E., 1973. The development of haploid embryoids from anther cultures of *Atropa belladonna* L. *Planta*, 113: 263-270.

- Reinert, J., Bajaj, Y.P.S., 1977. Anther Culture: Haploid Production and Its Significance. In "Plant Cell, Tissue and Organ Culture". Eds: J.Reinert and Y.P.S. Bajaj., Springer-Verlag, New York, p:251-264.
- Research Group of Haploid Breeding , 1978. Induction of haploid plants of *Solanum melongena* L. Prov. Symp. Plant Tissue Culture, Peking, p: 223-226
- Rotino, G., Falavigna, A., Restaino, F., 1987 a. Production of anther-derived plantlets of eggplant. *Capsicum Newsletter* 6; 89-90.
- Rotino, G., Falavigna, A., Fiume, F., Nervo, G., Restaino, F., 1987 b. Possibility of eggplant (*Solanum melongena* L.) improvement through in vitro techniques. *Genetica Agraria*, Vol: XLI, N:3, 314-315, Roma.
- San Noeum, L.H., 1976. Haploides d'*Hordeum vulgare* L., par culture in vitro d'ovaires non fécondes. *Ann.Amelior. Plantes*, 26(4): 751-754.
- Sauton, A., 1987. Recherche d'haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.), Etude et application a la selection de la parthenogenese induit par du pollen irradié. These (Doctorat), USTL Montpellier, 123 p.
- Seitz, H.U., Seitz, U., Alfermann, W., 1985. Pflanzliche Gewebekultur. Ein Praktikum. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 115 p.
- Sevimay, C.S., 1986. Diploid Çok Yıllık Çavdardan (*Secale montanum* Guss.) Kolkisin Etkisi İle Tetraploid Çavdarın Elde Edilmesi. A.Ü.Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 33 s.

- Shanon, P.R.M., Nicholson, A.E., Dunwell, J.M., Davies, D.R., 1985. Effect of anther orientation on microspore-callus production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 271-280.
- Sharp, W.R., Raskin, N.S., 1972. The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. *Planta* (Berl.) 104: 357-361.
- Sibi, M., Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D., 1979. Obtention de plantes haploides par androïenese in vitro chez le piment (*C. annuum* L.) *Ann. Amélior. Plantes*. 29(5): 583-606.
- Sink, K.C., Padmanabhan, V., 1977. Anther and pollen culture to produce haploids: Progress and application for the plant breeder. *Hort Sci.* 12: 143-148.
- Sopory, S.K., 1979. Effect of sucrose, hormones, and metabolic inhibitors on the development of pollen embryoids in anther cultures of dihaploid *Solanum tuberosum*. *Can. J. Bot.* 57: 2691-2694.
- Sopory, S.K., Jacobsen, E., Wenzel, G., 1978. Production monohaploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*. *Plant Sci. Letters*, 12: 47-54.
- Sopory, S.K., Maheshwari, S.C., 1976. Development of pollen embryoids in anther cultures of *Datura innoxia*. *J. of Exp. Bot.* 27 (96): 49-57.
- Street, H.E., 1973. *Plant Tissue and Cell Culture*. Blackwell Sci. Publ. Oxford.

- Sunderland, N., 1971. Anther culture: a progress report. *Sci. Prog. Oxf.* 59: 527-549.
- Sunderland, N., Dunwell, M., 1977. Anther and pollen culture. In: "Plant Tissue and Cell Culture (H.E. Street, ed.), Blackwell Publ., Oxford, p: 223-265.
- Sunderland, N., Roberts, M., 1977. New approach to pollen culture. *Nature* 270: 236-238.
- Sunderland, N., Roberts, M., 1979. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann. Bot.* 43: 405-414.
- Sunderland, N., Wildon, D.C., 1979. A note on the pretreatment of excised flower buds in float culture of *Hyoscyamus* anthers. *Plant Sci. Letters* 15: 169-175.
- Thurling, N., Chay, P.M., 1984. The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspores in cultured anthers of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Ann. Bot.* 54: 681-693.
- Tomes, D.T., Collins, G.B., 1976. Factors affecting haploid plant production from in vitro anther culture of *Nicotiana* species. *Crop. Sci.* 16: 837-840.
- Tsay, H.S., Miao, S.H., Widholm, J.M., 1986. Factors effecting haploid plant regeneration from maize anther culture. *J. Plant Physiol.* 126: 33-40.
- Tuberosa, R., Sanguineti, M.C., Conti, S., 1987. Anther culture of egg-plant (*Solanum melongena* L.) lines and hybrids. *Genetica Agraria* 41: 267-274.

- Tulecke, W., 1953. A tissue derived pollen of *Ginkgo biloba*.
Science 117:599-600.
- Tulecke, W., 1959. The pollen cultures of C.D. La Rue: a tissue from the pollen of *Taxus*. Bull. Torrey Bot. Club 86: 283-289.
- Vasil, I.K., 1980. Androgenetic haploids. In: "International Review of Cytology" Ed: Bourne, G.H., Danielli, J.F., Jeon, K.W. Suppl. 11 A: "Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture". Acad. Press. New York, 195-223.
- Vidalie, H., 1984. La culture in vitro et ses applications horticoles. Tech. Docum. Lavoisier, Paris, 151p.
- Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C., Chien, N.F., 1973. The induction of pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annuum* from anther culture. Science Sin. 16: 147-151.
- Weatherhead, M.A., Burdon, J., Henshaw, G.G., 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. Z. Pflanzenphysiol. 89: 141-147.
- Wenzel, G., Thomas, E., 1974. Observations on growth in culture of anthers of *Secale cereale*. Z. Pflanzenzüchtung. 72: 89-94.
- Wernicke, W., Kohlenbach, H.W., 1976. Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. Z. Pflanzenphysiol., 79: 189: 198.
- Wilson, H.M., Mix, G., Foroughi-Wehr, B., 1978. Early microspore divisions and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anthers of *Hordeum vulgare* L. J. Exp. Bot. 29 (108):227-238.

Yamada,T., Shoji,T., Sinoto,Y., 1963. Formation of calli and free cells in the tissue culture of *Tradescantia reflexa*. Bot.Mag., Tokyo 76: 332-339.

Yentür,S., 1982. Bitki Anatomisi. İ.Ü.Fen Fak. Yayınları, Rektörlük No: 3283, Dekanlık No: 191. İ.Ü.Fen Fak.Basımevi, İstanbul, 563 s.

Zamir,D., Richard,J., Kedar,N., 1980. Anther culture of male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants. Plant Sci. Letters, 17: 353-361.