

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FARKLI UYGULAMALARIN LAHANALARDA MİKROSPOR KÜLTÜRÜ
YOLUYLA EMBRİYO UYARTIMINA ETKİSİ**

Burcu TUNCER

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2010**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

FARKLI UYGULAMALARIN LAHANALARDA MİKROSPOR KÜLTÜRÜ YOLUYLA EMBRİYO UYARTIMINA ETKİSİ

Burcu TUNCER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ruhsar YANMAZ

Araştırmada, beyaz baş lahanada (*B. oleracea* var. *capitata* subvar. *alba*), yaprak lahanada (*B. oleracea* var. *acephala*) ve süs lahanasında (*B. oleracea* var. *acephala* cv. Chidori Red F1) mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo elde etme olanakları üzerinde çalışılmıştır.

Bu amaçla NLN-13 ortamında izole edilip kültüre alınan (40.000 mikrospor/ml) mikrospora haploid embriyo oluşumunu uyartmak amacıyla ilk yıl 3 farklı sıcaklık ve süre (30°C, 32°C ve 35°C 1-2-3 gün), 3 kolhisin dozu (25 mg/l, 50 mg/l ve 100 mg/l) ve aktif kömür (0.1-0.2 ml/petri) uygulaması yapılmıştır. İlk yıl denemelerinde çoğu uygulamada görülen enfeksiyon nedeniyle embriyo sayımları yapılamamıştır. İkinci yıl denemelerinde 2 sıcaklık (32°C ve 35°C'de 2 gün), 2 kolhisin dozu (50 mg/l ve 100 mg/l), ortam yenileme (NLN-16 / NLN-13, NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-16, NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-13) ile yaprak lahanada (100 Gy, 300 Gy) ve süs lahanasında (50 Gy, 75 Gy, 100 Gy, 300 Gy) gama ışını uygulamalarının mikrospor kültürü yoluyla embriyo uyartımına etkisi araştırılmıştır.

12. ve 19. gün sayım ortalamalarına göre, embriyo oluşumunu uyartmada yaprak lahanada 35°C (5.0 embriyo/petri), Erciş lahanasında 32°C (4.3 embriyo/petri) etkili bulunmuş, Yalova-1 baş lahanada 32°C (3.2 embriyo/petri, 35°C-2.4 embriyo/petri) ve süs lahanasının (32°C-7.9 embriyo/petri, 35°C-7.1 embriyo/petri) sıcaklık yönünden seçici olmadığı saptanmıştır. Kolhisin ve sıcaklık uygulamalarının birlikte yapıldığı denemelerde doz ve sıcaklık interaksiyonunun bulunması nedeniyle faktörler bağımsız değerlendirilememiştir. Bununla birlikte Yalova-1 baş lahanada 32°C + 50 mg/l kolhisin (5.3 embriyo/petri), süs lahanasında 35°C+50 mg/l kolhisin (9.4 embriyo/petri) uygulamalarında daha yüksek embriyo sayısı elde edilmiştir. Yaprak ve süs lahanasında gama ışını uygulamalarının etkisi de sıcaklığa bağlı olarak değişim göstermiştir. Işınlanmış tomurcukların 4°C'de kuru ve sıvı (NLN-13) ortamda bekletildiği uygulamalardan yaprak lahanada kuru, süs lahanasında ise sıvı koşullarda bekletmenin yine sıcaklığa bağlı olarak uyartımı sağlamada etkisi görülmüştür. Ortam yenileme uygulamalarının etkisi lahanada türlerine göre farklılık göstermekle birlikte kolhisin katılmış ortam yenileme uygulamasının (Erciş lahanasında 3.9 embriyo/petri) daha etkili olabileceği görülmüştür. Süs lahanası ise ortam yenileme uygulamasına olumlu cevap vermemiştir.

Nisan 2010, 96 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Brassica oleracea*, Mikrospor Kültürü, Embriyo Uyartımı, Sıcaklık Şoku, Kolhisin, Ortam Yenileme, Gama Işını

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE EFFECT OF DIFFERENT TREATMENTS ON EMBRYO INDUCTION OF CABBAGES VIA MICROSPORE CULTURE

Burcu TUNCER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Ruhsar YANMAZ

In this study, the possibility to obtain haploid embryo using microspore culture in white head cabbage (*B.oleracea* var. *capitata* subvar. *alba*), kale (*B.oleracea* var. *acephala*) and ornamental kale (*B.oleracea* var. *acephala* cv. Chidori Red F1) was determined.

For this reason, in order to promote haploid embryo production, microspores cultured in NLN-13 medium (40.000 microspores/ml) were treated with 3 different temperatures and periods (30°C, 32°C and 35°C for 1-2-3 days), three colchicine doses (25 mg/l, 50 mg/l and 100 mg/l) and activated charcoal (0.1-0.2 ml/petri dish) in the first year. Due to the infections in most of the treatments, embryo countings could not be performed. In the second year of the experiments, the effect of 2 temperatures (2 days in 32°C and 35 °C), 2 colchicine doses (50mg/l and 100 mg/l), refreshing media (NLN-16/NLN-13, NLN-16+50 mg/l colchicine / NLN-16, NLN-16+50 mg/l colchicine / NLN-13) and gamma treatments (100 Gy, 300 Gy) in kale and (50 Gy, 75 Gy, 100 Gy, 300 Gy) in ornamental kales were tested on embryo induction by microspore culture.

According to the mean countings of 12th and 19th days, 35°C in kales (5.0 embryo/petri dish), 32°C in Ercis cabbage (4.3 embryo/petri dish) was found effective, while Yalova-1 head cabbage cultivar (32°C-3.2 embryo/petri dish, 35°C-2.4 embryo/petri dish) and ornamental kales (32°C-7.9 embryo/petri dish, 35°C-7.1 embryo/petri dish) were not selective in terms of temperature. Due to the presence of dose and temperature interaction with experiments conducted in combination with colchicine and heat treatments, the factors could not be evaluated independently. In addition, higher number of embryos were obtained in Yalova-1 head cabbage cultivar at 32°C + 50 mg/l colchicine (5.3 embryo/petri dish), and ornamental kales at 35°C+50 mg/l colchicine (9.4 embryo/petri dish). The effect of gamma radiation varied according to temperature in kale and ornamental kale. Among treatments where irradiated buds were maintained at 4°C in dry and liquid (NLN-13) conditions, maintaining kales in dry conditions and ornamental kales in liquid conditions were effective in embryo induction depending on the temperature. It was determined that the effect of medium refreshment was variable depending on different species and inclusion of colchicine to the medium refreshment was more effective in (Ercis cabbage, 3.9 embryo/petri dish). Medium refreshment was not effective in ornamental kales.

April 2010, 96 pages

Key Words: *Brassica oleracea*, Microspore Culture, Embryo Induction, Heat Shock, Colchicine, Medium Refreshing, Gamma Irridation

TEŞEKKÜR

Doktora tezimi yapmak üzere ülkemizde *Brassica* türlerinde ilk kez yapılacak olan mikrospor kültürü konusunda çalışmamı olanak sağlayan ve çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ruhsar YANMAZ'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı), tez çalışmam boyunca yaptıkları katkılardan dolayı Tez İzleme Komitesi Üyeleri Sayın hocalarım Prof. Dr. Kazım ABAK (Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı), Ankara Üniversitesinde eğitim almam için bana izin veren Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü'ne, tezimin yürütülmesinde maddi kaynak sağlayan, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı ve Bilim İnsanı Yetiştirme Projesi (BIYEP) çerçevesinde Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne, çalışmam boyunca desteğini gördüğüm hocalarım Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı), Prof. Dr. İbrahim DEMİR ve Prof. Dr. Birhan KUNTER'e (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı), istatistiki analizlerimin yapılması aşamasında yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Sıddık KESKİN'e (Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı), gama uygulamalarının yapılmasına olanak sağlayan Dr. Yaprak KANTOĞLU'na (Türkiye Atom Enerjisi Kurumu) laboratuvar çalışmalarım süresince yardımlarını gördüğüm arkadaşım Araş. Gör Faika YARALI'ya (Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis Meslek Yüksekokulu), 2005 yılından beri çalışmalarımı yürüttüğüm Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda görevli hocalarıma, arkadaşlarıma ve idari personeline, doktoram boyunca hep yanımda olan, biricik kızım Irmak TUNCER'in sıcak bir aile ortamında büyümesini sağlayan, hiçbir zaman benden, hoşgörü ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili annem Cevriye DÜZELTİR, babam Kemal DÜZELTİR ve kızkardeşim Burçin DÜZELTİR'e, doktoram boyunca yanımda olamasa da, her zaman desteğini gördüğüm sevgili eşim Dr. Selçuk Seçkin TUNCER'e (Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootehni Anabilim Dalı) sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora tez çalışması, 2007-FBE-D81 no'lu proje ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından ve,

2005K120140 kod no'lu Bilim İnsanı Yetiştirme konulu (BIYEP) proje ile Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü ve Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından desteklenmiştir.

Burcu TUNCER
Ankara, Nisan 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	7
2.1 Tür ve Genotip.....	8
2.2 Ana Bitkinin Yetiştirildiği Koşullar.....	9
2.3 Tomurcuk ve Mikrospor Gelişme Dönemi.....	10
2.4 İzolasyon Yöntemi.....	13
2.5 Mikrospor Yoğunluğu.....	14
2.6 Haploid Embriyo Oluşumunu Uyarıcı Uygulamalar.....	14
2.6.1 Sıcaklık şokları.....	15
2.6.2 Kolhisin uygulamaları.....	17
2.6.3 Gama radyasyonu uygulamaları.....	18
2.6.4 Aktif kömür uygulamaları.....	19
2.6.5 Ortam yenileme uygulamaları.....	20
2.7 Besin Ortamının Bileşimi ve Yapısı.....	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1 Materyal.....	30
3.2 Yöntem.....	30
3.2.1 Ana (donör) bitkilerin yetiştirilmesi.....	30
3.2.2 Bitkilerin kışlatılması.....	32
3.2.3 Bitkilerin çiçeklenme için dikimi.....	33
3.2.4 Mikrospor kültürü için uygun tomurcuk gelişme devresi, mikrospor gelişme dönemi ve mikrospor canlılığının belirlenmesi.....	35
3.2.5 Mikrospor kültürü çalışmaları.....	36
3.2.5.1 Tomurcuk sterilizasyonu.....	36

3.2.5.2 Mikrosporların izolasyonu.....	37
3.2.5.3 Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi.....	39
3.2.6 Mikrosporların kültüre alınması.....	40
3.2.7 Mikrospordan haploid embriyo oluşumunu uyarmak için yapılan uygulamalar.....	41
3.2.7.1 Sıcaklık uygulaması.....	41
3.2.7.2 Kolhisin uygulaması.....	42
3.2.7.3 Aktif kömür uygulaması.....	45
3.2.7.4 Gama ışını uygulaması.....	45
3.2.7.5 Besin ortamını yenileme uygulamaları.....	46
3.2.8 Embrioların çimlendirilmesi.....	47
3.2.9 Yapılan ölçüm ve değerlendirmeler.....	47
3.2.10 İstatistiki değerlendirme.....	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	48
4.1 Mikrospor Kültürü İçin Uygun Tomurcuk Gelişme Devresi, Mikrospor Gelişme Dönemi ve Mikrospor Canlılığının Belirlenmesi.....	48
4.2 Farklı Uygulamaların Haploid Embriyo Oluşumu Üzerine Etkileri.....	53
4.2.1 Birinci yıl sonuçları.....	53
4.2.2 İkinci yıl sonuçları.....	55
4.2.2.1 Sıcaklık uygulaması.....	56
4.2.2.2 Kolhisin uygulaması.....	57
4.2.2.3 Gama uygulaması.....	66
4.2.2.4 Besin ortamını yenileme uygulamaları.....	74
4.3 Embrioların Çimlendirilmesi.....	75
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	78
5.1 Mikrospor Kültürü İçin Uygun Tomurcuk Gelişme Devresi, Mikrospor Gelişme Dönemi ve Mikrospor Canlılığının Belirlenmesi	78
5.2 Sıcaklık Uygulamaları.....	80
5.3 Kolhisin Uygulamaları.....	80
5.4 Gama Uygulamaları.....	81
5.5 Aktif Kömür Uygulamaları.....	82
5.6 Besin Ortamını Yenileme Uygulamaları.....	83

5.7 Embriyo Sayım Süresinin Belirlenmesi.....	83
5.8 Embriyoların Çimlendirilmesi.....	85
KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	95

SİMGELER DİZİNİ

ABA	Absizik asit
AC	Aktif kömür
AgNO ₃	Gümüş nitrat
BAP	Benzilaminopürin
BA	Benziladenin
B5	Gamborg besin ortamı (1968)
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
DAPI	4', 6-diaminido-2-phenylindole
DES	Dikilen embriyo sayısı
E	Embriyo
E	Enfeksiyon
FDA	Fluorescein di acetate
GY	Gelişme yok
g	Gram
g/l	Gram/litre
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
NLN	Nitsch ve Nitsch (1967) tarafından geliştirilen Lichter (1981, 1982) tarafından modifiye edilen besin ortamı
mg	Miligram
mg/l	Miligram/litre
mm	Milimetre
mm ³	Milimetreküp
l	Litre
ml	Mililitre
Mm	Milimolar

μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
t	Ton
KH_2PO_4	Potasyum fosfat
KNO_3	Potasyum nitrat
$\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum nitrat tetrahidrat
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum sülfat hegzahidrat
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Bakır sülfat pentahidrat
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Kobalt klorür heptahidart
H_3BO_3	Borik asit
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Mangan sülfat tetrahidrat
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum Klorür dihidrat
NH_4NO_3	Amonyum nitrat
NaFeEDTA	Sodyum demir etta
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Disodyum molibdat hidrat
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Çinko sülfat hegzahidrat
İS	İzolasyon sayısı
PS	Petri sayısı
Gy	Gray
PEG	Polietilen glikol
NAA	Naftelen asetik asit
R	Rejenerasyon
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Mikrospor kültürü ve anter kültürünün şematik gösterimi.....	3
Şekil 3.1 Dikim sonrası gelişmekte olan bitkilerin tarladaki görünümü.....	31
Şekil 3.2.a. Lahana, b. süs lahanası bitkilerinin genel görünümü.....	32
Şekil 3.3 Serada hendeklere dikilen köklü lahana bitkileri.....	33
Şekil 3.4.a. Araziye dikilen lahana bitkileri, b. kışı arazide geçiren süs lahanaları.....	34
Şekil 3.5 İkinci yıl araziye çıkarılmayıp serada kışlatılan bitkiler.....	34
Şekil 3.6 Filtrasyon ünitesi ve kabin içinde besin ortamının sterilizasyonunun yapılışı.....	38
Şekil 3.7 Mikrospor süspansiyonunun süzülmesinde kullanılan elek sistemi.....	38
Şekil 3.8 Santrifüj işleminin yapılışı.....	38
Şekil 3.9 Santrifüj işlemi sonucunda çökelen mikrosporlar.....	38
Şekil 3.10 Thoma lamının yandan görünüşü.....	39
Şekil 3.11 Thoma lamındaki sayım yapılan kareler.....	40
Şekil 3.12 İnkübatörde bekleme alınan petriler.....	41
Şekil 3.13 Orbital çalkalayıcı üzerine alınan petriler.....	41
Şekil 3.14 Kolhisin katılmış ortamlardaki mikrosporların orbital çalkalayıcıdaki görünümü.....	43
Şekil 4.1 Asetokarminle boyanmış: a. tetraat aşaması (Yalova-1, 2. gelişme dönemi), b. tek çekirdekli mikrosporlar (yaprak lahana, 1. gelişme dönemi).....	49
Şekil 4.2 DAPI ile boyanmış: a. tek çekirdekli mikrospor (Yalova-1, 2. gelişme dönemi), b. olgun polen (süs lahanası, 3. gelişme dönemi).....	50
Şekil 4.3 Kültüre alınan mikrosporda 28 gün sonra görülen: a. simetrik çekirdek bölünmesi (32°C 2 gün + kontrol, Yalova-1), b. çok çekirdekli yapı (32°C 2 gün + 50 mg kolhisin, süs lahanası), c. çoklu hücre grubu (32°C 2 gün + kontrol, yaprak lahana) ve d. çoklu hücre yapısı (32°C 3 gün + 25 mg kolhisin, yaprak lahana).....	50
Şekil 4.4 Farklı gelişme dönemine ait tomurcuklar.....	51
Şekil 4.5 Çiçek salkımı üzerinde tomurcukların dizilişi ve iç halkadaki tomurcuklar.....	52
Şekil 4.6 Kültür ortamında FDA ile boyanmış canlı mikrosporlar.....	53

Şekil 4.7 Mikrospor kültüründe 28 gün sonra görülen: a. yürek şekilli embriyo (32°C 2 gün + 50 mg/l kolhisin, yaprak lahanası), b. yürek şekilli embriyo (35°C 2 gün +kontrol, süs lahanası), c. globular embriyolar (32°C 2 gün + kontrol, yaprak lahanası), d. gelişmiş embriyo (35°C 1 gün + kontrol, süs lahanası).....	55
Şekil 4.8 Kültür süresinin 12. gününde görülen: a. yürek şekilli embriyo (32°C + 50 mg/l kolhisin Yalova-1), b. torpido embriyo (35°C + kontrol, Yalova-1), c. torpido embriyo (32°C + kontrol, Erciş lahanası),19 günlük embriyolar: d. anormal embriyo (32°C + kontrol, Erciş lahanası), e. torpido embriyo (32°C + 50 mg/l kolhisin, Yalova-1), f. yürüyen çubuk şekilli embriyo (32°C + 50 mg/l kolhisin, Yalova-1).....	59
Şekil 4.9 Yaprak lahanada farklı kolhisin doz ortalamalarının embriyo sayısına etkisi.....	61
Şekil 4.10 12 günlük anormal embriyolar: a. 35°C + 100 mg/l kolhisin, b. 32°C + 100 mg/l kolhisin, 19 günlük anormal embriyolar: c., d. ve e. 32°C + 100 mg/l kolhisin, f. 35°C + 100 mg/l kolhisin.....	62
Şekil 4.11 Süs lahanasında farklı kolhisin doz ortalamalarının embriyo sayısına etkisi.....	64
Şekil 4.12 Süs lahanasında 12 günlük: a. gelişmiş embriyo (32°C + kontrol), 19 günlük: b. yürüyen çubuk şekilli embriyo (32°C+ kontrol), c. gelişmiş embriyo (32°C + 50 mg/l kolhisin), d. gelişmiş embriyo (32°C + kontrol).....	65
Şekil 4.13 12 günlük: a. torpido embriyo (32°C + 100 Gy-kuru), b. anormal embriyo (35°C + 300 Gy-kuru).....	68
Şekil 4.14 12 günlük: a. torpido embriyo (32°C + 300 Gy), b. anormal embriyo 32°C +75 Gy)......	70
Şekil 4.15 a., b., c. Farklılaşmış yapılar (32°C + 50 Gy-sıvı), d. ezilmemiş anter dokusu, e. 12 günlük geç torpido embriyo, f. 19 günlük gelişmiş embriyo (32°C + 50 Gy sıvı).....	73
Şekil 4.16 Çimlendirme ortamına aktarılan yapılarda enfeksiyon oluşumu.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Farklı <i>Brassica</i> türlerinde embriyo oluşumunu uyarıcı stres uygulamaları...	15
Çizelge 3.1 Lahanalarda ekim ve dikim zamanları ile dikilen toplam bitki sayısı.....	31
Çizelge 3.2 Mikrospor izolasyonu ve kültüre alınmasında kullanılan sıvı NLN-13 ortamının bileşimi.....	37
Çizelge 3.3 Lahana türlerinde kullanılan sıcaklık uygulamaları.....	42
Çizelge 3.4 Denemelerde yer alan kolhisin uygulamaları.....	44
Çizelge 3.5 Denemelerde yer alan besin ortamı yenileme uygulamaları.....	46
Çizelge 4.1 Lahana türlerinde tomurcuk iriliğine göre tomurcuk özellikleri.....	48
Çizelge 4.2 İlk yıl denemelerinde umutvar bulunan uygulamalar.....	54
Çizelge 4.3 Lahana türlerinde sıcaklık şokunun embriyo sayısına etkisi (12. gün).....	56
Çizelge 4.4 Lahana türlerinde sıcaklık şokunun embriyo sayısına etkisi (19. gün).....	57
Çizelge 4.5 Baş lahanada (Yalova-1 ve Erciş) farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (12. gün).....	58
Çizelge 4.6 Baş lahanada (Yalova-1 ve Erciş) farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (19. gün).....	58
Çizelge 4.7 Yaprak lahanada farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (12. gün).....	60
Çizelge 4.8 Yaprak lahanada farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (19. gün).....	60
Çizelge 4.9 Süs lahanasında farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (12. gün).....	63
Çizelge 4.10 Süs lahanasında farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (19. gün).....	64
Çizelge 4.11 Yaprak lahanada farklı sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (12. gün).....	66
Çizelge 4.12 Yaprak lahanada farklı sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (19. gün).....	67
Çizelge 4.13 Yaprak lahanada farklı saklama koşulu, sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (12. gün).....	67

Çizelge 4.14 Yaprak lahanada farklı saklama koşulu, sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (19. gün).....	68
Çizelge 4.15 Süs lahanasında farklı sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (12. gün).....	69
Çizelge 4.16 Süs lahanasında farklı sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (19. gün).....	70
Çizelge 4.17 Süs lahanasında farklı saklama koşulu, sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (12. gün).....	71
Çizelge 4.18 Süs lahanasında farklı saklama koşulu, sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (19. gün).....	72
Çizelge 4.19 Farklı lahana türlerinde ortam yenileme uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (12. gün).....	74
Çizelge 4.20 Farklı lahana türlerinde ortam yenileme uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (19. gün).....	75
Çizelge 4.21 Uygulamalara göre çimlendirme ortamına aktarılan embriyo sayıları ve gelişme durumları	76

1. GİRİŞ

Lahana grubu sebzeler, serin iklim sebze türleri yetiştiriciliğinde önemli bir paya sahip olan ve en fazla üretimi yapılan sebze türleridir. Ülkemizde lahana grubu sebzelerin (beyaz baş lahana, kırmızı lahana, yaprak lahana, brüksel lahanası) toplam üretimi 674.017 t olup, bu üretimin 487.744 t'ü beyaz baş lahana, 80.225 t'ü yaprak lahana, 104.583 t'ü kırmızı lahana ve 1.465 t'ü da brüksel lahanasına aittir. Yaprağı yenilen sebzelerin üretimi ise toplam 1.459.058 t'dur (Anonymous 2008). Geçmiş yıllarda lahanalar ülkemizde üreticiye yüksek gelir getiren türler olmamasına rağmen, son yıllarda özellikle sağlık değerlerinin ön plana çıkarılmasıyla pazar değerleri de yükselmiştir. Süs lahanaları da ülkemizde süs bitkisi olarak yaygın bir şekilde kullanım alanı bulmasına rağmen, istatistiklerde üretim miktarı ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak konuyla ilgili yapılan araştırmalar sonucunda, Ankara genelinde 150.000-200.000 adet süs lahanası fidesinin dikildiği belirlenmiştir. Özellikle iç bölgelerimizdeki belediyelerin de süs lahanası talepleri düşünüldüğünde, bu sayının 1.000.000 adet üzerinde olabileceği tahmin edilmektedir (Yanmaz ve Tuncer 2008).

Ülkemiz lahana üretimi yönünden zengin olduğu kadar gen kaynakları yönünden de zengindir (Yanmaz vd. 2000, Balkaya vd. 2005). Ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen türler olmalarına karşın, ıslah çalışmalarının uzun yıllar alması, hibrid üretiminin zorluğu ve yavaşlığı, yurt dışından tohum girişi nedeniyle bu türler üzerinde yapılan ıslah çalışmalarının çok az ve yetersiz olduğu görülmektedir (Yanmaz vd. 2002). Ürün kalitesinin yükseltilebilmesi için kaliteli çeşit geliştirilmesi lahana ıslahının amaçları arasında yer almaktadır. Ülkemizde lahana gen kaynaklarının toplanması ve çeşit geliştirilmesi amacıyla Ege Bölgesi (Şalk 1982), Marmara Bölgesi (Şimşek ve Sürmeli 1991) ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde (Alan ve Padem 1995) çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda bugüne kadar ancak 2 tane beyaz baş lahana çeşidi (Yalova 1 ve Yalova) tescil edilmiş; 4 adet F1 (Cerox, Hinova, Cabton, Bowie), 5 adet standart beyaz baş lahana çeşidi (Bayraklı 85, Atlas, Globe Master, Grandslam, Ancoma) ise standart tohumluk kaydı altına alınmıştır. Ülkemizde henüz geliştirilmiş olan hibrit lahana çeşidi ise bulunmamaktadır. Bununla birlikte Tarım Bakanlığı TAGEM bünyesinde 1999 yılından beri Tarım Bakanlığı ile ortaklaşa yürütülen projede lahana hibritlerinin

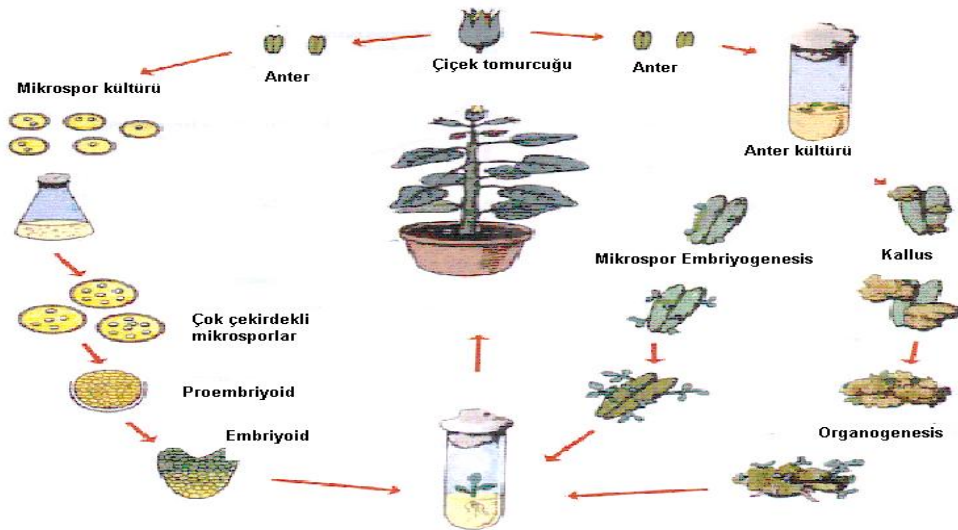
geliştirilmesi için saf hat geliştirme çalışmaları devam ettirilmekte ve hibrit lahanada geliştirme projesi kapsamında ıslah edilmiş lahanada hatları da bulunmaktadır. Geliştirilen hatlarla hibrit kombinasyonları oluşturulmaya başlanmıştır. Ancak klasik ıslah yöntemleri kullanılarak devam ettirilen ıslah çalışmaları sonucunda ancak 5. ve 6. kendileme generasyonlarına ulaşılmıştır.

Yaprak lahanada ise, TÜBİTAK tarafından destek gören seleksiyon çalışmaları ile Karadeniz Bölgesi'ndeki yaprak lahanada gen kaynakları toplanmış ve tüketime uygun tipler belirlenmiştir (Balkaya ve Yanmaz 2005). Şu anda seçilen hatlardan 3 tanesi tescil denemelerine sunulmuştur. Ancak lahanaların yabancı tozlanma oranının yüksek olması ve 2 yılda bir tohum alma zorunluluğu nedeniyle ıslah çalışmaları çok yavaş ilerlemektedir. Oysa tüketici tercihleri çok hızlı değişim gösterebilmektedir. Bu nedenle ıslah çalışmalarının süresini kısaltmak, çeşit adaylarını ve özellikle hibrit ıslahında kullanılan ebeveynlerin saf hatlarını kısa sürede elde etmek büyük önem kazanmaktadır.

Günümüzde çeşit geliştirme çalışmalarında kullanılacak homozigot saf hatların daha kısa sürede elde edilmesini sağlamak amacıyla dihaploidler (Doubled haploids) önemli avantaj sağlamaktadır. Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitki adı verilmektedir. Haploid bitkiler, homolog kromozomlardan sadece bir takımını içerdiğinden, resesif genlerin etkisi ilk generasyonda ortaya çıkabilmekte ve bu özellikleri ile genetik, sitogenetik ve ıslah çalışmalarında önemli yer tutmaktadırlar.

Haploid bitkilerin ıslah programlarında kullanılabilmesi için bunların yeniden verimli diploid bitkilere dönüştürülmeleri gerekmektedir. Haploid bir bitkinin kromozom sayısının bazı kimyasal maddelerle katlanması sonucu, türün normal kromozom sayısına yeniden kavuşturulması ve mutlak homozigot bitkilerin elde edilmesine dihaploidizasyon, bu yolla geliştirilen hatlara da dihaploid hat denilmektedir. Dihaploidizasyon tekniği; arpa, buğday, mısır, çeltik, kolza, biber, patlıcan, *Brassica* türleri, gerbara, kavun, karpuz, kabakta yaygın olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde haploid bitkiler; erkek gametin başlangıç materyali olarak kullanıldığı androgenetik yöntemler (anter ve mikrospor kültürü) ve dişi gametin başlangıç materyali olarak kullanıldığı ginogenetik yöntemler (yumurta (ovül) ve yumurtalık (ovaryum) kültürü, kromozom eliminasyonu, eksik veya yetersiz polenlerle tozlama) ile elde edilebilmektedir. Ancak her türde dihaploidizasyon yoluyla saf hat geliştirilmesi sağlanamamakta, türün dihaploidizasyona yatkınlığı önemli rol oynamaktadır. Ayrıca her tür farklı dihaploidizasyon tekniğinin kullanılmasını isteyebilmektedir. Örneğin; lahanada gruba türler anter ve mikrospor kültürüne cevap verirken kabakgil türlerinde ginogenezis başarılı olabilmektedir. Ancak *Brassica oleracea*'nın birçok formunda; lahanada (Roulund vd. 1991, Dias ve Martin 1999, Yanmaz vd. 2002) brüksel lahanasında (Ockendon 1984, Biddington ve Robinson 1991) ve brokolide (Arnison vd. 1990, Paksoy vd. 1995) anter kültürü çalışmaları yapılmış, ancak embriyo oluşum yüzdesinin düşük olması, *Brassica* cinsi içine giren bu türlerde anter kültürünün ıslah programlarında kullanımını sınırlandırmıştır. Oysaki *Brassica*'larda, *Gramineae*'lerde ve *Nicotiana*'da mikrospor kültürü çalışmaları anter kültürüyle karşılaştırıldığında daha başarılı bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır (Bajaj 1990). Anter kültürü ve mikrospor kültürü tekniklerinin işleyişi şematik olarak Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Mikrospor kültürü ve anter kültürünün şematik gösterimi (Reynolds 1997)

Mikrospor kültürü, olgunlaşmamış mikrosporların anterlerden izole edilerek *in vitro* koşullarda sıvı besin ortamlarında geliştirilmesi ve bunlardan haploid embriyoların elde edilmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Mikrospor kültürü, anter kültürünün bazı olumsuz özelliklerini ortadan kaldırmak amacıyla anter kültürüne alternatif olarak geliştirilmiş bir yöntemdir. Mikrospor kültürünün anter kültürüne göre üstünlüklerini şu şekilde sıralamak mümkündür:

1. Mikrospor kültürü rejenerasyonun somatik dokulardan meydana gelme riskini tamamen ortadan kaldırmaktadır. Anter kültüründe, mikrospordan başka anter duvarı, anterlerden uzaklaştırılmamış filament, septum, tapetum gibi diploid yapıya sahip dokulardan da rejenerasyon gerçekleşebilmektedir. Mikrospor kültüründe ise diploid yapılar ortamdaki uzaklaştırılmış olduğundan oluşan embriyolar tamamen haploiddir (Ellialtıoğlu vd. 2001).
2. Anter dokusunda bulunan engelleyici maddeler (ABA, toksik bileşikler) ortamdaki uzaklaştırılmış olduğundan sorun olmaktan çıkarlar (Ellialtıoğlu vd. 2001).
3. Anter kültüründe mikrosporlar ortamdaki besin maddelerini anter duvarından geçtikten sonra alabilmektedir. Mikrospor kültüründe ise mikrosporlar ortamdaki besin maddeleri ile doğrudan temas halinde olduklarından besin maddelerini daha iyi bir şekilde alabilmektedir (Ellialtıoğlu vd. 2001).
4. Bazı türlerde (örn: *B.napus*) haploid embriyo verimi anter kültürüne göre daha yüksektir (Siebel ve Pauls 1989).
5. *Gramineae*' larda (örn: buğday) mikrospor kültürü yoluyla anter kültürüne oranla albino bitki oluşumu azalmakta, daha yüksek oranda yeşil bitki oluşumu sağlanmaktadır (Holme vd. 1999).

6. Mikrospor kültüründe mutagenik uygulamalar kolaylıkla yapılabilenkte, mutagenik kimyasal bileşimin uygulanması ve ortamdan uzaklaştırılması santrifüjleme yöntemiyle kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir (Bal 2002). *B.carinata*'da izole edilen mikrospora 10 dakika süreyle UV ışını uygulandığında elde edilen dihaploid hatların tohumlarında gulikonilazat ve erusik asit içeriğinde önemli değişimler olduğu saptanmıştır (Barro vd. 2002).
7. Gen transferi çalışmalarında da avantajlı bir tekniktir. İzole edilen mikrospora kültür ortamında gen aktararak haploid bitkiler, bunlarda da kromozom katlaması sonucu homozigot diploid transgenik bitkiler elde edilebilmektedir. Buğday'da mikrospora ve mikrospor kökenli kalluslara partikül tabancası ile gen aktarımı sonucu transgenik buğday bitkileri elde edilmiştir (Folling ve Olesen 2001).
8. İzole edilmiş mikrospora oluşturduğu populasyon, anter kültüründe kullanılmak üzere seçilen anterlerin oluşturduğu populasyona göre daha homojen bir deney materyalidir. Karma bir mikrospor populasyonunun farklı deneme birimlerine dağıtılması ile elde edilen sonuçların geçerliliği daha fazladır (Bal 2002).
9. Mikrospor kültürü ile varyasyonu daha da azaltmak mümkündür. Mikrospor populasyonları 'santrifüjleme yöntemi' ile birbirinden ayrılabilenkte, istenilen özellikte ve en az varyasyon gösteren mikrospor populasyonu, bulunduğu gradyanttan alınarak homojen deney üniteleri olarak denenen faktörlere dağıtılabilmektedir (Bal 2002).

Mikrospor kültüründe tek çekirdekli mikrospora içeren tomurcuklar veya anterler, farklı türler için geliştirilmiş olan izolasyon ortamında homojenizatör veya cam bağıet yardımıyla ezilerek mikrospora serbest hale gelmesi sağlanmaktadır. Daha sonra süzölen süspansiyon santrifüjlenerek mikrospora oluştan çökelti elde edilmektedir. Çökeltiden istenen yoğunlukta süspansiyonlar hazırlanarak sıvı besin ortamlarına aktarılır ve mikrospora embriyoya dönüşmesi sağlanır.

Ülkemizde mikrospor kültürü çalışmaları ile ilgili detaylı çalışma domateslerde yapılmış, bu çalışma sonucunda simetrik çekirdek bölünmesi ve çok çekirdekli yapıların oluşumu uyarılmış ancak embriyo oluşumu sağlanamamıştır (Bal 2002). Buna karşılık yapılan kaynak taramalarında mikrospor kültürü yoluyla haploid bitkilerin elde edilebildiği belirtilmektedir (Takahata ve Keller 1991, Ferrie vd. 1999, Dias ve Correia 2002, Wei vd. 2008). Daha önce de belirtildiği gibi haploidi ile ilgili çalışmalarımız anter kültürü ile başlamış, ancak başarılı sonuçlar alınamamıştır (Yanmaz vd. 2002).

Bu çalışmalarımızın devamı niteliğinde olan araştırmada, ülkemizde yaygın olarak yetiştirilmekte olan ve halen ıslah çalışmalarının devam ettiği *Brassica* cinsi içine giren türlerden beyaz baş lahanası (*B. oleracea* var. *capitata* subvar. *alba*) ve yaprak lahanası (*B. oleracea* var. *acephala*) ile süs bitkisi olarak kullanılan süs lahanasında mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo elde etme olanaklarını ortaya koymak, ülkemizde henüz kullanılmayan, ancak yurt dışındaki ülkelerde ıslah programları içinde yer alan tekniğin ülkemiz koşullarında optimizasyonunu sağlamak ve bu amaçla gereken araştırmaları yapmak hedeflenmektedir.

Bu amaçla yapılan çalışmada; mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo elde etmek için uygun tomurcuk gelişme devresi ve mikrospor gelişme aşamasının belirlenmesi, optimum mikrospor izolasyon yönteminin belirlenmesi, embriyo oluşumunu uyarıcı uygulamaların (yüksek sıcaklık şoku, aktif kömür, kolhisin, gama ışını ve besin ortamını yenileme uygulamaları) etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Mikrospor kültürü, henüz olgunlaşmasını tamamlamamış mikrosporların anterlerden izole edilerek serbest halde sıvı besin ortamında kültüre alınması şeklinde tanımlanmaktadır.

Mikrospor kültürü tekniğinde mikrosporların anterlerden izole edilmesinden hemen sonra ön uygulama yapılmaksızın kültüre alınması, mikrosporların izole edilmesinden önce anterlerin ön uygulamaya tabi tutulmasından sonra kültüre alınması ya da anterlerin bir sıvı ortamda kültüre alınmasından sonra mikrosporların ortama dökülmesi (anter yüzdürme yöntemi) olmak üzere 3 yöntemle yapılmaktadır (Bal 2002).

Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki elde edilmesi konusundaki ilk çalışma Kameya ve Hinata tarafından 1970 yılında *B.oleraceae* ve *B.oleraceae* x *B. alboglabra* melezi kullanılarak yapılmış ve olgun polen tanelerinden hücre kolonileri elde edilmiş ancak bu çok hücreli yapıların mikrosporların kendi içerisinde bölünmesinden meydana geldiği kesin olarak gösterilememiştir (Bal 2002). Daha sonra Nitsch ve Norreel (1973)'in *Datura innoxia*'da yaptıkları çalışmadan başarılı sonuçlar alınmıştır. *Brassica*'larda gerçek anlamda ilk mikrospor kültürü çalışması *B.napus*'da başarıyla gerçekleştirilmiş (Lichter 1982) ve *B.napus*'un mikrospor embriyogenesi için model bir bitki olduğu bildirilmiştir (Telmer vd. 1992). *Brassica napus* L.'de (F1 hibritleri ve bunların döllerinde) anter kültürü ve mikrospor kültürü tekniklerini karşılaştırıldığında, mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo elde etmenin anter kültürüne oranla daha etkin olduğu ve bu yolla yaklaşık 10 kat daha fazla embriyo elde edildiği belirtilmektedir (Siebel ve Pauls 1989).

Brassica türlerinde mikrospor kültürü çalışmaları, **kolza** (Siebel ve Pauls 1989, Zhao ve Simmonds 1995, Zhang ve Takahata 2001, Segui-Simarro vd. 2003, Weber vd. 2005), **hardal** (Barro ve Martin 1999), **çin lahanası** (Cao vd. 1994, Sato vd. 2005), **brokoli**, **karnabahar**, **baş lahanası**, **kıvırcık yapraklı baş lahanası (savoy cabbage)** **brüksel lahanası** (Takahata ve Keller 1991, Duijs vd. 1992, Ferrie vd. 1999, Dias ve Correia

2002) ve **süs lahanasında** (Wei vd. 2008) başarıyla uygulanabildiği ancak başarı oranının genotipe ve laboratuvar koşullarına göre farklılık gösterdiği belirtilmektedir.

Wang vd. (1999), 4 brokoli hibridinde anter kültürü ve mikrospor kültürü yoluyla elde edilen rejenerantların ploidi düzeyini karşılaştırmışlardır. Anter kültürü yoluyla elde edilen rejenerantlarda haploidi oluşumu % 1.3-2.5, diploidi oluşumu % 39.8-73.8, tetraploid oluşumu % 21.5-57.8 arasında değişim gösterirken; mikrospor kültürü yoluyla elde edilen rejenerantlarda bu değerler % 4.3-31.6, % 57.7-71.4, % 5.2-37.2 arasında değişim göstermiştir.

Mikrospor kültüründe başarıyı etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; tür ve genotip, ana bitkinin yetiştirildiği koşullar, tomurcuk ve mikrospor gelişme dönemi, izolasyon yöntemi, kültür ortamındaki mikrospor yoğunluğu, haploid embriyo oluşumunu uyarıcı uygulamalar (sıcaklık şokları, karbonhidrat ve azot açlığı, kolhisin uygulaması, gama ışını, aktif kömür uygulaması, ortam yenileme, yüksek PH vs.), besin ortamının bileşimi ve yapısı olarak sıralanabilmektedir.

2.1 Tür ve Genotip

Haploid embriyo oluşum oranı, türlere ve tür içinde de genotiplere göre değişiklik göstermektedir. *Brassica oleracea*'nın 6 türünde (brokoli, karnabahar, baş lahana, brüksel lahanası, kıvrıkcık yapraklı baş lahana, kırmızı lahana) toplam 64 genotiple yapılan bir çalışmada, bu genotiplerin % 86'sından mikrospor kültürü yoluyla embriyo elde edilebildiği, en yüksek oranda embriyo oluşumunun 36.3 embriyo/tomurcuk değeri ile brokolinin New River adlı genotipinden sağlandığı bildirilmektedir (Duijs vd. 1992).

Çin lahanasında 12 genotipin 9'undan 0.5-57.4 embriyo elde edilebilirken (Cao vd. 1994), *Brassica carinata*' da 16 genotipin 10'undan (% 63) mikrospor kültürüne olumlu tepki alındığı bildirilmektedir (Barro ve Martin 1999).

Ferrie vd. (1999), *B.oleracea* var. *botrytis* (13 genotip), *B.oleracea* var. *sabauda* (1 genotip), *B.oleracea* var. *capitata* (5 genotip) olmak üzere toplam 19 genotipin 15'inden mikrospor kültürü yoluyla embriyo elde edebilmişler ve embriyo oluşum oranının 0-3000 embriyo/100 tomurcuk arasında değişim gösterdiğini saptamışlardır.

Zhang ve Takahata (2001), *B.napus* ve *B.campestris* L. ssp. *pekinensis*'de 4x4 diallel melezleme yoluyla elde edilen çeşitlerde mikrospordan embriyo oluşturma yeteneklerinin kalıtımını araştırmışlardır. Her iki türde de çoğu F1 hibrit embriyo verimleri açısından ebeveynlerine benzer ya da ebeveynlerinin üzerinde bir değer sergilemişlerdir. Araştırma sonucunda her iki türde de embriyo oluşturma yeteneğinin genetik kontrolünün açıklanmasında dominansi ve eklemeli gen etkisi % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Dominant gen etkisi mikrospor embriyogenezisi üzerinde pozitif etki yaparken, *B.napus*'da eklemeli gen etkisi, çin lahanasında dominansi etkisi daha önemli bulunmuştur.

Wei vd. (2008), 29 farklı süs lahanasında mikrospor kültürü yoluyla 6 genotipten embriyo elde edildiğini, 7.5 cm'lik petrielerde kültüre alınan mikrospordan embriyo oluşum oranının 0.2-43.4 embriyo/petri arasında değişim gösterdiğini, bu 6 genotipin 4'ünden (Q42, Q45, Q46, BP, HZ) bitki rejenerasyonu sağlandığını ve elde edilen bitkilerin başarılı bir şekilde dış koşullara alıştırdığını belirtmişlerdir.

2.2 Ana Bitkinin Yetiştirildiği Koşullar

Mikrospor kültüründeki başarı bakımından genotip elverişli olsa bile, bitkinin yetiştirilme dönemindeki koşullar da önem taşımaktadır. Ana bitkinin yetiştirildiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu, günlük ışıklenme süresi, beslenme programı ve bitki sağlığı androgenezisde başarı üzerinde etkili olmaktadır.

Lo ve Pauls (1992), *B. napus*'da ana bitkileri 23°C/18°C (16/8 saat) sürekli aydınlık, 23°C/18°C (16 saat aydınlık/8 saat karanlık), 15°C/12°C (16/8 saat) sürekli aydınlık ve 15°C/12°C (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) koşullarda yetiştirdiklerinde, 15°C/12°C

sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerde embriyo veriminin 23°C/18°C sıcaklığa göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Cao vd. (1993), 17 çin lahanası genotipinin 2 tanesinden (T11 ve CC11) 35 928 ve 34 132 embriyo/100 tomurcuk elde etmişler ve ana bitkinin yetiştirildiği koşulların da embriyo eldesi üzerine önemli etkisinin olduğunu vurgulamışlardır. Serada 10°C/20°C (gece/gündüz) sıcaklık koşullarında yetişen CC11 genotipinde 12.991 embriyo/100 tomurcuk elde edilirken, arazide 10-15°C/30-40°C (gece/gündüz) sıcaklık koşullarında yetiştirilen bu genotipte 3.831 embriyo/100 tomurcuk elde edildiğini bildirmişlerdir.

Brassica juncea'nın 3 çeşidinde yapılan başka bir çalışmada ana bitkiler, tarla koşulları, kontrollü koşullar ve ikisinin kombinasyonu olan koşullarda yetiştirilmiştir. Kontrollü koşullarda yetiştirilen bitkilerde tomurcuk büyüklüğü mikrospor gelişme aşamasının belirlenmesinde doğru bir belirleyici olurken; tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerde kesin bir belirleyici olamamıştır. Tarla koşullarında yetiştirilen ana bitkilerde tek çekirdekli mikrosporları içeren tomurcuklar toplanmış ve daha sonra bu bitkiler kontrollü koşullara transfer edilmiş ve genotiplere göre farklılık göstermekle birlikte diğer faktörlere bakılmaksızın 10-35 embriyo/petri elde edilmiştir (Prem vd. 2005).

2.3 Tomurcuk ve Mikrospor Gelişme Dönemi

Mikrospor kültürü çalışmalarında, embriyo oluşumu için mikrosporların içinde bulunduğu gelişme dönemi önem taşımaktadır (Ziauddin vd. 1997). Mikrosporların, olgun polen oluşumuyla sonuçlanan gametofitik gelişim modundan, haploid embriyo oluşumuyla sona eren sporofitik gelişme yönüne kaydırmak için mutlaka buna uygun gelişme döneminde bulunması gerekmektedir. Mikrospor kültürü çalışmalarında hedef, tek çekirdekli mikrospor gelişme aşamasındaki çiçek tomurcuklarından alınan mikrosporları kullanmaktır. Tek çekirdekli mikrosporlar, kültür koşullarında embriyo oluşturmak üzere sporofitik gelişmeye doğru daha kolay yönlendirilebilmektedir. Mikrosporlar içerisinde nişasta depolanmaya başladıktan sonra, gelişmeyi sporofitik

gelişme yönüne kaydırmak ve haploid bitki elde etmek için yapılacak uyarılar etkili olmamaktadır (Siebel ve Pauls 1989, Duijs vd. 1992).

Mikrospor kültüründe kullanılacak mikrosporların, çoğu türde tek çekirdekli (uninucleate) mikrospor gelişme aşaması veya birinci polen mitozunu geçirmiş dönem (Duijs vd. 1992, Carlos ve Dias 1999, Carlos ve Dias 2001, Dias ve Correia 2002) ile birinci polen mitozundan hemen önceki dönemde olmaları gerektiği birçok kaynakta bildirilmektedir (Sarıkamış vd. 2000; Ellialtıoğlu vd. 2001). Mikrosporların içinde bulunduğu gelişme dönemi ile tomurcuk büyüklüğü arasında da yakın ilişki bulunmaktadır (Takahata ve Keller 1991, Rudolf vd. 1999, Sarıkamış vd. 2000). Ancak mikrospor gelişme aşamasının belirlenmesinde tomurcuk büyüklüğü, anter-dişi organ boyu, taç yaprak uzunluğu, petal/anter oranı dikkate alınarak yapılabilirse de her türde kesin sonuç vermemektedir (Telmer vd. 1992).

Duijs vd. (1992), *Brassica*'larda aynı tomurcuk içinde farklı gelişme dönemlerine sahip polenlerin (asinkronize) varlığından bahsetmişlerdir. Her tomurcuktaki polen sayısı da türlere göre farklılık göstermekle birlikte bu değerler brokolide 30.000-65.000 polen/tomurcuk, karnabaharda 10.000-25.000 polen/tomurcuk, diğerlerinde ise 60.000-100.000 polen/tomurcuk olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan sitolojik gözlemler sonucu, mikrosporların bölünmeye başladığı safha (lateuninucleate) ile % 10 oranında çift çekirdekli mikrospor gelişme safhasında (binucleate) yani birinci mitoz bölünmesini geçirmiş safhadaki mikrospordan daha yüksek oranda embriyo elde edildiğini saptamışlardır.

B31-18 (brokoli) hattında en yüksek oranda embriyo oluşumunun 4-5 mm büyüklüğündeki tomurcuklardan (Takahata ve Keller 1991), *B.carinata*'da ise en yüksek hücre bölünmesi ve embriyo veriminin (%13.9) 2.5-3.5 mm uzunluğundaki tomurcuklardan sağlandığını bildirilmektedir (Barro ve Martin 1999).

Lahanada çiçek tomurcuğu morfolojisi ile mikrospor gelişme dönemi arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, tomurcuklar büyüklüklerine göre 5

gruba (2.1-2.5 mm, 3.0-3.5 mm, 3.75-4.0 mm, 4.25-5.0 mm, 5.5-6.0 mm) ayrılmış ve 2.1-2.5 mm uzunluğundaki tomurcularda tek çekirdekli mikrosporların, diğer dört tomurcuk grubunda ise iki çekirdekli ve olgun polenlerin bulunduğu belirtilmektedir (Sarıkamış vd. 2000). Buna karşılık *B. rapa* var. *pekinensis* L.'de mikrospor kültürü çalışmaları için 1.5-2.0 mm (petal/anter: 0.5-0.7 mm) uzunluğundaki tomurcularda tek çekirdekli mikrosporların bulunduğunu bildirmişlerdir (Sato vd. 2005).

Prem vd. (2008), *B. juncea*'nın 3 çeşidine (Pusa bold, Varuna, BIO-902) mikrospordan embriyo oluşumunun genotip ve tomurcuk büyüklüğüne göre farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırma sonucunda Pusa bold ve BIO-902 çeşitlerinde en yüksek oranda embriyo oluşumunun 2.5-3.0 mm büyüklüğündeki tomurculardan (4594 embriyo/100 tomurcuk ve 1034 embriyo/100 tomurcuk), Varuna çeşidinde ise 3.1-3.5 mm büyüklüğündeki tomurculardan (5390 embriyo/100 tomurcuk) elde edildiğini bildirmişlerdir.

Uygun tomurcuk büyüklüğünün belirlenmesinde morfolojik gözlemlerin yanı sıra sitolojik gözlemlerin de yapılmasının daha güvenilir sonuçlar verdiği literatürde yer almaktadır (Deslauriers vd. 1991, Telmer vd. 1992, Bal 2002). Sitolojik yöntemler mikrosporları farklı boyama yöntemleri ile boyama esasına dayalıdır. Mikrospor gelişme aşaması, sitolojik gözlemlerden asetokarminle hızlı boyama yapılarak saptanabileceği gibi kolzada olduğu gibi kalın bir polen dış tabakası söz konusu ise, bir gece tespit çözeltilisinde bekletmenin ardından asetokarmin ile boyama yöntemi de kullanılabilir (Ellialtıoğlu vd. 2001). Ancak asetokarmin sitoplazmayı da yoğun olarak boyadığından çekirdek bölünme aşamaları net olarak görülmeyebilmektedir.

Sitolojik yöntemlerden floresans boyalarla boyama yönteminde DAPI ve ethidium bromid gibi boyalar kullanılarak mikrospor gelişme aşamaları net olarak gözlenebilmektedir (Vergne vd. 1987, Touraev vd. 1997, Ilic-Grubor vd. 1998, Samancı vd. 1998).

Kültüre alınan mikrosporların canlılığı da başarıyı etkilemektedir. Deslauriers vd. (1991), *Brassica napus* L. mikrosporlarının embriyogenik sınıflandırması ve tanımlanmasında flow sitometrik yöntemden yararlanmışlardır. Bu amaçla, mikrosporlar kültüre alındıktan sonra FDA (10 mg/ml) ile boyanarak 0, 1, 3, 5 ve 7 gün süreyle kültür ortamında FDA ile boyanan embriyogenik mikrosporların canlılık ve ebatlarındaki değişim incelenmiştir. Embriyogenik mikrosporların kültür süresince büyümeye devam ettikleri ve boyanmaları durumunda ışığa gösterdikleri ancak mikrosporların %95'inin kültür süresince canlılıklarını kaybettikleri belirlenmiştir. Bu yöntem embriyogenik olarak gelişimine başlamış olan mikrosporların diğerlerinden ayrılmasına ve polen oluşumuna ait erken dönemdeki hücresel ve moleküler değişikliklerin araştırılmasına olanak sağlamaktadır.

Nitta vd. (1997), *Brassica* türlerinde *in vitro*'da kültürün ilk başlangıcında embriyonik ve embriyonik olmayan mikrosporların aynı morfolojik yapıya sahip olduğunu, kültürden 24 saat sonra mikrosporda büyüklüğün arttığını bildirmişlerdir. Embriyogenik mikrosporda iki farklı morfolojik değişimin görüldüğünü, 1. tipte; mikrosporda sadece çimlenme diyaframındaki hücre kümelerinin hacminin genişlediğini, 2. tipte tüm mikrospor yüzeyinde hücre kümelerinde genişleme görüldüğünü ve *Brassica*'larda 1.tipte gelişimin görüldüğünü belirtmişlerdir.

2.4 İzolasyon Yöntemi

Tomurcukların veya anterlerin, izolasyonu için türlere göre geliştirilmiş özel ortamlar gerekmektedir. Bu ortamlarda anterler ezilerek mikrosporların serbest hale geçmesi sağlanmaktadır. Her tür için farklı izolasyon ortamları geliştirilmiştir. *Brassica*'larda; Nitsch ve Nitsch (1967) tarafından geliştirilen ve Lichter (1981) tarafından modifiye edilen sıvı NLN-13 ortamı (%13 sakkaroz, hormonsuz, PH: 6.1) (Carlos ve Dias, 1999) ve sıvı B5 ortamı (Gamborg vd. , 1968) (%13 sakkaroz, hormonsuz) (Siebel ve Pauls 1989, Takahata ve Keller 1991, Sato vd. 2005) izolasyon ortamı olarak kullanılmaktadır.

2.5 Mikrospor Yoğunluğu

Kültür ortamında bulunan mikrospor yoğunluğu da başarıyı etkileyen önemli bir faktördür. Brokolide; 20.000 mikrospor/ml'den az (5000, 10.000 mikrospor/ml) olan kültürlerde tomurcuk başına 0.4-13.6 arasında embriyo elde edilirken, ortamdaki mikrospor yoğunluğunun artmasıyla (30.000 mikrospor/ml) tomurcuk başına 42 embriyo elde edilmiştir (Duijs vd. 1992). *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*'in 3 varyetesi olan var. *communis* (5 genotip), var. *rosularis* (3 genotip), var. *utilis* (4 genotip)'de 100.000-200.000 mikrospor/ml (Cao vd. 1994), *B.carinata*' da ise; kültüre alınan mikrosporların 150.000 mikrospor/ml yoğunlukta olması durumunda en iyi sonuçların alındığı belirtilmektedir (Barro ve Martin 1999).

Karnabaharın 3 genotipinde kültür ortamında 100.000 mikrospor/ml yoğunlukta, 50.000 mikrospor/ml yoğunluğa göre daha yüksek oranda embriyo elde edildiği bildirilmektedir (Ferrie vd. 1999).

2.6 Haploid Embriyo Oluşumunu Uyarıcı Uygulamalar

Mikrospordan haploid embriyo oluşumunu uyarmak amacıyla tomurcuk, anter veya anterlerden izole edilen mikrospora sıcaklık şokları, karbonhidrat ve azot açlığı, yüksek PH, etanol, kolhisin ve gama ışını gibi çeşitli stres faktörlerine maruz bırakılarak gametofitik halka kırılabilen ve mikrosporlar embriyo oluşturma yönünde gelişebilmektedir (Touraev vd. 1997). *Brassica*'larda embriyo oluşumunu uyarmak amacıyla sadece yüksek sıcaklık uygulamaları bile yeterli olabilmektedir.

Farklı *Brassica* türlerinde embriyo oluşumunu uyartmak amacıyla yapılan stres uygulamaları Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 Farklı *Brassica* türlerinde embriyo oluşumunu uyarıcı stres uygulamaları (Shariatpanahi vd. 2006'dan alınarak değiştirilmiştir.)

Tür	Stres Uyg.	Protokol	Sonuç	Kaynak
Kolza	Kolhisin	25 µM/42 saat/25°C/mikrospor süspansiyonu	E ve R	Zhao vd. (1996)
Kolza	Sıcaklık	32°C/3gün/ mikrospor süspansiyonu	E ve R	Custers vd. (1994)
Brokoli	Sıcaklık	32°C/3gün/ mikrospor süspansiyonu	E ve R	Dias (2003)
Karnabahar Lahana	Sıcaklık	30°C/2gün/ mikrospor süspansiyonu	E ve R	Carlos ve Dias (1999)
Çin lahanası	Sıcaklık	33°C/1gün/ mikrospor süspansiyonu	E ve R	Cao vd. (1994)
Kolza	Gama uygulaması	Tomurcuklara 450 ve 900 Gy	E	Pechan ve Keller (1989)
Karnabahar Lahana Brokoli	Aktif kömür	0.1 ml/petri AC solüsyonu	E	Carlos ve Dias (1999)
Çin lahanası	Ortam yenileme	NLN-10 (2 gün)/NLN-10	E ve R	Gu vd. (2003)
Süs lahanası	Ortam yenileme	NLN-16+50 mg/l kolhisin (2 gün)/NLN-16	E ve R	Wei vd. (2008)

E: embriyo, R: rejenerasyon

2.6.1 Sıcaklık şokları

Sıcaklık şokları düşük veya yüksek sıcaklık uygulamaları şeklinde yapılır. Mikrospor embriyogenesi uyarmak amacıyla yapılan sıcaklık uygulamaları ana bitkiye, çiçek tomurcuklarına, anterlere veya izole edilen mikrospora yapılabilmektedir.

Soğuk uygulamaları, mikrospor kültüründe tahıllarda yaygın olarak kullanılırken (Indrianto vd. 1999, Kasha vd. 2001), *Brassica*'larda nadir olarak kullanılan bir ön uygulamadır.

Gu vd. (2004), soğuk uygulamalarının *B.napus*'un 7 genotipi, *B.rapa* ve *B.oleracea*'nın 1'er genotipi üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla tek çekirdekli mikrospor gelişme aşamasındaki çiçek tomurcukları yüzeysel sterilizasyona tabi tutulduktan sonra petri kutularına %13 sakkaroz içeren sıvı ortama konulmuştur. Daha sonra petri kutuları parafilmle sarıldıktan sonra 0, 1, 2, 3, 4 gün sürelerle 4°C karanlıkta bekletilmiştir. Soğuk uygulamaları *B.napus*'un 7 genotipinde de embriyo oluşumu üzerine *B.rapa* ve *B.oleracea* ile karşılaştırıldığında 1-7 kat daha olumlu etki yaparken, *B.rapa*'da bu uygulama daha az olumlu, *B.oleracea*'da ise olumsuz etki yapmıştır. *B.napus*' da 2-4 gün soğuk uygulaması embriyo oluşumunu uyarda en etkili süre olarak belirlenmiştir.

B. napus'da yapılan bir diğer çalışmada, kültür ortamında (1/2 MS+%2 sakkaroz+%0.9 agar) kotiledonar aşamaya gelen embriyolar 4°C'de 0, 3, 5 ve 7 gün süreyle bekletildikten sonra 24°C 16 saat gün uzunluğuna alınmıştır. Araştırma sonucunda 3-5 gün soğuk uygulamalarında embriyo çimlenme oranı %90 olurken, bu embriyoların %56.46'sından bitkiye dönüşüm sağlandığı bildirilmiştir (Zhang vd. 2006).

Brassica türlerinde yüksek sıcaklık şokları etkili bir uygulamadır. Sıcaklık şokları izole edilen mikrosporların kültüre alınmasından sonra uygulandığında daha etkili olmaktadır. *B. napus*'da izole edilen mikrospora sıcak şokları (8 saat 32°C) uygulaması ile simetrik çekirdek bölünmesinin uyarılması sonucu embriyonik polen oluşumu artmakta ve bu yapılar büyümeyi düzenleyici madde içermeyen basit bir ortama aktarıldığında rejenerasyon başarıyla gerçekleşebilmektedir (Custer vd. 1994).

Sıcaklık derecesi ve süresi türlere göre farklılık göstermektedir. Örneğin; *B. napus*'da 32 °C'de 3 gün (Siebel ve Pauls 1989), brokolide 30 °C'de 2 gün (Duijs vd. 1992), çin lahanasında 33°C'de 1 gün (Cao vd. 1994), karnabahar, baş lahanası ve *B.oleracea* var.

sabauda'da 32°C'de 2 gün (Ferrie vd. 1999), *Brassica oleracea* var. *costata*'da 32.5 °C 1 gün (Dias ve Correia 2002) uygulamalarından daha başarılı sonuçlar alındığı belirtilmektedir.

Simmonds vd. (1999), *B.napus* L. cv Topas'da izole edilen mikrosporları 32.5°C'de 18-24 saat süreyle yüksek sıcaklığa maruz bıraktıktan sonra 25°C'de kültüre almışlardır. Yüksek sıcaklık uygulanmış mikrosporda ilk bölünme simetrik bölünme olurken; sürekli 25°C'de kalanlarda asimetrik bölünmenin meydana geldiği belirlenmiştir.

Barro ve Martin (1999), *Brassica carinata*'nın 16 genotipinde mikrosporları B5 (Gamborg vd. 1968) ortamında (%13 sakkaroz) izole ettikten sonra NN ortamı (%13) ile tekrar süspansiyon haline getirilerek 3ml/petri olacak şekilde 32°C'de 1, 2, 3, 4 gün sürelerle karanlıkta kültüre alındıktan sonra 25°C karanlık koşullara alınmıştır. En yüksek hücre bölünmesi ve embriyo veriminin (%13.9) 32°C sıcaklıkta 3 gün bekletilen kültürlerden alınmıştır.

Karnabaharın 3 genotipinde mikrospor izolasyonundan sonra kültürler 32 °C ve 35 °C'de 48 saat ve 72 saat karanlıkta bekletilmiş ve her 3 genotipde de 32 °C'de 48 saat uygulamasından (Ferrie vd. 1999), brokolide yapılan başka bir çalışmada ise 32.5°C'de 1 gün uygulamasından embriyo oluşumu açısından daha başarılı sonuçlar alındığı saptanmıştır (Carlos ve Dias 2001).

2.6.2 Kolhisin uygulamaları

Kolhisin uygulamaları ağırlıklı olarak *Gramineae* ve *Cruciferae* familyasına ait türlerde embriyo oluşumunu uyaran bir stres uygulamasıdır. Zhou vd. (2002), *B.napus*'un 2 F1 hibrit çeşidinde mikrospor kültüründe embriyo oluşumu ve kromozom katlaması üzerine kolhisinin etkisini değerlendirmişlerdir. İzole edilen mikrospora 4 farklı kolhisin dozunu (0, 50, 500, 1000 mg/l) 30°C karanlıkta 15 ve 30 saat süreyle uygulamışlardır. İzole edilen mikrospora 2 farklı kolhisin dozunu (50 ve 500 mg/l) 15 saat süreyle uyguladıklarında embriyo oluşumu ve embriyo kalitesi üzerine olumlu etkilerini

görmüşlerdir. Katı MS (Murashige ve Skoog 1962) çoğaltma ortamına alınan embriyolar başlangıçta 2°C’de 10 gün boyunca bekletilmiş ve daha sonra 24°C’ de embriyolar çimlendirmeye tabi tutularak bitkicikler elde edilmiştir. En yüksek kromozom katlaması (%83-91) 500 mg/l kolhisin dozunda 15 saat uygulamasından alınmış ve bu dozda düşük frekansta poliploid bitki ve kimerik bitki oluşumu gözlenmiştir. 30 saat uygulamasının embriyo oluşumu ve kromozom katlanması üzerine etkisinin düşük olduğu, özellikle süre (30 saat) ve kolhisin dozu (1000 mg/l) arttığında olumsuz etki daha da belirginleşmiştir.

Weber vd. (2005), *B.napus*’un 8 genotipinde izole edilen mikrospora *in vitro* kolhisin uygulamalarının dihaploidizasyon üzerine etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmalar sonucunda tüm genotiplerde 50 mg/l kolhisin uygulamalarında dihaploidizasyon oluşum oranı (%31-%95) arasında değişim gösterirken; kontrol grubunda bu oran daha düşük (%17-%71) kalmış ve kolhisinin dihaploidizasyon üzerine önemli etkisinin olduğunu vurgulamışlardır.

2.6.3 Gama radyasyonu uygulamaları

İyonize radyasyonlar anter ya da mikrospordan embriyo oluşumunu uyarmak amacıyla da kullanılabilir.

Pechan ve Keller (1989), *Brassica napus* L.’da gama ışını uygulamalarının mikrospor gelişimi ve embriyo oluşumu üzerinde etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla çalışmanın ilk aşamasında tek çekirdekli mikrosporları içeren tomurcuklara 0, 450 ve 900 gray gama ışını uygulamışlardır. Işınlama yapılan tomurcuklardan ışınlamadan hemen sonra, 4-5, 6-7 ve 8-10 gün sonra Lichter’in geliştirdiği ortamda izole edilen mikrosporlar 25 °C ve 32 °C’de kültüre alınmıştır. Tüm uygulamalarda ışınlanan polenlerden kontrole göre daha yüksek oranlarda embriyo oluştuğunu ve 25°C sıcaklık uygulamasında %0.01’den daha az sayıda embriyo oluşurken, 32°C sıcaklık uygulamasında yaklaşık %2 oranında embriyo oluştuğunu belirtmişlerdir.

2.6.4 Aktif kömür uygulamaları

Besin ortamına katılan aktif kömür ortamdaki toksik bileşikleri tutarak, embriyo oluşumunu olumlu yönde etkileyebilmektedir. Farklı *Brassica* türlerinde (*B.napus*, *B.nigra*, *B.oleraceae var. capitata*, *B.oleracea var. italica* ve *Raphanus sativus*) her petriye 0.1 ml aktif kömür ilave edilmesinin embriyo oluşumunu artırdığı saptanmıştır (Lichter 1989).

Carlos ve Dias (1999), *Brassica* cinsine giren sebze türlerinde (karnabahar, brokoli, lahanada) mikrospor kültürü yoluyla embriyo oluşumu üzerine aktif kömürün etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 5 ml NLN-13 (40.000 mikrospor/ml= 200.000 mikrospor/petri) ortamındaki kültürleri, 30°C’de 48 saat karanlıkta beklettikten sonra 25°C’de karanlık ortama almışlardır. Her üç türde de kültür ortamına otoklavlanmış 0.1 ml aktif kömür (1 g aktif kömür + 0.5 g agaroz + 100 ml çift distile su) solüsyonunun eklenmesiyle, kontrole göre haploid embriyo oluşumunun arttığını, özellikle brokolide bu artışın çok belirgin olduğunu belirtmişlerdir. Kontrol grubunda karnabaharın 2 genotipinde embriyo oluşum oranı 0.2-3.7 embriyo/petri, lahananın 3 genotipinde 1.3-3.3 embriyo/petri, brokolinin 4 genotipinde 1.1-14.1 embriyo/petri arasında değişim gösterirken, aktif kömür katılan uygulamalarda karnabaharda 4.8-17.1 embriyo/petri, lahanada 3.4-6.5 embriyo/petri, brokolide 7.7-54.4 embriyo/petri elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Leskovsek vd. (2008), rokada (*Eruca sativa* L.) izole edilen mikrosporları farklı aktif kömür içeren (0.2 mg/l ve 1.0 mg/l) NLN-13 ortamında 24 ve 48 saat süreyle karanlıkta kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda 0.2 mg/l aktif kömür içeren ortamda 32°C’de 48 saat süreyle kültüre alınan mikrosporlardan daha yüksek oranda embriyo (46.5±4.4 embriyo/petri) elde edildiğini ve embriyo dönüşüm oranının %23 olduğunu bildirmişlerdir.

2.6.5 Ortam yenileme uygulamaları

Lionneton vd. (2001), *B.juncea*'nın 13 genotipinde izole edilen mikrosporları 3 farklı ortamda; 1. sürekli NLN-13 ortamı (kontrol), 2. kültürün ilk 48 saati NLN-13 ortamı daha sonra NLN-10 ortamı, 3. Kültürün ilk 48 saati NLN-17 ortamı daha sonra NLN-10 ortamında kültüre almışlardır. Deneme sonucunda gerek embriyo oluşumu gerekse bitki rejenerasyonu açısından en olumlu ortamın 3 no'lu ortamdan sağlandığını tespit etmişlerdir. Araştırma sonucunda *B.juncea*'nın 13 genotipinin 12'sinden embriyo elde edilirken (0-35.1 embriyo/petri), ancak 7 genotipten bitki rejenerasyonunun (1-106 bitki) sağlandığını bildirmişlerdir.

Mikrosporların besin ortamına alındıktan sonra 2-3 gün aralıklarla taze ortama aktarılması embriyo gelişiminde ve embriyo kalitesinde artışa neden olabilmektedir *Brassica oleracea* var. *costata* olarak bilinen 4 farklı lahana genotipinde ortamın belli aralıklarla yenilenmesinin mikrospor kültürü yoluyla embriyo oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmanın ilk aşamasında mikrosporlar izole edildikten sonra % 13 sakkaroz katılmış NLN-13 ortamına 40.000 mikrospor/ml (80.000 mikrospor/petri) olacak şekilde ekilmiş ve 0, 24, 48, 72, 96 ve 120 saatte bir taze ortamlara aktarılmıştır. Tüm kültürler karanlıkta 30°C'de 48 saat bekletildikten sonra 25 °C'de karanlık ortama alınmıştır. Araştırma sonucunda 24 saat arayla ortam yenileme tüm genotiplerde embriyo oluşumunun azalmasına neden olmuştur. Buna karşılık inokülasyondan 48, 72 ve 96 saat sonra yapılan ortam yenilemesi ise embriyo gelişiminde ve embriyo kalitesinde artışa neden olmuştur (Dias ve Correia 2002).

Gu vd. (2003), *B.rapa* (*B.campestris*) ssp. *chinensis*'in 2 varyetesinde (var. *communis*, var. *utilis*) izole edilen mikrosporları 3 farklı ortamda 1. sürekli NLN-10 (kontrol), 2. kültürün ilk 48 saati NLN-17 ortamı daha sonra NLN-10 ortamı, 3. kültürün ilk 48 saati NLN-10 ortamı daha sonra NLN-10 ortamında kültüre almışlardır. En yüksek oranda embriyo oluşumu 3 no'lu ortamdan (42.4 embriyo/tomurcuk) sağlanırken, en yüksek oranda bitki rejenerasyonu (%44.2) kültür ortamının yenilendiği ve kültürün ilk 48 saat sonunda (32°C'de 48 saat karanlık) ortamın sakkaroz konsantrasyonunun azaltıldığı 3

no'lu ortam bileşiminden sağlandığı uygulamalardan alınmıştır. Gelişen bitkiciklerin %13-14'ü haploid, %70'den fazlası diploid olduğu, her 2 genotipde de spontan tetraploid formların görüldüğü ve bu tetraploid formlardan *B.rapa* ıslah programlarında yeni çeşitlerin elde edilebileceğini belirtmişlerdir.

Wei vd. (2008), 29 farklı süs lahanası genotipinde, B5-13 ortamında izole edilen mikrosporları 4 farklı ortamda (1. NLN-13 ortamında 48 saat bekletildikten sonra /taze NLN-13, 2. NLN-13+50 mg/l kolhisin ortamında 48 saat bekletildikten sonra taze /NLN-13, 3. NLN-16+50 mg/l kolhisin ortamında 48 saat bekletildikten sonra taze /NLN-16, 4. NLN-16+50 mg/l kolhisin ortamında 48 saat bekletildikten sonra taze /NLN-13 ortamında) kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda, 29 genotipin 6'sından embriyo elde edildiğini, farklı ortam bileşimlerinde embriyo oluşum oranlarının da genotiplere göre farklılık gösterdiğini, en yüksek oranda embriyo oluşumunun Q45 genotipinde 4 (19.8 embriyo/petri), Q46 genotipinde 3 (19 embriyo/petri), HZ genotipinde ise 1 (20.1 embriyo/petri) ve 3 (43.4 embriyo/petri) no'lu ortamlardan sağlandığını belirtmişlerdir.

2.7 Besin Ortamının Bileşimi ve Yapısı

Mikrospor kültüründe kullanılan temel besin ortamı embriyo oluşumunda etkili faktörlerin başında gelir. Farklı *Brassica* türlerinde NLN ortamı temel besin ortamı olarak kullanılmaktadır (Ferrie vd. 1999, Carlos ve Dias 1999, Weber vd. 2005).

Takahata ve Keller (1991), 4 brokoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) hattında yaptıkları çalışmada, sıvı (2 ml hormonsuz, 1/2 NLN-13 ortamı katılmış), sulandırılmış (1 hafta sonra 1 ml 1/2 NLN-13 katılmış) ve agarla katılaştırılmış (2 ml 1/2NLN-13 + % 0.35 agar) ortamların haploid embriyo oluşumuna etkisini belirlemişlerdir. Bu amaçla mikrosporları B5-13 ortamında izole ettikten sonra 1/2 NLN-13 ortamına, 3 farklı ortam fazı (sıvı, sulandırılmış, agarla katılaştırılmış) kullanarak mikrospor ekimini gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra tüm ortamlar, 30°C, 32.5°C ve 35°C' de 1 gün bekletildikten sonra 25°C' deki karanlık ortama alınmıştır. Araştırma sonucunda 32.5

°C 'de sıvı ortamda tutulan kültürlerden daha yüksek oranda embriyo (en iyi koşullarda 400-700 embriyo/tomurcuk) elde edildiği saptanmıştır. Kültür aşamasından 2-3 hafta sonra torpido aşamasına gelen embriyolar, filtre kağıtları üzerinde ve katılaştırılmış B5 ortamında çimlendirilmiş, filtre kâğıtları üzerinde çimlendirmenin daha başarılı olduğu ve bu yolla yaklaşık 1.5 kat daha fazla çimlenme sağlandığı belirtilmiştir. Elde edilen bitkiciklerin %80'inin haploid olduğu saptanmıştır.

Carlos ve Dias (2001), brokolide kültür ortamının (1/2 NLN-13, NLN-13) embriyo oluşumu üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, 1/2 NLN-13 ortamında kültüre alınan mikrosporlardan (0.47-27.20 embriyo/petri) NLN-13 ortamında kültüre alınan mikrosporlara göre (0.30-16.98 embriyo/petri) daha yüksek sayıda embriyo oluştuğunu belirlemişlerdir.

Mikrospor kültürü çalışmalarında kültür ortamında yüksek düzeyde şeker kullanılmaktadır. Kültür ortamının karbonhidrat içeriği ve tipi mikrosporlardan embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkilidir (Indrianto vd. 1999). Genellikle karbonhidrat kaynağı olarak sakkaroz ve maltoz kullanılmaktadır. Karbonhidratların sadece enerji kaynağı olarak değil aynı zamanda besin ortamının osmotik basıncını ayarlayıcı etkisi de bulunmaktadır

Ferrie vd. (1999), karnabaharın (*B.oleracea* var. *botrytis*) 4 genotipinden izole edilen mikrosporları NLN sıvı ortamında %10, %13 ve %17 olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda sakkaroz içeren ortama almışlar ve 48 saat sonra her üç ortamda da ortamın şeker konsantrasyonunu %10'a düşürmüşlerdir. Araştırma sonucunda en yüksek oranda embriyo oluşumunun 3 genotipde (Bo1, Bo4, Bo8)'de % 17 sakkaroz içeren ortamdaki olduğunu belirtmişlerdir.

Osmotik basıncını sağlamak amacıyla karbonhidrat kaynağı olarak yüksek konsantrasyonda sakkaroz kullanılabileceği gibi, son zamanlarda yüksek molekül ağırlığına sahip PEG 4000' de *B.napus*'ta ortamın osmotik basıncını sağlamak amacıyla

sakkaroz yerine kullanılabilir (Ilic-Grubor vd. 1998). Bundan başka ortamın PH' sın da karbonhidrat alımını etkilediği bilinmektedir (Barinova vd. 2004).

Ilic-Grubor vd. (1998), *B.napus*' dan izole edilen mikrospora manitol ve PEG 4000 uygulamalarının embriyo oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla, izole edilen mikrospora kontrol (1/2 NLN, %13 sakkaroz), (%8 manitol+1/2 NLN+ %0.08-0.1 sakkaroz), (%25 PEG + 1/2 NLN + %0.08-0.1 sakkaroz) olmak üzere 3 farklı ortamda kültüre almışlardır. Mannitol içeren ortamda kültüre alınan mikrospora embriyo oluşumu ve embriyonik hücre bölünmesi hiç olmazken, PEG içeren ortamda 2 hafta içinde embriyo oluşumu görülmüştür. PEG'li ortamda bulunan embriyolar aydınlık ortama alındığında hızlı bir şekilde sarı renkten yeşile dönüşürken, sakkaroz içeren ortamdaki embriyolar başlangıçta sarımsı renkte kalmış ve daha sonra yavaş bir şekilde yeşil renge dönüşmüştür.

Brassica'larda kültür ortamındaki sakkaroz yerine kullanılan PEG 4000'in embriyo oluşumu ve kalitesi üzerine etkisini araştırıldığı bir çalışmada, PEG'li ortamda gelişen embriyoların morfolojik yapılarının zigotik embriyolarla benzerlik gösterdiğini ve çimlenme yeteneklerinin sakkaroz içeren ortama göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir. *B.napus*'da mikrospora %25 PEG 4000 içeren NLN ortamında kültüre alındıktan 14 gün sonra 3ml NLN-13 (son konsantrasyon %3 olacak şekilde) ilave edilmiş ortamda kültüre alındığında embriyoların kalite ve miktarlarında artış olduğu belirtilmiştir. Kültür ortamına katılan PEG diğer *Brassica* türlerinde de (*B.nigra*, *Crambe abyssinica* ve *Raphanus oleifera*) mikrosporalardan embriyo oluşumunun arttığı, *B.napus*'da PEG içeren ortamda yüksek sıcaklık (32°C) şoku uygulanmadan 4°C, 15°C, 18°C ve 24°C'de kültüre alınan mikrosporalardan embriyo oluşumu sağlanırken, PEG yerine sakkarozun kullanıldığı ortamlarda embriyo oluşumu uyartılamamıştır. Ayrıca PEG içeren ortamda spontan kromozom katlamasının %64-92; sakkaroz içeren ortamda %2-18 olduğu belirtilmiştir (Ferrie ve Keller 2007).

Kültüre alınan mikrospora genellikle besin ortamında büyümeyi düzenleyici maddelere gerek duymazken (tütün, kolza, *Brassica* ssp.), bazı türlerde (buğday, arpa)

mikrospor yapılarından rejenerasyonunun sağlanabilmesi için besin ortamına ilave hormonlara ihtiyaç duyulmaktadır (Jahne-Gartner ve Lorz 1999).

Hormonsuz NLN ortamında (Lichter 1981) *B.napus* hariç diğer *Brassica* türlerinde embriyo oluşumunun daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Lichter 1989). Lichter (1989), farklı *Brassica* türlerinde (*B.napus*, *B.nigra*, *B.oleraceae* var. *capitata*, *B.oleracea* var. *italica* ve *Raphanus sativus*) hormonlu, hormonsuz NLN ortamı ve aktif kömür (0.1 ml/petri) ilavesinin embriyo oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. İnkübasyonun ilk 10 gününde sıcaklık 30°C' de tutulmuş ve daha sonra petriyer, 2, 3, 4, 7, 10 gün süreyle 25°C'de özel yapılmış bir çalkalayıcı üzerinde bekletilerek havalandırılmaya tabi tutulmuş ve böylece ortamda birikmiş olabilecek toksik maddelerin etkisi azaltılmaya çalışılmıştır. İnkübasyondan sonra 3 gün süreyle yapılan havalandırmanın tüm genotiplerde embriyo oluşumunu arttırdığı, 7. ve 10. güne kadar yapılan havalandırmada ise embriyo oluşumunun önemli düzeyde azaldığı ortaya konulmuştur. Hormonsuz NLN ortamında *B.napus* hariç tüm genotiplerde embriyo oluşumunun daha yüksek olduğu saptanmıştır. Charne ve Beversdorf (1988)' nin bildirdiğine göre *B.napus*' da ortamın NAA konsantrasyonunun 0.136-1.85mg/l arasında değişmesinin embriyo oluşumu üzerine hiçbir etkide bulunmazken, BAP' ın (0.01-0.255 mg/l) konsantrasyonları toplam embriyo veriminde artışa neden olmuştur (Lichter 1989).

Cao vd. (1994), *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*'in 3 varyetesi olan var. *communis* (5 genotip), var. *rosularis* (3 genotip), var. *utilis* (4 genotip)'den izole edilen mikrosporlar, %13 sakkaroz, 0.05 mg/l BA ve 0.5 mg/l NAA ile desteklenen modifiye NLN82 (Lichter 1982) ortamında 100.000-200.000 mikrospor/ml (200.000-400.000 mikrospor/petri) olacak şekilde ekilmiş, sürekli 25°C ve 33°C' de 1, 3 gün süreyle karanlık koşullarda tutulduktan sonra 25°C'de karanlık koşullara alınmıştır. Kültüre alındıktan 3 hafta sonra, embriyo sayımları yapılmış ve petri kapları 22°C, 14 saat gün uzunluğuna ayarlanmış iklim odalarına transfer edilmiştir. Araştırma sonucunda 12 genotipin 9'undan değişen oranlarda (0.5-57.4 embriyo/tomurcuk) embriyo elde edilmiş, en yüksek oranda embriyo oluşumunun ise 33°C' de 1 gün sıcaklık uygulamasından elde edildiği saptanmıştır. Embriyolar daha sonra %2'lik sakkaroz içeren hormonsuz

B5 (Gamborg vd. 1968) ortamına transfer edilerek yeni bitkiciklerin oluşumu sağlanmıştır.

Liu vd. (2003), *B. napus*'da iki farklı besin ortamının (NLN-13+%0.05 aktif kömür ve NLN-16+0.1 mg/l 6-BA) mikrosporlardan embriyo oluşumu üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, aktif kömür uygulamasında 24 embriyo/petri elde edilirken, hiçbir uygulama yapılmamış kontrol grubunda ise 1.7 embriyo/petri elde edildiğini, 0.1 mg/l 6-BA ilave edilmiş NLN-16 ortamında kültüre alınan mikrosporlardan 38.3 embriyo/petri, kontrol grubunda ise 26 embriyo/petri elde edildiğini bildirmişlerdir.

Zhang vd. (2006) *B.napus*'un 5 genotipinde torpido aşamasına gelen embriyoları 5 farklı ortam bileşiminde kültüre aldıklarında tüm genotiplerde en yüksek oranda bitki rejenerasyonunun 1/2 MS+2 mg/l BAP+%2 sakkaroz+%0.9 agar içeren ortamdan sağlandığını saptamışlardır. Çalışmanın ikinci aşamasında, kültür ortamındaki kotiledonar aşamadaki iyi gelişmiş embriyoları seçerek steril petri kutuları içinde kurutma kağıtları üzerine koyarak parafilmle sarılan petrileri 0, 1, 2, 4 gün süreyle 16 saat gün uzunluğunda beklettikten sonra 24°C 16 saat gün uzunluğuna almışlardır. Tüm genotiplerde 1 gün süreyle kurutulan embriyolarda çimlenme oranı ve bitkiye dönüşüm oranının daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Buna karşılık rokada (*Eruca sativa* L.) yapılan başka bir çalışmada, kültürden 3-4 hafta sonra 4-8 mm büyüklüğe ulaşan mikrospor kökenli embriyolar değişik oranlarda ABA içeren (0, 1.0, 3.0, 5.0 mg/l) katı B5 ortamına aktarıldıktan 24 saat sonra embriyolar petri kutuları içinde steril filtre kağıtları üzerine alınmış ve 24°C karanlıkta farklı sürelerde (0, 1, 2 ve 3 hafta) kurutmaya tabi tutulmuştur. Araştırma sonucunda embriyolara yapılan ABA ve kurutma ön uygulamalarının bitki rejenerasyonunu engellediği saptanmıştır (Leskovsek vd. 2008).

Genellikle mikrospor kültür ortamına, embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonunu sağlamak amacıyla çeşitli bileşiklerin de ilave edilmesinin gerekli olduğu bilinmektedir. Örneğin; aktif kömür, nitrat/amonyum oranı, polyamınler, vitaminler, Ca⁺² iyonu ve

myo-inositol'un besin ortamına ilavesinin birçok türde mikrospordan ve somatik hücrelerden bitki rejenerasyonu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir.

Rudolf vd. (1999), 5 baş lahana (*B.oleraceae* var. *capitata*) genotipinde mikrospor kültürüne tepki veren (28.7 embriyo/petri) ve vermeyen genotipler (0.1 embriyo/petri) ile bunların döllerinde (18.9, 52.9, 64.0 embriyo /petri) mikrospor kültürü ile çoğalma kabiliyetini belirlemek ve kromozom katlamak amacıyla kullanılan maddelerden trifluarin (0.5, 1.0 mg/l) ve orizalinin (0.125, 0.25, 0.5 mg/l) embriyo verimine etkisini incelemiştir. Araştırma sonucunda NLN-13 kültür ortamına uygulanan trifluralin embriyo sayısı üzerinde etkili olmazken, orizalinin 0.125, 0.25 mg/l dozları kısmen, 0.5 mg/l dozu ise tamamen engelleyici etkide bulunmuştur. Ploidy düzeyini belirlemek amacıyla ortama katılan trifluarin ve orizalin uygulamalarında ise, ploidy düzeyinin hem genotipe hem de uygulamalara göre farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada en olumlu sonuç veren Hawke F1 çeşidinde 0.125 mg/l orizalin uygulamasıyla kontrole (%21) göre, oldukça yüksek oranda (%68) diploid hat elde edilmiştir. Ayrıca bu genotipte trifluarin'in artan dozlarında (4 mg/l) en yüksek oranda diploid bitki elde edildiği, 5 mg/l'de ise tetraploid bitki oluşumunun en yüksek oranda (%45) olduğu saptanmıştır.

Tian vd. (2004), *B. napus*'da mikrospordan gelişen embriyoları büyüklüklerine göre 2 gruba ayırarak (3 mm ve 7 mm) 4 farklı besin ortamında (B5, 1/2 B5, MS ve 1/2 MS) çimlendirmeye tabi tutmuşlardır. B5, 1/2 B5 ve MS ortamına aktarılan embriyolarda düzensiz yaprak benzeri yapılar gelişmiş; B5 ve 1/2 B5 ortamında embriyoların bitkiye dönüşüm oranı yönünden çok az farklılık bulunmuştur. 7 mm boyundaki embriyolar için bitkiciğe dönüşüm oranı 1/2 B5 ortamında %11, B5 ortamında %12; 3 mm embriyolar için ise 1/2 B5 ortamında %9, B5 ortamında %7 olmuştur. MS ortamında gelişen embriyoların kısa hipokotil koyu yeşil kotiledonlara sahip oldukları ve bitkiye dönüşüm oranlarının düşük olduğu belirtilmiştir. MS ortamında 7 mm büyüklüğündeki embriyoların %7'sinin, 3 mm büyüklüğündeki embriyoların ise %2'si bitkiye dönüşürken; 1/2 MS ortamında 7 mm büyüklüğündeki embriyoların %31'inden rejenerasyon sağlanmıştır. 7 mm embriyolar için 1/2 MS+900 mg/l CaCl₂.2H₂O içeren

ortam en uygun ortam olurken bu ortamda gelişen embriyoların %72'si bitkiye dönüşmüştür. 3 mm boyundaki embriyolar için ise 1/2 MS+450 mg/l CaCl₂.2H₂O +100 mg/l NH₄NO₃+vitamin ilavesi en uygun ortam olarak belirlenmiş ve bu ortamlarda embriyoların %68'i bitkiye dönüşebilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda; besin ortamına ilave edilen Ca iyonunun mikrospordan embriyo oluşumu üzerinde önemli etkisinin olduğu vurgulanmıştır.

Prem vd. (2005), *Brassica juncea*'nın 3 çeşidinde mikrospor embriyogenesi üzerine ortam bileşimi ve inkübasyon sıcaklıklarının etkisini araştırmışlardır. Embriyo oluşumu üzerine besin ortamına (NLN-13) katılan aktif kömür, polivinilpyrolidin, kolhisin ve büyümeyi düzenleyici maddeler (BAP ve NAA) olumsuz etki yaparken, 10 mM AgNO₃ olumlu etkide bulunmuştur. Yüksek sıcaklık uygulamalarından 32.5°C 10-15 gün uygulaması başarılı bulunmuştur. En yüksek oranda embriyo oluşumu (78 embriyo/petri) genotipe bakılmaksızın NLN-13+10 mM AgNO₃ ortamında 32.5°C 10-15 gün tek çekirdekli mikrosporları içeren 3.1-3.5 mm büyüklüğündeki tomurcuklardan sağlanmıştır.

Sato vd. (2005), *B. rapa* var. *pekinensis* L.'de mikrospor kültürü çalışmaları için sıvı B5 ortamında (%13 sakkaroz içeren, L-glutamin, L-serine, ve hormon içermeyen) izole edilen mikrosporları, NLN sıvı ortamında (%13 sakkaroz, 0.3 mg/l BAP, PH: 6.0) 2ml/petri olacak şekilde kültüre almış ve 33 °C'de 1 gün karanlıkta inkübe edildikten sonra 25 °C karanlık ortama aktarmışlardır. Torpido aşamasına gelen embriyolar %0.2 aktif kömür, %1 gelrite içeren sürgün çoğaltım ortamına alınmış, 2 hafta sonra gelişen sürgünler %0.8 agar içeren ortama alınarak alt kültürler yapılmıştır. Daha sonra köklenmeyi uyarmak için sürgünler B5 ortamına (%2 sakkaroz, %0.8 agar) transfer edilmiştir. Tüm genotiplerde tomurcuk başına elde edilen bitki rejenerasyonunun %5.6-313.1 arasında değişim gösterdiğini, elde edilen bitkiciklerin %9.5-60.2 oranında haploid, %38.2-69.9 oranında diploid ve %0-20 oranında tetraploid yapıda olduklarını belirlemişlerdir.

Prem vd. (2008), *B. juncea*'nın 3 çeşidinde kültür ortamına ilave edilen aktif kömür ve AgNO₃'ün mikrospor embriyogenesisi üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla her izolasyonda 12 tomurcuk kullanılmış ve izole edilen mikrosporlar 10µM AgNO₃ içeren NLN-13 ortamında 40.000 mikrospor/ml olacak şekilde kültüre alınmıştır. Daha sonra petri kutularında kültüre alınan mikrospora (kontrol ve 0.2 ml aktif kömür solüsyonu) uygulamışlardır. Aktif kömür uygulaması yapılmış NLN-13+10µM AgNO₃ ortamında başarı oranını 4 kat daha artırdığını ve 100-405 embriyo/petri (2.700-10.935 embriyo/100 tomurcuk) elde edildiğini belirtmişlerdir. Çalışmanın bir diğer aşamasında aktif kömür (kontrol ve 0.2 ml AC/petri), çimlendirme ortamına embriyoların aktarım koşulunun (direkt ya da kurutulmuş) ve çimlendirme ortamındaki embriyolara farklı sıcaklık uygulamalarının (kontrol ve soğuk uygulaması) embriyoların bitkiye dönüşüm ve çimlenme oranına etkisi araştırılmışlardır. Çalışma sonucunda aktif kömür ilave edilmiş veya edilmemiş ortamlar arasında bitkiye dönüşüm yönünden farklılık görülmezken, hava üflemeli steril kabin içinde steril filtre kağıtları üzerinde 15 dakikalık kurutmanın ardından çimlendirme ortamına aktarılan embriyolar ise dönüşüm oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çimlendirme ortamına aktarılan embriyoların 4°C karanlıkta 5-10 gün süre soğuklatılması durumunda, 10 gün uygulamasında dönüşüm oranının %83 olduğunu ve embriyolardan elde edilen bitkilerin çoğunluğunun haploid olduğu saptanmıştır. Kromozom katlanması amacıyla bu embriyolardan gelişen bitkilere 3-4 yapraklı dönemde 2-3 saat %0.34 kolhisin uygulaması sonucunda canlılık oranı %70, kromozom katlanmasında başarı oranı ise %75 olmuştur.

Ülkemizde ise mikrospor kültürü çalışmaları ile ilgili detaylı çalışma domateslerde yapılmış ve bu çalışmada çok çekirdekli hücreler oluşturulmuş ancak embriyo oluşumu sağlanamamıştır (Bal 2002). Bal ve Abak (2005), domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill) tek çekirdekli mikrosporları bulunduran çiçek tomurcuklarını mannitol katılmış ortamda 10°C' de 7 gün boyunca karanlıkta beklettikten sonra, izole edilen mikrosporlar NLN ortamında 0.5mg/l BAP, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l NAA ve 2, 4 ml/l lactalbumin hydrolysate içeren ortamda kültüre alındığında simetrik çekirdek bölünmesi ve çok çekirdekli yapıların oluşumunun uyartıldığını belirtmişlerdir. Lactalbumin hydrolysate yerine casein hydrolysate'in denendiği ikinci bir denemede ise 5 ve 10 g/l

casein hydrolysate' ın bulunduğu NLN+ 0.5 mg/l BAP+ 0.5 mg/l NAA kültür ortamlarında da simetrik çekirdek bölünmesi ve çok çekirdekli yapıların oluşununun uyarıldığını, ancak embriyo oluşununun sağlanamadığını bildirmişlerdir.

Benzer bir çalışmada, biberde (*Capsicum annuum* L.) tek çekirdekli mikrosporlu aşamadaki tomurcuklar mannitollu açlık ortamında 10°C'de 7 gün boyunca bekletmiş, daha sonra izole edilen mikrosporlar 100 g/l, 130 g/l ve 170 g/l sakkaroz katılmış NLN- ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda yoğun kontaminasyon nedeniyle başarı elde edilememiş, sadece 170 g/l şeker katılmış ortamda 30. günde sayım sonuçlarına göre mikrospor kökenli kallus koloni oranının % 40.5, 60. gününde ise % 67 olduğunu, gelişen kallusların 1 ve 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre aldıklarında gelişemediklerini bildirmişlerdir (Bal vd. 2003).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma, 2007-2009 yılları arasında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde yürütülmüştür.

3.1 Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak, beyaz baş lahanası (*B. oleracea* var. *capitata* subvar. *alba*), yaprak lahanası (*B. oleracea* var. *acephala*) ve kırmızı süs lahanası kullanılmıştır. Beyaz baş lahanada ülkemizin tescilli 2 çeşidinden biri olan Yalova-1 ile Van ve çevresinde yetiştirilmekte olan ve yerel bir populasyon olan 'Erciş Populasyonu', yaprak lahanası için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet Balkaya'dan temin edilen kendilenmiş 1 hat ile özel bir tohum firmasından elde edilen 1 adet hibrit süs lahanası (Chidori red) çeşidi kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Ana (donör) bitkilerin yetiştirilmesi

Ana bitkilerin yetiştirilmesi için tohumlar tamamen torf doldurulmuş viyollere ekilmiş ve gelişen lahanası fideleri 60x80 cm, süs lahanası fideleri ise 30x60 cm aralıklarla arazide hazırlanan yerlerine dikilmiştir. Tohum ekimi ile fide dikimi tarihleri ve dikilen fide sayıları Çizelge 3.1'de özetlenmiştir. Lahanası fidelerinin dikileceği, parselde sonbaharda derin toprak işleme, ilkbaharda ise çapa motoru ile yüzlek toprak işleme yapılmıştır. Dekara 1-2 ton yanmış ahır gübresi verilmiştir. Sulamada damla sulama sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.1).

Çizelge 3.1 Lahanalarda ekim ve dikim zamanları ve dikilen toplam bitki sayısı

	Ekim zamanı		Dikim zamanı		Dikilen fide sayısı
	1.yıl		1.yıl		
	1.ekim	2.ekim	1. dikim	2. dikim	
Yalova-1	09.05.2007	10.07.2007	04.07.2007	23.08.2007	183 bitki
Erciş Populasyonu	09.05.2007	10.07.2007	04.07.2007	23.08.2007	177 bitki
Yaprak lahana	09.05.2007	10.07.2007	04.07.2007	23.08.2007	114 bitki
Süs lahanası (Chidori red)	23.08.2007	-	26.10.2007	-	141 bitki
	2.yıl		2. yıl		
Yalova-1	09.05.2008	-	10.06.2008	-	250 bitki
Erciş Populasyonu	09.05.2008	-	10.06.2008	-	315 bitki
Yaprak lahana	09.05.2008	-	10.06.2008	-	290 bitki
Süs lahanası (Chidori red)	10.08.2008	-	03.09.2008	-	200 bitki



Şekil 3.1 Dikim sonrası gelişmekte olan bitkilerin tarladaki görünümü

Şekil 3.2’de ise gelişimini tamamlamış olan lahana ve süs lahanası bitkileri görülmektedir.



Şekil 3.2.a. Lahana, b. süs lahanası bitkilerinin genel görünümü

3.2.2 Bitkilerin kışlatılması

Lahanalar ikinci yıl çiçeklenebildikleri için, beyaz baş lahanada elde edilen başlar, yaprak lahanada ise yapraklı bitkiler hasat edildikten sonra köklü şekilde bitkiler, ilk yıl **17.11.2007** tarihinde, ikinci yıl **20.11.2008** tarihinde ısıtmasız sera içinde açılan hendeklere dikilmiş ve üzerleri toprakla kapatılarak kış ayları boyunca muhafaza edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Serada hendeklere dikilen köklü lahana bitkileri

3.2.3 Bitkilerin çiçeklenme için dikimi

Seradan çıkarılan köklü lahana bitkileri ilk yıl **17.03.2008** tarihinde arazide hazırlanan yerlerine 40X20-25 cm arayla dikilmiş (Şekil 3.4.a) ve çiçeklenme başlangıcından itibaren tomurcuklar hasat edilmeye başlanmıştır. Erciş lahanası bitkileri ilk yıl sert geçen kış nedeniyle donmuş ve bitkilerin önemli bir kısmı zarar gördüğü için ilk yıl deneme programına alınamamıştır. Süs lahanaları ise kışı arazide geçirmiştir (Şekil 3.4.b). İkinci yıl denemelerinde ise; iklim ve arazi koşullarının uygun olmamasından dolayı serada saklanan köklü lahana bitkileri arazi koşullarına çıkarılamamış, çiçek tomurcukları seradaki bitkilerden alınmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.4.a. Araziye dikilen lahanalar, b. kışı arazide geçiren süs lahanaları



Şekil 3.5 İkinci yıl araziye çıkarılmayıp serada kışlatılan bitkiler

3.2.4 Mikrospor kültürü için uygun tomurcuk gelişme devresi, mikrospor gelişme dönemi ve mikrospor canlılığının belirlenmesi

Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki elde edilmesindeki ilk aşama, tek çekirdekli mikrosporları bulunduran tomurcukları seçebilmektir. Uygun tomurcuk gelişme aşamasını belirlemek amacıyla her türde çiçeklenmenin başlamasından itibaren farklı irilikteki tomurcuklardan alınan 10'ar tomurcukta tomurcuk uzunluğu, çanak ve taç yaprak uzunluğu ve anter uzunlukları cetvel yardımıyla ölçülerek ortalamaları alınmış ve tomurcuklar iriliklerine göre 5 sınıfa ayrılmıştır.

Morfolojik özelliklerine göre sınıflandırılan tomurcukların anterlerindeki mikrosporların canlılığını ve gelişme dönemlerini belirlemek amacıyla sitolojik inceleme yapılmıştır. Farklı gelişme dönemlerindeki tomurcuk örnekleri toplandıktan hemen sonra Farmer tespit çözeltisine (3 kısım %96'lık etil alkol: 1 kısım glacial asetik asit) alınarak 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve daha sonra küçük cam şişelere doldurularak %70'lik etil alkol içinde buzdolabında saklanmıştır (Elçi 1982).

Mikrosporların gelişme dönemlerini belirlemek amacıyla 2 yöntemden yararlanılmıştır:

a. Asetokarmin yöntemi: Anterler bir lam üzerine konarak ok uçlu iğne ve pens yardımıyla mikrosporlar serbest hale getirilmiş ve Elçi (1982)'ye göre hazırlanan % 1'lik asetokarminden 1 damla karıştırılmıştır. Lamel kapatıldıktan sonra preparatın üzerine bir kurutma kağıdı konarak bastırılmış ve hafif ezilmeleri sağlandıktan sonra 3-4 kez ispirto ocağında kaynatmadan ısıtılmıştır. Daha sonra preparatlar ışık mikroskobunda incelenmiştir (Sarıkamış vd. 2000).

b. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) yöntemi: Çekirdeksel DNA materyalinin tam olarak boyanabilmesini sağlayan, ve mikrospor gelişme aşamalarının net olarak görülebildiği bu yöntemde, DAPI stok solüsyonu (1 mg DAPI/1ml bidistile su) hazırlanmış ve bu stok solüsyon +4°C karanlıkta saklanmıştır. Mikroskopta inceleme yapılacağı zaman anterler bir lam üzerine konarak ok uçlu iğne ve pens yardımıyla

mikrosporlar serbest hale getirilmiş ve bu stok solüsyondan 1 µl karıştırılmıştır. Lamel kapatıldıktan sonra preparatlar alüminyum folye ile sarılarak 10 dakika kadar karanlıkta bekletildikten sonra ultraviyole ışık altında incelenmiştir (Coleman ve Goff 1985). Aynı şekilde izole edilmiş mikrosporların *in vitro* ortamdaki davranışlarını belirlemek amacıyla ilk yıl denemelerinde kültür süresinin sonunda (28. gün), kültürlerden lam üzerine 1 ml örnek alınmış ve DAPI ile boyanan preparatlar ultraviyole ışık altında incelenmiştir (Coleman ve Goff 1985).

Kültüre alınan mikrospor hücrelerinin canlılığını kontrol etmek amacıyla aşağıdaki yöntem kullanılmıştır.

FDA (fluorescein di acetate): İlk yıl denemelerinde kültüre alınan mikrosporların canlılığını test etmek amacıyla FDA (1 mg FDA/1 ml aseton) stok solüsyonu hazırlanmış ve bu stok solüsyon -20°C'de ve karanlıkta saklanmıştır. Kültürlerden kültür süresinin ikinci gününde lam üzerine 1ml örnek alınmış ve bu örneklere FDA stok solüsyonundan 4 µl damlatıldıktan sonra lamel kapatılmıştır. Daha sonra alimunyum folye ile sarılan preperatlar 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra ultraviyole ışık altında incelenmiştir (Heslop-Harrison ve Heslop Harrison 1970, Deslauriers vd. 1991). Her bir uygulamadan 1 preparat hazırlanarak her tür için toplam 24 preparattta inceleme yapılmıştır.

3.2.5 Mikrospor kültürü çalışmaları

3.2.5.1 Tomurcuk sterilizasyonu

Tek çekirdekli mikrosporlu dönemdeki tomurcuklar toplanarak birkaç damla Tween-20 damlatılmış % 10'luk ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 10 dakika bekletildikten sonra 3 kez bidistile suyla 6'şar dakika çalkalanarak yıkanmıştır.

3.2.5.2 Mikrosporların izolasyonu

Mikrosporların anterlerden izole edilmesinde ve kültüre alınmasında mikrospor kültürü çalışmalarında kullanılan ve *Brassica* türlerinde olumlu sonuç verdiği bildirilen Nitsch ve Nitsch (1967) tarafından geliştirilen ve Lichter (1981, 1982) tarafından modifiye edilen NLN-13 ortamı kullanılmıştır. İzolasyon ortamı ve temel kültür ortamı olarak kullanılan NLN-13 ortamının bileşimi Çizelge 3.2’de verilmiştir. Kültür ortamının PH’sı 6.1 olarak ayarlanmıştır.

Çizelge 3.2 Mikrospor izolasyonu ve kültüre alınmasında kullanılan sıvı NLN-13 ortamının bileşimi

Bileşik	Miktar (mg/l)
Makro Elementler	
KH ₂ PO ₄	125
KNO ₃	125
CaNO ₃ .4H ₂ O	500
MgSO ₄ .7H ₂ O	125
Mikro Elementler	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
H ₃ BO ₃	10
MnSO ₄ .4H ₂ O	25
NaFeEDTA	40
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10
Vitaminler	
L-Serine	100
Myo-inositol	100
L-Glutamine	800
Glutathione reduced	30
Nikotinik asit	5
Glycine	2
Folik asit	0.5
Pyrodoksin-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.5
D (+) Biotin	0.05
Sakkaroz	130 g/l

Her izolasyonda 40 adet tomurcuk kullanılmıştır. Tomurcuklar, Nitsch ve Nitsch (1967) tarafından geliştirilen ve Lichter (1981) tarafından modifiye edilen filtre ile sterilizasyonu yapılmış (Şekil 3.6) 3.5 ml NLN-13 ortamında (%13 sakkaroz, patates

özü ve büyüme düzenleyici içermeyen, PH: 6.1) 100 ml'lik beher içinde ezilerek mikrosporların serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra mikrospor süspansiyonu 40 µm'lik deliklere sahip eleklerden geçirilmiştir (Şekil 3.7), elekte ve beherde kalan çökelti 6.5 ml NLN-13 ortamı ile 100 ml'lik beherlere aktarılmıştır. Daha sonra süzülen süspansiyon santrifüj tüplerine alınmış, mikrosporların çökmesini sağlamak ve mikrospor safiyetini artırmak amacıyla bu süspansiyon 3 dakika 900 rpm hızda, 4°C'de 3 kez santrifüj edilerek (Şekil 3.8), mikrospor çökeltisi elde edilmiştir (Şekil 3.9).



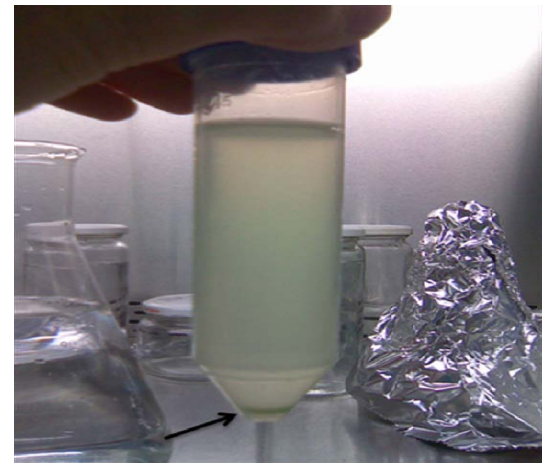
Şekil 3.6 Filtrasyon ünitesi ve kabin içinde besin ortamının sterilizasyonunun yapılışı



Şekil 3.7 Mikrospor süspansiyonunun süzülmesinde kullanılan elek sistemi



Şekil 3.8 Santrifüj işleminin yapılışı

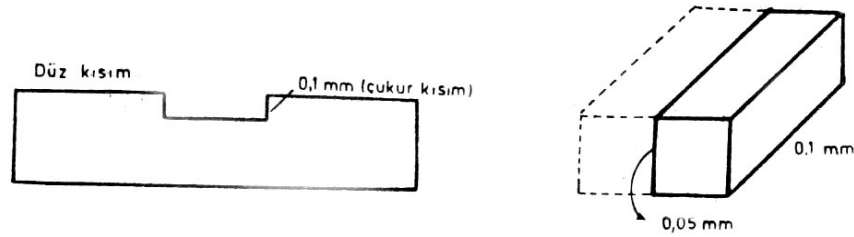


Şekil 3.9 Santrifüj işlemi sonucunda çökelen mikrosporlar

3.2.5.3 Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi

Mikrosporların belirli yoğunlukta kültüre alınmaları gerekmektedir. Bu amaçla son santrifüjleme (yıkama) işleminden sonra kültür ortamına alınan mikrosporların yoğunluğu *Brassica*'larda olumlu sonuçlar verdiği bildirilen mililitrede 40.000 adet olacak şekilde ayarlanmıştır (Takahata ve Keller 1991, Carlos ve Dias 1999, Dias ve Correia 2002, Prem vd. 2008). Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesinde Hemositometrik yöntemin bir uyarlaması kullanılmıştır (Eti 1990). Bu amaçla santrifüj tüpünde bulunan mikrospor süspansiyonundan bir damla alınmış ve thoma lamında sayım yapılarak mikrospor yoğunluğu belirlenmiştir.

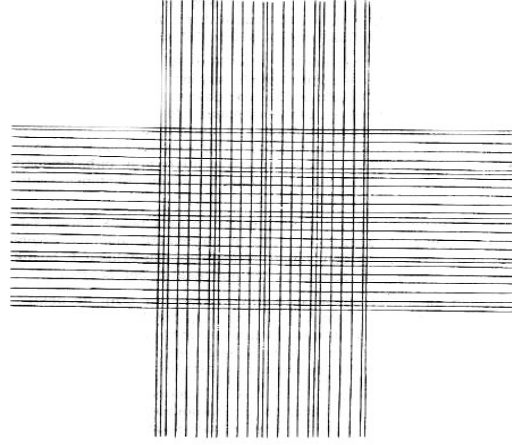
Thoma lamının esası, $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılmasıdır. Thoma lamının yandan görünüşü Şekil 3.10'da verilmiştir. Şekil 3.10'da görüldüğü gibi, küçük kare olarak belirtilen gerçekte bir kare prizmadır. Derinlik boyutu, şekilde verilen çukurun derinliğini göstermekte olup, $1/10 = 0,1 \text{ mm}$ dir. 1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi = $0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,00025 \text{ mm}^3 = 1/4.000 \text{ mm}^3$ 'dür. Bir sayım alanında $16 \times 25 = 400$ küçük kare olduğuna göre toplam sayım hacmi = $0,00025 \text{ mm}^3 \times 400 = 0,1 \text{ mm}^3$ 'dür.



Şekil 3.10 Thoma lamının yandan görünüşü

Sayım yapılacak alan, cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir (Şekil 3.11). Thoma lamı ile sayım sonucu $A \times 10.000$ formülü ile hesaplanır. Burada $A = 16$ büyük karede sayılan mikrospor sayısı adedidir. 10.000 ise $0,1 \text{ mm}^3$ 'teki sayım sonucunu 1 ml 'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir (Gürgün ve

Halkman 1990). Derinliği belli ve genellikle 0.1 mm olan lam çukurunda bulunan ve en x boy x derinlik kombinasyonunun belirlediği hacimde (0.1 mm³) bulunan mikrospor sayısı belirlenmiş ve çaprazlama 8 büyük kare sayılıp sonuç 2 ile çarpılarak 0.1 mm³'deki değer bulunmuştur. Toplam 16 büyük karede sayılan mikrospor sayısı 10.000 ile çarpılarak 1 ml'de bulunan mikrospor sayısı belirlenmiştir. Bu sayım sonucundan hareketle örneğin alındığı hacimdeki mikrospor sayısına ulaşılmıştır (Bal 2002, Doğu ve Yanmaz 2004). Bu amaçla denemelerimizde, son santrifüjleme işleminden sonra oluşan mikrospor okeltisi, taze NLN-13 ortamıyla ml'de 40.000 mikrospor içerecek şekilde yeniden süspansiyon haline getirilerek mikrospor yoğunluğu ayarlanmıştır.



şekil 3.11 Thoma lamındaki sayım yapılan kareler

3.2.6 Mikrosporların kültüre alınması

Kültüre alınan mikrosporlar tüm uygulamaların ardından 25°C sıcaklıkta karanlık koşullarda 21 gün süreyle beklemeye alınmıştır (Takahata ve Keller 1991, Duijs vd. 1992, Ferrie vd. 1999). Ancak ilk yıl denemelerinde 21 gün sonunda çoğu petride görülen enfeksiyon nedeniyle embriyolar sayılamamıştır. Bu nedenle ikinci yıl denemelerinde bekleme süresi 12 güne indirilmiştir. İkinci yıl 25°C karanlık koşullarda 12 gün süreyle bekletilen kültürlerde (şekil 3.12) bir petride 2 ya da daha çok sayıda embriyo çıplak gözle görülür görülmez petriker 45 rpm hızlı orbital çalkalayıcı üzerine alınarak 1 hafta süreyle sallanmıştır (şekil 3.13).



Şekil 3.12 İnkübatörde beklemeye alınan petrilere



Şekil 3.13 Orbital çalkalayıcı üzerine alınan petrilere

3.2.7 Mikrosporelerden haploid embriyo oluşumunu uyarmak için yapılan uygulamalar

3.2.7.1 Sıcaklık uygulaması

Kültüre alınan mikrosporelere kültür süresinin ilk birkaç günü yüksek sıcaklık şoklarının uygulanması embriyo oluşumunu uyartmada etkili olmaktadır. 3 farklı lahana türünde sıcaklığın haploid embriyo uyartımı üzerine etkisini belirlemek amacıyla ilk yıl 3 farklı sıcaklık (30°C, 32°C ve 35°C) ve süre (1, 2 ve 3 gün) denenmiştir. İkinci yıl ise embriyo oluşumu açısından daha umutvar bulunan 32°C ve 35°C'de 2 gün uygulamasıyla devam edilmiştir. İkinci yıl denemelerinde her uygulama 5x6 petri olacak şekilde planlanmış, her uygulama için toplam 4 adet izolasyon gerçekleştirilmiş ve her bir uygulama için 160 adet tomurcuk kullanılmıştır. Çizelge 3.3'de 1. ve 2. yıl denemelerinde kullanılan sıcaklık uygulamaları özetlenmiştir.

Çizelge 3.3 Lahana türlerinde kullanılan sıcaklık uygulamaları

Tür	Çeşit	Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	İzolasyon sayısı (adet)		Petri sayısı (adet)	
				1.yıl	2.yıl	1.yıl	2.yıl
Baş lahana	Yalova-1	30	1	6	-	5	
			2		-	5	
			3		-	5	
		32	1		-	5	
			2		4	5	30
			3		-	5	
		35	1		-	5	
			2		4	5	30
			3		-	5	
	Erciş lahanası	30	1	6	-	5	
			2		-	5	
			3		-	5	
		32	1		-	5	
			2		4	5	30
			3		-	5	
		35	1		-	5	
			2		4	5	30
			3		-	5	
Yaprak lahana		30	1	6	-	5	
			2		-	5	
			3		-	5	
		32	1		-	5	
			2		4	5	30
			3		-	5	
		35	1		-	5	
			2		4	5	30
			3		-	5	
Süs lahanası	Chidori red F1	30	1	18	-	12	
			2		-	12	
			3		-	12	
		32	1		-	12	
			2		4	12	30
			3		-	12	
		35	1		-	12	
			2		4	12	30
			3		-	12	

3.2.7.2 Kolhisin uygulaması

B.napus'da yapılan bir araştırmada mikrospora kolhisin uygulamasının embriyo oluşumunu artırdığının belirtilmesi üzerine (Zhou vd. 2002) bu uygulamanın lahanalarda nasıl bir sonuç verdiğini belirlemek amacıyla ilk yıl 25, 50, 100 mg/l kolhisin dozları, ikinci yıl ise ilk yıl denemelerinde daha olumlu sonuç alınan 50 ve 100

mg/l kolhisin uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla %0.2'lik kolhisin stoğu hazırlanmış ve bu stok solüsyon 4°C sıcaklıkta karanlık koşullarda saklanmıştır. Stok solüsyon kullanılmadan önce filtre ile sterilize edilmiştir. Her bir kolhisin dozu için ayrı 500 ml'lik NLN-13 ortamı hazırlanmış ve bu ortamlara kolhisin dozlarını ayarlayacak şekilde (25 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l) stok solüsyondan eklenmiştir. Daha sonra Bölüm 3.2.5.2'de açıklanan santrifüj edilmiş pellete tomurcuk başına 1 ml olacak şekilde kolhisin çözeltisinden eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyonlar santrifüj tüplerine alınmış ve 30°C sıcaklıkta karanlık koşullarda 15 saat süreyle 60 rpm hızlı orbital çalkalayıcıda sallanmıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Kolhisin katılmış ortamlardaki mikrosporların orbital çalkalayıcıdaki görünümü

15 saat sonra kolhisinin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla santrifüj tüplerindeki mikrosporlar 900 rpm hızda, 4°C' de 2 kez santrifüj edilmiştir. Daha sonra 40 000 mikrospor/ml yoğunlukta olacak şekilde taze NLN-13 ortamıyla tekrar süspansiyon haline getirilerek 5ml NLN-13/petri (40.000 mikrospor/ml = 200.000 mikrospor/petri) olacak şekilde kültüre alınmıştır. Bu uygulamada ilk yıl, serada saklanan Erciş lahanası bitkilerinin donması nedeniyle yeterli tomurcuk alınamadığından sadece kontrol grubu denemesi kurulabilmiştir. İkinci yıl denemelerinde; tüm genotiplerde ilk yıl denemelerinde daha olumlu sonuç alınan 50 mg/l ve 100 mg/l kolhisin uygulamaları denemeye dahil edilmiştir. Çizelge 3.4'de 1. ve 2. yıl denemelerinde yer alan kolhisin uygulamaları özetlenmiştir.

Çizelge 3.4 Denemelerde yer alan kolhisin uygulamaları

	Doz (mg/l)	1.yıl				2.yıl			
		Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	İ.S	P.S	Sıcaklık (°C)	Süre (gün)	İ.S	P.S
Yalova-1	Kontrol	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	32	2	4	30
		35			15	35	2	4	30
	25	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	-	-	-	-
		35			15	-	-	-	-
	50	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	32	2	4	30
		35			15	35	2	4	30
	100	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	32	2	4	30
		35			15	35	2	4	30
Erciş lahanası	Kontrol	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	32	2	4	30
		35			15	35	2	4	30
	25	30	1+2+3	-	-	-	-	-	-
		32			-	-	-	-	-
		35			-	-	-	-	-
	50	30	1+2+3	-	-	-	-	-	-
		32			-	32	2	4	30
		35			-	35	2	4	30
	100	30	1+2+3	-	-	-	-	-	-
		32			-	32	2	4	30
		35			-	35	2	4	30
Yaprak lahanası	Kontrol	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	32	2	4	30
		35			12	35	2	4	30
	25	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	-	-	-	-
		35			15	-	-	-	-
	50	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	32	2	4	30
		35			15	35	2	4	30
	100	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	32	2	4	30
		35			15	35	2	4	30
Süs lahanası	Kontrol	30	1+2+3	18	36	-	-	-	-
		32			36	32	2	4	30
		35			36	35	2	4	30
	25	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	-	-	-	-
		35			15	-	-	-	-
	50	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	32	2	4	30
		35			15	35	2	4	30
	100	30	1+2+3	6	15	-	-	-	-
		32			15	32	2	4	30
		35			15	35	2	4	30

İ.S: izolasyon sayısı, P.S: petri sayısı

Denemede her uygulama için 5x6 petri olmak üzere planlanmış, her uygulama için toplam 4 adet izolasyon gerçekleştirilmiş ve her bir uygulamada 160 adet tomurcuk kullanılmıştır.

3.2.7.3 Aktif kömür uygulaması

Aktif kömürün etkinliğini belirlemek amacıyla ilk yıl denemelerinde farklı dozlarda aktif kömür uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla otoklavda sterilizasyonu yapılan aktif kömür solüsyonundan (1 g aktif kömür+0.5 g agaroz+100 ml bidistile su) her bir petri kabına 0.1-0.2 ml ilave edilmiş ve sıcaklık uygulamasının ardından 25°C’de karanlıkta kültüre alınmıştır (Carlos ve Dias 1999).

İlk yıl denemelerinde herhangi bir embriyo oluşumu gözlenemeyen aktif kömür uygulaması ikinci yıl denemelerinde devre dışı bırakılmıştır.

3.2.7.4 Gama ışını uygulaması

Taranan kaynaklarda *Brassica napus* L.’da tomurcuklara gama ışını uygulamasının haploid embriyo oluşumunu uyardığının belirtilmesi üzerine bu uygulama ikinci yıl denemelerine alınmış ve modifiye edilerek yaprak lahanası ve süs lahanasında denenmiştir (Pechan ve Keller 1989).

Bu amaçla tek çekirdekli mikrosporları içeren tomurcuklar gama uygulaması yapılmak üzere Türkiye Atom Enerjisi Kurumu’na götürülmüştür. Gama ışını uygulaması yapacak olan cihazın kaynak gücü 0,938 KGy/saat olarak belirlenmiştir. Yaprak lahanada gama dozu olarak 2 doz (100 Gy ve 300 Gy), süs lahanasında ise 4 doz (50 Gy, 75 Gy, 100 Gy ve 300 Gy) kullanılmıştır. Işınlama yapılan yerden tomurcukların laboratuvara hemen ulaştırılması mümkün olmadığından ışınlamadan bir süre sonra (yaprak lahanada 19 saat, süs lahanasında 24 saat) tomurcuklar işleme alınabilmektedir. Işınlanan tomurcuk sayısının fazla olması nedeniyle, izolasyon öncesi tomurcuklar 5 saat süreyle 4°C’de kuru (doğrudan petri kutuları içinde) ve sıvı (NLN-13) ortamda

bekletilmiş ve böylece ışınlamanın etkisinin devamlılığı ve tomurcuk saklama koşulları arasında farklılığın olup olmadığı test edilmeye çalışılmıştır.

Deneme her uygulama için 4x6 petri olmak üzere planlanmış, her uygulama için toplam 3 adet izolasyon gerçekleştirilmiştir. Her uygulama için toplam 120 adet tomurcuk kullanılmıştır.

3.2.7.5 Besin ortamını yenileme uygulamaları

Yapılan kaynak taramalarında lahanalarda besin ortamının şeker konsantrasyonunun değiştirilmesi ve ortam yenilemenin mikrospor embriyogenesi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Lionneton vd. 2001, Gu vd. 2003, Wei vd. 2008). Bu amaçla 2. yıl denemelerinde, 3 farklı lahana türünde NLN-16 ortamında izole edilen mikrosporlar iki farklı ortamda (NLN-16 ve NLN-16+50 mg/l kolhisin) 32°C sıcaklıkta karanlık koşullarda 2 gün süreyle inkübe edildikten sonra NLN-13 ve NLN-16 ortamlarına alınarak ortam yenileme uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Ortamlar Çizelge 3.5’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.5 Denemelerde yer alan besin ortamı yenileme uygulamaları

Tür	Çeşit	Ortam bileşimleri
Baş lahana	Yalova-1	Ortam 1 (NLN-16 / NLN-13)
		Ortam 2 (NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-13)
		Ortam 3 (NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-16)
	Erciş	Ortam 1 (NLN-16 / NLN-13)
		Ortam 2 (NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-13)
		Ortam 3 (NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-16)
Yaprak lahana		Ortam 1 (NLN-16 / NLN-13)
		Ortam 2 (NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-13)
		Ortam 3 (NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-16)
Süs lahanası	Chidori red F1	Ortam 1 (NLN-16 / NLN-13)
		Ortam 2 (NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-13)
		Ortam 3 (NLN-16+50 mg/l kolhisin / NLN-16)

Deneme her uygulama için 4x5 olacak şekilde planlanmış, her uygulama için toplam 3 adet izolasyon gerçekleştirilmiştir. Her uygulamada toplam 120 adet tomurcuk kullanılmıştır.

3.2.8 Embriyoların çimlendirilmesi

Kültür süresinin sonunda (izolasyondan 19 gün sonra) embriyo ya da embriyo başlangıcı yapılar %2 sakkaroz, %0.9 agar takviyeli Gamborg vd. (1968) tarafından geliştirilen ve hormon içermeyen B5 ortamında 25 °C ve 16 saat gün uzunluğundaki iklim odasında çimlendirmeye alınmıştır. Embriyoların bir bölümü düşük agarlı (7 g agar/l) ortama aktarılmış, böylece embriyoların gelişebilmeleri için gevşek bir ortam sağlanmaya çalışılmıştır. Ayrıca olası enfeksiyonu engellemek amacıyla besin ortamına çok düşük dozda antibiyotik katılmıştır (250 mg augmentin/lt).

3.2.9 Yapılan ölçüm ve değerlendirmeler

- **Embriyo ya da embriyo başlangıcı yapıların sayımı (Embriyogenik kapasite):** İzolasyondan 12 gün sonra ve orbital çalkalayıcı üzerinde sallanan petrielerde 1 hafta sonunda (izolasyondan 19 gün sonra) petri başına embriyo veya embriyo başlangıcı yapılar sayılmıştır.

3.2.10 İstatistiki değerlendirme

Denemeler ilk yıl tür x sıcaklık uygulamaları x dozlar (gama ve kolhisin) arasındaki ilişkileri ortaya koymak amacıyla faktöriyel deneme düzenine göre kurulmuştur. Ancak 2. yıl denemelerinde her faktörün etkisini belirlemek amacıyla faktöriyel varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizini takiben farklı grupları belirlemek amacıyla Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. İkili ve üçlü interaksiyonlar istatistik olarak önemli bulunduğundan, Duncan çoklu karşılaştırmaları alt gruplar düzeyinde yapılmıştır. Hesaplamalarda istatistik önemlilik düzeyi % 5 olarak alınmış ve hesaplamalar SPSS istatistik paket programında yürütülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

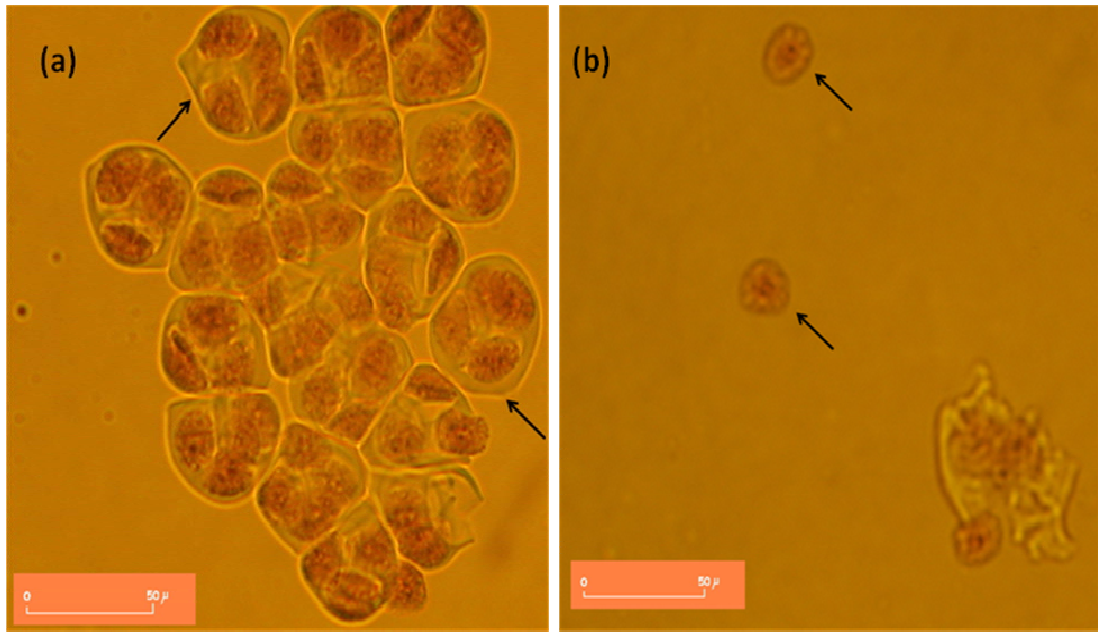
4.1 Mikrospor Kültürü İçin Uygun Tomurcuk Gelişme Devresi, Mikrospor Gelişme Dönemi ve Mikrospor Canlılığının Belirlenmesi

İlk çiçek tomurcukları 1. yıl Yalova-1 beyaz baş lahanada 24.03.2008, Erciş lahanasında 27.03.2008, yaprak lahanada 28.03.2008, süs lahanasında ise 20.04.2008 tarihinde görülürken, ikinci yıl ise bu tarihler Yalova-1 çeşidinde 25.02.2009, yaprak lahanada 01.03.2009, Erciş lahanasında 07.03.2009, süs lahanasında 09.04.2009 olarak belirlenmiştir. Denemelerde tek çekirdekli mikrospor gelişme aşamasındaki tomurcuk büyüklüğünü belirlemek amacıyla hasat edilen tomurcuklar 5 farklı gruba ayrılarak, her bir gelişme dönemine ait tomurcuk uzunluğu, çanak yaprak uzunluğu, taç yaprak uzunluğu, anter uzunluğu ve petal/anter oranlarının ortalama değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Lahana türlerinde tomurcuk iriliğine göre tomurcuk özellikleri

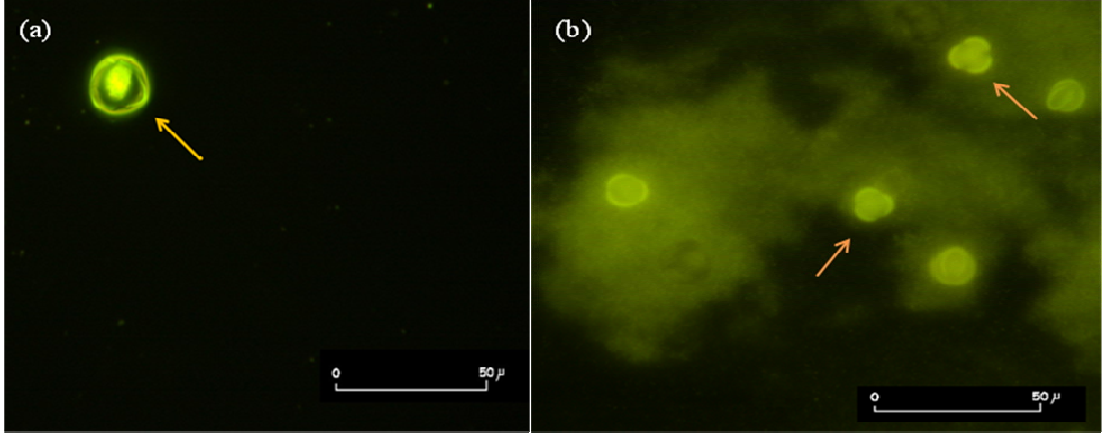
	Gelişme dönemi	Tomurcuk uzunluğu (mm)	Çanak yaprak uzunluğu (mm)	Taç yaprak uzunluğu (mm)	Anter uzunluğu (mm)	Petal/anter oranı
Yalova-1						
	1	3.6	2.3	1.1	2.3	0.47
	2	5.3	4.2	1.5	3.1	0.48
	3	5.5	4.4	1.8	3.7	0.48
	4	7.0	5.0	2.1	4.2	0.50
	5	8.1	7.2	4.4	5.3	0.83
Erciş lahanası						
	1	2.2	2.0	1.7	2.0	0.85
	2	4.4	4.0	2.0	3.0	0.66
	3	5.0	4.3	2.4	3.5	0.68
	4	5.9	5.0	3.0	4.1	0.73
	5	6.3	6.1	4.3	5.3	0.81
Yaprak lahanası						
	1	6.2	4.7	1.6	4.1	0.39
	2	6.7	4.9	2.0	4.6	0.43
	3	7.1	5.9	3.5	5.2	0.67
	4	8.3	6.3	5.1	6.2	0.82
	5	10	9.6	7.0	7.2	0.97
Süs lahanası						
	1	2.4	2.0	1.2	2.0	0.60
	2	4.4	2.8	1.5	2.8	0.53
	3	6.3	5.3	1.8	3.7	0.48
	4	7.2	5.8	2.1	4.2	0.50
	5	9.3	7.2	3.8	6.1	0.62

Çizelge 4.1'e göre yaprak lahananın diğer türlere göre daha iri tomurcuklara sahip olduğu, bunu süs lahanası ve Yalova-1'in izlediği, Erciş lahanasının ise en küçük tomurcuklara sahip olduğu anlaşılmaktadır. 5 farklı gelişme dönemindeki tomurcuklarda mikrospor gelişme dönemi asetokarmin ve DAPI yöntemi ile boyanarak mikroskop altında incelenmiştir. İnceleme sonuçlarına göre, Yalova-1 çeşidinde ve süs lahanasında asetokarmin yöntemiyle boyanmış tek çekirdekli mikrosporlar ve tetratlar **2. gelişme dönemindeki tomurcuklarda** görülürken, yaprak lahana ve Erciş lahanasında **1. gelişme dönemindeki tomurcuklarda** görülmüştür (Şekil 4.1).

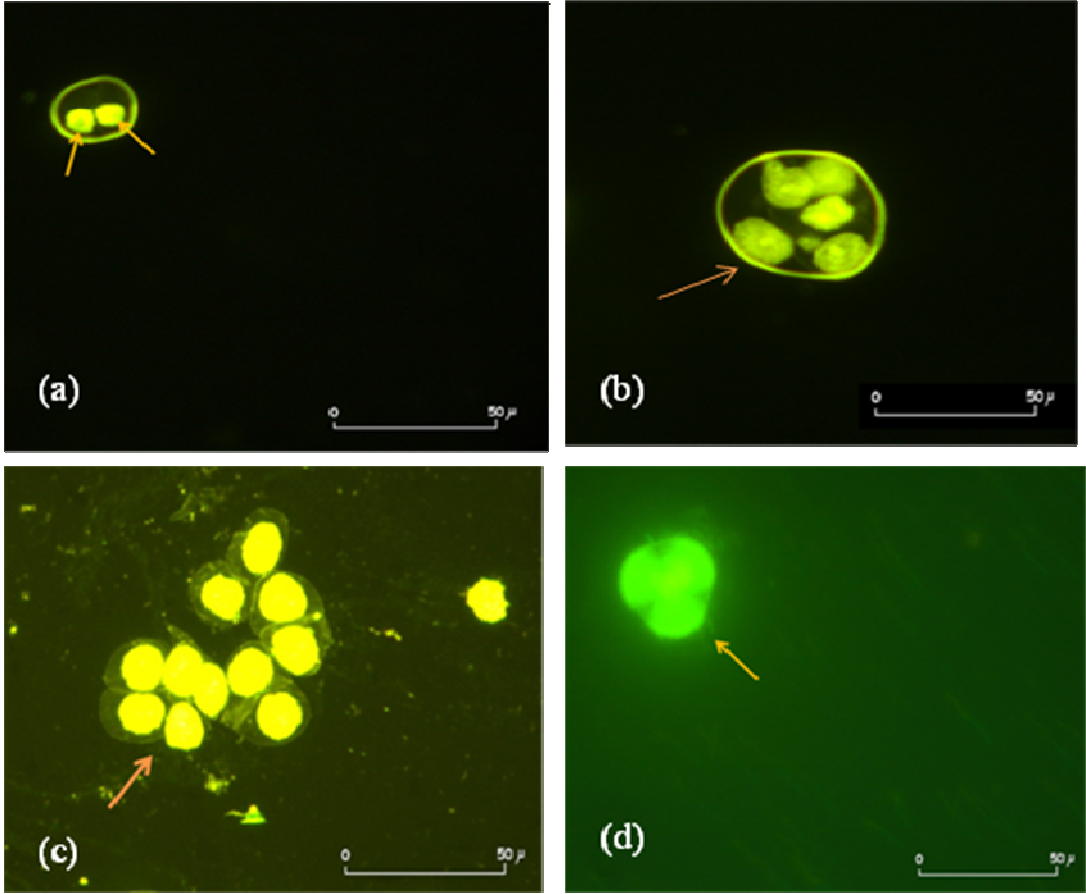


Şekil 4.1 Asetokarminle boyanmış: **a.** tetrat aşaması (Yalova-1, 2. gelişme dönemi), **b.** tek çekirdekli mikrosporlar (yaprak lahana, 1. gelişme dönemi) (x 40 büyütme)

DAPI yönteminde çekirdeksel DNA materyali tam olarak boyanabilmekte ve mikrospor gelişme aşamalarını net olarak belirlenebilmektedir. Şekil 4.2'de DAPI ile boyanmış preparatlarda tek çekirdekli mikrospor ve olgun polenler görülmektedir. Kültüre alınan mikrosporların besin ortamında 28. gün sonraki görüntüleri incelendiğinde, çoklu hücre grupları ve simetrik çekirdek bölünme aşamasındaki mikrosporların yanında çok çekirdekli yapılara (embriyoid) da rastlanılmıştır (Şekil 4.3).



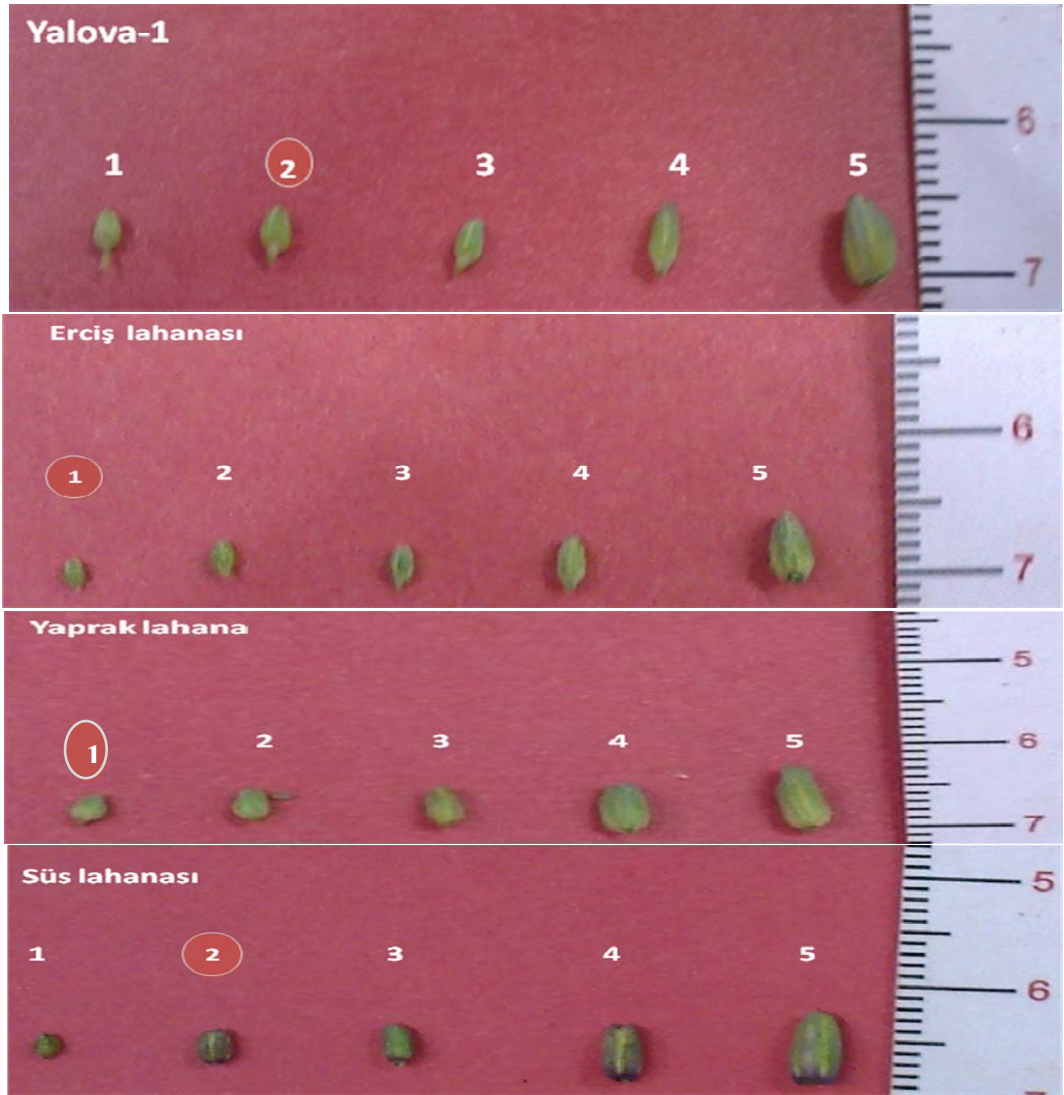
Şekil 4.2 DAPI ile boyanmış: **a.** tek çekirdekli mikrospor (Yalova-1, 2. gelişme dönemi), **b.** olgun polen (süs lahanası, 3. gelişme dönemi) (x 40 büyütme)



Şekil 4.3 Kültüre alınan mikrosporelerde 28 gün sonra görülen: **a.** simetrik çekirdek bölünmesi (32°C 2 gün + kontrol, Yalova-1), **b.** çok çekirdekli yapı (32°C 2 gün + 50 mg/l kolhisin, süs lahanası), **c.** çoklu hücre grubu (32°C 2 gün + kontrol, yaprak lahanası) ve **d.** çoklu hücre yapısı (32°C 3 gün + 25 mg/l kolhisin, yaprak lahanası) (x 40 büyütme)

Elde ettiğimiz bulgular, tomurcuk büyüklüğünün türlere göre değişim gösterdiğini, yapılan sitolojik gözlemler sonucunda tüm türlerde mikrosporogenesis aşamalarının, tomurcuğun çok küçük olduğu dönemde (1. ve 2. gelişme dönemi) görülebileceğini, 3. ve daha sonraki gelişme aşamalarında bulunan tomurcukların tümünde genç veya olgunlaşmakta olan çiçek tozlarına rastlanıldığını göstermiştir.

Bu sonuçlara göre tek çekirdekli mikrosporlar türlere göre farklı gelişme dönemindeki tomurcuklardan elde edilmiştir. Bu aşama Şekil 4.4’de halka içine alınarak, Çizelge 4.1’de ise koyu renkle belirtilmiştir.



Şekil 4.4 Farklı gelişme dönemine ait tomurcuklar

Denememizde uygun tomurcuk dönemi olarak belirlenen tomurcukların bitkide çiçek salkımı üzerindeki dizilişi gözlenerek, pratik açıdan bu tip mikrosporları bulunduran tomurcukların, tomurcuk kümesinin en iç halkasındaki küme içinden alınmasının avantaj sağlayacağı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Çiçek salkımı üzerinde tomurcukların dizilişi ve iç halkadaki tomurcuklar

Boyama çalışmaları sonuçları ve tomurcuk ölçüm sonuçları birlikte değerlendirildiğinde (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4) Yalova-1 çeşidinde 5.3 mm, Erciş lahanasında 2.2 mm, yaprak lahanada 6.2 mm, süs lahanasında ise 4.4 mm ve daha küçük tomurcuklarının tercih edilmesinin gerektiği sonucuna varılmıştır.

Mikrospor kültüründe kültüre alınan mikrosporlar canlılıklarını çok kısa sürede kaybedebilmektedir. Bu nedenle kültüre alınan mikrosporların canlı olup olmadıklarının belirlenmesi önem taşımaktadır. Mikrospor canlılığı FDA ile boyanarak tespit edilmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi canlı olan mikrosporlar flouresans ışıkta parlak görünmektedir. (Maraschin vd. 2003). Bizim çalışmamızda canlılık ilk yıl

denemelerinde test edilmiştir. Kültür süresinin ikinci günündeki sonuçlara göre tüm mikrosporların canlı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Kültür ortamında FDA ile boyanmış canlı mikrosporlar (x 40 büyütme)

4.2 Farklı Uygulamaların Haploid Embriyo Oluşumu Üzerine Etkileri

4.2.1 Birinci yıl sonuçları

İlk yıl denemelerinde, mikrospor kültürü tekniğinin lahanalarda ilk defa denenecek olması nedeniyle uygulamalara göre embriyolar elde edilmiş, ancak kaynak verilerine göre kültürlerin son güne kadar bekletilmesi sonucu enfeksiyon nedeniyle rakamsal veri elde edilememiştir. Kaynak verilerine göre mikrospor izolasyonundan 4 hafta sonra kotiledonar aşamadaki embriyoların görülebildiği belirtilmektedir. Bizim denemelerimizde izolasyondan 21 gün sonra petrilerin büyük bir çoğunluğunda enfeksiyon oluşumu nedeniyle embriyo sayımı olanaksız hale gelmiştir.

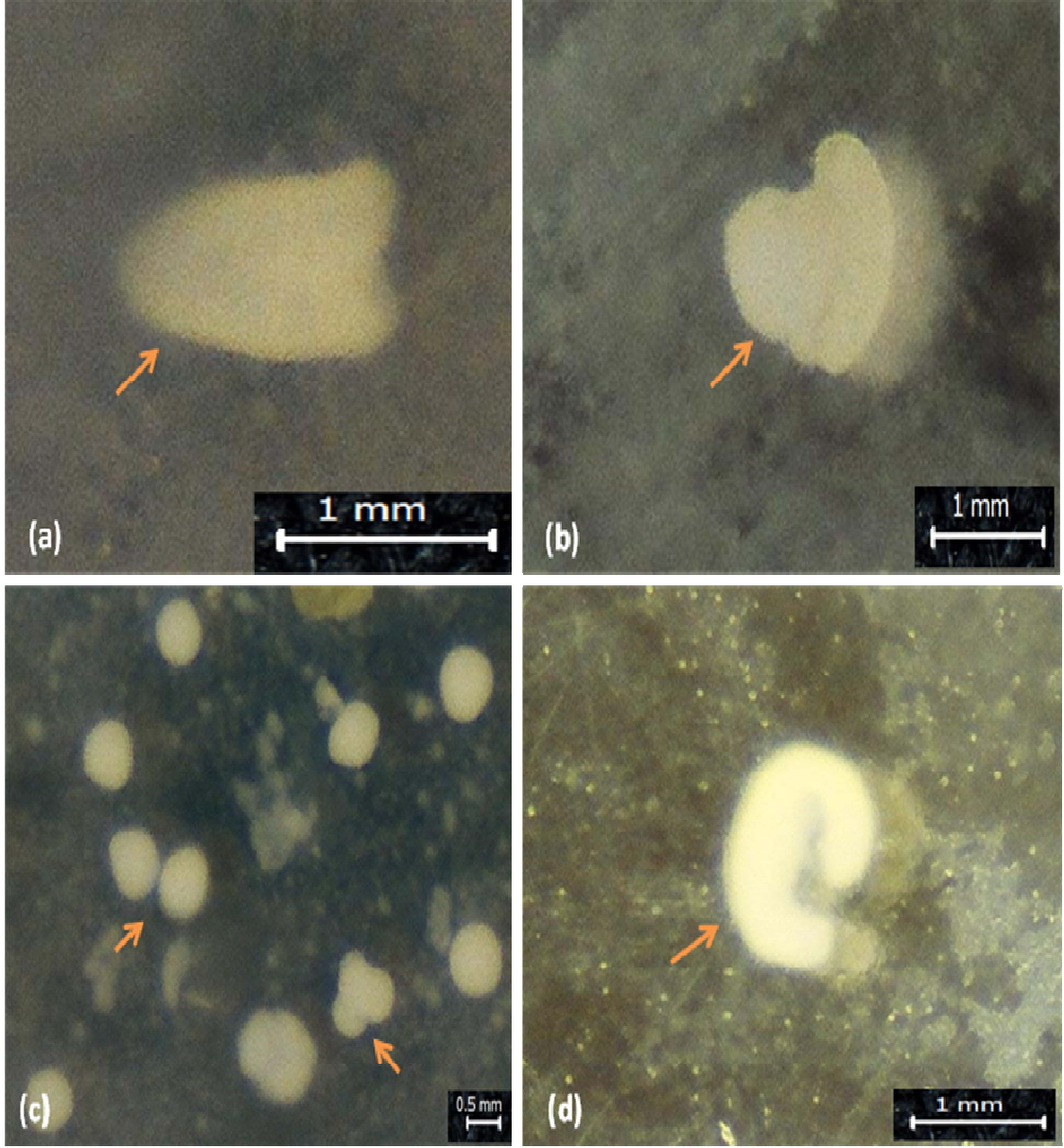
Ancak ikinci yıl çalışmalarına ışık tutacak şekilde gözlemler değerlendirilmiş ve 2. yıl denemeleri bu sonuçlara göre şekillendirilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 İlk yıl denemelerinde umutvar bulunan uygulamalar

Tür	Çeşit	Uygulama Adı
Baş lahanası	Yalova-1	Tüm uygulamalarda enfeksiyon görülmüştür.
	Erciş lahanası	Tüm uygulamalarda enfeksiyon görülmüştür.
Yaprak lahanası		32°C-2 gün 32°C - 3 gün 32°C - 1 gün + 25 mg/l kolhisin 32°C - 3 gün + 25 mg/l kolhisin 32°C - 1 gün +50 mg/l kolhisin 32°C - 2 gün +50 mg/l kolhisin
Süs lahanası	Chidori red	32°C - 1 gün 32°C - 2 gün 32°C - 3 gün 32°C 1 gün + 100 mg/l kolhisin 32°C 2 gün + 100 mg/l kolhisin 32°C 3 gün + 100 mg/l kolhisin 35°C - 1 gün 35°C - 2 gün 35°C - 3 gün 35°C 1 gün + 100 mg/l kolhisin 35°C 2 gün + 100 mg/l kolhisin 35°C 3 gün + 100 mg/l kolhisin

İlk yıl denemelerinde kültür süresinin sonunda yapılan mikroskopik incelemelerde sadece yaprak ve süs lahanasındaki kültürlerde embriyolara rastlanılmış (Şekil 4.7), baş lahanada (Yalova-1 ve Erciş lahanası) ise tüm petrilere enfeksiyon oluşumu meydana gelmiştir.

Gözlem sonuçlarına göre sıcaklık şoku olarak **32°C ve 35°C + 2 gün, kolhisin dozu olarak 50 ve 100 mg/l kolhisin** uygulamaları ikinci yıl çalışmalarına aktarılmıştır. İlk yıl sonuçlarına göre, her 3 türde de hiçbir ortam ve koşulunda embriyo oluşumu gözlenemeyen aktif kömür uygulaması devre dışı bırakılmıştır.



Şekil 4.7 Mikrospor kültüründe 28 gün sonra görülen: **a.** yürek şekilli embriyo (32°C 2 gün + 50 mg/l kolhisin, yaprak lahanası) (x 1.25), **b.** yürek şekilli embriyo (35°C 2 gün, süs lahanası) (x 1.0), **c.** globular embriyolar (32°C 2 gün, yaprak lahanası) (x 1.25), **d.** gelişmiş embriyo (35°C 1 gün, süs lahanası) (x 1.25)

4.2.2 İkinci yıl sonuçları

İlk yıl denemelerinde kültür süresinin sonunda (28. gün) enfeksiyon nedeniyle embriyo sayımları yapılamamıştır. Sayım sırasında enfeksiyon nedeniyle yaşanan sıkıntı

nedeniyle 2. yıl denemelerinde sayımlar, kültürlerin 12. ve 19. gününde olmak üzere 2 kez yapılmıştır.

4.2.2.1 Sıcaklık uygulaması

Sıcaklık şoku olarak 2 sıcaklık derecesi (32°C ve 35°C) 2 gün süreyle denenmiştir. 12. ve 19. gün sayımlarına göre elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3 ve 4.4’de verilmiştir. Çizelge 4.3 ve 4.4 incelendiğinde embriyo sayısı açısından türler arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunurken ($P<0.05$), sıcaklık dereceleri arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.3 Lahana türlerinde sıcaklık şokunun embriyo sayısına etkisi (12. gün)

Tür	Çeşit	Sıcaklık (°C)	
		32	35
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Baş lahana	Yalova-1	2,66±1,00 b	2,53±0,59 bc
	Erciş lahanası	5,23±2,33 ab	0,36±0,28 c
Yaprak lahana		3,12±0,75 b	6,03±1,78 ab
Süs lahanası	Chidori red F1	7,46±2,16 a	7,13±0,69 a

Aynı sütunda farklı harfler türler arası farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). Sıcaklıklar arası fark önemli olmadığından harflendirme yapılmamıştır.

Çizelge 4.3’de süs lahanası ve yaprak lahananın baş lahanaya göre mikrospor kültürüne daha iyi cevap verdiği görülmektedir. Süs lahanasından her iki sıcaklıkta da daha fazla embriyo (7,46 ve 7.13 embriyo/petri) elde edilmiştir. Yine çizelgedeki rakamlara göre sıcaklıklar arasında istatistik olarak önemli farklılık olmamasına rağmen, süs lahanası ve Yalova-1 baş lahana çeşidinin sıcaklık yönünden seçici olmadığı, buna karşılık Erciş lahanasında 32°C (5.23 embriyo/petri), yaprak lahanada ise 35°C sıcaklık uygulamasının (6.03 embriyo/petri) daha başarılı olduğu dikkat çekmektedir (Çizelge 4.3).

Aynı şekilde 19. gün sayım sonuçlarında da başarılı olan uygulamalar 12. gün sonuçlarına benzerlik göstermiştir. 32°C sıcaklıkta Yalova-1 çeşidi (3.80 embriyo/petri)

ve süs lahanasında (8.46 embriyo/petri) embriyo sayısı 12. güne göre artış gösterirken, Erciş lahanası ve yaprak lahanada azalmıştır. (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Lahana türlerinde sıcaklık şokunun embriyo sayısına etkisi (19. gün)

Tür	Çeşit	Sıcaklık (°C)	
		32	35
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Baş lahana	Yalova-1	3,80±1,42 b	2,36±0,85 b
	Erciş lahanası	3,45±1,49 b	0,43±0,24 b
Yaprak lahana		0,96±0,54 b	4,06±1,64 ab
Süs lahanası	Chidori red F1	8,46±2,19 a	7,13±1,37 a

Aynı sütunda farklı harfler türler arası farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). Sıcaklıklar arası fark önemli olmadığından harflendirme yapılmamıştır.

4.2.2.2 Kolhisin uygulaması

2 sıcaklık derecesi (32°C ve 35°C) ve 2 kolhisin dozu (50 mg/l ve 100 mg/l) kullanılarak yapılan denemenin 12. ve 19. gün sonuçları türler bazında ayrı ayrı incelenmiştir.

Baş lahana

Çizelge 4.5'e göre 'sıcaklık x doz' interaksiyonunun istatistik olarak önemli bulunması nedeniyle, faktörlerin bağımsız etkilerinden söz edilememiştir. Buna göre, Yalova-1 çeşidinde 32°C + 50 mg/l kolhisin dozu (6.59 embriyo/petri) daha başarılı bulunmuştur. Buna karşılık, aynı sıcaklık derecesinde Erciş lahanası çeşidinde hiç kolhisin uygulanmayan denemelerden (5.23 embriyo/petri) ve 100 mg/l kolhisin uygulamasında (4.19 embriyo/petri) embriyo sayısının arttığı belirlenmiştir. 100 mg/l kolhisin uygulamaları 35°C sıcaklıkta tutulan petrilere her iki çeşitte de daha etkili bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Baş lahanada (Yalova-1 ve Erciş) farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (12. gün)

Tür	Çeşit	Kolhisin dozu (mg/l)	Sıcaklık (°C)	
			32	35
			Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Baş lahanada	Yalova-1	Kontrol	2,66±1,00 b B ¹	2,53±0,59 a AB ¹
		50	6,59±1,48 a A ¹	1,06±0,35 a B ²
		100	2,16±0,36 a B ¹	4,86±2,32 a A ¹
	Erciş	Kontrol	5,23±2,33 a A ¹	0,36±0,28 a B ²
		50	0,79±0,27 b B ¹	1,56±0,53 a AB ¹
		100	4,19±0,71 a A ¹	3,92±0,52 a A ¹

Aynı sütunda farklı büyük harfler kolhisin dozları arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı kolhisin dozunda farklı küçük harfler çeşitler arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı satırda farklı rakamlar sıcaklıklar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Kültür süresinin 19. gününde yapılan embriyo sayım sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4.6), sonuçların 12. gün sonuçlarıyla benzer olduğu dikkat çekmektedir. Yine en yüksek embriyo sayısı Yalova 1 çeşidinde 32°C + 50 mg/l dozundan alınmıştır.

Çizelge 4.6 Baş lahanada (Yalova-1 ve Erciş) farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (19. gün)

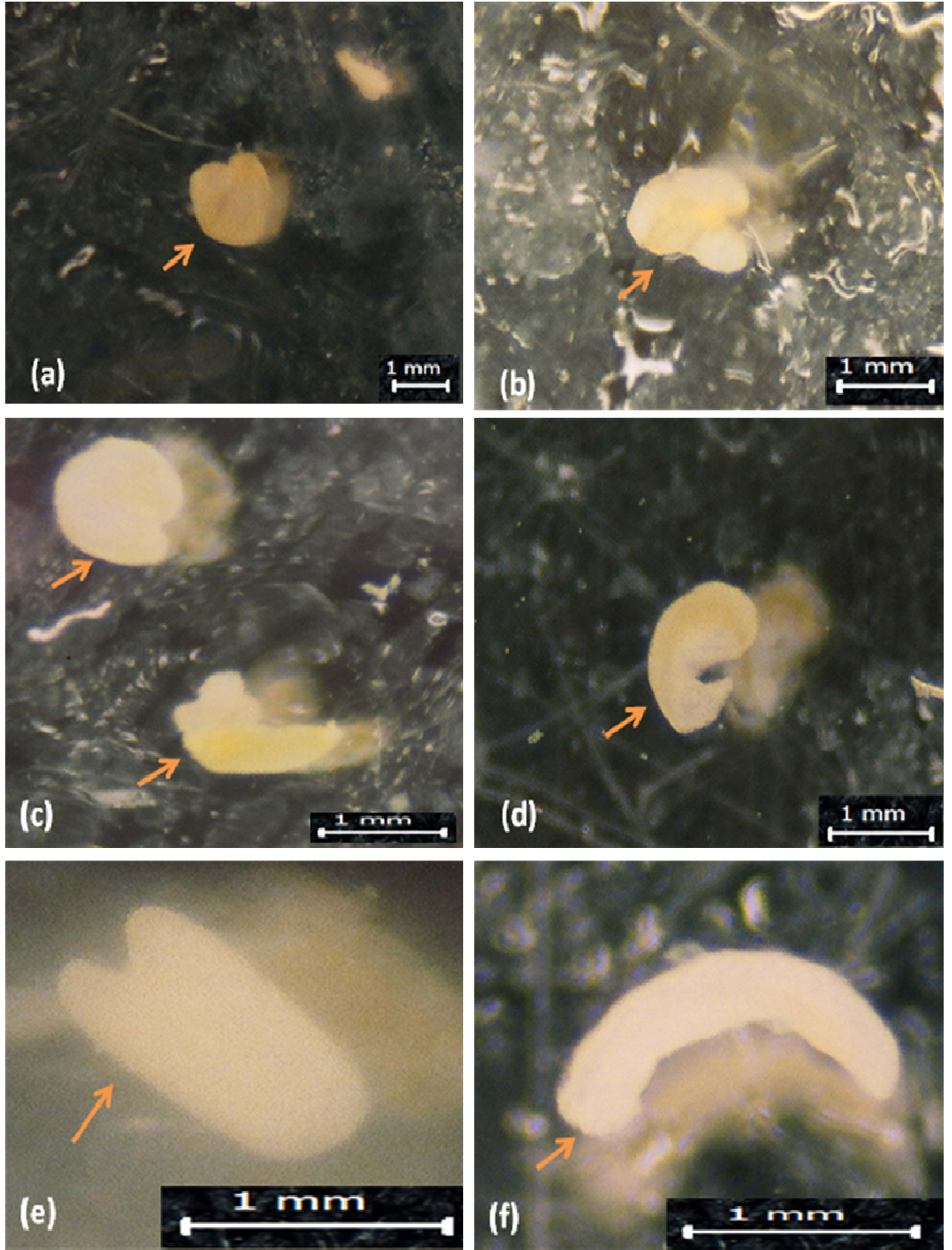
Tür	Çeşit	Kolhisin dozu (mg/l)	Sıcaklık (°C)	
			32	35
			Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Baş lahanada	Yalova-1	Kontrol	3,80±1,42 a A ¹	2,36±0,85 a A ¹
		50	4,06±0,76a A ¹	0,93± 0,28a A ²
		100	1,91±0,71a A ¹	3,10±1,17 a A ¹
	Erciş	Kontrol	3,45±1,49a A ¹	0,43±0,24 a A ²
		50	0,66±0,28b B ¹	1,52±0,61 a A ¹
		100	2,91±0,65 a AB ¹	2,86±0,55 a A ¹

Aynı sütunda farklı büyük harfler kolhisin dozları arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı kolhisin dozunda farklı küçük harfler çeşitler arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı satırda farklı rakamlar sıcaklıklar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Şekil 4.8’de kültür süresinin 12. ve 19. gününde Yalova-1 ve Erciş lahanasında oluşan embriyoların fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 4.8 Kültür süresinin 12. gününde görülen: **a.** yürek şekilli embriyo (32°C + 50 mg/l kolhisin, Yalova-1) (x 0.63), **b.** torpedo embriyo (35°C + kontrol, Yalova-1) (x 0.8), **c.** torpedo embriyo (32°C + kontrol, Erciş) (x 1.0), 19 günlük embriyolar: **d.** anormal embriyo (32°C + kontrol, Erciş) (x1.0), **e.** torpedo embriyo (32°C + 50 mg/l kolhisin, Yalova-1) (x 0.63), **f.** yürüyen çubuk şekilli embriyo (32°C + 50 mg/l kolhisin, Yalova-1) (x 1.25)

Yaprak lahanana

Yaprak lahanada 12. gün sonuçlarına göre yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda, embriyo sayısı bakımından kolhisin dozları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. Buna karşılık sıcaklık dereceleri arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır. En yüksek embriyo sayısı 35°C’de kontrolden alınmıştır (6.03 embriyo/petri). Bunu 32°C + 100 mg/l kolhisin uygulaması (4.99 embriyo/petri) izlemiştir. 50 mg/l kolhisin dozu etkili bulunmamıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Yaprak lahanada farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (12. gün)

Tür	Kolhisin dozu (mg/l)	Sıcaklık (°C)	
		32	35
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Yaprak lahanana	Kontrol	3,12±0,75 AB	6,03±1,78 A
	50	0,36±0,14 B	0,93±0,85 B
	100	4,99±0,94 A	3,99±1,47 AB

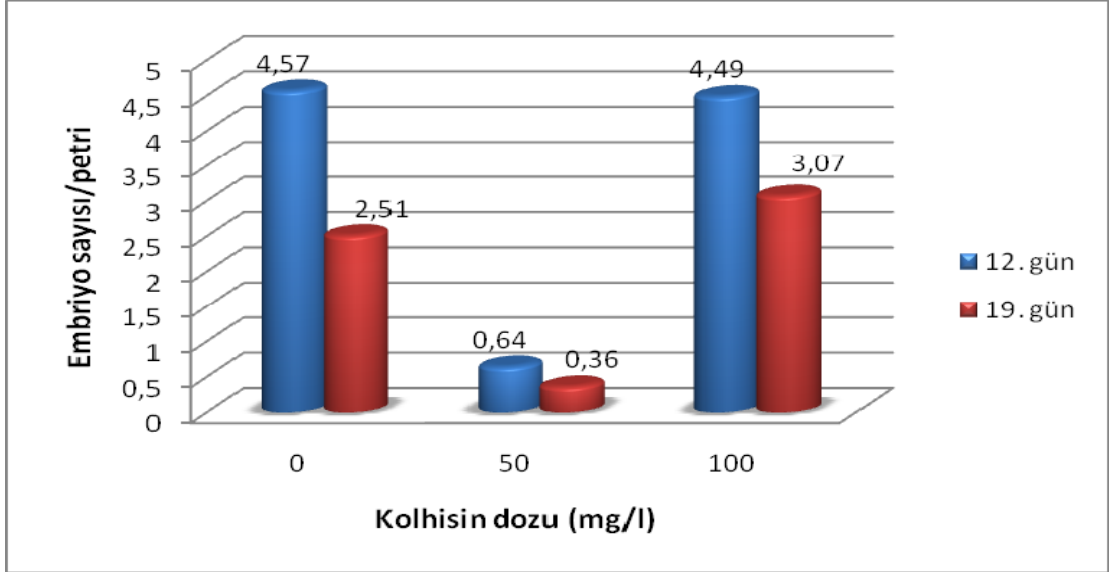
Aynı sütunda farklı harfler kolhisin dozları arası farklılığı göstermektedir (p<0.05). Sıcaklıklar arası fark önemli olmadığından harflendirme yapılmamıştır.

Kültür süresinin 19. gününde yapılan embriyo sayım sonuçları da 12. gün sonuçları ile paralellik göstermiştir (Çizelge 4.8). Hem sıcaklıklar arası farklılığın hem de ‘sıcaklık x doz interaksiyonunun’ istatistik olarak önemli olmaması nedeniyle, doz ortalamaları alınarak yapılan değerlendirmede dozların etkisi daha iyi izlenebilmektedir (Şekil 4.9). Bu sonuçlara göre yaprak lahanasında kolhisin uygulamalarının etkisinin dikkate değer olmadığı anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.8 Yaprak lahanada farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (19. gün)

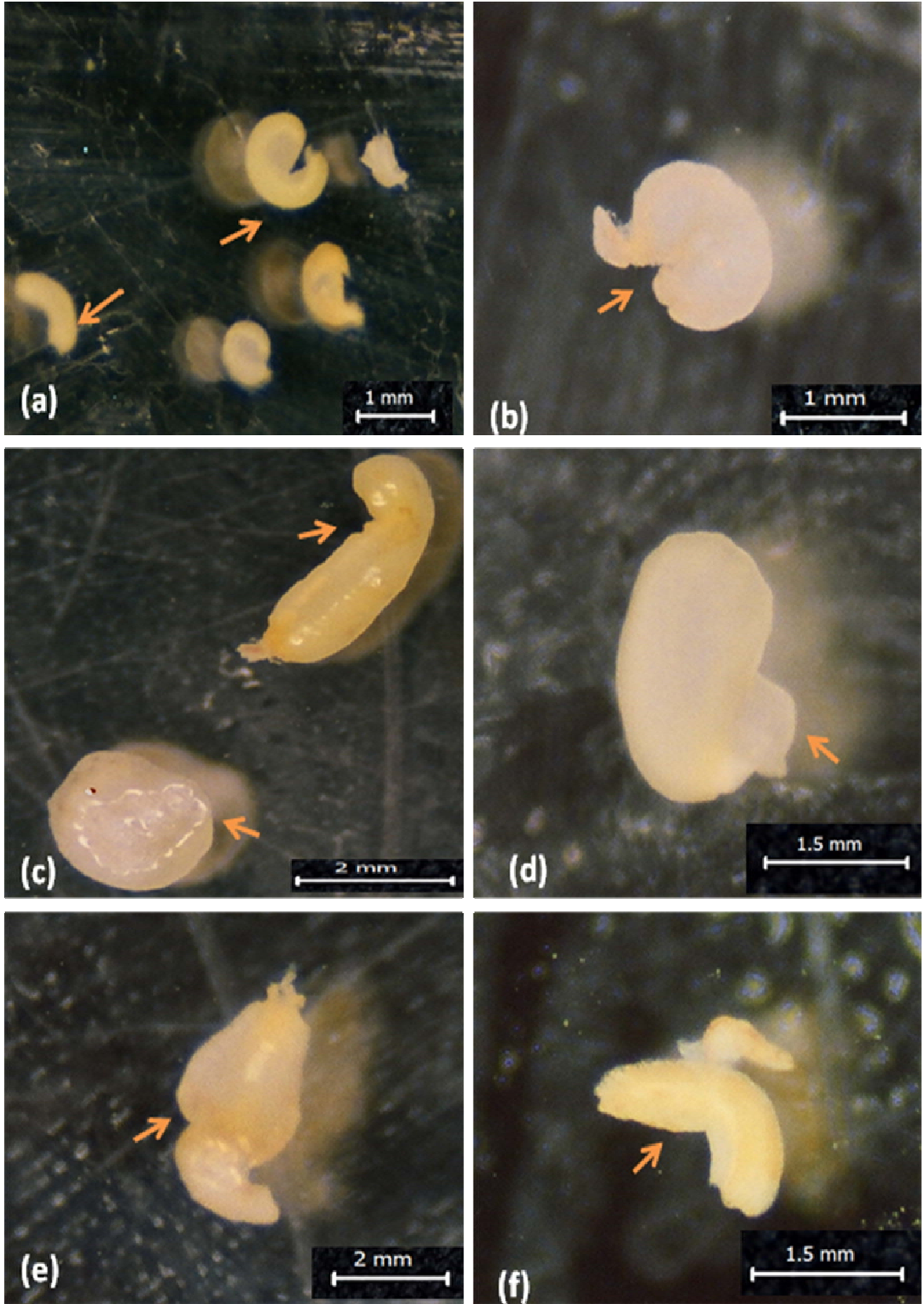
Tür	Kolhisin dozu (mg/l)	Sıcaklık (°C)	
		32	35
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Yaprak lahanana	Kontrol	0,96±0,54 AB	4,06±1,64 A
	50	0,30±0,12 B	0,43±0,43 B
	100	3,42±1,37 A	2,73±0,99 AB

Aynı sütunda farklı harfler kolhisin dozları arası farklılığı göstermektedir (p<0.05). Sıcaklıklar arası fark önemli olmadığından harflendirme yapılmamıştır.



Şekil 4.9 Yaprak lahanada farklı kolhisin doz ortalamalarının embriyo sayısına etkisi

Şekil 4.10'da kültür süresinin 12. ve 19. gününde yaprak lahanada kolhisin uygulamaları sonucu oluşan anormal embriyoların binoküler mikroskopta çekilen fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 4.10 12 günlük anormal embriyolar: **a.** 35°C + 100 mg/l kolhisin (x 1.0), **b.** 32°C + 100 mg/l kolhisin (x 1.25), 19 günlük anormal embriyolar: **c, d** ve **e.** 32°C + 100 mg/l kolhisin, **f)** 35°C + 100 mg/l kolhisin (x 1.25)

Süs lahanası

Çizelge 4.9'a göre, süs lahanasında, embriyo üretiminde sıcaklıklar arasında görülen farklılık istatistik olarak önemli bulunmazken, kolhisin dozları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Çizelge 4.9 incelendiğinde, 32°C sıcaklıkta kontrol ve 50 mg/l kolhisin uygulamalarının istatistiki olarak aynı grupta yer aldığı, 35°C sıcaklıkta ise tüm dozlar arasındaki farklılığın önemli olmasına rağmen yine aynı uygulamaların etkili olduğu görülmektedir ($P<0.05$). En yüksek embriyo sayısı 35°C + 50 mg/l kolhisin uygulamasından 11,59 embriyo/petri ile elde edilmiş, bunu, 32°C + 50 mg/l (8.09 embriyo/petri) uygulaması izlemiştir. Buna karşılık 100 mg/l kolhisin uygulaması ise her iki sıcaklıkta da embriyo oluşumunu engelleyici etkide bulunmuştur (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 Süs lahanasında farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (12. gün)

Tür	Kolhisin dozu (mg/l)	Sıcaklık (°C)	
		32	35
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Süs lahanası	Kontrol	7,46±2,16 A	7,13±0,69 B
	50	8,09±1,22A	11,59±1,92 A
	100	0,22±0,10 B	0,21±0,12C

Aynı sütunda farklı harfler kolhisin dozları arası farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). Sıcaklıklar arası fark önemli olmadığından harflendirme yapılmamıştır.

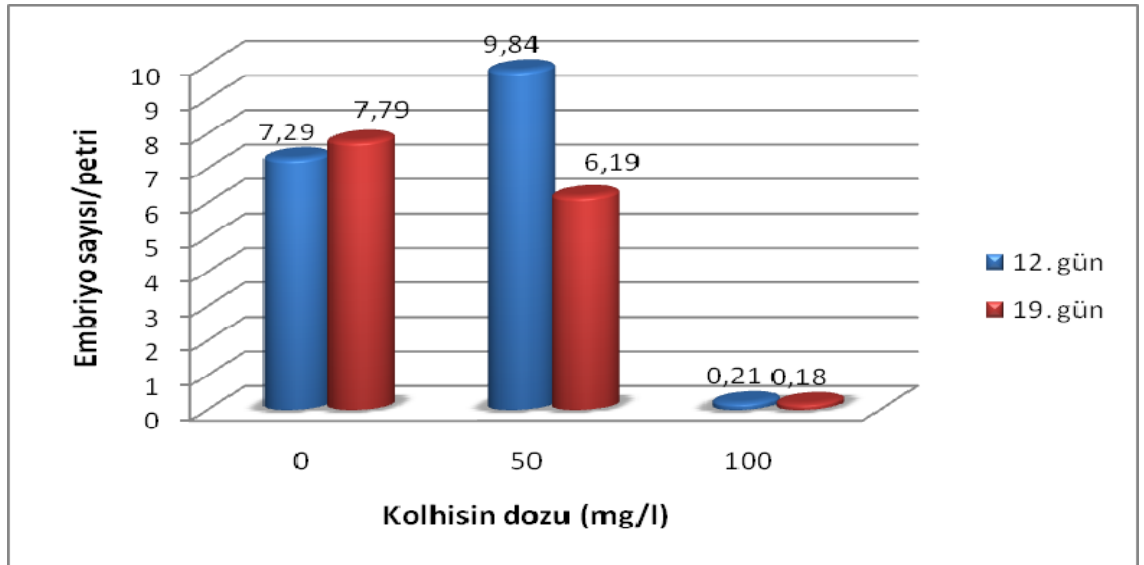
19. gün sonunda yapılan embriyo sayım sonuçlarında da başarılı uygulamalar 12. gün sonuçları ile benzerlik göstermiştir. Kültür süresinin 19. gününde, kontrol dışında tüm dozlarda ortalama embriyo değerlerinde azalış olduğu dikkat çekmektedir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 Süs lahanasında farklı sıcaklık ve kolhisin dozu uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (19. gün)

Tür	Kolhisin dozu (mg/l)	Sıcaklık (°C)	
		32	35
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Süs lahanası	Kontrol	8,46±2,19 A	7,13±1,37 A
	50	5,23±1,18 A	7,16±1,06 A
	100	0,18±0,08 B	0,18±0,09 B

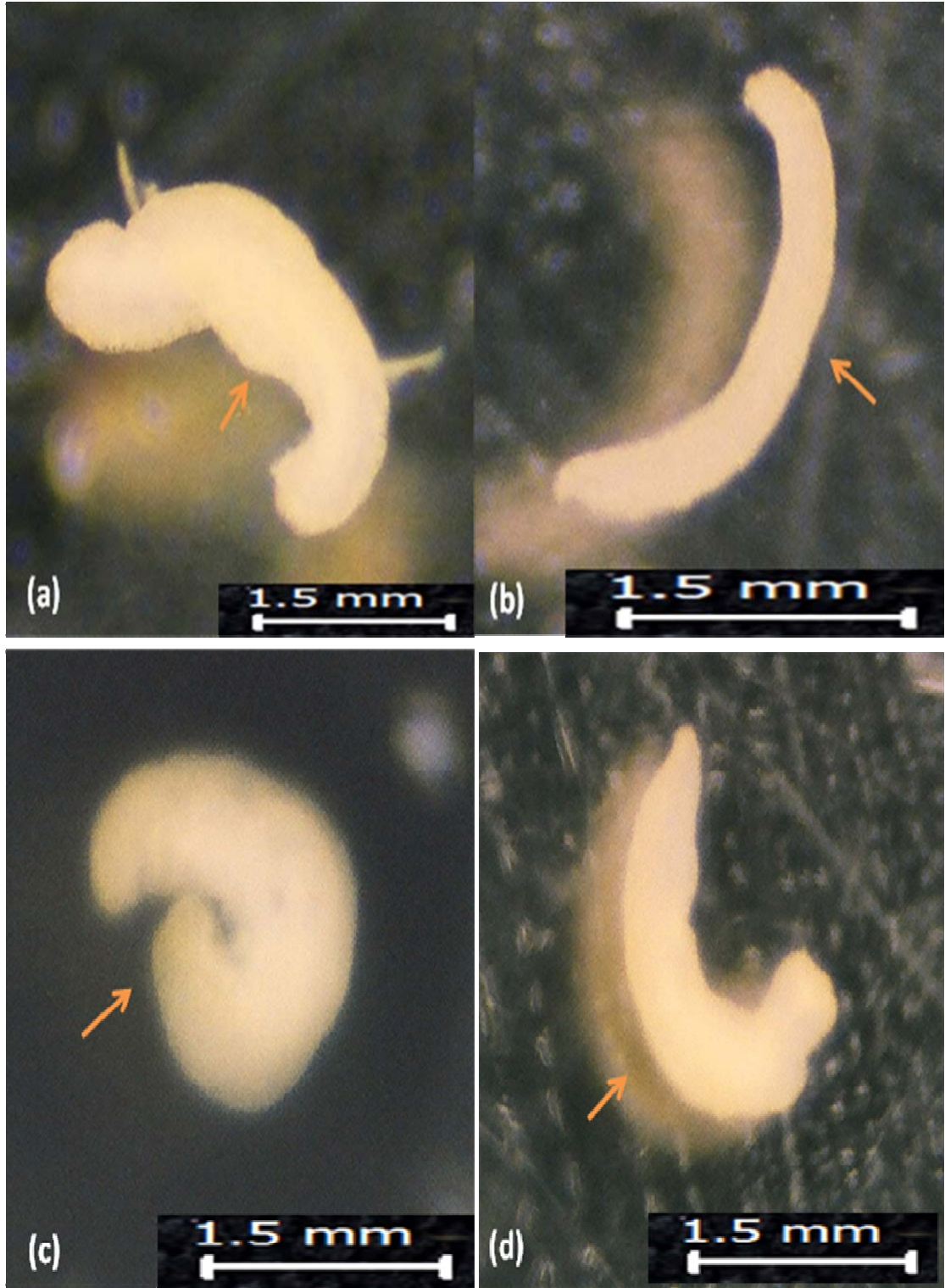
Aynı sütunda farklı harfler kolhisin dozları arası farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). Sıcaklıklar arası fark önemli olmadığından harflendirme yapılmamıştır.

Sıcaklıklar arası farklılık ile sıcaklık x doz interaksyonunun önemli çıkmaması nedeniyle, uygulamaların etkisini daha iyi gözleyebilmek amacıyla, doz ortalamalarına göre düzenlenen Şekil 4.11’de dozların etkileri belirgin olarak izlenebilmektedir.



Şekil 4.11 Süs lahanasında farklı kolhisin doz ortalamalarının embriyo sayısına etkisi

Süs lahanasında kolhisin uygulaması sonucunda elde edilen embriyoların binoküler mikroskopta çekilen fotoğrafları Şekil 4.12’de görülmektedir.



Şekil 4.12 Süs lahanasında 12 günlük: **a.** gelişmiş embriyo (32°C + kontrol) (x 0.63), 19 günlük: **b.** yürüyen çubuk şekilli embriyo (32°C + kontrol) (x 0.63), **c.** gelişmiş embriyo (32°C + 50 mg/l kolhisin) (x 0.63), **d.** gelişmiş embriyo (32°C + kontrol) (x 0.63)

4.2.2.3 Gama uygulaması

Gama uygulamaları Tez İzleme Komitesi tarafından sadece yaprak lahanası için öngörülmüşse de, süs lahanası da bu denemelere ilave edilmiştir. Yapılan gama uygulamaları türler bazında ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Yaprak lahanası

2 gama dozu (100 Gy ve 300 Gy) ve 2 sıcaklık derecesinin (32°C ve 35°C) kullanıldığı denemede ışınlanan tomurcuklardan 19 saat sonra mikrospor izolasyonu yapılabilmektedir. Bu süre içinde ışınlanmış tomurcuklar 4°C'de petride muhafaza edilmiştir. İzolasyondan 12 gün sonra yapılan embriyo sayım sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11 Yaprak lahanada farklı sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (12. gün)

Gama dozu (Gy)	Sıcaklık (°C)	
	32	35
	Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Kontrol	1,37±0,77 ²	3,02±0,86 ¹
100	0,58±0,04 ²	5,95±1,46 ¹
300	0,24±0,08 ²	3,66±1,33 ¹

Aynı satırda farklı rakamlar sıcaklıklar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05). Dozlar arası fark önemli olmadığından harflendirme yapılmamıştır.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gama dozları arasındaki farklılık önemli bulunmamış, ancak sıcaklıklar arası farklılık önemli bulunmuştur (p<0.05). Bununla birlikte gama uygulamaları ile 35°C sıcaklık derecesinde daha yüksek embriyo değerlerine ulaşılmıştır. En yüksek embriyo sayısı 5,95 adetle 35°C + 100 Gy kombinasyonundan elde edilmiştir.

19. gün sayımı sonuçları da 12. gün sayımlarıyla uyumlu sonuçlar vermiştir. Ekim sonrası geçen süre içinde embriyo sayısında azalma görülmüştür (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 Yaprak lahanada farklı sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (19. gün)

Gama dozu (Gy)	Sıcaklık (°C)	
	32	35
	Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Kontrol	0,75±0,59 A ²	2,34±0,71 B ¹
100	0,29±0,19 A ²	5,28±1,06 A ¹
300	0,08±0,08 A ²	1,93±0,93 B ¹

Aynı sütunda farklı harfler dozlar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı satırda farklı rakamlar sıcaklıklar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Işın uygulamaları ile ilgili denemelerde, ışınlanmış tomurcukların izolasyon öncesi doğrudan petri kutuları içinde (kuru) ve sıvı besin ortamı içinde (NLN-13) saklanması (5 saat), embriyo oluşumunu uyarıcı bir etkisinin olup olmadığı da araştırılmıştır. 12. gün sonunda elde edilen embriyo sayıları Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13 Yaprak lahanada farklı saklama koşulu, sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (12. gün)

Sıcaklık (°C)	Gama Dozu (Gy)	Saklama koşulu	
		Kuru	Sıvı
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
32	Kontrol	2,87±0,84 A ¹	2,83±0,41 B ¹
	100	4,16±1,39 A ¹	3,20±0,93 B ¹
	300	4,45±0,76 A ¹	3,18±0,55 B ¹
35	Kontrol	1,79±0,55 A ¹	1,41±0,20 A ¹
	100	1,91±0,22 A ²	2,49±0,91 A ¹
	300	2,74±0,57 A ²	1,20±0,20 B ²

Aynı satırda farklı harfler saklama koşulları arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı doz içerisinde farklı rakamlar sıcaklıklar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Dozlar arası fark önemli olmadığından harflendirme yapılmamıştır.

Çizelge 4.13’e göre gama dozları arasında farklılık istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. ‘Sıcaklık x saklama koşulu’ interaksyonu ise önemli bulunmuştur. 35°C sıcaklıkta kontrol ve 100 Gy dozu hariç, saklama koşulları arasında farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). Tomurcukların kuru muhafazasının etkili olduğu belirlenmiştir. Buna göre en yüksek embriyo sayısı, kuru koşullarda saklanan 32°C + 300 Gy (4.45 embriyo/petri) uygulamasından alınmıştır. 100 Gy dozu (4.16 embriyo/petri) da bunu izlemiştir

19. gün sayımlarında da sonuçlar birbirine benzerlik göstermiştir. En başarılı uygulama olarak, 32°C + 100 Gy (4.25 embriyo/petri) ve 300 Gy (3.99 embriyo/petri) uygulamaları belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Şekil 4.13’de bu deneme sonucu elde edilen embriyoların binoküler mikroskopta çekilen görüntüleri görülmektedir.

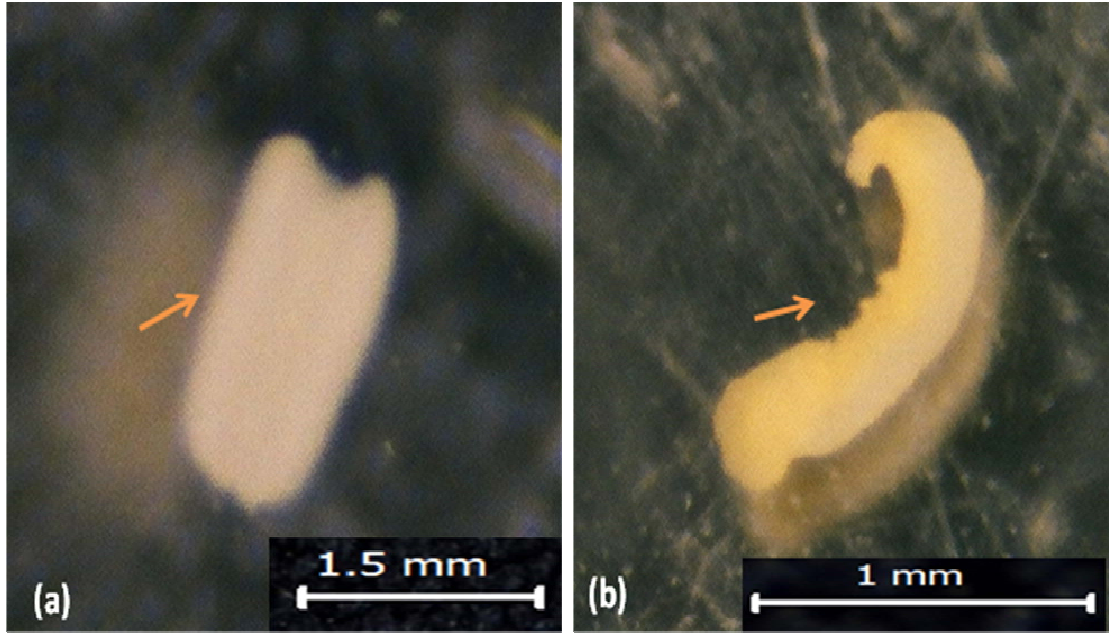
Çizelge 4.14 Yaprak lahanada farklı saklama koşulu, sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (19. gün)

Sıcaklık (°C)	Gama Dozu (Gy)	Saklama koşulu	
		Kuru	Sıvı
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
32	Kontrol	2,01±0,55 b ¹	1,94±0,22 a ¹
	100	4,25±1,75 a ¹	2,95±0,63 a ¹
	300	3,99±0,50 a ¹	2,94±0,80 a ¹
35	Kontrol	1,01±0,58 b ¹	0,81±0,17 b ¹
	100	1,29±0,61 ab ²	2,23±0,90 a ¹
	300	2,52±0,58 a ¹	2,16±1,33 a ¹

Aynı sütunda farklı harfler dozlar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı doz içerisinde farklı rakamlar sıcaklıklar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Saklamalar arası fark önemli olmadığından harflendirme yapılmamıştır.



Şekil 4.13 12 günlük: a. torpido embriyo (32°C + 100 Gy-kuru) (x 0.80), b. anormal embriyo (35°C + 300 Gy-kuru) (x 2.0)

Süs lahanası

Süs lahanasında 4 gama dozu (50 Gy, 75 Gy, 100 Gy ve 300 Gy) ve 2 sıcaklık derecesi (32°C ve 35°C) denenmiştir. Bu uygulamada ışınlanmış tomurcuklar 24 saat süreyle 4°C kuru koşullarda bekletildikten sonra mikrospor izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

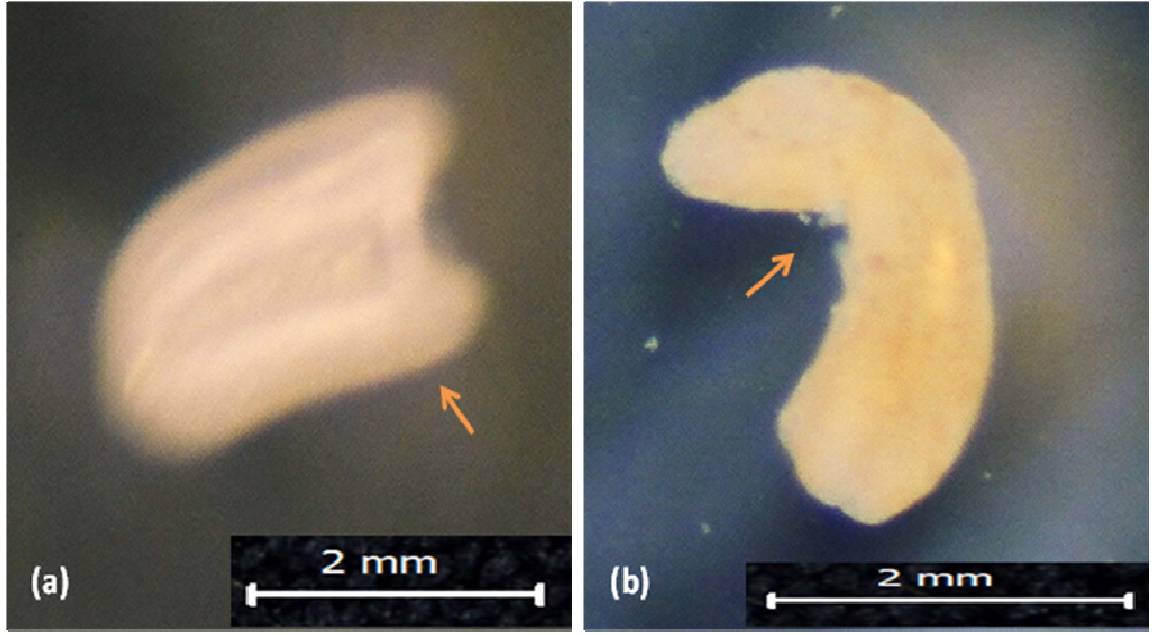
Çizelge 4.15’de 12. gün sonunda yapılan embriyo sayım sonuçları gösterilmektedir. Çizelge incelendiğinde ‘Sıcaklık x doz’ interaksiyonun istatistiki olarak önemli olduğu görülmektedir. Buna göre en yüksek embriyo sayısı her 2 sıcaklıkta da kontrol denemelerinden elde edilmiştir (32°C-5.11 embriyo/petri, 35°C-3.35 embriyo/petri). Gama dozlarının etkisi ise dikkate değer bulunmamıştır. Şekil 4.14’de bu uygulama sonucu elde edilen embriyolar görülmektedir.

Çizelge 4.15 Süs lahanasında farklı sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (12. gün)

Gama Dozu (Gy)	Sıcaklık (°C)	
	32	35
	Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Kontrol	5,11±1,01 a, A	3,35±1,17 a, B
50	2,70±0,73 b, A	2,45±0,75 ab, A
75	3,58±0,49 ab, A	1,24±0,43 b, B
100	3,37±0,50 ab, A	0,95±0,49 b, B
300	3,04±0,56 b, A	2,29±0,36 ab, A

Aynı sütunda farklı küçük harfler dozlar arası farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

Aynı satırda farklı büyük harfler sıcaklıklar arası farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).



Şekil 4.14 12 günlük: **a.** torpido embriyo (32°C + 300 Gy) (x 0.80), **b.** anormal embriyo (32°C + 75 Gy) (x 1.0)

Çizelge 4.16’da ise 19. gün sonunda elde edilen embriyo değerleri gösterilmektedir (Çizelge 4.16). Değerler incelendiğinde ışın uygulamalarında embriyo sayısının dramatik şekilde azaldığı dikkat çekmektedir. Bunda tomurcukların dikim öncesi bekletilme sürelerinin etkisinin bulunduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.16 Süs lahanasında farklı sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (19. gün)

Gama Dozu (Gy)	Sıcaklık (°C)	
	32	35
	Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Kontrol	1,54±0,63	1,11±0,55
50	0,86±0,43	0,95±0,66
75	1,43±0,66	0,49±0,29
100	0,65±0,42	0,85±0,49
300	0,35±0,21	2,21±0,37

Dozlar ve sıcaklıklar arası fark önemli bulunmamıştır.

Süs lahanasında ışın uygulamaları ile ilgili yapılan diğer bir denemede ise, yaprak lahanası örneğinde olduğu gibi ışınlanan tomurcuklar izolasyon öncesi 5 saat süreyle 2 farklı saklama koşulunda 4°C’ de kuru (doğrudan petri kutuları içinde) ve sıvı besin

ortamında (NLN-13) bekletilmiştir. Bu uygulamada 12. gün sonunda elde edilen embriyo değerleri Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17 Süs lahanasında farklı saklama koşulu, sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (12. gün)

Sıcaklık (°C)	Gama dozu (Gy)	Saklama koşulu	
		Kuru	Sıvı
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
32	Kontrol	3,98±0,82 a A ¹	4,32±0,83 a AB ¹
	50	4,79±1,45 a A ¹	5,54±0,36 a A ¹
	75	1,53±0,32 a B ¹	3,70±1,00 a B ²
	100	0,22±0,10 a B ¹	0,23±0,11 a C ¹
	300	0,49±0,21 a B ¹	0,17±0,06 a C ¹
35	Kontrol	2,09±0,27 a AB ¹	2,23±0,41 a BC ²
	50	3,16±0,86 a A ¹	3,79±0,98 a AB ²
	75	1,45±0,59 b AB ¹	5,20±1,06 a A ¹
	100	0,37±0,15 a B ¹	0,54±0,26 a CD ¹
	300	0,30±0,15 a B ¹	0,37±0,14 a D ¹

Aynı sütunda farklı büyük harfler dozlar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı sıcaklıkta farklı küçük harfler saklama koşulları arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı dozda farklı rakamlar sıcaklıklar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Çizelge 4.17 incelendiğinde, ‘doz x sıcaklık x saklama koşulu’ interaksiyonu istatistik olarak önemli bulunması nedeniyle faktörler bağımsız olarak değerlendirilmemiştir. 35°C + 75 Gy uygulaması hariç saklama koşulları arasında görülen farklılık istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Ancak, her iki sıcaklık derecesi ve tüm dozlarda sıvı (NLN-13) saklama koşullarında daha yüksek embriyo değerlerine ulaşılmıştır (Çizelge 4.17). Buna göre en başarılı kombinasyonlar 32°C + 50 Gy (5.54 embriyo/petri) ve 35°C +75 Gy (5.20 embriyo/petri) olarak belirlenmiştir. Bu uygulamaları 4.32 embriyo/petri ile 32°C sıcaklıkta kontrol izlemiştir. Yine Çizelge 4.17’den her iki sıcaklık ve saklama koşulunda da 100 Gy’in üzerindeki dozlarda embriyo değerlerinin azalış gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 4.18’de ise 19. gün sonunda elde edilen embriyo değerleri gösterilmektedir. Değerler incelendiğinde, yaprak lahanada olduğu gibi 12. güne göre embriyo değerlerinde belirgin azalışların olduğu dikkat çekmektedir.

Çizelge 4.18 Süs lahanasında farklı saklama koşulu, sıcaklık ve gama dozlarının embriyo sayısına etkisi (19. gün)

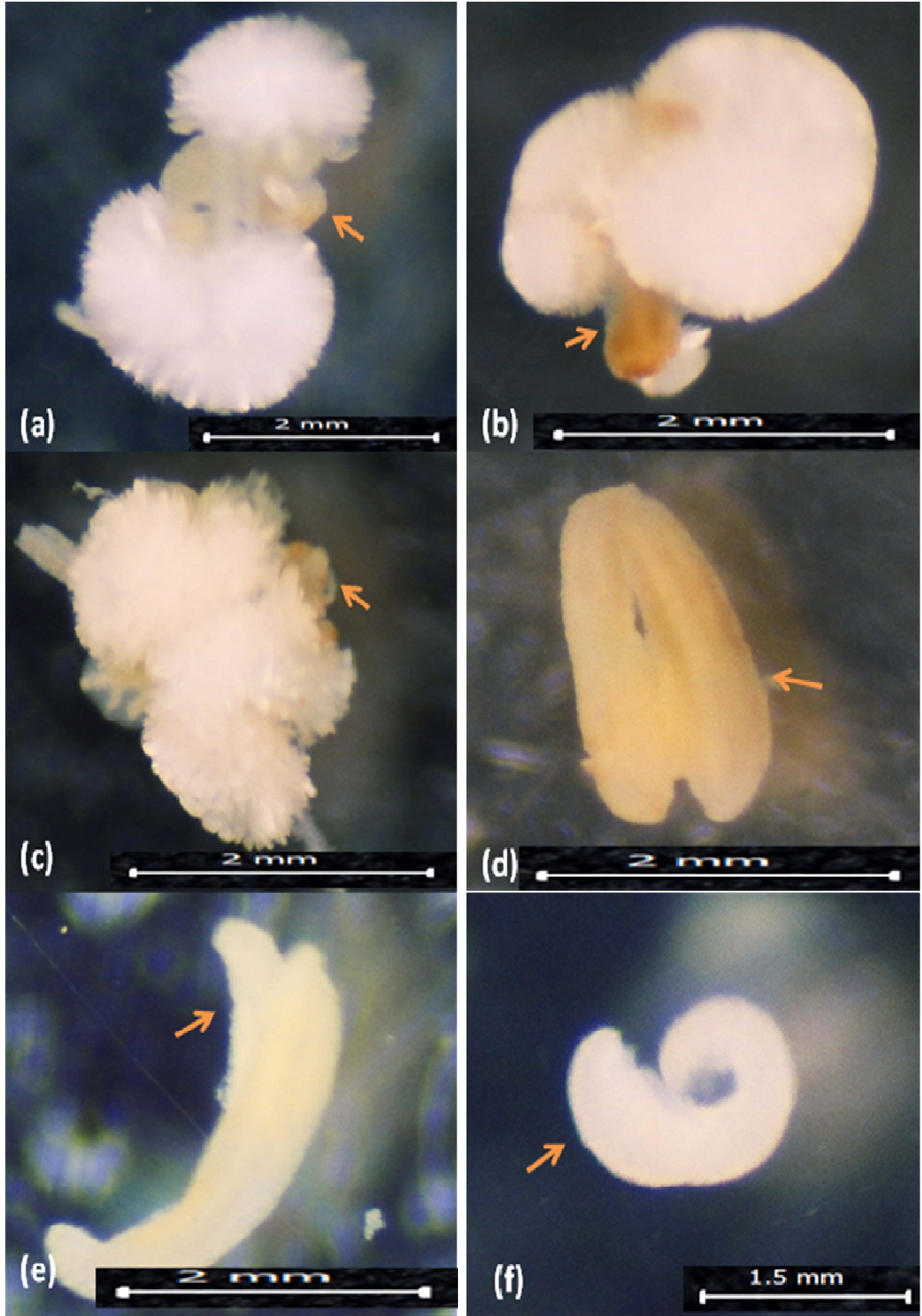
Sıcaklık (°C)	Gama dozu (Gy)	Saklama koşulu	
		Kuru	Sıvı
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
32	Kontrol	1,51±0,97 a A ¹	1,50±0,50 a AB ¹
	50	1,28±0,72 a A ¹	2,09±0,73 a A ¹
	75	0,36±0,23 a A ¹	1,92±0,58 a A ¹
	100	0,16±0,08 a A ¹	0,22±0,11 a B ¹
	300	0,44±0,23 a A ¹	0,21±0,08 a B ¹
35	Kontrol	0,79±0,47 a A ¹	1,94±0,06 a AB ¹
	50	0,41±0,24 a A ¹	1,83±1,13 a AB ¹
	75	0,20±0,20 b A ¹	3,16±0,98 a A ¹
	100	0,27±0,11 a A ¹	0,81±0,33 a B ¹
	300	0,23±0,14 a A ¹	0,82±0,28 a B ¹

Aynı sütunda farklı büyük harfler dozlar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı sıcaklıkta farklı küçük harfler saklama koşulları arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı dozda farklı rakamlar sıcaklıklar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Şekil 4.15’de bu uygulamadan elde edilen yapıların binoküler mikroskopta çekilen görüntüleri görülmektedir.



Şekil 4.15 **a.**, **b.**, **c.** Farklılaşmış yapılar ($32^{\circ}\text{C} + 50 \text{ Gy-sıvı}$) (x 1.0), **d.** ezilmemiş anter dokusu (x 0.80), **e.** 12 günlük geç torpido embriyo (x 0.63), **f.** 19 günlük gelişmiş embriyo ($32^{\circ}\text{C} + 50 \text{ Gy-sıvı}$) (x 1.25)

4.2.2.4 Besin ortamını yenileme uygulamaları

Besin ortamını yenileme uygulamalarının embriyo oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla 3 farklı lahana türünde izolasyon ortamı olarak NLN-16 ortamı (160 g sakaroz/l) kullanılmıştır. Bu ortamda izole edilen mikrosporlar 2 farklı ortamda (NLN-16 ve NLN-16+50 mg/l kolhisin) 32°C sıcaklıkta karanlık koşullarda 2 gün süreyle bekletildikten sonra taze NLN-13 ve NLN-16 ortamlarına aktararak ortam yenileme uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Ortam bileşimleri Bölüm 3.2.7.5’de detaylı olarak açıklanmıştır.

Çizelge 4.19’da ortam yenileme uygulamalarına ait 12. gün embriyo sayım sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.19 Farklı lahana türlerinde ortam yenileme uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (12. gün)

Tür	Çeşit	Ortam 1	Ortam 2	Ortam 3
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Baş lahana	Yalova-1	2,80±0,58 a, A	1,15±0,62 a, B	0,70±0,38 b, B
	Erciş lahanası	0,95±0,09 b, B	0,45±0,12 a, B	4,00±0,60 a, A
Yaprak lahana		3,05±0,58 a, A	0,15±0,11 a, B	0,33±0,12 b, B
Süs lahanası	Chidori red F1	1,05±0,61 b, A	0,65±0,65 a, A	0,75±0,51 b, A

Aynı sütunda farklı küçük harfler türler arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı satırda farklı büyük harfler ortamlar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Çizelge 4.19’a göre baş lahananın Yalova-1 çeşidi (2.80 embriyo/petri) ve yaprak lahanada (3.05 embriyo/petri) Ortam 1, Erciş lahanasında ise Ortam 3 (4.00 embriyo/petri) diğer iki ortamdaki embriyo sayısı bakımından istatistiksel olarak önemli farklılık göstererek daha başarılı bulunmuştur. Süs lahanasında ise ortamlar arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık bulunmazken 3 ortam bileşiminde de düşük sayıda embriyo elde edilmiştir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.20’de ise 19. gün sonunda elde edilen embriyo değerleri görülmektedir. 19. günde başarılı olan uygulamalar 12. güne benzerlik göstermiştir. Yalova-1 baş lahanası çeşidinde Ortam 1 ve 2’de, Erciş lahanasında ise Ortam 2’de embriyo sayılarında 12. güne göre artışlar olmuştur (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20 Farklı lahanalar türlerinde ortam yenileme uygulamalarının embriyo sayısına etkisi (19. gün)

Tür	Çeşit	Ortam 1	Ortam 2	Ortam 3
		Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri	Embriyo sayısı/petri
Baş lahanası	Yalova-1	3,05±1,35 a, A	1,50±1,03 a, AB	0,70±0,70 b, B
	Erciş lahanası	0,65±0,47 b, B	1,60±0,22 a, B	3,80±0,71 a, A
Yaprak lahanası		2,20±0,78 ab, A	0,20±0,14 a, B	0,31±0,11 b, AB
Süs lahanası	Chidori red F1	0,90±0,59 b, A	0,60±0,44 a, A	0,52±0,34 b, A

Aynı sütunda farklı küçük harfler türler arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Aynı satırda farklı büyük harfler ortamlar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

4.3 Embriyoların Çimlendirilmesi

25°C karanlık koşullarda 45 rpm hızlı orbital çalkalayıcı üzerinde sallanan petriyelerdeki embriyo ya da embriyo başlangıcı yapılar (izolasyondan yaklaşık 19-20 gün sonra) %2 sakkaroz, %0.9 agar takviyeli Gamborg vd. (1968) tarafından geliştirilen ve hormon içermeyen B5 ortamında 25 °C ve 16 saat gün uzunluğundaki iklim odalarında çimlendirmeye alınmıştır. Bir kısım denemede ortama katılan agarın miktarı düşürülerek (7 g agar/l) embriyoların gelişebilmeleri için daha gevşek bir ortam sağlanmıştır. Ayrıca olası enfeksiyonu engellemek amacıyla besin ortamına çok düşük dozda antibiyotik katılmıştır (250 mg augmentin/l). Ancak her türlü sterilizasyon önleminin alınmasına rağmen katı ortama aktarılan bu yapılarda enfeksiyon oluşumu engellenememiştir. Çizelge 4.21’de uygulamalara göre katı ortama aktarılan embriyo sayıları ve sonuçları gösterilmektedir.

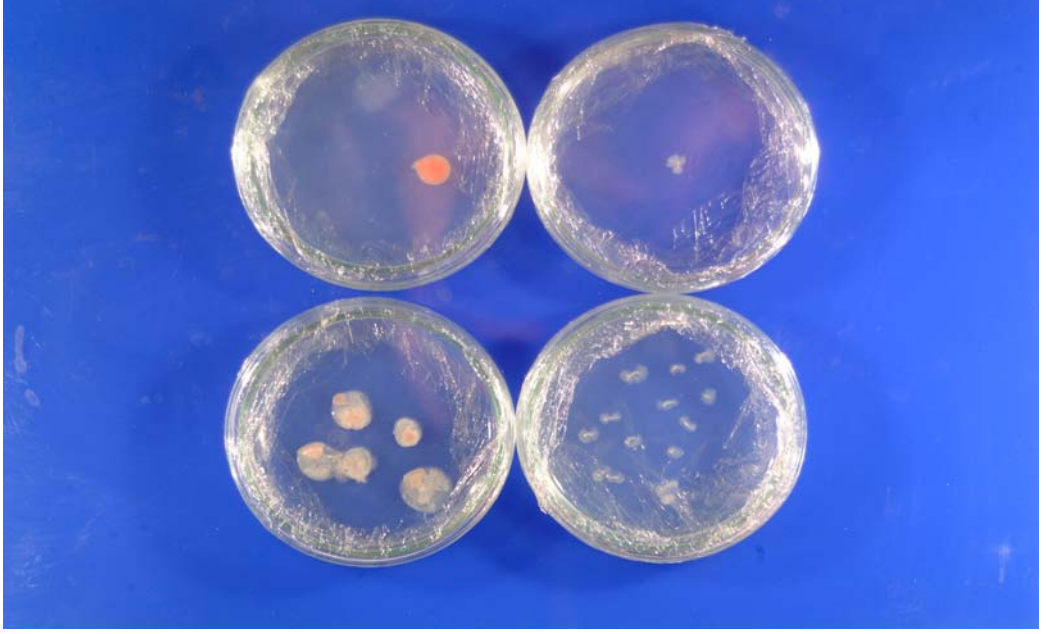
Çizelge 4.21 Uygulamalara göre çimlendirme ortamına aktarılan embriyo sayıları ve gelişme durumları

	Uygulama	D.E.S	Sonuç		D.E.S	Sonuç
	Yalova-1	32°C + Kontrol	15		10 E, 5 GY	Erciş lahanası
32°C + 50 mg/l kolhisin		65	50 E, 15 GY	18	18 E	
32°C + 100 mg/l kolhisin		18	18 E	46	46 E	
35°C + Kontrol		21	13 E, 8 GY	-	-	
35°C + 50 mg/l kolhisin		30	30 E	-	-	
35°C + 100 mg/l kolhisin		29	29 E	14	14 E	
Ortam 1		6	6 E	6	6 E	
Ortam 2		8	8 E	2	2 E	
Ortam 3		1	1 GY	18	18 E	
Yaprak lahana		32°C + Kontrol	13	10 E, 3 GY	Süs lahanası	
	32°C + 50 mg/l kolhisin	-	-	92**		61 E, 31 GY
	32°C + 100 mg/l kolhisin	30	30 E	-		-
	35°C + Kontrol	30	12 E, 18 GY	101**		101 E
	35°C + 50 mg/l kolhisin	-	-	105**		95 E, 10 GY
	35°C + 100 mg/l kolhisin	50	30 E, 20 GY	-		-
	Ortam 1	18	18 E	-		-
	32°C + 100 Gy kuru, 19 saat	2	2 E	-		-
	32°C + 100 Gy kuru, 24 saat	30	26 E, 4 GY	-		-
	32°C + 100 Gy sıvı, 24 saat	10	10 E	-		-
	32°C + 300 Gy kuru, 24 saat	20	17 E, 3 GY	-		-
	32°C + 300 Gy sıvı, 24 saat	20	20 E	-		-
	35°C + 100 Gy kuru, 19 saat	20	20 E	-		-
	35°C + 100 Gy kuru, 24 saat	6	6 E	-		-
	35°C + 100 Gy sıvı, 24 saat	10	10 E	-		-
	35°C + 300 Gy kuru, 19 saat	12	5 E, 7 GY	-		-
	35°C + 300 Gy kuru, 24 saat	8	7 E, 1 GY	-		-
	35°C + 300 Gy sıvı, 24 saat	11	4 E, 7 GY	-		-
	32°C + 50 Gy kuru, 24 saat	-	-	8*		8 E
	32°C + 50 Gy sıvı, 24 saat	-	-	2*		2 E
	32°C + 75 Gy kuru, 24 saat	-	-	20*		20 E
	35°C + 50 Gy kuru, 24 saat	-	-	13*		13 E
	35°C + 50 Gy kuru, 29 saat	-	-	4*		4 E
	35°C + 75 Gy kuru, 29 saat	-	-	9*		9 E
	35°C + 75 Gy sıvı, 29 saat	-	-	17*		17 E

*: Büyüme düzenleyici madde (1.5 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA) ve 7 g/agar içeren besi ortamı

** : 7g agar/l içeren Gamborg besi ortamı, D.E.S: dikilen embriyo sayısı, E:enfeksiyon, GY:gelişme yok.

Şekil 4.16'da katı Gamborg ortamına aktarılan yapılarda meydana gelen enfeksiyon oluşumları görülmektedir.



Şekil 4.16 Çimlendirme ortamına aktarılan yapılarda enfeksiyon oluşumu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmanın temel amacı, *Brassica* cinsi içinde yer alan beyaz baş lahana (*B. oleracea* var. *capitata* subvar. *alba*), yaprak lahana (*B. oleracea* var. *acephala*) ve süs lahanasında mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyo uyartımın sağlamak ve ülkemizde lahana ıslahında mikrospor kültüründen yararlanacak araştırmacılara yol gösterebilmektir.

Çalışma kapsamında, mikrospor kültürü için uygun tomurcuk gelişme dönemi ve mikrospor gelişme aşaması belirlendikten sonra haploid embriyo oluşumunu uyarmak amacıyla izole edilen mikrosporlara farklı sıcaklık (32°C ve 35°C), aktif kömür (0.1-0.2 ml/petri), kolhisin (25 mg/l, 50 mg/l ve 100 mg/l) ve gama uygulamaları ile besin ortamı yenilemenin embriyo oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar ayrı başlıklar altında tartışılmıştır.

5.1 Mikrospor Kültürü İçin Uygun Tomurcuk Gelişme Devresi, Mikrospor Gelişme Dönemi ve Mikrospor Canlılığının Belirlenmesi

Haploid bitki elde edilmesinde mikrosporların gelişme dönemi etkilidir. Bu amaçla ilk aşamada sitolojik yöntemlerden asetokarmin ve DAPI boyama yöntemlerinden yararlanılmıştır. Mikrospor kökenli embriyo oluşumu için en uygun mikrospor gelişim safhası bir çok araştırmacı tarafından geç tek çekirdekli safha ile %10-30 çift çekirdekli polen yani birinci polen mitozunu geçirmiş dönem olarak bildirilmektedir (Duijs vd. 1992, Carlos ve Dias 1999, Carlos ve Dias 2001, Dias ve Correia 2002). Buna karşılık Sarıkamış vd. (2000), Ellialtıoğlu vd. (2001) ise birinci polen mitozundan hemen önceki dönemdeki tek çekirdekli mikrosporların kültür koşullarında embriyo oluşturmak üzere sporofitik gelişmeye doğru daha kolay yönlendiğini belirtmektedir. Bizim çalışmamızda alınan tomurcuk örneklerinde tek çekirdekli mikrosporlara sahip olan tomurcuklar dikkate alınmıştır. Daha sonra tomurcukların morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Tomurcukların morfolojik görünümleri, uygun aşamadaki tomurcukların seçimi ve

toplanmasında büyük kolaylık sağlamakta, bu nedenle tomurcuğun morfolojik görünümüyle mikrospor gelişim aşamaları arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması büyük önem taşımaktadır. Nitekim denemelerimizde uygun büyüklükteki tomurcukların bitkide tomurcuk kümesinin en iç halkasındaki küme içinde dizili oldukları belirlenmiştir. Tomurcuklarda morfolojik gözlem olarak tomurcuk büyüklüğü, çanak yaprak uzunluğu, taç yaprak uzunluğu, petal/anter oranı dikkate alınmıştır. Bununla birlikte morfolojik gözlemlere dayalı belirleme her zaman sağlıklı sonuç vermeyebilmektedir. Embriyonik mikrosporları bulunduran tomurcukların gelişme dönemi ana bitkinin yetiştirildiği koşullara, bitkinin yaşına ve genotipe göre farklılık göstermektedir (Telmer vd. 1992, Duijs vd. 1992). Nitekim yapılan birçok çalışmada aynı tür hatta aynı tür içindeki çeşitlerde bile uygun tomurcuk büyüklüğünün oldukça farklılık gösterdiği saptanmıştır. Örneğin; lahanada 3.0 mm \leq (Paksoy vd.1995), 3-6 mm (Takahata ve Keller 1991), 3.5-5.0 mm (Rudolf vd. 1999), 2.1-2.5 mm (Sarıkamış vd. 2000), karnabahar ve lahanada 2-3 mm uzunluğundaki tomurcuklarda tek çekirdekli mikrosporların bulunduğunu bildirilmiştir. (Ferrie vd. 1999). Bizim denememizde ise baş lahananın Yalova-1 çeşidinde 5.3 mm (2. gelişme aşaması), Erciş lahanasında 2.2 mm (1. gelişme aşaması), yaprak lahanada 6.2 mm (1. gelişme aşaması), süs lahanasında ise 4.4 mm (2. gelişme aşaması) ve daha küçük tomurcukların uygun büyüklükteki tomurcuklar olduğu belirlenmiş, sonuçlar Erciş baş lahana genotipi dışında Paksoy vd. (1995) ve Takahata ve Keller (1991)'in sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir.

Mikrospor kültürü çalışmalarında kültüre alınan mikrosporların canlı olup olmadıklarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Deslauriers vd. 1991, Maraschin vd. 2003). Mikrospor kültürü çalışmalarında kültüre alınan mikrosporların çoğunluğunun (%95) kültür süresi boyunca canlılıklarını kaybettiği, embriyonik mikrosporların ise kültürün 1 ile 3. gününde genişleyerek canlılıklarını korudukları bildirilmektedir (Deslauriers vd. 1991). Bu kaynak bildirişi dikkate alınarak, ilk yıl denemelerinde kültür süresinin 2. gününde mikrosporların canlı olup olmadıkları araştırılmıştır. Mikrosporların canlılık durumlarını belirlemek amacıyla FDA ile yapılan boyamalarda, kültür süresinin 2. gününde mikrosporların canlılıklarını devam

ettirdikleri belirlenmiş ve mikrosporların embriyonik gelişim moduna yönlendikleri düşünülmüştür (Şekil 4.6).

5.2 Sıcaklık Uygulamaları

Brassica türlerinde mikrospordan embriyo oluşumunun uyarılmasında kültürlerin 1-3 gün süreyle yüksek sıcaklıkta tutulmaları gerekmektedir. Optimum inkübasyon sıcaklığı ve süresi türlere göre değişim göstermekle birlikte 30°C-33°C birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir. (Takahata ve Keller 1991, Duijs vd. 1992, Barro ve Martin 1999, Carlos ve Dias 2001, Sato vd. 2005, Wei vd. 2008). Çalışmamızda optimum sıcaklık ve süreyi belirlemek amacıyla, literatür bildirişleri dikkate alınarak ilk yıl denemelerinde 3 farklı sıcaklık (30°C, 32°C ve 35°C) ve süre (1 gün, 2 gün, 3 gün) kullanılmıştır. İkinci yıl denemelerinde ise daha umutvar olan 32°C ve 35°C sıcaklıkta 2 gün uygulaması tercih edilmiştir. Her 3 türde de yapılan embriyo sayım sonuçlarına göre sıcaklıklar arası farklılık istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Bununla birlikte Erciş baş lahanası genotipinde 32°C (5.23 embriyo/petri), yaprak lahanada ise 35°C sıcaklık uygulamasının (6.03 embriyo/petri) embriyo oluşumu açısından daha umutvar olduğu, süs lahanası ve Yalova-1 baş lahana çeşidinin ise sıcaklık yönünden seçici olmadığı ortaya konulmuştur. Her ne kadar sonuçlar sıcaklık dozlarının istatistiki önemde olmadığını gösterse de gözlemlerimiz türlere göre farklılık oluşabildiğini, bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda 32°C ve 35°C'de 2 gün uygulamasının kullanılabilceğini göstermiştir.

5.3 Kolhisin Uygulamaları

Yapılan araştırmalar kolhisin uygulamalarının özellikle *Cruciferae* familyasına giren türlerde mikrospordan embriyo oluşumunu uyardığını belirtmektedir (Zhao ve Simmonds 1995, Zhou vd. 2002, Weber vd. 2005, Wei vd. 2008). Belirtilen araştırmalarda çoğunlukla 50-500 mg/l dozlar önerilmektedir. Çalışmamızda bu kaynak bildirişleri dikkate alınmış ve kolhisinin 25, 50 ve 100 mg/l'lik dozları denenmiştir. İlk

yıl denemelerinde tüm uygulamalarda embriyo sayımları için kaynak bildirişleri dikkate alınarak 28 gün sonra sayım yapılması planlanmıştır. Ancak enfeksiyon nedeniyle veri elde edilememiştir. Bu nedenle 2. yıl denemelerinde sadece 50 ve 100 mg/l dozları denenmiş ve sayımlar 12. ve 19. günde yapılmıştır. Kolhisin uygulamalarının etkisi sıcaklığa bağlı olarak değişim göstermiştir. Buna göre en başarılı kombinasyonlar, Yalova-1 baş lahanası çeşidinde 32°C + 50 mg/l kolhisin uygulamasından (6.59 embriyo/petri) elde edilmiştir. Erciş lahanası ile yaprak lahanada kolhisin uygulaması etkili bulunmamıştır (Çizelge 4.6 ve 4.7). Buna karşılık süs lahanasında ise her iki sıcaklıkta da 50 mg/l dozunun embriyo oluşumunu uyarıcı etkisi net olarak görülmüştür (Çizelge 4.9). 100 mg/l dozu başarısız doz olarak belirlenmiştir. Süs lahanasında elde edilen sonuçlar Wei vd. (2008) verileri ile uyumlu bulunmuştur. Diğerlerindeki sonuçlar ise *Brassica napus* türünde yapıldığı için, tür farklılığından kaynaklanan nedenlerle uyumlu bulunmamıştır. Yine de ileride yapılacak çalışmalarda aynı türde daha fazla sayıda çeşitle 50-100 mg/l arasındaki dozların denenmesinin düşünülebileceği kanısına ulaşılmıştır.

5.4 Gama Uygulamaları

Brassica türlerinde mikrosporlardan veya anterlerden embriyo oluşumunu uyarmak amacıyla gama ışını uygulamalarından da yararlanılabilmektedir. Bununla birlikte konudaki çalışma sayısı sınırlıdır (Pechan ve Keller 1989). *B. napus*'da yürütülen bu araştırmada doz olarak 450 Gy ve 900 Gy kullanılmış ve 900 Gy dozu (5.98 embriyo/petri) embriyo oluşumu açısından daha etkili bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ışın kaynağının yer aldığı kuruluştaki görevli Dr. Yaprak Kantoğlu'nun önerileri dikkate alınarak gama ışınının yaprak lahanada 100 Gy ve 300 Gy, süs lahanasında ise 50 Gy, 75 Gy, 100 Gy ve 300 Gy dozları kullanılmıştır.

Gama ışın kaynağının uzaklığı nedeniyle ışınlanan tomurcuklardan ışınlanmadan hemen sonra izolasyonu gerçekleştirmek mümkün olamamıştır. Bu nedenle yaprak lahanada uygulamadan 19 saat, süs lahanasında ise 24 saat sonra izolasyon yapılabilmektedir. Bekleme süresince tomurcuklar 4°C'de muhafaza edilmiştir. Yaprak lahanada gama

ışınlarının etkisi sıcaklığa bağlı olarak değişim göstermiştir. En yüksek embriyo sayısı 35°C + 100 Gy (5.95 embriyo/petri) kombinasyonundan elde edilmiştir (Çizelge 4.11 ve 4.12). Bekleme süresinin yanında tomurcukların saklama koşulları da değerlendirilmeye alınmıştır. Değerlendirme sonuçlarına göre tomurcukların kuru muhafazasının daha etkili olabileceği görülmüştür. Buna karşılık süs lahanasında gama ışını uygulamaları etkili bulunmamıştır (Çizelge 4.15). Buna karşılık tomurcuk saklama koşullarının etkisinin araştırıldığı denemede, 35°C + 75 Gy (5.20 embriyo/petri) ve 35°C + 50 Gy (3.79 embriyo/petri) uygulamalarında kontrole göre daha yüksek embriyo değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.17). Bu sonuçların alınmasında ışınlamadan hemen sonra izolasyonun yapılamamasının etkisinin önemli olduğu düşünülmektedir. Benzer konuda Pechan ve Keller (1989) tarafından *Brassica napus*'ta yürütülen bir çalışmada da gama ışını uygulamasının etkinliğinden söz etmişse de embriyo oranı çok az farklılık göstermiştir. Bizim çalışmamızda her iki türde de Pechan ve Keller (1989)'ın bildirdiğinden daha yüksek embriyo sayısına ulaşılmıştır. Bunda bizim seçtiğimiz dozların daha düşük olmasının ve tür farklılığının etkisi olabilir. İleride yapılacak çalışmalarda daha geniş gama dozu aralıklarındaki dozların, ışınlamadan hemen sonra izolasyonun yapılması koşuluyla denenmesinin gama ışını uygulamasının etkisinin netleştirilmesi açısından daha faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

5.5 Aktif Kömür Uygulamaları

Besin ortamına katılan aktif kömürün brokoli, karnabahar, lahanada ve hardalda (*B. juncea*) embriyo sayısının yanında embriyo olgunlaşmasında da artışa neden olduğu belirtilmektedir (Carlos ve Dias 1999, Prem vd. 2008). Bu durum dikkate alınarak denemelerimizde aktif kömür solüsyonunun her bir petri kutusuna 0,1 ve 0,2 ml'lik dozları denenmiştir. Ancak ilk yıl denemelerinde hiçbir koşulda embriyo oluşmaması nedeniyle bu uygulama 2. yıl denemelerine alınmamıştır. Oysa yukarıdaki araştırmalarda özellikle brokolide embriyo sayısı yüksek (54.4 adet/petri) bulunurken lahanada daha düşük sayıda (6.5 adet/petri) embriyo elde edilmiştir. Dolayısıyla aktif kömüre gösterilen tepkinin türlere göre farklılık gösterdiğini söylemek yanlış olmayacaktır. İnternet aracılığı ile yapılan yazılı görüşmelerde *B. juncea*'da boş

santrifüj tüplerinin santrifüjleme işlemi öncesi de 4°C’de bekletilmesinin başarıda çok etkili olabildiği öğrenilmiştir (Prem 2010). Gland vd. (1988) ve Kott vd. (1988) *B. napus*’da ortama katılan aktif kömürün embriyo verimini artırmamasının nedeninin aktif kömür ile agarozun tam olarak birleşmemesi olduğunu belirtmektedir. Nitekim bizim denememizde de ortama katılan aktif kömür ve agarozda birleşme sağlanmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar aktif kömürün etkili olamamasının nedenini açıklamaktadır.

5.6 Besin Ortamını Yenileme Uygulamaları

Mikrosporların besin ortamına alındıktan sonra 2-3 gün aralıklarla taze ortama aktarılmasının embriyo gelişiminde ve embriyo kalitesinde artış sağladığı belirtilmektedir (Lionneton vd. 2001, Dias ve Correia 2002, Gu vd. 2003, Wei vd. 2008). Bizim çalışmamızda 3 farklı ortam bileşimi denenmiştir. Ortam yenileme denemeleri toplu olarak değerlendirildiğinde ortam yenilemeye gösterilen tepkide tür farklılığı etkili olmuştur. Buna göre Yalova 1 çeşidinde ve yaprak lahanada NLN-16/NLN-13), Erciş lahanasında (NLN-16+50 mg/l kolhisin/NLN-16) ortamlarında daha yüksek embriyo değerlerine ulaşılırken, süs lahanasında ortamlar arasında istatistiki düzeyde önemli bir farklılık görülmemiştir. Oysa Wei vd. (2008), bizim de deneme programına aldığımız ortam bileşimlerini denedikleri 29 süs lahanası genotipinin 6’sından embriyo elde edildiğini belirtmektedir. Ancak araştırmacılar genotiplere ve ortam bileşimlerine göre değişmekle birlikte 0.2-43.4 embriyo/petri arasında embriyo elde etmişlerdir. Bizim elde ettiğimiz rakamlar daha düşük düzeylerde kalmıştır. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda daha farklı ortam bileşimlerinin denenmesi planlanmaktadır.

5.7 Embriyo Sayım Süresinin Belirlenmesi

Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki elde etme çalışmalarında izolasyondan 3 hafta sonra, kültürlerin orbital çalkalayıcıya alınması ve 1 hafta süreyle bekletildikten sonra

embriyoların sayılarak kotiledon aşamasındaki embriyoların çimlenme ortamına alınması öngörülmektedir (Carlos ve Dias 1999, Ferrie vd. 1999, Carlos ve Dias 2001, Dias ve Correia 2002, Gu vd. 2003). Bu durum dikkate alınarak ilk yıl denemelerinde izolasyondan 28 gün sonra sayım yapılması planlanmıştır. Ancak bu süre sonunda çoğu petride enfeksiyon oluşumunun görülmesi nedeniyle embriyo sayımları yapılamamıştır. Son yıllarda yayınlanmış olan makalelere ulaşıldığında ise (Wei vd. 2008, Prem vd. 2008), ilk yıl denemelerindeki başarısızlıkta, petrielerin çalkalayıcı üzerine alınmaksızın 21 gün süreyle 25°C'deki inkübatörde bekletilmesinin rolü olduğu düşünülmektedir. Nitekim 2. yıl denemelerinde, kültüre alınan petrielerde kontroller sıklaştırılmış, 2 ya da daha çok sayıda embriyo çıplak gözle görüldüğünde (yaklaşık kültür süresinin 10.-11.günü) petrieler 45 rpm hızlı orbital çalkalayıcı üzerine alınarak 25°C karanlık koşullarda kotiledonar embriyo oluşum aşamasına kadar bekletilmiştir. Ancak orbital çalkalayıcı üzerinde bekleyen kültürlerde 1 hafta sonunda tekrar enfeksiyon oluşumlarının görülmeye başlanması nedeniyle denemeler izolasyondan 19 gün sonra sonlandırılmıştır. Kültürlerde görülen enfeksiyonun bakteri kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Tomurcukların alınmasından izolasyonuna kadar olan aşamalarda gerekli sterilizasyon koşullarına azami derecede özen gösterilmesine rağmen oluşan enfeksiyonun nedeni anlaşılamamıştır. İleride yapılacak çalışmalarda tomurcuk sterilizasyonunda doz ve süre çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

Embriyo sayımlarının kültür süresinin 12. ve 19. günü olmak üzere 2 farklı zamanda yapılması başarılı olan uygulamaları belirlemek ve 1 haftalık zaman diliminde embriyoların yapı ve kalitelerinde meydana gelen değişimleri belirleme açısından önem taşımaktadır. Hemen hemen her uygulamada 12. gün sonunda embriyo sayısı daha yüksek iken, 19. günde yapılan sayımlarda enfeksiyon nedeniyle embriyoların yapı ve kalitelerinin bozulduğu ve 12. güne göre azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Lichter (1989)'in görüşleri ile uyumlu görünmektedir. Araştırmacı, farklı *Brassica* türlerinde (*B.napus*, *B.nigra*, *B.oleraceae* var. *capitata*, *B.oleracea* var. *italica* ve *Raphanus sativus*) ortamda birikmiş olabilecek toksik maddelerin etkisini azaltmak amacıyla, petri kutularını, 2-10 gün süreyle 25 °C sıcaklıkta çalkalayıcı üzerinde bekletmiştir. 3 gün aralıklarla çalkalama yoluyla yapılan havalandırmanın tüm

genotiplerde ilk günlerde yüksek olan embriyo sayısının daha sonra azalttığı belirlenmiştir.

5.8 Embriyoların Çimlendirilmesi

Denemelerimizde tüm uygulamalardan elde edilen embriyolar 19. gün sonunda hormon içermeyen katı Gamborg ortamına (7-9 g/l agar, 20 g sakaroz/l) aktarılmış ve 25 °C ve 16 saat gün uzunluğundaki iklim odalarında çimlendirmeye alınmıştır. Ayrıca olası enfeksiyonu engellemek amacıyla besin ortamına çok düşük dozda antibiyotik (250 mg augmentin/l) ilave edilmiştir. Ancak çalışma ortamında her türlü sterilizasyon tedbirinin alınmasına rağmen, katı ortama aktarılan bu yapılarda birkaç uygulama dışında enfeksiyon oluşumu engellenememiş (Çizelge 4.21), embriyoları çimlendirme denemeleri başarısız olmuştur. Kültür süresinin sonunda (19. gün) çimlendirme ortamına aktarılan embriyoların globular, kalp ve torpido aşamasında olduğu saptanmıştır. Kotiledon aşamasındaki embriyolara rastlanmamıştır. Çimlendirme denemelerinde embriyolardan bitkiye dönüşümün sağlanamamasında enfeksiyon nedeniyle embriyoların yeterli olgunluğa (kotiledonar embriyo) ulaşamaması etkili olmuştur. Mikrospor kültüründe hardalda (*Brassica juncea*) yapılan bir çalışmada, kültür süresinin 10-11. gününde kalp şekilli embriyoların, 18-20 gün sonra kotiledon aşamasındaki embriyoların, 25-30. gününde ise her petride kalp, torpido ve kotiledon aşamasındaki embriyoları görmek mümkün olmuştur. Bu embriyolar çimlendirme ortamına aktarıldığında, kalp ve torpido şekilli embriyoların büyüemedikleri, yalnızca kotiledonar aşamadaki embriyoların gelişmelerini tamamladığı ve bitkiye dönüştüğü bildirilmektedir (Prem vd. 2008).

Sonuç olarak baş lahana, yaprak lahana ve süs lahanasında yürütülen bu çalışma ile, lahana grubu sebze türlerine uyarlanabilecek bir protokol oluşturulmuştur. Ülkemizde bu türlerde ilk kez yapılan bu çalışma ile yurt dışında yürütülen araştırma sonuçları dikkate alınarak ülkemiz koşullarına adapte edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda mikrospolardan embriyo elde edilmesi başarılı, ancak enfeksiyon nedeniyle embriyolar yeterli olgunluk aşamasına kadar gelememiş ve dolayısıyla bitkiye

dönüşüm sağlanamamıştır. Bununla birlikte, uygun mikrospor aşaması, izolasyon yöntemi, embriyo oluşumunu uyarıcı uygulamaların etkisi ile kültür koşulları (sıcaklık ve süre) belirlenmiştir.

İleride yapılacak çalışmalarda, tomurcuk alma dönemini uzatıcı çalışmaların yapılması faydalı olacaktır. Ayrıca bitkilerin yetiştirme ortamının kontrollu hale getirilmesi de androgenesisde başarı üzerine olumlu etki yapacaktır.

Mikrospor kültürü çalışmalarında kültür koşulları önemlidir. Bizim çalışmamız ile her ne kadar 2 farklı sıcaklık derecesi (32°C ve 35°C) denenmiş ve türlere göre sıcaklık faktörünün etkisi ortaya konulmuşsa da belli türlerde daha fazla sayıda genotiple tekrarlamalı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Mikrospor kültürü çalışmalarında optimum sıcaklık ve süresi belirlendikten sonra, bazı uygulamalarla embriyo oluşumunu uyarmak mümkün olmaktadır. Kolhisin uygulamalarının daha geniş doz aralıklarında denenmesi faydalı olacaktır. Ayrıca aktif kömür ve ortam yenileme çalışmaları da dikkate alınabilecek uygulamalar olarak görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alan, R. ve Padem, H. 1995. Toptan seleksiyon yoluyla Doğu Anadolu Bölgesine uygun lahana çeşitleri ıslahı. TÜBİTAK, TOAG Proje no: 803, 59 s.
- Anonymous. 2008. FAO statistics division. Web Sitesi: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Erişim Tarihi: 18.01.2010.
- Arnison, P., Donaldson, P., Jackson, A., Semple, C. and Keller, W. 1990. Genotype-specific response of cultured broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) anthers to cytokinins. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 20, 217-222.
- Bajaj, Y.P.S. 1990. Haploids in crop improvement. I. Springer-Verlag Berlin, 549 p.
- Bal, U. 2002. Domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill.) izole edilmiş mikrospor kültürü, ovaryum kültürü ve *Solanum sisymbriifolium* Lam. İle tozlanma yöntemleri ile haploid embriyo oluşumunun uyartılması. T.Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi (basılmamış),1-156 s., Tekirdağ.
- Bal, U., Abak, K., Büyükalaca, S. ve Çömlekçioğlu, N. 2003. Development of callus colonies from the isolated microspore culture of *Capsicum annuum* L. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 17, 38-43.
- Bal, U. ve Abak, K. 2005. Induction of symmetrical nucleus division and multicellular structures from the isolated microspores of *Lycopersicon esculentum* Mill. Biotechnol&Biotechnological Equipment, 19, 35-42.
- Balkaya, A. ve Yanmaz, R. 2005. Promising kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) populations from Black Sea region, Turkey. (Karadeniz Bölgesi'nin umutvar yaprak lahana polasyonları) New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, Vol. 33, 1-7.
- Balkaya, A., Yanmaz, R., Apaydın, A. ve Kar, H. 2005. Morphological characterisation of white head cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata* subvar. *alba*) genotypes in Turkey. (Türkiye'deki beyaz baş lahana genotiplerinin morfolojik özelliklere göre karakterizasyonu). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, Vol. 33, 333-341.
- Barinova, I., Clement, C., Martiny, L., Baillieul, F., Soukupova, H., Heberle-Bors, E. and Touraev, A. 2004. Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium PH. Planta, 219, 141-146.
- Barro, F. and Martin, A. 1999. Response of different genotype of *Brassica carinata* to microspore culture. Plant Breeding, 118, 79-81.

- Barro, F., Fernandez-Escobar, J., De la Vega, M. and Martin, A. 2002. Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores. *Euphytica*, 129, 1–6.
- Biddington, N.L. and Robinson, H.T. 1991. Ethylene production during anther culture of Brussel sprouts (*Brassica oleraceae* var. *gemmifera*) and its relationship with factors that affect embriyo production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 25, 169-177.
- Cao, M., Yan, L. and Fan, L. 1993. Influence of genotype and donor plant growth environment on embryogenesis from isolated microspores in chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). *Acta Agricult. Borealisin*, 8(4), 1-6.
- Cao, M., Li, Y., Liu, F. and Dore, C. 1994. Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*B.rapa* L.ssp. *chinensis*) via in vitro isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 13, 447-450.
- Carlos, J. and Dias, S. 1999. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. *Euphytica*, 108, 65-69.
- Carlos, J. and Dias, S. 2001. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. *Euphytica*, 119, 389–394.
- Charne, D.G., Pukacki, P., Kott, L.S. and Beversdorf, W.D. 1988. Embryogenesis following cryopreservation in isolated microspores of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Cell Rep.*, 7, 407–409.
- Coleman, A.W. and Goff, L.J. 1985. Applications of fluorochromes to pollen biology. I. Mithramycin and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as vital stains and for quantitation of nuclear DNA. *Stain Technol*, 60, 145–154.
- Custers, J.B.M., Cordowener, J.H.G., Nöllen, Y., Dons, H.J.M. and Van Lookeren Campagne, H.J.M. 1994. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.*, 13, 267-271.
- Deslauriers, C., Powell, A.D., Fuchs, K. and Pauls, K.P. 1991. Flow cytometric characterization and sorting of cultured *Brassica napus* microspores. *Biochimica et Bitophysica Acta*, 1091, 165-172.
- Dias, J.S. and Martins, M.G. 1999. Effect of siver nitrate on anther culture embriyo production of different *Brassica oleracea* morphotypes. *Scientia Horticulturae*, 82, 299-307.
- Dias, J.S. and Correia, M.C. 2002. Effect of medium renovation and incubation temperature regimes on tronchuda cabbage microspore culture embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, 93, 205-214.

- Dias, J.S. 2003. Protocol for broccoli microspore culture. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants, a Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 195–204.
- Doğu, K. and Yanmaz, R. 2004. Beyaz baş lahanada (*Brassica oleracea* var. *capitata* sub.var.*alba* cv. Yalova 1) kendine uyumsuzluk mekanizmasının belirlenmesi. 5. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildirileri, s.69-74.,21-24 Eylül 2004, Çanakkale.
- Duijs, J.G., Voorrips, R.E., Visser, D.L. and Custers, J.B.M. 1992. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. Euphytica, 60, 45-55.
- Elçi, Ş. 1982. Sitogenetikte gözlemler ve araştırma yöntemleri. Fırat Üni. Fen Fak. Yayınları, Biyoloji 3, 165 s.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K. 2001. Haploid Bitki Üretimi. (Bitki Biyoteknolojisi Cilt:I, Ed: Babaoğlu, M., Gürel,E., Özcan, S.) s: 138-189.,Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Eti, S. 1990. Çiçek tozu miktarını belirlemede kullanılan pratik bir yöntem. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 5, 4: 49-58.
- Ferrie, A.M.R., Taylor, D.C., Mackenzie, S.L. and Keller, W.A. 1999. Microspore embriyogenesis of high sn-2 erucic acid *Brassica oleracea* germplazm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 57, 79-84.
- Ferrie, A.M.R. and Keller, W.A. 2007. Optimization of methods for using polyethylene glycol as a non-permeating osmoticum for the induction of microspore embriyogenesis in the *Brassicaceae*. In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant, 43, 348–355.
- Folling, L. and Olesen, A. 2001. Transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore-derived callus and microspores by particle bombardment. Plant Cell Rep., 20, 629-636.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 60, 151-158.
- Gland, A., Lichter, R. and Schweiger, H.G. 1988. Genetic and exogenous factors affecting embriyogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L J Plant Physiol 132, 613–617.
- Gu, H.H., Zhou, W.J. and Hagberg, P. 2003. High frequency spontaneous production of doubled haloid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. Euphytica, 134, 239-245.
- Gu, H.H., Hagberg, P. and Zhou, W.J. 2004. Cold pretreatment enhances microspore embriyogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.) Plant Growth Regulation, 42, 137-143.

- Gürkün, V. and Halkman, A.K. 1990. Mikrobiyolojide sayım yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği, yayın no 7, 2. Baskı, Ankara.
- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.*, 45, 115-120.
- Holme, I.B., Olesen, A., Hansen, N.J.P. and Andersen, S.B. 1999. Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breeding*, 118, 111-117.
- Ilic-Grubor, K., Attre, M., Fowke, L.C. 1998. Comparative morphological study of zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. as revealed by scanning electron microscopy. *Annals of Botany*, 82, 157-165.
- Indrianto, A., Heberle-Bors, E. and Touraev, A. 1999. Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. *Plant Science*, 143, 71-79.
- Jahne-Gartner, A. and Lorz, H. 1999. Protocols for anther and microspore culture of barley. *Methods Mol Biol* 111, 269-279.
- Kameya, T. and Hinata, K. 1970. Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. *Jpn. J. Breed*, 20, 82-87.
- Kasha, K.J., Simion, E., Oro, R., Yao, Q.A., Hu, T.C. and Carlson, A.R. 2001. An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica*, 120, 379-385.
- Kott, L.S., Polsoni, L., Ellis, B. and Beversdorf, W.D. 1988. Autotoxicity in isolated microspore culture of *B. napus*. *Can. J. Bot.* 66: 1665-1670.
- Leskovsek, L., Jakse, M. and Bohanec, B. 2008. Doubled haploid production in rocket (*Eruca sativa* Mill.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 93, 181-189.
- Lichter, B. 1981. Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. *Z. Pflanzenphysiol.* 103, 229-237.
- Lichter, B. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *B. napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 105, 427-434.
- Lichter, R. 1989. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores different *Brassica* species. *Plant Breeding*, 103, 119-123.
- Lionneton, E., Beuret, W., Delaitre, C., Ochatt, S., Rancillac, M. 2001. Improved microspore culture and double dihaploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). *Plant Cell Reports*, 20, 126-130.

- Liu, X.P., Liu, Z.W., Tu, J.X., Chen, B.Y. and Fu, T.D. 2003. Improvement of microspores culture techniques in *Brassica napus* L. *Yi Chuan*, 25(4), 433-6.
- Lo, K.H. and Pauls, K.P. 1992. Plant growth environment effects on rapeseed microspore development and culture. *Plant Physiol.*, 99, 468-472.
- MacDonald, M.V., Hadwiger, M.A., Aslam, F.N. and Ingram, D.S. 1988. The enhancement of anther culture efficiency in *Brassica napus* ssp. *Oleifera* Metzy. (Sinsk) using low doses of gamma irradiation. *New Phytol* 110, 101-107
- Maraschin, S.F., Lamers, G. E. M., Pater, B. S, Spaink, H. P. and Wang, M. 2003. 14-3-3 isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 384, pp. 1033-1043.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Nitsch, C. and Nitsch, J.P. 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta*, 72, 355-370.
- Nitsch, C. and Norreel, K. 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. Acad. Sci.*, 276 D, 303-306.
- Nitta, T., Takahata, Y. and Kaizuma, N. 1997. Scanning electron microscopy of microspore embryogenesis in *Brassica* spp. *Plant Cell Reports*, 16, 406-410.
- Ockendon, D.J. 1984. Anther culture of Brussel sprouts (*Brassica oleraceae* var. *gemmifera*) I. Embryo yields and plant regeneration. *Ann. Appl. Biol.*, 105, 285-291.
- Paksoy, M., Ellialtıoğlu, Ő., Sarı, N. ve Abak, K. 1995. Bazı *Brassica* Türlerinde in vitro Anter Kültürüne Etki Eden Faktörler Üzerinde Araştırmalar. *Tr.J.of Botany*, 19, 281-286.
- Pechan, P.M. and Keller, W.A. 1989. Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. by gamma irradiation and ethanol stress. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Vol.25, 11, 1073-1074.
- Prem, D., Gupta, K. and Agnihotri, A. 2005. Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian Mustard (*Brassica juncea* L. Czern and Coss). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41, 266-273.
- Prem, D., Gupta, K., Sarkar, G. and Agnihotri, A. 2008. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, 93, 269-282.
- Prem, D. 2010. Yazılı görüşme (deepakandrewprem@gmail.com)

- Reynolds, T.L. 1997. Pollen embriyogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33, 1-10.
- Roulund, N., Andersen, S.B and Farestveit, B. 1991. Optimal concentration of sucrose for head cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) anther culture. *Euphytica* 52, 125-129.
- Rudolf, K., Bohanec, B. and Hansen, M. 1999. Microspore culture of white cabbage, *B.oleracea* var. *capitata* L.: Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breeding*, 118, 237-241.
- Samancı, N.E., Kurum, R., Boyacı, F. ve Biner, B. 1998. Anter Kültürü çalışmaları için elverişli tomurcuk safhasının saptanmasında kullanılacak boyama yöntemi. 2. Sebze Tarımı Sempozyumu, 28-30 Eylül 1998, 157-162, Tokat.
- Sangwan, R.S. and Sangwan, B.S. 1986. Effets des rayons gamma sur l'embryogene`se somatique et l'androgene`sechez divers tissue ve`ge`taux cultives in vitro. In:Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant improvement. International Atomic Energy Agency,Vienna, pp 181–185.
- Sarıkamış, G., Ellialtıoğlu, Ş. ve Yanmaz, R. 2000. Lahanada çiçek tomurcuğu morfolojisi ile mikrospor gelişme dönemi arasındaki ilişkinin belirlenmesi.3. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildirileri, Isparta, 72-76.
- Sato, S., Katoh, N., Iwai, S. and Hagimori, M. 2005. Frequency of spontaneous polyploidization of embryos regenerated from cultured anthers or microspores of *Brassica rapa* var.*pekinensis* L. And *B.oleracea* var.*capitata* L. *Breeding Science*, 55, 99-102.
- Segui-Simarro, J.M., Testillano, P.S. and Risueno, M.C. 2003. Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embriyogenesis induction in *Brassica napus* L. *Journal of Structural Biology*, 142, 379-381.
- Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Boors, E. and Touraev, A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127:519-534.
- Shtereva, L.A., Zagorska, N.A., Dimitrov, B.D., Kruleva, M.M. and Oanh, H.K. 1998. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis.*Plant Cell Rep* 18: 312–317
- Siebel, J. and Pauls K.P. 1989. A comparison of anther and microspore culture a breeding tool in *Brassica napus*. *Theor App. Genet.*, 78, 473-479.
- Simmonds, D.H. and Keller, W.A. 1999. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embriyogenesis of *Brassica napus*. *Planta*, 208, 383–391.

- Şalk, A. 1982. Toptan seleksiyon yoluyla Ege Bölgesi'ne uygun lahana çeşitleri ıslahı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay., 470, 56 s.
- Şimşek, G. ve Sürmeli, N. 1991. Sarmalık beyaz baş lahana ıslahı. Yalova Bahçe Kült. Araşt. Enst. Sonuç raporu.
- Takahata, Y. and Keller, W.A. 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. Plant Science, 74, 235-242.
- Telmer, C.A., Simmonds, D.H. and Newcomb, W. 1992. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum, 84, 417-424.
- Tian, H., Yi Yao, C. and Xiang Sun, M. 2004. High frequency conversion of microspore-derived embryos of *Brassica napus* cv. Topas by supplemental calcium and vitamins. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76, 159-165.
- Touraev, A., Vicente, O. and Heberle-Bors, E. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends Plant Sci, 2, 285-303.
- Vergne, P., Delvallee, I. and Dumas, C. 1987. Rapid assesment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. Stain Technology, 62, 299-304.
- Wang, M., Farnham, M.W. and Nannes, J.S.P. 1999. Ploidy of brocoli regenerated from microspore culture versus anther culture. Plant Breeding, 118, 249-252.
- Weber, S., Ünker, F. and Friedt, W. 2005. Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment in vitro and ploidy determination by flow cytometry. Plant Breeding, 124, 511-513.
- Wei, Z., Qiang, F., Xigang, D. and Manzhu, B. 2008. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. Scientia Horticulturae, 117, 69-72.
- Yanmaz, R., Kaplan, N., Balkaya, A., Apaydın, A. ve Kar, H. 2000. Türkiye'nin beyaz baş lahana (*Brassaica oleraceae* L. var. *capitata* sub.var. *alba*) gen kaynaklarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. (Researches on determination of white head cabbage gene resources of Turkey). III. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildirileri, Isparta, 160-166.
- Yanmaz, R., Ellialtıoğlu, Ş. ve Sarıkamış, G. 2002. Baş lahanalarda (*Brassica oleraceae* var. *capitata* subvar. *alba*) anter kültürü yoluyla haploid bitki etme olanakları. A.Ü.Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Sonuç Raporu.

- Yanmaz, R. ve Tuncer, B. 2008. Parklarımızın kış gülleri: Süs lahanaları. Hasad Dergisi, sayı: 279, 90-93 s.
- Zhang, F.L. and Takahata, Y. 2001. Inheritance of microspore embriyogenic ability in *Brassica* crops. Theor Appl. Genet., 103, 254-258.
- Zhang, G.Q., Zhang, D.Q., Tang, G.X., He, Y. and Zhou, W.J. 2006. Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rapeas affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. Biologia Plantarum, 50(2), 180-186.
- Zhao, J. and Simmonds, D.H. 1995. Application of trifluralin to embriyogenic microspore cultures to generate doubled haploid plants in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum, 95, 304-309.
- Zhao, J-P., Simmonds, D.H. and Newcomb, W. 1996. Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv Topaz.. Planta, 198, 433–439.
- Zhou, W.J., Hagberg, P. and Tang, G.X. 2002. Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. Euphytica, 128, 27-34.
- Ziauddin, A., Peng, M. and Wolyn, D.J. 1997. Improved nuclear staining of Asparagus microspores for cytological analysis. HortScience 32(4), 735-736.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burcu TUNCER

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 07.07.1977

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ankara Atatürk Lisesi (1993)

Lisans : Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü
(2000)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri
Anabilim Dalı (2004)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü
(2003-2004)

Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim
Dalı (2005-

Yayımları

YANMAZ, R., **DÜZELTİR**, B. 2003. Çekirdek Kabağı Yetiştiriciliği. (Pumpkin culture for seed). Ekin Dergisi, Sayı 26, 22-24.

DÜZELTİR, B., YANMAZ, R. 2004. Çekirdek Kabağında (*Cucurbita pepo* L.) Seleksiyon Yoluyla Islah. (Selection breeding in pumpkin for seed). 5. Sebze Tarımı Sempozyumu, 21-24 Eylül 2004, Çanakkale, 63-68.

YANMAZ, R., **DÜZELTİR**, B. 2004. Kabak Çekirdeğinin Besin Değeri ve Sanayide Kullanım Olanakları. (Nutritional value of pumpkin seed and using in industry). Popüler Bilim, 11(125), 19-24.

TUNCER, B.,YANMAZ, R. 2007. Haploid Bitki Elde Etme Yollarından Biri: Mikrospor Kültürü. Alatarım 6(2):1-8.

YANMAZ R, **TUNCER, B.** 2008. Parklarımızın kış gülleri: Süs lahanaları. Hasad Dergisi, sayı: 279, 90-93 s.

YANMAZ R., **TUNCER, B.**, EYDURAN,E. 2008. Çekirdek kabaklarında (*Cucurbita pepo* L.) meyve şekli ve ağırlığı ile tohum verimi ilişkisi. Türkiye 3. Tohumculuk Kongresi. 25-28 Haziran 2008, Kapadokya, 47-51 s.

YANMAZ, R., **TUNCER, B.** 2009. Türkiye’de Organik Tarım Eğitimi. 1. GAP Organik Tarım Kongresi, 16-20 Kasım 2009, Şanlıurfa (Bildiri, baskıda).