



**GENOTİP, BESİN ORTAMI VE SOĞUK  
UYGULAMALARININ PATLICANDA  
ANDROGENESIS ÜZERİNE ETKİLERİ**

**EZGİ GÜR SOY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI  
Prof.Dr. Naif GEBOLOĞLU**

**Nisan - 2019**

**Her hakkı saklıdır**

T.C.  
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GENOTİP, BESİN ORTAMI VE SOĞUK UYGULAMALARININ  
PATLICANDA ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

EZGİ GÜRİSOY

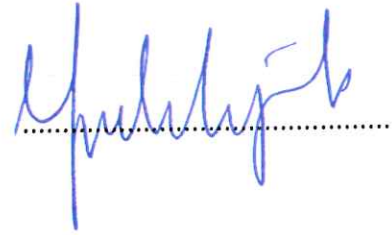
TOKAT  
Nisan - 2019

**EZGİ GÜRSOY** tarafından hazırlanan “Genotip, Besin Ortamı ve Soğuk Uygulamalarının Patlıcanda Androgenesis Üzerine Etkileri” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 2 NİSAN 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
PROF.DR. NAİF GEBOLOĞLU



Üye  
DOÇ.DR. ŞEBNEM KUŞVURAN  
ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ



Üye  
DR. ÖGR. ÜYESİ YASİN BEDRETTİN KARAN  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ



ONAY

Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## **TEZ BEYANI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**EZGİ GÜRSOY**

**2 Nisan 2019**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### GENOTİP, BESİN ORTAMI VE SOĞUK UYGULAMALARININ PATLICANDA ANDROGENESIS ÜZERİNE ETKİLERİ

EZGİ GÜRİSOY

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAİF GEBOLOĞLU

Anter kültürü, patlıcanda androgenik haploid ve dihaploid bitkilerin elde edilmesinde en çok tercih edilen tekniklerden biridir. Patlıcanda anter kültürünün kullanımı yaygın olmakla beraber embriyo ve haploid bitki oluşumu genotip, besin ortamı, stres uygulamaları ve bitki büyüme düzenleyiciler gibi birçok faktöre bağlıdır. Bu çalışmada genotip, besin ortamları ve çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulamalarının patlıcanda androgenik başarı üzerine etkileri araştırılmıştır. Anamur F<sub>1</sub>, Anamur F<sub>2</sub>, Anamur F<sub>3</sub>, Topan 374 and Yamula genotipleri Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982) (DDVX), Murashige ve Skoog (1962) (MS) ve Gamborg ve ark. (1968) (B5) tarafından önerilen protokollere göre kültüre alınmıştır. Çiçek tomurcukları 4 ve 10 °C sıcaklıkta 24 ve 48 saat süreyle düşük sıcaklığa bırakılmıştır. Kontrol uygulamasında tomurcuklara düşük sıcaklık uygulanmamıştır. Denemede Anamur F<sub>1</sub>, Topan 374 ve Yamula genotiplerinde DDVX ortamı, Anamur F<sub>2</sub> ve Anamur F<sub>3</sub> genotiplerinde MS ortamı en başarılı ortam olmuştur. En yüksek embriyo oluşumu Yamula genotipinde DDVX ortamında ve çiçek tomurcuklarının 4 °C'de 48 saat bekletildiği uygulamadan elde edilmiştir. Topan 374 ve Yamula genotipleri embriyo oluşumu ve bitkicik gelişimi bakımından en iyi genotipler olmuştur. Çiçek tomurcuklarına soğuk şoku uygulamasında 4 °C'de 48 saat bekletme en iyi sonucu vermiştir. En düşük embriyo formasyonu düşük sıcaklık uygulanmayan kontrol grubundan elde edilmiştir. Sonuç olarak, denemede embriyo oluşumu, bitkicik gelişimi ve haploid bitki elde edilmesi bakımından tatminkâr sonuçlar alınmıştır. Bununla beraber androgenik başarı genotiplere, besin ortamlarına ve düşük sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak farklılıklar göstermiştir.

2019, 64 SAYFA

**ANAHTAR KELİMELER:** Anter kültürü, Stres, Genotip, Embriyo, Haploid bitki

## **ABSTRACT**

### **MASTER THESIS**

#### **EFFECTS OF GENOTYPE, NUTRIENT MEDIA AND COLD TREATMENTS ON ANDROGENESIS IN EGGPLANT**

**EZGİ GÜRSOY**

**TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**DEPARTMENT OF HORTICULTURE**

**SUPERVISOR: PROF.DR. NAİF GEBOLOĞLU**

Anther culture is one of the most favorable technique to obtain androgenic haploid and doubled haploid plants in eggplant. Although the application of anther culture is widespread in eggplant, the success of embryo induction and haploid plant production depends on a lot factors such as genotype, nutrient media, stress treatments and plant growth regulators. The effects of genotypes, nutrient media and cold-shock treatment of eggplant buds on androgenic success were examined in this study. Anthers of Anamur F<sub>1</sub>, Anamur F<sub>2</sub>, Anamur F<sub>3</sub>, Topan 374 and Yamula genotypes were cultured according to Dumas de Vault and Chambonnet (1982) (DDVX), Murashige and Skoog (1962) (MS) and Gamborg et al. (1968) (B5). Flower buds were treated with at 4 and 10 °C for 24 and 48 h. Flower buds were not treated with cold in control application. The highest embryo formation observed in DDVX media for Anamur F<sub>1</sub>, Topan 374 and Yamula genotypes, and MS media for Anamur F<sub>2</sub> and Anamur F<sub>3</sub> genotypes. The highest embryo formation obtained from Yamula genotypes cultured at DDVX media at 4 °C 48 h cold treatment with 110 embryos from 60 anthers. Topan 374 and Yamula Genotypes were found more tend to embryo and plantlet formation. The best results were obtained when buds pretreated at 4 °C 48 h before anthers cultured. The lowest embryo formation obtained from control treatments which buds antreated with cold. As a result, sufficient embryos, plantlets and haploid plants were achieved in the study. However, androgenic respons varied according to genotypes, nutrient media and cold pretreatments.

2019, 64 pages

**KEYWORDS:** Anther culture, Stress, Genotyp, Embryo, Haploid plant

## ÖNSÖZ

Patlıcan sebze türleri arasında anter kültürüne yanıt veren başarılı türlerden biridir. Patlıcan ıslahında homozigot saf hatların elde edilmesinde anter kültürü önemli tekniklerden biri olmuştur. Bununla beraber halen daha istenen başarı oranları yakalanamamıştır. Bunun değişik nedenleri olmakla beraber genotiplerin uygulamalara göre farklı tepkiler göstermesi en önemli eden olarak görülmektedir. Dolayısıyla anter kültürü çalışmasına alınan her yeni genotipte başarı düzeyi farklı olmaktadır. Bu tez çalışmamda patlıcanda değişik genotiplerin androgenik başarısı üzerine farklı besin ortamlarının ve çiçek tomurcuklarına ön soğuk uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Tez çalışmamın ülkemize ve bilim dünyasına yararlı olmasını temenni ederim.

Tez çalışmamda ilgi ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof.Dr. Naif GEBOLOĞLU'na ve çalışmaların yürütülmesi sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımlarından dolayı Arş.Gör. Sevtap DOKSÖZ BONCUKCU'ya ve her zaman yanımda olan dostum Nigâr ÇAĞLAR'a teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans tez çalışmam boyunca ayrı kaldığım ve desteğini hep yanımda hissettiğim aileme şükran borçluyum.

**EZGİ GÜRSOY**

**2 Nisan 2019**

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	iv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>5</b>
2.1. Haploidi Bitki Üretimi ve Biyoteknoloji.....	5
2.2. Anter Kültürü.....	6
2.3. Patlıcanda Anter Kültürü.....	6
2.4. Patlıcanda Androgenesisin Başarısı Üzerine Genotipin Etkisi.....	8
2.5. Androgenik Başarıda Donör Bitkinin Yaşı ve Yetiştirme Koşullarının Etkisi.....	9
2.6. Anterlerin Geliştirme Dönemi.....	10
2.7. Anter Kültüründe Tomurcuk ve Anter Ön Uygulamaları.....	11
2.8. Anter Kültüründe Besin Ortamları ve Bileşimlerinin Etkileri.....	12
2.9. Anter Kültüründe İnkübasyon Koşulları.....	14
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>15</b>
3.1 Materyal.....	15
3.1.1. Donör Bitkiler ve Özellikleri.....	15
3.1.2. Donör Bitkilerin Yetiştirme Koşulları.....	16
3.1.3.Kültür Aşamasında Kullanılan Ekipmanlar.....	18
3.2. Yöntem.....	221
3.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	21
3.2.1. Çiçek Tomurcuklarının Gruplandırılması ve Toplanması.....	23
3.2.3. Çiçek Tomurcuklarına Soğuk Uygulaması.....	23
3.2.4.Çiçek Tomurcuklarının Dezenfeksiyonu, Anterlerin Çıkarılması Dikimi.....	25
3.2.5.Besin Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanması.....	26



3.2.6.Uygulamalar.....	27
3.2.7.Ploidi testi(stomal inceleme).....	31
3.2.8.Gözlemler.....	34
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>34</b>
4.1.Genotiplerin Uygulamalara Göre Androgenik Performansları.....	35
4.2.Genotiplere Göre Embriyo, Bitkicik ve Haploid Bitki Oluşumu.....	42
4.3.Besin Ortamlarına Göre Embriyo, Bitkicik ve Haploid Bitki Oluşumu.....	44
4.4. Çiçek Tomurcuklarına Soğuk Şoku Uygulamasının Embriyo, Bitkicik ve Haploid Bitki Oluşumu Üzerine Etkileri.....	46
4.5.Genotip x Besin İnteraksiyonunun Androgenik Başarıya Etkileri.....	48
<b>5. SONUÇ.....</b>	<b>52</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>55</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>64</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

g	gram
l	litre
m <sup>2</sup>	metre kare
mg	miligram
ml	mililitre
h	saat
°C	santigrat derece
cm	santimetre
cm <sup>2</sup>	santimetrekare
%	yüzde

### Kısaltmalar

KNO <sub>3</sub>	Potasyum nitrat
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Amonyum nitrat
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Magnezyum sülfat
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	Kalsiyum klorür
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	Kalsiyum nitrat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Mono sodyum fosfat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Amonyum sülfat
KCl	Potasyum klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Mono potasyum fosfat
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Mangan sülfat
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Çinko sülfat
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Borik asit
KI	Potasyum iyodür
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	Sodyum molibdat
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	Bakır sülfat
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	Kobalt klorür
Na <sub>2</sub> EDTA	Sodyum EDTA
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Demir sülfat
BAP / BA	Benzil aminopürin
2,4-D	Diklorofenoksiasetik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ACC	Aminocyclopropane carboxylic asit
AgNO <sub>3</sub>	Gümüş nitrat
MS	Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen besin ortamı
DDVX	Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1981) tarafından önerilen besin ortamı
B5	Gamborg ve ark. (1968) tarafından önerilen besin ortamı

## ŞEKİL LİSTESİ

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 3.1. Denemede kullanılan donör bitkilerin görünüşleri.....	17
Şekil 3.2. Donör bitkilerin yetiştirildiği sera.....	18
Şekil 3.3. Anter kültürü çalışmalarının yürütüldüğü laboratuvar ekipmanları.....	19
Şekil 3.4. Denemede kullanılan inkübatör ve otoklav.....	20
Şekil 3.5. Denemede kullanılan mikroskop, manyetik karıştırıcı ve pH metre.....	20
Şekil 3.6. Denemede kullanılan petripler .....	21
Şekil 3.7. Donör bitkilerin görünümü.....	22
Şekil 3.8. Çiçek tomurcuklarının görünümü.....	24
Şekil 3.9. Uygun çiçek tomurcuğu ve anter aşaması.....	24
Şekil 3.10. Çiçek tomurcuklarının dezenfeksiyonu.....	25
Şekil 3.11. Çiçek tomurcuklarından anterlerin çıkarılması ve anter dikimi.....	26
Şekil 3.12. Besin ortamlarının hazırlanmış şekli.....	27
Şekil 3.13. R ve V ortamında embrioid ve bitki gelişme durumu.....	30
Şekil 3.14. Anamur F1 genotipinin haploid ve diploid (kontrol) bitkilerinin mikroskopik stoma görünümü.....	31
Şekil 3.15. Anamur F2 genotipinin haploid ve diploid (kontrol) bitkilerinin mikroskopik stoma görünümü.....	32
Şekil 3.16. Anamur F3 genotipinin haploid ve diploid (kontrol) bitkilerinin mikroskopik stoma görünümü.....	32
Şekil 3.17. Topan 374 genotipinin haploid ve diploid (kontrol) bitkilerinin mikroskopik stoma görünümü.....	33
Şekil 3.18. Yamula genotipinin haploid ve diploid (kontrol) bitkilerinin mikroskopik stoma görünümü.....	33
Şekil 4.1. Normal gelişimini sürdüren Topan 374 ve Anamur F <sub>2</sub> genotiplerine ait anterler .....	35
Şekil 4.2. Genotiplerin androgenik başarı durumu.....	43
Şekil 4.3. Genotiplerin haploid bitki oluşum oranları.....	44

Şekil 4.4. Besin ortamlarına göre androgenik başarı durumu.....	45
Şekil 4.5. Besin ortamlarına göre haploid bitki oluşum durumu.....	45
Şekil 4.6. Düşük sıcaklık uygulamalarının androgenik başarı üzerine etkileri.....	47
Şekil 4.7. Düşük sıcaklık uygulamalarının haploid bitki oluşumuna etkileri.....	48
Şekil 4.8. Genotip ve besin ortamlarına göre toplam embriyo sayıları (300 anterden)	50
Şekil 4.9. Genotip ve besin ortamlarına göre toplam bitkicik sayıları (300 anterden)	51
Şekil 4.10. Genotip ve besin ortamlarına göre haploid bitki sayıları (300 anterden)....	52



## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge.3.1. Denemede kullanılan besin ortamları ile R ve V ortamlarının bileşimi..	29
Çizelge 4.1. Anamur F <sub>1</sub> genotipinde uygulamalara göre embriyoid, bitkicik ve haploid bitki oluşumu.....	37
Çizelge 4.2. Anamur F <sub>2</sub> genotipinde uygulamalara göre embriyoid, bitkicik ve haploid bitki oluşumu.....	38
Çizelge 4.3. Anamur F <sub>3</sub> genotipinde uygulamalara göre embriyoid, bitkicik ve haploid bitki oluşumu.....	39
Çizelge 4.4. Topan 374 genotipinde uygulamalara göre embriyoid, bitkicik ve haploid bitki oluşumu.....	40
Çizelge 4.5. Yamula genotipinde uygulamalara göre embriyoid, bitkicik ve haploid bitki oluşumu.....	41

## GİRİŞ

Patlıcan (*Solanum melongena* L.) Solanaceae familyasının önemli türlerinden biridir. Anavatanı Hindistan olan patlıcan, Asya, Afrika, Akdeniz Bölgesi ve Güney Amerika'yı içine alan tropik, subtropik ve ılıman iklim kuşağına adapte olmuş ve dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilen bir türdür. Tropik bölgelerde çok yıllık, subtropik bölgelerde ve ılıman iklim kuşağında tek yıllık özellik gösterir. Dünyada üretim ve tüketim bakımından patlıcan yetiştiriciliği önemli bir yere sahiptir ve insanların gıda ihtiyacını karşılamak üzere yetiştirilen en eski sebze türlerinden biridir. Domates, karpuz, biber, soğan ve hıyardan sonra en çok üretilen sebzeler arasındadır. Dünya'da 2017 yılı verilerine göre patlıcan üretimi 1 milyon 858 bin ha alanda 52.31 milyon ton dolayındadır. Yaklaşık 785 bin hektar alanda 33 milyon ton ile Çin ilk sırada gelmektedir. Türkiye üretim alanı bakımından Çin, Hindistan, Mısır ve Endonezya'dan sonra 25.6 bin hektar ile beşinci sırada yer alırken, üretim miktarı bakımından 884 bin ton ile Çin, Hindistan ve Mısır'dan sonra dünyada dördüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2017).

Günümüzde tarımda teknoloji kullanılmadan sadece geleneksel yöntemlerle başarıya ulaşmak artık söz konusu değildir. Bugün dünyada verim ve hastalıklara dayanıklılık bakımından üstün nitelikli, kaliteli ve sanayide kullanmaya uygun, raf ömrü uzun çeşitlerin ıslah edilmesi için biyoteknolojik yöntemler kullanılmakta; bu yöntemler sayesinde genetik temellere dayanan sınırlamalar ortadan kaldırılmakta ve böylece büyük bir hızla yeni ve üstün özelliklere sahip çeşitlerin ıslahı yapılabilmektedir. Islah çalışmalarında biyoteknolojinin kullanılmaya başlanmasıyla beraber ıslah süresi kısalmış, homozigot hatların elde edilmesi kolaylaşmıştır. Islah çalışmalarında biyoteknolojik yöntemlerden biri de anter kültürüdür ve günümüzde anter kültürü yanıt alınabilen türlerde vazgeçilmez tekniklerden biri olmuştur. Bitki ıslahının çeşitli alanlarında kullanılan anter kültürünün sağladığı avantajlar, göz ardı edilemeyecek derecede önemlidir. Klasik ıslah yöntemlerine kıyasla sağladığı zaman ve işgücü kazancı oldukça önemlidir. Bitki ıslahının kombinasyon ve seleksiyon ıslahı, mutasyon ıslahı, dayanıklılık ıslahı ve F<sub>1</sub> hibrit gücü ıslahı gibi alanlarında anter kültüründen yararlanılmaktadır (Alpsoy, 1999).

Bilindiği üzere, kombinasyon ıslahında ebeveyn olarak kullanılan homozigot saf hatların elde edilmesi için, minimum 5-6 generasyon kendileme yapılması gerekmektedir. Böylece her generasyonda, homozigotluk düzeyi artırılarak, kendileme generasyonları sonunda %100'e yakın bir değere ulaşılmaktadır. Oysa in vitro olarak elde edilen haploid bitkilerin dihaploidi (diploid) hale getirilmesiyle, homozigot hatların daha kolay ve geleneksel yöntemlere kıyasla daha kısa zamanda elde edilmesi mümkün olmaktadır. Bu yolla homozigotlaştırma için gereken 6-7 generasyonluk süre bir generasyona, toplam kombinasyon ıslahı süresi ise 12-13 yıldan 5-6 yıla indirilebilmektedir. Ayrıca, elde edilen saf hatlar arazi koşullarında değişik bölgelerde denenerek, birkaç yılda adaptasyon yeteneği geniş çeşitler geliştirilebilmektedir (Abak,1986). Bir hibrit çeşidin geliştirilmesi için atılması gerekli ilk adım, elverişli populasyonlardan kendilenmiş hatların elde edilmesidir (Şeniz, 1990). Anter kültürü yoluyla elde edilecek haploid bitkiler sayesinde kendileme işlemi ortadan kaldırılmakta, katlanmış haploid (dihaploid) hatlar doğrudan doğruya genel ve özel kombinasyon yeteneği testlerine alınmaktadır. Böylece, ebeveyn adayı olacak materyalin hazırlanma süresi 5-6 generasyondan 1 yıla indirilmektedir. Geboloğlu ve ark. (2017), anter kültüründe besin ortamında patlıcanda şeker ve balın etkilerini araştırdıkları çalışmada şeker yerine bal kullanılmasının embriyo oluşumuna olumlu katkı sağladığını, ancak bu etkinin genotiplere bağlı olarak değiştiğini belirtmektedirler. Ellialtıoğlu ve ark. (2012), haploid bitki elde etme frekansının birçok faktöre bağlı olduğunu ve bu faktörlerden birinin de mevsimsel farklılıklar olduğunu belirtmektedirler. Anterlerin içinde bulunan polenlerin yapısal olarak birbirinden farklı olmalarının mevsimlerin etkisini açıklamada etkili olabileceğini belirten araştırmacılar bu hipotezi açıklamak amacıyla patlıcanda farklı dönemlerde yetiştirilen bitkilerden alınan anterleri kültüre almış ve aynı zamanda mikrosporları da yapısal olarak incelemiştirler.

Patlıcan ıslahında hibrit çeşitlerin geliştirilmesi önemli bir hedefdir. Günümüzde verim ve kalite özelliklerinin yanında biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı veya tolerant çeşitlerin geliştirilmesi daha da önemli hale gelmiştir. Dayanıklılık ıslahı devreye girdiğinde patlıcanda türler arası melezlemelere ihtiyaç duyulmaktadır. Dayanıklılık ıslahında geriye melezleme, saf hat eldesi gibi yöntemler uygulandığından süreç uzamaktadır. Bunun sonucunda bir yandan maliyet artarken diğer yandan geçen

süre hedeflenen hibrit çeşidin rekabet gücünü azaltmaktadır. Biyoteknolojik yöntemlerin devreye girmesiyle patlıcan ıslahında bu zorluklar büyük oranda aşılmıştır. Biyoteknolojik yöntemler içerisinde artık gelenekselleşen doku kültürü tekniklerinden birisi olan anter kültürü yoluyla patlıcanda dihaploid saf hatların elde edilmesi bu açıdan en önemli aşamalardan birisidir (Karakullukçu, 1991). Biyoteknoloji tekniklerinden biri olan bitki doku kültürleri bitkilerden ayrılan organ, doku, hücre veya hücre kısımlarının steril koşullarda, yapay besin ortamlarında yetiştirilmesi, geliştirilmesi ve yeni bitkilere dönüştürülmesi işlemidir.

Bitki ıslahında haploidizasyon tekniğinin kullanılmasının birçok avantajı vardır. Bu avantajları Ellialtıoğlu ve ark. (2001) şu şekilde açıklamaktadır. Geleneksel yöntemlere göre çok daha kısa sürede %100 homozigot bitkiye ulaşılabilmektedir. Haploid bitkilerden geliştirilen dihaploid bitkiler sitolojik, fizyolojik ve genetik açıdan önemli deneysel materyallerdir. Dihaploid bitkilerin döllerinde açılım olmadığı için genotipler arasında eleme yapmak daha kolay olmaktadır. Haploid bitkiler, farklı patojenler ve patojenlerin fizyolojik ırklarına karşı in vitro seviyede seçime olanak vermekte, hastalıklara dayanıklılık çalışmalarında zaman, yer ve maddi kazanç sağlamaktadır.

Patlıcanda anter kültürü ile ilgili çalışmalara 30 yıldan daha fazladır devam edilmektedir. Birçok çalışmada farklı teknikler kullanılarak başarı düzeyi artırılmaya çalışılmıştır (Dumas de Vault ve ark., 1982; Chambonnet, 1985; Miyoshi, 1996; Rotino, 1996; Salas ve ark., 2012). Patlıcanda anter kültüründe başarıyı etkileyen birçok faktör söz konusudur. Bu faktörlerin başında genotip gelmektedir. Patlıcanda anter kültürüne yanıt almada genotiplerin önemli rolü bulunmaktadır. Genotiplere bağlı olarak başarı düzeyi sifira kadar inebilmektedir (Başay ve Ellialtıoğlu, 2013; Sharma ve Rajam, 1995; Başay ve Ellialtıoğlu, 2013). Patlıcanda anter kültürü çalışmalarında başarıyı etkileyen önemli faktörlerden biri de besin ortamlarıdır. Anter kültürü çalışmalarında farklı besin ortamları kullanılabilir. Murashige ve Skoog, (1962), Nitsch ve Nitsch (1969) ve Dumas de Vault (1981) tarafından sebzelerde anter kültürüne yönelik temel protokoller geliştirilmiştir. Daha sonra genelde sebzelerde



Özelde ise patlıcanda anter kültürü üzerinde çalışmalar yürüten araştırcılar bu temel besin ortamlarında modifikasyonlar yaparak denemişlerdir.

Patlıcanda anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler arasında donor bitkinin yetişme koşulları, anter alım döneminde mikrosporların içinde bulunduğu gelişme evresi, tomurcuk uygulamaları, bitki büyüme düzenleyiciler ve stres uygulamaları da önemli rol oynamaktadır (Rotino, 2016).

Patlıcanda anter kültürü çalışmalarında gelinen nokta başlangıçtaki çalışmalara göre çok ileri olmasına rağmen bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Bunun en önemli nedeni ise başarı oranının yükselebileceğine olan inançtır. Dolayısıyla patlıcanda anter kültürü kullanılarak embryoid ve haploid bitki elde edilmesine yönelik çalışmalar besin ortamı etkisi, genotip etkisi, bitki büyüme düzenleyiciler, kültür koşulları ve stres uygulamalarının etkisi üzerinde devam edecektir. Bu tez çalışmasında da farklı patlıcan genotiplerinde soğuk stresi uygulaması ve değişik besin ortamlarının anter kültüründe embriyo oluşumu ve haploid bitki rejenerasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca araştırmada Anamur F<sub>1</sub> patlıcan eşidinin F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> generasyonlarının anter kültürüne verdiği yanıtlar da incelenmiştir. Çalışmada temel amaç anter kültürü yoluyla haploid bitki oluşum oranını yükseltmek ve böylece anter kültürü tekniğinin patlıcan ıslahında daha etkin bir Şekilde kullanılmasını sağlamaktır.

## KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Hablodi Bitki Üretimi ve Biyoteknoloji

Bitki biyoteknolojisi; biyolojik bilimlerdeki gelişmelerin, teknolojik gelişmeler yardımıyla uygulanması ve ticari amaçlara yönelik olarak kullanılmasıdır. Bitki biyoteknolojisi ile ilgili teknikleri iki ana başlık altında incelemek mümkündür. Bunlar bitki doku kültürleri ve Rekombinant DNA teknikleri ya da genetik mühendisliğidir. Biyoteknolojinin konularından biri olan bitki doku kültürleri; bitkilerden ayrılan organ, doku, hücre veya hücre kısımlarının steril koşullarda, yapay besin ortamlarında yetiştirilmesi, geliştirilmesi ve yeni bitkilere dönüştürülmesi işlemidir.

Doku kültürü tabiri genel olarak; herhangi bir bitki dokusundan uygun besi ortamında ve aseptik şartlar altında bütün organları tam olan bitkilerin elde edilmesidir. Ancak çeşitli amaçlara göre başlangıç materyali değişik kaynaklardan olabilir. Bunlar meristem, embriyo, anter, tek bir hücre protoplastı gibi alındığı bitki parçasına göre adlandırılır. Doku kültürünün amaçları arasında çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturulması önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetik iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Kaybolmakta olan türlerin korunmasında, çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde ve ayrıca yerel populasyonlar halinde bulunan ve ülkemiz damak zevkine hitap eden tiplerin daha kısa zamanda ıslah edilmesi için de çeşitli doku kültürü yöntemleri başarıyla uygulanmaktadır.

Bitki doku kültürleri içerisinde haploid bitki elde etmek amacıyla kullanılan ve özellikle bitki ıslahı yönünden önem taşıyan anter kültürü; bir bitkiden izole edilen anterlerin uygun besin ortamına yerleştirilerek olgun olmayan polen tanelerinden bitkilerin geliştirilmesi tekniğidir.

Haploid bitkiler değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Örneğin; homolog kromozomların incelenmesinde ve sitolojik araştırmanın yapılmasında haploid bitkiler oldukça

değerlidir. Diploid bir bitkiden elde edilen haploid bitkiler, genetik ve biyokimyasal çalışmalar için basit bir sistem (yalnız tek allel gen) sağlamaktadırlar. Anter kültürü ile elde edilebilecek haploid bitkilerle bu, birkaç ayda gerçekleşebilmektedir. Bu şekilde fazla miktarda haploid bitki üretimini sağlayacak anter kültürü ile istenilen mutant tiplerin seçimi ve yeni varyetelerin geliştirilmesi mümkün olmaktadır (Akgün ve ark., 1996).

## 2.2. Anter Kültürü

Anter kültürü esas olarak; içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulunduran anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesi olayına verilen isimdir. Anter kültürü yapılarak, normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polen tanesinin gametik gelişme yönü; henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmekte ve böylece mikrospor androgenesis veya sadece androgenesis olarak adlandırılan oluşum gerçekleşmektedir.

İlk kez 1953 yılında Tulecke, *Gingko biloba* bitkisine ait olgun polenlerin kültür koşullarında haploid kallus oluşturmak üzere uyarılabileceğini gözlemlemiştir. İlk önemli gelişmeyi ise 1964 yılında Guha ve Maheshwari gerçekleştirmiş, *Datura innoxia* bitkisinin kültüre alınan anterlerinde mikrospordan haploid embriyo oluşumu sağlanmıştır (Guha ve Maheshwari, 1966). Sonraki yıllarda Bourgin ve Nitsch (1967), *Nicotiana tabacum* türünde anter kültürü yoluyla tam bir haploid bitki elde etmeyi başarmışlardır. Bu aşamadan sonra bir çok bitki türünde erkek gametten haploid bitki elde edilmesi amacıyla çalışmalar yapılmış, günümüze değin yaklaşık 250 farklı bitki türünde *in vitro* androgenesis tekniğinden başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Bajaj, 1983; George ve Sherrington, 1984; Pierik, 1989).

## 2.3. Patlıcanda Anter Kültürü

Patlıcanda anter kültürü çalışmaları konvansiyonel ıslah programları için dihaploid hatların elde edilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (Rotino, 1996). Dihaploid hatların elde

edilmesi konvansiyonel ıslah programlarında kendilemeler yapılarak saf hatların elde edilmesine oranla daha kısa zamanda gerçekleşmektedir. Dihaploid bitkiler %100 homozigot hatlar oldukları için kendilenmiş hatlara göre birçok açıdan daha avantajlıdır ve yüksek verim, hastalıklara dayanım, abiyotik stres faktörlerine karşı tolerant, erkencilik gibi özelliklerin ıslahında önemli katkılar sağlar (Jacobsen ve Sopory, 1978; Uhrig ve Salamani, 1987; Waari, 1996). Patlıcanda anter kültürünü kullanarak homozigot dihaploid hatların elde edilmesi ile ilgili ilk başarılı çalışma Raina ve Iyer (1973) tarafından yürütülmüştür. Daha sonra patlıcanda haploid bitkiler Isouard ve ark. (1979) tarafından elde edilmiştir. Dumas De Vault ve Chambonnet (1982), anter kültürü ile ilgili daha detaylı çalışmalara başlamış ve anterlerin inkübasyona alınmasından sonra ilk 7-8 gün karanlıkta yüksek sıcaklıkta ( $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) bekletilmelerinin haploid bitki oluşumunu artırdığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar oksin ve stokininin besin ortamında mutlaka bulunması gerektiğini belirtmektedirler. Rotino ve ark. (1987), patlıcanda haploid bitki rejenerasyonunun genotip, sıcaklık, kültür koşulları, hormonlar ,anter ve mikrosporların gelişme evrelerine bağlı olarak değiştiğini belirtmişlerdir. Anterlerin yüksek sıcaklığa bırakılmaları mikrosporların gametofitik evreden sporofitik evreye geçişlerini yönetmektedir. İnkübasyon uygulamasından sonra regenerasyon ortamında sitokininin kullanılmasının da androgenik başarıya katkısı belirtilmektedir (Rotino, 1996).

Rotino ve ark. (1991), anter kültürü çalışmalarında kolhisin uygulamasının somaklonal varyasyon oluşturup oluşturmadığını da araştırmışlar ve bitki boyu, meyve şekli ve verim gibi özelliklerin somaklonal varyasyondan etkilendiklerini belirlemişlerdir. Miyoshi (1996), patlıcan anterlerinden aldıkları mikrosporları 4 gün süreyle 0,5 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA eklenmiş Nitsch Lichter Nitsch (Litcher, 1982) ortamında beklettikten sonra anterleri 4 mg/l zeatin ve 0.2 mg/l IAA içeren MS ortamına aktardıklarında mikrospordan kallus elde etmişlerdir.

Anter kültürü tekniği *Solanum melongane* ile akraba türler (*S. integrifolium* ve *S. aethiopicum* gr. Gilo) arasında yapılan melezlemeler ile elde edilen somatik hibritlerin kromozomlarının yarıya indirilmesinde de başarıyla uygulanabilmektedir (Rotino ve

ark., 2001; Rizza ve ark., 2001; Rizza ve ark., 2002). Böylece türler arası melezlerden elde edilen dihaploid hatlar *S. melongena* ile mezlenebilmekte ve akraba türlerin sahip olduğu üstün özellikler kültür patlıcanına aktarılabilir.

#### **2.4. Patlıcanda Androgenesisin Başarısı Üzerine Genotipin Etkisi**

Anter kültürünün uygulandığı birçok bitki türünde olduğu gibi patlıcanda da başarı üzerine etki eden en önemli faktörlerden biri genotiptir. Salas ve ark. (2011) patlıcanda anter kültüründe genotipe bağlı olarak başarı oranlarının %0-60.9 arasında değiştiğini, yakın akraba türlerden *Solanum incanum*, *S. macrocarpon* ve *S. aetiopicum*'da ise embryoid elde edilemediğini, buna karşın kallus geliştiğini belirtmektedirler. Araştırmacılar embriyoların bitkiye dönüşümünde önemli kayıplar olduğunu, yüz anterden 60.9 embriyo elde edilen uygulamada bitkicik elde edilme oranının %5.8 olarak gerçekleştiğini belirtmektedirler.

Anter kültüründe genotipin kültüre tepki vermede en önemli faktörlerden biri olduğunu belirten Karakullukçu ve Abak (1992), dört değişik patlıcan genotipinin anter kültürüne verdikleri yanıtı incelemişlerdir. En iyi sonucun Halep Karası çeşidinden alındığını, bu genotipte embriyo oranının %7.8 ve haploid bitki oranının ise % 4.4 olduğunu belirtmektedirler. Araştırmacılar, Adana Topağı, Birecik Yerlisi ve Black Beauty çeşitlerinin anterlerinde irileşme olduğunu, anterlerinden kallus geliştiğini, ancak embriyo ve haploid bitki elde edilemediğini vurgulamaktadırlar.

Karakullukçu (1991) tarafından 13 patlıcan çeşidinde yapılan 8 ayrı denemede patlıcanda androgenesis başarısının genotiple yakın bir ilişki içinde olduğu görülmüştür. Araştırmacıların kullandıkları çeşitlerden yalnızca Halep Karası ve Baluroi F<sub>1</sub>'in haploid bitki verdiğini, Prelane F<sub>1</sub> ve Kemer çeşitlerinde ise embriyo oluşmasına rağmen bu embriyoların bitkiye dönüşmediği belirtilmektedir. Denemede kullanılan diğer çeşitlerden (Dourga, Pala, Adana, Topan, Şeytan, Black Beauty, Marfa F<sub>1</sub>, Fabina F<sub>1</sub>, Galine F<sub>1</sub>) embriyo veya bitki elde edilemediği bildirilmektedir. Araştırmacılar çalışmanın değişik aşamalarında toplam 22 adet embriyo ve 13 adet haploid bitki elde etmişlerdir.

Geboloğlu ve ark. (2017), patlıcanda androgenik yanıt üzerine Şeker ve bal uygulamasını karŐılaŐtırdıkları çalışmada ticari çeşit olan Anamur F1 ve populasyon özelliğinde olan Yamula patlıcanını donör bitki olarak kullanmışlardır. AraŐtırcılar Anamur F1 patlıcan eŐidinin Yamula populasyonunun anter kültürüne yanıt vermede ve anterlerin besin ortamında geliŐmelerinde çok başarılı genotipler olduklarını belirtmektedirler.

Tuberosa ve ark. (1987), farklı ülkelerden topladıkları 8 patlıcan genotipini melezleyerek 16 melez bitki elde etmişlerdir. AraŐtırcılar ebeveyn bitkiler ve melezlerinde anter kültürü çalışması yürütmüŐlerdir. Androgenik başarı oranının ebeveynlerde %17.3 olurken, melezlerde embriyo oluşum oranının %42'ye kadar çıktığını belirlemişlerdir.

## **2.5. Androgenik Başarıda Donör Bitkinin Yaşı ve YetiŐme Koşullarının Etkisi**

Anter kültürü çalışmalarında donör bitkilerin yetiştirildiği dönemdeki ve yetiştirildiği ortamda ki sıcaklık, ışık yoğunluğu ve günlük ıŐıklanma süresi, bitkinin beslenme koşulları ve diğer çevresel faktörler başarı üzerine doğrudan etkili faktörlerdir. Çalışmada kullanılacak genotip(ler)in androgenik yanıtı yüksek olsa bile donör bitkiler istenen koşullarda yetiŐtirilmemiŐse başarı oranı düŐmektedir. Literatürde yürütülmüŐ çalışmalara bakıldığında diğer anter kültürü uygulamaları aynı olmasına rağmen donör bitkinin yetiŐme koşullarının farklı olması nedeniyle aynı genotiplerin androgenik performanslarında farklılıklar grlmektedir.

Patlıcanda donör bitkilerin yetiŐme koşullarının androgenik başarı üzerine etkileri konusunda literatürde yapılmış herhangi bir çalışma bulunamamıŐtır. Bununla beraber değişik bitki türlerinde bu konuda yapılmış çalışmalar bulunmaktadır.

Biberde donör bitkilerin yetiŐme koşulları ve donör bitkinin yaşının anter kültüründe embriyo oluşumuna etkisini inceleyen Kristiansen ve Andersen (1993), donör bitkileri 16-18-22-26 ve 30 C sıcaklığa sahip serada 11-19 saat fotoperyotta yetiŐtirmiŐlerdir.

Araştırmacılar anter alımını 6-14 haftalar arasında ve her hafta toplamışlardır. Enyüksek androgenik başarıyı 26 °C derecede yetişen bitkilerden alan araştırmacılar başarı oranının 16 °C'de sifıra yakın olduğunu, 26 °C sıcaklıkta yetişen bitkilerden alınan anterlerde başarı oranının % 2 olduğunu ve bu dereceden daha yüksekte yetişen bitkilerde ise androgenik başarının düştüğünü, fotoperiyod uygulamasının etkisinin olmadığını belirtmektedirler. Araştırmacılar donör bitkilerin yaşı ilerledikçe embryo elde etme başarısının da düştüğünü, en iyi sonucun genç bitkilerden elde edildiğini belirtmektedirler.

Ercan ve ark. (2006), biberde donör bitkinin yaşı ve yetiştirme koşullarının anter kültüründe embryoid oluşumuna etkisini araştırdıkları çalışmada donör bitkinin yaşının ve yetiştirme koşullarının androgenik başarı üzerine önemli etkileri olduğunu belirlemiştir.

Biber dışında lahana, arpa, duğday, pirinç ve mısırdaki yapılan çalışmalarda da donör bitkinin yetiştirme koşullarının anter kültüründe başarı üzerine etkili olduğu belirtilmektedir.

## **2.6. Anterlerin Geliştirme Dönemi**

Anter kültürü çalışmalarında anterlerin kültüre alındıkları dönemde mikrosporların geliştirme evresinin başarı üzerine %100 etkisi vardır. Uygun dönemde anter alımının yapılamaması durumunda başarı oranı diğer faktörlere bakılmaksızın sifir olabilmektedir. Tomurcukların hasat edildiği evrede mikrosporların optimum geliştirme döneminde bulunması çok büyük önem taşımaktadır. Bu evre türlere göre değişiklik göstermektedir. Raina ve Iyer (1973)'e göre patlıcanda anter kültürüne en iyi cevap veren polen geliştirme döneminin tek çekirdekli mikrospor dönemi olduğunu belirtmektedirler.

Karakullukçu ve Abak (1993), patlıcanda anter kültüründe haploid bitki elde etmek için en uygun mikrospor geliştirme dönemini araştırdıkları çalışmalarında Pala, Kemer,

Baluroi ve Prelane F<sub>1</sub> çeşitlerini kullanmışlardır. Araştırmacılar 8 farklı büyüklüğe sahip tomurcukları kültüre almışlardır. Genotiplere bağlı olarak tomurcuk büyüklüklerinde farklılıklar olmasına rağmen genel olarak taç yaprakların seviyesinin çanak yaprakların birleşme yerinde olduğu beşinci gelişme evresi ile çanak yaprakların hafifçe açılmaya başladığı ve taç yaprakların 1-2 mm'lik kısmının görüldüğü evre en uygun anter alım zamanı olduğunu belirtmektedirler. Bu evrede tomurcuk uzunluklarının genotiplere bağlı olarak 22.4-24.7 mm, tomurcuk çaplarının ise 10.8- 12.5 mm arasında değiştiğini bildirmektedirler. Araştırmacılar morfolojik gözlemlerini sitolojik çalışmalarla teyit etmişler ve bu evrenin polen mitozundan hemen önceki evreye karşılık geldiğini belirlemişlerdir.

### **2.7. Anter Kültüründe Tomurcuk ve Anter Ön Uygulamaları**

Anter kültüründe tomurcuklara ön uygulama yapılması ve anterleinin inkübasyon koşulları başarıyı etkileyen önemli faktörler arasındadır. Tıprıdamaz ve Ellialtıoğlu (1998), patlıcanda anter kültürü üzerine yaptıkları çalışmada Kemer patlıcan çeşidine ait çiçek tomurcuklarına soğuk şoku uygulamışlar ve besin ortamına katılan aktif kömür ilave ederek anterlerdeki içsel absisik asit (ABA) miktarını incelemişlerdir. Araştırmacılar bitkilerden topladıkları tomurcukları +4 °C'de 80 saat ve +9 °C'de 5 gün bekletmişlerdir. Aktif kömür uygulamasını ise rejenerasyon ortamına %0.1, %1 ve %2 dozlarında vermişlerdir. Tomurcuklara soğuk şoku uygulaması ve regenerasyon ortamına aktif kömür ilave edilmesi patlıcan anterlerinde ABA miktarını azaltırken; embriyo oluşumuna etki etmemiştir. Araştırmacılar sadece kontrol ortamlarından embriyo elde ettiklerini (% 7.75) belirtmektedirler.

Patlıcanda anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerine ilk çalışmalardan birini yapan Dumas de Vaultx ve Chambonnet (1982), yüksek sıcaklıkta inkübasyon (35 ±2) uygulamasının haploid bitki oluşumunda etkili olduğunu belirtmektedirler. Biberde Terzioğlu ve ark. (2000), patlıcanda ise Salas ve ark. (2011), Khatun ve ark. (2006) ve Başay ve Ellialtıoğlu (2013), anterlerin yüksek sıcaklıkta inkübe edilmesinin haploid bitki geliştirmede etkili olduğunu belirtmektedirler.



Elliialtıoğlu ve ark. (2000) anter kültüründe ıek tomurcuklarından çıkarılan anterlere n uygulama yapılmasının mikrosporların kültür sırasında gelişmeleri üzerine olumlu etki gösterdiğini belirtmektedirler. Morrison ve ark. (1986), Biber tomurcuklarını 24, 48, 100 ve 120 saat 4°C’de beklettikten sonra kültüre almışlardır. Araştırmacılar 24 saat soğuk uygulamasında embriyo oluşumunun maksimum 12 olduğunu, 100 saat uygulamasında ise embriyo sayısının 349’a çıktığını belirtmektedirler.

Terzioğlu ve ark. (2000), biberde anter kültüründe besin ortamının bileşimi ve inkübasyon koşullarının embriyo oluşumu üzerinde önemli etkisinin olduğunu belirtmektedirler. Biberde anter kültüründe anterlerin ilk 8 gün 35 °C ’de karanlıkta bekletilmesi ve daha sonra 25 °C’ye alınması birçok araştırmada kullanılan inkübasyon koşulu olduğunu, sürekli ışıklandırılan ve 29° C’de tutulan anterlerden oluşun embriyo sayısının, 25 ve 35 °C uygulamasından daha yüksek olduğunu vurgulamaktadırlar.

## **2.8. Anter Kültüründe Besin Ortamları ve Bileşimlerinin Etkileri**

Anter kültüründe androgenik başarı üzerine etkili faktörler arasında besin ortamlarının önemli bir yeri vardır. Anter kültüründe anterlerin kültür ortamına alınmasından sonraki süreçte mikrosporların gametofitik gelişmelerinin sporofitik gelişmeye dönüştürülmesi gerekir. Bunun için besin ortamında oksinlere ihtiyaç vardır. Daha sonra ise mikrosporlardan embriyoid ve ardından bitki oluşumu için ortamda sitokininlere ihtiyaç duyulur. Anter kültürü çalışmalarında besin ortamlarında sitokinin kaynağı olarak kinetin, BAP ve zeatin kullanılırken, oksin kaynağı olarak 2,4 D, NAA ve IAA kullanılmaktadır. Temel besin ortamları olarak anter kültüründe en fazla MS (Murashige ve Skoog (1962), LS (Linsmaer ve Skoog, 1965), NN (Nitch ve Nitch, 1969) ve CP (Dumas de Valux ve ark., 1981) ortamları kullanılmaktadır. Bu ortamlar temel besin ortamları olup, içerikleri büyük ölçüde birbirine benzer.

Anter kültürlerinde besin ortamlarında karbon kaynağı olarak çoğunlukla sakkaroz kullanılmaktadır. Besin ortamlarına özellikle kültürün ilk dönemlerinde ilave edilen yüksek şeker dozları (%6-12) patates (Sopory ve ark., 1978), biber (Dumas de Valux ve ark., 1981) ve patlıcanda (Dumas de Valux ve Chambonnet, 1982) haploid embriyoların

oluşmasını teşvik etmektedir. Besin ortamlarına katılan serin, glutamin gibi aminoasitler, AgNO<sub>3</sub> gibi etilen biyosentezini inhibe edici veya aktif kömür gibi maddeler başarıyı arttırmaktadır.

Kumar ve ark. (2003), patlıcan anterlerini MS ve GD (Gresshoff and Doys, 1972) ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırmacılar kallus regenerasyonunu teşvik etmek için besin ortamlarına bitki büyüme düzenleyicilerin (2-4 D, BA, NAA) farklı dozlarını (0.5, 1.0, 2.0 mg/l) ilave etmişlerdir. Araştırmacılar 2.0 mg/l 2,4-D içeren ortamlardan embryogenic callus elde ettiklerini, anterlerin bazılarının kallus oluştururken, bir kısmının da embriyo oluşturduklarını, anterlere 2-3 saat 5°C soğuk uygulamasının kallus oluşumunu teşvik ettiğini belirlemişlerdir.

Karakullukçu ve Abak (1993), besin ortamına organik madde olarak sakkaroz, glikoz ve aktif karbon ve büyümeyi düzenleyici olarak kinetin, zeatin, 2,4-D ve NAA eklenmesinin patlıcanda androgenik haploid bitki oluşumuna etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar ilk 12 gün boyunca besin ortamına % 12 sakkaroz ilave edilmesi , %3 sakkaroz veya % 6 sakkaroz+% 6.3 glikoz ilave edilmesine oranla daha iyi sonuç verdiğini, aktif karbonun embriyo oluşumuna olumlu bir etkisinin olmadığını belirtmektedirler. Besin ortamına kinetin+ 2,4-D ilavesi zeatin+ 2,4-D veya kinetin+ NAA ilave edilmesine oranla embriyo oluşumunda daha etkili olmuştur. Araştırmacılar çalışmanın değişik aşamalarında 5mg/l kinetin +5 mg/l 2,4-D ve %12 sakkaroz kullanılan ortamlarda Baluroi F<sub>1</sub> çeşidinde %12.1, Kemer çeşidinde %1.5 ve Halep Karası çeşidinde % 3.8 oranında embriyo elde ettiklerini belirtmektedirler.

Abak (1983), biberde 5 mg/l kinetin ve 5 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda şeker ve demir konsantrasyonlarının yükseltilmesinin haploid embriyo ve bitki oluşumunu teşvik ettiğini, 90 ve 120 g/l şeker içeren ortamlarda, demir konsantrasyonunun da iki katına çıkartılmasının, hem embriyo, hem de bitki oluşumunu önemli düzeyde artırdığını belirtmektedirler.

Geboloğlu ve ark. (2017), patlıcanda anter kültüründe Dumas de Vault ve ark. (1981), tarafından önerilen besin ortamına 0,03 mg/l B12 vitamini ile sakkaroz ve balın farklı dozlarını (30-60-90-120 ve 150 g/l) ilave etmişlerdir. Çalışmada ayrıca besin ortamına 1,0, 3,0 ve 5,0 mg/l kinetin ve 2,4-D ilave eden araştırcılar uygulamaların embriyo oluşumuna etkisini araştırmışlardır. Araştırcılar çalışmada Yamula patlıcan genotipini ve Anamur F1 çeşidini donör bitki olarak kullanmışlardır. En yüksek ortalama embriyoid oluşumu bal uygulamasında %18.35, şeker uygulamasında %20.95 olmuştur. Yamula daha yüksek androgenik cevap vermiştir. En yüksek embriyoid oluşumu 1,0 mg/l Kinetin + 3,0 mg/l 2,4 D uygulamasından elde edilmiştir. Besin ortamında karbonhidrat kaynağı olarak sakkaroz yerine bal kullanılmasının patlıcanda anter kültüründe embriyoid oluşumu üzerine olumlu etki ederken, besin ortamlarında bal kullanılması ile ilgili daha çok çalışma yapılması gerektiğini belirtmektedirler.

## **2.9. Anter Kültüründe İnkübasyon Koşulları**

Anter kültürü çalışmalarında çiçek tomurcuklarından uygun dönemlerde alınan anterlerin besin ortamlarına aktarılması ve anterlerin inkübasyonu aşamasında dikkatli davranılması gerekmektedir. Zira bu aşamada yapılacak yanlışlar ve eksik uygulamalar androgenik başarıyı olumsuz etkilemektedir. Besin çözeltileri petri kaplarına aktarılırken, anterler petrilere yerleştirilirken ve inkübasyon sürecinde sterilizasyona dikkat edilmesi gerekir. Aksi takdirde anter kültürü çalışmalarında sık sık görüldüğü gibi ortamdan veya anterden kaynaklanan nedenlerle kontaminasyonlar meydana gelmektedir. Kontaminasyonla karşılaşılan petrilere deneme dışı aklmaktadır. Böyle durumlarda donör bitkinin yaşı ilerlediği için yeniden anter alınması mümkün olmamakta veya alınması durumunda diğer uygulamalarla eşitlik bozulmaktadır.

Anter kültüründe tomurcuklardan alınan anterlerin doğrudan besin ortamına temas etmesi gerekmektedir. Anter alımı sırasında anter dokusunun yaralanmaması veya anter üzerinde filament parçacıklarının kalmaması gerekir. Anterler besin ortamına yerleştirilirken dorsal yüzeyi ortamla temas edecek şekilde yerleştirilmelidirler. Anterlerin kültüre alındıkları ilk aşamada anterler genellikle karanlıkta 20-30° C arasındaki sıcaklıklarda kültüre alınmaktadır. İnkübasyon döneminden sonra düşük ışık

yoğunluğu ve değişik fotoperyotlarda bekletilen anterler embriyo oluştuktan sonra, rejenere olan bitkicikler daha yüksek ışık yoğunluğuna alınır. Bazı bitki türlerine ait anter kültürlerinde inkübasyonun ilk günlerinde uygulanan yüksek sıcaklık uygulamaları embriyo oluşumu üzerine olumlu etki yapmaktadır (Dumas de Vault ve ark., 1981).

### **3. MATERYAL YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Laboratuvar ve araştırma alanında yürütülmüştür.

##### **3.1.1. Donör Bitkiler ve Özellikleri**

Denemede Anamur F<sub>1</sub> patlıcan genotipi ile Anamur F<sub>1</sub>'in kendilenmesi ile elde edilmiş F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> generasyonları, Topan 374 standart patlıcan çeşidi ve lokal popülasyon olan ancak uzun yıllardır kendilenecek tohumu alındığı için varyasyon içermeyen Yamula genotipi donör bitki olarak kullanılmıştır. Anamur F<sub>1</sub> çeşidi Türkiye'de birçok bölgede açıkta yetiştiriciliğe uygun, yüksek verimli, siyah uzun meyveli bir çeşittir. Türkiye'de açık alanda yetiştiriciliği en çok yapılan çeşit durumundadır. Anter kültürü çalışmalarında androgenik yanıtı iyi genotiplerden biridir. Topan374 çeşidi Türkiyede uzun yıllardır siyah Topan meyveli patlıcan olarak kullanılan standart çeşittir. Ticari olarak değerli bir genotip olmamasının yanında anter kültürü çalışmalarında androgenik yanıtı nedeniyle denemede kullanılmıştır. Yamula patlıcanı Kayseri ilinin Yamula ilçesinde yetiştiriciliği yapılan ve bu yöreye has bir genotip olduğu için yöre ismiyle tanınmıştır. Yapılan ön çalışmalarda androgenik yanıtı çok iyi olan bir genotiptir. Denemede kullanılan genotiplerin görünümü Şekil 3.1'de verilmiştir.

### 3.1.2. Donör Bitkilerin Yetişme Koşulları

Donör bitkiler yarı otomasyon bir serada yetiştirilmiştir. Sera oluk altı yüksekliği 5 metre, taban alanı 2000 m<sup>2</sup>, ısı ve gölge perdesi bulunan, üstleri kelebek havalandırmalı, sirkülasyon ve egzoz fanlarına sahip, yanları uzay havalandırmalı, havalandırma boşlukları insect net ile kapalı, sulama ve gbrele sistemi otomasyona bağlı, içinde hem fide yetiştirme bölümü, hem de topraksız yetiştiriciliğe uygun altyapıya sahip bölümler mevcuttur. Seranın bulunduğu alanın rakımı 595 metre ve konumu 40°19'55.58"K - 36°28'27.49"D Őeklindedir. Donör bitkilerin yetiştirildiği seradan görünümler Şekil 3.2'de verilmiştir.





**ANAMUR F1**



**YAMULA**



**TOPAN 374**

Şekil 3.1. Denemede kullanılan donör bitkilerin görünüşleri



Şekil 3.2. Donör bitkilerin yetiştirildiği sera

### 3.1.3. Kültür Aşamasında Kullanılan Ekipmanlar

*Doku kültürü laboratuvarı:* Stres ve inkübasyon uygulamaları, dezenfeksiyon, besi ortamı hazırlama ve anter atımı çalışmaları Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

*İklimlendirme odası:* Anterlerin inkübasyon evrelerini tamamlamalarından dış koşullara aktarılincaya kadarki süreyi geçirmeleri için ışık, sıcaklık ve nem kontrollü iklimlendirme odası kullanılmıştır. İklimlendirme odasında krom nikel malzemenen imal edilmiş raflar bulunmaktadır ve bu rafların aydınlatılması LED lambalarla sağlanmaktadır.

*Growth Chamber(Büyütme Dolabı):* Anterleri 10 °C'de bekletmek için sıcaklık nem ve ışık kontrolünü sağlayan 600 lt hacimli Nüve Test Kabini kullanılmıştır.

*Floww kabin:* Steril ortam çalışmalarının yürütülmesi için Telstar Bio II A marka flow kabin kullanılmıştır.



*İnkübatör:* Anterlerin ekimi yapıldıktan sonra 8 gün boyunca 35 °C'de karanlık koşullarda bekletmede Memmert 'IPP 400' inkübatör kullanılmıştır.

*Otoklav:* Çalışma sırasında kullanılan malzemelerin (Besi ortamı, pens, büstüri, erlenmayer, tüp vs.) dezenfeksiyonunda nemli hava (basınçla) sterilizasyonu sağlayan ALP CL-3258 L marka 54 lt kapasiteli otoklav kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Anter kültürü çalışmalarının yürütüldüğü laboratuvar ekipmanları





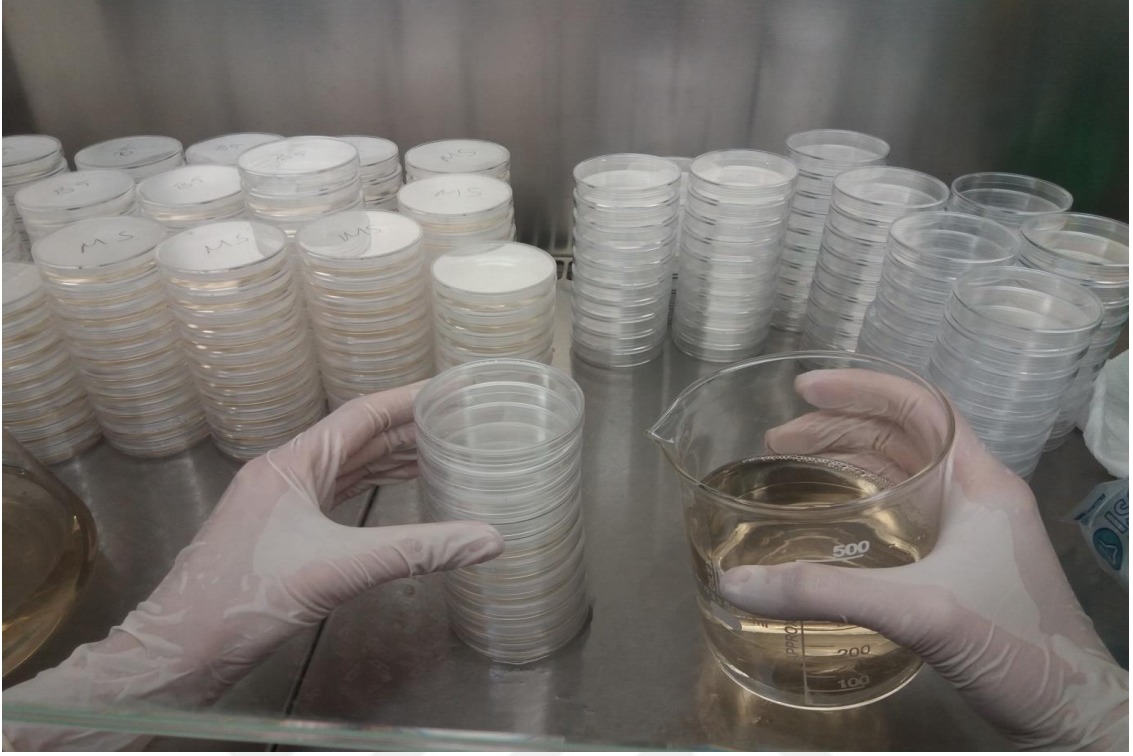
Şekil 3.4. Denemede kullanılan inkübatör ve otoklav

*Isıtmalı manyetik karıştırıcı, pH metre ve mikroskop:* Besin ortamı hazırlanırken gerekli olan kimyasalların belirli bir sıcaklık ve devirde manyetik alan etkisiyle karıştırılmasını sağlayan karıştırıcı cihaz kullanılmıştır. Besi ortamlarının pH değerlerini ölçmek için pH metre kullanılmıştır. Anterlerin gelişimi ve stoma incelemelerinde mikroskoptan faydalanılmıştır.



Şekil 3.5. Denemede kullanılan mikroskop, manyetik karıştırıcı ve pH metre

*Petri:* Çalışmada besin ortamları ve anterlerin anter dikimi için steril plastik petri kapları kullanılmıştır. Anterlerin inkübasyonu aşamasında 60 mm'lik petriler, anterlerin R1 ve R2 ortamlarına aktarılmasında ise 90 mm'lik steril plastik petriler kullanılmıştır.



Şekil 3.6. Denemede kullanılan petriler

### 3.2. Yöntem

Çalışmada 5 genotip, 3 farklı besin ortamı ve kontrol ile birlikte 5 farklı soğuk stres uygulaması, 6 tekerrürlü olarak denenmiştir. Böylece  $(5 \times 3 \times 5 \times 6)$ : 450 muamele kullanılmış olup her muamelede 10 anter kullanılmıştır. Toplamda ise 4500 anter ekimi yapılmıştır.

#### 3.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi

Denemede kullanılan patlıcan genotiplerine ait tohumlar 25 Nisan 2017 tarihinde çoklu saksılarda torf ortamına ekilmiştir. Fideler 30 Mayıs 2017 tarihinde ısıtılmalı sera içinde topraksız tarım sisteminde cocopeat bloklara dikilmiştir. Denemede her genotip için 20 bitki yetiştirilmiştir. Toplamda 5 genotip ve 100 bitki donör bitki olarak kullanılmıştır. Tomurcuk hasadından önce bitkiler üzerindeki açmış bütün çiçekler uzaklaştırılmıştır. Bitkiler düzenli olarak budanarak vegetatif-generatif denge sağlanmış ve yeni çiçek tomurcuğu oluşumu teşvik edilmiştir.



Şekil 3.7. Donör bitkilerin görünümü

Donör bitkiler yetiştirilirken stres oluşumunu önlemek amacıyla hastalık ve zararlılara karşı mümkün olduğunca ilaçlı mücadeleden kaçınılmış ve kültürel tedbirler alınmıştır. Bitkiler için 2:1:3:1:1 oranında N:P:K:Ca: Mg içerecek şekilde besin elementi stok solüsyonları hazırlanmıştır. Stok solüsyonlarda 1 nolu tank asit tankı olarak kullanılmıştır. 2 nolu tank Ca için; 3 nolu tank ise N-P-K-Mg ile S ve mikro elementler için hazırlanmıştır. Başlangıçta sulama suyunun EC değeri 1400  $\mu\text{S}/\text{cm}$  olacak şekilde gübreleme yapılmış ve bitkiler çiçeklenmeye başladıklarında sulama suyunun EC değeri 1800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  ve daha sonraki dönemde 2000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  olarak ayarlanmıştır. Haftada en az bir kere gübresiz sulama yapılmış, ayrıca düzenli olarak drenaj suyu alınmış ve EC ve pH değerleri ölçülmüştür. Drenaj sularında EC değerinin 2800  $\mu\text{S}/\text{cm}$ 'nin üzerine, pH değerinin 7.00'ın üzerine çıktığı durumlarda otomasyona müdahale edilerek değerler yeniden ayarlanmıştır.

### **3.2.2. Çiçek Tomurcuklarının Gruplandırılması ve Toplanması**

Anterlerin yeşilden sarıya dönüşmeye başladığı evre anter hasadı için baz alınmıştır. Bu devre tek çekirdekli mikrospor gelişmesinin son evreleri ile birinci polen mitozunun başlangıç evresini kapsamaktadır (Sibi ve ark., 1979; Abak, 1983; Karakullukçu, 1991). Genotipler arasında farklılıkların olma ihtimaline karşı anterlerin gelişme aşamalarını belirleyebilmek amacıyla, tomurcuklar önce kendi aralarında morfolojik özelliklerine göre gruplandırılmış ve bu gruplardan alınan anterlerde mikrospor gelişim aşamalarının kontrol edilmesi için % 2'lik asetokarmin yöntemi ile boyama işlemi yapılarak NİKON marka ışık mikroskobu ile mikrosporlar incelenmiş ve en uygun evrenin tespiti yapılmıştır. (Elçi,1982; Karakullukçu,1991). Mikrosporların durumuna göre tomurcuk gelişme aşamaları belirlenmiş ve deneme süresince tomurcuk hasadında aynı kriterler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan çiçek tomurcuklarının morfolojik görünüşleri Şekil 3.8'de, çiçek tomurcuğu ve anterlerin görünümü Şekil 3.9'da verilmiştir. Çiçek tomurcukları sabahın erken saatlerinde hasat edilmiştir.

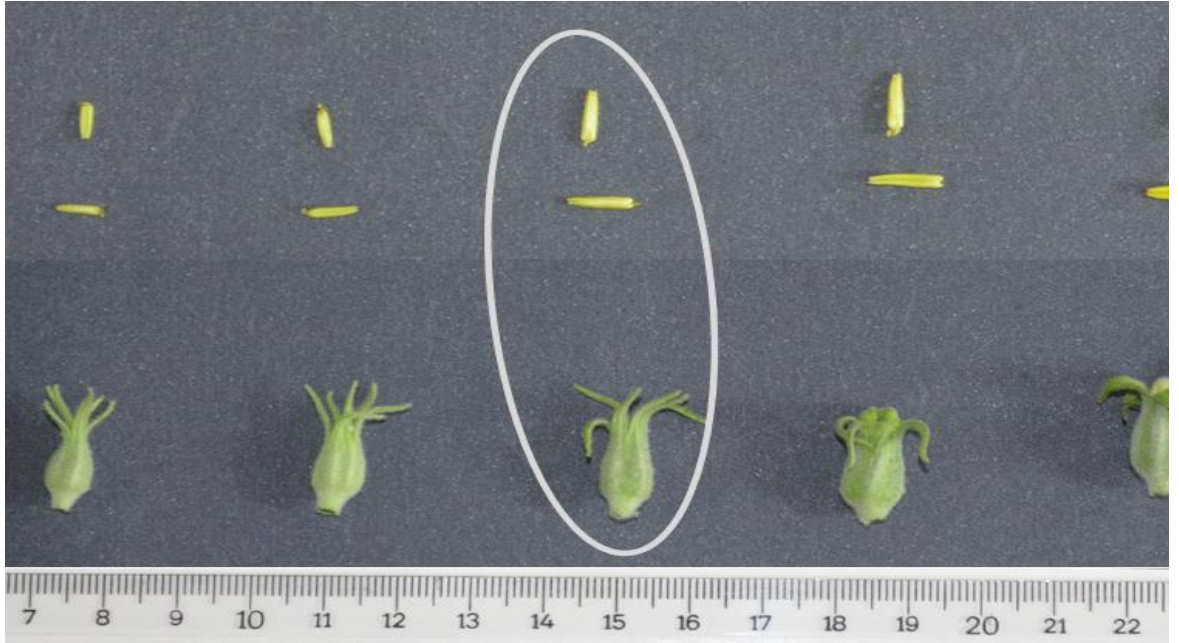
### **3.2.3. Çiçek Tomurcuklarına Soğuk Uygulaması**

Çiçek tomurcukları sabah erken saatlerde (07.00 ile 08.00 saatleri arasında) toplanmıştır. Tomurcuklar cam beher içine konulmuş ve soğuk uygulamaları için sıcaklıkları 4 ve 10 °C'ye ayarlanmış buzdolaplarına konulmuştur. Tomurcuklar +4 °C ve +10 °C sıcaklıkta 24 ve 48 saat bekletilmiş ve bu süreler sonunda dolaplardan çıkarılan tomurcuklar dezenfeksiyon işlemine alınmıştır. Soğuk uygulamalarının kontrolü olan tomurcuklara ise herhangi bir uygulama yapılmamış, hasat edilen tomurcuklar doğrudan sterilize edilmiş ve anter atımı yapılmıştır.





Şekil 3.8. Çiçek tomurcuklarının görünümü



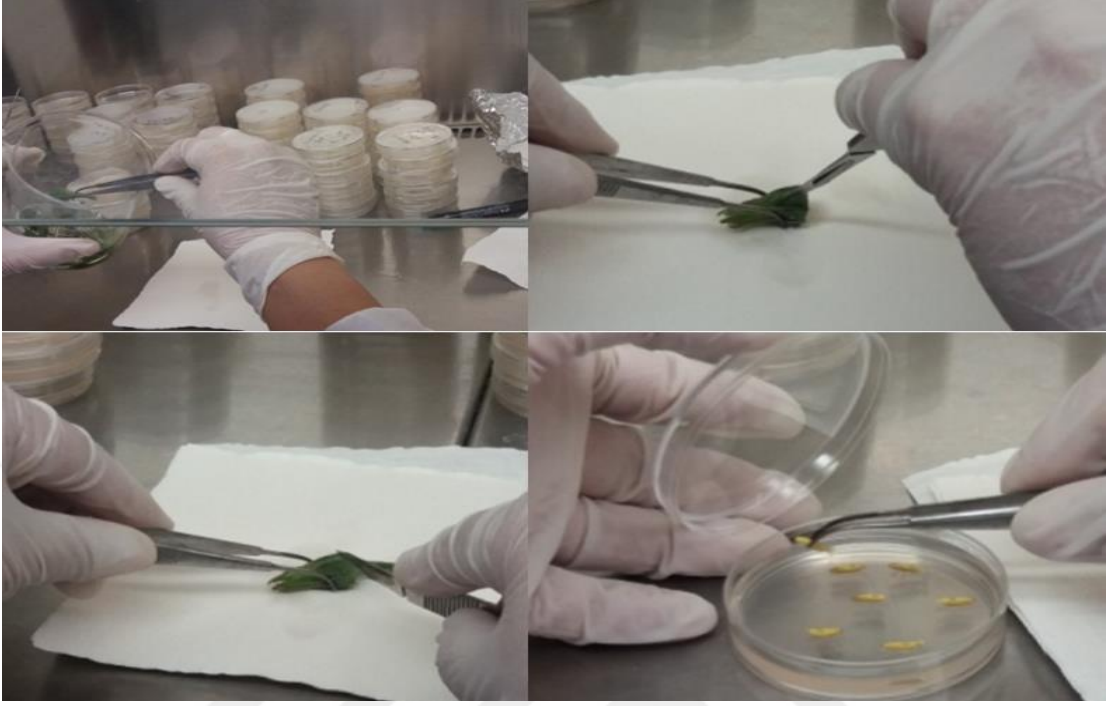
Şekil 3.9. Uygun çiçek tomurcuğu ve anter aşaması

### 3.2.4. Çiçek Tomurcuklarının Dezenfeksiyonu, Anterlerin Çıkarılması ve Dikimi

Polen embriyogenesi için en uygun mikrospor gelişme dönemine sahip olan anterleri içeren çiçek tomurcukları dezenfeksiyona alınmadan önce deterjanlı suda 1-2 dakika süreyle bekletilmiş ve ardından 8-10 dakika çeşme suyunda yıkanmıştır. Daha sonra çiçek tomurcukları birkaç damla Tween-20 damlatılmış % 20'lik ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 15 dakika süreyle dezenfekte edilmiş, daha sonra üç kez beşer dakika süreyle steril saf su ile durulanmıştır. Anterler, çiçek tomurcukları içerisinde bistüri ve kıvrık uçlu bir pens yardımıyla çıkarılmıştır. Anterler tomurcuktan çıkarıldıktan sonra bekletilmeden ince uçlu bir pens yardımıyla besin ortamı üzerine, dorsal yüzeyi ortamla temas edecek biçimde ve ortama batırılmaksızın yerleştirilmiştir. (Karakullukçu, 1991). Her petri kutusuna 2 çiçek tomurcuğundan çıkan anterlerin tamamı dikilmiş olup, bu sayı 10-12 arasında değişmektedir. Dikim işlemi tamamlandıktan sonra petri kutularının kenarları ince plastik film şeritlerle kapatılarak dış atmosferle ilişkileri kesilmiştir. Çalışma sırasında izolasyon ve dikim aletleri; sık sık cam boncuk sterilizatöre batırılarak sterilize edilmiştir. Ayrıca dikim işlemi sırasında steril kabin içerisine sık sık % 70'lik etil alkol spreylenmiştir.



Şekil 3.10. Çiçek tomurcuklarının dezenfeksiyonu



Şekil 3.11. Çiçek tomurcuklarından anterlerin çıkarılması ve anter dikimi

### 3.2.5. Besin Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanması

Çalışmada besin ortamı olarak anter kültüründe en çok kullanılan temel besin ortamlarından Dumas de VAulx ve Chambonnet (1982) tarafından önerilen DDVX besin ortamı, Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen MS besin ortamı ve Gamborg ve ark. (1968) tarafından önerilen B5 besin ortamı kullanılmıştır.

Besin ortamları hazırlanırken ortamların katılaştırılmasında %0.8 Agar-agar kullanılmıştır. Ortama ayrıca %6 sucrose eklenmiştir. Besin ortamlarının bileşimleri. Çizelge 3.1’de verilmiştir. Besin ortamları erlenmayerler içine konulduktan sonra pH seviyesi 5.8’e ayarlanmış, ağızları alüminyum folye ile kapatılmış ve otoklava yerleştirilmiştir. Ortamlar otoklavda 15 dk boyunca 121°C’de 1 atm basınç altında sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besin ortamları steril kabin içinde petrilere aktarılmıştır. Her petri kabına 10 ml besin ortamı doldurulmuştur. Kabin içinde besin



ortamlarının petrilere doldurulması ve anterlerin petrilere yerleştirilmesi süresince kabin içi sık sık %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir.



### 3.12. Besin ortamlarının hazırlanmış şekli

#### 3.2.6. Uygulamalar

Çalışmada 4 farklı ön uygulama yapılmıştır. Çiçek tomurcuklarına herhangi bir uygulama yapılmadan donör bitkilerden alınarak kültür ortamına aktarılan anterleri içeren tomurcuklar kontrol uygulaması olarak kullanılmıştır.

Tomurcuklara yapılan ön stres uygulamaları aşağıdaki gibidir;

1. Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 24 saat 4°C'de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra anterler 35°C'de 8 gün süre ile karanlık ortamda inkübasyona tabi tutulmuştur.
2. Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 24 saat 10 °C 'de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra anterler 8 gün boyunca 35 °C' de karanlık ortamda inkübasyona tabi tutulmuştur.
3. Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 48 saat 4°C'de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra anterler 35°C'de 8 gün süre ile karanlık ortamda inkübasyona tabi tutulmuştur



4. Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 48 saat 10 °C 'de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra anterler 8 gün boyunca 35 °C' de 8 gün süre ile karanlık ortamda inkübasyona tabi tutulmuştur.

5. Çiçek tomurcukları dezenfekte edildikten sonra anterler bekletilmeden C ortamına aktarılmış, ardından anterler 35°C'de 8 gün süre ile karanlık ortamda inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu uygulama tomurcuklara sıcaklık uygulamalarının kontrolü olarak alınmıştır.

İnkübasyon uygulama sürelerinin sonunda petriler 3000 lux ışık intensitesi, 25°C ±1°C sıcaklık ve 16 saat fotoperiyoda sahip iklimlendirme odasına alınmıştır. Petriler iklimlendirme odasına alındıktan 4 gün sonra anterler içinde R ortamı bulunan petrilere aktarılmıştır. Her 4 haftada bir anterler yeni bir R ortamına transfer edilmiştir. R ortamında yaklaşık 6-7 hafta sonra anterlerin yüzeyinde embrioidler görülmüştür. Anterler üzerinde embrioidler görülünce bu embrioidler steril koşullarda içinde yenilenmiş R ortamı bulunan petrilere aktarılmıştır. R ortamları her 3 besin ortamı için ortak kullanılmıştır. R ortamı DDVX ortamı esas alınarak hazırlanmıştır. R ortamına 0,1 mg/l kinetin ilave edilmiş, 2,4-D ve Vitamin B<sub>12</sub> ilave edilmemiştir. Ayrıca R ortamında 30 000 mg/l sucrose kullanılmıştır. R ortamı yaklaşık 4 hafta bekledikten sonra ortamların etkinliğinin azalması nedeniyle bu ortamlar her 4 haftada bir yenilenmiştir. Bunun için taze R ortamları petrilere doldurulmuş ve anterler steril koşullarda bu petrilere aktarılmıştır. R ortamında gelişen embrioidler yine steril koşullarda içinde V ortamı bulunan cam tüplere aktarılmıştır.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan besin ortamları ile R ve V ortamlarının bileşimi

<b><u>Kimyasal Maddeler</u></b>	<b>C Ortamları</b>			<b>R</b>	<b>V</b>
	<b>MS</b>	<b>B5</b>	<b>DDVX</b>	<b>Ortamı</b>	<b>Ortamı</b>
<b><u>Makro elementler (mg/l)</u></b>					
KNO <sub>3</sub>	1900	3000	2150	2150	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	1238	1238	1650
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	370	500	444	444	370
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134	34	34	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	150	38	38	-
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	440	150	313	313	440
KCl	-	-	7	7	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	-	-	50	50	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	142	142	170
<b><u>Mikro elementler (mg/l)</u></b>					
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	22.300	13.200	22.130	22.130	22.300
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	8.600	2.000	3.625	3.625	8.600
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200	3.000	3.150	3.150	6.200
KI	0.830	0.750	0.695	0.695	0.830
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.250	0.250	0.188	0.188	0.250
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.016	0.016	0.025
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,025	0.025	0.016	0.016	0.025
<b><u>Fe-EDTA</u></b>					
Na <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O (mg/l)	37.3	37.3	18.65	18.65	37.3
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (mg/l)	27.8	27.8	13.90	13.90	27.8
<b><u>Vitaminler (mg/l)</u></b>					
Pyridoxin HCL	0.50	1.00	5.500	5.500	0.5
nicotinamic Acid	0.50	1.00	0.700	0.700	0.5
Thiamine HCL	0.10	10.00	0.600	0.600	0.1
Glycin	2.00	-	0.100	0.100	2.0
MioInositol	100.00	100.00	50.300	50.300	100.0
Vit B <sub>12</sub>	0.03	0.03	0.030	-	-
Calcium panthotenate	-	-	0.500	0.500	-
Biotine	-	-	0.005	0.005	-
<b><u>Karbonhidratlar</u></b>					
Sucrose (mg/l)	60.000	60.000	60.000	30.000	30.000
<b><u>Büyüme düzenleyiciler</u></b>					
Kinetin (mg/l)	1.0	1.0	1.0	0.1	-
2,4-D (mg/l)	1.0	1.0	1.0	-	-
<b><u>Agar</u></b>					
Agar-agar (mg/l)	8000	8000	8000	8000	8000
PH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

MS besin ortamı V ortamı olarak kullanılmıştır. MS besin ortamına göre sucrose miktarı 30 000 mg/l olarak alınmıştır. Ayrıca V ortamında kinetin, 2,4-D ve Vitamin B<sub>12</sub> kullanılmamıştır. R ortamında gelişme gösteren embriyo ve V ortamındaki gelişme durumu Şekil 3.13'de verilmiştir.

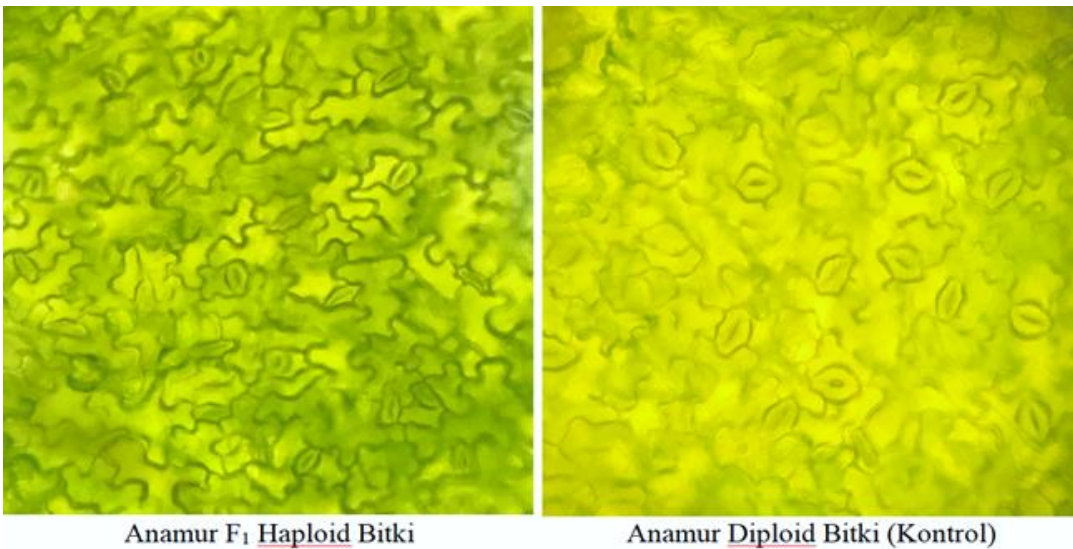


Şekil 3.13. R ve V ortamında embriyoid ve bitki gelişme durumu

### 3.2.7. Ploidi testi (Stomal inceleme):

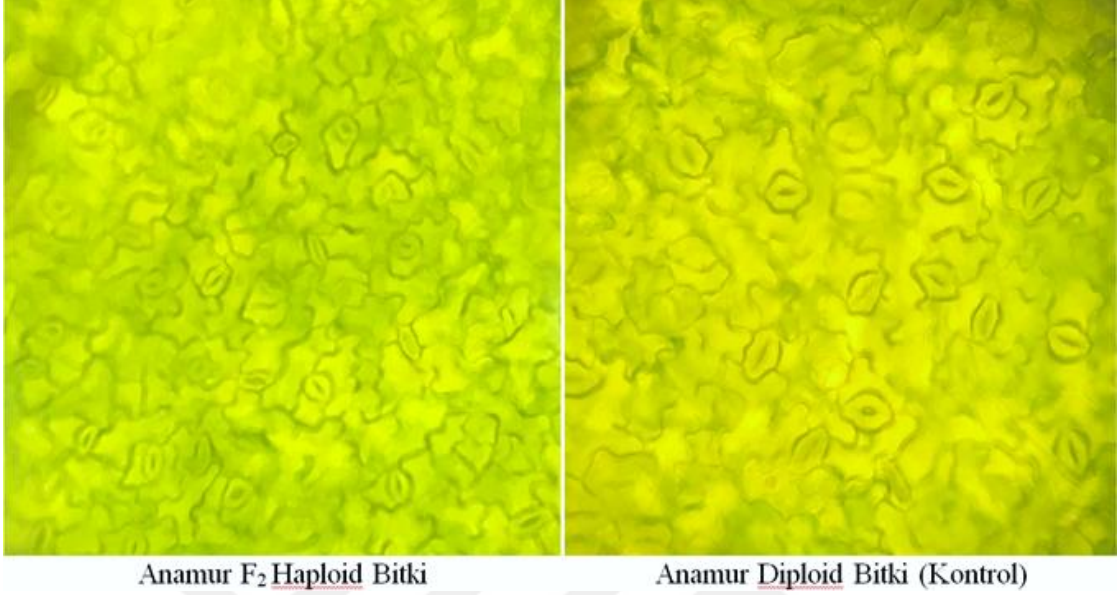
V ortamında gelişmesini tamamlayan bitkicikler dış koşullara alıştırılmak için saksılara alınmıştır. İçinde 2:1 oranında torf+perlit karışımı bulunan saksılara bitkicikler dikildikten sonra üzerleri beherle kapatılarak alıştırması sağlanmıştır. Beherler 3 gün kapalı tutulduktan sonra bitkilerin üzeri açılmış ve iklim odasında gelişmeye bırakılmıştır.

Dış koşullara alıştırılan ve 8-10 yapraklı aşamaya gelen bitkilerden yaprak örnekleri alınmış yaprakların alt yüzeyindeki stoma büyüklüğü ve stoma sayıları NIKON Eclipse E600 marka ışık mikroskobunda 40x100 büyütme olarak incelenmiştir. Stomal incelemede kontrol olarak AnamurF<sub>1</sub> çeşidinin diploid bitkileri kontrol olarak kullanılmıştır. Anter kültüründen elde edilen ve haploid olduğu düşünülen bitkiler ile diploid bitkilerin görüntüleri karşılaştırılmış, kontrole göre stoma sayısı daha fazla ve stoma ebatları daha küçük olan örnekler haploid olarak kaydedilmiştir. Sitolojik çalışmalarda haploid bitkilerinin stomalarının diploid bitkilere göre daha fazla sayıda ve daha küçük oldukları bilinmektedir (Ellialtıoğlu ve ark. 2001). Denemede kullanılan genotiplerin (diploid) stoma görüntüleri Şekil 3.14-3.18'de ile bu genotiplerden elde edilen haploid bitkilerin stoma görüntüleri verilmiştir.

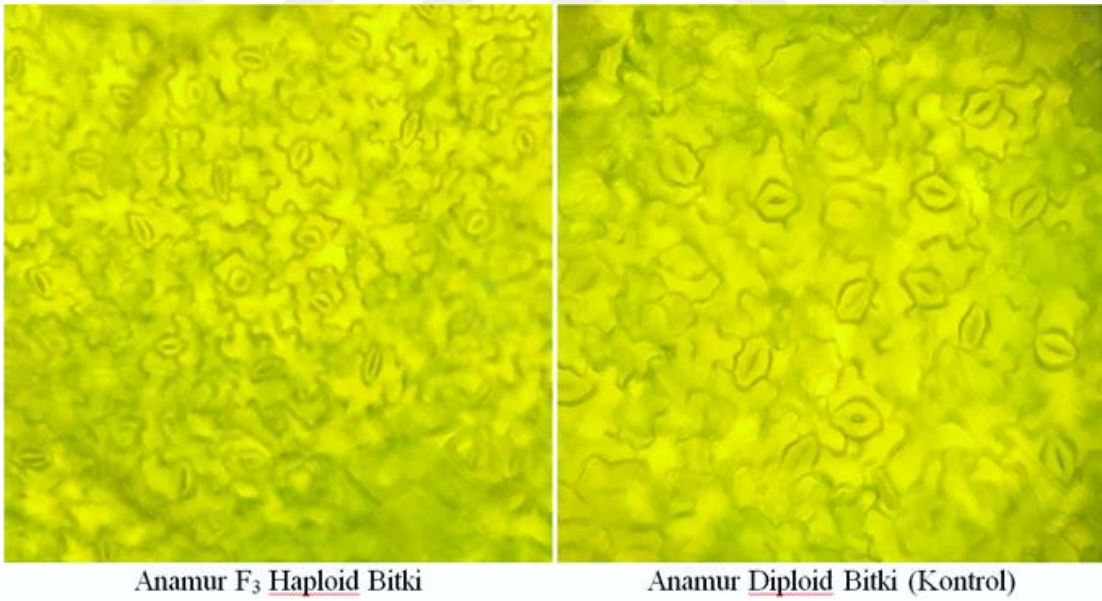


Şekil 3.14. Anamur F<sub>1</sub> genotipinin haploid ve diploid (kontrol) bitkilerinin mikroskobik stoma görünümü

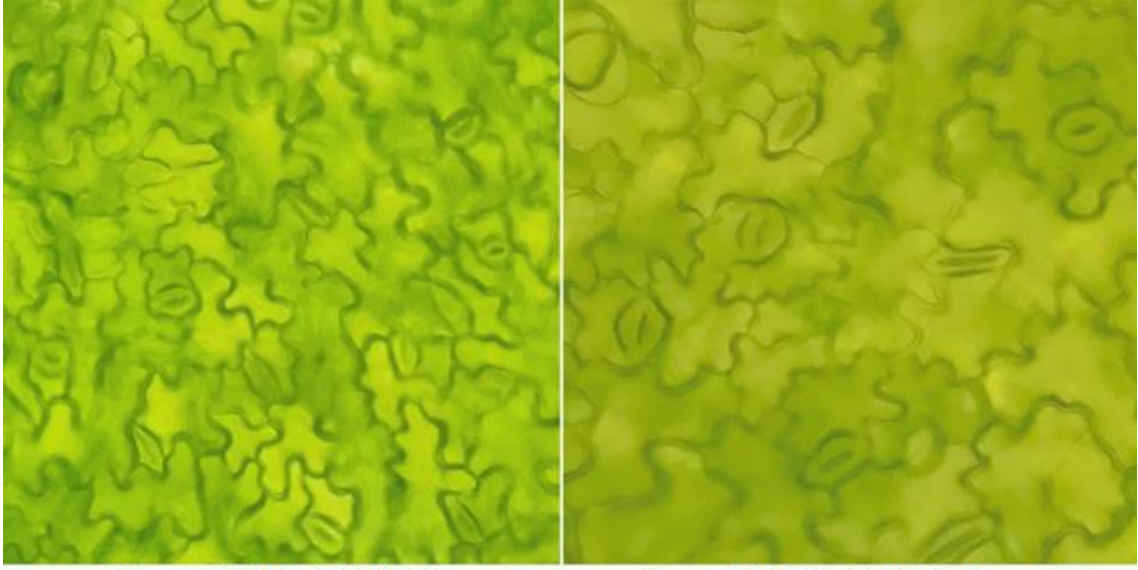




Şekil 3.15. Anamur F<sub>2</sub> genotipinin haploid ve diploid (kontrol) bitkilerinin mikroskobik stoma görünümü



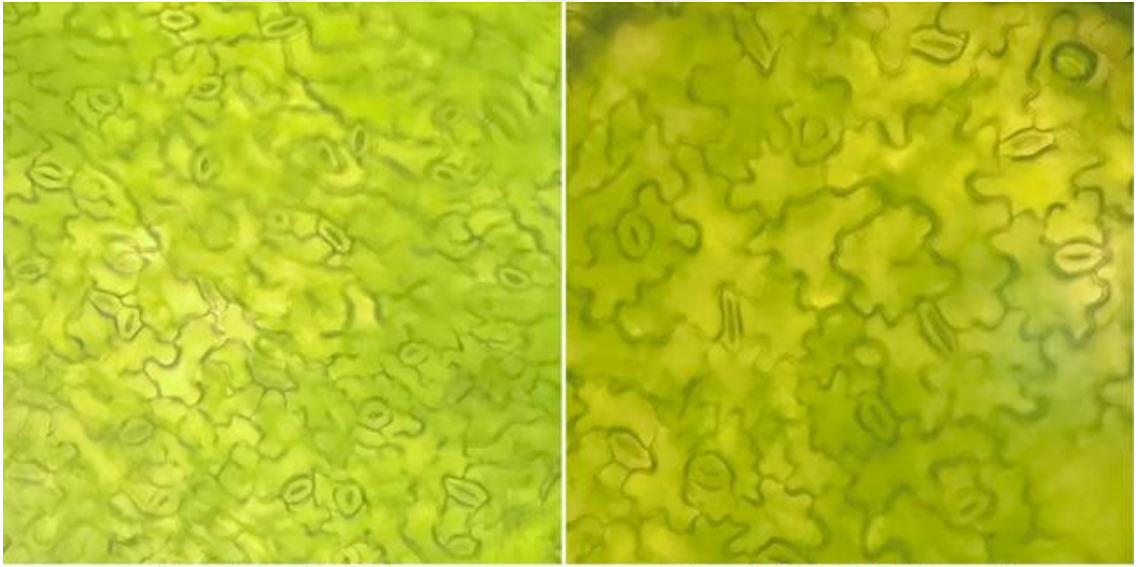
Şekil 3.16. Anamur F<sub>3</sub> genotipinin haploid ve diploid (kontrol) bitkilerinin mikroskobik stoma görünümü



Topan 374 Haploid Bitki

Topan 374 Diploid Bitki (Kontrol)

Şekil 3.17. Topan 374 genotipinin haploid ve diploid (kontrol) bitkilerinin mikroskobik stoma görünümü



Yamula Haploid Bitki

Yamula Diploid Bitki (Kontrol)

Şekil 3.18. Yamula genotipinin haploid ve diploid (kontrol) bitkilerinin mikroskobik stoma görünümü

### 3.2.8.Gözlemler

Çalışmada anterlerden elde edilen embriyo sayıları, embriyolardan elde edilen bitkicik sayıları ve dış koşullara alıştırılan bitki sayıları kaydedilmiştir. Embriyo sayıları kültüre alınan anter sayısına oranlanmış, bitkicik ve dış koşullara alıştırılan bitki sayıları kültüre alınan anter ve embriyo sayılarına oranlanmıştır. Ayrıca stomal inceleme yapılarak haploid bitki sayıları belirlenmiştir. Ayrıca genotiplere, soğuk uygulamalarına ve besin ortamlarına göre başarı oranları da hesaplanmıştır. Anter kültürü çalışmalarında sonuçların analizinde iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Kullanılan uygulamalara göre başarı oranı sıfıra kadar indiğinden uygulamalar arasındaki farklılıkların istatistiksel analizi pek tercih edilmemektedir. Bu nedenle genelde uygulamalardan elde edilen sayısal değerler ve bu verilerin anter veya embriyo sayısına oranları verilmektedir. Bu nedenle denemede başarı oranları sayı ve yüzde olarak verilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada 5 patlıcan genotipinden alınan çiçek tomurcuklarından toplam 4500 adet anter besin ortamlarına aktarılmıştır. Anterlerin besin ortamlarına aktarılmasından 12 gün sonra tüm uygulamalarda anter gelişmesi takip edilmiştir. Kültür ortamına alınan anterlerden anormal şişme, kuruma veya bozulma olmadan canlılıklarını sürdüren anterle besin ortamlarında normal olarak gelişen anterler olarak kabul edilmiştir. Normal gelişimini sürdüren anterlere ait görüntüler Şekil 4.1'de verilmiştir. Çalışmada genotip, besin ortamları ve tomurcuklara soğuk stresi uygulamasına bağlı olarak androgenik başarıda farklılıklar görülmüştür. Anamur F<sub>1</sub> patlıcan çeşidinin F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> generasyonları ile karşılaştırıldığında generasyonlar arasında farklılıklar görülmüştür. En yüksek embriyo oluşumu 110 embriyo/60 anter ile Yamula genotipinden DDVX ortamında ve tomurcukların 4 °C sıcaklıkta 48 saat bekletildiği uygulamadan elde edilmiştir. Denemede genotipler, besin ortamları ve soğuk şoku uygulamaları dikkate alındığında 75 uygulama kullanılmış ve bu uygulamaların 51'inden embriyo elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Normal gelişimini sürdüren Topan 374 ve Anamur F<sub>2</sub> genotiplerine ait anterler

#### 4.1. Genotiplerin Uygulamalara Göre Androgenik Performansları

Anamur F<sub>1</sub> genotipinde 4 uygulamadan embriyo elde edilememiştir. Androgenik başarı elde edilen uygulamalarda embriyo oluşum oranı % 5.00 – 26.67 arasında değişmiştir. Anamur F<sub>1</sub> genotipinde en yüksek başarı DDVX ortamından ve tomurcukların 4 °C sıcaklıkta 24 saat bekletildiği uygulamadan (60 anterden 16 embriyo ve 9 bitkicik) elde edilmiştir. Bitkiciklerin alıştırma aşamasından sonra stoma incelemeleri yapılmış ve haploid bitki sayıları belirlenmiştir. En yüksek haploid bitki DDVX ortamında 4°C 24 saat uygulamasından (60 anterden 4 haploid bitki) elde edilmiştir. Bütün uygulamalar dikkate alındığında Anamur F<sub>1</sub> genotipinde toplamda 110 embriyo, 43 bitkicik ve 10 haploid bitki elde edilmiştir. Anamur F<sub>1</sub> genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki sayıları ile anter ve embriyo sayısına göre başarı oranları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Anamur F<sub>2</sub> genotipinde 4 uygulamadan embriyo elde edilememiştir. Androgenik başarı elde edilen uygulamalarda embriyo oluşum oranı % 3.33 – 56.67 arasında değişmiştir. Denemede Anamur F<sub>2</sub> genotipinde en yüksek başarı MS ortamından ve tomurcukların 10 °C sıcaklıkta 24 saat bekletildiği uygulamadan (60 anterden 34 embriyo ve 13 bitkicik) elde edilmiştir. Bitkiciklerin alıştırma aşamasından sonra stoma incelemeleri yapılmış ve haploid bitki sayıları belirlenmiştir. En yüksek haploid bitki sayısı DDVX ortamında 10°C 48 saat uygulaması ile MS ortamında 4°C 48 saat uygulamalarından elde edilmiştir (60 anterden 6 haploid bitki). Bütün uygulamalar dikkate alındığında Anamur F<sub>2</sub> genotipinde toplamda 121 embriyo, 60 bitkicik ve 24 haploid bitki elde



edilmiştir. Anamur F<sub>2</sub> genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki sayıları ile anter ve embriyo sayısına göre başarı oranları. Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Anamur F<sub>3</sub> genotipinde 9 uygulamadan embriyo elde edilememiştir. Bu genotipin androgenik başarı düzeyi oldukça düşük çıkmıştır. Embriyo elde edilen uygulamalarda embriyo oluşum oranı % 1.67 – 31.67 arasında değişmiştir. Denemede Anamur F<sub>3</sub> genotipinde en yüksek başarı MS ortamından ve tomurcukların 10 °C sıcaklıkta 48 saat bekletildiği uygulamadan elde edilmiştir (60 anterden 19 embriyo ve 6 bitkicik). Bitkiciklerin alıştırma aşamasından sonra stoma incelemeleri yapılmış ve haploid bitki sayıları belirlenmiştir. En yüksek haploid bitki sayısı MS 10 °C 48 uygulamasından elde edilmiştir (60 anterden 2 haploid bitki). Bütün uygulamalar dikkate alındığında Anamur F<sub>3</sub> genotipinde toplamda 39 embriyo, 14 bitkicik ve 4 haploid bitki elde edilmiştir. Anamur F<sub>3</sub> genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki sayıları ile anter ve embriyo sayısına göre başarı oranları Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Topan 374 denmede en yüksek androgenik performansı gösteren genotip olmuştur. Bu genotipte 5 uygulamadan embriyo elde edilememiştir. Androgenik başarı elde edilen uygulamalarda embriyo oluşum oranı % 8.33 – 133.33 arasında değişmiştir. Denemede Topan 374 genotipinde en yüksek başarı DDVX ortamında tomurcukların 4 °C sıcaklıkta 48 saat bekletildiği uygulamadan elde edilmiştir (60 anterden 80 embriyo ve 45 bitkicik). Bitkiciklerin alıştırma aşamasından sonra stoma incelemeleri yapılmış ve haploid bitki sayıları belirlenmiştir. En yüksek haploid bitki B5 ortamında 4°C 48 saat uygulamasından elde edilmiştir (60 anterden 22 haploid bitki). Bütün uygulamalar dikkate alındığında denemede Topan 374 genotipinde toplamda 439 embriyo, 244 bitkicik ve 100 haploid bitki elde edilmiştir. Topan 374 genotipinde uygulamalara göre embrioid, bitkicik ve haploid bitki sayıları ile anter ve embriyo sayısına göre başarı oranları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Denemede Yamula genotipi Topan 374’ten sonra en yüksek performansı gösteren ikinci genotip olmuştur. Bu genotipte 2 uygulamadan embriyo elde edilememiştir. Androgenik başarı elde edilen uygulamalarda embriyo oluşum oranı % 5.00 – 183.33 arasında değişmiştir. Denemede Yamula genotipinde en yüksek başarı DDVX ortamından ve

tomurcukların 4 °C sıcaklıkta 48 saat bekletildiği uygulamadan elde edilmiştir (60 anterden 110 embriyo ve 101 bitkicik). Bitkiciklerin alıştırma aşamasından sonra stoma incelemeleri yapılmış ve haploid bitki sayıları belirlenmiştir. En yüksek haploid bitki sayısı DDVX ortamında 4°C 48 saat uygulamasından elde edilmiştir (60 anterden 32 haploid bitki). Bütün uygulamalar dikkate alındığında denemede Yamula genotipinde toplamda 387 embriyo, 266 bitkicik ve 73 haploid bitki elde edilmiştir. Yamula genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki sayıları ile anter ve embriyo sayısına göre başarı oranları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Anter kültürü çalışmalarında başarı birçok faktörden etkilenebilmektedir. Araştırmalarda birden fazla faktörün kullanıldığı durumlarda başarı oranlarında farklılıklar çıkmaktadır. Denemede uygulamalara bağlı olarak embriyo ve bitki oluşum oranları farklılıklar göstermiştir. Embriyo ve bitkicik oluşum oranı yüksek genotiplerin yanında düşük başarı gösteren genotipler de olmuştur. Aynı genotipin farklı besin ortamlarında farklı androgenik yanıtlar verdiği görülmüştür. Genotiplere göre değişen bazı uygulamalarda embriyo oluşumu yüksek olmasına rağmen, bitkiye dönüşüm oranları düşük kalmıştır. Literatürde değişik bitki türlerinde anter kültürü çalışmalarında başarı üzerine birçok faktörün etkili olduğu belirtilmektedir. Özellikle genotip ve besin ortamının bileşimi başta olmak üzere stres ve inkübasyon koşulları gibi faktörlerin de etkisiyle embriyo oluşum oranı ve bitkiye dönüşümde farklılıkların olduğu değişik araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Karakullukçu (1991), Karakullukçu ve Abak (1992), Salas ve ark. (2011) ve Ellialtıoğlu ve ark. (2012) patlıcanda; Smith (2013), Touraev ve Heberle-Bors (2003) ve Belogradova ve ark. (2009) tütünde; Achar (2002), Zhang ve ark. (2005) ve Cardoza ve Stewart (2004) lahanada; Ochoa-Alejo ve Ramirez-Malagon (2001), Ercan ve ark. (2006) ve Kothari ve ark. (2010) biberde anter kültürü ile ilgili yürüttükleri çalışmalarda androgenik başarı üzerine birçok faktörün etkili olduğunu belirtmektedirler. Literatürde bahsedilen ve anter kültürü çalışmalarında kullanılan faktörlere bağlı oluşan androgenik başarı farklılıkları denemede de benzer şekilde görülmüştür.

Çizelge 4.1. Anamur F<sub>1</sub> genotipinde uygulamalara göre embriyoid, bitkicik ve haploid bitki oluşumu

Genotip	Ortam	Soğuk Uygulaması	E1	B1	E2	B2	B3	B4	B5	B6
	MS	Kontrol								
	MS	4 °C'de 24 saat	11	3	18.33	5.00	27.27	1	1.67	9.09
	MS	10 °C'de 24 saat								
	MS	4 °C'de 48 saat	16	5	26.67	8.33	31.25	2	3.33	12.50
	MS	10 °C'de 48 saat	7		11.67					
	DDVX	Kontrol	13	2	21.67	3.33	15.38			
	DDVX	4 °C'de 24 saat	16	9	26.67	15.00	56.25	4	6.67	25.00
Anamur F <sub>1</sub>	DDVX	10 °C'de 24 saat	6	2	10.00	3.33	33.33			
	DDVX	4 °C'de 48 saat	11	4	18.33	6.67	36.36	2	3.33	18.18
	DDVX	10 °C'de 48 saat	15	6	25.00	10.00	40.00	1	1.67	6.67
	B5	Kontrol								
	B5	4 °C'de 24 saat	3	3	5.00	5.00	100.00			
	B5	10 °C'de 24 saat	7	5	11.67	8.33	71.43			
	B5	4 °C'de 48 saat	2	2	3.33	3.33	100.00			
	B5	10 °C'de 48 saat	3	2	5.00	3.33	66.67			

E1: Embriyo sayısı (60 anterden)

B1: Bitkicik sayısı (60 anterden)

E2: Embriyo oluşum oranı (%)

B2: Bitkicik oluşum oranı (%)

B3: Embriyodan bitkicik oluşum oranı (%)

B4: Haploid bitki sayısı

B5: Anterden haploid bitki oluşum oranı (%)

B6: Embriyoidden gelişen haploid bitki oranı (%)

Çizelge 4.2. Anamur F<sub>2</sub> genotipinde uygulamalara göre embriyoid, bitkicik ve haploid bitki oluşumu

Genotip	Ortam	Soğuk Uygulaması	E1	B1	E2	B2	B3	B4	B5	B6
	MS	Kontrol								
	MS	4 °C'de 24 saat								
	MS	10 °C'de 24 saat	34	13	56.67	21.67	38.24	1	1.67	2.94
	MS	4 °C'de 48 saat	29	18	48.33	30.00	62.07	6	10.00	20.69
	MS	10 °C'de 48 saat								
	DDVX	Kontrol	4		6.67					
	DDVX	4 °C'de 24 saat	3	1	5.00	1.67	33.33			
Anamur F <sub>2</sub>	DDVX	10 °C'de 24 saat	9	5	15.00	8.33	55.56	4	6.67	44.44
	DDVX	4 °C'de 48 saat	12	10	20.00	16.67	83.33	4	6.67	33.33
	DDVX	10 °C'de 48 saat	18	6	30.00	10.00	33.33	6	10.00	33.33
	B5	Kontrol								
	B5	4 °C'de 24 saat	3	2	5.00	3.33	66.67	1	1.67	33.33
	B5	10 °C'de 24 saat	2	1	3.33	1.67	50.00			
	B5	4 °C'de 48 saat	5	3	8.33	5.00	60.00	2	3.33	40.00
	B5	10 °C'de 48 saat	2	1	3.33	1.67	50.00			

E1: Embriyo sayısı (60 anterden)

B1: Bitkicik sayısı (60 anterden)

E2: Embriyo oluşum oranı (%)

B2: Bitkicik oluşum oranı (%)

B3: Embriyodan bitkicik oluşum oranı (%)

B4: Haploid bitki sayısı

B5: Anterden haploid bitki oluşum oranı (%)

B6: Embriyoidden gelişen haploid bitki oranı (%)

Çizelge 4.3. Anamur F<sub>3</sub> genotipinde uygulamalara göre embrioid, bitkicik ve haploid bitki oluşumu

Genotip	Ortam	Soğuk Uygulaması	E1		E2		B3		B4		B5		B6	
			B1		B2		B3		B4		B5		B6	
Anamur F <sub>3</sub>	MS	Kontrol												
	MS	4 °C'de 24 saat												
	MS	10 °C'de 24 saat												
	MS	4 °C'de 48 saat	11	2	18.33	3.33	18.18		1		1.67	9.09		
	MS	10 °C'de 48 saat	19	6	31.67	10.00	31.58		2		3.33	10.53		
	DDVX	Kontrol												
	DDVX	4 °C'de 24 saat	3	1	5.00	1.67	33.33		1		1.67	33.33		
	DDVX	10 °C'de 24 saat												
	DDVX	4 °C'de 48 saat												
	DDVX	10 °C'de 48 saat												
	B5	Kontrol												
	B5	4 °C'de 24 saat	3	3	5.00	5.00	100.00							
	B5	10 °C'de 24 saat	2	2	3.33	3.33	100.00							
	B5	4 °C'de 48 saat												
	B5	10 °C'de 48 saat	1		1.67									

E1: Embriyo sayısı (60 anterden)

B1: Bitkicik sayısı (60 anterden)

E2: Embriyo oluşum oranı (%)

B2: Bitkicik oluşum oranı (%)

B3: Embriyodan bitkicik oluşum oranı (%)

B4: Haploid bitki sayısı

B5: Anterden haploid bitki oluşum oranı (%)

B6: Embriyoıdden gelişen haploid bitki oranı (%)

Çizelge 4.4. Topan 374 genotipinde uygulamalara göre embriyoid, bitkicik ve haploid bitki oluşumu

Genotip	Ortam	Soğuk Uygulaması									
			E1	B1	E2	B2	B3	B4	B5	B6	
Topan 374	MS	Kontrol									
	MS	4 °C'de 24 saat	14	3	23.33	5.00	21.43		2	3.33	14.29
	MS	10 °C'de 24 saat									
	MS	4 °C'de 48 saat	44	14	73.33	23.33	31.82		11	18.33	25.00
	MS	10 °C'de 48 saat	37	13	61.67	21.67	35.14		5	8.33	13.51
	DDVX	Kontrol									
	DDVX	4 °C'de 24 saat	5	3	8.33	5.00	60.00				
	DDVX	10 °C'de 24 saat	68	36	113.33	60.00	52.94		14	23.33	20.59
	DDVX	4 °C'de 48 saat	80	45	133.33	75.00	56.25		17	28.33	21.25
	DDVX	10 °C'de 48 saat	24	16	40.00	26.67	66.67		4	6.67	16.67
	B5	Kontrol									
	B5	4 °C'de 24 saat									
	B5	10 °C'de 24 saat	34	19	56.67	31.67	55.88		12	20.00	35.29
	B5	4 °C'de 48 saat	73	60	121.67	100.00	82.19		22	36.67	30.14
	B5	10 °C'de 48 saat	60	35	100.00	58.33	58.33		13	21.67	21.67

E1: Embriyo sayısı (60 anterden)

B1: Bitkicik sayısı (60 anterden)

E2: Embriyo oluşum oranı (%)

B2: Bitkicik oluşum oranı (%)

B3: Embriyodan bitkicik oluşum oranı (%)

B4: Haploid bitki sayısı

B5: Anterden haploid bitki oluşum oranı (%)

B6: Embriyoitten gelişen haploid bitki oranı (%)

Çizelge 4.5. Yamula genotipinde uygulamalara göre embriyoid, bitkicik ve haploid bitki oluşumu

Genotip	Ortam	Soğuk Uygulaması	E1	B1	E2	B2	B3	B4	B5	B6
Yamula	MS	Kontrol								
	MS	4 °C'de 24 saat	11	4	18,3	6,67	36.36	2	3.33	18.18
	MS	10 °C'de 24 saat	13	5	21.67	8.33	38.46	1	1.67	7.69
	MS	4 °C'de 48 saat	49	30	81.67	50.00	61.22	6	10.00	12.24
	MS	10 °C'de 48 saat	23	11	38.33	18.33	47.83	4	6.67	17.39
	DDVX	Kontrol	3	2	5.00	3.33	66.67			
	DDVX	4 °C'de 24 saat	15	13	25.00	21.67	86.67	3	5.00	20.00
	DDVX	10 °C'de 24 saat	35	28	58.33	46.67	80.00	9	15.00	25.71
	DDVX	4 °C'de 48 saat	110	101	183.33	168.33	91.82	3	53.33	29.09
	DDVX	10 °C'de 48 saat	20	15	33.33	25.00	75.00	2	6.67	20.00
	B5	Kontrol								
	B5	4 °C'de 24 saat	30	14	50.00	23.33	46.67	4	6.67	13.33
	B5	10 °C'de 24 saat	38	24	63.33	40.00	63.16	6	10.00	15.79
	B5	4 °C'de 48 saat	32	14	53.33	23.33	43.75	2	3.33	6.25
B5	10 °C'de 48 saat	8	5	13.33	8.33	62.50				

E1: Embriyo Sayısı (60 anterden)

B1: Bitkicik sayısı (60 anterden)

E2: Embriyo oluşum oranı (%)

B2: Bitkicik oluşum oranı (%)

B3: Embriyodan bitkicik oluşum oranı (%)

B4: Dihaploid Bitki Sayısı

B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)

B6: Embriyoıdden Gelişen Dihaploid Bitki Oranı (%)

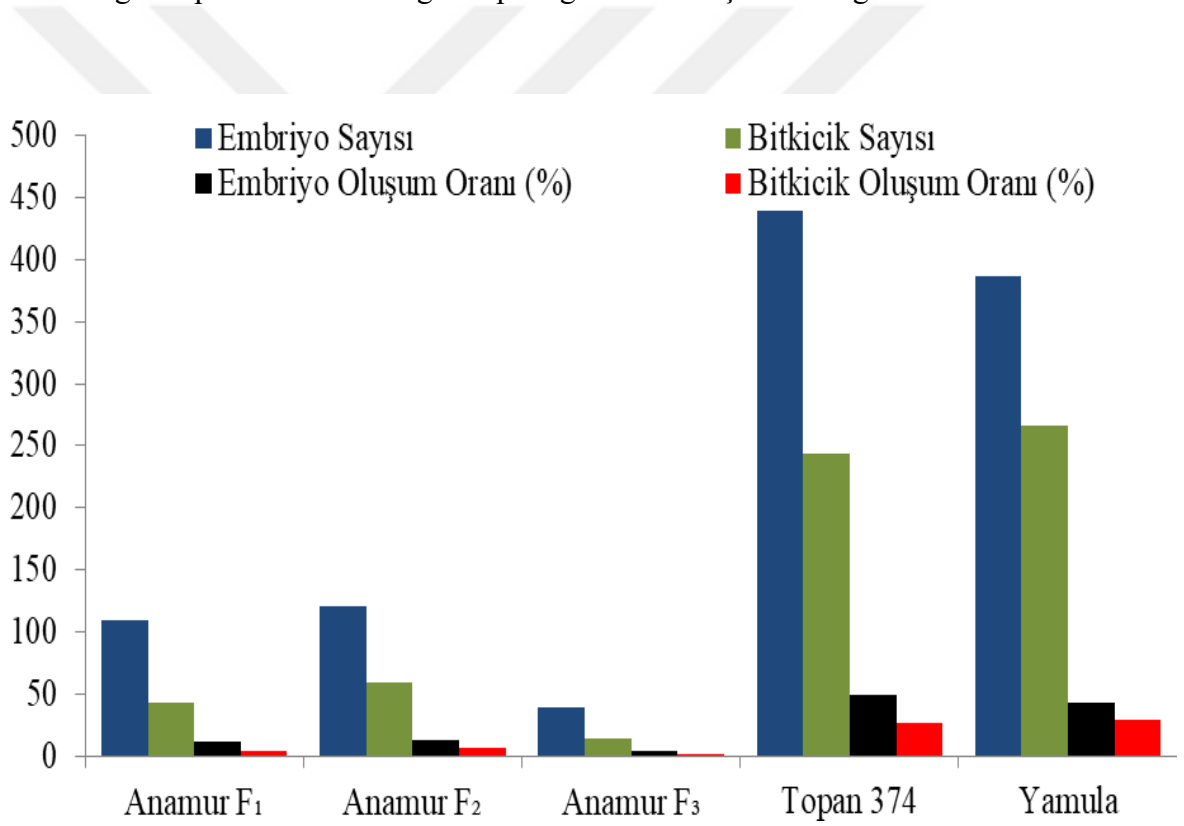
## 4.2. Genotiplere Göre Embriyo, Bitkicik ve Haploid Bitki Oluşumu

Denemede kullanılan 5 patlıcan genotipinin hepsi androgenik yanıt vermiş, ancak genotipler arasında önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Anamur patlıcan çeşidinin F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> generasyonları birbiri ile karşılaştırıldığında F<sub>2</sub> generasyonunun F<sub>1</sub> ve F<sub>3</sub> generasyonuna göre androgenik başarısı daha yüksek çıkmıştır. Topan 374 genotipi en iyi performansı gösteren genotip olurken bunu Yamula genotipi izlemiştir. Anamur genotipinin F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> generasyonlarında elde edilen bitkicik sayıları embriyo sayılarıyla benzerlik göstermiştir. Ancak genotipler arasında en yüksek bitkicik sayısı Yamula genotipinden elde edilmiştir. Yamula genotipini Topan 374 genotipi izlemiştir. Embriyo oluşumunda en iyi genotip Topan 374 olurken bitkicik sayısı bakımından Yamula Topan 374 genotipinden daha başarılı olmuştur. En yüksek haploid bitki oluşumu Topan 374 genotipinden elde edilmiştir (toplamda 100 anter). Embriyoların bitkiye dönüşüm oranı bakımından en başarılı genotip %13,87 ile Anamur F<sub>2</sub> genotipi olurken, ne fazla haploid bitkinin elde edildiği Topan 374 çeşidinde embrioların haploid bitkiye dönüşüm oranı %13,23 olarak gerçekleşmiştir. Bu durum genotiplerin ürettikleri embriyo sayıları ile embriyoların haploid bitkiye dönüşümü bakımından farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Genotiplerin embriyo ve bitkicik oluşumu Çizelge 4.2’de haploid bitki oluşum düzeyleri Çizelge 4.3’de verilmiştir.

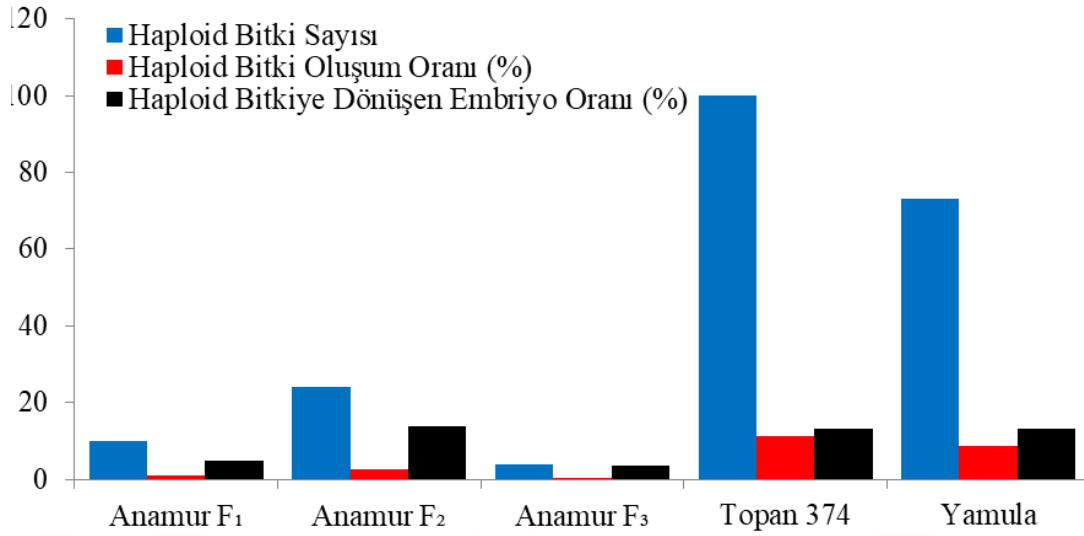
Anter kültürü çalışmalarında haploid bitki elde edilmesinde başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri genotiptir. Değişik bitki türlerinde yürütülen anter kültürü çalışmalarında androgenik başarı genotiplere bağlı olarak çok önemli farklılıklar göstermektedir. Anter kültürü çalışmalarının yoğun olarak yürütüldüğü türlerinden biri olan biberde androgenik başarı üzerine genotipin önemli bir etkisi olduğu değişik araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Rodeva ve ark., 2004; Mityko ve ark., 1995; Qin ve Rotino, 1995; Popova ve ark., 2016; Parra-Vega ve Seguí-Simarro, 2016; Ari ve ark., 2016). Biber dışında solanum türlerinde (Powell ve Uhrig, 1987), mısırdaki (Genovesi ve Collins (1982), tütünde (Smith, 2013; Touraev ve Heberle-Bors, 2003), lahanada (Achar, 2002; Zhang ve ark., 2005; Cardoza, ve Stewart, 2004) ve patatestede (Tai ve Xiong, 2003; Liang ve ark. 2006) anter kültüründe başarının genotipe bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir. Birçok bitki türünde olduğu gibi patlıcanda da anter



kültürü ile ilgili yapılan çalışmalarda başarıyı etkileyen önemli faktörlerden birinin genotip olduğu değişik çalışmalarda ortaya konmuştur (Chambonnet ve Dumas de Vaulx, 1983; Sharma ve Rajam, 1995; Alpsoy ve Şeniz, 2004; Khatun ve ark., 2006; Salas ve ark., 2011). Literatürde belirtilen genotipik farklılıkların etkisi denemede de görülmüştür. Denemede kullanılan genotiplerden Topan çeşidini kullanan Başay ve Ellialtıoğlu (2003), 5 farklı patlıcan genotipiyle ilgili yürüttükleri anter kültürü çalışmalarında embriyo ve bitkicik oluşumu bakımından Topan genotipinin 5 genotip arasında 1. yıl denemelerinde ikinci sırada, 2 yıl denemelerinde ise birinci sırada yer aldığını, Anamur F<sub>1</sub> ve Yamula çeşitlerini kullanan Geboloğlu ve ark. (2017) ise, Yamula genotipinin Anamur F<sub>1</sub> genotipine göre daha başarılı olduğunu belirtmektedir.



Şekil 4.2. Genotiplerin androgenik başarı durumu

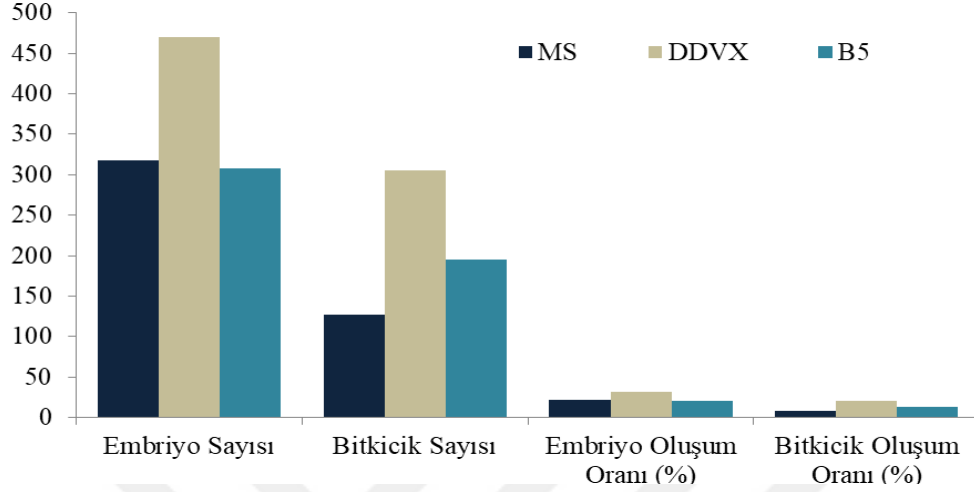


Şekil 4.3. Genotiplerin haploid bitki oluşum oranları

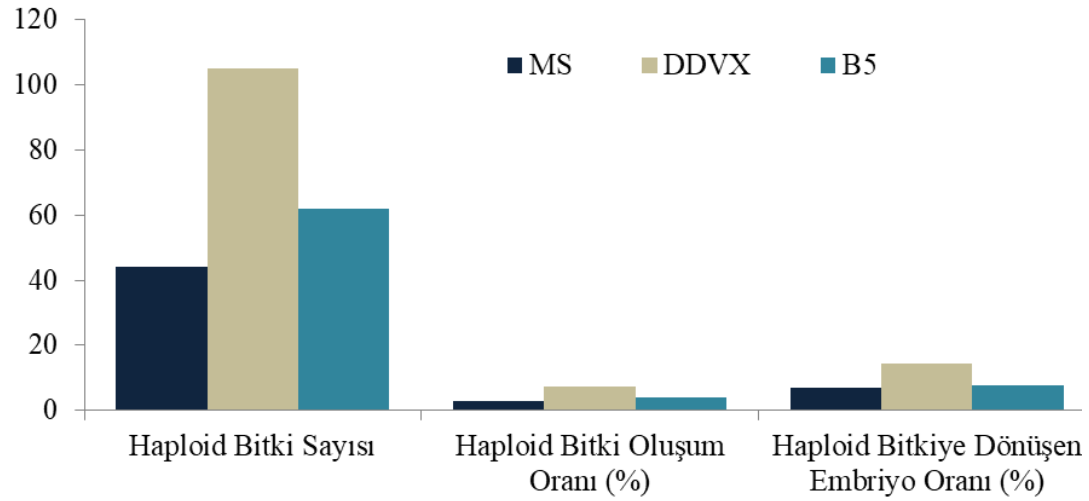
#### 4.3. Besin Ortamlarına Göre Embriyo, Bitkicik ve Haploid Bitki Oluşumu

Genelde Solanacea familyası türlerde özelde ise patlıcanda yürütülen anter kültürü çalışmalarında Dumas de Vaulux (1982) (DDVX) ve Murashige ve Skoog (1962) (MS) tarafından önerilen ortamlar en çok tercih edilen ve günümüze kadar birçok defa modifiye edilerek kullanılmış ortamlardır. Literatürde anterlerden embriyo ve bitkicik rejenerasyonu bakımından DDVX ortamının MS ortamına göre daha iyi sonuç verdiği belirtilmektedir. Denemede bu iki ortama ilave olarak Gamborg (B5) ortamı da denemiştir. Ortamlara göre embriyo oluşum miktarı ve oranlarında önemli farklılıklar oluşmuştur. Toplamda en yüksek embriyo sayısı DDVX ortamından (470 embriyo) elde edilirken, bu ortamı MS ortamı izlemiştir. Embriyolardan gelişen bitkicik sayısı bakımından en iyi sonuç 305 bitkicik ile DDVX ortamından elde edilirken bu ortamı 195 bitkicik ile B5 ve 127 bitkicik ile MS ortamı izlemiştir. En başarılı ortam olan DDVX ortamında embriyo oluşum oranı %31,33, bitkicik oluşum oranı %20,33 olmuştur. Embriyo oluşum oranı bakımından MS ortamı ikinci sırada yer alırken, bitkicik oluşum oranı bakımından DDVX ortamından sonra B5 ortamı ikinci sırada yer almıştır. Ortamlara göre toplam haploid bitki oluşumunda DDVX ortamı % 7,29 başarı oranı ile ilk sırada yer almıştır (105 haploid bitki). Haploid bitki sayısı bakımından B5 ortamı MS ortamına göre daha başarılı olmuştur. Embriyoların haploid bitkiye dönüşüm oranı enyüksek %14,48 ile DDVX ortamı olmuş ve bu ortamı %7,83 ile B5 ve %6,93

ile MS ortamı izlemiştir. Ortamlara göre embriyoid ve bitkicik oluşum oranları (bkz. Şekil 4.4, haploid bitki oluşum oranları Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Besin ortamlarına göre androgenik başarı durumu



Şekil 4.5. Besin ortamlarına göre haploid bitki oluşum durumu

Anter kültürü çalışmalarında besin ortamlarının etkisi genotiplere göre değiştiği gibi türlere göre de değişmektedir. Ayrıca besin ortamlarının içeriklerinde yapılan değişiklikler veya ilaveler de önemli rol oynamaktadır. Anter kültürünün yaygın olarak kullanıldığı türlerden biri olan biberde değişik ortamları deneyen araştırmacılar en etkili ortamların sırasıyla MS ve DDVX ortamları olduğunu belirtmektedirler (Irikova, ve ark., 2011; Irikova ve Rodeva, 2004; Koleva-Gudeva ve ark., 2008; Irikova ve ark., 2011). Patlıcanda yürütülen anter kültürü ve mikrospor kültürü çalışmalarında

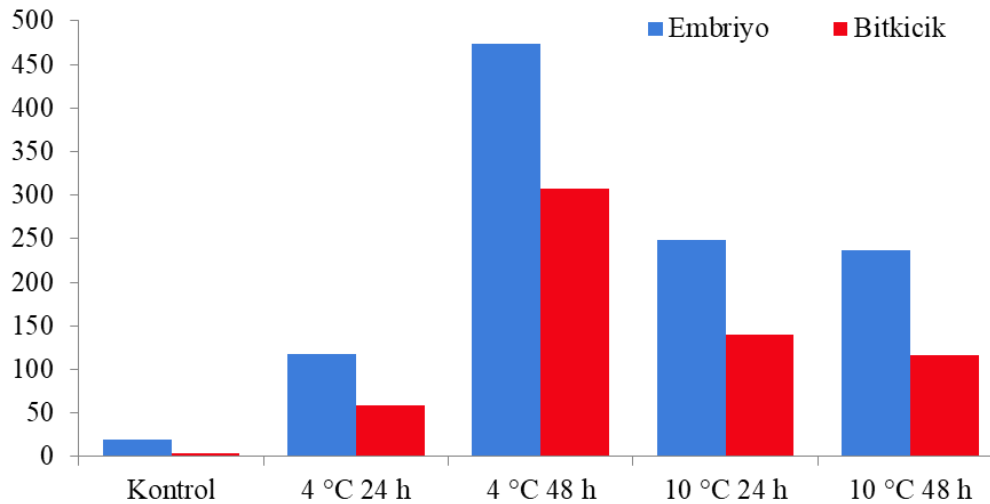
ortamların karşılaştırılmasına yönelik kannat ortaya koyacak bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber patlıcanda yürütülen anter kültürü çalışmalarında ağırlıklı olarak Dumas de Vaultx and Chambonnet (1982) tarafından önerilen protokolün modifiye edilmiş şekli tercih edilmektedir. Patlıcanda anter kültürü çalışmaları yürüten Salas ve ark. (2011 ve 2012), Aşay ve Ellialtıoğlu (2013) ve Rivas-Sendra ve ark. (2013) besin ortamı olarak Dumas de Vaultx and Chambonnet (1982) tarafından önerilen ve denemede DDVX ortamı olarak adlandırılan besin ortamını tercih etmişler ve uygulamalara göre değişmekle beraber başarılı sonuçlar almışlardır. Kumar ve ark. (2003), MS ortamı (Murashige and Skoog medium, 1962) ile GD ortamını (Gresshoff and Doys, 1972) kullandıkları çalışmada androgenik başarı üzerine MS ortamının daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Literatürde en çok tercih edilen DDVX ortamı denemede de en başarılı ortam olmuştur.

#### **4.4. Çiçek Tomurcuklarına Soğuk Şoku Uygulamasının Embriyo, Bitkicik ve Haploid Bitki Oluşumu Üzerine Etkileri**

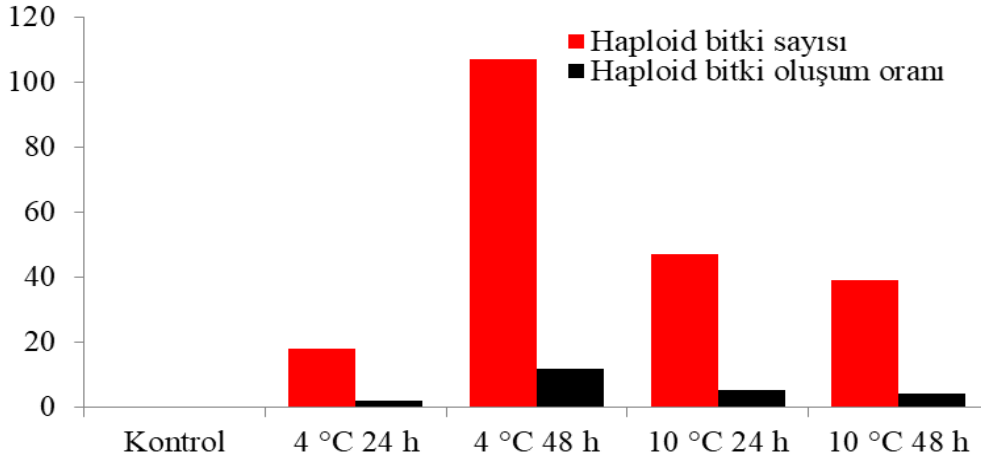
Çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık şoku uygulamasının embriyo oluşumuna önemli bir etkisi olmuştur. Düşük sıcaklık şoku uygulaması androgenik başarıyı artırırken uygulamalara göre de farklar oluşmuştur. En yüksek etki çiçek tomurcuklarının 4°C'de 48 saat bekletildikleri uygulamadan (toplamda 474 embriyo ve 308 bitkicik) elde edilirken, bunu 10°C'de 24 saat uygulaması izlemiştir. Düşük sıcaklık uygulaması haploid bitki oluşumunda da etkisini göstermiş, kontrol uygulamasında haploid bitki elde edilemezken en yüksek oran 4°C sıcaklıkta 48 saat bekletilen uygulamadan elde edilmiştir (107 haploid bitki ve %11,89 embriyodan haploid bitkiye dönüşüm oranı) Düşük sıcaklık uygulamalarının androgenik başarıya etkileri Şekil 4.6'de, haploid bitki oluşumuna etkileri Şekil 4.7'de verilmiştir.

Anter kültürü ve mikrospor kültürü çalışmalarında soğuk şoku uygulamasının mikrospordan haploid bitki gelişmesini artırdığı eskiden beri bilinmektedir (Nitsch ve Norreel, 1974; Duncan ve Heberle 1976; Gaillard ve ark. 1991; Dunwell, 1996). Mikrosporların gametofitik durumdan sporofitik duruma geçebilmeleri için düşük veya yüksek sıcaklık, ozmotik stres veya fizyolojik, yani açlık stresi uygulanabilir

(Maraschin ve ark., 2005; Koleva-Gudeva ve ark., 2008). Duncan and Heberle (1976), soğuk uygulamasının anterlerin kültür aşamasında kararmasına neden olan anter dokularındaki bozulmayı yavaşlattığını ve buna bağlı olarak ta mikrosporların toksik bileşiklerin etkisinden korunduğunu belirtmektedirler. Tütünde soğuk şokunun mikrospordan embriyo gelişimini inceleyen Sunderland and Roberts (1979) 7°C sıcaklığın embriyo gelişimini arttığını belirlemişlerdir. Brüksel lahanasında farklı sıcaklık şoklarının angrogenesis üzerine etkisini inceleyen Krzyżanowska ve Górecka (2008), 35°C sıcak uygulamasının 4°C'ye göre daha etkili olduğunu belirtmektedirler. Patlıcana en yakın türlerden biri olan biberde yapılan çalışmalarda soğuk uygulamasının etkilerinin farklı olduğu belirtilmektedir. Biberde çiçek tomurcuklarına 24-100 saat soğuk uygulamasının androgenik yanıtı artırdığı belirtilirken (Morrison ve ark., 1986; Supena ve ark., (2006), bazı araştırmacılar biberde çiçek tomurcuklarına soğuk uygulamasının önemli bir etkisinin olmadığını vurgulamaktadırlar (Vagera ve Havranek, 1985; Munyon ve ark., 1989; Özkum ve ark., 2001; Kim ve ark., 2005). Özkum and Tipirdamaz (2002) ise, biberde çiçek tomurcuklarına soğuk uygulamasının embriyo gelişimini azalttığını ve eksplantlarda kallus oluşumunun arttığını belirtmektedirler.



Şekil 4.6. Düşük sıcaklık uygulamalarının androgenik başarı üzerine etkileri



Şekil 4.7. Düşük sıcaklık uygulamalarının haploid bitki oluşumuna etkileri

Patlıcanda çiçek tomurcuklarına soğuk uygulamasının androgenesis başarısına etkisi konusunda çok sınırlı çalışma bulunmaktadır. Tipirdamaz ve Ellialtioglu (1998), patlıcanda çiçek tomurcuklarına soğuk uygulamasının androgenik başarıya etkisini incelemişler ve soğuk uygulaması yapılmayan kontrol grubundan embriyo elde ederken, +4°C'de 80 saat ve +9°C'de 9 gün beklettikleri anterlerden embriyo elde edememişlerdir. Bizim çalışmamızda ise bunun tam tersi sonuçlar alınmış, soğuk stresi uygulanmayan anterlerden embriyo gelişmezken, soğuk stresi uygulaması embriyo oluşumunu teşvik etmiştir. Denemede elde edilen sonuçlar ile Tipirdamaz ve Ellialtioglu (1998)'nin sonuçlarının uyuşmamasının nedeni araştırmacıların soğuk uygulamasını denemeye göre çok uzun tutmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir

#### 4.5. Genotip x Besin İnteraksiyonunu Androgenik Başarıya Etkileri

Anter kültürü çalışmalarında uygulamalar arasındaki interaksiyonların da incelenmesi gerekir. Denemede kullanılan genotiplerin besin ortamlarına göre gösterdikleri tepkiler incelenmiştir. Buna göre Anamur F<sub>1</sub> genotipinde en yüksek embriyo sayısı DDVX ortamından elde edilmiştir (300 anterden toplam 61 embriyo). Bunu MS ve B5 ortamları izlemiştir. Bitkicik oluşumunda DDVX ortamı en etkili ortam olurken (300 anterden toplam 23 bitkicik), B5 ortamı ikinci sırada yer almıştır. Haploid bitki oluşumunda ise DDVX ortamı ilk sırada yer almış (300 anterden toplam 7 haploid

bitki), bu ortamı MS ortamı izlemiştir. Anamur F<sub>1</sub> genotipinde B5 ortamında haploid bitki elde edilememiştir.

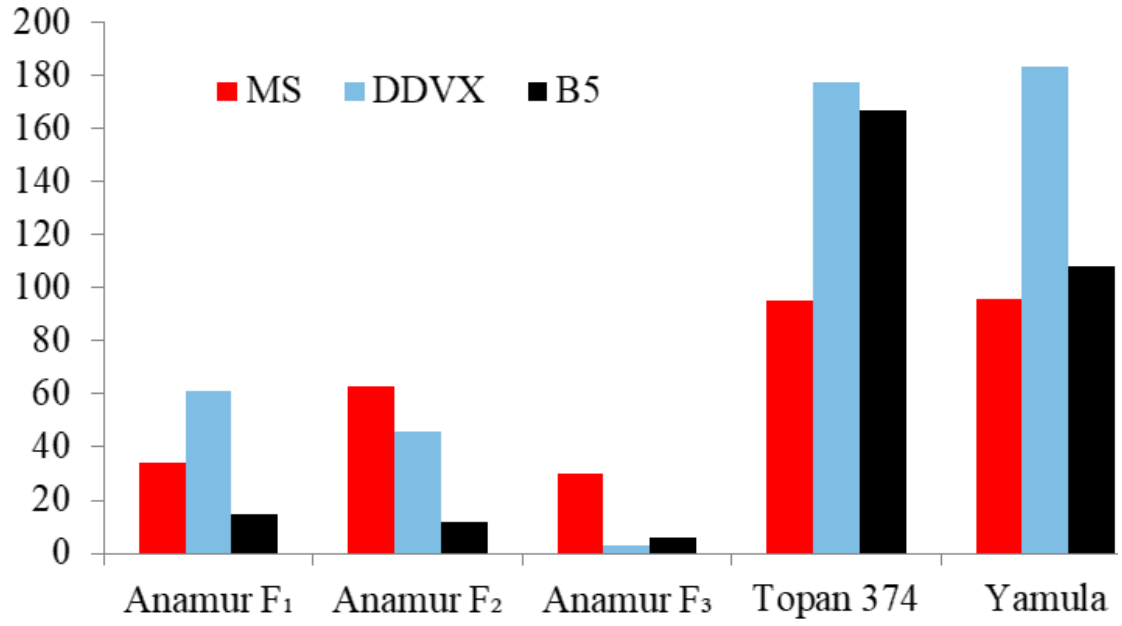
Anamur F<sub>2</sub> genotipinde en yüksek embriyo sayısı MS ortamından elde edilmiştir (300 anterden toplam 63 embriyo). Bunu DDVX ve B5 ortamları izlemiştir. Bitkicik oluşumunda MS ortamı en etkili ortam olurken (300 anterden toplam 31 bitkicik), DDVX ortamı ikinci sırada yer almıştır. Haploid bitki oluşumunda ise DDVX ortamı ilk sırada yer almış (300 anterden toplam 14 haploid bitki), bu ortamı MS ortamı izlemiştir.

Anamur F<sub>3</sub> genotipinde en yüksek embriyo sayısı MS ortamından elde edilmiştir (300 anterden toplam 30 embriyo). Bunu B5 ve DDVX ortamları izlemiştir. Bitkicik oluşumunda MS ortamı en etkili ortam olurken (300 anterden toplam 8 bitkicik), B5 ortamı ikinci sırada yer almıştır. Haploid bitki oluşumunda ise MS ortamı ilk sırada yer almış (300 anterden toplam 3 haploid bitki), bu ortamı DDVX ortamı izlemiştir. Anamur F<sub>3</sub> genotipinde B5 ortamında haploid bitki elde edilememiştir.

Topan 374 genotipinde en yüksek embriyo sayısı DDVX ortamından elde edilmiştir (300 anterden toplam 177 embriyo). Bunu B5 ve DDVX ortamları izlemiştir. Bitkicik oluşumunda B5 ortamı en etkili ortam olurken (300 anterden toplam 114 bitkicik), DDVX ortamı ikinci sırada yer almıştır. Haploid bitki oluşumunda ise B5 ortamı ilk sırada yer almış (300 anterden toplam 47 haploid bitki), bu ortamı DDVX ortamı izlemiştir.

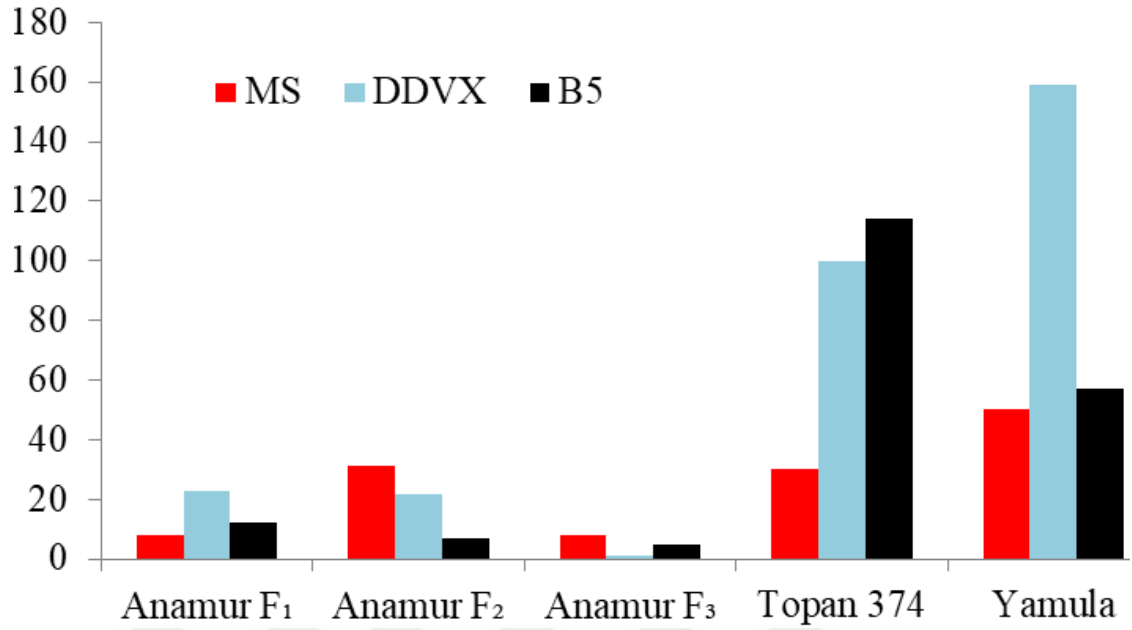
Yamula genotipinde en yüksek embriyo sayısı DDVX ortamından elde edilmiştir (300 anterden toplam 183 embriyo). Bunu B5 ve MS ortamları izlemiştir. Bitkicik oluşumunda DDVX ortamı en etkili ortam olurken (300 anterden toplam 159 bitkicik), B5 ortamı ikinci sırada yer almıştır. Haploid bitki oluşumunda da DDVX ortamı ilk sırada yer almış (300 anterden toplam 80 haploid bitki), bu ortamı B5 ortamı izlemiştir.

Genotiplerin besin ortamlarına göre gösterdikleri androhenik başarılar Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10'de verilmiştir.

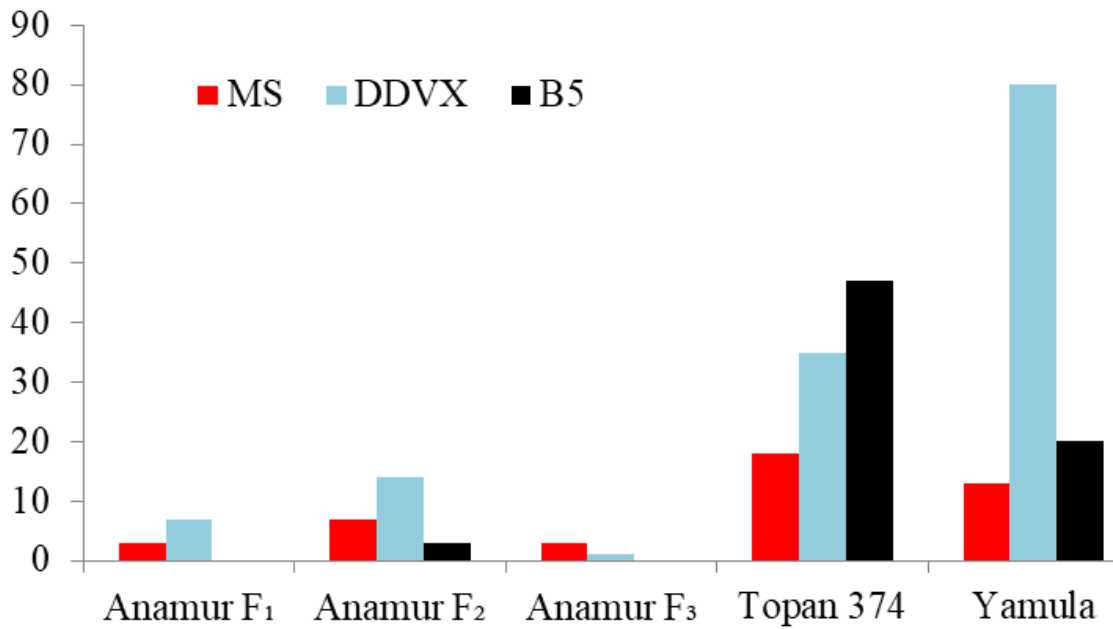


Şekil 4.8. Genotip ve besin ortamlarına göre toplam embriyo sayıları (300 anterden)





Şekil 4.9. Genotip ve besin ortamlarına göre toplam bitkicik sayıları (300 anterden)



Şekil 4.10. Genotip ve besin ortamlarına göre toplam haploid bitki sayıları (300 anterden)

## 5. SONUÇ

Islah çalışmalarında ebeveyn hatların elde edilmesinde önemli katkılar sağlayan anter kültürü son elli yıl içinde önemli mesafeler almıştır. Günümüzde artık biyoteknolojik altyapısını kuran ıslah firmaları anter kültüründen önemli faydalar sağlamaktadırlar. Patlıcan anter kültürüne en kolay tepki veren türlerden biridir. Patlıcanda anter kültürü çalışmalarında halen daha eksik veya yetersiz noktalar bulunmaktadır. Başlangıca göre androgenik başarıda geline nokta çok yüksek olsa da özellikle genotipe göre başarı düzeyinde çok ciddi farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca yapılan androgenik çalışmalarda besin ortamlarının karşılaştırılması, genotip x besin ortamı ve genotip x ön uygulama interaksyonları konusunda yeterli araştırma bulunmamaktadır. Buradan hareketle ele alınan çalışmada değişik patlıcan genotiplerinin farklı besin ortamı ve düşük sıcaklık uygulamalarına verecekleri androgenik tepkiler araştırılmıştır.

Denemede uygulamalara göre farklılıklar olmakla beraber bütün genotiplerden embriyo elde edilmiştir. Anamur F<sub>1</sub> genotipinin F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> generasyonları ile birlikte karşılaştırmasında en iyi sonucu Anamur F<sub>2</sub> genotipi vermiştir. Bununla beraber denemedeki 5 genotip içinde başarı sıralaması Topan 374, Yamula ve Anamur F<sub>2</sub> şeklinde gerçekleşmiştir. Androgenik başarı oranları 60 anterden elde edilen embriyo ve bitkicik sayısı ile ölçülmüş ve en yüksek sonuç alan uygulamada 60 anterden 110 embriyo, 101 bitkicik ve 32 haploid bitki elde edilmiştir (Yamula genotipi DDVX ortamı 4 °C'de 48 saat uygulaması).

Genotip ortam interaksyonuna bakıldığında embriyo sayısı bakımından Anamur F<sub>1</sub> genotipi DDVX ortamında daha başarılı olurken, Anamur F<sub>2</sub> ve Anamur F<sub>3</sub> genotipleri MS ortamında daha başarılı olmuşlardır. Topan 374 ve Yamula genotiplerinde en yüksek embriyo gelişimi DDVX ortamında gerçekleşmiştir. Bu interaksyon bitkicik oluşumunda da benzer çıkmıştır. Denemede her ne kadar DDVX ortamı en başarılı ortam olarak belirlense de özellikle androgenik yanıtın düşük olduğu Anamur generasyonlarına ait genotiplerde androgenik başarı ortamlara göre farklılık göstermiştir.

Haploid bitki sayısı bakımından genotiplerin ortamlara göre gösterdikleri tepkiler de farklı olmuştur. Anamur F<sub>1</sub> ve Anamur F<sub>2</sub> genotiplerinde en yüksek haploid bitki DDVX ortamından elde edilirken, Anamur F<sub>3</sub> genotipinde MS ortamından elde edilmiştir. Topan 374 genotipinde ise en yüksek haploid bitki sayısı B5 ortamından elde edilmiştir. Yamula genotipinde ise haploid bitki oluşumu bakımından en iyi sonucu DDVX ortamı vermiştir.

Çalışmada kullanılan üç farklı ortamdaki embriyo, bitkicik ve haploid bitki elde edilmiştir. Ancak başarı düzeyi uygulamalara göre farklılıklar göstermiştir. Embriyo oluşumu bakımından ortamlar sıralandığında en iyi ortam DDVX ortamı olurken, bu ortamı MS ve B5 ortamları izlemiştir. Denemede MS ve B5 ortamlarının birbirine çok yakın olmaları dikkat çekmektedir. DDVX ortamı embriyo oluşumunda olduğu gibi bitkicik ve haploid bitki oluşumunda da en etkili ortam olmuştur. Ancak, embriyo oluşumunda MS ortamı en başarılı ikinci ortam olurken bitkicik ve haploid bitki oluşumunda B5 ortamı MS ortamından daha başarılı sonuç vermiştir.

Denemede anter kültüründe en etkili uygulamalardan biri de çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulaması olmuştur. Çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulanmayan kontrol grubunda androgenik başarı sifira yakın çıkarken, sıcaklık düzeyi ve uygulama süresine göre farklılıklar olmakla beraber düşük sıcaklık uygulaması androgenik başarıyı artırmıştır. Embriyo ve bitkicik oluşumu bakımından 4°C'de 48 saat bekletilen tomurcuklar en iyi sonucu verirken, bunu 10 °C'de 24 saat ve 10 °C'de 48 saat bekletilen tomurcuk uygulamaları izlemiştir.

Çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulaması embriyo oluşumuna etki ettiği gibi haploid bitki oluşumuna da etkili olmuştur. Denemede haploid bitki oluşumu en yüksek 4°C 'de 48 saat bekletilen tomurcuk uygulamalarından elde edilirken, bu uygulamayı 10°C 'de 24 saat ve 10°'de 48 saat bekletilen tomurcuk uygulamaları izlemiştir. Haploid bitki oluşumu bakımından 4°C'de 24 saat tomurcuk bekletilmesi uygulamalar arasında en düşük değeri verirken, çiçek tomurcuklarına ön uygulama yapılmayan kontrol uygulaması en düşük uygulama olmuştur.

Sonuç olarak patlıcanda değişik genotipler üzerinde farklı besin ortamları ve ön stres uygulamasının anter kültüründe başarı üzerine etkisinin incelendiği çalışmada genotiplere, besin ortamlarına ve ön uygulamalara bağlı olarak androgenik yanıtlarda farklılıklar olmuştur. Deneme sonuçları literatürde bugüne kadar yürütölen patlıcanda anter kültürü çalışmaları ile karşılaştırıldığında embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu bakımından bazı uygulamaların literatüre göre daha başarılı olduğu, bazı uygulamaların ise literatürde belirtilen başarı oranlarının altında kaldığı görölmektedir. Anter kültüründe başarı üzerine birçok faktörün tek başına veya interaksiyonlar şeklinde etkisinin olduğu düşünöldüğünde denemede elde edilen sonuçlar normal, hatta başarılı bulunmuştur. Çalışmada elde edilen embriyo ve bitki sayılarının yanında haploid bitki sayısının düşük olması dikkat çekmektedir. Bu durum embriyoların bitkiye dönüşümünde yaşanan zorluklardan kaynaklanmıştır. Literatürde de anter kültürü çalışmalarında embriyoların bitkiye dönüşümünde zorlukların olduğu sürekli olarak tartışılmaktadır. Embriyoların bitkiye dönüşümünde başarı oranının artırılmasına yönelik yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abak, K., 1983. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Etme Üzerinde Araştırma. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı, 33.
- Achar, P. N., 2002. A Study of Factors Affecting Embryo Yields From Anther Culture of Cabbage. *Plant cell, tissue and organ culture*, 69(2), 183-188.
- Akgün, İ., Tosun, M. ve Sağsöz, S., 1996. Biyoteknoloji ve Bitki Islahındaki Kullanım Alanları/Biotechnology and its Application in Plant Breeding. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 27.2.
- Alpsoy, H.C., 1999. Bazı Patlıcan Genotiplerinde In Vitro Androgenesis ve Haploid Bitki Elde Edilmesi Üzerinde Araştırmalar. PhD, Uludağ University Institute of Science, Bursa, Turkey.
- Alpsoy, H. C., ve Şeniz, V., 2004. Researches on the In Vitro Androgenesis and Obtaining Haploid Plants in Some Eggplant Genotypes. In *III Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes 729* (pp. 137-141).
- Ari, E., Bedir, H., Yildirim, S ve Yildirim, T. 2016. Androgenic Responses of 64 Ornamental Pepper (*Capsicum annuum* L.) Genotypes to Shed-Microspore Culture in the Autumn Season. *Turkish Journal of Biology*, 40(3), 706-717.
- Bajaj, Y. P. S., 1983. In Vitro Production of Haploids. In: Evans D. A., Sharp W. R., Ammirato P. V., Yamada Y. (Eds). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publ. Co. Vol. 1 Chapter 6: pg. 228-287.
- Başay, S ve Ellialtıoğlu, Ş. Ş., 2013. Effect of Genotypical Factors on the Effectiveness of Anther Culture in Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Turkish Journal of Biology*, 37(4), 499-505.
- Belogradova, K., Lewicka, I., Heberle-Bors, E ve Touraev, A., 2009. An Overview on Tobacco Doubled Haploids. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (pp. 75-85). Springer, Dordrecht.
- Bourgin, J. P. ve Nitsch, J. P., 1967. Obtention de Nicotiana haploides a partir d'etamines cultivees in vitro. *Ann.Pysiol. Veget.* 9:377-382.
- Cardoza, V. ve Stewart Jr, C. N., 2004. Brassica biotechnology: progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40(6), 542-551.

- Chambonnet, D. ve Dumas de Vault, R., 1983. A New Anther Culture Medium Performant on Various Eggplant (*Solanum melongena L.*) Genotypes. In *Meeting Of The Capsicum And Eggplant Working Group* (Vol. 5, pp. 38-41).
- Chambonnet, D., 1985. Culture D'antheres in vitro chez trois Solanaceae Maraicheres: le Piment (*Capsicum annuum L.*), l'aubergine (*Solanum melongena L.*), la Tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*) et Obtention de Plantes Haploides. These (Doktorat), Academie de Montpellier, 90 p.
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D. ve Pochard, E., 1981. In Vitro Anther Culture in Red Pepper (*Capsicum annuum L.*): Improvement of the Rate of Plant Production in Different Genotypes by Treatments at 35 C. *Agronomie* 1,859–864.
- Dumas de Vault, R. ve Chambonnet, D., 1982. Culture In Vitro D'antheres D'aubergine (*Solanum melongena L.*) Stimulation de la Production de Plantes au Moyen de Traitements à+ 35 C Associés à de Faibles Teneurs en Substances de Croissance. *Agronomie* 2, 983-988.
- Duncan, E.J. ve Heberle, E., 1976. Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma* 90:173–177.
- Dunwell, J. M., 1996. Microspore cultures. In: Mohan Jain S, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro haploid production in higher plants*, vol 1. Kluwer, Dordrecht, pp 205–216.
- Elçi, Ş., 1982. Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. Fırat Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Yayınları, Biyoloji:3, Elazığ, 165s,
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K., 2000. Haploid Bitki Üretimi, Bitki Biyoteknolojisi – Doku Kültürü ve Uygulamaları, Cilt:I, (Ed: Babaoğlu, M., Özcan , S., Gürel, E.), Selçuk Üniversitesi Basımevi, s:137-189.
- Ellialtıoğlu, Ş. Sarı, N. ve Abak, K. 2001. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S. Bitki Biyoteknolojisi I - Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi. Haploid Bitki Üretimi.
- Ellialtıoğlu, Ş., Başay, S. ve Kuşvuran, Ş. 2012. Patlıcanda Polen Dimorfizmi ve Anter Kültürü İlişkinin İncelenmesi. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, (1), 149-152.

- Ercan, N., Sensoy, F. A. ve Sensoy, A. S., 2006. Influence of Growing Season and Donor Plant age on Anther Culture Response of Some Pepper Cultivars (*Capsicum annuum L.*). *Scientia Horticulturae*, 110(1), 16-20.
- Gaillard, A., Vergne, P. ve Beckert, M., 1991. Optimization of maize isolation and conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Rep* 10,55–58.
- Gamborg, O. L., Miller, R. ve Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158.
- Geboloğlu, N., Boncukçu, S. D., Durna, P. ve Bayram, M. 2017. Patlıcanda Şeker, Bal ve Büyüme Düzenleyicilerin Anter Kültüründe Embrioid Oluşumuna Etkisi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 6, 275-280.
- Genovesi, A. D. ve Collins, G. B., 1982. In Vitro Production of Haploid Plants of Corn via Anther Culture 1. *Crop Science*, 22(6), 1137-1144.
- George, E. F. ve Sherrington, P. D., 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Eastern Pres, Reading, Berks, 314-324.
- Gresshoff, P. M. ve Doys, C. H., 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato) *Planta* 107, 161-170.
- Guha, S. ve Maheshwari, S.C., 1966. Cell Division and Differentiation of Embryos in the Pollen Grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212, 97
- Irikova, T. ve Rodeva, V., 2004. Anther Culture of Pepper (*Capsicum annuum L.*) the Effect of Nutrient Media. *Capsicum Eggplant Newsl*, 23, 101-104.
- Irikova, T., Grozeva, S., Popov, P., Rodeva, V. ve Todorovska, E., 2011. In Vitro Response of Pepper Anther Culture (*Capsicumannuum L.*) Depending on Genotype, Nutrient Medium and Duration of Cultivation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 25(4), 2604-2609.
- Irikova, T., Grozeva, S. ve Rodeva, V., 2012. Anther Culture in Pepper (*Capsicum annuum L.*) İn Vitro. *Acta physiologiae plantarum*, 33(5), 1559-1570.
- Isouard, G., Raquin, C. ve Demarly, Y., 1979. Obention de Plantes Haploids et Diploids par Culture İn Vitro d'aubergine (*Solanum melongena L.*). *CR Acad. Sci. Ser. D* 288, 987-989.

- Jacobsen, E. ve Sopory, S. K., 1978. The Influence and Possible Recombination of Genotypes on the Production of Microspore Embryoids in Anther Cultures of *Solanum Tuberosum* and Dihaploid Hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 52(3), 119-123.
- Karakullukçu, Ş., 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde in Vitro Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi, Ankara, 131s.
- Karakullukçu, Ş. ve Abak, K., 1992. Bazı Patlıcan Çeşitlerinin Anter Kültürüne Tepkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı, Cilt:42, Fas.:1-2-3-4, s:7-12.
- Karakullukçu, Ş. ve Abak, K., 1993. Patlıcanda Anter Kültürü Üzerinde Araştırmalar: I. Elverişli Tomurcuk Gelişim Döneminin Belirlenmesi. *Turk J Agric For*, 17, 801-810.
- Khatun, F., Meah, M. B. ve Nasiruddin, K. M., 2006. Regeneration of eggplant through anther culture. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 1, 48–53.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D-I. ve Lee, K-M., 2004. Origin of Multicellular Pollen and Pollen Embryos in Cultured Anthers of Pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 77, 63-72.
- Koleva-Gudeva, L., Trajkova, F., Dimeska, G. ve Spasenoski, M., 2008. September). Androgenesis efficiency in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). In *IV Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes 830* (pp. 183-190).
- Koleva-Gudeva, L., Trajkova, F., Dimeska, G. ve Spasenoski, M., 2008. Androgenesis efficiency in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). In *IV Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes 830* (pp. 183-190).
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S. ve Ochoa-Alejo, N., 2010. Chilli peppers—a Review on Tissue Culture and Transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28(1), 35-48.
- Kristiansen, K. ve Andersen, S. B., 1993. Effects of Donor Plant Temperature, Photoperiod, and age on Anther Culture Response of *Capsicum Annuum* L. *Euphytica*, 67(1-2), 105-109.



- Krzyżanowska, D. ve Górecka, K., 2008. Effect of various stress factors on the induction of androgenesis in anther cultures of brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*). *Vegetable Crops Research Bulletin*, 69, 5-13.
- Kumar, S., Singh, M., Prabhavathi, K., Mathews, A., Kumar, S., Singh, M. ve Mathews, A., 2003. In vitro Induction of Haploid in Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 22, 147-150.
- Liang, Y., Di, H., Lu, C., Chen, Y., Shi, Y. ve Wang, Z., 2006. Effects of Several Factors on the Anther Culture of Potato [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 5, 005.
- Lichter, R., 1982. Induction of Haploid Plants From Isolated Pollen of *Brassica Napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 105(5), 427-434.
- Linsmaier, E. M. ve Skoog, F., 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18,100±127.
- Maraschin, S. F., de Priester, W., Spaink, H. P. ve Wang, M., 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J Exp Bot* 56, 1711–1726.
- Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G. ve Fári, M., 1995. Anther-Culture Response in Different Genotypes and F<sub>1</sub> Hybrids of Pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Breeding*, 114(1), 78-80.
- Miyoshi, K., 1996. Callus Induction and Plantlet Formation Through Culture of Isolated Microspores of Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports*, 15(6), 391-395.
- Morrison, R. A., Koning, R. E. ve Evans, D. A., 1986. Anther Culture of an Interspecific Hybrid of *Capsicum*. *Journal of plant physiology*, 126(1), 1-9.
- Munyon, I. P., Hübstenberger, JF. ve Phillips, GC., 1989. Origin of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 25. 3,293-296.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, 15,473-497.
- Nitsch, J. P.ve Nitsch, C., 1969. Haploids Plants From Pgrains. *Science* 163,8587
- Nitsch, C. ve Norreel, B., 1974. La culture de pollen isol'e sur milieu synth'etique. *CR Acad Sci (Paris) Ser D* 278,1031–1034.

- Ochoa-Alejo, N. ve Ramirez-Malagon, R., 2001. In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 701-729.
- Özkum, D. ve Tıprıdamaz, R., 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turkish Journal of Biology* 26,131–139.
- Parra-Vega, V. ve Seguí-Simarro, J. M., 2016. Anther Culture in Pepper (*Capsicum annuum* L.). In *In vitro Embryogenesis in Higher Plants* (pp. 467-474). Humana Press, New York, NY.
- Pierik, R. L. M., 1989. In vitro Culture of Higher Plants. Marthinus Nijhoff Publ. Dordrecht, Boston, Lancaster, 344pp.
- Popova, T., Grozeva, S., Todorova, V., Stankova, G., Anachkov, N. ve Rodeva, V., 2016. Effects of Low Temperature, Genotype and Culture Media on in Vitro Androgenic Answer of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta physiologiae plantarum*, 38(11), 273.
- Powell, W. ve Uhrig, H., 1987. Anther Culture of Solanum Genotypes. *Plant cell, tissue and organ culture*, 11(1), 13-24.
- Qin, X. ve Rotino, G.L., 1995. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. *Acta Hort.* 402, 313-316
- Raina S. K. ve Iyer, R. D., 1973. Differentiation of Diploid Plants From Pollen Callus in Anther Cultures of Solanum Melongena L. *Z Pflanzenzucht* 70, 275–280.
- Raina, S. K. ve Iyer, R. D., 1973. Differentiation of Diploid Plants From Pollen Callus in Anther Cultures of Solanum Melongena L. *Z Pflanzenzucht*.
- Rivas-Sendra, A., Corral-Martinez, P., Salas, P. ve Segui-Simarro, J. M., 2013. Influence of the stage for anther excision in embryogenesis induction from eggplant anther cultures and isolated microspore cultures. *Breakthroughs in the Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*, 545.
- Rizza, F., Barchiesi, F., Mennella, G., Tacconi, M. G., Collonnier, C., Sihachakr, D. ve Rotino, G. L., 2001. Production and Characterization of Dihaploid Plants From Somatic Hybrids Between Eggplant and Solanum Aethiopicum gr Gilo. In *Proceedings of the 11th Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant* (pp. 117-120).

- Rizza, F., Mennella, G., Collonnier, C., Sihachakr, D., Kashyap, V., Rajam, M. ve Rotino, G. 2002. Androgenic Dihaploids From Somatic Hybrids Between *Solanum Melongena* and *S. Aethiopicum* Group Gilo as a Source of Resistance to *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Melongenae*. *Plant cell reports*, 20(11), 1022-1032.
- Rodeva, V. N., Irikova, T. P. ve Todorova, V. J., 2004. Anther Culture of Pepper (*Capsicum annum* L.): Comparative Study on Effect of the Genotype. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 18(3), 34-38.
- Rotino, G. L., Falavigna, A. ve Restaino, F., 1987. Production of Anther-Derived Plantlets of Eggplant. *Capsicum Newsletter*, 6, 89-90
- Rotino, G. L. ve Gleddie, S., 1990. Transformation of Eggplant (*Solanum Melongena* L.) Using a Binary *Agrobacterium Tumefaciens* vector. *Plant Cell Reports*, 9(1), 26-29.
- Rotino, G. L., Schiavi, M., Vicini, E. ve Falavigna, A., 1991. Variation Among Androgenic and Embryogenic Lines of Eggplant (*Solanum Melongena* L.). *J. Genet. Breeding* 45,141-146.
- Rotino, G. L., 1996. Haploidy in Eggplant. In *In Vitro Haploid Production in Higher Plants* (pp. 115-141). Springer, Dordrecht.
- Rotino, G. L., 2016. Anther Culture in Eggplant (*Solanum melongena* L.). In *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants* (pp. 453-466). Humana Press, New York, NY.
- Rotino, G. L., Mennella, G., Fusari, F., Vitelli, G., Tacconi, M. G., D'alessandro, A. ve Acciarri, N., 2001. Towards Introgression of Resistance to *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Melongenae* From *Solanum Integrifolium* Into Eggplant. *Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Antalya, Turkey. XI*, 303-307.
- Salas, P., Prohens, J. ve Seguí-Simarro, J. M., 2011. Evaluation of Androgenic Competence Through Anther Culture in Common Eggplant and Related Species. *Euphytica*, 182(2), 261.
- Salas, P., Rivas-Sendra, A., Prohens, J. ve Seguí-Simarro, J. M., 2012. Influence of the Stage for Anther Excision and Heterostyly in Embryogenesis Induction From Eggplant Anther Cultures. *Euphytica*, 184(2), 235-250.

- Sharma, P. ve Rajam, M. V., 1995. Genotype, Explant and Position Effects on Organogenesis and Somatic Embryogenesis in Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Experimental Botany*, 46(1), 135-141.
- Sibi, M., Dumas de Vaulx, R. ve Chambonnet, D., 1979. Obtention de plantes haploides par androgenese in vitro chez le piment (*Capsium annuum* L.). *Ann.Amelior.Plant.* 29(5), 583-606.
- Smith, R. H., 2013. Plant tissue culture: techniques and experiments. Academic Press.
- Spory SK, Jakobson E ve Wenzel G., 1978. Production of monoploids embryoids and Plantles in Cultured Anthers of Solanum Tuberosum, *Plant. Sci. Lett.* 12,47-54
- Supena, E. D., Suharsono, S., Jacobsen, E. ve Custers, J. B, 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep* 25,1–10.
- Tai, G. C. C. ve Xiong, X. Y. (2003). Haploid Production of Potatoes by Anther Culture. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 229-234). Springer, Dordrecht.
- Terzioğlu, Ş., Ellialtıoğlu, Ş. ve Abak, K., 2000. İnkübasyon Koşullarının Biber Anter Kültüründe Embriyo Oluşumu Üzerine Etkisi. III. *Sebze Tarımı Sempozyumu*, 11-13 Eylül 2000, Isparta, Süleyman Demirel Üniversitesi.
- Tipirdamaz, R. ve Ellialtıoğlu, Ş., 1998. The Effects of Cold Treatments and Activated Charcoal on Aba Contents of Anthers and in Vitro Androgenesis in Eggplant (*Solanum Melongena* L.). In *Progress in Botanical Research* (pp. 607-610). Springer, Dordrecht.
- Touraev, A. ve Heberle-Bors, E., 2003. Anther and Microspore Culture in Tobacco. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants*(pp.223-228). Springer, Dordrecht.
- Tuberosa, R., Sanguinetti, M.C. ve Conti, S., 1987. Anther Culture of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Lines and Hybrids, *Genetica Agraria* 41, 267-274.
- Uhrig, H. ve Salamini, F., 1987. Dihaploid Plant Production from 4×-Genotypes of Potato by the Use of Efficient Anther Plants Producing Tetraploid Strains (4× EAPP-Clones) Proposal of a Breeding Methodology. *Plant Breeding*, 98(3), 228-235.

- Vagera, J. ve Havranek, P., 1985. In vitro induction of androgenesis in *Capsicum annuum* L. and its genetic aspects. *Biologia plantarum*, 27(1), 10-21.
- Waara, S., 1996. The Potentials of Using Dihaploid/Diploid Genotypes in Breeding Potato by Somatic Hybridization. In *In Vitro Haploid Production in Higher Plants* pp. 321-338. Springer, Dordrecht.
- Zhang, E., Ou, C., Xu, Z. ve Cheng, Y., 2005. Factors affecting embryoid induction and formation of cabbage anthers in culture. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26(11), 2372-2377.



## 7. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Ezgi GÜR SOY
Doğum Tarihi ve Yeri	12.07.1992 – Ankara
E-posta	ezgigursoy92@gmail.com

### Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Tokat Gaziosmanpaşa Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü	2016
Lise	Konyaaltı Lisesi/ Antalya	2010