

T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

84830

**BAZI PATLİCAN GENOTİPLERİNDE *IN VITRO*
ANDROGENESİS VE HAPLOİD BİTKİ ELDE
EDİLMESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

HÜSEYİN CAN ALPSOY
ZİR. YÜK. MÜH.

TC. YÜK. MÜHÜRÜ
DOKTORA TEZİ

DOKTORA TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA - 1999

84830

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

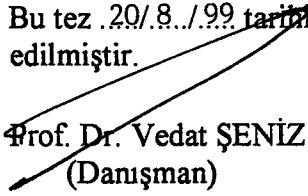
**BAZI PATLICAN GENOTİPLERİNDE *IN VITRO*
ANDROGENESİS VE HAPLOİD BİTKİ ELDE
EDİLMESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**


HÜSEYİN CAN ALPSOY
ZİR. YÜK. MÜH.

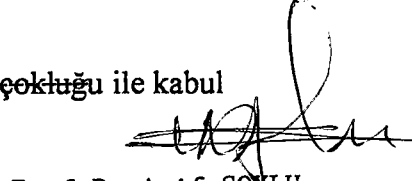
DOKTORA TEZİ

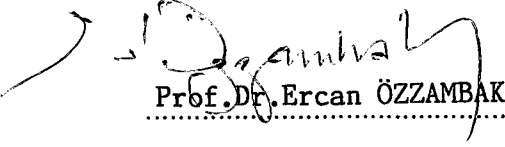
BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

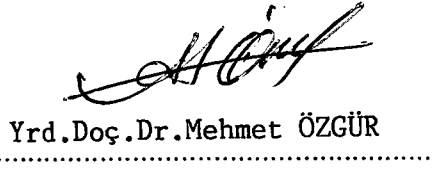
Bu tez .20/8../99 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği /oy çokluğu ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Vedat ŞENİZ
(Danışman)


Prof. Dr. Hüseyin VURAL


Prof. Dr. Arif SOYLU


Prof. Dr. Ercan ÖZZAMBAK


Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZGÜR

ÖNSÖZ

Patlıcan (*Solanum melongena* L.), ülkemiz sebze yetiştiriciliğinde önemli yere sahip olan bir sebze türüdür. 1997 yılı rakamlarına göre yıllık patlıcan üretimimiz 850.000 ton olup, üretim miktarı itibarıyla ülkemiz sebze yetiştiriciliğinde domates, karpuz, kavun ve hıyardan sonra beşinci sırada gelmektedir. Halkımız tarafından sevilerek tüketilen ve çok çeşitli şekillerde değerlendirilebilen patlıcanın üretimi yıldan yıla artmaktadır. 1984 yılında 670.000 ton olan üretimimiz, 13 yıl içinde 180.000 ton artış göstererek 850.000 ton'a ulaşmıştır (Anonymous 1997).

Son yıllarda, özellikle sera patlıcan yetiştiriciliğinde F₁ hibrit çeşit kullanımı yaygınlık kazanmıştır. Açıkta yetiştiricilikte hibrit çeşitler kısmen kullanılmakla birlikte, Pala ve Kemer gibi yerli genotiplerimizden de çiftçimizin memnun olduğu görülmektedir. Yerli çeşitlerimize hastalıklara dayanıklılık, düşük sıcaklıkta meyve tutabilme vb. gibi istenen özelliklerin kazandırılması ya da bu özellikleri taşıyan yeni çeşitlerin ıslah edilerek, F₁ hibrit tohumu için dış ülkelere ödenen büyük miktarlardaki dövizin ülkemizde kalması amacıyla, ıslah çalışmalarının hızla devreye sokulması gerekmektedir.

Islah çalışmalarında bazı biyoteknolojik yöntemlerin yeni çeşit geliştirilmesi amacıyla kullanılması birçok yönden avantaj sağlamaktadır. Bu yöntemlerden biri de anter kültürü olup, normalde 10 yıldan fazla süren ıslah çalışmalarını birkaç yıla indirerek, hem zamandan hem de işgücünden önemli kazanç sağlamakta, böylece daha kısa zamanda daha çok sayıda çeşit geliştirilmesine olanak vermektedir.

Bu amaçla yaptığımız çalışmada, patlıcanda anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesini yükseltmek için değişik faktörlerin etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Ülkemizin ilerlemesine ve teknolojinin tarım alanında kullanılmasına katkı sağlayacağına inandığım bu konuda bana tez hazırlama olanağı veren, denemelerimi ve yazım aşamasını rahat bir şekilde yürütebilmem için gereken her türlü kolaylığı

gösteren ve çalışma sırasında karşılaştığım tüm sorunların çözümünde yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Vedat Şeniz'e içtenlikle teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Tezimin fotoğraflarının çekilmesinde yardımcı olan U.Ü. Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç Dr. Nesrin Özfiliz'e, U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlilerine, çalışmalarım da zaman zaman yardımlarını gördüğüm fakültemiz Tarla Bitkileri Bölümü Araştırma Görevlilerine de teşekkürlerimi sunarım.

Deneme sonucunda elde ettiğim bitkiciklerin geliştirilip değerlendirilmesinde iklim odası ve sera ünitelerinden yararlandığım Beta Ziraat A.Ş. Yenışehir İşletmesi personeline de içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışmayı gerçekleştirdiğim Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Elemanlarına ve çalışmanın bir kısmında olanaklarından yararlandığım Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nün Öğretim Elemanları ile laboratuvar personeline teşekkür etmeyi de bir vazife sayarım.

Temmuz 1999

Hüseyin Can ALPSOY

ÖZ

BAZI PATLICAN GENOTİPLERİNDE *IN VITRO* ANDROGENESİS VE HAPLOİD BİTKİ ELDE EDİLMESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Patlıcanda haploid bitki eldesinde anter kültürünün kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, *Solanum melongena* L. türüne ait Pala, Kemer, Topan, Aydın Siyahı, Adana ve Manisa yerli çeşitleri; Urfa Yerlisi popülasyonu; Munica, Baluroi, Mileda, Ancha, Leila, Barbentane, Bellissima ve Purpurea F₁ hibrid çeşitlerinden oluşan toplam 15 patlıcan genotipi kullanılmıştır.

1994 yılında yapılan ön denemelerde, hiçbir genotipte haploid embriyo veya bitki elde etmek mümkün olmamış, yalnızca değişen oranlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Genel kallus oluşum oranı %30.00 olmuştur.

1995 yılındaki denemelerde, yine haploid embriyo veya bitki elde edilememiş yalnızca kallus elde edilebilmiştir. Elde edilen kallus oranı Pala, Kemer, Topan ve Aydın Siyahı çeşitlerinde sırasıyla %15.12, 20.0, 24.0 ve 26.42 olmuştur.

1996 yılında yapılan denemelerde ise Kemer çeşidinde C ortamında %3.67, MS ortamında %2.05 oranında, Urfa Yerlisi çeşidinde ise C ortamında %4.91, MS ortamında %1.84 oranında haploid embriyo elde edilmiştir.

1998 yılında yapılan denemelerde de, anterlerden embriyoid elde etmek mümkün olmuş, embriyoid oluşum oranları, Adana çeşidinde MS ortamında %1.58; Barbentane çeşidinde C ortamında %2.72, MS ortamında %2.63; Leila çeşidinde C ortamında %2.43 şeklinde gerçekleşmiştir.

Patlıcanda, anterden haploid bitki eldesi için 5 mg/l 2,4-D ve 5 mg/l kinetin ilave edilmiş olan C ortamı ile, 4 mg/l NAA ve 1 mg/l kinetin ilave edilmiş olan MS ortamı uygun ortamlar olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Patlıcan, *Solanum melongena* L., *in vitro* androgenesis, anter kültürü, haploid bitki.

ABSTRACT

RESEARCHES ON THE *IN VITRO* ANDROGENESIS AND OBTAINING HAPLOID PLANTS IN SOME EGGPLANT GENOTYPES

This study was carried out with the aim of determining the usability of anther culture in obtaining haploid plants in eggplant (*Solanum melongena* L.), using the domestic cultivars Pala, Kemer, Topan, Aydın Siyahı, Adana and Manisa the domestic population Urfa Yerlisi; and the F₁ hybrid cultivars Munica, Baluroi, Mileda, Ancha, Leila, Barbentane, Bellisima and Purpurea.

In the preliminary trials in 1994, haploid embryos and plants could not be obtained in anyone of the genotypes, but only calli at different rates were obtained. The overall callus formation rate was 30.00%.

In the trials in 1995, no haploid plants or embryos were obtained again, but only calli developed. The callus formation rates were 15.12, 20.0, 24.0 and 26.42% in cvs. Pala, Kemer, Topan and Aydın Siyahı, respectively.

The obtention of haploid embryos and plantlets was achieved in the trials in 1996. Haploid embryos were obtained at the rates of 3.67% and 2.05% in C and MS media respectively in cv. Kemer; and at the rates of 4.91% and 1.84%, respectively in cv. Urfa Yerlisi.

Embryos were also obtained in the trials carried out in 1998. The embryoid formation rates were 1.58% in MS medium in cv. Adana; 2.72% and 2.63% in C and MS media respectively in cv. Barbentane; and 2.43% in C medium in cv. Leila.

The suitable media for obtaining haploid plants in eggplant were found as C medium supplemented with 5 mg/l 2,4-D and 5 mg/l kinetin, and MS medium supplemented with 4 mg/l NAA and 1 mg/l kinetin.

Keywords: Eggplant, *Solanum melongena* L., *in vitro* androgenesis, anther culture, haploid plants.

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM	SAYFA
ÖNSÖZ	
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
2.1. Ana Bitkinin Büyüme Koşulları	7
2.2. Ana Bitkilerin Yaşı	9
2.3. Çiçek Tozunun Gelişme Devresi	9
2.4. Tomurcuklara veya Anterlere Yapılan Ön Uygulamalar	10
2.5. Genotip	10
2.6. Besin Ortamının Bileşimi	11
2.7. Kültür Koşulları	15
2.8. Homozigot Diploid Bitkilerin Elde Edilmesi	16
2.8.1. Kolhisin Uygulanması.....	16
2.8.2. Haploid Bitkilerin Gövdelerinden İzole Edilen Parçaların Kültüre Alınması.....	17
2.9. Haploid Bitkilerin Tanınması	17
2.9.1. Yapısal Özellikler.....	17
2.9.2. Haploidlerde Mayoz ve Verimlilik Durumu.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Materyal ,.....	26
3.2. Yöntem	27

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	27
3.2.2. Çiçek Tomurcuklarının Toplanması.....	28
3.2.3. <i>In Vitro</i> Kùltürler.....	29
3.2.3.1. Besin Ortamlarının Hazırlanması	29
3.2.3.2. Anterlerin Çıkartılması ve Dikim	35
3.2.3.3. Kùltür Koşulları	37
3.2.3.4. Gelişen Bitkilerin Toprağa Transferi	39
3.2.4. Araştırmada Yapılan Sitolojik Gözlemler, Fotoğraf Çekimleri ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	41
3.2.4.1. Mikrospor Hücrelerinde Sitolojik Gözlemler	41
3.2.4.2. Kök Uçlarında Kromozom Sayımı	41
3.2.4.3. Fotoğraf Çekimleri.....	41
3.2.4.4. Denemelerin Değerlendirilmesi	42
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....	43
4.1. Mikrospor Gelişme Dönemleriyle İlgili Araştırma Sonuçları	43
4.2. 1994 Yılındaki Ön Denemelerin Sonuçları	43
4.3. 1995 Yılındaki Denemelerin Sonuçları.....	44
4.4. 1996 Yılındaki Denemelerin Sonuçları.....	46
4.5. 1998 Yılındaki Denemelerin Sonuçları.....	48
5. TARTIŞMA	61
6. ÖZET	67
7. SUMMARY.....	69
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

<i>Şekil 3.1. Sekiz Farklı Gelişme Devresindeki Patlıcan Tomurcukları.</i>	29
<i>Şekil 3.2. Petri Kabı İçerisindeki Anterlerin Görünüşü.</i>	36
<i>Şekil 3.3. Anterlerden Kotiledon Yapraklı Embriyoid Oluşumuna Dek Geçen Safhalar</i>	38
<i>Şekil 3.4. Bir Bitkicikten Tam Bitki Oluşumuna Dek Geçen Safhalar:</i>	40
<i>Şekil 4.1. Tek Çekirdekli Safhadaki Polen Hücresi.</i>	43
<i>Şekil 4.2. Urfa Yerlisi Çeşidine Ait Bir Anterden Oluşan İki Embriyoid</i>	51
<i>Şekil 4.3. Urfa Yerlisi Çeşidine Ait Bir Anterden Kallus Oluşumu</i>	51
<i>Şekil 4.4. Kemer Çeşidinde, Bir Anterden Oluşan 5 Embriyoidin Görünüşü</i>	52
<i>Şekil 4.5. Kemer Çeşidine Ait Embriyoidlerin Petri Kabına Transferden Sonraki Görünüşü</i>	53
<i>Şekil 4.6. Urfa Yerlisi Çeşidine Ait Embriyoidlerin Petri Kabına Transferden Sonraki Görünüşü.</i>	53
<i>Şekil 4.7. Barbantane Çeşidine Ait Embriyoidlerin Petri Kabına Transferden Sonraki Görünüşü.</i>	54
<i>Şekil 4.8. Embriyoidlerin Gelişmesiyle Oluşan Bir Bitkicığın, Transfer Edildiği Deney Tübündeki Görünüşü.</i>	55
<i>Şekil 4.9. Tüp İçerisindeki Gelişmesini Tamamlayıp Çeliklelemeye Hazır Hale Gelmiş Bir Bitkicik</i>	56
<i>Şekil 4.10. In Vitro Klonlama Amacıyla Çelik Olarak Kullanılan Ana Bitkicik Parçalarının Deney Tüplerindeki Görünüşü</i>	57
<i>Şekil 4.11. Kök Uçlarında Yapılan Kromozom Sayımı Sonucunda Haploid (n=12) Olduğu Belirlenen Bir Bitkicikteki Kök Ucu Hücreleri ve Kromozomlar</i>	58.
<i>Şekil 4.12. Saksılardaki Steril Harca Transfer Edilerek Üzerlerine Beher Kapatılan Bitkilerin Görünüşü</i>	58
<i>Şekil 4.13. Saksılardaki Steril Torfa Transfer Edilerek Üzerine PE Örtü Kapatılan Bitkiler. Bitkilerin Farklı Gelişim Aşamalarında Ortam Şartlarına Kademeli Bir Şekilde Alistırılarak, Seraya Dikime Hazır Hale Getirilmeleri.</i>	59
<i>Şekil 4.14. Diploid Bitki (a), Haploid Bitki (b).</i>	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

<i>Çizelge 3.1. 1994 Yılındaki Ön Denemelerde ve 1995 Yılındaki Denemelerde Kullanılan MS Temel Ortamının Bileşimi.....</i>	<i>30</i>
<i>Çizelge 3.2. 1995 Yılındaki Denemelerde Kullanılan Ortamların Büyüme Düzenleyici Kapsamları.....</i>	<i>31</i>
<i>Çizelge 3.3. 1996 ve 1998 Yılındaki Denemelerde Kullanılan İki Farklı Dikim Ortamının Bileşimleri.....</i>	<i>33</i>
<i>Çizelge 3.4. 1996 ve 1998 Yılındaki Denemelerde Kullanılan Transfer (R) Ortamının Bileşimi.....</i>	<i>34</i>
<i>Çizelge 4.1. 1995 Yılındaki Denemelerde Kullanılan ve Kallus Oluşturan Anter Sayıları ve Oranları.....</i>	<i>45</i>
<i>Çizelge 4.2. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde Yapılan Denemelerde Kullanılan Anterlere Ait Kallus ve Embriyoid Oluşum Değerleri.....</i>	<i>47</i>
<i>Çizelge 4.3. 1996 Yılında Yapılan Denemelerde, C Ortamı Üzerindeki Anterlere Ait Kallus Oluşum Değerleri.....</i>	<i>48</i>
<i>Çizelge 4.4. 1998 Yılında, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde Kültüre Alınan Anterlere Ait Kallus ve Embriyoid Oluşum Değerleri.....</i>	<i>49</i>

1. GİRİŞ

Bitki doku kültürleri, bitkinin herhangi bir hücre, organ ya da doku parçasından, özel besin ortamında ve aseptik şartlar altında tam bir bitki elde edilmesi için kullanılan tekniklerin tümüne verilen addır.

Bitki doku kültürü sistemleri, çoğunlukla bitkilerle ilgili değişik fizyolojik, biyolojik, kimyasal, genetik ve yapısal sorunların incelenmesinde model sistemler olarak kullanılmakta, aynı zamanda da ekonomik öneme sahip ve gelecek için potansiyel vaadeden bitkilerin ticari anlamda vejetatif çoğaltım yolu olarak da büyük bir potansiyele sahip bulunmaktadır (Torres 1989).

Bitki doku kültürü çalışmalarının teorik temelleri, ilk kez 1838'de Schwann ve Schleiden adlı iki araştırmacının topipotensi teorisini öne sürmeleriyle atılmıştır. Bu teoriye göre, bitki hücrelerinin herbiri, bağımsız ve ilke olarak rejenerasyon yoluyla tam bir bitkiyi oluşturma kapasitesinde olan yapılardır. Doku kültürü yoluyla ilk kez bitki elde edilmesi ise 1904 yılında Hanning tarafından gerçekleştirilmiş, bu araştırmacı, *in vitro* izole edilmiş embriyolardan canlı bitkiler elde edebilmiştir (Pierik 1987).

Doku kültüründe kullanılan yöntemlerden olan anter kültürüyle ilgili çalışmalar ise oldukça yenidir. İlk kez 1967 yılında Bourgin ve Nitsch adlı araştırmacılar *Nicotiana sylvestris* ve *N. tabacum* anterlerinden tam gelişmiş haploid bitkiler elde etmeyi başarmışlardır. Bu tarihten sonra, haploid bitki konusunda elde edilen başarılı sonuçlar hızla artmış olup, bugün haploid bitki elde edilebilmiş oldukça fazla tür mevcuttur (Gönülşen 1987).

Bir bitkiden izole edilen anterlerin uygun besin ortamına yerleştirilerek, olgun olmayan polen tanelerinden (mikrosporlardan) bitkilerin geliştirilmesi tekniği olarak tanımlanabilen anter kültürü, bitki ıslahı ve genetik çalışmalarda kullanılan yardımcı bir tekniktir.

Bitki ıslahının çeşitli alanlarında kullanılan anter kültürünün sağladığı avantajlar, gözardı edilemeyecek derecede önemlidir. Klasik ıslah yöntemlerine kıyasla sağladığı zaman ve işgücü kazancı, küçümsenemeyecek düzeydedir. Bitki ıslahının, kombinasyon ve seleksiyon ıslahı, mutasyon ıslahı, mukavemet ıslahı ve F_1 hibrit gücü ıslahı gibi alanlarında anter kültüründen yararlanılmaktadır.

Bilindiği üzere, kombinasyon ıslahında ebeveyn olarak kullanılan homozigot safhatların elde edilebilmesi için, minimum 5 veya 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 diploid hale getirilmesiyle, homozigot hatların daha kolay ve geleneksel yöntemlere kıyasla daha kısa zamanda elde edilmesi mümkün olmaktadır (Alejo 1992). 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 safhatlar arazi koşullarında değişik bölgelerde denenerek, birkaç yılda adaptasyon yeteneği geniş çeşitler geliştirilebilmektedir (Abak 1986).

Haploid bitkiler, mutasyon ıslahında da önemli avantajlar sağlamaktadır. Özellikle resesif mutasyonların sözkonusu olduğu durumlarda, diploid bitkilerin kullanılması, ıslah çalışmalarını güçleştirmekte ve yavaşlatmaktadır. Zira, bu bitkilerde resesif mutant gen, dominant alleli tarafından örtüldüğünden, tesbit edilmesi zorlaşmaktadır.

Haploid bitkilerde veya hücrelerde ise resesif mutasyonlar, kromozomların teksele olmasından ve tamamlayıcı allelleri olmamasından dolayı kolayca belirlenebilirler. Ayrıca haploid hücre veya bitkiler, arzulanan olumlu mutasyonlara sahip olduklarında homozigot hücre veya bitkiler elde etmek üzere diploid hale getirilebilirler. Haploid hücrelere kimyasal veya fiziksel mutagenler uygulanarak, mutasyon oranını arttırmak da mümkündür (Alejo 1992).

Haploid embriyo veya bitkilerden, günümüzde gittikçe yaygınlaşan gen transferi çalışmalarında da yararlanılabilmektedir. Polenlerden oluşan embriyolar yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olduklarından, gerek direkt DNA transferi, gerekse gen transferi araştırmalarında etkin şekilde kullanılabilirler (Sangwan ve Sangwan-Norreel 1990).

Diğer yandan, haploid hücre veya protoplastların kullanılmasıyla, antibiyotiklere, toksinlere, herbisitlere, tuza ve sıcaklığa, virüs ve nematodlara dayanıklı mutantların seçimi mümkün olmaktadır (Alejo 1992). Ayrıca, dayanıklı ve duyarlı çeşitlerin melezlenmesinden elde edilen bitkilerden, anter kültürü ile elde edilen haploidler katlanmakta ve bu hatların çok sayıda ırka mukavemeti aynı anda kontrol edilebilmektedir (Abak 1986).

Haploid bitkiler, ayrıca F₁ hibrit gücü ıslahında da büyük kolaylık sağlarlar. Bilindiği üzere, bir hibrit çeşitdin geliştirilmesi için atılması gerekli ilk adım, elverişli populasyonlardan kendilenmiş hatların meydana getirilmesidir (şeniz 1990). Oysa, anter kültürü yoluyla elde edilecek haploid bitkiler sayesinde kendileme işlemi ortadan kaldırılmakta, katlanmış haploid hatlar, doğrudan doğruya genel ve özel kombinasyon yeteneği testlerine alınmaktadır. Böylece, ebeveyn adayı olacak materyalin hazırlanma süresi, 5-6 generasyondan, bir yıla indirilmektedir (Abak 1986).

Haploid bitkiler, bitki ıslahı programlarına alınarak önemli katkılar sağladığı gibi, genetik incelemelerde de kullanılabilirler. Bunlar, gen interaksiyonunun saptanması, genetik farklılıkların tahmini, genler arası bağlantının saptanması, kantitatif bir karakteri etkileyen birkaç genin ve poligenlerin yerinin saptanması gibi çalışmalardır (Dunwell 1991).

Bazı türlerde, birçok tahıl türünde mikrospor, kolayca elde edilebilen, bağımsız ve topipotent olan yegane kaynak olmaktadır. Bu özelliklerinin yanısıra, haploid yapıya sahip olmaları nedeniyle de mikrosporlar, hücre farklılaşması ile ilgili çalışmalarda da kullanılmaktadır (Dunwell 1991).

Bazı dioik bitkilerde, populasyonun tek bir cinsiyetteki fertlerden oluşması istenebilmektedir. Örneğin kuşkonmazda dişi bitkiler, tohuma kaçmaları, sürgün verimlerinin düşük olması gibi nedenlerle istenmemektedir. Bu türde, anter kültürüyle erkek haploidler üretilip, diploid hale getirildiklerinde süper erkek (YY) genotipini vermekte ve bu bitkiler çoğaltılarak tümü erkek olan F₁ hibrit kuşkonmaz tohumunun üretiminde ebeveyn olarak kullanılabilir (Seckinger 1991).

Ayrıca, polen kültürü sonucunda elde edilecek haploidlerden, fertil homozigot diploidlerin elde edilmesi, bazı bitki türlerindeki vejetatif üretimin tohumla generatif bir şekilde yapılmasını sağlayabilmektedir (Şeniz 1990). Buna örnek olarak, tohumla üretimde tohumlarının heterozigot yapısı nedeniyle açılma gösterip yabani formuna dönüştüğü için vejetatif olarak çoğaltılan enginar verilebilir.

Bains (1993) ise, anter kültürleriyle elde edilecek haploid bitkilerin homozigot diploid hale getirildiğinde, her iki gen kopyasının da aynı olup, tüm özellikler bakımından saf hatlar oluşturmaları nedeniyle, bitki klonlama çalışmalarında kullanılabileceğini belirtmektedir.

Doğada haploid bitkiler, çeşitli yollarla düşük frekanslarda oluşabilmektedir. Örneğin, yumurta hücreleri bazen döllenme olmaksızın da gelişir ve tam teşekküllü bitkiler meydana getirebilirler. Eğer yumurta hücresinin kromozom takımı bu arada kendiliğinden iki katına çıkmazsa, burada bir haploid partenogenesis söz konusu olur. Ayrıca, haploid bitkiler düşük oranlarda olmakla birlikte, bazı kültür bitkilerinden görülen ikiz embriyo oluşumu yoluyla da meydana gelmektedirler. Haploid bitkilerin oluşmasında diğer bir yol ise, yabancı bir türe ait polenle tozlanma olmasıdır (Şeniz 1990).

Abak ve ark. (1996) ise, kavunda ışınlanmış polenlerle tozlanma yoluyla haploid embriyolar elde edebildiklerini bildirmişlerdir. Ancak, bu yöntemlerde elde olunan haploid bitki sayısı yeterli olmadığı gibi, istendiği zaman bulunamaması ve bütün türlerde uygulanamaması, ıslah çalışmalarında kullanılmasını engellemektedir. Bu nedenle, *in vitro* haploid bitki eldesi, birçok bitki türünde, üzerinde yoğun bir

şekilde çalışılan bir konu olmuştur. Anter kültürü yoluyla haploid embriyo oluşumu iki şekilde meydana gelmektedir.

1. Direkt Androgenesis: *Nicotiana tabacum*, *Datura innoxia* gibi bazı türlerde mikrospor bir zigot gibi davranarak, *in vivo*'daki değişik embriyolojik devreleri geçirir (Gönülşen 1987). Polen duvarı, tipik olarak eksin ve intin tabakalarından oluşmakta ve eksin üzerindeki açıklıklardan normal çimlenme sırasında polen tübü çıkış yapmaktadır (Esau 1977). *In vitro* durumda ise, genelde embriyolar globular devrede eksinden dışarı çıkmakta ve sonradan daha fazla gelişerek kotiledonları oluşturmaktadır. Böylece 4-6 hafta içinde bitkicikler gelişmiş olmaktadır (Gönülşen 1987). Sangwan ve Sangwan-Norreel (1990) ise, embriyonik polen tanelerinin gelişiminin eşzamanlı olmadığını ve bitkicikler anterden çıktıktan sonra bile, anter loküllerinde çok sayıda embriyonun değişik gelişim aşamalarında bulunduğunu bildirmektedirler.

2. İndirekt Androgenesis: Direkt androgenesisin tersine olarak, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Oryzae sativa*, *Lycopersicon esculentum*, ve *Brassica oleraceae* gibi türlerde de embriyogenesisin yerine mikrosporlar bölünerek kallus dokusunu oluştururlar. Kallus, aynı veya farklı bir besin ortamında farklılaştırılarak embriyo, kök ve sürgün oluşturulmaktadır. Yani bitkicikler kallustan organogenesis yolu ile meydana gelmektedir (Gönülşen 1987).

Anter kültürü ile elde edilen haploid bitkilerin sağladığı büyük avantajlara karşılık, en büyük dezavantajı, elde edilen haploid embriyo yüzdesinin birçok bitkide çok düşük olmasıdır. Ayrıca, bu konuda, çözümlenmesi gereken başka sorunlar da bulunmaktadır. Anter kültüründe karşılaşılan zorlukların başlıcaları Pierik (1987) tarafından belirtilmiştir. Anter kültüründe çoğu zaman *in vitro* olarak hiçbir büyüme ve gelişme meydana gelmemekte, ya da başlangıçtaki gelişmeyi takiben embriyolar aborsiyona uğramaktadır. Ayrıca, haploidlerin yanısıra çoğunlukla diploidler ve tetraploidler de rejenere olmaktadır. Diğer yandan, kültüre alınan anterlerin çoğundan embriyoid yerine kallus gelişmekte ve bu durum haploid bitki oluşumunu

genelde olumsuz yönde etkilemektedir. Zira, patlıcanda anter kültürüyle haploid bitki oluşumu, genelde direkt androgenesis yoluyla olmaktadır.

Keller (1988) ise, anter kültüründe en sık karşılaşılan sorunların, sebze türleri arasındaki ve içerisindeki başarı oranının değişken olması, uygun gelişme devresindeki polenin tanınması ve enfeksiyonun önlenmesi olduğunu belirtmektedir.

Karşılaşılan bu sorunlara ve zorluklara rağmen, anter kültürü ile haploid bitki eldesi, ıslah çalışmalarında sağladığı kolaylık ve zaman kazancı nedeniyle bir ümit olmaya devam etmekte ve başarı oranının yükseltilmesine çalışılmaktadır.

Patlıcanda anter kültürü konusunda, bugüne kadar ülkemizde yapılan çalışmalarda başarı düzeyi, gelişmiş ülkelere kıyasla çok düşük kalmıştır. Karakullukçu (1991) tarafından yapılan ilk çalışmalarda, farklı uygulamalarda kullanılan toplam anter sayısına kıyasla elde edilen genel haploid bitki oranı %0.1'in altındayken, bazı teksel uygulamalarda ise en fazla %6.9 oranında bitki elde edilebilmiştir. Özzambak ve Atasayar (1994) ise yalnızca kallus rejenere edebildiklerini, ancak bitki elde edemediklerini bildirmektedirler. Karakullukçu ve Abak (1993 a) ve (1993 b) tarafından yapılan sonraki çalışmalarda bu oran yükseltilebilmiş olmakla birlikte, belirli çeşitlerle sınırlı kalmıştır. Dolayısıyla, şu ana kadar ülkemizde bu konuda başarılı olunabildiğini söylemek güçtür. Gelişmiş ülkelerde ise bu oran bazı durumlarda %35'lere kadar çıkabilmekte (Dumas de Vaulx ve Chambonnet 1982), ortalama olarak ise %4-5'in altına inmemektedir.

Bu çalışmada, patlıcanda anter kültürü yoluyla haploid bitki oluşum oranını yükseltmek ve böylece anter kültürü tekniğinin patlıcan ıslahında daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamak amaçlanmıştır. Bu amaçla, farklı çeşitler ve besin ortamları denemede kullanılmış, bunların androgenesis üzerine etkisinin belirlenmesine çalışılmış, ayrıca ana bitkinin yetiştirme şartlarının sonuç üzerindeki etkisi incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Anter kültürü üzerindeki çalışmalar, bu yöntemin bitki ıslahında sağladığı avantajlar nedeniyle dünyanın birçok ülkesinde sürdürülmektedir. Ancak, üzerinde çalışılan türlerin bir kısmında başarılı sonuçlar alınabilirken, bazı türler ise anter kültürüne yeterince cevap vermemektedir. Hatta bazen, aynı türde yapılan değişik çalışmalarda bile farklı sonuçlar alınabilmektedir. Bu durum, anter kültürüyle haploid bitki eldesindeki başarının birçok değişken faktöre bağlı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu faktörleri şu şekilde sıralamak mümkündür:

2.1. Ana Bitkinin Büyüme Koşulları

Ana bitkinin çiçek oluşum zamanından polen alınmasına kadar optimum şartlarda yetiştirilmesi gerekmektedir. Patlıcanda anter kültürü ile ilgili yapılan bir çalışmada; serada yetiştirilen patlıcan bitkilerinde Şubat ve Mayıs ayları arasında yapılan günlük rasatlar sonucunda gündüz sıcaklığının 20-33°C'ler arasında, gece sıcaklığının ise 18-27°C'ler arasında olduğu belirlenmiştir (Karakullukçu 1991). Ayrıca bitkilerin iyi beslenmesinin ve ışık intensitesinin yüksek olmasının da şart olduğu, örnek alımından üç ila dört hafta öncesinden itibaren ister dışsal, isterse sistemik olsun her tür pestisid kullanımından kaçınılması gerektiği belirtilmiştir (Nitsch 1981).

Frett ve Dirr (1986), *Petunia x hybrida* cv. Coral Sea stok bitkilerini bir modifiye Hoagland çözeltisiyle yetiştirmişlerdir. Ayrı ayrı denemelerde, N; 0, 100, 200 ve 400 mg/l olarak nitrat azotu halinde ve Ca; 0, 75, 150, 300 mg/l dozda uygulanmıştır. N uygulamaları, N verilmeyen stok bitkilerden alınan anterlere kıyasla anter taze ağırlığını ve kültür başına sürgün sayısını arttırmıştır. 0 mg/l Ca uygulanan stok bitkilerden alınan anterler kültür başına en yüksek sürgün sayısını vermiştir. Anatomik olarak, hem filament, hem de anter duvarının dokusu kallus üretmiş, fakat mikrosporelerden herhangi bir kallus üretimi gözlenmemiştir. Anterler tarafından

Üretilen sürgünlerde yapılan sitolojik gözlemlerde bunların diploid oldukları grlmtr.

Ana bitkilerin yetiştirildiği yer ve zaman da başarı üzerinde etkili olmaktadır. Wenzel ve Foroughi-Wehr (1994), çoğu bitki türlerinde bitkinin doğal yetime mevsimi esnasında arazide yetiştirilen materyalden alınan anterlerin serada yetiştirilen materyalden alınanlara göre daha düşük performans gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, pratik açıdan, anterleri bahar ve erken gözde kültüre almanın uygun olduğunu vurgulamışlardır. Karakullukçu (1991) da yaptığı çalışmada, patlıcanda haploid bitkilerin ilkbahar ve yaz başlangıcında, çiçeklenmenin ilk dönemlerinde toplanan tomurcuklardan alınan anterlerden elde edildiğini bildirmiştir.

Dunwell (1991) ise, anter elde etmek amacıyla yetiştirilen ana bitkilerin yetime şartlarının mikrosporların verimi üzerine büyük etkisinin olduğunu belirtmiş ve başarılı sonuçların ancak sıcaklığı, fotoperiyodu ve ışık intensitesi uygun olan ortamlarda elde edilebileceğini vurgulamıştır. Anter kültüründeki en kapsamlı çalışmaların tütün ve arpada yapıldığını bildiren araştırıcı, tütünde kısa fotoperiyodların (8 saat) ve yüksek ışık intensitelerinin (16 000 lux) androgenesis açısından yararlı olduğuna dikkati çekmiş, arpada ise düşük sıcaklıkların (12°C) ve yüksek ışık yoğunluklarının (20 000 lux) anterlerden haploid bitkiler elde etmek için tavsiye edildiğini ifade etmiştir. Ferry ve ark. (1995) da, mikrospor kökenli embriyo veriminin, fotoperiyod ve ışık intensitesi tarafından etkilendiğini, rneğin Brassica campestris'te ışık intensitesindeki artışın, anterlerin kültürde verdikleri cevabı arttırdığını belirtmişlerdir.

Trke (1994), evre koşullarının patatesteki kallus oluşum oranını önemli derecede etkilediğini bildirmiştir. Aratırıcı, yaylada yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerin %7.6, ova dakilerden alınanların %4.3 ve seradakilerden alınanların %2.8 kallus oluşum oranı verdiğini belirtmektedir. Ayrıca kallus farklılaşması üzerine de yükseltinin etkilerinin farklı olduğu, yayla koşullarının %12.3 ile en yüksek farklılaşma oranını verdiği, bunu %6.1 ile ova ve %1.0 ile sera koşullarının izlediği saptanmıştır.

2.2. Ana Bitkilerin Yaşı

Tomurcukların çiçeklenme periyodunun başında toplanması tavsiye edilmiştir. Eğer, denemelere uzun bir periyod boyunca devam etmek gerekirse, kullanılmayan tomurcukların bitkiden koparılıp, olgunlaşmasına izin verilmemesi gerekmektedir (Dunwell 1991).

Pierik (1987) de, bitki yaşlandıkça rejenerasyon kapasitesinin çoğunlukla düştüğünü, dolayısıyla, genç bitkilerden alınacak materyalin, yaşlılardan alınanlara tercih edilmesi gerektiğini bildirmiştir.

2.3. Çiçek Tozunun Gelişme Devresi

Tomurcukların hasat edildiği devrede çiçek tozunun optimum gelişme aşamasında bulunması hayati öneme sahiptir, fakat bu aşama türlere göre değişmektedir (Dunwell 1991). Karakullukçu (1991), patlıcanda 8 değişik devredeki tomurcukta yaptığı sitolojik gözlemler sonucunda, anter kültürü için en elverişli gelişme döneminin birinci çiçek tozu mitozundan hemen önceki dönem olduğunu belirlemiş, bu dönemdeki tomurcuklarda taç yaprakların seviyesinin çanak yaprakların birleşme noktasında bulunduğunu, anter renginin ise yeşilimsi-sarı renkte olduğunu saptamıştır.

Summers ve ark. (1992), domateste anter gelişme devresinin, kallus ya da embriyo elde edilmesini etkilediğini bildirmişlerdir. Mayoz devresindeki anterlerden kallus meydana gelirken, tetrat safhasındaki ya da daha ileri devredeki hücrelerden embriyogenesis cereyan etmektedir.

Özzambak ve Atasayar (1994), 5 domates çeşidinde anter ve polen kültürü yoluyla haploid bitkilerin üretimi üzerinde araştırmalar yapmışlardır. Anterler 2 ila 3 mm uzunluktaki domates çiçeklerinden alınmışlardır. Araştırmacılar, MS ve Nitsch ortamlarında kültüre alınan anterlerden kallus meydana geldiğini, bu kallusların 6

adet çoğaltım ortamında altkültüre alındığını, ancak haploid bitkilerin rejenerasyon edilemediğini bildirmişlerdir.

2.4. Tomurcuklara veya Anterlere Yapılan Ön Uygulamalar

Chambonnet (1988), biber ve patlıcanda, kültürün ilk 8 günü sırasında karanlık ve 35°C'lik bir sıcaklık şokunun gerekli olduğunu bildirmekte, biberde anter kültüründen önceki 24 ila 48 saat sırasında çiçek tomurcuğuna 4°C'lik düşük sıcaklık ve karanlık uygulamasının da embriyogenik gelişimi uyarmasının mümkün olduğunu, ancak patlıcanda böyle bir uygulamanın şart olmadığını belirtmektedir. Karakullukçu (1991) da kültürün ilk 8 günü karanlık ve 35°C sıcaklık uygulamasının, patlıcanda embriyogenik gelişimi başlatmak için gerekli olduğunu bildirmektedir.

Ateş (1991), tütünde soğuk ön uygulamaların haploid üretimini arttırmadaki etkisini saptamak amacıyla, anterleri kültüre almadan önce 4, 8, 10 ve 16°C'lerde 10 gün süreyle bekletmişlerdir. Soğuk ön uygulamaların anterlerden embriyo ve bitkiciklerin çıkış süresini kısalttığı saptanmıştır.

Bajaj (1983) da, anter kültüründe ısı şoklarının uyarıcı etkisinin *Datura*, *Atropa belladonna*, domates ve tütünde başarıyla uygulandığını ve anterlerde androgenesisini arttırdığını belirtmektedir. Araştırmacı, soğuk uygulamasının etkisinin dolaylı olup, androgenesisdeki artışın, düşük sıcaklığın (3-5°C), polen canlılığının daha uzun süre korunmasını sağlamasından, yaşlanmayı geciktirmesinden ve polenin aborsiyonunu önleyerek embriyo oluşturabilecek olan canlı polen sayısını arttırmasından kaynaklandığını ifade etmiştir. Ayrıca hem soğuk uygulamasının ve hem de kısa süre yüksek sıcaklıkta bırakmanın polenin ardarda bölünmesini arttırdığını belirtmiştir.

2.5. Genotip

Haploidlerin *in-vitro* uyarılmasındaki başarıyı belirleyen en önemli faktörlerden biri bitki genotipidir. Değişik türlerin ve çeşitlerin kültürde farklı büyüme cevapları verdiği gözlenmiştir (Bajaj 1983). Örneğin, Rotino ve ark. (1987) patlıcanda

yaptıkları bir çalışmada elde edilen haploid bitki sayısının çeşitlere göre 1 ile 193 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Karakullukçu (1991) kullandığı 13 patlıcan çeşidinin ancak 2'sinde haploid bitki elde edildiğini bildirmektedir. Benzer şekilde, Gresshof ve Doy (1973), 43 domates çeşidi ile yaptıkları çalışmalarda yalnızca 3 genotipte anterlerden haploid dokuları geliştirebilmişlerdir. Araştırmacılar, çeşitli düzeylerde NAA ve kinetin eklenmiş besin ortamlarında anterlerden kallus farklılaşmasının hem karanlıkta hem de ışıktaki meydana gelebildiğini, fakat farklılaşan kallusların bitkiciklere dönüşmesinin yalnızca ışıktaki gerçekleşebildiğini belirtmişlerdir.

2.6. Besin Ortamının Bileşimi

Her ne kadar, genelde bu faktörün birinci derecede öneme sahip olduğu kabul edilmekteyse de, sonuç üzerinde tek başına etkili olmayıp, büyüme koşulları ve polenin gelişme devresi gibi faktörlerle etkileşim halindedir. Besin ortamının bileşimi dendiğinde, ortamın fiziksel yapısı, ozmotik basıncı, mineral ve vitamin kombinasyonu gibi çeşitli faktörler anlaşılmaktadır.

Ortamın fiziksel yapısının anter gelişimi üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır. Kültür ortamını katılaştırmak için kullanılan agar tiplerinin çoğunun, polenin hayatta kalması üzerinde olumsuz etkisi bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle, maksimum oranda bitkicik elde edebilmek için agardan kaçınılması, ya da en azından saf su ile iyice yıkanarak, üzerindeki anter gelişimine zararlı maddelerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Alternatif olarak sıvı ortamı denemek mümkündür. Katılaştırılmamış ortamın dezavantajı, yüksek oranda mikrospor kallusu elde edilmesine karşılık çoğunlukla bitki rejenerasyonu düzeylerinin oldukça düşük olmasıdır. Bunun nedeninin sıvı yüzeyinin altına batan kallusların büyümesini engelleyen anaerobik koşullar olduğu ileri sürülmektedir (Dunwell 1991).

Pierik (1987) çift-katmanlı yöntem adı verilen, agarlı plaka üzerindeki ince bir tabaka sıvı ortamda anterleri yetiştirmenin daha iyi olacağını belirtmektedir. Ancak, Karakullukçu (1991), agarla katılaştırılmış aktif kömürlü ortam üzerine eklenen sıvı

besin ortamına yerleştirilerek, dikimden sonra sıcaklık uygulamasına tabi tutulan anterlerin, uygulamanın henüz birinci gününde karardığını ve canlılıklarını yitirdiğini belirtmiştir.

Besin ortamıyla ilgili en önemli faktörlerden biri de, ortamın ozmotik basıncıdır. Buna rağmen, bu konuda ihtiyaç duyulan analitik bilgi yeterince yoktur. Bunun yerine, çeşitli deneysel araştırmalarla türler, düşük (%2-4) sakkaroz konsantrasyonları gerektirenler ve anterleri daha yüksek (%8-12) konsantrasyonlarda daha iyi sonuç verenler olarak iki gruba ayrılmıştır. Türlerin bu ayrımı, bunların olgun polenlerinin *Solanaceae* ve *Liliaceae*'deki gibi iki hücreli veya *Graminae* ve *Cruciferae*'daki gibi üç hücreli olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. İlk grup düşük ozmotik basınca, ikinci grup ise yüksek ozmotik basınca gerek duymaktadırlar (Dunwell 1991).

Sharp ve ark. (1972), iki domates çeşidinin anterlerinden olgunlaşmamış polen tanelerini izole ederek, farklı büyüme düzenleyici ve sakkaroz oranlarına sahip ortamlarda kültüre almışlardır. Araştırmacılar, anterlerden kallus gelişimi üzerine büyüme düzenleyicilerin önemli bir etkisi olmadığını, fakat sakkaroz düzeyinin yükselmesinin hücre çoğalmasını arttırdığını bulmuşlardır. Bu hücre yığınlarının, sakkaroz oranı düşük bir ortama transferiyle kök oluşumu gerçekleşmiştir.

Abak (1984), biberde 5 mg/l kinetin ve 5 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda şeker ve demir konsantrasyonlarının yükseltilmesinin haploid embriyo ve bitki oluşumunu mümkün kıldığını, 90 ve 120 g/l şeker içeren ortamlarda, demir konsantrasyonunun da iki katına çıkartılmasının, hem embriyo, hem de bitki oluşumunu önemli düzeyde yükselttiğini belirtmiştir. Dirr ve Heuser (1987) ise, MS ortamı için 30 g/l sakkarozun standart olduğunu bildirmektedir.

Son yıllarda, besin ortamında sakkaroz yerine kullanılacak ozmotik düzenleyicilerle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Grubor ve Fowke (1999) *Brassica napus*'da ortamdaki sakkarozu %0.1'e düşürüp, ozmotik düzenleyici olarak ortama yüksek konsantrasyonda ve metabolize edilemeyen PEG 4000 katmışlardır.

Araştırmacılar, anterlerden embriyoid oluşumu ve gelişiminde PEG'ün, sakkarozaya kıyasla çok daha iyi sonuç verdiğini ve diğer türlerde de denenmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Besin ortamının mineral madde ve vitamin içeriği, diğer bir deyimle ortamın formülasyonu da başarı üzerinde etkili bir faktördür. Anter kültüründe genellikle White, Murashige ve Skoog ve Nitsch ve Nitsch gibi üç temel besin ortamı kullanılmaktadır (Gönülşen 1987). Kullanılan organik ve inorganik maddeler bu ortamlara göre ayarlanmaktadır. Gönülşen (1987), besin ortamında bulunan demirin önemli bir role sahip olduğunu, demir kaynağı olarak Fe-EDTA ve Fe-EDDHA gibi şelatların, demir sitrattan daha etkili olduğunu belirtmektedir. Karakullukçu (1991) ise Chambonnet tarafından tavsiye edilen ortamın iyi sonuç verdiğini bildirmektedir. Bu ortamda büyüme düzenleyici olarak 5 mg/l 2,4-D ile 5 mg/l kinetin kullanılmaktadır.

Nishi ve ark. (1976) ise, 13 sebze türü ve çilekten toplam 40 çeşit ile yaptıkları anter kültürü araştırmalarında elde edilen bitkilerin hemen tümünün diploid olduğunu belirtmişlerdir. En iyi sonuçlar Linsmaier ve Skoog (LS) ortamından elde edilmiştir.

Anter kültüründe büyümeyi düzenleyicilerin gerekliliği üzerinde farklı görüşler bulunmaktadır. Pierik (1987) kallus oluşumunu sınırlandırmak için büyümeyi düzenleyicilerin genelde kullanılmadığını, ancak bazı durumlarda oksin, sitokinin, veya bunların ikisinin kombinasyonuna gerek duyulduğunu belirtmektedir. Bajaj (1983) ise, düşük seviyelerde oksin içeren basit ortamların direkt embriyogenesisin teşviki için tavsiye edilebileceğini, 2,4-D gibi oksinlerle zenginleştirilmiş olan kompleks ortamların ise genetik üniformluğun bozulmasına sebep olan kallus oluşumunu teşvik edeceğini, dolayısıyla bu tip uygulamalardan kaçınılması gerektiğini belirtmiştir.

Ünsal (1993) da, çoğu türlerde anterler için oksin ve sitokininlerin ortama konmasının gerektiğini, ayrıca Hindistan cevizi sütünün yerine sitokininlerin kullanılabilirliğini belirtmektedir. Pierik (1987) de hindistan cevizi sütü, hücre

bölünmesini arttırıcı yönde rol oynamakla birlikte, kullanımının fazla tavsiye edilemediğini, zira, bileşiminin elde edildiği hindistan cevizinin olgunluk düzeyine göre geniş ölçüde değişebildiğini bildirmektedir.

Matsubara ve ark. (1992)'nın California Wonder biber çeşidinde yaptıkları çalışmada 0.2 ppm 2,4-D + 0.1 ppm kinetin veya 0.1 ppm 2,4-D + 0.1 ppm kinetin eklendiği ortamlarda yüksek frekansta kallus meydana gelmiştir. Diğer taraftan 0.02 ppm kinetin ya da 0.004 ppm 2,4-D + 0.1 ppm kinetin eklenen MS ortamlarında direkt olarak yüksek oranda embriyoidler oluşmuştur.

Anter kültürü için hazırlanan besin ortamlarında zaman zaman kullanılan diğer bazı organik ve inorganik maddeler vardır. Bazı yazarlar, kültür ortamına kazein hidrolizat eklenmesini tavsiye etmektedir. Ortama bu zengin amino asit karışımının katılmasıyla, hücrenin karışımdan ihtiyacı olan maddeleri alacağı beklenmektedir. Ancak, amino asitler arasındaki interaksiyonların metabolizma üzerindeki etkisi anlaşılmadan bu tip maddelerin kullanılması sakıncalı olabilmektedir. O nedenle, analizleri yapılmadan kullanılmaması gerekmektedir (Nitsch 1981). Yıldırım (1991) beş tetraploid patates genotipine ait anterleri, iki farklı besin ortamında kültüre aldığıında, 2'şer ppm 2,4-D ve BAP ile birlikte, 1 ppm kazein hidrolizat katılmış MS besin ortamını anter kültüründe başarılı bulmuştur.

Guha veMaheshwari, *Datura innoxia* anterlerinin, polen tanesi aşamasındayken, kazein hidrolizat, indol asetik asit (IAA) ve kinetin veya hindistan cevizi sütü, üzüm suyu veya erik suyu ilave edilmiş bir mineral tuz ortamında kültüre alındığında, yaklaşık 6 ila 7 hafta içinde anterin yanlarından embriyo benzeri yapıların çıktığını bildirmişlerdir (Raghavan 1995).

Kültür ortamlarında bazen yer verilen diğer bir madde de, kültür ortamını birçok yolla değiştiren, özellikle hormonları, vitaminleri, demiri ve kültürdeki yaşlanan dokular tarafından salınan fenolik bileşikler adsorbe eden aktif kömürdür (Dunwell 1991). Etki tarzı tam olarak bilinmeyen bu bileşiğin anter başına bitkicik sayısını arttırdığını ve anterlerden bitkiciklerin rejenerasyonunu hızlandırdığını

bildiren araştırmacılar olduğu gibi (Bajaj 1983), aktif kömürlü ortamdaki anterlerin kararıp canlılığını yitirdiğini belirten araştırmacılar da (Karakullukçu 1991) vardır.

2.7. Kültür Koşulları

Kültür koşulları içinde en önemli faktör sıcaklıktır. Dunwell (1991), Solanaceae'deki türler de dahil çoğu türlerin anterlerinin 25°C kültüre alındıklarında yeterli gelişmeyi gösterdiğini, Sopory ve ark. (1978) da, patateste kültüre alınan anterlerin $26 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklığa yerleştirildiğini belirtmiştir. Nitsch (1981) ise, sıcaklığın kademeli olarak 14°C'den 18°C'ye, sonra da 25°C'ye yükseltilmesinin ve kültürün herbir sıcaklık derecesinde 5-7 gün tutulmasının embriyo üretimini arttırdığını bildirmiştir.

Kültür koşullarından ışık da önemlidir. Ancak, ışığın anter kültürlerine etkisi üzerinde yeterli bilgi bulunmamaktadır. Normalde, mikrospor kökenli embriyoların veya kallusların çıkışına kadar kültürlerin karanlıkta tutulması tavsiye edilmektedir (Dunwell 1991). Karakullukçu (1991) ise, patıcan anter kültüründe iklim odasındaki fotoperiyodik düzenin 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olarak ayarlandığını, ışık şiddetinin ise 2000 lux değerinde tutulduğunu bildirmektedir. Sopory ve ark. (1978)'da, patateste kültüre alınan anterlerin 2000 lux ışık şiddetine yerleştirildiğini, ancak aydınlanma sresinin 12 saat olarak tutulduğunu bildirmektedir. Nitsch (1981), yüksek yoğunluktaki (5000 lux) beyaz ışığın androgenesisini engellediğini, mavi ışığın ya da karanlığın ise engellemediğini bildirmekte, ancak düşük yoğunluktaki beyaz ışığın ve özellikle kırmızı ışığın elde edilen bitki sayısını arttırdığını belirtmektedir. Günüşen (1987) de, kullanılan bitki türüne, izole edilen eksplantın cinsine ve besin ortamına bağlı olarak 300-10.000 lux ışık yoğunluğu gerektiğini belirtmiştir.

Pierik (1987) ise, ışıklandırma kullanılan floresan lambaların yaydığı ışık miktarının, lambanın çalıştırılmasından itibaren gittikçe düştüğünü ve 12 ay sonra, başlangıçtaki değerin %70'ine indiğini bildirmektedir.

Anter kültüründe gözönüne alınması gereken diğer bir faktör de kültür kabındaki anter yoğunluğudur. Ancak, bu konuyla ilgili fazla çalışma olmayıp, tek sistematik araştırma tütün anterlerinde yapılmış, en iyi cevap anter başına 5 ml havanın sağlandığı tüplerden elde edilmiştir. Daha büyük ve de özellikle daha küçük tüplerde tepki büyük ölçüde azalmıştır (Dunwell 1991). Çalışmalarda kullanılan anter yoğunluğu araştırmacılara göre değişmekte olup, Tuberosa (1987b) patıcanda 55 mm çaplı bir petride ortalama 5 ila 7 anteri kültüre aldıklarını belirtirken, yine patıcanda çalışan Karakullukçu (1991) bir petriye iki tomurcuktan çıkan anterlerin tümünün dikildiğini ve bu sayının 12 ila 15 arasında değiştiğini bildirmektedir.

Anterin ortam yüzeyine göre yönüne de, genelde yapılan çalışmalarda değinilmemektedir (Dunwell 1991). Ancak, Karakullukçu (1991), patıcanda anterlerin besin ortamı üzerine dorsal (sırt) kısımları ortamlarla temas edecek biçimde ve ortama batırılmaksızın yerleştirilmesini önermektedir.

Yukarıda sayılan faktörlere dikkat edildiği takdirde, anter kültüründe belirli oranda haploid bitki elde etmek mümkün olmaktadır. Ancak, bu bitkilerin melezleme ıslahı çalışmalarında kullanılabilmesi için, bunlardan homozigot diploid bitkilerin elde edilmesi gerekmektedir.

2.8. Homozigot Diploid Bitkilerin Elde Edilmesi

Haploid bitkiciklerden başlıca iki yolla homozigot diploid bitkiler elde edilmektedir. Bunlar (Gönülşen 1987):

2.8.1. Kolhisin Uygulanması

Bitkicikler henüz antere bağlı olduğu devrede 24-96 saat %0.5'lik kolhisin çözeltisinde tutulduktan sonra yıkanır ve tekrar kültüre alınırlar. Diğer bir şekil de, olgun haploid bitkilerin tepe kısmına %0.4'lük kolhisin-lanolin macunu uygulanmasıdır.

2.8.2. Haploid Bitkilerin Gövdelerinden İzole Edilen Parçaların Kültüre Alınması

Haploid kallus kültüründe endomitozis yoluyla, yani çekirdeğin bölünmeden kromozomların eşlenmesiyle diploid hücrelerin oluştuğu bilinmektedir. Bu yöntemle haploid bitkilerden, homozigot diploid bitkiler elde edilebilmektedir.

2.9. Haploid Bitkilerin Tanınması

Anter kültürü yoluyla elde edilen bitkilerin haploid olduğunun anlaşılmasında gerek makro gerekse mikro düzeyde bazı göstergelerden yararlanılmaktadır. Çoğunlukla, bitkilerin dış görünüşü genel bir fikir vermekle birlikte, kesin karara sitolojik gözlemler sonucunda varılabilmektedir. Haploidlerin tanınmasını ve ayırd edilmesini sağlayan bu yapısal ve sitolojik özellikleri Emiroğlu (1982) şöyle sınıflandırmıştır:

2.9.1. Yapısal Özellikler

Bitkilerin doku ve organlarını oluşturan hücreler, haploidlerde, diploidlere kıyasla biraz daha küçük olduğundan, haploid bitkiler yapısal olarak diploidlere göre daha küçük ve zayıf görünüşlüdürler. Ayrıca, haploid bitkilerin stoma yoğunluğu ile, bu stoma hücrelerindeki plastidlerin sayıları da, diploid ve poliploidlerden farklı olmaktadır. Ploidi düzeyi yükseldikçe, stoma uzunluğu ve plastid sayısı da artmaktadır (Emiroğlu 1982).

2.9.2. Haploidlerde Mayoz ve Verimlilik Durumu

Haploidlerde kromozomların homologları olmadığından, metafaz gözlemlerinde kromozomları univalent halde görülmektedirler, yani kromozomlar tek takım halinde olup homolog karşılıkları bulunmamaktadır. Ayrıca monohaploidler steril olduklarından polen özelliklerinden yararlanma olanağı yoktur, ancak bu dihaploidlerde, yani genomları normalde tetraploid olup da haploidleştirilince $2n$ kromozom sayısına sahip olanlarda ve bazı polihaploidlerde mümkün olabilmektedir (Emiroğlu 1982).

Başlangıçta da belirtildiği gibi, her ne kadar bazı sorunlarla karşılaşılsa da, bugün anter kültürünün uygulanabildiği oldukça fazla sayıda tür mevcuttur. Hu ve Zeng (1984), anter kültürü uygulamalarının, kapalı tohumluların 26 familyasının 60 cinsine bağlı 171 türe yayıldığını belirtmektedirler. Cao ve ark. (1995) ise, anter kültürünün, kuşkonmaz, biber, patlıcan, karpuz ve lahanagiller gibi bazı sebze türlerinin ıslahı için haploid bitki üretmede kullanıldığını, izole edilmiş mikrospor kültürünün ise lahana, brokkoli ve Çin lahanası gibi bazı lahanagil sebzelerinde başarıyla uygulanabildiğini belirtmişlerdir.

Dumas de Vaultx ve Chambonnet (1982), Dourga patlıcan çeşidinden aldıkları anterlerin bir kısmını ilk 8 gün boyunca 35°C'de ve karanlıkta, geri kalanını ise direkt olarak 25°C'de ve 12 saat gün uzunluğunda kültüre almışlardır. Sıcak ve karanlık ön uygulaması yapılan anterlerden 100 anter başına ortalama 12 bitki elde edilebilirken, ön uygulama yapılmayıp, direkt 25°C'de ve ışıktaki kültüre alınan anterlerde bu değer 3.4 olmuştur. En yüksek bitkicik oranı, kültüre alınan 100 anter başına 25-35 bitki olmak üzere büyümeyi düzenleyici olarak 0.01 mg/l 2,4-D ve 0.01 mg/l kinetinin eklendiği ve C ortamı adı verilen ortamda, 35°C'de 8 günlük ön uygulamayla elde edilmiştir. Kültürün 12. gününden sonra anterler, oksinsiz ve 0.1 mg/l kinetin içeren ortama transfer edilmişlerdir. Anterlerden oluşan bitkilerin %15-50'si diploid olmuştur. Fakat, ilk kültür ortamında 2,4-D yerine IAA kullanılmasıyla yalnızca haploid bitkiler elde edilmiştir.

Misra ve ark. (1983) da, patlıcanda anterlerden kallus gelişiminin uyarılması için optimal kültür ortamını tesbit etmeye çalışmışlar ve oluşan kallusların sürgün ve köklere farklılaşmasını incelemişlerdir. Anterlerden kallus teşviki için kullanılan ortamlar içinde, 2 mg/l indol asetik asit ve 2 mg/l kinetin katılmış olan besin ortamı, kallus gelişimi için en uygun olarak bulunmuştur. Kallusun farklılaşması içinse 0.1 mg/l naftalen asetik asit ve 2 mg/l kinetin eklenmiş olan besin ortamı en elverişli olmuştur. Sürgün oluşumunun 15-20 gününden sonra, kallustan kök oluşumu başlamıştır.

Wang ve ark. (1989), patlıcan anterlerinin 35°C'de 8 gün tutulmasıyla embriyoid teşvik oranının %10-17'ye kadar yükseltildiğini belirtmişlerdir. 4 gün süreyle 3-5°C'de ön uygulama ve bunu takiben 35°C'de 8 gün tutma, anter başına embriyoid sayısı üzerinde olumlu etki yapmıştır.

Ene-Obong ve ark. (1986), bir patlıcan türü olan *Solanum macrocarpon*'un tek çekirdekli polen hücrelerini içeren anterleri katı temel ortam (Bourgin-Nitsch) veya sitokinin, oksin ya da her ikisiyle desteklenmiş olan BN ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Kùltürler 25 ± 2°C'de 12 saatlik floresan ışık/karanlık döngüsü altına yerleştirilmişlerdir. Bourgin ve Nitsch mineral tuzları, vitaminler, %2 sakkaroz, kinetin, 2,4-D ve %0.9 agar içeren ortamda kültüre alınan anterlerden kalluslar elde edilmiştir.

Çin'de "Haploid ıslahı Araştırma Grubu" tarafından yapılan bir çalışmada, Pekin Nine-Leaf patlıcan çeşidi ile, Anyang x Yenta ve Seven-Leaf x Anyang hibritleri kullanılmıştır. Kùltür ortamı olarak MS ortamının kullanıldığı ve farklı büyümeyi düzenleyicilerin denendiği çalışmanın sonucunda, embriyoid oluşumu için besin ortamında, kallus oluşumu için gerekenden daha düşük bir hormon konsantrasyonunun gerekli olduğu ve bu konsantrasyonunun 0.005 mg/l kinetin olduğu belirtilmiştir. Böylece, hormon konsantrasyonları düşük olan ortamları kullanmak suretiyle, anter duvarından oluşabilecek bitkicik oranının büyük ölçüde azaltılabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, embriyoidlerden bitkiciklerin oluşma oranını arttırmak için anterlerin ilk kùltür ortamından, rejenerasyon ortamına, gelişmelerinin erken bir devresinde transfer edilmesinin etkili olduğu belirtilmiş ve bu devre, kùltür ortamındaki anterin çatlamaya başladığı ve anter içinden embriyoidlerin henüz açığa çıkarak görüldükleri devre olarak verilmiştir. Kùltüre alınan anterlerin %2-3 civarındaki bir kısmından embriyoidlerin oluştuğu, yaklaşık %10'undan ise kallusların geliştiği belirtilmiştir. Denemenin sonucunda, gerek embriyoidlerden, gerekse kalluslardan, ümit verici bazı androgenik bitki hatları elde edilmiş, ancak kalluslardan elde edilen bazı hatların üniform olmayıp, heterozigot yapıda oldukları vurgulanmıştır (Anonymous 1978).

Rotino ve ark. (1987), patlıcan anterlerini, modifiye edilmiş C_p kültür ortamı ve R_1 farklılaştırma ortamını kullanarak kültüre almışlardır. Toplam olarak, 303 anterden 227 bitki elde edilmiştir. Bu sayı, kültüre alınan toplam 6937 anterin %4.4'üdür. Anterlerin tepkisi genotipe önemli düzeyde bağlı bulunmuş, en iyi sonuç, 100 anter başına 5.8 bitki ile Burpee F_1 çeşidinden elde edilirken, L63x57 çeşidinde bu rakam 4.2 olmuş, Picentia çeşidinden ise hiç bitki elde edilememiştir. Ortam bileşimi androgenesis üzerine etkili olmuş ve ortam ile genotip arasında bir interaksiyon olduğu belirlenmiştir. Deneme sonucunda elde edilen bitkilerin ploidi seviyesi incelendiğinde, bitkilerin yaklaşık %60'ının haploid, diğerlerinin ise diploid olduğu görülmüştür.

Tuberosa ve ark. (1987a)'nın yaptıkları çalışmada, serada ve arazide yetiştirilen patlıcanlardan materyal alınarak anter kültürü çalışmaları yapılmıştır. Denemede kültüre alınan toplam 8639 anterden 421 bitkicik elde edilmiştir. 100 anter başına rejenere edilen en yüksek bitki sayısı hibrit çeşitlerde 42 iken, bu hibritlerin elde edildiği ebeveyn hatlarda 19.5 olmuştur. Toprağa transferde tutan 328 bitkiden 77'sinin diploid, 250'sinin haploid, 1'inin ise trizomik olduğu, yani genomunda diploid kromozom sayısının 1 fazlasını taşıdığı belirlenmiştir.

Tuberosa ve ark. (1987b), patlıcanda yaptıkları diğer bir çalışmada, Black Jack, Lunga violetta di Romagna, Dourga, PI G23330, PI 351129, Burpee 4310, Baluroi ve PI G23329 çeşitlerinden toplam 3977 anteri, Temmuz başından Ekim sonuna kadar birer haftalık aralarla kültüre almışlardır. Tomurcukların sterilizasyonuna rağmen, kültürün ilk 30 günü içerisinde petri kaplarının içinde patojenlerin gelişmesi nedeniyle anterlerin %34'ü çıkarılmıştır, zira bir petri kabı içerisindeki anterlerin yalnızca biri bile enfeksiyona uğramış olsa, bu petri içindeki, bir tomurcuktan alınan anterlerin tümünün çıkarılması gerekmiştir. Serada yetiştirilen bitkilerden önceden ayrılan anterlerle gerçekleştirilen diğer bir denemede bulaşma yüzdesi daha düşük (%14) olarak tesbit edilmiştir. Bu durum, anterlerin alınacağı bitkileri kontrollü şartlarda yetiştirmenin daha uygun olacağı fikrini vermektedir. Denemeye alınan 8 çeşitten, *in vitro* devre sonucunda 257 bitkicik elde edilmiştir. Saksılara şaşırtılan 207 bitkinin ploidi düzeyleri incelendiğinde, bitkilerin %77'sinin haploid, %23'ünün

ise diploid olduğu görülmüştür. Tomurcuk alma tarihine göre oluşan bitki sayısı açısından en yüksek değer %15.6 ile Eylül'ün son üç haftasında alınan tomurcuklardan elde edilmiştir. Anterlerden oluşan haploid bitkilerin frekansı, genotiplere göre %0-42 arasında değişmiştir.

Kaloo (1988), patlıcanda anterlere 5-8°C'de 4 gün süreyle ön uygulama yapıldığında ve polenler MS makro besin ortamında ve 800 mg/l glutamin, 100 mg/l serin, 5 mg/l myo inositol, 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin ihtiva eden sıvı ortamda kültüre alındığında haploid bitkilerin üretiminde başarı elde edildiğini belirtmiştir.

Yadav ve ark. (1989) ise *Solanum melongena*'nın androgenik kallusu yani, polen hücrelerinin bölünmesiyle meydana gelip, kök ve sürgünler oluşturarak haploid bitkilere dönüşen kallus üzerinde morfogenetik çalışmalar yapmışlardır. Bitki doku kültürü tekniklerinin bitki ıslahında başarılı olarak uygulanabilmesi için bitki rejenerasyonunun morfogenetik, fizyolojik ve biyokimyasal düzeylerde incelenmesinin önemini vurgulayan araştırmacılar, patlıcanın (*Solanum melongena* L. cv. H4) androgenik kallusunda sürgün ve kök oluşumu sağlayan morfogenetik olayları açıklamışlardır. Androgenik kallus, anterleri tek çekirdekli gelişme aşamasında, 2 mg/l indolasetik asit ve 1 mg/l kinetin ihtiva eden GD besin (Gamborg ve Chalupa) ortamı üzerinde, karanlıkta 25°C'de kültüre almak suretiyle elde edilmiştir. Kalluslar, 0.1 mg/l naftalen asetik asit ve 2 mg/l kinetin ihtiva eden (GD) farklılaştırma ortamı üzerinde alt kültüre alınmışlardır. Bu kültürler 16 saat ışık ve 8 saat karanlık döngüsünden oluşan şartlarda tutulmuşlardır. Farklı gelişme aşamalarındaki kalluslar kesitlere ayrılıp boyanmıştır. Anter kökenli kallus, çevresel meristematik hücrelerin faaliyetiyle gelişmeye başlamıştır. İletim demetleri oluşumunun ilk göstergesi, trakeid hücrelerinin ve kanal elemanlarının oluşumu olmuştur. Sürgün oluşturan kallusta meristematik aktivite çevresel bölgelerde meydana gelmiştir. Erken devrelerde sürgün ve kök oluşturan meristemlerin ayrılması mümkün olmamıştır.

Sanguineti ve ark. (1990), patlıcanın androgenik hatlarını değerlendirmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, anter kültürü yoluyla elde edilmiş onsekiz patlıcan

dihaploidini ve bunlara karşılık gelen ebeveyn hatları tarla denemesinde değerlendirmişlerdir. F₁ hibrit kökenli dihaploidler arasında oniki tanesi, ebeveyn ortalamasından daha yüksek verime sahip olmuşlardır. Dihaploidlerden 4'ünün toplam verimi, yüksek verimli ebeveynlerden önemli ölçüde daha yüksek olmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, F₁ hibritlerinden, pratik ıslah amaçları için uygun olan anter kökenli dihaploidlerin elde edilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir.

Karakullukçu (1991) tarafından 13 patlıcan çeşidinde yapılan 8 ayrı denemenin sonucunda, patlıcanda androgenesis olayının genotiple yakın bir ilişki içinde olduğu görülmüştür. Kullanılan çeşitler içerisinde yalnızca Halep Karası ve Baluroi F₁ çeşitlerinden haploid bitki elde edilebilmiş, Prelane F₁ ve Kemer çeşitlerinde de embriyolar oluşmakla birlikte bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir. Diğer çeşitlerden (Dourga, Pala, Adana, Topan, Şeytan, Black Beauty, Marfa F₁, Fabina F₁, Galine F₁) haploid embriyo veya bitki elde edilememiştir. Çalışmanın değişik aşamalarında toplam 22 adet embriyo ve 13 adet haploid bitki elde edilmiştir.

Rotino ve ark. (1991) androgenik ve embriyogenik patlıcan hatları arasındaki varyasyonu gözlemek amacıyla yaptıkları çalışmada kendilenmiş çeşit Dourga'nın 9 adet katlanmış haploid bitkisini ve saf çeşit Floralba'nın 13 somaklonal bitkisini kendilemişler ve bunların döllerini, onlara karşılık gelen ebeveynlerin eşeysel olarak kendilenmiş döleriyle agronomik ve morfolojik özellikler açısından kıyaslamışlardır. Katlanmış haploid hatlar, ölçülen tüm özellikler açısından kontrolden önemli farklılıklar gösterirken, somaklonal hatlar yalnızca verim ve meyve ağırlığı bakımından farklı olmuşlardır. Katlanmış haploid hatların verim ve morfolojik özellikleri, bunlara karşılık gelen ebeveyninkilere göre yüksek veya düşük olabilirken, somaklonal hatların özellikleri kontrole kıyasla düşmüştür.

Matsubara ve ark. (1992), Wase Shinkuro patlıcan çeşidinin anterlerini 1988 ve 1989 yıllarında Eylül ve Kasım ayları arasında, arazide çiçeklenen bitkilerden almışlardır. Alınan anterlerdeki polen hücrelerinin tek çekirdekli devrede olduğu gözlenmiştir. Kültür ortamı olarak, %3 sakkaroz ilave edilmiş ve pH'sı 5.7'ye ayarlanmış olan MS ortamı kullanılmıştır. Ortamı jelleştirmek için agar veya Gelrite

kullanılmış olup, kinetin veya 2,4-D temel besin ortamına 0 ile 0.1 mg/l arasında değişen konsantrasyonlarda eklenmiştir. Kùltürler 25°C sıcaklık ve 16 saat gün uzunluğuna yerleştirilmişlerdir. Embrioid oluşumu ve adventif sürgün rejenerasyonunu arttırmak için anterler 2,4-D ve kinetinin 0 ila 0.5 ppm arasındaki 6 kombinasyonunun kullandığı ortamlar üzerinde kùltüre alınmış, ayrıca kùltürler 35°C'de 24 veya 48 saat, 5°C'de 24 veya 48 saat, ya da 5°C'de 24 veya 48 saati takiben 35°C'de 24 veya 48 saatten oluşan sıcaklık şoklarına tabi tutulmuşlardır. Tüm ortamlardaki patlıcan anterleri 35°C'de 24 saat tutulduğunda daha yüksek oranda kallus oluşturmuşlar, ayrıca 2,4-D ve kinetinin 0.1 mg/l kullandığı MS ortamındaki anterler %35.8 ile en yüksek kallus oluşumu ve %4.9 ile en yüksek embrioid oluşumu değerlerine sahip olmuşlardır. 1 mg/l kinetin + 0 ve 0.05 mg/l NAA içeren ya da hormonsuz olan ortamlarda, kalluslardan %5.9-9.2 oranında embrioidler oluşmuş, bu hormon konsantrasyonlarına sahip ortamlarda ve ilaveten 4 mg/l kinetin ve 1 mg/l NAA içeren ortamda ise kalluslardan %4.8-7.5 arasında değerli oranlarda adventif gözler rejenere olmuştur. Ortamı katılaştırmak için kullanılan ađar ve Gelrite karşılaştırıldığında ise, sürgün uzunluğu ve taze ağırlığı bakımından her iki maddenin de önemli etkide bulunmadığı, kök yoğunluğu ve taze ağırlığı bakımından ise Gelrite ortamındaki değerlerin yaklaşık yarı yarıya düşük olduğu belirlenmiştir.

Karakullukçu ve Abak (1993 a) patlıcanda anter kùltürü yoluyla haploid bitki elde etmek için en uygun mikrospor gelişme dönemini araştırmışlardır. Pala, Kemer, Baluroi ve Prelane F₁ eřitlerinin kullandığı denemede sekiz farklı büyüklük ve gelişme devresindeki anterler kùltüre alınmıştır. Çeşitlerin meyve şekline göre, tomurcuk büyüklükleri veya uzunlukları arasında farklılık olmakla birlikte, genel olarak ta yaprakların seviyesinin çanak yaprakların birleşme yerinde olduğu 5. gelişme dönemi ile, çanak yaprakların hafifçe açılmaya başladığı ve ta yaprakların 1-2 mm'lik kısmının görüldüğu dönem olan 6. gelişme dönemi, patlıcan anter kùltürü yoluyla haploid embriyo elde etmek için en uygun dönemler olarak bulunmuştur. Bu devrede tomurcuk uzunluklarının çeşitlere bağlı olarak 22.4-24.7 mm, tomurcuk çaplarının 10.8-12.5 mm olduğu belirlenmiştir. Sitolojik incelemelerde ise bu

devrenin polen mitozundan hemen önceki devreye karşılık geldiği görülmüştür. 5. ve 6. tomurcuk gelişme döneminde kültüre alınan patlıcan anterleri içinde Baluroi F₁ çeşidine dahil olanlar 100 anter başına 6.9 adet haploid bitki vermiştir. Diğer üç çeşitte anterler androgenik bir yapı gösterdikleri halde, embriyo oluşumu meydana gelmemiştir.

Araştırmacılar ayrıca, besin ortamına değişik düzeylerde katılan bazı organik maddelerin (sakkaroz, glikoz, aktif karbon) ve büyüme düzenleyicilerin (kinetin, zeatin, 2,4-D, NAA) patlıcan anter kültüründe haploid bitki oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. İlk 12 gün boyunca, %12 sakkaroz uygulaması, %3 sakkaroz veya %6 sakkaroz + %6.3 glikoz uygulamalarına kıyasla daha iyi sonuç vermiştir. Aktif karbonun embriyo oluşumuna olumlu bir etkisi gözlenmemiştir. Anterler kinetin + 2,4-D kombinasyonlarında, zeatin + 2,4-D veya kinetin + NAA kombinasyonlarına göre daha iyi cevap vermişlerdir. Çalışmanın değişik aşamalarında 5 mg/l kinetin + 5 mg/l 2,4-D ve %12 sakkaroz kullanılan ortamlarda Baluroi F₁ çeşidinde %12.1, Kemer çeşidinde %1.5 ve Halep Karası çeşidinde %3.8 oranında embriyo elde edilmiştir (Karakullukçu ve Abak 1993 b).

Tokumo ve ark. (1994), tek çekirdekli mikrosporlar içeren patlıcan (*Solanum melongena* cv. Wake Shinkuro) anterlerini, 0.02 mg/l 2,4-D, 0.02 mg/l kinetin, %3 sakkaroz ve %0.2 Gelrite eklenmiş olan MS ortamında kültüre almışlar, ve oluşacak haploidlerin sayısını arttırmak için yüksek ve düşük sıcaklıklara tabi tutmuşlardır. Kültüre alınan anterler, 35°C'de 48 saat süreyle tutulmuşlar ve sonradan mikrospordan embriyoidlerin geliştiği gözlenmiştir. Yüksek sıcaklık uygulanan anterlerde kallus oluşturma oranı %28'e kadar çıkarken, uygulama yapılmayan anterlerde bu oran yalnızca %14 olmuştur. Embriyoidler ise, yalnızca uygulama yapılan anterlerden elde edilmiş ve embriyoid oluşturan anterlerin oranı %5.1 olmuştur. Yaz mevsiminde çiçek tomurcuklarına 0, 5 ve 10 gün süreyle yapılan düşük sıcaklık (4°C) ön uygulamaları, embriyoid oluşumu bakımından etkisiz olmuş, uygulama süresi uzadığında kallus oluşumu da engellenmiştir.

Miyoshi (1996), patlıcanda izole edilmiş mikrosporların başlangıç kültürlerinden morfogjenik kalluslar elde etmiştir. Kallus teşviki için, yeni izole edilmiş mikrosporların başlangıçta 3 gün süreyle, yüksek sıcaklıkta (35°C) sakkarozsuz ortamda kültüre alınması şart olarak görülmüştür. Bundan sonra mikrosporlar, %2 sakkaroz ve bitki hormonlarını (0.5 mg NAA ve 0.5 mg BA/l) ihtiva eden NLN besin ortamında, karanlıkta, alt kültüre alınmışlardır. Alt kültürün 4 haftasından sonra, mikrospor kökenli küçük kalluslar sürgün rejenerasyonu için 4 mg/l zeatin ve 0.2 mg/l IAA ihtiva eden MS ortamına transfer edilmişlerdir. Rastgele seçilen 12 rejenere bitkinin ploidi, kök uçlarında yapılan kromozom sayılarıyla belirlenmiştir. Bitkilerden yalnızca 1'i haploid, 7'si diploid, 3'ü triploid ve 1'i tetraploid olmuştur. Diploidler, kendine tozlamadan sonra tohum tuttuklarından ve döllerinde morfolojik özellikler bakımından açılma göstermediklerinden, bunların spontan olarak eşlenmiş haploidler oldukları sonucuna varılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma 1994-1999 yılları arasında, Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde yürütülmüş, ancak 1996 yazı denemelerinde Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü olanaklarından da yararlanılmıştır. Ayrıca, kromozom sayımları ve oluşan bitkilerin toprağa transferinde Beta-Yenişehir'deki laboratuvar ve iklim odası olanaklarından da faydalanılmıştır. Değişik patlıcan çeşitlerinde farklı besin ortamlarının ve yetiştirme koşullarının androgenesis üzerine etkisi araştırılmıştır.

3.1. Materyal

Araştırmada materyal olarak 8 hibrit (Baluroi, Barbantane, Bellissima, Ancha, Leila, Milela, Munica, Purpurea), 6 standart (Pala, Kemer, Adana, Topan, Manisa, Aydın Siyahı) çeşit ve yerli popülasyonlardan Urfa Yerlisi olmak üzere toplam 15 patlıcan genotipi kullanılmıştır.

Denemede kullanılan çeşitlerden Munica, Milela, Ancha ve Purpurea, Sandoz A.Ş. Tohumculuk şirketinden; Baluroi, Kemer ve Pala May Tohumculuk A.Ş.'nden; Manisa, Topan ve Aydın Siyahı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden; Adana, Agromar A.Ş. firmasından, Barbentane, Leila ve Bellissima, Beta Ziraat ve Tohumculuk A.Ş.'den, Urfa Yerlisi popülasyonunun tohumları ise Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'nden temin edilmiştir.

1994 yılındaki ön denemelerde, Barbentane, Leila, Bellissima, Adana ve Urfa Yerlisi dışındaki tüm yerli ve hibrit çeşitler kullanılırken, 1995 yılındaki denemelerde Pala, Kemer, Topan ve Aydın Siyahı çeşitleri kullanılmıştır.

1996 yılında, Bursa'daki denemelerde Kemer ve Baluroi, Ankara'daki denemelerde Kemer ve Urfa Yerlisi olmak üzere toplam 3 genotip kullanılmıştır.

1998 yılında ise, önceden kullanılmış olan Pala, Kemer, Topan, Adana ve Mileda çeşitlerinin yanısıra, Barbentane, Bellissima ve Leila çeşitleri de denemeye ilave edilerek, toplam 8 çeşitle çalışmalar yürütülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

1994 yılındaki ön denemelerde ve 1995 yılında yapılan denemelerde, tohumlar ilkbaharda $\frac{1}{2}$ toprak + $\frac{1}{2}$ yanmış ahır gübresi ile doldurulmuş olan viyoller içine ekilerek, seraya yerleştirilmiştir. Oluşan fideler, 2 yapraklı devredeyken 14 cm çap ve 13 cm derinlikteki küçük plastik saksılara şaşırılmışlardır. Bitkilerin yetiştirildiği dönemde ısıtmasız plastik sera içindeki sıcaklıkların minimum 9.2°C ile maksimum 32.3°C arasında değiştiği belirlenmiştir. 1994 yılındaki ön denemelerde, bitkilerin bir kısmı araziye bir kısmı ise 32 cm çap ve 29 cm derinlikteki, içerisinde $\frac{1}{2}$ toprak + $\frac{1}{2}$ ahır gübresi karışımından oluşmuş harç bulunan plastik saksılara dikilerek, serada yetiştirilmiş; her iki gruptan da materyal alınmıştır. 1995 yılındaki denemelerde ise yalnız seradaki saksılarda yetiştirilen bitkiler kullanılmıştır. 1994 yılındaki ön denemelerde bitkilerden tomurcuklar Temmuz ayında toplanmaya başlanırken, 1995 yılındaki esas denemelerde serada yetiştirilen bitkilerden Ocak-Ekim ayları arasında tomurcuk alınmıştır.

Esas denemelerin ikinci serisi 1996 yılında yürütülmüş, denemelerin Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde gerçekleştirilen kısmında tohumlar Nisan başında ısıtılmayan seradaki tahtalar üzerine ekilip, üzerlerine yanmış-elenmiş ahır gübresinden oluşan kapak atılmış, burada gelişen fideler Mayıs sonunda direkt araziye dikilmişlerdir. Serin giden hava şartları nedeniyle çiçeklenmeleri geciken bitkilerden Ağustos başlarında tomurcuklar toplanmaya başlanıp, tomurcuk alımına Eylül başlarına kadar devam edilmiştir.

1996 yılındaki denemelerin Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde yürütülen kısmında ise, ilkbaharda tohumları ekilip yazın araziye alınan bitkilerden Ekim başından, Ekim sonuna kadar tomurcuk alınmıştır.

Anter kültürü denemelerinin son kısmı, 1998 yazında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Bu yılki denemelerde, Nisan ayında tohumları viyoller içine ekilen ve Haziran sonunda araziye dikilen bitkilerde Ağustos ortasına doğru başlayan tomurcuk alma işlemi, Ekim'in ilk haftasına kadar sürmüştür.

3.2.2. Çiçek Tomurcuklarının Toplanması

Çiçek tomurcukları toplanırken, Karakullukçu (1991) tarafından 8 gelişme devresine ayrılmış tomurcuklar içerisinde, 5. ve 6. devredeki tomurcukların alınmasına özen gösterilmiştir. Bu 8 devrenin en erkeni olan 1. devre tomurcuklarında, tomurcuklar henüz küçük (yaklaşık 1 cm boyunda) ve kapalı, anter rengi çok açık yeşilken; 8. devredeki tomurcuklar patlamak üzere, taç yapraklar pembe, anterler koyu sarı, kenarları mor çizgili bir görünüm arz etmektedir. İlk devre tomurcuklarında yalnızca mikrospor ana hücrelerine rastlanırken, sekizinci aşamadaki tomurcuklarda çoğunlukla olgun polenler saptanmıştır. Denemelerimizde kullanılan devrelerden, 5. devre tomurcuklarında çanak yapraklar açılmak üzere, taç yapraklar birleşme yerine gelmek üzere, anterler yeşilimsi sarı renkte olup, tomurcuk boyları çeşitlere bağlı olmakla birlikte 22.4 ile 24.7 mm arasında, tomurcuk çapları ise 10.1 ile 11.7 mm arasında değişmektedir. Bu devredeki tomurcuklardan alınan anterler içerisinde çok sayıda tek çekirdekli mikrosporun bulunduğu, bunun yanında tetratlara da rastlandığı yine Karakullukçu (1991) tarafından bildirilmiştir. 6. devre tomurcuklarında ise, taç yapraklar, çanak yaprakların birleşme yeri seviyesinde ve hafifçe görünmekte, anterler yeşil sarı renkte olup, tomurcuk boyları, 23.6 ile 24.6 mm arasında, tomurcuk çapları ise 11.7 ile 12.5 mm arasında değişmektedir. Bu devre tomurcuklarından alınan anterlerin içinde 1. polen mitozu aşamasının değişik devrelerindeki mikrosporların bulunduğu, Karakullukçu (1991) tarafından belirtilmiştir.

Şekil 3.1'de, patlıcanda sekiz farklı gelişme dönemine ait çiçek tomurcukları görülmektedir. Bunların arasında işaretlenmiş 5. ve 6. gelişme dönemindeki tomurcuklar, çalışmamızda kullanılan tomurcuk büyüklüğünü göstermektedir.



Şekil 3.1. Sekiz Farklı Gelişme Devresindeki Patlıcan Tomurcukları.

3.2.3. In Vitro Kültürler

3.2.3.1. Besin Ortamlarının Hazırlanması

1994 yılında yapılan ön denemelerde çeşitli hormon tip ve dozları denenmiş, ancak bunların hiçbirinde embriyo oluşumu meydana gelmemiştir. Sadece bazı ortam bileşimlerinde, filamentlerin kesim yüzeyinden kallus oluşumu elde edilmiştir. Bu nedenle, tüm uygulamalar burada verilmemiştir. Ön denemelerde, kısmen anterin içinden gelişen kallus oluşumu gösterdiği için ümitvar görülen dört bileşim, 1995 yılı denemelerinde kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de, bu denemelerde kullanılan temel besin ortamının organik ve inorganik madde kapsamları görülmektedir (Pierik 1987).

Çizelge 3.1. 1994 Yılındaki Ön Denemelerde ve 1995 Yılındaki Denemelerde Kullanılan MS Temel Ortamının Bileşimi (Pierik 1987).

<u>Makro besin maddeleri</u>	(mg/l)	<u>Mikro besin maddeleri</u>	(mg/l)
KNO ₃	1900	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.300
NH ₄ NO ₃	1650	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600
KH ₂ PO ₄	170	H ₃ BO ₃	6.200
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	KI	0.830
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
<u>Vitamin ve amino asitler</u>	(mg/l)	<u>Fe-Selat</u>	(mg/l)
Myo inositol	100	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Glisin	2.0	Na ₂ EDTA	37.3
Nikotinik asit	0.5		
Piridoksin HCL	0.5	Sakkaroz	30 000
Thiamin HCL	0.1	Agar	7 000

Bu ortamların büyüme düzenleyici kapsamları ise Çizelge 3.2'de verilmiştir. Görüldüğü üzere, 2 ve 3 no'lu bileşimdeki hormon düzeyleri düşük, 1 ve 4 no'lu bileşimdekiler ise yüksektir. 1 ve 4 no'lu ortamlarda BA düzeyi 3 mg/l'de sabit tutulurken, NAA düzeyi değiştirilmiş, 2 ve 3 no'lu ortamlarda ise NAA düzeyi 0.3 mg/l'de sabit tutulurken BA düzeyi değiştirilmiştir. Nitekim, Pierik (1987) de, doku kültürü çalışmalarında kullanılan hormon dozlarınının 0.01-10 mg/l arasında değiştiğini bildirmiştir.

Çizelge 3.2. 1995 Yılındaki Denemelerde Kullanılan Ortamların Büyüme Düzenleyici Kapsamları.

1 no'lu ortam	2 no'lu ortam	3 no'lu ortam	4 no'lu ortam
2 mg/l NAA	0.3 mg/l NAA	0.3 mg/l NAA	1 mg/l NAA
3 mg/l BA	1.0 mg/l BA	0.7 mg/l BA	3 mg/l BA

Besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılan %100 saf kimyasal maddelerin önce stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan x10'luk stok çözeltiler renkli şişeler içerisinde buzdolabında saklanmıştır.

Kültür yapımından bir gün önce, stok çözeltilerden gerekli miktarlar alınıp karıştırılmış ve sulandırılarak esas besin ortamı hazırlanmıştır. Ortamların pH'sı agar katılmadan önce 1 N HCL ve 1 N NaOH ile 5.9'a ayarlanmıştır (Tuberosa ve ark. 1987a).

İçinde ortamın bulunduğu beherglas, manyetik karıştırıcı üzerine konarak, hem ısınıp, hem de homojen olarak karışması sağlanmıştır. Ortam sıcaklığı 70-80°C civarına ulaştığında, agar ortamın içine boşaltılmış, manyetik karıştırıcı bir süre daha çalıştırılıp, ortam sıcaklığı 95°C civarına geldiğinde ve agar ortama iyice dağılıp şeffaflaştığında, beherglas manyetik karıştırıcıdan alınarak, içindeki ortam 1.5 cm çapx15 cm uzunluktaki cam tüplere yaklaşık 15'er ml olacak şekilde doldurulmuştur. Daha sonra, bu tüplerin ağızları pamuklarla sıkı şekilde kapatılmış ve üzerlerine alüminyum folyo örtülerek otoklava yerleştirilmişlerdir. Sterilizasyon işlemi otoklavda 121°C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Otoklavdan çıkarılan tüpler steril kabin içerisine alınarak ertesi güne kadar burada bekletilmiştir.

Dikim ortamlarında oluşan kallusların, kültürün başlangıcından 4-5 hafta sonra transfer edildiği transfer ya da geliştirme ortamı ise esas olarak yine MS formülasyonunda olup, sadece amonyum nitrat kapsamı normalin ¼'ü oranında kullanılmıştır. Amacımız kallustan sürgün elde etmek olduğundan, Pierik (1987)'ye uyularak ortamdaki NH_4NO_3 seviyesi düşürülmüştür. Ayrıca, yine aynı nedenle

ortama büyümeyi düzenleyici olarak, bir sitokinin olan Benzil Adenin (BA) 3 mg/l dozda ilave edilmiştir. Ortamın sakkaroz kapsamı ise Dirr ve Heuser (1987)'ye uyularak yine %3 olarak ayarlanmış, pH 5.9'da tutulmuştur.

1996 ve 1998 yılındaki denemelerde ise, MS ortamı ve Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982) tarafından tavsiye edilen ve C ortamı olarak adlandırılan ortam olmak üzere, başlıca iki farklı ilk dikim ortamı kullanılmış olup, bileşimleri Çizelge 3.3'te verilmiştir.



Çizelge 3.3. 1996 ve 1998 Yılındaki Denemelerde Kullanılan İki Farklı Dikim Ortamının Bileşimleri (Karakullukçu 1991).

MS Ortamı		C Ortamı	
Makro Bileşikler	(mg/l)	Mikro Bileşikler	(mg/l)
KNO ₃	1900	KNO ₃	2150
NH ₄ NO ₃	1650	NH ₄ NO ₃	1238
KH ₂ PO ₄	170	MgSO ₄ .7H ₂ O	412
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	CaCl ₂ .2H ₂ O	313
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	KH ₂ PO ₄	142
		Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	50
		NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	38
		(NH ₄) ₂ SO ₄	34
		KCl	7
Mikro Bileşikler	(mg/l)	Mikro Bileşikler	(mg/l)
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.300	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.130
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600	ZnSO ₄ .7H ₂ O	3.625
H ₃ BO ₃	6.200	H ₃ BO ₃	3.150
KI	0.830	KI	0.695
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.188
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.016
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.016
Organik Bileşikler	(mg/l)	Organik Bileşikler	(mg/l)
Myo inositol	100	Myo inositol	50.300
Glisin	2.0	Piridoksin HCl	5.500
Nikotinic asit	0.5	Nikotinic asit	0.700
Piridoksin HCL	0.5	Thiamin HCL	0.600
Thiamin HCL	0.1	Ca-pantetonat	0.500
		Vitamin B ₁₂	0.030
		Biotin	0.005
		Glisin	0.100
Fe Şelat	(mg/l)	Fe Şelat	(mg/l)
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	Na ₂ EDTA	18.65
Na ₂ EDTA	37.3	FeSO ₄ .7H ₂ O	13.90
Sakkaroz	%12	Sakkaroz	%12
Agar	%0.7	Agar	%0.7
pH	5.7	pH	5.7

Bu ortamların her ikisinin de pH'sı, agar ve şeker katılmadan önce, Ellialtıoğlu ve Abak (1993) tarafından, mineral maddelerin iyi çözünürlük gösterdikleri ve hücre bölünmesine uygun olduğu bildirilen 5.7'ye ayarlanmıştır. Kullanılan büyümeyi düzenleyiciler ise, MS ortamında 4 mg/l NAA ve 1 mg/l kinetin; C ortamında 5 mg/l 2,4-D ve 5mg/l kinetin şeklindedir (Karakullukçu 1991).

1996 ve 1998 yılındaki denemelerde kullanılan transfer (R) ortamında ise, büyüme düzenleyici olarak yalnız 0.1 mg/l kinetin kullanılmış olup, ortamın bileşimi Çizelge 3.4'teki gibidir (Karakullukçu 1991).

Çizelge 3.4. 1996 ve 1998 Yılındaki Denemelerde Kullanılan Transfer (R) Ortamının Bileşimi (Karakullukçu 1991).

Makro Bileşikler	(mg/l)	Mikro Bileşikler	(mg/l)
KNO ₃	2150	MnSO ₄ .H ₂ O	20.130
NH ₄ NO ₃	1238	ZnSO ₄ .7H ₂ O	3.225
MgSO ₄ .7H ₂ O	412	H ₃ BO ₃	1.150
CaCl ₂ .2H ₂ O	313	KI	0.330
KH ₂ PO ₄	142	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.138
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	50	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.011
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	38	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.011
(NH ₄) ₂ SO ₄	34		
KCl	7		
Organik Bileşikler	(mg/l)	Fe Şelat	(mg/l)
Myo inositol	50.300	FeSO ₄ .7H ₂ O	13.90
Piridoksin HCl	5.500	Na ₂ EDTA	18.65
Nikotinic asit	0.700	Sakkaroz	%12
Thiamin HCL	0.600	Agar	%0.7
Ca-pantetonat	0.500	pH	5.7
Biotin	0.005		
Glisin	0.100		

Bu ortamları homojen bir şekilde karıştırmak için yine manyetik karıştırıcıdan yararlanılmıştır. Erlenmayerlerdeki ortamlar manyetik karıştırıcıdan alındıktan sonra, ağızları alüminyum folyo ile kapatılmış halde otoklava yerleştirilerek 121°C'de ve ortam hacmine göre 20 dakika ile 30 dakika arasında değişen sürelerde sterilize edilmişlerdir (Biondi ve Thorpe 1981).

Kültüre alma işleminde kullanılan 8 cm çapındaki cam petri kapları, besin ortamlarından önce otoklavda 121°C'de 45 dakika ya da etüvde 170°C'de 120 dakika tutularak sterilize edilmiş ve izolasyon kabiniinde soğumaya bırakılmıştır. Besin ortamları, otoklavdan çıkarıldıktan sonra, steril kabin içerisinde ve aseptik koşullarda, herbir petri kabına yaklaşık 15 ml düşecek şekilde doldurulmuştur.

Anterlerden gelişen bitkiciklerin geliştirilmesi için ise, herhangi bir büyüme düzenleyici içermeyen, %2 oranında sakkaroz ilave edilmiş MS ortamı kullanılmıştır. Gereken maddeler konulduktan sonra pH'ları 5.7'ye ayarlanıp manyetik karıştırıcıda ısıtılarak karıştırılan ortam, 2.5 cm çap x 15 cm uzunluktaki tüplere yaklaşık 15'er ml olacak şekilde doldurulmuş ve tüplerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Ortamlar otoklavda sterilizasyondan sonra dikime hazır hale gelmişlerdir (Karakullukçu 1991).

3.2.3.2. Anterlerin Çıkartılması ve Dikim

Ana bitkilerden toplanan çiçek tomurcukları, %20'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 20 dakika süreyle dezenfekte edilmiş, daha sonra dezenfektan kalıntılarını uzaklaştırmak üzere üç kez beşer dakika süreyle steril saf suyla durulanmıştır. Anterler, çiçek tomurcukları içerisinde bistüri ve pens yardımıyla çıkarılmışlardır (Karakullukçu 1991). Bu sırada anterlerin zedelenmemesine ve filamentsiz olarak çıkarılmasına özen gösterilmiş, filament kalıntıları da dikkatlice kesilerek anterlerden uzaklaştırılmıştır. Anterler, besin ortamı üzerine ortama batırılmaksızın yerleştirilmişler; bu esnada sırt kısımlarının ortamlarla temas etmesine çalışılmıştır. 1994 yılındaki ön denemeler ile, 1995 yılındaki denemelerde bölüm laboratuvarında ortam havasını sürekli süzerek temizleyen laminar-flow kabinin

bulunmaması nedeniyle anterlerin dikimi, herhangi bir hava filtrasyonunun sağlanmadığı UV ışınli kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. 1996 yılındaki denemeler, laminar-flow cihazının mevcut olduğu Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarında gerçekleştirildiğinden, geniş yüzey alanına sahip petri kaplarının kullanılması ve dolayısıyla daha fazla sayıda anterin kültüre alınması mümkün olmuştur. 1998 yılındaki denemeler, bölüm laboratuvarına laminar-flow cihazı sağlanmış olduğundan, yine petri kapları kullanılarak U.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2'de petri kabı içerisine dikilmiş olan anterler görülmektedir.



Şekil 3.2. Petri Kabı İçerisindeki Anterlerin Görünüşü.

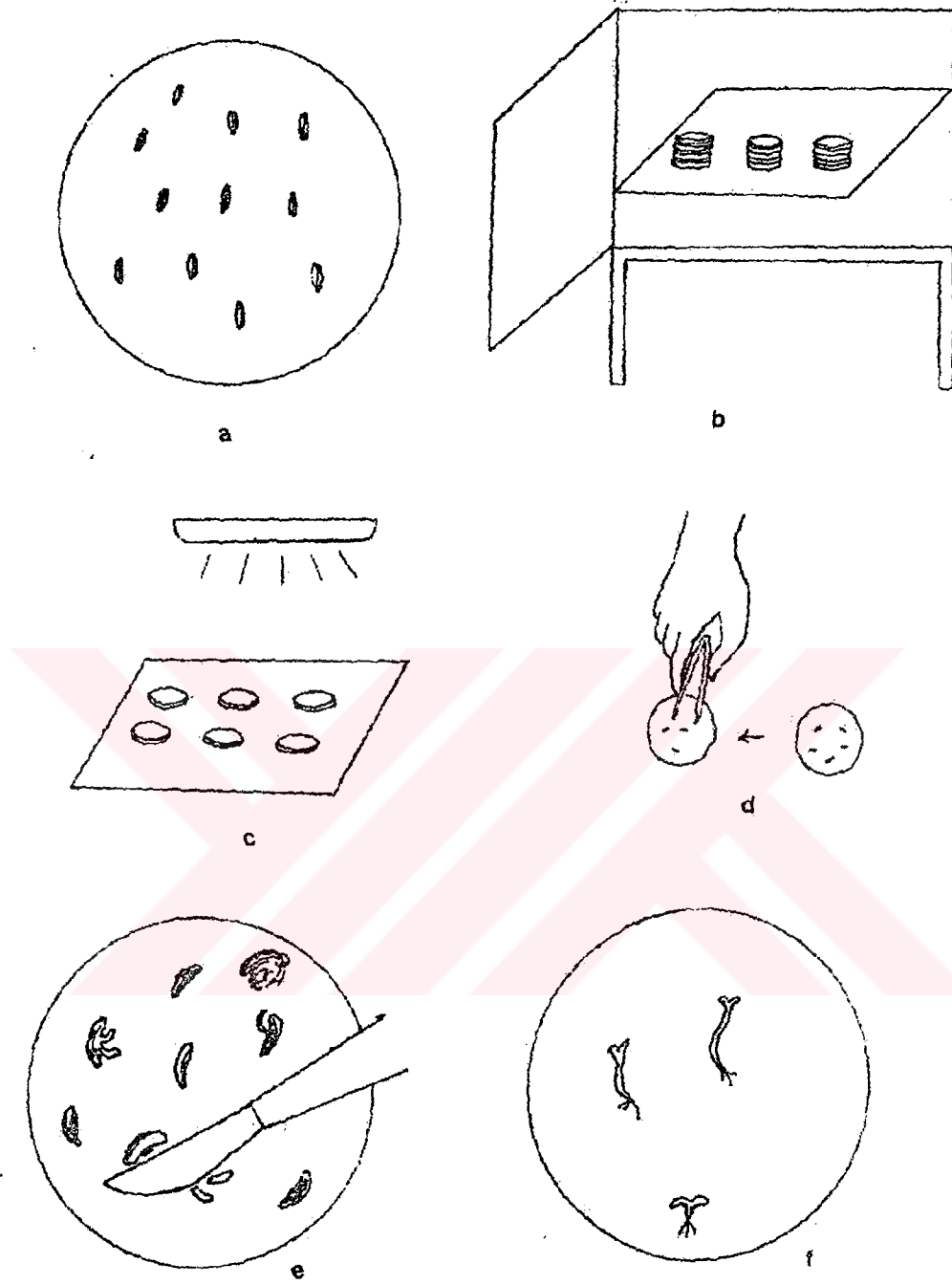
Bir petri kabına genelde iki çiçek tomurcuğundan çıkan anterlerin tümü dikilmiş, bu sayı 10 ile 17 arasında değişmiştir. Dikimden sonra, petri kaplarının kapakları kapatılarak, kenarları ince plastik film şeritlerle sarılmış, böylece dış ortamdan enfeksiyon almaları önlenmiştir.

3.2.3.3. *Kültür Koşulları*

1994'te yapılan ön denemeler ile, 1995 yılı denemeleri sırasında kültürler, 25°C sıcaklıktaki ve 16 saat gündüz, 8 saat gece ışıklanma şartlarına sahip iklim dolaplarına yerleştirilmişlerdir (Karakullukçu 1991).

1996 ve 1998 yaz dönemlerinde yapılan denemelerde ise, her iki ortamdaki kültüre alınan anterler Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982) ve Karakullukçu (1991)'ya uyularak önce 35°C'deki etüvde ilk 8 gün boyunca karanlıkta tutulmuşlar, daha sonra ise 25°C sıcaklık ve 16 saat gün uzunluğuna ayarlı iklim dolabına alınmışlardır. Bu ortamda 4 gün daha bekletilen anterler, 12. günden sonra transfer (R) ortamına aktarılmışlardır. Anterler bundan sonra iklim dolabında 25°C sıcaklık ve 16 saat gün uzunluğunda gelişmeye bırakılmışlardır.

Anterlerden ortalama olarak kültürün 50.-60. gününden itibaren embriyoidler çıkmaya başlamış, bu çıkan embriyoidler petrilerdeki hormonsuz MS ortamında geliştirilmeye alınmıştır. Şekil 3.3'te anterden, kotiledon yapraklı embriyoid oluşumuna dek geçen safhalar görülmektedir.



Şekil 3.3. Anterlerden Kotiledon Yapraklı Embriyoid Oluşumuna Dek Geçen Safhalar: a) Anterlerin petri kaplarında kültüre alınması, b) Kültüre alınan anterlerin ilk 8 gün boyunca 35°C'ye ayarlı etüvde, karanlıkta inkübasyonu, c) 8. günden sonra aydınlıkta inkübasyon, d) 12. günden sonra anterlerin transfer ortamına alınması, e) Anterlerden çıkan embriyoidlerin kesilerek ayrılması, f) Gelişerek bitkiciklere dönüşmeye başlayan embriyoidlerin, 2-3 tanesi bir petride olacak şekilde hormonsuz MS ortamına transferi.

Embriyoidler gerçek yaprakları çıkararak bitkicik haline dönüştüğünde 2.5 cm çaplı tüplerdeki hormonsuz MS ortamına dikilmişlerdir. Burada gelişen bitkicikler deney tübünü iyice dolduracak hale geldiğinde, birkaç parçaya ayrılarak *in vitro* çelikleme yapılmış, her bir parça ayrı deney tüplerine yerleştirilerek gelişmeye bırakılmışlardır.

3.2.3.4. Gelişen Bitkilerin Toprağa Transferi

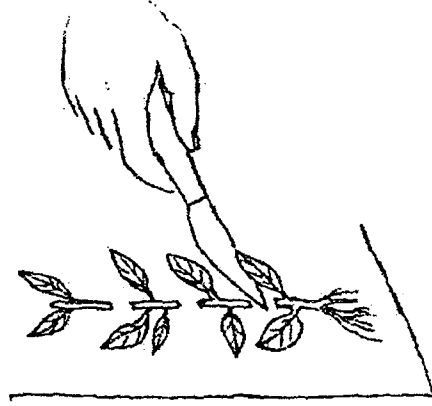
In vitro çelikleme yapılarak klonlanan bitkicikler, gelişip köklenerek deney tübünü iyice doldurduğunda saksılara şaşırtılmaya başlanmıştır. Saksı harcı olarak, Karakullukçu (1991) tarafından tavsiye edilen ve 3/6 torf 2/6 toprak 1/6 yanmış-elenmiş ahır gübresinden oluşan harç kullanılmıştır. Hazırlanan bu harç, otoklavda 121°C'de 90 dakika sterilize edilmiş ve önceden fungusitli suda tutulmak suretiyle dezenfekte edilen 10 cm çaplı saksılar içine boşaltılmıştır (Karakullukçu 1991). Ancak, bu harca dikilen bitkiciklerin birkaç gün içinde hayatietini kaybetmesi nedeniyle, ilk birkaç bitkinin şaşırtılmasından sonra bu harç bırakılarak, yalnızca sterilize edilmiş torf kullanılmıştır. Beta Ziraat ve Tohumculuk A.Ş.'nin Yenişehir'deki tesisleri bünyesinde bulunan iklim odasında, torf ihtiva eden saksılara şaşırtılan bitkiciklerin yaklaşık %80'i sağlıklı ve gelişmiş bitkilere dönüşerek seraya dikilmişlerdir.

Torfa transfer edilecek olan bitkicikler, tüplerden çıkarılarak kökleri Benlate'li saf su ile yıkanmıştır. Steril torf ihtiva eden saksılara dikilen bitkiciklere, can suyu olarak fungusitli su verilmiştir. Bitkilerin üzeri, nem kaybını önlemek üzere beherglaslarla kapatılmış, ancak bunun iyi sonuç vermemesi üzerine, sonraki bitkilerde küçük deliklenmiş PE örtüler kullanılmıştır. Bitkinin büyüme ve gelişmesine bağlı olarak, küçük PE örtüler daha büyük boyutlularla değiştirilmiştir. Saksılardaki bitkilere Omex (1 cc/l), Maxicrop (0.4 g/l) ve Hakaphos Base (0.25 g/l)'den oluşan besin çözeltisi 10 günde bir verilmiştir. Bitkiler saksılarda geliştikten sonra çıkarılıp seraya dikilmişlerdir.

Bir bitkicikten tam bitki oluşumuna dek geçen safhalar Şekil 3.4'de verilmiştir.



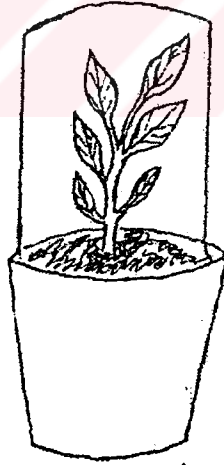
a



b



c



d

Şekil 3.4. Bir Bitkikten Tam Bitki Oluşumuna Dek Geçen Safhalar:
 a) Embriyoidlerden oluşan bitkiciklerin tüplere transferi, b) Gelişip, tüpü dolduran bitkiciklerin, steril kabinde birkaç çelik parçasına ayrılarak in vitro klonlama yapılması, c) Herbiri ayrı tüplere dikilerek köklenmeye alınan çelik parçalarının görünüşü (en sağdaki köklü ana bitkicik parçası), d) Çeliklerden gelişen bitkiciklerin saksılardaki steril harç içine dikilip, üzerlerine beher kapatılması.

3.2.4. Araştırmada Yapılan Sitolojik Gözlemler, Fotoğraf çekimleri ve Sonuçların Değerlendirilmesi

3.2.4.1. Mikrospor Hücrelerinde Sitolojik Gözlemler

Anterler içindeki mikrospora ait gelişme dönemlerinin sitolojik olarak belirlenmesi amacıyla binoküler mikroskop kullanılarak gözlemler yapılmıştır. Gözlemlerde kullanılacak iek tomurcukları sabah saatlerinde bitkiden alınarak hemen 3 kısım alkol, 1 kısım glasiyel asetik asitten oluşan Farmer tesbit zeltisi içine atılmış; burada 1 gün bekletildikten sonra tesbit zeltisi uzaklaştırılarak tomurcuklar %50'lik hidroklorik asit içinde ve 60°C'ye ayarlanan su banyosunda 10 dakika tutularak hidroliz yapılmıştır (Brooks ve ark. 1966). Hidrolizden sonra tomurcuklar saf suyla yıkanarak, anterler çıkarılıp aseto orsein boyası içine konulmuşlardır. Boya içinde 1 gün bekletilen anterler ertesini gün buradan alınıp lamel arasında iyice ezilerek preparatlar hazırlanmıştır (Johansen 1940).

3.2.4.2. Kök Uçlarında Kromozom Sayımı

Tüplerdeki bitkiciklerden kesilerek alınan kök uçları, önce ön uygulama olarak %0.029'luk hidroksiquinolin zeltisinde 3 saat bekletilmişlerdir. Buradan alınan kök uçları, 3 kısım alkol- 1 kısım glasiyel asetik asitten oluşan Farmer tespit zeltisinde birkaç saat bekletildikten sonra, %50'lik hidroklorik asit içinde 60°C'ye ayarlanan su banyosunda 5 dakika tutularak hidroliz yapılmıştır. Materyal daha sonra laktopropionik orsein yöntemiyle boyanarak preparat hazırlanmış ve mikroskopta bakılmıştır (Johansen 1940).

3.2.4.3. Fotoğraf ekimleri

Sitolojik gözlem yapmak amacıyla hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda incelenmiştir. Mikroskoptan çekilen fotoğraflar için Fujicolor 100 ASA renkli film kullanılmıştır. Polen hücrelerinin fotoğraflarının çekilmesinde preparatlar 20 x 10 kez bytlmştir.

Oluşan embriyoidlerin mikroskoptan fotoğraflarının çekilmesinde ise embriyoidler 10 x 0.8 kez büyütülmüştür.

3.2.4.4. Denemelerin Değerlendirilmesi

Anter kültüründe ana bitkilerden alınabilecek eksplant sayıları çok değişken olabilmektedir. Zira, androgenesis açısından uygun devredeki tomurcuk ve dolayısıyla anter sayıları çoğunlukla çeşitlere göre farklı olmakta, ayrıca anterlerin kültürü esnasında enfeksiyonlar nedeniyle olan kayıplar da materyal sayısını çok değiştirebilmektedir. Bu nedenle, çoğu doku kültürü çalışmalarında olduğu gibi anter kültürü denemelerinde de sağlıklı bir istatistiki analiz yapılamamaktadır. Nitekim, Karakullukçu (1991), doku kültürlerinde kullanılan materyalin sayıları eşit olmadığı için çoğunlukla istatistiksel değerlendirme yapılamadığını belirtmektedir. Bu çalışmada da aynı nedenle istatistiki analizler yapılamamış, yalnızca sayıların ve % değerlerin verilmesiyle yetinilmiştir.

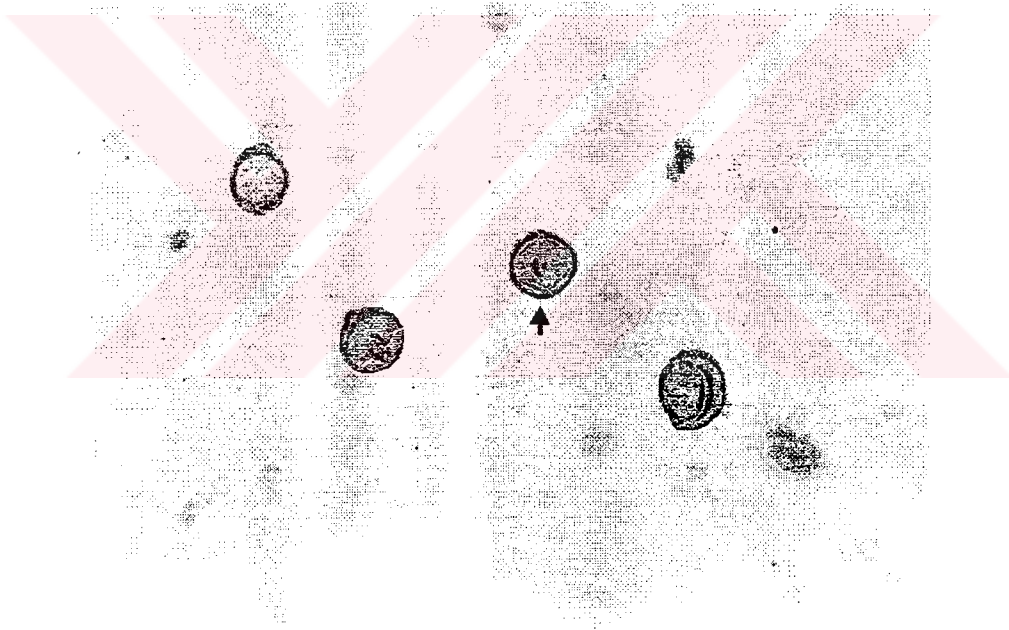
Denemede esas olarak kallus ve embriyo oluşumu üzerinde durulmuş, bu nedenle gözlemlerde kallus oluşum oranı (%) ve embriyoid oluşum oranı (%) gibi özelliklere dikkat edilmiştir. Kallus oluşturan anter sayısının, dikilen anter sayısına oranı kallus oluşum oranını (%), oluşan embriyo sayısının dikilen anter sayısına oranı ise embriyoid oluşum oranını (%) vermiştir.

Yüzde oranlarının belirlenmesinde, enfeksiyona uğrayan petrilerdeki anter sayıları düşüldükten sonra, enfeksiyonsuz anter sayıları esas alınmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Mikrospor Gelişme Dönemleriyle İlgili Araştırma Sonuçları

Ezme yöntemiyle yapılan incelemelerde, farklı devrelerdeki tomurcuklardan alınan anterlerin içerisindeki mikrosporların farklı gelişim aşamalarında oldukları gözlenmiştir. Bu aşamalar, henüz indirgemeye uğramamış diploid mikrospor ana hücresinden, iki çekirdekli olgun polen hücrelerine dek değişmektedir. Karakullukçu (1991) tarafından, anter kültürü için en uygun dönem olduğu bildirilen 5. ve 6. devre tomurcuklarından alınan anterlerde tek çekirdekli polen hücrelerinin hakim olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.1'de tek çekirdekli safhadaki polenler görülmektedir.



Şekil 4.1. Tek Çekirdekli Safhadaki Polenler.

4.2. 1994 Yılındaki Ön Denemelerin Sonuçları

1994 yılındaki ön denemelerde, ümitvar olan çeşitlerin ve yetiştirme ortamlarının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Dolayısıyla, MS temel besin ortamı esas alınmak kaydıyla, çok sayıda büyümeyi düzenleyici madde çeşit ve doz

kombinasyonları kullanılmıştır. Bu ortamlarda, sakkaroz konsantrasyonu %3 olarak tutulurken, kullanılan büyümeyi düzenleyici konsantrasyonları 0.01 ppm ile 5 ppm arasında değişmiştir. Büyümeyi düzenleyici olarak, NAA, IAA, 2,4-D ve BA kullanılmıştır. Bu hormonların düşük ve yüksek dozları denenerek, androgenesis üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca, 5'i yerli, 5'i de hibrit olan 10 çeşit kullanılarak, genotipin anter kültüründeki etkisi gözlenmiştir.

Bu yılki ön denemelerde, toplam 10 çeşitten 2363 anter çok sayıda ortam üzerinde kültüre alınmış ve bunların 709'unda kallus oluşumu görülmüş, genel kallus oluşturma oranı %30.00 olmuştur. Kullanılan ortamların androgenetik gelişme üzerine etkileri arasında önemli farklılıklar bulunmamış, bunlardan ayrıntılı olarak söz edilmesine gerek görülmemiştir. Kullanılan ortamların hiçbirisinden embriyoidler elde edilememiştir. Sadece, oluşan kalluslardan kök gelişiminin gözleendiği 4 ortam ümitvar kabul edilerek, 1995 yılındaki denemelerde kullanılmaları kararlaştırılmıştır.

4.3. 1995 Yılındaki Denemelerin Sonuçları

1995 yılındaki denemelerde, 1994 yılında ümitvar görülen 4 ortam denemeye alınarak, çalışmalar bunlarla yürütülmüştür. Ayrıca, bu seneki denemelerde çeşit sayısı da azaltılmıştır. 1994 yılındaki ön denemelerde, ümitvar çeşitlerin tespiti amacıyla çok sayıda yerli ve hibrit çeşit kullanılırken, 1995 yılında yerli çeşitler üzerinde yoğunlaşmış; Pala, Kemer, Topan ve Aydın Siyahı dışındaki çeşitler denemeye alınmamıştır. 1995 yılındaki denemelerde, çeşitlere ve ortamlara göre kullanılan ve kallus oluşturan anter sayıları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. 1995 Yılındaki Denemelerde Kullanılan ve Kallus Oluşturan Anter Sayıları ve Oranları.

Çeşit	Pala			Kemer			Topan			Aydın Siyahı		
	Kült. Al. Ant. Say.	Kal. Ol. Ant. Say.	Kal. Ol. (%)	Kült. Al. Ant. Say.	Kal. Ol. Ant. Say.	Kal. Ol. (%)	Kült. Al. Ant. Say.	Kal. Ol. Ant. Say.	Kal. Ol. (%)	Kült. Al. Ant. Say.	Kal. Ol. Ant. Say.	Kal. Ol. (%)
1 no'lu ortam	3	1	33.33	27	8	29.63	30	12	40.00	6	5	83.33
2 no'lu ortam	25	3	12.00	34	8	23.53	38	9	23.68	38	7	18.42
3 no'lu ortam	33	4	12.12	29	4	13.79	52	6	11.54	25	5	20.00
4 no'lu ortam	25	5	20.00	30	4	13.33	30	9	30.00	37	11	29.73
TOPLAM	86	13	15.12	120	24	20.00	150	36	24.00	106	28	26.42

Kült. Al. Ant. Say.: Kültüre alınan anter sayısı

Kal. Ol. Ant. Say.: Kallus oluşturan anter sayısı

Kal. Ol. (%) : Kallus oluşum oranı (%)

1 no'lu ortam: 2 mg/l NAA, 3 mg/l BA eklenmiş MS

2 no'lu ortam: 0.3 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA eklenmiş MS

3 no'lu ortam: 0.3 mg/l NAA, 0.7 mg/l BA eklenmiş MS

4 no'lu ortam: 1 mg/l NAA, 3 mg/l BA eklenmiş MS

Çizelge 4.1’de de görüldüğü gibi, en yüksek oranda kallus oluşumu %83.33 ile Aydın Siyahı çeşidinde ve 1 no’lu ortamda elde edilmiş, bunu yine aynı ortamda %40.00 ile Topan çeşidi izlemiştir. En düşük kallus oluşumu ise, %11.54 ile Topan çeşidinde 3 no’lu ortamdan elde edilmiştir. Toplam anter sayısı bakımından tüm çeşitler değerlendirildiğinde ise en yüksek kallus oluşumunun %26.42 ile Aydın Siyahı çeşidinde görüldüğü, bunu sırasıyla %24.00 ile Topan, %20.00 ile Kemer ve %15.12 ile Pala çeşitlerinin izlediği görülmektedir.

Görüldüğü üzere, 1995 yılındaki denemelerde de yalnız kallus meydana gelmiş, embriyoid veya bitkicik oluşmamıştır. Bu kallusların bazısından kökler rejenera olmakla birlikte, sürgün rejenerasyonu gerçekleştirilememiş, dolayısıyla bu kallusların hiçbiri bitkiye dönüşmemiştir. Bu nedenle, bu yılki denemelerde de androgenesis açısından başarılı sonuç elde edilememiştir.

4.4. 1996 Yılındaki Denemelerin Sonuçları

1996 yılı denemeleri, önceden de belirtildiği gibi, Ankara ve Bursa olmak üzere iki farklı yörede yürütülmüştür.

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’ndeki denemelerde bitkilerden 6 Ağustos’tan itibaren tomurcuk alınmaya başlanmış ve tomurcuk alımına yaklaşık birer haftalık aralarla 4 Eylül’e kadar devam edilmiştir. Burada gerçekleştirilen denemelerde Kemer ve Urfa yerlisi çeşitlerinden toplam 1276 anter kültüre alınmıştır.

Bu yılki denemelerin Bursa’daki kısmında ise, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nde yetiştirilen bitkilerden Ankara’daki denemelerin tamamlanmasından sonra, 7 Ekim tarihinde tomurcuk alımına başlanmış, en son 30 Ekim’de alınan tomurcuklarla kültüre alma işlemlerine tümüyle son verilerek, yalnızca gelişen anterlerin ve oluşan embriyoidlerin transferi işlemleriyle çalışmalara devam edilmiştir.

Ankara'da yapılan denemelerde, çeşitlere ve ortamlara göre kullanılan, kallus oluşturan anter sayı ve oranları ile, oluşan embriyoid sayısı ve embriyoid oluşum oranları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. 1996 Yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde Yapılan Denemelerde Kullanılan Anterlere Ait Kallus ve Embriyoid Oluşum Değerleri.

Çeşit	Ortam	Kült. Al. Ant. Say.	Kal. Ol. Ant. Say.	Kal. Ol. (%)	Oluşan Emb. Say.	Emb. Oluş. Oranı (%)
Kemer	C	490	240	49.98	18	3.67
	MS	195	70	35.90	4	2.05
Urfa Yerlisi	C	428	199	46.50	21	4.91
	MS	163	61	37.42	3	1.84

(C ortamına 5 mg/l 2,4-D ve 5 mg/l kinetin ilave edilmiş, MS ortamına ise, 4 mg/l NAA ve 1 mg/l kinetin eklenmiştir.)

Çizelge 4.2'den de görüleceği gibi, çeşitlerin aynı ortam üzerinde gösterdikleri kallus oluşum değerleri arasında fazla bir farklılık bulunmamaktadır. C ortamında Kemer çeşidi %49.98 oranında kallus oluşumu verirken, Urfa yerlisi çeşidinde bu oran %46.50 olmuştur. Kemer çeşidinde MS ortamı kullanıldığında %35.90 kallus oluşumu görülmüş, Urfa yerlisi çeşidinde ise yine aynı ortamda %37.42 oranında kallus oluşmuştur. Burada, kallus oluşumu bakımından çeşitler arasında belirgin bir farklılık görülmemekle birlikte ortamlar arasında göze çarpar bir farklılık olduğu, C ortamının MS ortamına göre belirgin bir şekilde daha yüksek oranda kallus oluşumu sağladığı görülmektedir.

Embriyo oluşumu açısından da C ortamının MS ortamına üstünlük gösterdiğini söylemek mümkündür. Çizelge 4.2'den de görüleceği gibi, Kemer çeşidinde C ortamında %3.67 oranında embriyo elde edilirken, MS ortamında bu değer, %2.05 olmuştur. Urfa Yerlisi çeşidinde ise C ortamında %4.91 oranında embriyoid elde

edilirken, MS ortamında bu oran ancak %1.84 olmuştur. Çeşitler açısından ise, Urfa yerlisi çeşidinin, C ortamında Kemer çeşidinden daha yüksek oranda embriyoid verdiği, MS ortamındaki sonuçların ise birbirine yakın olmakla beraber, Kemer çeşidinin biraz daha yüksek başarı sağladığı görülmektedir.

Aynı yıl, Bursa'da yapılan denemelerde ise, yine MS ve C ortamları ile Kemer ve Baluroi çeşitleri kullanılmış, ancak enfeksiyonlar nedeni ile MS ortamındaki anterlerin tümü, C ortamındaki anterlerin ise bir kısmı kaybedildiğinden, yalnızca C ortamı ile Kemer çeşidine ait 57 anter ve Baluroi çeşidine ait 54 anter değerlendirmeye alınabilmiştir. Bitkicik elde edilemediği bu çalışmada elde edilen kallus sayıları ve oranları Çizelge 4.3'e görülmektedir.

Çizelge 4.3. 1996 Yılında Bursa'da Yapılan Denemelerde, C Ortamı Üzerindeki Anterlere Ait Kallus Oluşum Değerleri.

Çeşit	Kült. Al. Ant. Say.	Kal. Ol. Ant. Say.	Kal. Or. (%)
Kemer	57	19	33.33
Baluroi	54	3	5.56

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi, Kemer çeşidinde %33.33 oranında, Baluroi çeşidinde ise %5.56 oranında kallus oluşumu elde edilmiştir.

4.5. 1998 Yılındaki Denemelerin Sonuçları

1998 yılı denemeleri, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde kurulan doku kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. 12 Ağustos tarihinde arazideki bitkilerden tomurcuk alınmaya başlanmış ve tomurcuk alınma yaklaşık birer haftalık aralarla, 7 Ekim tarihine kadar devam edilmiştir. Bu sene gerçekleştirilen denemelerde, 8 çeşitten toplam 5207 anter kültüre alınmıştır.

1998 yılı denemelerinde, çeşitlere ve ortamlara göre kültüre alınan anter sayıları ile oluşan embriyoid sayıları ve embriyoid oluşum oranları ile kallus oluşturan anter sayıları ve kallus oluşum oranları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. 1998 Yılında, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde Kültüre Alınan Anterlere Ait Kallus ve Embriyoid Oluşum Değerleri.

Çeşit	Ortam	Kült. Al. Ant. Say.	Kal. Ol. Ant. Say.	Kal. Ol. Oranı (%)	Ol. Emb. Say.	Embriyoid Ol. Or. (%)
Pala	C	228	35	15.35	0	0
	MS	210	13	6.19	0	0
Kemer	C	447	40	8.95	0	0
	MS	235	7	2.98	0	0
Topan	C	436	67	15.37	0	0
	MS	212	3	1.42	0	0
Adana	C	445	93	20.90	0	0
	MS	190	22	11.58	3	1.58
Mileda	C	324	63	19.44	0	0
	MS	250	6	2.40	0	0
Barbentane	C	368	57	15.49	10	2.72
	MS	419	25	5.97	11	2.63
Leila	C	329	47	14.29	8	2.43
	MS	350	14	4.00	0	0
Bellissima	C	322	35	10.87	0	0
	MS	142	6	4.23	0	0

(C ortamına 5 mg/l 2,4-D ve 5 mg/l kinetin ilave edilmiş, MS ortamına ise, 4 mg/l NAA ve 1 mg/l kinetin eklenmiştir.)

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi, denemeye alınan çeşitler içerisinde Pala, Kemer, Topan, Mileda ve Bellissima'dan embriyo elde edilememiş; Adana, Barbentane ve

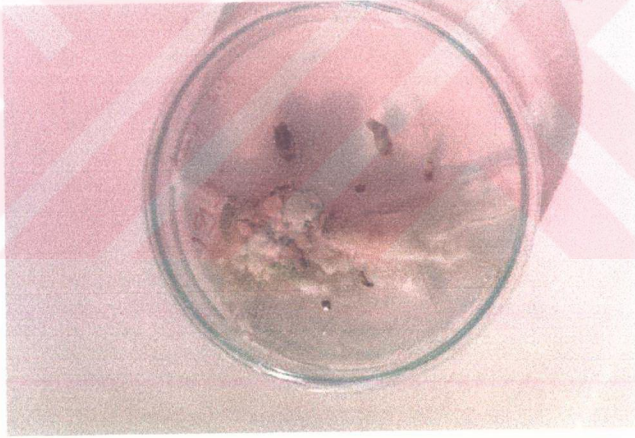
Leila çeşitlerinde ise çeşitli oranlarda embriyoidler elde edilebilmiştir. Bu durum, anter kültürü ve androgenesiste genotipin etkisini teyid etmektedir. Nitekim genotipin etkisi, Rotino ve ark. (1987), Karakullukçu (1991) gibi araştırmacılar tarafından da belirlenmiştir. Adana çeşidinde, MS ortamında kültüre alınan anterlerden %1.58 oranında embriyoid elde edilirken, aynı çeşitte C ortamında embriyoid elde edilememiştir. Barbentane çeşidinde ise, MS ortamında %2.63 ve C ortamında %2.72 olmak üzere her iki çeşitte de birbirine yakın oranlarda embriyoidler elde edilmiştir. Leila çeşidinde, yalnızca C ortamında %2.43 oranında embriyoid elde edilmiş, MS ortamında ise embriyoid elde edilememiştir. Diğer çeşitler ise, androgenik açıdan her iki ortama da cevap vermemişlerdir.

Kallus oluşum oranı bakımından ise, tüm çeşitlerde C ortamında daha yüksek oranda başarı elde edilmiş, en yüksek kallus oluşum oranı, %20.90 ile Adana çeşidinde C ortamında gerçekleşirken, en düşük kallus oluşumu, MS ortamında Topan çeşidinde %1.42 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Denemelerde kullanılan anterlerin önemli bir kısmından kallus oluşumu gerçekleşirken, nispeten az bir kısmından embriyoid elde edilebilmiştir. Zira, bir bitkideki androgenik anterlerin oranı genelde düşük olmaktadır. Bununla birlikte, bazı durumlarda bir anterden birden fazla embriyoid oluştuğu da görülebilmektedir. Şekil 4.2'de Urfa Yerlisi çeşidine ait bir anterden embriyoid oluşumu, Şekil 4.3'de ise yine aynı çeşide ait bir anterden kallus oluşumu görülmektedir.



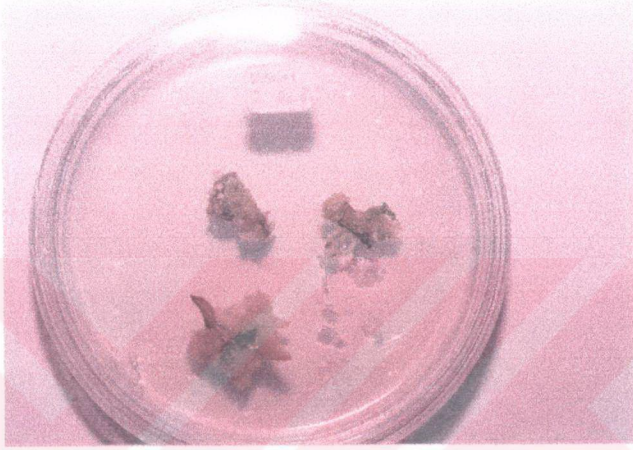
Şekil 4.2. Urfa Yerlisi Çeşidine Ait Bir Anterden Oluşan İki Embriyoid.



Şekil 4.3. Urfa Yerlisi Çeşidine Ait Bir Anterden Kallus Oluşumu.

Denemeler sırasında, bir anterden elde edilen embriyoid sayıları farklılık göstermiş, bazı anterlerden 1-2 embriyoid elde edilebilirken, bazılarında bu sayı 4-5'e kadar çıkmıştır Zira, bir anter içerisindeki androgenik polen hücrelerinin sayısı, anterler arasında değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca, anter içindeki polen

hücrelerinin androgenik gelişim aşamaları da farklı olabilmekte, dolayısıyla bir anterden farklı zamanlarda birkaç embriyoid çıkabilmektedir. Şekil 4.4'de içinden 5 embriyoidin gelişerek dışarı çıktığı Kemer çeşidine ait bir anter görülmektedir.

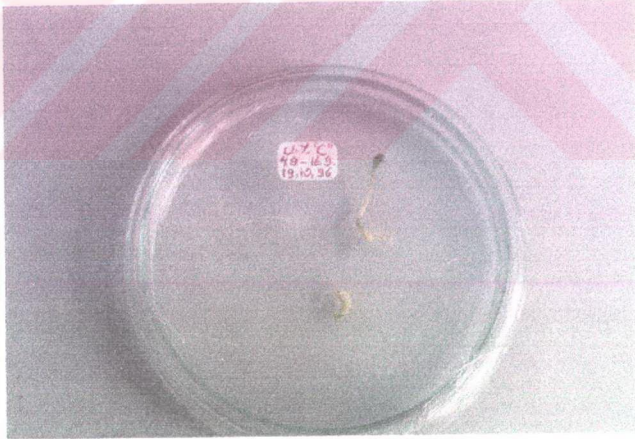


Şekil 4.4. Kemer Çeşidinde, Bir Anterden Oluşan 5 Embriyoidin Görünüşü.

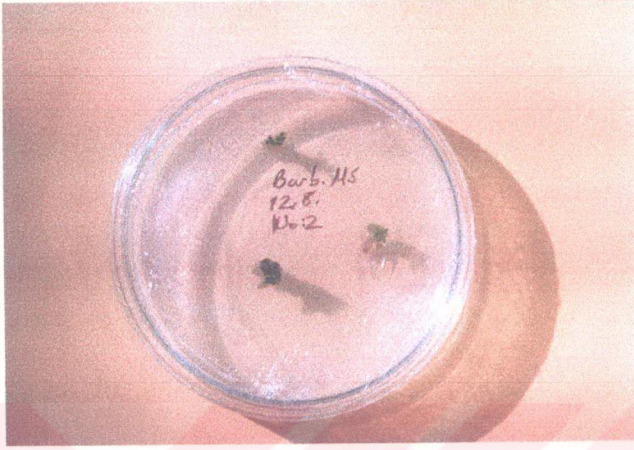
Anterlerden oluşan bu embriyoidler, yeterli gelişmeyi gösterdiklerinde petrilereki taze ortamlara transfer edilmişlerdir. Şekil 4.5 ve 4.6'da Kemer ve Urfâ yerlisi çeşitlerine Şekil 4.7'de ise Barbentane F₁ hibrit çeşidine ait, petri kaplarına transfer edilen embriyoidler görülmektedir.



Şekil 4.5. Kemer Çeşidine Ait Embriyoidlerin Petri Kabına Transferden Sonraki Görünüşü.



Şekil 4.6. Urfa Yerlisi Çeşidine Ait Embriyoidlerin Petri Kabına Transferden Sonraki Görünüşü.



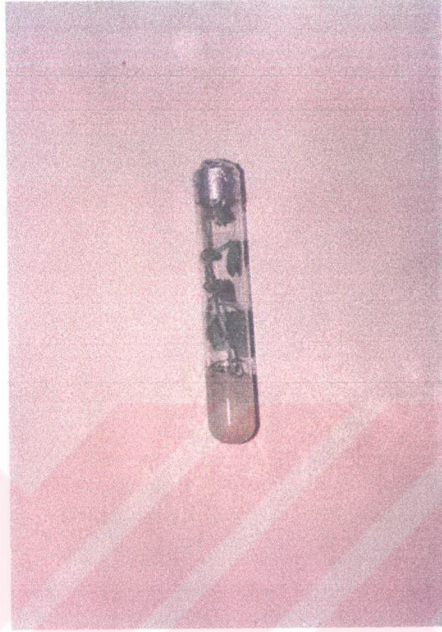
Şekil 4.7. Barbentane Çeşidine Ait Embriyoidlerin Petri Kabına Transferden Sonraki Görünüşü.

Petri kabında gelişip bitkicik haline dönüşen embriyoidler, daha sonra 2.5 cm çapındaki cam tüplere transfer edilmişlerdir. Şekil 4.8'de deney tübüne transfer edilen bir bitkicik görülmektedir.



Şekil 4.8. Embrioidlerin Gelişmesiyle Oluşan Bir Bitkiciğin, Transfer Edildiği Deney Tübündeki Görünüşü.

Deney tüplerine transfer edilen bitkicikler, zamanla gelişip tübü tamamen doldurmuşlar ve *in vitro* çeliklemeye hazır hale gelmişlerdir. Şekil 4.9'da tüp içerisindeki gelişmesini tamamlayıp çeliklemeye hazır hale gelmiş bir bitkicik görülmektedir.



Şekil 4.9. Tüp İçerisindeki Gelişmesini Tamamlayıp Çeliklemeye Hazır Hale Gelmiş Bir Bitkicik

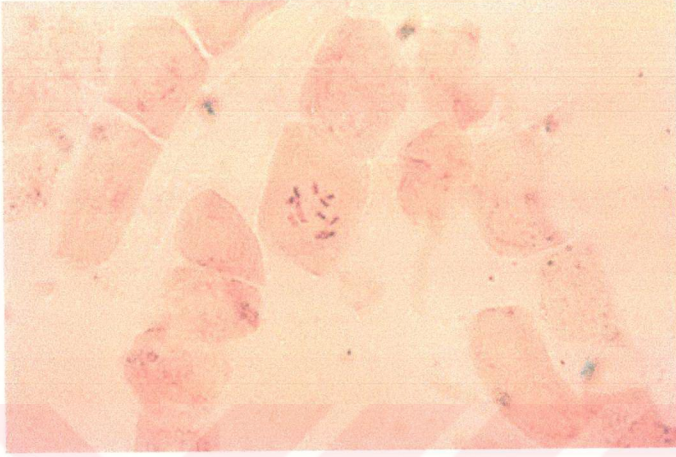
Deney tüplerinde gelişmelerini tamamlayıp belli bir boya gelen bitkicikler, elde edilecek bitki sayısını arttırmak amacıyla, birkaç parçaya kesilip, herbiri ayrı bir tübe konmak suretiyle *in vitro* klonlamaya tabi tutulmuşlardır. Şekil 4.10'da bu yöntemle birkaç çelik parçasına bölünerek klonlanan bitkicikler görülmektedir.



Şekil 4.10. In Vitro Klonlama Amacıyla Çelik Olarak Kullanılan Ana Bitkicik Parçalarının Deney Tüplerindeki Görünüşü (En Soldaki Köklü Ana Bitkicik Parçası).

Bu klonlama işlemi de gerçekleştirildikten sonra, tüp içindeki köklü ana bitkicik parçasından kök uçları alınarak, bunlardan hidroksiquinolin ile ön uygulamayı takiben Farmer çözeltilisinde bekletme ve sonra hidroliz yapma yöntemiyle preparat hazırlanıp, bitkilerin ploidi durumu incelenmiştir. Diploid patlıcan bitkisinin kromozom sayısı $2n=24$ olduğundan, $n=12$ kromozoma sahip olan kök ucu hücrelerinin ve dolayısıyla bunların alındığı bitkinin haploid olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 4.11'de, kök uçlarında kromozom sayımı yapıлып, haploid ($n=12$) olduğu belirlenen bir bitkicikğin kök ucu hücreleri ve kromozomları görülmektedir.

Klonlanmış olan bitki parçaları köklendiğinde saksılardaki steril harç içine şaşırtılmıştır. Elde edilen ilk bitkilerde, saksıların üzerine beher kapatılarak nem kaybı önlenmeye çalışılmış, fakat sonraki bitkilerde daha pratik bir yöntem olan, saksılar üzerine delikli PE örtüler geçirme yöntemi kullanılmıştır. Böylece hem bitkilerden meydana gelecek nem kaybının önüne geçilmiş, hem de bitkilere zarar vermeyecek sınırlı ve devamlı bir havalanma sağlanmıştır. Şekil 4.12 ve 4.13'de sırasıyla, üzerine beher ve PE örtüler kapatılmış saksılardaki bitkiler görülmektedir.



Şekil 4.11. Kök Uçlarında Yapılan Kromozom Sayımı Sonucunda Haploid (n=12) Olduğu Belirlenen Bir Bitkicikteki Kök Ucu Hücreleri ve Kromozomlar.

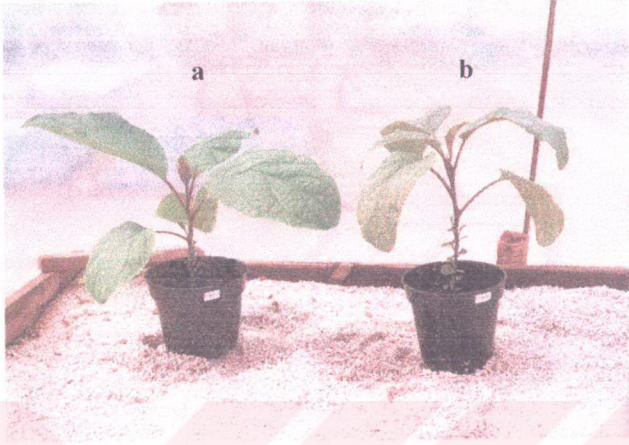


Şekil 4.12. Sakslardaki Steril Harca Transfer Edilerek Üzerlerine Behçer Kapattılan Bitkilerin Görünüşü.



Şekil 4.13. Saksılardaki Steril Torfa Transfer Edilerek Üzerine PE Örtü Kapatılan Bitkiler. Bitkilerin Farklı Gelişim Aşamalarında Ortam Şartlarına Kademeli Bir Şekilde Alıştırılarak, Seraya Dikime Hazır Hale Getirilmeleri.

Bitkiler gelişerek seraya dikime hazır hale geldiklerinde dış görünüşlerine bakılarak haploidlerin, diploidlerden ayrılması büyük ölçüde mümkün olmaktadır. Zira haploidler diploidlere kıyasla daha küçük ve zayıf yapıda olmakta, bu özellikleriyle de diploidlerden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Bu konuda, sitolojik gözlemler ile dışsal farklılıklardan yararlanma yöntemlerinin birbirlerini büyük ölçüde teyid ettiği görülmüştür. Şekil 4.14'de haploid ve diploid bitkiler birarada görülmektedir.



Şekil 4.14. Diploid Bitki (a), Haploid Bitki (b).

5. TARTIŞMA

İnsan beslenmesinde değerli bir sebze olan ve ülkemizde de yaygın olarak yetiştirilen ve tüketilen patlıcanda gerek sera gerekse açıkta yetiştiricilikte kullanılacak yeni ve üstün özellikli çeşitlerin ıslahı için çalışmalar yapılmaktadır. Bu ıslah çalışmalarında, klasik yöntemlerin yanısıra, anter kültürü gibi modern tekniklerden de sağladıkları zaman kazancı nedeniyle yararlanılmaktadır. Dünyada kullanılan bu modern tekniklerin ülkemizde de pratiğe aktararak, ıslah çalışmalarının hız kazanması ve böylece tarımımızın ilerlemesinin amaçlandığı bu denemede, anter kültürü yoluyla haploid bitki elde edilmeye çalışılmıştır. Deneme sonunda, birkaç çeşitte ıslah çalışmalarında kullanılacak düzeyde bitkicik elde edilebilmiş, ayrıca bundan sonraki çalışmalarda yararlanılabilecek bazı sonuçlara ulaşılmıştır.

1994 yılında gerçekleştirilen ön denemelerde, kullanılan çok sayıda çeşitte, yetiştirilen bitkilerden tomurcuk alınarak androgenik açıdan ümitvar olan çeşitler belirlenmeye çalışılmıştır. Bu denemelerde, gerek serada gerekse arazide yetiştirilen bitkilerden haploid embriyo veya bitki elde etmek mümkün olmamıştır. 1995 yılında, 4 çeşit kullanılarak, serada yetiştirilen bitkilerle gerçekleştirilen denemelerde yine haploid embriyo veya bitki elde edilememiştir. 1996 yılında, yalnız arazi materyali kullanılarak yapılan denemelerde, Kemer çeşidinde C ortamında %3.67, MS ortamında %2.05; Urfa Yerlisi çeşidinde ise C ortamında %4.91, MS ortamında %1.84 oranlarında haploid bitkicikler elde etmek mümkün olmuştur. 1998 yılında sekiz çeşit kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde, tomurcuklar yine arazide yetiştirilen bitkilerden alınmış, kullanılan genotipler içinde Adana çeşidinde MS ortamında %1.58; Barbentane çeşidinde C ortamında %2.72, MS ortamında %2.63; Leila çeşidinde C ortamında %2.43 oranlarında bitkicikler elde edilebilmiştir. Çalışmanın tümü gözönüne alındığında, kullandığımız 15 genotipin yalnızca 5'inde, yani Kemer, Urfa Yerlisi, Adana, Barbentane ve Leila çeşitlerinde bitkicik elde etmek mümkün olmuştur. Gerçekten de bu durum, yani genotipin anter kültüründe başarı üzerine etkisi, çeşitli araştırmacılar tarafından (Bajaj 1983, Rotino ve ark. 1987, Karakullukçu

1991) belirtilmekte, aynı türün bazı genotiplerinden çok sayıda bitki elde edilebilirken, bazılarında ise hiç bitki elde edilememektedir.

Çalışmamızda bitkiciklerin çoğunluğu, çiçeklenme başlangıcından sonra 1 ay zarfında Ağustos başı ile Eylül başı arasında toplanan tomurcuklardan alınan anterlerden elde edilmiştir. Dunwell (1991) de, tomurcukların bitkilerden çiçeklenme periyodunun başında toplanmasını tavsiye etmektedir. Tuberosa ve ark. (1987a), patlıcanda en yüksek bitki yüzdesinin, Eylül'ün ikinci veya üçüncü on gününde alınan anterlerden elde edildiğini bildirirken, Karakullukçu (1991) ise haploid bitkilerin, ilkbahar ve yaz başlarında alınan tomurcuklardan elde edildiğini belirtmiştir.

Yaptığımız denemelerde haploid embriyo ve bitkicikler, 1996 ve 1998 yılı denemelerinde, ilk 8 gün boyunca karanlıkta tutulan anterlerden elde edilmiş, bu uygulamanın yapılmadığı 1994 yılındaki ön denemeler ile, 1995 yılındaki denemelerde haploid embriyo veya bitki elde edilememiştir. Bu durum, ön uygulamaların anter kültürü çalışmalarındaki önemini göstermektedir. Nitekim, Chambonnet (1998) ve Karakullukçu (1991) de, anterlere dikimin ilk sekiz günü boyunca yapılan karanlık ve sıcaklık uygulamasının gelişme üzerine önemli etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

1996 ve 1998 yıllarındaki çalışmalarda, hem 4 mg/l NAA ve 1 mg/l kinetin katılmış MS ortamı, hem de Karakullukçu (1991)'nin, Chambonnet tarafından tavsiye edilip patlıcanda iyi sonuç verdiği belirtilen 5 mg/l 2,4-D ve 5 mg/l kinetin eklenmiş olan C ortamı kullanılmış ve her iki ortamda da haploid bitkiler elde etmek mümkün olmuştur. Gönülşen (1987) ise, anter kültüründe genellikle White, Murashige ve Skoog ile Nitsch ve Nitsch gibi üç temel besin ortamının kullanıldığını bildirmektedir.

Besin ortamlarında enerji kaynağı ve ozmotik düzenleyici olarak kullanılan sakkarozun anter gelişimi üzerinde büyük etkisi vardır. Nitekim, ilk dikim ortamında %12 sakkarozun kullanıldığı 1996 ve 1998 yılı denemelerinde, haploid embriyo veya bitkicikler elde etmek mümkün olmuştur. Karakullukçu (1993 b) da, patlıcanda ilk

dikim ortamındaki %12 sakkarozun, %3 sakkaroz veya %6 sakkaroz + %6.3 glikoz uygulamalarından daha iyi sonuç verdiğini ve yalnızca %12 sakkaroz içeren ortamlarda haploid embriyo oluştuğunu belirtmiştir.

Yaptığımız denemelerde haploid bitkiler 4 mg/l NAA ve 1 mg/l kinetin ihtiva eden MS ortamında ve 5 mg/l 2,4-D ile 5 mg/l kinetin ilave edilmiş olan C ortamında elde edilmiştir. Karakullukçu (1991) da aynı ortamlarda patlıcan anterlerinden haploid bitkiler elde edebildiğini belirtmektedir. Kalloo (1988) ise, patlıcanda anterler 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin ihtiva eden sıvı ortamda kültüre alındığında haploid üretiminde başarı elde edildiğini bildirmiştir. Anonymous (1978)'de ise, patlıcanda anterlerden embriyo oluşumu için 0.005 mg/l kinetin gibi düşük bir hormon dozunun gerekli olduğunu belirtilmiştir.

1996 yılında, A.Ü. Ziraat Fakültesi'nde yapılan çalışmada anterler, ilk 8 günlük karanlık ve sıcaklık şokundan sonra, 25°C sıcaklık ile 16 saat gün uzunluğuna ve 2000 lux ışık şiddetine sahip iklim odasına yerleştirildiğinde yüksek oranda embriyoid elde etmek mümkün olmuştur. 1998 yılında U.Ü. Ziraat Fakültesi'nde yapılan çalışmalarda da yine aynı yöntem ve aynı ortamlar kullanılmakla beraber, U.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarında mevcut olan 800 lux ışık şiddetine sahip iklim dolabı kullanılmış, sonuçta yine embriyoidler elde edilmekle beraber, elde edilen embriyoid oranı 1996 değerlerine kıyasla daha düşük olmuştur. Ayrıca ana bitkilerin yetiştirildiği Ankara ve Bursa bölgelerinin rakımlarının (sırasıyla 850 ve 150m), dolayısıyla ışıklandırma şiddetlerinin farklı olduğu gözönüne alındığında androgenesis üzerine ışığın etkisi kolayca anlaşılabilir. Nitekim Dunwell (1991), anter elde etmek amacıyla yetiştirilen ana bitkilerin yetiştirme şartlarının mikrosporların verimi üzerine büyük etkisi olduğunu ve verimli sonuçların ancak sıcaklığı, fotoperiyodu ve ışık intensitesi uygun olan ortamlarda elde edilebileceğini vurgulamıştır. Örneğin tütünde kısa fotoperiyodların (8 saat) ve yüksek ışık intensitelerinin (16.000 lux) yararlı olduğunu, arpada ise düşük sıcaklıkların (12°C) ve yüksek ışık yoğunluklarının (20.000 lux) tavsiye edildiğini ifade etmiştir. Yine, iyi araştırılmış bir genus olan Brassica'da yüksek ışık yoğunlukları ve türe dayalı olarak optimum sıcaklık şartlarının sağlanmasını tavsiye etmiştir.

Denemede oluşan embriyoidlerin bazıları geliştikçe anterlerden kopmuşlar, bazıları ise 4-5 mm uzunluğa geldiklerinde pens ve bistüri yardımıyla anterlerden ayrılmışlardır. Tuberosa ve ark. (1987a) da yaptıkları çalışmada bazı embriyoların anterden kopup ortamın üst yüzeyinde gelişmeye devam ettiğini, diğerlerinin ise 4-6 mm uzunluğa eriştiğinde anterlerden kesilerek ayrıldığını bildirmektedir. Araştırmacılar ayrıca, embriyoların anterden ayrılmasının geciktirilmesi durumunda bunun anterdeki embriyolar arasında rekabete neden olduğunu, çok erken devrede yapılan ayırmanın ise kallus çoğalmasına yol açtığını vurgulamaktadır.

1994 yılındaki ön denemeler ile 1995 yılındaki denemelerde, her çeşitten ortam başına kullanılan anter sayısı sınırlı olmuştur. Örneğin 1995 yılındaki denemelerde kullanılan 4 çeşit içerisinde bir ortam başına en yüksek 52 adet anter kullanılmıştır. Oysa 1996 yılındaki denemelerde bir çeşitten ortam başına kullanılan anter sayısı 163 ile 490, 1998 yılında ise 142 ile 447 arasında değişmiştir. Bu durumun, 1996 ve 1998 yıllarındaki denemelerde bitki elde edilmesini sağlayan en önemli faktörlerden biri olduğu söylenebilir. Zira, bir bitkideki anterlerin hepsi bitki oluşturma kapasitesinde olmayıp, bu kapasiteye sahip olan androgenik anter frekansı oldukça düşüktür. Bu nedenle, bu anterlere rastlama ihtimalini arttırmak için, mümkün olduğunca çok sayıda anterin herbir ortam üzerine dikilmesi gerekmektedir. 1994 ve 1995 yıllarındaki çalışmalarımızda, anterler enfeksiyondan korunmak amacıyla deney tüpleri içinde kültüre alınmış, bu nedenle fazla sayıda anter kullanılamamıştır. Oysa, bir petride, bir deney tüpüne kıyasla 4-5 kat fazla anteri kültüre almak mümkün olmaktadır. Bu nedenle, 1996 ve 1998 yılındaki denemelerde daha iyi laboratuvar şartlarında petri kapları kullanılarak daha fazla anter kültüre alınmıştır.

Ülkemizde anter kültürüyle ilgili yeterince çalışma henüz yapılmamıştır. Bu konuda çalışan başlıca araştırmacılar Abak (1984), Yıldırım (1991), Karakullukçu (1991), Ellialtıoğlu (1993), Özzambak ve Atasayar (1994)'dır. Bu araştırmacıardan Özzambak ve Atasayar (1994), patlıcanda yaptıkları anter kültürü çalışmalarında kallus elde edildiğini, ancak bitki rejenere edilemediğini belirtmektedirler. Karakullukçu (1991) ise, patlıcanda elde ettiği haploid embriyo randımanının bir ıslah çalışmasında kullanılabilecek düzeyde olmadığını ifade etmektedir. Bizim

çalışmamızda ise, 1996 yılındaki denemelerde Kemer çeşidinde C ortamında %3.67, MS ortamında %2.05 Urfa Yerlisi çeşidinde ise C ortamında %4.91, MS ortamında %1.84 düzeyinde haploid embriyo elde edilirken, 1998 yılındaki çalışmalarda bu oranlar Adana çeşidinde MS ortamında %1.58, Barbentane'de C ortamında %2.72, MS ortamında %2.63, Leila'da C ortamında %2.43 şeklinde gerçekleşmiştir. Bu oranların ıslah çalışmalarında kullanılabilir düzeyde bir sonuç olduğunu söylemek mümkündür. Nitekim, patlıcanda anter kültürü üzerinde yapılan çalışmalarda Rotino ve ark. (1987), %4.4, Tuberosa ve ark. (1987a) %4.87 oranında bitki elde etmişlerdir. Dolayısıyla, çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar dünya standartlarına yakındır. Tabii ki bu oranın daha da yükseltilebilmesi için anter kültürü üzerine daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda başarının yükseltilebilmesi için şunları tavsiye etmemiz mümkündür.

Çalışmalarda kullanılan anter popülasyonu elden geldiğince geniş tutulmalı, mümkünse bir çeşide ait anterlerden, bir ortam üzerine en az 500 adet dikilmelidir. Zira, çalışmamıza ait sonuçlar incelendiğinde, çok sayıda anterin kullanıldığı ortamlarda başarı oranının yükseldiği görülecektir. Örneğin, 1998 yılı denemelerinde, Adana çeşidinden MS ortamına 190 anter dikildiğinde sadece 3 embriyoid elde edilebilmiş, diğer bir deyimle başarı oranı %1.58 olmuştur. Leila çeşidinde C ortamına 329 anter dikildiğinde, elde edilen embriyoid sayısı 8'e, başarı oranı da %2,43'e yükselmiştir. Barbentane çeşidinde, C ortamına 368, MS ortamına 419 anter dikildiğinde sırasıyla 10 ve 11 embriyoid elde edilmiş, bunlara tekabül eden başarı oranları da %2.73 ve 2.63 olmuştur. Dolayısıyla kültüre alınan anter sayısını arttırmak, elde edilecek embriyoid sayısını yükseltmek açısından avantajlı olmaktadır.

Anter kültürü çalışmalarında, kullanılan anter sayısı kadar, polen tanelerinin gelişme devresi, anterlere yapılan ön uygulamalar, hatta ana bitkinin yetiştirme şartları gibi faktörler de başarı üzerinde etkili olmaktadır. Bu nedenle, yapılacak denemelerin bu faktörler de gözönünde tutularak planlanması gerekmektedir.

Ayrıca, bundan sonraki çalışmalarda, anterlerin transfer edildiği rejenerasyon ortamının bileşimi, bir kültür kabındaki anter yoğunluğu, anterlerden embriyoid gelişimi üzerine inkübasyon ortamındaki ışık yoğunluğunun etkisi ve bitkideki androgenik polen oranını yükseltmeye yönelik çalışmalar gibi, üzerinde nispeten az durulmuş konuları ele almak da yararlı olacaktır. Çalışmamızda embriyoid elde ettiğimiz rejenerasyon ortamı, büyümeyi düzenleyici olarak 0.1 mg/l kinetin içermekteydi. Rejenerasyon ortamında değişik büyümeyi düzenleyici kombinasyonlarının denenerek, başarı üzerindeki etkilerinin incelenmesi mümkündür. Ayrıca, denememizde, yüksek rakımda yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerden, daha fazla sayıda embriyoid elde edilmiştir. Bu nedenle, yetiştirme şartlarının bitkideki androgenik polen oranı üzerindeki etkileri araştırılabilir. Bunların dışında, kültür kaplarında değişik anter yoğunlukları denenerek, bu faktörün embriyogenik gelişmeye etkisi üzerinde çalışılması tavsiye edilebilir.

6. ÖZET

Patlıcan ıslahında anter kültürünün kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışma 1994-1999 yılları arasında Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde yürütülmüş, ancak 1996 yılındaki denemelerde Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü olanaklarından da yararlanılmıştır. Çalışmada *Solanum melongena* L. türüne ait Pala, Kemer, Topan, Aydın Siyahı, Manisa ve Adana yerli çeşitleri, Urfa yerlisi popülasyonu ile Munica Baluroi, Mileda, Ancha Leila, Barbentane, Bellissima ve Purpurea hibrit çeşitlerinden anterler alınarak bunların kültürde gelişme durumları incelenmiştir. Yapılan denemelerde elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir.

1. 1994 yılında yapılan ön denemelerde Urfa yerlisi dışındaki tüm çeşitler kullanılmasına rağmen, hiçbir genotipte haploid embriyo veya bitki elde edilememiş, yalnızca kallus elde edilebilmiştir. Çeşitler genelinde kallus oluşum oranı %30.00 olmuştur.

2. 1995 yılında yapılan denemelerde, Pala, Kemer, Topan ve Aydın Siyahı çeşitleri kullanılmış, çeşit bazında en yüksek kallus oluşum oranını %26.42 ile Aydın Siyahı çeşidi vermiş, Pala Çeşidi ise %15.12 ile en düşük kallus oluşum oranını vermiştir. Bu yılki denemelerde embriyoid veya bitki elde edilememiştir.

3. 1996 yılındaki denemelerin Bursa'da gerçekleştirilen kısmında Kemer ve Baluroi çeşitleri kullanılmış; Kemer çeşidinde %33.33, Baluroi çeşidinde ise %5.56 oranında kallus elde edilebilmekle birlikte, embriyoid veya bitki elde etmek mümkün olmamıştır.

4. 1996 yılında Ankara'da yapılan denemelerde ise Kemer çeşidi ile Urfa Yerlisi popülasyonu kullanılmış, bu denemelerde ilk kez anterlerden embriyoid ve bitkicik eldesi başarılmıştır. Kemer çeşidinde C ortamında %3.67, MS ortamında %2.05,

Urfa Yerlisi çeşidinde ise C ortamında 4.91, MS ortamında % 1.84 oranında embriyo elde edilmiş ve bunlar bitkiciklere dönüştürülebilmıştır.

5. 1998 yılında Bursa'da gerçekleştirilen denemelerde de anterlerden bitkicikler elde edilebilmiş, embriyoid oluşum oranları Adana çeşidinde MS ortamında %1.58; Barbentane çeşidinde C ortamında %2.72, MS ortamında %2.63; Leila çeşidinde C ortamında %2.43 şeklinde gerçekleşmiştir.

6. Elde edilen embriyoidler, gelişkin bitkicikler haline gelip deney tüpünü doldurduğunda, in vitroda ortalama 5'er çelik parçasına ayrılarak klonlama yapılmış, daha sonra köklü ana bitkiciklerden kök uçları alınarak kromozom sayımı gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak anter kültürü yöntemi homozigot hatları elde edilmesi bakımından ümit verici bir yöntem olarak bulunmuştur. Eğer, çalışmalarda geniş sayıda materyal kullanılacak ve uygun genotip ve ortamlardan yararlanılacak olursa yöntemin etkinliğinin artırılması mümkün olacaktır.

7. SUMMARY

RESEARCHES ON THE *IN VITRO* ANDROGENESIS AND OBTAINING HAPLOID PLANTS IN SOME EGGPLANT GENOTYPES

This study was carried out at the Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Uludağ University between 1994 and 1996, with the aim of determining the usability of anther culture in obtaining haploids in eggplant. However, the facilities of Horticulture Department of Ankara University were also utilized in the trials in 1996. In the study, the anthers were excised from the plants of the domestic eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars Pala, Kemer, Topan, Aydın siyahı, Manisa the domestic population Urfa yerlisi, and the hybrid cultivars Munica, Baluroi, Mileda, Ancha, Purpurea, Leila, Barbentane and Bellissima; the development of the cultured anthers was examined. The results obtained from the study are as follows:

1. Although all the cultivars except Urfa yerlisi were used in the preliminary trials in 1994, haploid embryos or plants could not be obtained from any one of the genotypes, but only calli developed. The overall callus formation rate was 30.00%.

2. The cultivars Pala, Kemer, Topan and Aydın siyahı were used in the trials in 1995, cv. Aydın siyahı gave the highest callus formation ratio with 26.42%, whereas cv. Pala gave the lowest with 15.12%. No embrioids or plants could be obtained in the trials of this year.

3. The cultivars Kemer and Baluroi were used in the trials carried out in Bursa in 1996; calli were obtained at the rates of 33.33% and 5.56% in cvs. Kemer and Baluroi, respectively. Nevertheless, no embryos or plants could be obtained.

4. The obtention of embrioids and plants was achieved in the trials carried out in Ankara in 1996, using cv. Kemer and Urfa Yerlisi population. Embryos were

obtained at the rates of 3.67 and 2.05% in C and MS media respectively, in cv. Kemer, and 4.91 and 1.84% in C and MS media respectively in cv. Urfa Yerlisi, and these embryos could be developed into plantlets.

5. Embryos were also obtained in the trials carried out in 1998. The embrioid formation rates were 1.58% in MS medium in cv. Adana; 2.72% and 2.63% in C and MS media respectively in cv. Barbentane; and 2.43% in C medium in cv. Leila.

6. After these embryoids developed into plantlets and filled the test tube, they were cut into 5 cutting pieces in average, thus cloned *in vitro*. Thereafter, root tips were excised from the rooted plantlets and chromosome counts were realized.

As a result, the anther culture method was found as a promising method with respect to obtaining homozygous lines. It will be possible to increase the efficiency of the method, especially in case that a large number of materials is used in the study and the suitable genotype and medium are utilized.

KAYNAKLAR

- ABAK, K. 1984. Biberde (*Capsicum annum L.*) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Etme Üzerinde Araştırma. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yıllığı, 1983, 33 (1,2,3,4):154-162, Ankara Üniv. Basımevi-Ankara.
- ABAK, K. 1986. Biber Islahında Anter Kültüründen Yararlanma. Bitki Islahı Simpozyumu. Bildiri Özetleri (15-17 Ekim 1986, İzmir), 64s.
- ABAK, K., SARI, N., PAKSOY, M., YILMAZ, H., AKTAŞ, H. ve TUNALI, C. 1996. Kavunda Işınlanmış Polen Tozlamaları ile Haploid Embriyo Uyartımında Genotip Etkisi, Haploid ve Diploid Bitkilerin Değişik Yöntemlerle Ayrımı. Doğa Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi, 20(5):425-430.
- ALEJO, N.O. 1992. Culture d'Antheres. In "Fondements Theoriques et Pratiques de la Culture des Tissus Vegetaux", (C.H. Rosell, J.M. Villalobos, eds.), 61-67, Etude FAO Production Vegetale et Protection des Plantes, Rome.
- ANONYMOUS. 1978. Induction of Haploid Plants of *Solanum melongena L.* Research Group of Haploid Breeding. Institute of Vegetables, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Proc. Symp. Plant Tissue Culture (May 25-30 1978, Peking), 227-232.
- ANONYMOUS. 1997. Türkiye İstatistik Yıllığı T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Yay. No. 2110. 733s.
- ATEŞ, A.O. 1991. Tütünde Soğuk Ön Uygulamaların Androgenesise Etkisi. Ege Üniv., Fen Bilimleri Enst., Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi), 36s.
- BAINS, W. 1993. Biotechnology from A to Z. (Introduction by G.K. Raab), IRL Press, Printed in Great Britain. 358s.

- BAJAJ, Y.P.S. 1983. In Vitro Production of Haploids. In "Handbook of Plant Cell Culture. Techniques of Propagation and Breeding, Vol. 1", (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada, eds.), Collier Macmillan Publishers, London, 228-287.
- BIONDI, S. ve THORPE, T.A. 1981. Requirements for a Tissue Culture Facility. In Plant Tissue Culture - Methods and Applications in Agriculture", (T.A. Thorpe, ed.), Printed in the USA, 1-20.
- BROOKS, R.M., M.V. BRADLEY ve T.I. ANDERSON 1966. Plant Microtechnique Manual Dep. of Pomology Univ. of California Davis 61p.
- CAO, M.Q., LI, Y., LIU, F., JIANG, T., LIU, G.S., ve DORE, C. 1995. Application of Anther Culture and Isolated Microspore Culture to Vegetable Crop Improvement. In "Genetic Improvement of Horticultural Crops by Biotechnology", (T. Nishio, ed.), 27-38, XXIVth International Horticultural Congress, (21-27 August 1994, Kyoto, Japan). Acta Horticulturae No:392.
- CHAMBONNET, D. 1988. Obtention of Haploid Plants in Vegetables. Advantages in Breeding Programmes. I. Uluslararası Tarım ve Biyoteknoloji Simpozyumu, Çukurova Üniv. (1-3 Haziran 1988, Adana).
- DIRR, M.A. ve HEUSER, C.W. IR. 1987. The Reference Manual of Woody Plant Propagation - From Seed to Tissue Culture, 239p.
- DUMAS DE VAULX, R. ve CHAMBONNET, D. 1982. Culture In Vitro d'Antheres. d'Aubergine (*Solanum melongena* L.): Stimulation de la Production de Plantes au Moyen de la Traitements a+ 35°C Associes a de Faibles Teneurs en Substances de Croissance. Agronomie, 2(10): 983-988.
- DUNWELL, J. W. 1991. Haploid Cell Cultures. In "Plant Cell Culture: a Practical Approach", (R.A. Dixon, ed.), IRC Press, Oxford, Washington D.C. 21-36.

- ELLİALTIOĞLU, Ş. ve ABAK, K. 1993. Domates Islahında Embriyo Kültüründen Yararlanma. TÜBİTAK, VIII. Bitki Islahı Simpozyumu, (15-17 Ekim 1986, İzmir), 42-52.
- EMİROĞLU, Ü. 1982. Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. Ege Üniv. Ziraat Fak. Yay. No:450, Bornova, İzmir, 38s.
- ENE OBONG, E.E., AGWU, C.O.C. ve OKONGWO, S.N.C. 1986. Callus and Embryoid Induction From Anthers of African Yam Bean, Sunhemp and Eggplant. International Congress for Plant Tissue and Cell Culture. Univ. Of Nigeria, Nsuka, Nigeria, 92p.
- ESAU, K. 1977. Anatomy of Seed Plants. Printed in the USA, 550p.
- FERRY, A.M.R., PALMER, C.E. ve KELLER, W.A. 1995. In Vitro Androgenesis in Plants. (Trevor A Thorpe Ed.). Kluwer Academic Publishers 1995. Printed in the Netherlands. Chap. 9 Haploid Embryogenesis p.309-344.
- FRETT, J.J. ve DIRR, M.A. 1986. Effect of Nitrogen and Calcium Stock Plant Nutrition on *Petunia x hybrida* Leaf and Anther Explant Growth *In Vitro*. Hort. Abst. 56(8):6215.
- GÖNÜLŞEN, N. 1987. Bitki Doku Kültürleri-Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayın No:78, Menemen-İzmir, 140s.
- GRESSHOF, P.M. ve DOY, C.H. 1973. Development and Differentiation of Haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). Hort. Abst. 43(7):4582.
- GRUBER, K.I. ve FOWKE L. 1999. A New Way to Culture Microspores. PBI Bulletin. January 1999. National Research Council, Canada. (<http://www.pbi.nrc.ca/cgi-bin/bulletin/January99.sh?new.html>).

- HU, H. ve ZENG, J.Z. 1984. Development of New Varieties via Anther Culture. In "Handbook of Plant Cell. Culture, Crop Species, Vol.3", (P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp, Y. Yamada, eds.), 65-90, Collier Macmillan Publishers, London.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw Hill Company Inc. New York and London. 523p.
- KALLOO, DR. 1988. Vegetable Breeding. Volume III, Chapter 4, Printed in the USA. 174p.
- KARAKULLUKÇU, Ş. 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde *In Vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enst., Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı (Yayınlanmamış Doktora Tezi), 136s.
- KARAKULLUKÇU, Ş. ve ABAK, K. 1993a. Patlıcanda Anter Kültürü Üzerinde Araştırmalar: 1. Elverişli Tomurcuk Gelişme Döneminin Belirlenmesi. Doğa Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi. 17(3):801-810.
- KARAKULLUKÇU, Ş. ve ABAK, K. 1993b. Patlıcanda Anter Kültürü Üzerinde Araştırmalar: 2. Şeker ve Büyüme Düzenleyicilerin Etkileri. Doğa Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi. 17(3):811-820.
- KELLER, J. 1988. Using Anther Culture to Generate Haploids for Use in Breeding Vegetables. Gartenbau, 35(6):171-173.
- MATSUBARA, S., HU, K. ve MURAKAMI, K. 1992. Embryoid and Callus Formation From Pollen Grains of Eggplant and Pepper. Journal of the Japanese Horticultural Society For Horticultural Science, 61(1):69-77.

- MISRA, N.R., VARGHESE, T.M., MAHERCHANDANI, N. ve JAIN, R.K. 1983. Studies on Induction and Differentiation of Androgenic Callus of *Solanum melongena* L. Basic Life Sci. 22, 465-468.
- MIYOSHI, K. 1996. Callus Induction and Plantlet Formation Through Culture of Isolated Microspores of Eggplant (*Solanum melongena* L.). Plant-Cell-Reports. 1996, 15:6, 391-395.
- NISHI, S., OOSAWA, K. ve TOYODA, T. 1976. Studies on the Anther Culture of Vegetable Crops. I Differentiation in Plantlets of Some Vegetable Crops Obtained From Calluses Formed By Anther Culture. Bulletin of the Vegetable and Ornamental Crop Research Station, Japan, A(1974), No:1, 1-40.
- NITSCH, C. 1981. Production of Isogenic Lines: Basic Technical Aspects of Androgenesis. In "Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture" (T.A. Thorpe ed.), 241-252. Academic Press Inc.
- ÖZZAMBAK, E. ve ATASAYAR, A. 1994. Anther Culture of Tomatoes and Eggplants. Acta-Horticulturae, 336:229-233.
- PIERIK, R.L.M. 1987. In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, 344p.
- RAGHAVAN V. 1995. From Microspore to Embryoid: Faces of the Angiosperm Pollen Grain. In "Progress in Plant Cellular and Molecular Biology (H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plus, J. Van Aartrijk Eds.) Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, p. 213-221.
- ROTINO, G.L., FALAVIGNA, A. ve RESTAINO, F. 1987. Production of Anther-Derived Plantlets of Eggplant. Capsicum Newsletter, 6: 89-90.

- ROTINO, G.L., SCHIAVI, M., VICINI, E. ve FALAVIGNA, A. 1991. Variation Among Androgenetic and Embryogenetic Lines of Eggplant (*Solanum melongena* L.). Journal of Genetics and Breeding, 45(2): 141-146.
- SANGUINETI, M.C., TUBEROSA R. ve CONTI, S. 1990. Field Evaluation of Androgenetic Lines of Eggplant. Acta Horticulturae, 280: 177-181.
- SANGWAN, R.S. ve SANGWAN-NORREEL, B.S. 1990. Anther and Pollen Culture. In "Plant Tissue Culture-Applications and Limitations", (S.S. Bhojwani Ed.), Elsevier Science Publishers. Printed in the Netherlands, 220-241.
- SECKINGER, G.R. 1991. Micropropagation of Vegetable Crop Species. In "Micropropagation. Technology and Application", (P.C. Debergh, R.H. Zimmerman eds.), 265-284, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- SHARP, W.R., DOUGALL, D.K. ve PADDOCK E.F. 1972. Haploid Plantlets and Calluses From Immature Pollen Grains of *Nicotiana* and *Lycopersicon*. Hort. Abst. 42(2):4109.
- SOPORY, S.K., EVERT, J. ve WENZEL, G. 1978. Production of Monohaploid Embryoids and Plantlets in Cultured Antheres of *Solanum tuberosum*. Plant Science Letters, 12:47-54.
- SUMMERS, W.L., JARAMILLO, J. ve BAILEY, T. 1992. Microspore Developmental Stage and Anther Length Influence the Induction of Tomato Anther Callus. Hort. Science 27(7):838-840.
- ŞENİZ, V. 1990. Bahçe Bitkilerinin Islahı. Genişletilmiş II. Baskı. Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Ders Notları. No:13, 275s.

- TOKUMO, K.; MURAKAMI, K., MATSUBARA, S. 1994. Embryoid and callus formation from eggplant microspores by culture of anthers treated with high and low temperatures. Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University. 1994, No.84, 13-16.
- TORRES, K.C. 1989. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Published in Great Britain by Chapman and Hall. 285p.
- TUBEROSA, R., SANGUINETI, M.C., TONI, B. ve CIANI, F. 1987 a. Ottanimento di Aploidi in Melanzana (*Solanum melongena* L.) Mediante Coltura di Antere. Estratto dalla Rivista di Sementi Elette. Anno XXXIII-No:3, Italy, 9-14.
- TUBEROSA, R., SANGUINETI, M.C, CONTI, C. 1987 b. Anther Culture of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Lines and Hybrids. Genet. Agr. 41:267-274.
- TÜRKEÇ, A. 1994. Patates Bitkisinde Anter Kültürü Yoluyla Kallus ve Rejenere Bitki Oluşumu Üzerinde Genotip, Çevre ve Besin Ortamlarının Etkisi. T.C. Uludağ Üniv. Fen Bilimleri Enst., Tarla Bitkileri Anabilim Dalı (Yayınlanmamış Doktora Tezi), 81s.
- ÜNSAL, N. 1993. Bitki Büyüme Maddeleri. İstanbul Üniv. Yay. No:3677, Enst. Yay. No:4, 357s.
- WANG, J.F., JIA, C.L., JIN, B., ve DAI, Z.X. 1989. Effects of High Temperature Treatment on Embryoid - Induction Rate From Anthers of Eggplants (*Solanum melongena* L.). Journal of Agricultural Sciences, 2:31-35.
- WENZEL, G. ve FOROUGHİ - WEHR, B. 1994. Production and Use of Isogenic Lines. In "Plant Cell and Tissue Culture", (I.K. Vasil, T.A. Thorpe, Eds.), 153-172. Kluwer Academic Publishers, printed in the Netherlands.

YADAV, N.R., VARGHESE, T.M. ve SHARMA, D.R. 1989. Morphogenetic Studies in Androgenic Callus of *Solanum melongena* L. Curr. Sci. 58(11):637-639.

YILDIRIM, Z. 1991. Androgenik Patates Haploidleri Üzerinde Morfolojik ve Sitolojik Araştırmalar. Ege Üniv., Ziraat Fak., Tarla Bitk. Bölümü (Yayınlanmamış Doktora Tezi), Bornova-İzmir.



ÖZGEÇMİŞ

1965 yılında Bursa'da doğdu. 1983 yılında Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini 1987 yılında tamamlamıştır. Mart 1988 – Eylül 1990 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimi almış. Temmuz 1988'de aynı anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başlamış ve bu görevini Şubat 1997'ye dek sürdürmüştür. Eylül 1990'da Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında başladığı doktora öğrenimine, 1997 Ekim'inde vatani görevini yapmak üzere ara veren Hüseyin Can Alpsoy, 1998 yazında doktora çalışmalarına yeniden başlamış ve laboratuvar denemelerini tamamlamıştır.

