ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Namık Kemal YÜCEL

Solanum melongena L. VE *Solanum torvum* SW. TÜRLERİ ARASINDA DOĞAL VE *İN VİTRO* KOŞULLARDA MELEZLEME ÇALIŞMALARI

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2017

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Solanum melongena L. VE *Solanum torvum* SW. TÜRLERİ ARASINDA DOĞAL VE *İN VİTRO* KOŞULLARDA MELEZLEME ÇALIŞMALARI

Namık Kemal YÜCEL

DOKTORA TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 09/03/2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

……	……..	…….
Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA DANIŞMAN	Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU ÜYE	Prof. Dr. Salih KAFKAS ÜYE
……...	……..	
Doç. Dr. Hatıra TAŞKIN ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Mehtap YILDIZ ÜYE	

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FBA-2015-3252.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

Solanum melongena L. VE _Solanum torvum_ SW. TÜRLERİ ARASINDA DOĞAL VE _İN VİTRO_ KOŞULLARDA MELEZLEME ÇALIŞMALARI

Namık Kemal YÜCEL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
Yıl: 2017, Sayfa: 153
Jüri : Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU
: Prof. Dr. Salih KAFKAS
: Doç. Dr. Hatıra TAŞKIN
: Yrd. Doç. Dr. Mehtap YILDIZ

Bu tez çalışması; toprak kökenli hastalıklardan *Fusarium* ve *Verticillium'a* ve zararlılardan da *Nematod'*a dayanıklılığı sağlayan genlerin bir arada olduğu *Solanum torvum* yabani patlıcan türü ile yaygın olarak yetiştirilen patlıcanın kültür formlarından (*Solanum melongena* L.) iki çeşidi (Aydın Siyahı ve Kemer) doğal ve *in vitro* ortamda melezleyerek, dayanıklılık özelliklerinin kültür formuna aktarılması amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada arazi melezlemeleri ve tohum eldesi, embriyo kurtarma, çiçek tozu çim borusu büyümesinin incelenmesi, çiçek tozu canlılıklarının belirlenmesi, *in vitro* kültürden elde edilen melez bitkilerin dış ortama alıştırılması, melez bireylerin fertilite durumlarının araştırılması, embriyogenik kallus eldesi için uygun ortam denemeleri, anter kültürü protokolünün geliştirilmesi, *in vitro* tozlama ve dölleme ve patlıcanda protoplast füzyonu protokolünün belirlenmeye çalışılmıştır.

Aydın Siyahı x S. torvum ve Kemer x S. torvum melezlemelerden elde edillen meyvelerde embriyo kurtarma yöntemi için her iki kombinasyonda en uygun zamanın tozlamadan sonra 35. gün olduğu belirlenmiştir. Anter kültürü çalışmalarında en yüksek bitki eldesi (% 36.4) Aydın Siyahı çeşidinden 1 mg/l 2.4-D +1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz+ 7 g/l agar ortamında elde edilmiştir. PEG yöntemiyle yapılan protoplast kültüründe 4-6 hafta sonra birleşmeye başlayan protoplast hücrelerinden mikro kalluslar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Türler arası melezleme, embriyo kurtarma, *Solanum melongena, Solanum torvum,* anter kültürü, PEG protoplast füzyonu.

ABSTRACT

PhD THESIS

NATURAL AND *IN VITRO* HYBRIDIZATION STUDIES BETWEEN *Solanum melongena* L. AND *Solanum torvum* SW.

Namık Kemal YÜCEL

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
Yıl: 2017, Sayfa: 153
Jury : Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU
: Prof. Dr. Salih KAFKAS
: Assoc. Prof. Dr. Hatıra TAŞKIN
: Asst. Prof. Dr. Mehtap YILDIZ

In this study we aimed to cross *Solanum torvum,* wild aubergine species, has genes which enable resistance to *Fusarium* and *Verticillium* from soil-derived diseasesand, *Nematode* from parasites withtwo varieties (cv Aydın Siyahı ve Kemer) of the common cultivated eggplant culture forms (*Solanum melongena* L.) in the natural and *in vitro* environment, and also we purposed to transfer resistance properties to the culture forms.

Land hybridization and seed obtaining, embryo rescue, investigation of pollen viability and tube growth, acclimazation of hybrid plants which obtained from *in vitro* culture, search of hybrids fertility, media treatments for obtaining embryogenic callus, development of anter culture protocol, *in vitro* pollination and fertilization, and detecting protoplast fusion on eggplant were studied in the study.

The most suitable time for the embryo rescue method of fruits obtained from Aydin Siyahı x *S. torvum* and Kemer x *S. torvum* hybrids, in both combinations were determined as 35th day after pollination. The highest plant yield (36.4%) in anther culture studies was shown in 1 mg/l 2.4-D +1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz+ 7 g/l agar media with Aydın Siyahı variety., Microcalluses were obtained from the protoplast cells starting to join after 4 to 6 weeks in the protoplast culture carried out by PEG method.

Anahtar Kelimeler: Interspesific hybridization, embryo rescue, *Solanum melongena, Solanum torvum,* anter culture, PEG protoplast fusion.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Araştırmada Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında arazide ve *in vitro* koşullarda melezlemeler yapılmıştır. Çalışmada hem melez bireyler elde etmek hem de tozlamadan sonra dişicik borusunda döllenmeye kadarki aşamaları izlemek amacıyla Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemeler yapılmıştır. Arazide Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemelerde *Solanum torvum*'un ana ebebeyn olarak kullanıldığı melezlemelerden meyve elde edilememiştir. Kemer x *Solanum torvum* ve Aydın Siyahı x *Solanum torvum* melezlemelerinde tozlamadan 25. 30. ve 35 gün sonra her melezleme kombinasyonu için 5'er adet meyve hasat edilerek 'Tek Tek Açma yöntemi' ile embriyo kurtarma yapılmıştır. Hasat edilen melez meyvelerdeki tohumların bir kısmı da Doğrudan Ekim Yöntemiyle *in vitro* kültüre alınmıştır. Hasat tarihi bakımından, en yüksek bitki eldesi 35. günde Kemer x *Solanum torvum* melezinden % 90.83, Aydın Siyahı x *Solanum torvum* melezinden % 78.75 oranında bitkiye dönüşüm elde edilmiştir. Doğrudan ekim tekniğinde ise bitkiye dönüşüm oranları (%) açısından hasat tarihi ve çeşitlerin etkisi istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Hasat tarihi bakımından Kemer x *Solanum torvum* melezinden 30. günde (% 16.53), Aydın Siyahı x *Solanum torvum* melezinden 35. günde (% 14.53) en yüksek bitkiye dönüşüm elde edilmiştir.

Tozlanmadan sonra döllenmenin olmamasının ya da çok düşük olmasının nedenini anlamak amacıyla çiçek tozu çim borusu büyümesi, tozlanmadan sonra 72 saat boyunca her 6 saatte bir her bir melez kombinasyondan dörder adet çiçek örneği alınarak florasan mikroskop ile incelenmiştir. Aydın Siyahı x *Solanum torvum* çiçeklerinde tozlamadan 30 saat sonra sonra çiçek tozu çim boruları yumurtalığa ulaşırken, Kemer x *Solanum torvum* çiçeklerinde tozlamadan 24 saat sonra sonra çiçek tozu çim borularının yumurtalığa ulaştığı tespit edilmiştir.

Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ve *Solanum torvum'*da çiçek tozu canlılığı ve çimlenmesi açısından istatistiki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir. En yüksek polen canlılığı Kemer (% 70.4) çeşidinden elde edilmiştir. En yüksek polen çimlenmesi ise *Solanum torvum*'dan (% 22.8) meydana gelmiştir.

Çalışmada elde edilen melez bireylerin (Kemer x *Solanum torvum* ve Aydın Siyahı x *Solanum torvum*) morfolojik gözlemleri yapılmıştır. Bu melez bireylerde hem kendileme hem de geriye melezlemeler [(Kemer x *Solanum torvum)* x Kemer ve (Aydın Siyahı x *Solanum torvum)* x Aydın Siyahı] yapılmış ancak meyve oluşmamıştır. Kemer x *Solanum torvum* melezi ile Aydın Siyahı x *Solanum torvum* melezi bitkiler yaprak rengi dışında birbirlerine benzerdir. Kemer x *Solanum torvum* melezi bitkilerin yaprak rengi Kemer çeşidine benzemiştir. Bu melez bitkiler S*olanum torvum* bitkilerine yaprak şekli, dikenlilik, tüylülük, çiçeklenme çalımsı gelişim yönünden, *Solanum melongena*'ya da çiçek rengi ve büyüklüğü, diken rengi, bitki gelişimi yönünden benzemiştir. Ancak elde edilen bu melez bireyler kısır olmuştur.

Solanum torvum, Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin yaprak eksplantlarından ve genç meyvelerinin döllenmiş yumurta hücrelerinden elde edilen embriyogenik kalluslar, protoplast füzyonu çalışmalarında protoplast kaynağı olması amacıyla elde edilmeye çalışılmıştır. Embriyogenik kallus eldesi için Aydın Siyahı, Kemer ve *Solanum torvum*'un döllenmiş yumurta hücreleri, 1 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l BAP, 1 mg/l 2,4 D + 1 mg/l BAP, 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4 D içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Ayrıca *Solanum torvum* için 3 mg/l BAP içeren MS ortamı da denenmiştir. Çalışma sonucunda 1 mg/l Kin uygulamasının Aydın Siyahı, Kemer ve *Solanum torvum*'un döllenmiş yumurta hücrelerinden kallus eldesinde başarılı olduğu tespit edilmiştir. En yüksek kallus eldesi ise 1 mg/l Kinetin uygulanan Aydın Siyahı çeşidinden (% 84) elde edilmiştir. *Solanum torvum*, Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin genç taze yaprakların yaprak damar arası (YDA) ve yaprak damar üzerinden (YDÜ) alınan eksplantlar 1.5 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l BAP ve 2 mg/l 2,4 D içeren MS ortamında alınmıştır. YDA'dan alınan

eksplantlar için 1.5 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l BAP, YDÜ'den alınan eksplantlar için 2 mg/l 2,4 D uygulamaları daha başarılı bulunmuştur.

Anter kültürü protokolünün oluşturularak hem *Solanum melongena* ve *Solanum torvum* arasında somatik hibridizasyon yoluyla elde edilebilecek tetraploid bitkileri fertil dihaploid bitkilere dönüştürmek, hem de anter kültüründen elde edilen haploid yapıdaki embriyogenik kallusları protoplast füzyonunda diploid bitki eldesi sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Anter kültürü çalışmalarına 2012 yılı bahar yarıyılında Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'nın kullandığı ortama göre (C, R ve V3) başlanmıştır. Bu dönemde *Solanum torvum*'dan kallus ve bitki eldesi sağlanamamıştır. Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinden ise sadece kallus elde edilmiştir. Çalışmanın 2014 yılı yaz döneminde ise, Dumas de Vaulx ve ark. (1982), ve CP ortamlarında kültüre alınan antelerden en yüksek kallus gelişimi R ortamında Aydın Siyahı çeşidinden (% 26.65) elde edilmiştir. CP ortamında hiçbir genotipten kallus ve bitki elde edilmemiştir. Tüm genotiplerden elde edilen kallusların büyüklükleri çoğunlukla çok küçük kompakt-beyaz görünümünde olmuşlardır. Bu dönemde de hiçbir ortamda bitki oluşmamıştır. 2014 yılı güz dönemi anter kültürü çalışmalarında, Dumas de Vaulx ve ark. (1982) ve CP regenerasyon ortamlarında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve tamamen karanlık koşullarda denenmiştir. Farklı ortam ve koşulların denendiği çalışmada her genotipten belli miktarlarda kallus oluşumu görülmüştür. En yüksek kallus oluşum oranları karanlık koşullarda R ve V3 ortamlarına ekilen Aydın Siyahı ve Kemer anterlerinden elde edilmiştir (sırasıyla % 30.9 ve % 29.8). En yüksek bitki eldesi R ortamında Aydın Siyahı çeşidinden elde edilmiştir (% 4.6). Çalışmanın 2015 yaz döneminde Aydın Siyahı ve Kemer çeşitleri anter kültürü çalışmaları Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'na göre yapılmıştır. Yaz döneminde yeterli sayıda anter petrilere yerleştirilmesine karşın kallus gelişimi düşük olduğu gibi hiç bitki oluşmamıştır. En yüksek kallus eldesi % 4.5 ile Kemer çeşidinden olurken, Aydın Siyahı çeşidinin ise % 2.5 olmuştur. 2015 yılı güz döneminde anter kültürü çalışmalarında modifiye edilmiş Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'e göre Aydın

Siyahı ve Kemer çeşitleri ile tekrar denenmiştir. Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'de bildirilen C ortamının 3 farklı 2,4 D, Kinetin ve sakkaroz dozları denenmiştir. En yüksek bitki eldesi 1 mg/l 2.4-D + 1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakaroz (1/1) ortamında (% 36.4) Aydın Siyahı çeşidinden elde edilmiş bunu 5 mg/l 2.4-D + 5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakaroz (5/5) ortamında (% 33.8) Kemer çeşidi takip etmiştir. 2015-Güz döneminde anter kültüründen elde edilen bitkilerin viyollere aktarılan bitki sayısı 501, araziye aktarılan bitki sayısı ise 90 adet olmuştur. Gerek viyollere (171 bitki) gerek araziye şaşırtılan (27 bitki) en fazla bitki sayısı Aydın Siyahı çeşidinin 1/1 uygulamasından elde edilmiştir. Bunu Kemer çeşidinin 5/5 uygulaması takip etmiştir (sırasıyla, viyollere 124, araziye 22 bitki).

Anter kültüründen elde edilen ve ploidi seviyesi incelenen 79 bitkiden, 60'ı haploid, 13'ü diploid, 4'ü triploid, 1'i tetraploid ve 1'i mixoploid olarak belirlenmiştir.

Tür içi ve türlerarası tozlanma ve döllenme problemlerine alternatif bir çözüm olan *in vitro* tozlanma ve döllenme yöntemi *Solanum melongena* ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemelerle denenmiştir. Bu amaçla stigma tozlanması ve döllenmesi ve plesanta (ovaryum) döllenmesi yapılmıştır. *İn vitro* ortamda *Solanum torvum* ile *Solanum melongena* arasındaki melezleme çalışmalarında en fazla kallus gelişimi 1 mg/l NAA / 2 mg/l BAP içeren ortamda Aydın Siyahı x *Solanum torvum*'un ovaryum döllemesinden elde edilmiştir.

Protoplast füzyonunda *in vitro* ortamda elde edilen ebriyogenik kalluslar ile *Solanum melongena*'nın genç yaprakları protoplast kaynağı olarak kullanılmıştır. Patlıcanda kalluslardan ve yaprak mezofil hücrelerinden en yüksek sayıda protoplast izolasyonu sağlamak için enzim (0.7 M mannitol, 18.0 mM $CaCl_2$, 6.0 mM MES tamponu, 1.4 mM NaH_2PO_4, %1 Onozuka RS cellulase, %1 Macerase, %0.2 Pectolase Y-23, pH 5.6) ve BH3 kombinasyonları denenmiştir. Kalluslar için 1.5 ml enzim solusyonu + 2.5 ml BH3 kültür ortamı, yaprak mezofil hücreleri için 1.5 ml enzim solusyonu + 4 ml BH3 kültür ortamı kullanımının en yüksek protoplast verimliliğini sağladığı belirlenmiştir. PEG yöntemiyle

birleştirilen protoplastlar EMEP katı ortamı (Grosser ve Gmitter, 2011) üzerine 8-12 damla ortam eklenerek petri kaplarında karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Kültürden 4-6 hafta sonra birleşmeye başlayan protoplast hücrelerinden mikro kalluslar gözlenmiştir. Ancak mikro kalluslardan sonra gelişim elde edilememiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında maddi manevi yardımlarını esirgemeyen, yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora tezimin her aşamasında beni yönlendiren, sorduğum tüm soruları sabırla dinleyip cevaplayan ve bana zaman ayıran saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU, ikinci danışman hocam Dr. Hatice Filiz BOYACI'ya,

Yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulunan Doktora tezi jüri üyelerinden Sayın Prof. Dr. Salih, KAFKAS, Doç.Dr. Hatıra TAŞKIN ve Yrd. Doç. Dr. Mehtap YILDIZ'a

Tezimin bir kısmını yürüttüğüm Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne (BATEM),

Laboratuvar çalışmalarımda her türlü desteğini gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Sinan ETİ, Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ, ile arkadaşlarım Berken Çimen, Sara YASEMİN, Şenay KARABIYIK, Songül ÇÖMLEKÇİOĞLU, Gökhan BAKTEMUR, Adem TAŞ, Ayşegül BURĞUT, Özhan ŞİMŞEK, Tolga İZGÜ, Başar SEVİNDİK'e,

Yardım ve desteklerini esirgemeyen Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Fethiye Nürgül TÜREMİŞ, Prof. Dr. Sevgi PAYDAŞ KARGI ve Mehmet Ali SARIDAŞ'a

Araştırmayı maddi yönden destekleyen Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Tezimin son düzeltmelerindeki katkılarından dolayı Adnan TÜRKİBİŞ'e,

Doktora çalışmam esnasında tüm zorluklara rağmen bana manevi desteklerini ve sevgilerini hiç esirgemeyen annem, kardeşlerim ve özellikle 2009 yılında kaybettiğim babam Fazlı YÜCEL'e, sevgili eşim Gülşah YÜCEL ve biricik oğlum Umut Can YÜCEL'e,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR IX
İÇİNDEKİLER X
ÇİZELGELER DİZİNİ XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ XVIII
SİMGELER VE KISALTMALAR XXII
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 7
2.1. Hastalıklara dayanıklılık ve ıslah çalışmaları 7
2.2. Embriyo kurtarma ve *İn vitro* tozlama ve dölleme çalışmaları 14
2.3. Anter kültürü ve regenerasyon çalışmaları 19
2.4. Protoplast kültürü çalışmaları 34
3. MATERYAL VE METOT 43
3.1. Materyal 43
3.2. Metot 43
3.2.1. Doğada türler arası melezleme 43
3.2.1.1. Arazi melezlemeleri ve tohum elde edilmesi 44
3.2.1.2. Embriyo kurtarma 44
3.2.1.3. Çiçek tozu çim borusu büyümesinin incelenmesi 51
3.2.1.4. Çiçek tozu canlılık ve çimlenme oranlarının belirlenmesi 52
3.2.1.5. *Solanum torvum* fidelerinin elde edilmesi 53
3.2.1.6. *İn vitro* kültürden elde edilen melez bitkilerin dış ortama alıştırılması 53
3.2.1.7. Melez bireylerin fertilite durumlarının araştırılması 55
3.2.1.8. Embriyogenik kallus eldesi için uygun ortam denemeleri 56

3.2.1.9. Patlıcanda anter kültürü protokolünün araştırılması 58
3.2.1.10. Flow sitometri yöntemiyle ploidi seviyesinin belirlenmesi . 66
3.2.2. *İn vitro* tozlama ve dölleme..... 67
3.2.2.1. Stigma tozlanması ve döllenmesi..... 67
3.2.2.2. Plesanta döllenmesi..... 68
3.2.3. Patlıcanda protoplast füzyonu protokolü oluşturulması..... 68
3.2.3.1. Embriyogenik kalluslar ve yaprak mezofil protoplastlarının izolasyonu..... 69
3.2.3.2. Protoplastların saflaştırılması ve sayımı 72
3.2.3.3. PEG (polietilen glikol) yöntemiyle protoplastların füzyonu.. 74
3.2.4. Sonuçların Değerlendirilmesi..... 76
4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 79
4.1. Doğada türler arası melezleme..... 79
4.1.1. Arazi melezlemeleri ve tohum elde edilmesi 79
4.1.2. Embriyo kurtarma ile ilgili sonuçlar 79
4.1.3. Çiçek tozu çim borusu büyümesinin incelenmesi ile ilgili sonuçlar . 83
4.1.4. Çiçek tozu canlılık ve çimlenme oranlarının belirlenmesi ile ilgili sonuçlar..... 87
4.1.5. Melez bireylerin fertilite durumlarının araştırılması..... 89
4.1.6. Embriyogenik kallus eldesi için uygun ortam denemeleri ile ilgili bulgular..... 93
4.1.7. Patlıcanda anter kültürü protokolünün araştırılması ile ilgili sonuçlar..... 98
4.1.8. Flow sitometri yöntemiyle ploidy seviyesinin belirlenmesi ile ilgili bulgular..... 119
4.2. *İn vitro* tozlama ve dölleme ile ilgili sonuçlar..... 120
4.2.1. Stigma tozlanması ve döllenmesi..... 121
4.2.2. Plesanta (Ovaryum) döllenmesi 121
4.3. Patlıcanda protoplast füzyonu protokolü oluşturulması ile ilgili sonuçlar 125

4.3.1. Embriyogenik kalluslar ve yaprak mezofil protoplastlarının izolasyonuna ait sonuçlar 125
4.3.2. Protoplastların saflaştırılması ve sayımı 126
4.3.3. PEG yöntemiyle protoplastların füzyonu ile ilgili bulgular 127
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 133
KAYNAKLAR..... 139
ÖZGEÇMİŞ..... 153

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Patlıcanın kimyasal bileşimi ve enerji içeriği (100 g yenilebilir kısım içinde) (Ellialtıoğlu, 2010) 3

Çizelge 3.1. Patlıcanda anter kültüründe kullanılan C, R ve V3 ortamları (mg/) 59

Çizelge 3.2. Anter kültüründe kullanılan C, R ve V3 ortamlarının içerikleri.....59

Çizelge 3.3. Patlıcanda anter kültüründe kullanılan CLC/Ipomoea CP ortamı 61

Çizelge 3.4. Anter kültüründe kullanılan CP ortamının içeriği 62

Çizelge 3.5. Anter kültüründe kullanılan C, R ve V3 ortamlarının içerikleri.....63

Çizelge 4.1. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* melezlerinin *in vitro* koşullarda embriyo kurtarma tekniği ile bitki eldesi 81

Çizelge 4.2. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* melezlerinin *in vitro* koşullarda embriyo kurtarma ile bitkiye dönüşüm yüzdeleri 82

Çizelge 4.3. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* melezlerinin *in vitro* koşullarda doğrudan ekim yöntemiyle bitki eldesi.....82

Çizelge 4.4. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* melezlerinin *in vitro* koşullarda doğrudan ekim yöntemiyle bitkiye dönüşüm yüzdeleri 83

Çizelge 4.5. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* çiçeklerinde tozlamadan sonra çiçek tozu çim borularının ilerlemesi.....84

Çizelge 4.6. Tozlamadan sonra farklı saatlerde alınan *Solanum melongena* x *Solanum torvum* çiçeklerinin döllenme durumu.....85

Çizelge 4.7. Aydın Siyahı, Kemer ve *Solanum torvum*'un polen çimlenme ve canlılık yüzdeleri 88

Çizelge 4.8. Çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılan çeşit ve melezlerin bitkisel özellikleri 90

Çizelge 4.9. Farklı ortamlarda *Solanum melongena* ve *Solanum torvum*'un döllenmiş yumurta hücrelerinden kallus gelişimi (mg/l).....96

Çizelge 4.10. *Solanum torvum*, Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin genç yapraklarından kallus eldesi 97
Çizelge 4.11. Patlıcan genotiplerinde 2014 yaz döneminde anter kültüründen elde edilen sonuçlar 101
Çizelge 4.12. 2014 yaz döneminde anter kültüründen elde kallus büyüklükleri ..101
Çizelge 4.13. 2014 yaz döneminde anter kültüründen elde kallus tipi ve rengi ...101
Çizelge 4.14. Patlıcan genotiplerinde 2014 güz döneminde anter kültüründen elde edilen sonuçlar 103
Çizelge 4.15. 2014 güz döneminde anter kültüründen elde edilen kallus büyüklükleri 104
Çizelge 4.16. 2014 güz döneminde anter kültüründen elde edilen kallus tipi ve rengi.....104
Çizelge 4.17. Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinin 2015 yaz döneminde anter kültüründen elde edilen sonuçlar.....107
Çizelge 4.18. Anter kültüründe kullanılan modifiye edilmiş C, R ve V3 ortamlarının içerikleri.....107
Çizelge 4.19. 2015-Güz döneminde 0.01/0.01 ortamında anter kültüründen elde edilen sonuçlar 108
Çizelge 4.20. 2015-Güz döneminde 1/1 ortamında anter kültüründen elde edilen sonuçlar.....108
Çizelge 4.21. 2015-Güz döneminde 5/5 ortamında anter kültüründen elde edilen sonuçlar.....109
Çizelge 4.22. 2015-Güz döneminde anter kültüründen elde edilen kallus büyüklükleri 109
Çizelge 4.23. 2015-Güz döneminde anter kültüründen elde edilen kallus tipi ve rengi 110
Çizelge 4.24. 2015-Güz döneminde anter kültüründen elde edilen bitkilerin dış ortama alınması.....113

Çizelge 4.25. 2015-güz döneminde anter kültüründen elde edilen bitkilerin ploidi seyiyeleri 120
Çizelge 4.26. *İn vitro* tozlama/dölleme ile melezleme 123
Çizelge 4.27. Stigma tozlamasında aktif karbon ilave edilmiş ortamlar 123

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 3.1. Aydın Siyahı ve Kemer patlıcan çeşidi ile *Solanum torvum* arasında yapılan melezlemelerden görünüm.....45

Şekil 3.2. *Solanum torvum* meyvelerinin hasatı.....46

Şekil 3.3. Aydın Siyahı ve Kemer patlıcan çeşitlerinin *Solanum torvum* ile melezlenmesinden elde edilen meyvelerin farklı hasat tarihlerindeki görünümleri (25., 30. ve 35. gün).....46

Şekil 3.4. Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında yapılan melezlemelerden elde edilen tohumlarda Tek Tek Açma ve Doğrudan Ekim yöntemleriyle embriyo kurtarma ve melez bitkilerin eldesi.....47

Şekil 3.5. Tespit çözeltisi içerisinde bulunan örneklerin yıkama setine bağlanması.....52

Şekil 3.6. *Solanum torvum*'un tohumlarından fide elde edilmesi ve araziye şaşırtılması.....54

Şekil 3.7. Doku kültüründen elde edilen melez bitkilerin dış ortama alıştırılması.....55

Şekil 3.8. Melez bireylerin arazideki görünümü.....55

Şekil 3.9. Kallus eldesinde kullanılan genç meyveler.....56

Şekil 3.10. Genç meyvelerin sterilizasyonu.....57

Şekil 3.11. *Solanum torvum*, Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin yapraklarından kallus eldesi.....58

Şekil 3.12. *Solanum torvum* ve *Solanum melongena*'da anter kültürü için uygun tomurcuk seçimi.....60

Şekil 3.13. CP ve C ortamlarında ortamlarında Kemer, Aydın Siyahı ve *Solanum torvum* anterlerinin gelişimi.....62

Şekil 3.14. Anterlerden bitki gelişimi.....64

Şekil 3.15. Anterlerden oluşan bitkileri kavanozlara, dış ortama ve araziye aktarma....65
Şekil 3.16. Yaprak örneklerinin hazırlanışı....66
Şekil 3.17. Flow sitometri cihazında triploid bitkinin yaprağından elde edilen pik....67
Şekil 3.18. Steril kabin içerisinde filtre sterilizasyonu ile hazırlanan PEG çözeltisi....70
Şekil 3.19. Embriyogenik kallusların BH3 çözeltisinde dağılması....71
Şekil 3.20. Kalluslara enzim çözeltisi eklenmesi....71
Şekil 3.21. Kallus ve yaprakları inkübatörlü yatay hareketli çalkalayıcıda BH3+ enzim solüsyonunda bekletme....72
Şekil 3.22. Protoplasların santrifüj ile saflaştırılması....73
Şekil 3.23. PEG solüsyonu eklenmiş protoplast karışımı....75
Şekil 4.1. Tek Tek Açma Yöntemi ile binoküler mikroskop altında çıkarılan Aydın Siyahı x *S. torvum* ve Kemer x *S. torvum* embriyolarından geliştirilen bitkicikler....80
Şekil 4.2. Doğrudan Ekim Yöntemiyle *in vitro* kültüre alınan Aydın Siyahı x *S. torvum* ve Kemer x *S. torvum* tohumlarından oluşan bitkicikler....80
Şekil 4.3. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* çiçek tozu çim borularının sırasıyla stigma, dişicik borusu ve yumurtalık girişindeki durumu....86
Şekil 4.4. Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinin yumurta hücrelerinin döllenmesi....87
Şekil 4.5. Aydın Siyahı, Kemer çeşitleri ve *Solanum torvum'*da çiçek tozu canlılık ve çimlenmesi....88
Şekil 4.6. **(**Kemer x *Solanum torvum*) x Kemer geriye melezleme....89
Şekil 4.7. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* melezi ile *Solanum torvum*'un bitkisel özelllikleri....91

Şekil 4.8. Çalışmada kullanılan bitkilerin çiçek görünümleri 93
Şekil 4.9. *Solanum melongena* ve *Solanum torvum*'un döllenmiş yumurta hücrelerinin 1 mg/l Kinetin ortamında kallus gelişimi 95
Şekil 4.10. Yaprak ekplantlarından kallus gelişimi.....98
Şekil 4.11. Aydın Siyahı çeşidinin R ortamında kallus gelişimi.....99
Şekil 4.12. Kemer çeşidinin R ortamında kallus gelişimi 100
Şekil 4.13. Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinde anter kültürü ortamından (Dumas de Vaulx ve ark. 1982'e göre) elde edilen kallus ve bitkiler.....105
Şekil 4.14. Anter kültürüyle oluşan bitkileri dış ortama alıştırma 105
Şekil 4.15. *Solanum torvum,* Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinin anterlerinin farklı ortam ve koşullardaki kallus gelişimi.....106
Şekil 4.16. Anter kültüründen elde edilen bitkileri dış ortama alıştırma 113
Şekil 4.17. Anterlerden direkt bitki oluşumu 114
Şekil 4.18. Anterlerden indirekt bitki oluşumu 115
Şekil 4.19. 0.01 mg/l 2.4-D + 0.01 mg/l Kinetin + 30 g/l sakaroz içeren ortamda (0.01/0.01) patlıcan anterlerinin gelişimi.....116
Şekil 4.20. 1 mg/l 2.4-D + 1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakaroz içeren ortamda (1/1) patlıcan anterlerinin gelişimi.....117
Şekil 4.21. 5 mg/l 2.4-D + 5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakaroz içeren ortamda (5/5) patlıcan anterlerinin gelişimi.....118
Şekil 4.22. 2015 güz yarıyılında anter kültüründen elde edilen bitkilerin araziye şaşırtılması.....119
Şekil 4.23. *İn vitro* melezlemelerden meydana gelen kalluslar.....124
Şekil 4.24. Alt kültüre alınmış *in vitro* melezlemelerden meydana gelen kalluslar.....124
Şekil 4.25. Patlıcan yaprak ve kalluslarından izole edilen protoplastlar.....125
Şekil 4.26. Embriyogenik kallusların BH3 çözeltisinde dağılması.....126
Şekil 4.27. İzole edilen protoplastların yoğunluğunun tespiti.....127

Şekil 4.28. Binoküler mikroskopta protoplastların kontrolü ve sayımı 127
Şekil 4.29. PEG plus (A+B) solüsyonundan sonra protoplasların füzyonu 128
Şekil 4.30. PEG yöntemiyle proplast füzyonu sonrası oluşan mikro-kalluslar...132

SİMGELER VE KISALTMALAR

MS	: Murashige and Skoog
2,4-D	: 2,4-Dikloro fenoksi asetik asit
NAA	: Naftalen asetik asit
BAP	: Benzil amino purin
ABA	: Absisik asit
Kin	: Kinetin
CP	: CLC/Ipomoea ortamı
mm	: Milimetre
mg/l	: Miligram/litre
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
g	: Gram
mg	: Mikrogram
l	: Litre
S.	: *Solanum*
St.	: *Solanum torvum*
Kem	: Kemer
Ayd	: Aydın Siyahı
YA	: Yaprak arası
YD	: Yaprak damar üzeri
M	: Molar
PEG	: Polietilen glikol
NaOH	: Sodyum hidroksit
TTC	: Trifenil tetrazolium klorit
ppm	: milyonda bir kısım
mM	: Milimolar

SAS : Statistical Analysis Systems

µM : Mikrometre

1. GİRİŞ

Solanaceae familyasına ait olan ve ***Solanum melongena*** L., aubergine, eggplant, melanzani veya brinjal olarak dünyada farklı isimlerle bilinen patlıcan bitkisinin, anavatanı Hindistan olarak bilinmektedir. Patlıcan, İndo-Burma orijinli bir bitki olarak tanımlanmaktadır. İkinci derecedeki gen merkezinin de Çin olduğu yönünde kayıtlar bulunmaktadır (Kalloo, 1993). Daunay ve ark. (2001), patlıcanın kültürü yapılan tiplerinin orijinini ortaya koymak için birçok teknikten yararlanıldığını (tohum integümentlerinin elektron mikroskobisi, melezlemelerdeki uyuşma durumu, tohum proteinlerindeki ve izoenzimlerindeki varyasyon ve morfolojik ölçümler); buna göre *S. melongena*'nın en ilkel formlarının (*S. incanum* L.) Doğu Afrika 'savana'larındaki ekvatoral bölgeden ortaya çıktığını ileri sürmektedirler. Ellialtıoğlu (2010), *S. İncanum*'un Afrika ve Orta Asya'dan, Paleolitik ve Neolitik çağlarda insanların Hind-i Çin lokasyonuna göç etmesiyle taşındığını bildirmiştir. Bu dönemlerde patlıcan bitkisi tıbbi amaçlarla tüketilmiştir. Yaprakları ağrı kesici, tüm bitki ise kalp hastalıklarının tedavisinde, olgun meyveler bağırsakları çalıştırmak için kullanılmıştır. Asya'ya girişin ardından bu türün *S. melongena*'ya dönüştüğü rapor edilmiştir. *S. melongena*'nın ilk tür ayrımı Güney Doğu Asya'da meydana gelmiştir. Indo-Burma bölgesi, kültüre alma işleminin tarihi merkezidir. Patlıcanın batıya doğru hareketi, İpek Yolu sayesinde gerçekleşmiştir. Türkiye'de patlıcanın yetiştiriciliği 16. yüzyılda başlamıştır. Buradan Kuzey Afrika'ya taşınmış, bunun ardından Candolle'ye göre Araplar sayesinde 19. yüzyılda İspanya'ya getirilmiştir.

'Eggplant' adı altında; üzümsü meyve yapısındaki etli meyveleri bulunan, ***Solanum*** cinsine ait, kültürü yapılan veya yabani çok sayıdaki tür anlaşılmaktadır. Bu bitkilerin meyveleri acımsı tadları, hafif tatlı veya keskin baharatlı kokularıyla değer taşımaktadır. Bu bitkilerin değişik kısımları yemeğe tad veren bir çeşni olarak kullanılabildiği gibi, meyveleri taze olarak yenebilmekte; pişirilerek veya kurutularak da sebze niteliğinde tüketilmektedir. Yaprakları eğer dikensiz olursa

hafif acılık özelliğine sahip olduklarından ıspanak gibi pişirilerek tüketilebilmektedir. Sebze olarak tüketiminin yanısıra, çoğunlukla yüksek alkaloid içerikleri nedeniyle bu türler çok önceden dini törenlerde ve geleneksel tıpta şifa kaynağı olarak da kullanılmıştır (Ellialtıoğlu, 2010).

Kültürü yapılan patlıcan türleri;

***Solanum melongena* L.** (Asya'da ve Akdeniz havzasında en fazla yetiştirilen patlıcanlar bunlardır. Brinjal, eggplant veya aubergine adlarıyla bilinmektedir)

***S. aethiopicum* L.** (Scarlet patlıcanı veya bahçe patlıcanı adıyla bilinmektedir). Tüm Afrika'da çok önemli bir bitki olup Batı Afrika'da bamyadan sonra gelen en önemli meyvesi ve yaprakları tüketilen sebze konumundadır.

***S. macrocarpon* L.** (Gboma patlıcanı) Son iki patlıcan türü çoğunlukla Afrika'da yetiştirilmekte olup; *S. aethiopicum* aynı zamanda Güney Amerika'da, kültürü yapılan diğer tür *S. macrocarpon*, Tropikal Amerika ve Asya'da da yetiştirilmektedir. Her üç tür de diploid yapıda olup 2n=24 kromozom sayısına sahiptir (Ellialtıoğlu, 2010).

Sekara ve arkadaşlarının (2007) bildirdiğine göre, Lester (1998), *Solanum melongena*'nın yabani *Solanum incanum'*dan Hindistan ve Güneydoğu Çin'de *Solanum aethiopicum* ve *Solanum macrocarpon*'un Afrika'da yabani akrabaları olan *Solanum anguivi* ve *Solanum dasyphyllum*'dan geldiğini bildirmiştir.

Patlıcan, *Solanaceae* familyası içerisinde üretim bakımından patates ve domatesten sonra üçüncü önemli sebze olup, vitamin ve mineral içeriği bakımından da oldukça değerlidir (Çizelge 1.1). Dünya toplam sebze üretiminin (1169 milyon ton) yaklaşık % 4'ünü (50 milyon ton) patlıcan oluşturmaktadır. Patlıcan üretiminin % 93'ü Asya'da, % 6'sı ise Afrika, Avrupa ve Amerika'da üretilmektedir (FAO, 2014).

FAO (2014)'e göre Dünya'da 1870728 ha 'da 50193117 ton patlıcan üretimi yapılmaktadır. Yanmaz ve ark. (2015), Türkiye'nin toplam sebze

üretiminin 28.448.118 ton olduğunu ve patlıcan üretiminin ise bu üretimin % 3'ünü oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 1.1. Patlıcanın kimyasal bileşimi ve enerji içeriği (100 g yenilebilir kısım içinde) (Ellialtıoğlu, 2010)

	Yenilebilir kısım (%)	92			
	Su (g)	92.7		Lisin	53.000
	Protein (g)	1.1		Histidin	20.000
	Yağlar (g)	0.4		Arginin	47.000
Karbon-hidratlar	Çözünebilir (g)	2.6		Aspartik asit	147.000
	Amido (g)	0.0		Treonin	41.000
	Çözünmeyen (g)	2.6		Serin	45.000
	Fibra alimentare	2.6	Aminoasitler (Toplam 1.1 g proteini oluşturan kısım) (mg)	Glutamik asit	144.000
Enerji	Kcal	15		Prolin	73.000
	Kj	63		Glisin	53.000
Mineral maddeler	Sodyum (mg)	26		Alanin	56.000
	Potasyum (mg)	184		Sistin	0.000
	Demir (mg)	0.3		Valin	60.000
	Kalsiyum (mg)	14		Metionin	21.000
	Fosfor (mg)	33		Isoleusin	43.000
Vitaminler	Tiamin (mg)	0.05		Leusin	70.000
	Riboflavin (mg)	0.05		Tirosin	42.000
	Niasin (mg)	0.60		Fenilalanin	59.000
	Vitamin A (mg)	0		Triptofan	11.000
	Vitamin C (mg)	11			

Dünyada ve ülkemizde patlıcan üretimini kısıtlayan en önemli faktörlerin başında toprak kökenli fungal hastalıklar ve zararlılar gelmektedir. Fungal hastalıklardan ***Fusarium*** ve ***Verticillium***, zararlılardan ***Nematod*** önemli verim kayıplarına neden olmaktadır (Cappelli ve ark.; 1995; Başay, 2006; Mutlu ve ark., 2008). Bu patojenler hem açıkta hem de sera yetiştiriciliğinde zarar yapmakta, önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Söz konusu hastalık ve zararlılar sadece Türkiye'de değil Asya ve kısmen de Avrupa'da üretimi kısıtlamaktadır (Kennet ve ark., 1970; Mutlu ve ark., 2008). Söz konusu patojenlerle mücadelede genellikle kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Ancak günümüzde insan ve çevreye sağlığı üzerinde yarattığı olumsuz etkiler nedeniyle kimyasal kullanımı

azaltılmış ve alternatif mücadele yöntemleri denenmeye başlanmıştır. Mücadele yöntemleri içerisinde en güvenli yol dayanıklı çeşit veya anaç kullanmaktır (Rotino ve ark., 2002; Toppino ve ark., 2008a). Her üç patojene birden dayanıklı ticari bir çeşit bulunmamakla birlikte, patlıcanda kullanılan anaçların performansının düşük olması da yeni çalışmaları zorunlu kılmaktadır. Her üç patojene dayanıklılığı sağlayan genler patlıcanın kültür formunda bulunmayıp yabani akrabası olan *Solanum torvum* Sw.'da mevcuttur (Yamakawa ve Mochizuki, 1979; Ali ve ark., 1992; Monma ve ark., 1996; Salam ve ark., 2002; Luc ve ark., 2005; Sekara ve ark., 2007). Ancak *Solanum torvum*'dan kaynaklanan eşeysel uyuşmazlık nedeni ile generatif olarak türler arası melezleme gerçekleştirilememekte, doğal yollardan kültür formuna dayanıklılığı sağlayan genler aktarılamamaktadır (Kumar ve ark., 1998; Sekara ve ark., 2007). Bunun yanında patlıcanda kullanılan anaçlar ya patlıcanın yabani formları olan *Solanum torvum* ve *Solanum integrifolium*, ya da domates için geliştirilmiş olan ticari anaçlardır. *Solanum torvum* ve *Solanum integrifolium*'un anaç olarak kullanıldığı durumlarda kültür çeşidinden yeterli performans elde edilememektedir. Her iki yabani form ekolojik koşullardan özellikle de düşük sıcaklıktan olumsuz etkilenmektedir (Boyacı ve ark., 2006). Islah çalışmalarında generatif yolla arzu edilen karakterlerin aktarılamaması durumunda devreye genetik manipülasyon girmektedir. Genetik transformasyona imkân sağlayan ve bitkinin en küçük birimi olan protoplastların kullanıldığı somatik melezleme, bitki ıslahında bu tür problemlerin üstesinden gelinmesini sağlayan metot olup, bu sayede pek çok türler arası melezleme başarı ile gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca bu yöntem cinsler arası melezlemeye de uygulama şansı vermek suretiyle yeni türlerin elde edilmesine de olanak sağlamaktadır (Sihachakr ve ark., 1993; Kashyap ve ark., 2003).

Yapılan bilimsel araştırmalara göre, patlıcanın kültür formları arasında *Fusarium*, *Verticillium* ve *Nematod'*a dayanıklı genotipler bulunmamaktadır. *Fusarium* ve *Verticillium*'a karşı bazı dayanıklılık kaynakları tespit edilmekle birlikte henüz ticari çeşitlerde yaygın kullanım olanağı bulamamıştır (Rotino ve

ark., 2002; Toppino ve ark., 2008a). Nematodlara karşı dayanıklılık ise kültür patlıcanlarında tespit edilmemiştir. Dolayısıyla *Fusarium, Verticillium* ve *Nematod'*a aynı anda dayanıklı olan ticari bir çeşit henüz geliştirilmemiştir. Ayrıca yabani formlarda mevcut dayanıklı genler bir ya da iki hastalığa karşıdır. Oysa bu üç etmene de dayanıklılık sağlayan genler bir arada patlıcanın akrabası ve aynı zamanda yabani tür olan *Solanum torvum*'da mevcuttur (Yamakawa ve Mochizuki, 1979; Ali ve ark., 1992; Monma ve ark., 1996; Salam ve ark., 2002; Luc ve ark., 2005; Sekara ve ark., 2007). Bununla birlikte bu yabani formdaki dayanıklılık genleri kültür bitkilerine aktarılmaya çalışılmış fakat ticari çeşide dönüştürülememiştir. Ayrıca somatik hücrelerin melezlenmesi ile bazı türlerden hastalıklara dayanıklılık geninin kültür formuna kazandırılması mümkün olmuştur (Rotino ve ark. 1997).

Solanum torvum'da ve *Solanum habrochaites'*te her üç patojen etmene karşı dayanıklılık bulunmaktadır. *Solanum melongena* ile *Solanum torvum* arasında daha önce somatik melezleme yolu ile türler arası somatik hibritler geliştirilse de bugüne kadar pratiğe intikal eden bir sonuç elde edilememiştir (Rotino ve ark., 2002; Toppino ve ark., 2008a).

Solanum torvum, Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin yaprak eksplantlarından ve genç meyvelerinin döllenmiş yumurta hücrelerinden elde edilen embriyogenik kalluslar, protoplast füzyonu çalışmalarında protoplast kaynağı olması amacıyla elde edilmeye çalışılmıştır.

Anter kültürü protokolünün oluşturularak hem *Solanum melongena* ve *Solanum torvum* arasında somatik hibridizasyon yoluyla elde edilebilecek tetraploid bitkileri fertil dihaploid bitkilere dönüştürmek, hem de anter kültüründen elde edilen haploid yapıdaki embriyogenik kallusları protoplast füzyonunda diploid bitki eldesi sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

Çalışmanın amacı, toprak kökenli *Fusarium* ve *Verticillium*, *Nematod'*a dayanıklılığı sağlayan genlerin bir arada olduğu *Solanum torvum* yabani patlıcan türü ile yaygın olarak yetiştirilen patlıcanın kültür formlarından (*Solanum*

melongena L.) iki çeşidi doğal ve *in vitro* ortamda melezleyerek, dayanıklılığı kültür formuna aktarmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hastalıklara dayanıklılık ve ıslah çalışmaları

Patlıcanın ıslah programları genellikle bu türün yetiştirildiği ülkelerde (Batı Avrupa, Türkiye, Hindistan, Çin ve Japonya) yürütülmektedir. Son 30 yılda sonuçlandırılan ıslah programlarında farklı fenotiplerde pek çok F_1 hibrit geliştirilmiştir (Sekara ve ark., 2007).

Patlıcan çeşitli hastalık ve zararlılara özellikle bakteriyel ve fungal solgunluk ile nematodlara ve böceklere hassastır (Collonnier ve ark., 2001; Sekara ve ark., 2007; Toppino ve ark., 2008a).

Fusarium oxysporum f.sp. *melongenae* hastalık etmeni özellikle Asya da ve kısmen de Avrupa da patlıcan üretimini kısıtlayan en önemli etmenlerden biridir (Kennet ve ark., 1970, Mutlu ve ark., 2008).

Hastalıklar önemli verim kaybına sebep olmakta (Cappelli ve ark.; 1995 Mutlu ve ark., 2008), hem açıkta hem de sera yetiştiriciliğinde zarar yapmaktadır. Fungusitlerin pahalı olması, çevreye verdiği zarar ve hastalığı tamamen kontrol edememesi dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinin ve kullanılmasının önemini ortaya koymaktadır.

Çoğu patojenlere dayanıklılık patlıcanda bulunmakla birlikte bunların düzeyi yetersiz veya kısmi olduğu için ıslah programında kullanılmak için etkin değildir (Toppino ve ark., 2008a).

Pratikte patlıcan yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı ülkelerde toprak kökenli patojenler ile nematod zararına karşı dayanıklı çeşit geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır (Rotino ve ark., 2002).

Rotino ve ark. (2005), patlıcan ve yabani akrabaları arasındaki somatik hibritlerin pratik olarak kullanılmasına yönelik temel kısıtlamalar kısırlık ve tetraploididir bu da ıslah programlarına dahil olmalarını engellemiştir. Anter kültürü yoluyla, patlıcan ile akraba *S. integrifolium* ve *S. aethiopicum* gr *Gilo* arasındaki türler arası hibritlerde tetraploid ploidi düzeyi diploid duruma getirmek

için başarıyla kullanılabilmektedir. Her iki akraba tür de patlıcanın önemli hastalılarından *Fusarium oxysporum* f. sp *melongenae* ve bazı bakteriyel patlıcan hastalıklarına (*Ralstonia solanacearum*) dirençlidir. Dihaploid androgenetik bitkiler, [(patlıcan x *S. aethiopicum*) x (patlıcan x *S. integrifolium*)] melezlenmesi ile elde edilen çift somatik hibritlerden ve geriye melezlenmiş tetraploid *S. aethiopicum* ve patlıcan melezi somatik bitkilerden elde edilmiştir. Fenotipik, moleküler, biyolojik ve biyokimyasal karakterizasyon ve ayrıca *Fusarium oxysporum* ile suni aşılama, melezleşmelerde yer alan türlerin genomları arasındaki kombinasyon ile tutarlı olmuşlardır. *Fusarium*'a dirençli dihaploidler patlıcan ile başarılı bir şekilde geriye melezlenmiştir. Elde edilen ıslah materyalleri potansiyel değerli ıslah materyalleri olarak kullanılmalarının yanı sıra, *S. integrifolium* ve *S. aethiopicum* gr *Gilo*'dan geriye melezlenmiş hatları *Fusarium*'a karşı direnç konusunda genetik ve moleküler araştırmalarda kullanıma uygun bulunmuştur.

Patlıcanın 39 (*Solanum melongena*) genotipinin bir germplazm koleksiyonu ve *S. torvum;* kontrollü sera testleri kullanılarak kök-ur nematoduna (*Meloidogyne javanica*) dayanıklılık açısından değerlendirilmiştir. Test edilen genotipler arasında, bu nematod türlerinin neden olduğu hastalığa karşı farklı direnç dereceleri gözlemlenmiştir. Islah edilmiş *S. melongena* türlerine ait bir hatta tam direnç (inokülasyondan sonra 7 hafta sonrasına kadar nematod ur kütlesi oluşumu yok) tespit edilmiştir. Bazı ticari patlıcan genotiplerinde kısmi direnç görülmüştür. Bu bulguların *S. melongena* gen havuzundaki *M. javanica*'ya karşı tamamen direnç kaynağı olan ilk rapor olduğunu bildirmişlerdir. Islah edilmiş *S. melongena* türlerinin kök ur nemeatoduna dayanıklılık özelliklerinin ticari patlıcan çeşitlerine kolaylıkla aktarılabileceğini belirtmişlerdir. Daha önce çeşitli kök-ur nematod türlerine (*M. javanica, M. arenaria* ve *M. incognita* dahil) dirençli olarak tarif edilen *S. torvum*'un *M. Javanica*'nın Brezilya popülasyonuna karşı da dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir. Bu nedenle, *S. torvum*'un kök-ur nematodlara karşı geniş spektrumlu direnç genlerinin en umut verici kaynaklarından biri olarak görülebileceğini ileri sürmüşlerdir. Geniş spektrumlu dayanıklılı, farklı çok sayıda

Meloidogyne türlerine sahip dünyanın tropik ve subtropikal bölgelerindeki olan çeşitlerin geliştirilmesine odaklanan ıslah programları için büyük önem taşıyacağını bildirmişlerdir (Boiteux ve Charchar, 1996).

Gousset ve ark (2005), patlıcanın yabani akrabası olan *Solanum torvum* Sw'a ait bitkiler Endonezya, Java Adası'nda toplanmıştır. Morfoloji, verimlilik, *Ralstonia solanacearum* ve *Fusarium oxysporum* f sp. *melongenae*'ya direnç seviyeleri ile RAPD ve I-SSR işaretleyicileri kullanarak genetik çeşitlilik değerlendirilmiştir. Endonezya, Bogor'da yetişen bitkiler, kök çapı ve dal sayıları hariç, toplanan bitkiler arasında incelenen tüm karakterlerde çok kuvvetli ve yüksek bir polimorfizm görüldüğünü bildirmişlerdir. Toplanan 29 *S. torvum* genotipi ve pozitif kontrol olarak kullanılan Pusa Purple Long çeşidi Bogor'daki seralarda *R. solanacearum*'a direnç açısından değerlendirilmiştir. Patlıcanın hastalık aşılanmış tüm bitkileri 2 hafta içinde öldüğünü tespit etmişlerdir. *S. torvum* bitkilerinin alt yapraklarında bakteri semptomları oluştuğunu bununla birlikte herhangi bir bitkinin ölmediğini tespit etmişlerdir. Semptomsuz bitkilerin köklerinde serolojik olarak saptanan bakterilerin varlığı *R. solanacearum*'a toleranslı olduğunu belirlemişlerdir. *S. torvum*'un 10 bitkisi İtalyan bir *F. oxysporum* f sp. *melongena* izolatına karşı da oldukça dirençli olduğunu belirlemişlerdir.

Oniki yabani *Solanum* genotipi, *Fusarium oxysporum* f sp. *melongenae* izolatına direncini belirlemek için fide evresinde cam serada test edilmiştir. Patojenin dört ayrı izolatı (üç tanesi Türkiye'den temin edilmiş ve birisi İtalya'da izole edilmiş) kullanılmıştır. *Solanum incanum* ve *S. linneanum* oldukça duyarlı olduğunu, *S. sisymbrifolium, S. torvum* ve *S. aethiopicum* Gilo grubunun ise (bir genotip) dirençli olduğunu belirlemişlerdir. *Solanum aethiopicum* Aculeatum'un iki genotipi, *S. aethiopicum* Gilo, *S. viarum* ve *S. macrocarpon*'da dirençli ve duyarlı bitkilerin olduğunu tespit etmişlerdir. Yabani *Solanum* türleri içinde bulunan direnç kaynaklarının *Fusarium* solgunluğuna dirençli patlıcan

çeşitlerininin ıslahında rahatlıkla kullanılabileceğini vurgulamışlardır (Stravato ve Cappelli, 2000).

Boyacı (2007), patlıcanda *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo and Ishigami'ya dayanıklılık kaynakları ve dayanıklılığın kalıtımını araştırmıştır. Çalışma dört bölüm halinde yürütülmüştür. İlk aşamada yerli ve yabancı genotipler ile patlıcana akraba yabani türlerin yer aldığı 25 genotip test edildiğini bildirmiştir. Yabani genotiplerin bu hastalığa dayanıklı, yerli ve yabancı genotipler ile bazı ıslah hatlarının ise duyarlı olduğu tespit etmiştir. İkinci aşamada ise 15 patlıcan genotipi ile onbiri ülkemizden izole edilen biri İtalya'dan getirilen, *F. oxysporum* f. sp. *melongenae'*nın 12 izolatı ile test edilerek genotip x izolat interaksiyonunu araştırmıştır. Araştırma sonuçlarına göre; izolatlar zayıf ve agresif olarak iki farklı gruba ayrılmış, dayanıklı genotipler tüm izolatlar karşısında dayanıklılık sergilerken, duyarlı genotipler agresif izolatlar karşısında duyarlılık, zayıf izolatlar karşısında ise dayanıklılık sergilediğini belirlemiştir. Üçüncü aşamada, bulunan dayanıklılık kaynakları içinden, *Solanum melongena* türüne ait dayanıklı genotipler LS 1934 ve LS 2436 ile duyarlı genotip NSFB-99 arasında resiprokal melezleme yapılarak dayanıklılığın kalıtımını araştırmış ve dayanıklılığın her iki dayanıklı genotip için de monogenik dominant olduğunu tespit etmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise dayanıklı genotip LS 2436 ve duyarlı saf hat NSFB-99 arasında yapılan melezlemelerden elde edilen F2 ve BC1 populasyonunda 1200 primerle RAPD kullanılarak genetik haritalama yapmış, dayanıklılık genine 2.6 cM uzaklıkta olan H-12 primerini markır olarak tespit etmiştir.

Derviş ve ark (2009), Türkiye'nin üç farklı bölgesinde (batı, güney ve güneydoğu Anadolu bölgesi) 19 ildeki patlıcan tarlalarında *Verticillium* solgunluğunu araştırmışlardır. Solgun patlıcanlardan *Verticillium dahliae*'nin 67 soyunu toplamışlar ve nitrat kullanılmayan mutantları ve bitki uyumluluğu gruplarının (VCG'ler) referans test suşları 1A, 2A, 2B, 3B, 4A ve 4B'yi kullanarak vegetatif uygunluk analizi için kullanmışlardır. Tüm izolatların 33 tanesi VCG2B,

23'ü VCG2A, altısı da VCG4B'ye, beşi VCG1A'a, olduğunu tespit etmişlerdir. VCG3 ve VCG4A izolatlar arasında bulunamadığını bildirmişlerdir. ***V. dahliae***'de VCG ve patojenlik arasında bir korelasyon olup olmadığını test etmek için, VCG'yi temsil eden 30 izolatın patojenitesi ısıtılmamış serada yetiştirilen *Solanum melongena* çeşitleri olan 'Kemer' ve 'Aydın Siyahı' üzerinde test etmişlerdir. Tüm izolatların her iki çeşitte de patojen olduğunuve iki çeşit arasında duyarlılık açısından fark bulunmadığını bildirmişlerdir.

Bletsos ve ark. (2004), en iyi üç Yunan patlıcan çeşidi olan 'Langada', 'Tsakoniki' ve 'Emi', *S. macrocarpon* yabani türü ile karşılıklı olarak melezlemişler ve F1'e ait melez hibritleri üretmişlerdir. F1 hibritlerinin melezliği, morfolojik ve biyokimyasal MNR işaretleyicileri kullanılarak teyit etmişlerdir. F1 melezlerinin tamamı yarı dik, kısa ve ebeveynlerine kıyasla daha küçük yapraklı olduğunu belirlemişlerdir. Bu F1'lerin, ebebeynlerinin hiçbirisi dikenli olmamasına rağmen çiçek rengi ve çiçeklenmesi *S. macrocarpon*'a benzer mor renkte ve dikenli yapraklı olduğunu tespit etmişlerdir. F1 bitkileri ('Tsakoniki' × *S. macrocarpon* hariç) açık tozlama, kendileme ve ilgili patlıcan çeşidine geriye melezleme yapmışlardır. Bununla birlikte, F1 hibritleri ('Emi' × S. macrocarpon, S. macrocarpon × 'Emi' ve S. macrocarpon × 'Langada') açık tozlandığında ve resiprokal F1 hibritler ('Emi' × S. macrocarpon ve S. macrocarpon × 'Emi'), Emi çeşidi ile geriye melezlendiğinde meyve elde etmişlerdir. Geriye melezlemelerden oluşan meyvelerin hiçbirinin canlı tohum içermediğini tespit etmişlerdir.

Daunay (2000), patlıcanın genetik kaynaklarının ağırlıklı olarak *Solanum melongena* L. üyeliğinden oluştuğunu buna *S. aethiopicum, S. macrocarpon, S. muricatum ve S. quitoense* gibi diğer kültürü yapılan patlıcanlar ve bunların her biriyle ilgili yabani türler de dahil olduğunu bildirmiştir. Elliden fazla türü ilgilendirdiği için, tüm yabani akrabaların kapsamlı bir listesi bulunmadığını vurgulamıştır. Yabani patlıcan akrabalarının yalnızca yarısının koleksiyonlarda (çoğunlukla Avrupa'da) tutulduğunu bildirmiştir. Diğer türlerin toplanmadığını ve yalnızca yabani olarak doğada (çoğunlukla Afrika'da) yetiştiklerini belirtmiştir.

Solanum melongena'nın genetik kaynakları aslında onun en ciddi hastalık ve zararlıklarına karşı dayanıklılık genlerini barındırmaktadır (Sekara ve ark., 2007). Kültürü yapılan patlıcan türü (*S. melongena*) *Fusarium* solgunluğuna dayanıklı değildir fakat patlıcanın diğer yabani türleri oldukça dayanıklıdır (Yamakawa ve Mochizuki, 1979, Monma ve ark., 1996). *Verticillium*'a toleranslık patlıcanın yabani akrabası olan *Solanum torvum*'da mevcuttur (Sekara ve ark., 2007). Aynı zamanda *Solanum torvum Meloidogyne incognita* ve *Meloidogyne arenaria*'ya yüksek derecede dayanıklılık göstermektedir (Ali ve ark., 1992; Salam ve ark., 2002; Luc ve ark., 2005). Bu yüzden patlıcanın kültürü yapılan çeşitlerine bu özellikleri, özellikle hastalıklara dayanıklılığı aktarmak için türler arası melezleme yapmak dikkate alınmalıdır (Toppino ve ark., 2008a).

Başay (2006), patlıcanda verim ve kalite düşüklüğüne yol açan *Verticillium dahliae* Kleb.'in neden olduğu *Verticillium* solgunluğuna daha az duyarlı hatların geliştirilmesi amacıyla kültür çeşitleri olarak, "K-1", "K-2", "K-3", "K-4", "K-5", "K-6", "K-7" ve "K-8" kullanmıştır. Yabani türlerden *S. torvum, S. sodemeum*, dayanıklı kültür formlarından "DK-1", "DK-2", "DK-3" ve "DK-4" ve ve "DK-6" çeşitleri ve "DK-5" hattını kullanmıştır. Klasik testleme sonucu *V. dahliae* hassas olan "K-1" çeşidi ile tolerant olarak belirlenen "DK-5" hattını melezleyerek F1'i ve F1'i kendileyerek F2'yi elde etmiştir. 2006 yılında patojenisite testinde "K-1" çeşidi ve "DK-5" hattı ile F1 ve F2 bitkilerini testlemiştir. Patojenisite testi sonucunda "K-1" çeşidi ve "DK-5" hattının hastalık şiddeti diğer yıllar ile paralellik tespit etmiş, "F1" bitkilerinin yapraklardaki sararma ve solgunluk değerleri, gövde izolasyonu ve reizolasyon sonuçları "F2" bitkileri sonuçlarından daha yüksek çıktığını belirlemiştir. Yapraklarındaki sararmadan yola çıkarak 0-5 skalası kullanılarak yaptığı değerlendirmede "F1" bitkilerinde hastalık şiddeti % 38, "F2" de 200 bitkinin % 55'inde hastalık şiddeti % 2 ila % 6 arasında değiştiğini, % 45'inde ise %36 ila % 44 arasında değiştiğini tespit etmiştir. Çalışmanın haploid kısmında; yaz döneminde yetiştirilen bitkilerden temin edilen tomurcuklarla yapılan anter kültüründe başarının çok daha yüksek olduğunu

belirlemiştir. Anter kültürü uygulanan çeşitler ve hattın içersinde en iyi cevabı % 14.2 oranında embriyo oluşumu ve % 5.3 oranında da bitki oluşumu ile "25" nolu çeşidi verdiğini belirlemiştir. Anter kültüründen haploid bitkiler elde edildikten sonra bitkileri dihaploid hale getirmek amacıyla kolhisin dozu (% 0.5 ve % 1) ve 2 farklı uygulama süresi (1 saat, 2 saat) uygulamıştır. Uygulamalar içersinde en iyi sonucu % 0.5 kolhisin + 2 saat veya %1 kolhisin + 1 saat verdiğini tespit etmiştir. .Diploid hale getirilen bitkilerde kromozom sayımı yapmış ve seraya alınan bitkilerden 2006 yılında tohum almıştır.

Ellialtıoğlu (2010), türler arası melezlemelerde tek taraflı uyuşmazlık, sitoplazmik faktörler nedeniyle ortaya çıktığını bildirmektedir. Sitoplazmik faktörler, melezlemelerin çift yönlü (resiprokal) yapılmasını engelleyen çok kuvvetli bariyer olduğunu ifade etmiştir. *S. indicum* (dişi) x *S. melongena* (erkek) melezlemesinde başarılı; tersi durumda başarı elde edilemediğini bildirmiştir. "*S. melongena*'nın sitoplazmasının *S. indicum*'un genetik materyalinin hücre içinde barınmasına uygun olmayabileceğini" ifade etmiştir.

Tümbilen (2007), patlıcanın (*Solanum melongena* L.) gittikçe artan bir tanınma ile önemli ürünlerden bir tanesi olduğunu ve şu anda küresel olarak üretildiğini bildirmiştir. Özellikle Hindistan başta olmak üzere, birincil çeşitlilik merkezi olan Asya kıtasında, insan beslenmesinde önemli bir yeri olduğunu vurgulamıştır. Üretim miktarı bakımından Türkiye, Avrupa'da birinci ve dünyada da ilk beş ülke arasında olduğunu ifade etmiştir. *S. melongena'*nın ait olduğu *Solanaceae* ailesi de önemli olduğunu ve. 3000-4000 türün yer aldığı bu önemli ailede, morfolojik olarak yüksek düzeyde çeşitlilik gösterdiğini bildirmiştir. Bu çeşitliliğin sistematik açıdan çeşitler, türler ve cinsler seviyesinde olduğunu vurgulamıştır. Yaptığı çalışmaların amacının, Türk patlıcanları ve yabani akrabaları arasındaki genetik çeşitliliği ayrı ayrı ve farklı moleküler teknikler kullanarak belirlemek olduğunu ifade etmiştir. Türkiye'de yetiştirilen patlıcan kültürleri arasındaki genetik çeşitliliği açığa çıkarmak üzere, AFLP işaretleyici sistemini örnek genotiplere uygulamıştır. *S. melongena* ve yabani akrabaları arasındaki

genetik varyasyonu araştırmak için ise SSR işaretleyici sistemini kullanmıştır. Türk patlıcanları AFLP verileri için, 0.97 r değerini bulmuştur. Bu değerin en iyi aralık dahilinde yer aldığını bildirmiştir. Ayrıca, rapor edilen Eigen değerlerini de oldukça açıklayıcı bulmuştur. Bu sonuçlar, örnekler arasındaki çeşitliliğin temel bileşenler analizi ile ilk düzlemde % 64.34 oranında açıklandığını belirlemiştir. Üç düzlemde ise, toplam varyasyonun % 72.21'i açıklandığını ifade etmiştir. SSR analizlerinin istatistiksel sonuçlarına göre, *Solanum* türleri genotipik verilerinin r değerini 0.88 bulmuştur. Bu sonucun örnek genotipik data ve dendrogram arasında bulunan ilişkinin yüksek olduğu anlamına geldiğini ifade etmiştir. Diğer istatistiksel sonuçlara göre, Eigen değerlerinin temel bileşenler analizi ile ilk düzlemde genotiplerin % 46.12'sini açıkladığını bildirmiştir. Toplam % 55.28'lik değer ile, 47 farklı genotip, temel bileşenler analizindeki ilk üç düzlemde açıklandığını belirlemiştir. AFLP çalışmalarının sonuçlarının, yüksek düzeyde benzerlik değeri gözlenmesine rağmen, tohum örnekleri arasında varyasyonun tespit edilebileceğini bildirmiştir. SSR çalışmalarının sonuçlarının, önceki çalışmalarla uyumlu ve tespit edilen çeşitliliğin ise istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirlemiştir.

2.2. Embriyo kurtarma ve *İn vitro* tozlama ve dölleme çalışmaları

Boyacı'nın (2001) bildirdiğine göre, Gönülşen (1987), bitki doku kültürleri alanında 1970'lerden sonra olan gelişmeler bu teknikten ıslahta yararlanma şansını doğurduğunu ifade etmiştir. Bitki doku kültürlerinin ıslahta doğrudan veya dolaylı olarak kullanılması çeşitli şekilde olabileceğini belirtmiştir. Boyacı'nın (2001) bildirdiğine göre, Hatipoğlu (1993), *İn Vitro* Tozlanma ve Döllenme Tekniklerinin üç şekilde uygulandığını belirtmiştir:

1. Stigma tozlanması ve döllenmesi

Bu yöntemde erkek kısır organları uzaklaştırılmış bir çiçek bilinen sterilizasyon yöntemleriyle sterilize edilerek dişi organ besin ortamına yerleştirilir. Sterilize edilmiş olgun bir anterden alınan polen stigma üzerine yerleştirilir.

Bitkinin normal doğa koşullarındaki tozlanma ve döllenmesine benzeyen bu yöntem yumurtalığın olgunlaşmadan öldüğü ***Pisum sativum*** türlerinde uygulanmaktadır.

2. Plesanta döllenmesi

Bu yöntemde çiçek sterilize edilir ve döllenmemiş yumurtaları kapsayan plasenta stero mikroskop altında izole edilir. İzole edilen plesanta besin ortamına yerleştirilir. Açılmak üzere olan anterler sterilize edilir ve anterler açılarak içindeki polen daneleri yumurtalara yakın kısma yerleştirilir. Bu işlemden sonra polen danelerinin çimlenip çimlenmedikleri embriyo kesesine erişip erişmedikleri kontrol edilir.

3. İzole edilmiş yumurtanın *İn vitro* döllenmesi

Bu yöntem plesanta döllenmesine benzemektedir. Ancak *İn vitro* döllenmiş yumurtadan embriyonun oluşması çok güç olduğundan bu yöntemin uygulanması çok başarılı değildir. İn vitro tozlanma ve döllenme tekniklerinin sebze ıslahında ile kullanım alanları:

a) Kendine uyuşmazlığın önlenmesi:

Plesanta tozlanması tekniği ile bazı durumlarda tamamıyla kendine uyuşmaz olan bitkilerde kendilenmiş döllerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir.

b) Melezlenme uyuşmazlığının önlenmesi :

Doğada normal olarak mümkün olmayan türler ve cinsler arası melezlemeler *İn vitro* tozlama ve dölleme teknikleri ile başarılmıştır.

c) Haploid bitkilerin elde edilmesi :

Bir tür başka bir türün polen tozlarıyla *İn vitro* koşullarda döllenerek haploid bitkiler elde edilebilmektedir.

d) Çiçek veya yumurtalığın ana bitki üzerinde olgunlaşmadan döküldüğü durumlarda tohum elde edilmesi:

Böyle durumlarda stigma tozlama ve döllemesi ile tohum elde edilebilmektedir.

e) Döllenme fizyolojisinin incelenmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Boyacı, 2001).

Emiroğlu ve Gürel (1993), temel araştırmalar ve dormansiyi ortadan kaldırmak için uygulanılabilen embriyo kültürlerinin türler arası ve cinsler arası melezlerin elde edilmesi açısından ayrı bir öneme sahip olduğunu bildirmişlerdir. Uzak melezlemelerde döllenmeden sonra belirli bir dönemde embriyonun gelişmesinin aksaması ve düşmesi melez tohum oluşmasına engel olduğunu ifade etmişlerdir. Embriyonun gelişmesindeki aksaklık herhangi bir dönemde ortaya çıkabileğini ileri sürmüşlerdir. Embriyo bu aksaklığın ortaya çıkmasından önceki bir dönemde *in vitro* kültüre alınması gerektiğini bildirmişlerdir.

Özellikle dayanıklılıkla ilgili ıslah çalışmalarında yabani türlerden gen aktarımı konusunda türler arası melezlemelerde sorunlarla karşılaşılabileceği ifade edilmiştir. Bazı türlerde melezlemeden 6 ile 25 gün sonra embriyo aborsiyonu görülebildiğini bildirilmektedir. Fakat embriyo kültürü yöntemi ile bu sorunun üstesinden başarı ile gelinebildiğini vurgulamıştır. Hibrit embriyo abosiyondan önce *in vitro* kültüre alınıp kurtarılabileceğini bildirilmektedir (Kalloo, 1986, Hatipoğlu, 1993).

İn vitro tozlama ve dölleme tekniği ile tür içi ve türler arası hibritlerin elde edilmesi yanında döllenme problemi olan bazı türlerde çözüm olabileceği bildirilmektedir (Stewart, 1981; Kranz ve Dressethaus, 1996; Taji, ve Williams, 2004).

Douglas (1990), kendine uyuşmaz türlerin *in vitro* ortamda kendilenmelerine ve türler arası melezlemeye olanak sağlayabileceğini vurgulamıştır. *İn vitro* tozlama aynı zamanda partenogenesis ve haploid bitki eldesine olanak sağladığını bildirmiştir.

Faure ve ark (1994), Angiosperm döllenmesinde, özellikle *Zea mays* L'de gerçekleştirilen önemli gelişmeleri bildirmektedir. Bu türde, çift döllenme işlemi sırasında olayların kesin sırasını belirlemişlerdir. Beslenme ve çevresel koşulların tanımlanmasına olanak tanıyan *in vitro* tozlama yöntemi, dölleme süreci üzerindeki

çevresel stres etkilerinin incelenmesi için uygun bir teknik olduğunu ifade etmişlerdir. Elektrofüzyon, izole edilmiş gametlerin kalsiyum ile indüklenen füzyonu ve dişi hücrelere sperm çekirdeği mikroenjeksiyonu gibi farklı *in vitro* fertilizasyon sistemleri geliştirildiğini bildirmişlerdir. Elektrofüzyonun, yapılan zigotların melez bitkiler ve izole döllenmiş embriyo keseleri kültürüne dönüştürülmesi, fertilizasyon ve embriyogenesin hücresel ve moleküler düzeyde erken aşamalarını araştırmak için yeni olanaklar sağlayabileceğini ifade etmişlerdir.

Pessarakli ve Ramdane (2004), patlıcanda meyve kalitesinin yükseltilmesi, verimin arttırılması için ıslah ve tozlaşma hakkında yenilikleri özetledikleri çalışmalarında; *in vitro*'daki polen çimlenmesini canlı polenin çimlenme kapasitesi; çevre koşulları, çimlenme ortamındaki besin miktarları, ortamın nemi ve sıcaklığı, hava basıncı ve pH'ın etkilediğini belirlemişlerdir. Eğer bunlar ortamda yeterli değil ise polen canlılığı yüksek bile olsa çimlenmenin gerçekleşmediğini ifade etmişlerdir. Patlıcan çiçeği kendine döllenebildiği halde meyve tutumu ve tohum oluşumu için genellikle tozlayıcı gerektiğini ve serada domates, biber, patlıcan üretiminde tozlanmayı sağlamak amacıyla bambus arısı kullanımını önerdiklerini bildirmişlerdir.

Cucumis cinsi içinde Hıyar ve Kavun arasında türler arası melezleme engelini aşmak için yapılan *in vitro* dölleme tekniğinde, modifiye edilmiş CP ve YS ortamlarında fertil melez bitkiler ede etmişler ancak moleküler düzeyde bunu RAPD tekniği ile belirlenemediğini bildirmişlerdir (Skálová ve ark., 2010).

Clain ve ark (2004), *Solanum torvum*'un patlıcanın (*Solanum melongena*) yabani akrabası olup, Hindistan'ın doğal bitkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bakteriyel solgunluğa (*Ralstonia solanacearum*) dayanıklılık kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Gousset ve ark (2005), patlıcanın yabani akrabası olan *Solanum torvum*'u Endonezya'nın Java adasından toplamışlar, morfolojisi, fertilitesini inceleyerek, Bakteriyel ve *Fusarium* solgunluklarına karşı dayanıklılıklarını test etmişlerdir. RAPD ve I-SSR markırları yardımıyla genetik çeşitliliği incelemişler

ve incelenen tüm genotiplerde hastalığa karşı dayanıklılık bakımından farklılık bulamamışlardır. *Solanum* türleri içerisinde her bir çiçek salkımında iki tip çiçek formu görülebildiği, uzun ve kısa stilli çiçeklerin mevcut olduğunu belirlemişlerdir. Bu morfolojik yapının nemli tropik iklimlere dağılış gösteren *Solanum torvum* içinde geçerli olduğu bildirmişlerdir.

Jaiki ve Chin (2007), patlıcanın kültür formu (*Solanum melongena* L.) çeşitli toprak kökenli hastalıklara karşı hassas olduğu bildirilmiştir. Yabani akrabası olan *Solanum torvum*'un bu hastalıklara karşı yüksek derecede dayanıklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte türler arası melezlemede döllenme öncesi engeller nedeni ile başarı sağlanamadığı ifade edilmektedir. Yapılan çalışmada *Solanum torvum*'un polenlerinin çimlenme ve polen tüpü gelişimi açısından patlıcan pistillerinde herhangi bir engelleme ile kaşılaşılmadığı ancak tersi durumda *Solanum torvum*'un stillerinde patlıcanın polen tüplerinin engellendiği bildirilmiştir.

Çağlar ve Bağcı (2004), *Cucumis* cinsi içinde yer alan *C. melo* ve *C. sativus* arasında türler arası melezleme ile gen aktarımını sağlayabilme ve *C. melo* var. *flexuosus*'u iki tür arasında köprü türü olarak kullanabilme olanaklarını araştırmışlardır. Bu amaçla *C. melo*, *C. sativus* ve *C. melo* var. *flexuosus* arasında melezlemeler yapmışlardır. Kontrollü tozlamalardan iki hafta sonra hasat edilerek laboratuvara getirilen ve % 30'luk hipoklorit çözeltisinde yüzey dezenfeksiyonuna tabii tutulan meyvelerdeki tohumlar açılarak içerisindeki embriyolar çıkarılıp MS ortamında *in vitro* kültüre almışlardır. Melezlemelerdeki meyve tutum oranlarının *C. flexuosus* x *C. sativus* tozlanmasında % 50, *C. flexuosus* x *C. melo'*da % 46.6, *C. melo* x C. *flexuosus*'da % 53.3 ve *C . melo x C. sativus'*da % 33.3, *C. sativus x C. flexuosus*'da % 53.3, C. *sativus* x *C. melo*'da % 43.3 olduğunu bildirmişlerdir. Meyve başına tohum sayısı ortalama 117 adet ile *C. flexuosus* x *C. sativus* kombinasyonunda en düşük, 432.8 ile *C. melo* x *C. sativus*'da en yüksek bulmuşlardır. Ancak *C. melo* x *C. sativus*'daki tohumların çoğunun boş olduğunu ve embriyo içeren tohum oranının % 32.2 ile en düşük düzeyde kaldığını ifade

etmişlerdir. Buna karşın *C. melo* ile *C. flexuosus* arasında yapılan melezlemelerde tohumların tamamına yakınının (% 90) embriyo içerdiğini belirlemişlerdir. Embriyoların bitkiye dönüşüm oranı % 12.5 ile % 25.0 arasında gerçekleş tiğini belirlemişlerdirBu embriyolardan *in vitro* kültürde toplam 32 adet bitki geliştiğini tespit etmişlerdir.

Verba ve ark (2010), embriyo kültürü yöntemi ile patlıcanların türler arası melezlerini elde etmek amacıyla *Solanum melongena*, *S. aethiopicum* ve *S. integrifolium* arasında resirokal melezlemeler yapmışlardır. *İn vitro* embriyo kültürü kullanılarak melez kombinasyonlar elde etmişlerdir. *S. melongena* x *S. aethiopikum*, *S. melongena* x *S. integrifolium*, *S. aethiopicum* x *S. melongena*, *S. aethiopicum* x *S. integrifolium*, *S. integrifolium* x *S. melongena S. aethiopicum* ve *S. integrifolium* meyveleri tozlamadan 20., 25., 30., 35., 40. ve 45. günlerde, (çaprazların kombinasyonuna ve ana türlerdeki embriyogenesin biyolojik özelliklerini göz önüne alarak) *S. melongena*'da 20., 23., 27., 31., 35. ve 40. günlerde toplandığını bildirmişlerdir. Tidiazuron (TDZ) (0,1 mg/l) ve Naftalen asetik asit (NAA) (10 mg/l) eklenmiş Murashige-Skoog ortamına, 20 ml agar ilave edilmiş ortam 100 ml'lik petrilere aktarmışlardır. Embriyo gelişim aşaması, optimal izolasyon, embriyo ve bitki gelişimi için en uygun besin ortamı bileşimini belirlediklerini bildirmişlerdir.

2.3. Anter kültürü ve regenerasyon çalışmaları

Jamil ve ark (2013), patlıcanın (Brinjal) en popüler besleyici sebzelerden biri olduğunu bildirmişlerdir. İhracata yönelik bir ürün olarak ulusal ekonomide çok önemli bir rol oynadığını ifade etmişlerdir. Patlıcanın (*Solanum melongena* L.) kalite ve kantitesinin ilerletilmesi için biyoteknolojik uygulamalar yapıldığı belirtilmiştir. Günümüzde doku kültürü tekniklerinin bu amaçla geniş ölçüde kullanıldığı vurgulanmıştır. Brinjal'ın *in vitro* rejenerasyonu için farklı hormonların farklı kombinasyonlarının kullanıldığı bildirilmiştir. Farklı oranlarda 2,4 D, IAA, BAP, NAA ve kinetin hormonları çeşitli kombinasyonlarda

kullanmışlardır. Rejenerasyon için kök ve yaprak gibi çeşitli eksplantlar kullanmışlardır. Kök eksplantının daha iyi yanıt verdiğini belirlemişlerdir. 2 mg/l 2,4 D uygulamasının daha iyi kallus oluşumu gösterdiğini belirlemişlerdir. Kök eksplantı halinde, farklı kombinasyonlar arasında 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA uygulamasının kallus oluşumu ve ayrıca bir miktar rejenerasyon oluşumunda daha iyi olduğunu belirlemişlerdir. 0.5 mg/l kinetin gibi sitokininlerin 1.5 mg/l oksinin (IAA) kombinasyonuyla birlikte hindistan cevizi suyunun direk sürgün rejenerasyonunda başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Eksplantlar inokülasyondan yaklaşık 4-5 hafta sonra direk sürgün rejenerasyonu gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca iki farklı besin ortamında (biri hormon içermeyen MS, diğeri 0.5 mg/l IAA içeren ortam) köklerin rejenerasyonunun gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Hormon içermeyen MS ortamının sürgün oluşumundan yaklaşık 2-3 hafta sonra köklenmesinden dolayı en çok tercih edilen ortam olduğunu bildirmişlerdir.

Kantharajah ve Golegaonkar (2004), Patlıcan (*Solanum melongena* L.) birçok ülkede yaygın olarak yetiştirilen ve ekonomik açıdan önemli bir sebze olduğunu ancak birçok zararlıya ve hastalığa duyarlı olduğu bildirilmiştir. Geleneksel yöntemlerle dirençli çeşitlerin gelişimi, yabani türleriyle uyuşmazlığa bağlı olarak sınırlı bir başarıya sahip olduğu belirtilmiştir. Patlıcan, genel olarak morfogenezise ve özellikle de somatik embriyogenesise oldukça müsait olduğunu vurgulanmıştır. Genotip, eksplant türü ve yeri, büyüme regülatörleri, poliaminler ve diğer bazı faktörlerin somatik embriyogenesisi etkilediği bildirilmiştir. Çoğu araştırma somatik embriyogenesisin indüksiyonu, gelişimi ve olgunlaşması üzerine yoğunlaştığı belirtilmiştir. Patlıcan'da somatik embriyogenesisin moleküler özelliklerinin de incelendiği bildirilmiştir.

Ellialtıoğlu (2000), *in vitro* kültüre alınan genç anterlerden haploidlerin başarıyla oluşturulmasının ilk kez 1964 yılında *Datura stramonium* bitkisinde Guha ve Maheshwari tarafından gerçekleştirildiğini bildirmiştir. 1967 yılında Bourgin ve Nitsch'in tütün bitkisinde anter kültür yoluyla haploid embriyolar elde etmesinden sonra, özellikle ekonomik önemi fazla olan tahıllar, sebzeler ve şeker

pancarı başta olmak üzere günümüze değin pek çok bitki türünde anter kültürü yoluyla haploid eldesi üzerinde pek çok çalışmanın yapıldığını ve 25 familyaya ait 200 bitki türünde *in vitro* androgenesis tekniğinden başarılı sonuçlar elde edildiğini belirtmiştir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerin, genotip, dönor bitkinin yetişme koşulları, anterlerin gelişme koşulları, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı, inkübasyon koşulları olduğunu bildirmiştir.

Rahman ve ark. (2006), *Solanum melongena* L.'nin Lodan çeşidi olan kotiledon ve yaprak orta damarı eksplantlarından somatik embriyolar elde edildiğini bildirmişlerdir. Kallus indüksiyonu için, ortama tek başına veya BAP ile farklı konsantrasyonlarda oksin ile ilave edildiğini belirtmişlerdir. En iyi kallus oranının % 83-85'lik, 2.0 mgl/l NAA + 0.05 mg/1 BAP içeren MS ortamında kültürlenen her iki eksplanttan elde edildiğini bildirmişlerdir. BAP, GA3, NAA ve Zeatin ile takviye edilen MS ortamına kalluslar aktarıldıktan sonra, somatik embriyogenesis ve sürgün oluşumunun sağlandığı belirlenmiştir. Kotiledon türevi kalluslar, 2.0 mg/l Zeatin + 1.0 mg/1 BAP'a sahip olan MS ortamında alt kültürlendiğinde rejenerasyon için daha iyi performans (% 82) gösterdiği tespit etmişlerdir. Kök indüksiyonu için, MS + 3.0 mg/l IBA'nın, ortalama sayı (14-15) ve ortalama uzunluğu (12 cm) için diğer uygulamalardan daha iyi uygulama olduğu kanıtlandığını belirlemişlerdir.

Rotino (1996), patlıcanda haploid bitki üretimine yol açan doğal parthenogenesis olmadığını bildirmiştir. Rotino'nun (1996) bildirdiğine göre, Raina ve Iyer (1973), bitkilerde anter kültürü ile bitki regenerasyonu gerçekleştirildiğini, Isouard (1979), patlıcanda ilk haploid bitki eldesinin başarıldığını, Dumas De Vaulx ve Chambonnet (1982), patlıcanda anter kültüründe yüksek sıcaklık uygulamasının (35 ^{0}C) bitki eldesini artırdığını belirtmiştir.

Swamynathan ve ark (2010), büyük oval meyvesi ve tıbbi özelliği nedeniyle yetiştirilen tarımda önemli bir bitki olan *Solanum melongena*'nın (Thengaithittu çeşidinin) *in vitro* rejenerasyonunun tespit etmişlerdir. Olgun tohumların embriyoları, kotiledon ve sürgün eksplantları farklı konsantrasyonlarda

1-naftalinasetik asit, kinetin, 2,4-diklorofenoksi asetik asit, thidiazuron ve benzil amino purin kombinasyonları ile takviye edilmiş MS ortamına aktarmışlardır. Kotiledon kültürleri tek başına NAA (10.6 mg/l) ilave edilmiş ortamda kallus üretimi için oldukça verimli olduğonu belirlemişlerdir. Bununla birlikte, embriyo eksplant kültürleri, kallus üretiminde NAA (8.0 mg/l) ve Kinetin (0.1 mg/l) ile takviye edilen MS ortamında embriyogenesis için iyi yanıtlar verdiğini belirlemişlerdir. Sürgün kültürüne tepkinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir. NAA varlığında, embriyo ve kotiledon kültürleri sırasıyla % 40 ve % 80 oranında yanıt gösterdiğini bildirmişlerdir 2.4 D içeren ortamlarda (% 45) embriyo kültürlerine verilen tepkinin daha iyi olduğunu belirlemişlerdir. Kotiledon eksplantları, 2.4 D ve NAA (% 75) varlığında benzer şekilde yanıt verdiğini tespit etmişlerdir. Embriyo gelişimi, iki ay içinde NAA (8.0mg/l) ve Kinetin (0.1mg/l) içeren aynı ortamda gerçekleştiğini ve toplam 85 embriyo geliştirildiğini bildirmişlerdir. Kotiledon eksplantlardan oluşan kallus kültürlerinde, tek başına yüksek konsantrasyonda NAA (10.6 mg/l) varlığında toplam 65 embriyo geliştirmişlerdir. Kotiledon, embriyo ve sürgün eksplantlarından oluşturulan embriyolar, çimlenme için hormonsuz ortama, 3-4 hafta sonra rejenerasyona uğramış bitkiler seraya başarıyla aktardıklarını bildirmişlerdir.

Tuncay (2007), besin ortamı olarak MS temel besin ortamı kompozisyonu kullanmış; bu ortamı iki farklı karbonhidrat kaynağı ile (% 1.5 oranında glukoz veya % 2 oranında sakaroz) zenginleştirdiğini bildirmiştir. “2 mg/l zeatin ve 0.01 mg/l NAA”; “4 mg/l NAA”; “10 mg/l NAA” ise, büyüme düzenleyici katkısı olarak kullanmıştır. Her eksplanttan 50’şer adet olacak biçimde yapılan eksplant dikimlerinden sonra kültürler iklim odasında karanlıkta 3 hafta süreyle tutulmuş ve bu sürenin sonunda gözlemler yapmıştır. Gözlemlerde kallus oluşturma oranı, somatik embriyo veya organogenesis varlığı (sürgün ve kök oluşumu) belirlenerek eksplant başına oluşan miktarlarını saptamıştır. Genotiplere göre besin ortamı bileşiminin çok etkili olduğunu belirlemiştir. Genel olarak G3 (MS temel besin ortamı + % 1.5 Glukoz + 4 mg/l NAA) ve S3 (MS temel besin ortamı + % 2

Sukroz + 4 mg/l NAA) ortamlarının sürgün oluşturma kapasitesini yüksek bulmasına rağmen, bazı çeşitlerde daha uygun ortamların da olduğu tespit etmiştir. 3x8 melez genotipi, sürgün oluşturma kapasitesi en yüksek genotip olduğunu tespit etmiştir. NAA'in yüksek dozları, patlıcanda sürgün meristemi oluşumu üzerinde olumlu etki yaptığını, ancak bunlardan bitkiye dönüşüm için besin ortamına sitokinin ilavesinin gerekli olduğu yönünde bulgulara ulaştığını bildirmiştir.

Başay ve ark. (2010), altı adet yerli ve yabancı patlıcan çeşidi ve iki yabani tür arasından; Topan 374, Halep Karası, Aydın Siyahı, Munica F_1 ve Bonica F_1 çeşitlerinden anter kültürü yoluyla haploid embriyo elde edildiğini bildirmişlerdir. Fakat yabani *S. torvum* ve *S. sodomeum* türlerinde anter kültüründe başarılı olunamadığını belirlemişlerdir. Bonica F_1 çeşidi % 14.29 oranında bitki oluşumuyla en yüksek performansı gösterdiği belirtilmiştir. Ankara koşullarında önceki yıllarda çok sayıda denemede yer alan ve embriyo oluşumu hiç sağlanamamış olan Aydın Siyahı çeşidinden Yalova ekolojisinde % 1.25 oranında da olsa ilk kez haploid bitki elde edilmiş olmasının genotip etkisinin yanı sıra donör bitkinin yetişme koşullarının, anter kültüründen alınan sonucu etkileyen önemli bir faktör olduğunu tespit etmişlerdir.

ZhiQiang ve ark. (2009), Xi'an patlıcan çeşidinin anterleri, optimum kültür koşulunun oluşturulması için farklı hormonlar, karbon kaynakları, amino asitler ve $AgNO_3$'ın kallus oranına etkilerini incelemek üzere kültürle almışlardır. Sonuçlar olarak: 1) ortamda tek bir hormon kullanıldığında kallus oranı neredeyse sıfıra, oksin ve sitokinin ortamda eşzamanlı olarak kullanıldığında toplam kalus oranı ve merkezi anterin kallus oranı % 18.0 ve % 4.0'ün üzerinde olduğunu tespit etmişlerdir. Optimum ortam 0.2 mg / L 2,4-D + 1.0 mg / L NAA + 0.25 mg / L Kinetin' olduğunu belirlemişlerdir. 2) ortamda % 2 sakroz kullanıldığında toplam kallus oranı % 57.14, merkezi anterde % 2 sakkaroz ve % 6.5 glikoz kullanıldığında merkezi anterin kallus oranı % 12'nin üstünde olduğunu belirlemişlerdir. 3) toplam kalus oranı ve amino asitler ve $AgNO_3$ ilave edilen uygulamalar merkezi anterinin kallus oranı kontrolden yüksek bulmuşlardır. Xi'an

patlıcan çeşidinin anter kallus oranını iyileştirmek için en uygun ortam, MS + 0.2 mg / L 2,4-D + 1.0 mg / L NAA + 0.25 mg / L KT +% 2 sükroz +100 mg / L Serin olduğunu tespit etmişlerdir.

Miyoshi (1996), patlıcanda mikrospor kültürlerinden morfogenik kallusları başarılı bir şekilde elde etmiştir. Mikrosporların başlangıç kültürleri yüksek sıcaklıkta (35 °C'de 3 gün) sakkaroz içermeyen ortamlar, kallus indüksiyonu için ön koşul Olduğunu belirlemişlerdir. Mikrosporlar, % 2 sükroz ve fitohormonlar (0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA) içeren ortamda karanlıkta tekrar kültürden 4 hafta sonra, mikrosporlardan türetilen küçük kalluslardan sürgün rejenerasyonu için 4 mg/l zeatin + 0.2 mg/l IAA içeren MS ortamına aktardıklarını bildirmişlerdir. Rasgele seçilen 12 rejenerantın ploidisi kök uçlarındaki kromozom sayıları ile değerlendirmişlerdir. Bunlardan sadece biri haploid, 7'si diploid, 3'ü triploid ve biri tetraploid olduğunu tespit etmişlerdir.

Alpsoy ve Şeniz (2007), 1994-1999 yılları arasında yürüttükleri çalışmada, çeşitli patlıcan çeşitlerinin farklı kültür ortamlarında anter gelişimlerini araştırmışlardır. 1994 yılındaki ön araştırmalarda kullanılan anterlerden % 30'luk ortalama bir kallus oluşumu elde etmişler ancak haploid embriyolar oluşmadığını bildirmişlerdir. 1995 yılındaki denemelerde, Pala, Kemer, Topan ve Aydın Siyahı çeşitlerinin anterleri, 25 °C'lik bir sıcaklıkta ve 16 saatlik uzunluk koşullarında 4 farklı büyüme düzenleyici kombinasyonu ile takviye edilmiş ortam üzerinde kurmuşlardır. Pala, Kemer, Topan ve Aydın Siyahı çeşitleriden sırasıyla % 15.12, 20.00, 24.00 ve 26.42 toplam kallus oluşum oranları elde edildiğini bildirmişlerdir. 1996'da yapılan denemelerinde Kemer ve Baluroi ve Urfa Yerlisi, patlıcan çeşitlerini kullanılmışlardır. Kallus oluşum oranlarının, 5.56'dan % 49.98'e kadar değiştiğini belirlemişlerdir. 1996 yılında embriyolar da elde ettiklerini bildirmişlerdir. Haploid embriyoidler ve bitkiler Kemer ve Urfa Yerlisi çeşitlerinden elde etmişlerdir. Kemer ve Baluroi ve Urfa Yerlisi çeşitlerinin anterleri, 4 mg/L NAA + 1 mg/L kinetin içeren MS ortamında ve 5 mg/L 2, 4-D artı 5 mg / L kinetin içeren C ortamında kültüre almışlardır. Kültürler, inkübatörde

35 °C'de ilk 8 gün için karanlık koşullar altında tutulmuşlar ve daha sonra 16 saatlik bir gün uzunluğunda 25 °C'ye transfer etmişlerdir. Embriyolar C ve MS ortamında Urfa Yerlisi'nde sırasıyla % 3.67 ve % 2.05 oranlarında elde edildiğini bildirmişlerdir. Embriyoların, aynı kültür koşulları altında 1998'de yapılan denemelerde de oluştuğunu belirlemişlerdir. Embriyo oluşum oranlarının MS ortamında Adana çeşidinde % 1.58, Leila çeşidinde C ve MS ortamında sırasıyla % 2.72 ve % 2.63 olduğunu belirlemişlerdir. Tüm bu embriyoların sonunda bitkilere dönüşebildiğini tespit etmişlerdir.

Bal ve ark. (2009), patlıcanda (*Solanum melongena* L.) tütün mikrospor embriyogenesisini indüklemek için kullanılan bir protokol değişikliğini test etmişlerdir. Tütünde kullanılan protokolde tek çekirdekli mikrosporların, manitol içeren "B" ortamında 33 °C'de altı gün süreyle tutulduğunu, daha sonra geliştirilmesi için maltoz içeren AT3 ortamına aktarıldığını bildirmişlerdir. Araştırıcılar, B ortamında önceden kültürlenen Bambino patlıcan çeşidinin geç tek çekirdekli ve iki-çekirdekli mikrosporlarını iki gün boyunca sırasıyla + 4 °C, 25 °C ve 33 °C'de inkübe etmişlerdir. Ön-muamelelerden sonra mikrospor kültürlerini, 0.25 M maltoz içeren AT3 ortamına aktarmışlar ve karanlıkta 25 °C'de muhafaza etmişlerdir. Bir ve iki hafta sonra çekirdeğin DAPI boyaması ile simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapıların varlığını kontrol etmişlerdir. Çekirdeğin ve çok çekirdekli yapıların simetrik bölünmesi, yalnızca iki gün 33 °C'de ön-muamele edilmiş tek-çekirdekli mikrosporlarda gözlemlemişlerdir. Bu koşullar altında çok çekirdekli yapıların sıklığı % 19.4 olarak belirlemişlerdir. Patlıcanın, simetrik bölünme ve çok çekirdekli yapıların üretiminde değiştirilmiş tütün protokolüne tepki verdiğini belirlemişlerdir. Bu sonuçların, patlıcanın tütün mikrospor embriyogenesis yönteminin tamamına adaptasyon için bir temel olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Başay ve ark. (2011), yaz döneminde yetiştirilen patlıcanlardan elde edilen tomurcuklarla kurulan anter kültüründe, embriyo oluşumunun daha yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. "25" çeşidi, embriyo ve bitki oluşum oranları ile

sırasıyla % 14.2 ve % 5.3 anter kültürü yapılan çeşitler arasında en iyi yanıtı verdiğini bildirmişlerdir. Anter kültürü ile haploid bitkiler elde ettikten sonra, *in vitro* koşullar altında dihaploid bitkiler elde etmek için 1 saat veya 2 saat boyunca % 0.5 ve % 1 konsantrasyonlarda kolhisin uygulamışlardır. En iyi sonuçların, 2 saat süreyle % 0.5 kolhisin ve 1 saat süreyle % 1 kolhisin uygulamasından elde edildiğini belirlemişlerdir. Dihaploid bitkilerde kromozom sayımları yapmışlar ve bu bitkilerden tohumlar elde etmişlerdir.

Matsubara ve ark. (1992), biber ve patlıcan anterlerinde haploid bitkilerin üretimi için etkili metodlar araştırmışlardır. Tek çekirdekli mikrospor aşamasında alınan anterleri farklı 2.4 D ve kinetin dozları içeren MS ortamında kültüre almışlar ve daha sonra yüksek ve düşük sıcaklığa maruz bırakılmışlardır. Anterlerden oluşan embriyoidler ve kalluslardan adventif sürgünler gözlemlemişlerdir. Oluşan bitkileri MS ortamına aktarmışlardır. Sonuç olarak: 1- 0.1 mg/l 2.4 D ve kinetin içeren MS ortamında 35 ^{0}C'de 24 saat bekletilen anterlerden en yüksek oranda kallus ve embriyoid elde edildiğini fakat düşük sıcaklık uygulamasının (5 ^{0}C'de 24 veya 48 saat) etkili olmadığını bildirmişlerdir. 2- Kalluslardan oluşan adventif sürgün ve embriyoidlerin regenerasyonu gerçekleşince hormonsuz MS ortamı, 1 mg/l kinetin veya 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamına transfer etmişlerdir. 3- Bitkiler % 0.8 agar ve % 5-8 şeker içeren MS ortamında güçlü geliştiğini belirlemişlerdir. 4- En yüksek kallus yüzdesi 0.2 mg/l 2.4 D + 0.1 mg/l kinetin ve 0.1 mg/l 2.4 D + 0.1 mg/l kinetin içeren MS ortamlarından elde edildiğini bildirmişlerdir.

Gudeva ve Trajkova (2012), *in vitro* anter kültüründe indüklenen androgenesisin etkilerini araştırmışlardır. Biber anter kültüründe embriyogenesisin indüklenmesi için etkili teknolojilerin geliştirilmesi, steril ortamdaki bitkiciklerin sera koşullarına adaptasyonu ve aklimatizasyonu ve plastik tünel koşullarında elde edilen androgenetik biber hatlarının ıslah süreçlerini belirlemeye çalışmışlardır. Biber genotiplerinin anterleri 0.01 mg/l Kin + 0.01 mg/l 2.4-D içeren CP ortamında 35 ºC'de 8 gün karanlık koşulda inkübe etmişler ardından 4 gün sonra 0.01 mg/l

Kin içeren R ortamında 25 ºC' 12 saat karanlık 12 saat aydınlık koşullar sağlamışlardır. Genç sürgünler görülünce V3 ortamına aktarmışlardır. Araştırma sonucunda 19 biber genotipinden 12'sinin anter kültüründe embriyo oluşumu için potansiyel olduğunu belirlemişlerdir.

Taşkın (2005), üç defa kendilenmiş düşük sıcaklığa tolerant olarak belirlenen A71, A269, A313 nolu biber genotipleri ile orta derecede tolerant olarak belirlenen A109 nolu biber genotipi ve duyarlı olarak belirlenen A74 nolu biber genotipi olmak üzere beş farklı biber genotipini en yüksek embriyo uyartımı ve bitkiye dönüşümün belirlenmesi amacıyla dört farklı kültür ortamında anterlerin farklı zamanlarda kültüre alındığını bildirmiştir. Kültüre alınan ortamlarda gelişmesini tamamlayamayan embriyoların 10 gün süresince 0.5 mg/l absisik asit içeren besin ortamına alınarak absisik asitin embriyo olgunlaşmasına etkisini belirlenmeye çalışmıştır. Araştırıcı, gerek embriyo oluşumunun gerekse oluşan embriyoların bitkiye dönüşümünün genotiplere, anter alma dönemlerine ve besin ortamlarına göre değiştiğini tespit etmiştir. Genotipler arasında en yüksek embriyo verimini soğuğa tolerant olarak belirlenmiş olan 269 nolu genotipinden elde etmiştir. Anter alma dönemlerinden ise en başarılı sonuçların Nisan ve Mayıs aylarından elde edildiğini bildirmiştir. Besin ortamları arasında ise III nolu besin ortamı (Murashige and Skoog + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l naftalen asetik asit + 1 mg/l benzil amino purin) ve IV nolu besin ortamından (modifiye edilmiş Murashige and Skoog + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l naftalen asetik asit + 0.1mg/l benzil amino purin) diğer ortamlara göre daha fazla sayıda embriyo elde edildiğini bildirmiştir. Olgunlaşmamış embriyolara absisik asit uygulamasından olumlu bir sonuç alınamadığını tespit etmiştir. Bitkiye dönüşüm, hormonsuz MS ortamına alınan olgun embriyolardan sağlandığını bildirmiştir.

Dumas De Vaulx ve Chambonnet (1982), patlıcan anter kültüründe haploid ve diploid bitkilerin yüksek oranda üretimini sağlayan yeni gelişmeleri sunmuşlardır. +35°C'de karanlıkta inkübe edilen anterlerden gelen bitkilerin

üretiminin, *in vitro* kültürün ilk 8 gününde + 25°C'de kültüre alınan anterlerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde artırdığını tespit etmişlerdir (sırasıyla her 100 anterde 12.0 ve 3.4 bitki, çeşitli kültür ortamlarında alınan veriler). Bazı 2,4 D ve kinetin konsantrasyonlarında, sıcaklık uygulamasının anterden bitkiye dönüşümü artırdığını belirlemişlerdir. En iyi sonuçların +35°C'de 8 günde 0.01 mg/l 2,4 D ve kinetin uygulmasından elde etmişlerdir. Her 100 kültüre alınan anterlerden 25 – 30 bitki oluştuğunu belirlemişlerdir. Kültürden 12 gün sonra oksin içermeyen ve 0.1 mg/l kinetin içeren yeni besin ortamına aktarılması gerektiğini vurgulamışlardır. Anterden türetilen bitkilerin % 15-50'si diploid olduğunu bildirmişlerdir. Fakat ilk kültür ortamında 2,4 D yerine IAA kullanımı ile sadece haploid bitkiler elde edildiğini belirlemişlerdir.

Başay ve Ellialtıoğlu (2013), bazı patlıcan (*Solanum melongena* L.) çeşitlerinin androjenik kapasitesini, ıslah hatlarını belirlemek ve yüksek haploid embriyo oluşturma yeteneğine sahip daha duyarlı genotiplerle melezlenmesiyle düşük duyarlılığa sahip genotiplerde androgenesis oluşumunu etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. Yeşilimsi-sarı anterleri içeren çiçek tomurcukları, petallerin görünür olmadığı bir çiçek boyutuna eş değer zaman olarak düşünülen tek çekirdekli mikrosporun son aşamasında iken toplamışlardır. Anterler 8 gün 35°C'de karanlıkta saklandıktan sonra 12 sa ışık periyodunda 25 °C'de 4 gün C besin ortamında inkübe etmişlerdir. Daha sonra 30 g/l sakkaroz ve 0.1 mg/l kinetin içeren katı R ortamına transfer etmişlerdir. Çalışmanın ilk kısmında bitki materyali olarak Topan, Halep karası ve Teorem F1 çeşitleri ve *Verticillium dahliae* Kleb.'e toleranslı 2 ıslah hatları [Vd-1 ve Vd-2 (LS 2346)] kullanmışlardır. Topan ve Halep karasından sırasıyla % 4.16 ve % 2.63 oranında haploid embriyolar elde etmişlerdir. Topan ve Halep karası patlıcan çeşitlerinin anter kültürüne yanıtları Teorem F1 çeşidi ve Vd-1 ve Vd-2 hatlarına göre daha iyi olduğunu belirlemişlerdir. Anter kültürüne cevaplarından dolayı Topan ve Halep karası çeşitleri ebeveyn olarak kullanmışlardır. Bu çeşitler diğer 3 genotip (Teorem F1, Vd-1 ve Vd-2) ile resiprokal bir şekilde melezlemişlerdir. Hibritler arasında

gametik embriyogenesis sadece Topan x Teorem F1 ve Teorem F1 x Topan kombinasyonlarından elde edildiğini bildirmişlerdir (sırasıyla % 0.87 ve % 2.57). Haploid embriyoların gelişimi ve bitki oluşumları sırasıyla % 0.69 ve % 2.57 oranında olduğunu belirlemişlerdir. Sonuçlara göre, patlıcanda androgenesisin güçlü bir şekilde genotiplere bağlı olduğunu vurgulamışlardır. Bu melezleme teknikleriyle haploid embriyo oluşturamayacak genotiplerden haploid embriyogenesis etkinliği için fırsatları arttırmada kullanılabileceği bildirilmiştir.

Sundar ve Jawahar (2010), *Datura stramonium* L.'in anter kültüründen direkt somatik embriyogenesis için etkili bir protokol araştırmışlardır. MS besin ortamı farklı konsantrasyonlarında 2,4 D (2.26-18.08 µm/l) ve 2,4 D ve 13.32 µm/l BAP'ın kombinasyonlarına 3 m/l CW (Hindistan cevizi suyu) ilave etmişlerdir. En fazla somatik embriyo 9.04 µm/l 2,4 D içeren MS besin ortamından elde etmişlerdir. Daha yüksek olgunlaşma sıklığı ve embriyolardan bitki rejenerasyonu 3 m/l CW ilavesiyle 9.04 µm/l 2,4 D ve 13.32 µm/l BAP içeren ortamdan elde edildiğini bildirmişlerdir.

Salas ve ark. (2011), anter kültürünün androjenik haploidler ve katlanmış diploidler elde etmek için kullanılan yaygın bir teknik olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde patlıcanda (*Solanum melongena*) bu teknik bazı ticari çeşitlerin F1 hibrit tohumlarını üretmek için katlanmış diploid (DH) saf hatlar geliştirilmesi için kullanıldığını ifade etmişlerdir. Ancak bilinen patlıcan ve ilgili türlerin farklı materyalleri arasında bu faydalı muamelenin varyasyonları kapsamlı bir çalışmadan yoksun olduğunu belirtmişlerdir. *Solanum melongena*'nın androjenik tepkilerini araştırmışlardır. Aynı koşullar altında her genotipten anterleri kültüre almışlar ve kallus, embriyo ve bitki üretme yeteneklerinin yanısıra üretilen embriyoların orijinleri ve kalitelerini tespit etmişlerdir. Araştırılan 12 genotipten 11'inin somatik kallus ürettiğini, embriyo kalitesi, embriyo oluşturma sıklığı ve bitki çimlenmesi bakımından çeşitli sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir. Elde edilen embriyolardan 5 tanesinin mikrospor kökenli olduğunu belirtmişlerdir. Anter kültüründen oluşan embriyolar ilk olarak haploid olduğunu ve DH statüsüne

ulaştırıldığını bildirmişlerdir. Kültürün belirlenmiş bir periyodundan sonra SSR markırlarıyla doğrulamışlardır.

Khatun ve ark. (2006), patlıcanda anter kültürü protokolünü araştırdıkları çalışmada, 6 kültür çeşidini (Dohazari, IPM 31, Laffa S, Ishurdi L, ISD-006 ve Jessore L) MS besin ortamında farklı hormon dozunda (2 mg/l NAA+ 2 mg/l BAP, 1 mg/l IAA+ 2 mg/l BAP ve 2 mg/l 2.4 D+ 2 mg/l BAP) kallus eldesi için denemişlerdir. En yüksek canlı anter (% 35) ve en fazla kallus gelişimini (% 30) ISD-006 çeşidinin 2 mg/l NAA+ 2 mg/l BAP içeren MS ortamında elde etmişlerdir. En erken kallus oluşumu ISD-006 çeşidinde 2 mg/l 2.4 D+ 2 mg/l BAP içeren MS ortamında (27.25 gün) gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Patlıcan anterlerinden elde kallusları sürgün gelişimi için farklı oksin ve sitokonin kombinasyon ve konsantrasyonları içeren MS besin ortamına aktarmışlar fakat sürgün elde edememişlerdir. Kalluslarda kök yapıları gözlemlemişlerdir. Kök yapılarının farklı parametreleri arasında ISD-006 en iyi sonuç gösterdiğini bunu Jessore L çeşidi izlediğini bildirmişlerdir. Ortamlar arasında 2 mg/l NAA+ 2 mg/l BAP ve 2,5 mg/l NAA+ 2 mg/l BAP içeren MS ortamları en iyi performansı gösterdiğini belirlemişlerdir.

Patlıcan ve *Solanum aethiopicum gilo* arasında somatik hibritlerin anter kültürlerinden dihaploid bitkiler elde etmişlerdir. Anter kültürü Rotino (1996)'ya göre yapılmıştır. Anterler C3 (3 mg/l Kin + 1 mg/l IAA), C6 (5 mg/l Kin + 5 mg/l NAA), C9 (1 mg/l Zeatin + 3 mg/l NAA) ve C12 (0.5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l Zeatin + 0.5 mg/l IAA) ortamlarında 35 ^{0}C'de 8 gün bekletmişlerdir. Daha sonra petrileri 25 ^{0}C'de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullara almışlar, 4 gün sonra anterler 0.1 mg/l sitokinin içeren regeneresyon ortamına almışlardır. Anterlerden embriyolar gözükünce V3 ortamına aktarmışlardır. Gelişen androgenik kallusları ise 0.5 mg/l Zeatin, 0.3 mg/l Kinetin ve 0.1 mg/l BAP içeren MS ortamlarına almışlardır. Dihaploidlerin androjenik kökenleri ploidi tayiniyle (flow sitometri ve kloroplast sayımı), izoenzim ve moleküler analizler ile (ISSR ve RAPDs) belirlemişlerdir. Yaptıkları analizlerde androjenik bitkilerin önemli ölçüde

morfolojik çeşitlilik gösterdiğini belirlemişlerdir. Dihaploid androjenik bitkilerde polen canlılığının somatik hibritlere göre önemli bir şekilde azaldığını tespit etmişlerdir. Ancak dihaploidlerin çoğunun partenokarpik meyveler ürettiğini belirlemişlerdir. *Solanum aethiopicum Gilo* ve somatik hibritler *Fusarium oxysporum* f sp. *melongenae* tarafından sebep olunan fungal hastalığa tam direnç gösterdiği bildirilmiştir. İnoküle edilen 41 dihaploidden 34'ü belirti göstermediği belirlemişlerdir. Geliştirilen androjenik bitkilerin patlıcana direnç kazandırmak için önemli bir kaynak sunabileceğini ifade etmişlerdir (Rizza ve ark, 2002).

Kumar ve ark. (2003), üç patlıcan F1 melezinin (*Solanum melongena*) genç anterleri, 2-4 D, BA, NAA (0.5, 1.0, 2.0 mg/l) gibi çeşitli büyüme regülatörleri içeren MS ortamında (Murashige ve Skoog ortamı, 1962) ve GD ortamında (Gresshoff ve Doys, 1972) kallus indüksiyonu için kültüre almışlardır. Anterlerin, polen gelişimi aşamasını asetonkarmin boyaması ile test etmişlerdir. Genç izole tomurcuklar soğukta 2-3 saat ön işleme tabi tutmuşlardır. Bu tomurcukları % 0.1 $HgCl_2$ ile 3 dakika boyunca yüzey sterilizasyonu yapmışlar ve steril su ile üç kez yıkamışlardır. Anterleri MS ortamında olduğu gibi GD ortamında da aseptik olarak kültüre almışlardır. Anterlerin filamentleriyle birlikte aseptik koşullar altında kesildiğini, steril bir petri kabına yatay olarak yerleştirildiğini ve parafilm ile sızdırmaz hale getirildiğini bildirmişlerdir. Kültürleri başlangıçtaki 20-30 gün boyunca karanlıkta 25 ± 2 ° C'de inkübe edildiğini ve kallus gelişimi başlatıldıktan sonra tüm kültürlerin 16 saatlik ışık periyoduna aktarıldığını belirtmişlerdir. Her bir işlem için 5 bitkiden en az 200 anter kültürlemişlerdir. İnkübasyondan dört hafta sonra, kallusların gözlendiğini tespit etmişlerdir. Kültürlerin, dört hafta sonunda kallus indüksiyonu sıklığını tespit etmişlerdir. Kallus indüksiyonu veya rejenerasyona yanıt verilen anterlerin sayısı ile kültürlenen toplam anter sayısı arasındaki oranı hesaplamışlardır. Anter kültüründen gelişmiş bitkiler küçük kaplara, daha sonra (20-30 gün) seraya aktarmışlardır.

Zayova ve ark. (2012), *Solanum melongena*'nın ('Larga Negra' ve Black Beauty') hipokotil ve kotiledonlarından oluşan kallusları kullanılarak indirekt

organogenesisi için bir protokol araştırmışlardır. En fazla morfogenik kallus indüksiyonu, 2.0 mg/l α-naftalen asetik asit (NAA) ve 0.5 mg/l 6-benzilaminopurin (BAP) içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında 30 günlük fidelerin kotiledonlardan gözlemlemişlerdir. En yüksek sürgün oluşumu yüzdesini ve en yüksek sürgün/kallus ortalamasını, hormonsuz MS ortamından elde etmişlerdir. Kallus indüksiyonu ve sonrasında bitki oluşumu açısından, kotiledon eksplantlarının, hipokotil eksplantlardan daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir. Oluşan sürgünleri (2-3 cm), hormonsuz MS ortamda veya 0.1 mg/1 indol-3-bütirik asit (IBA) içeren ortamda köklendirmişlerdir. Rejenerasyona uğramış olan bitkilerin yaklaşık % 90'ının sera içerisinde alıştırıldıktan sonra arazi koşullarında hayatta kaldığını bildirmişlerdir. Patlıcan ıslah programları için önerilebilecek ilk bitki materyali olarak yararlı varyasyon gösteren birkaç somaklon elde ettiklerini belitmişlerdir.

Salas ve ark. (2012), anter kültürünün etkinliği ile ilgili patlıcanın çiçek biyolojisinin iki yönünü ele almışlardır. Bunların anter kültürü için en uygun çiçeklenme aşaması seçimi ve uygun tomurcuklanma ve anter seçiminde heterostilinin etkisi olduğunu bildirmişlerdir. 12 farklı genotipte, embriyogenesis indüksiyonuna en duyarlı aşamaları olan vakuolat mikrosporlar ve genç iki hücreli polenlerle zenginleştirilmiş tomurcukları ve anterleri tanımlamak için morfolojik kriterleri (tomurcuk büyüklüklerini) belirlemişlerdir. Bu mikrospor/polen evreleri içeren anterlerin, sıvı ortamda izole edildiğinde ve kültürlendiğinde en tepkisel olduğunu, bu evreleri içeren anterin kültürünün ise başarılı olmadığını gözlemlemişlerdir. Bunun yerine, çoğunlukla genç ve orta mikrosporları içeren genç anterler daha uygun olduğunu belirlemişlerdir. Patlıcan anter duvarları analiz edilmiş ve anter duvarı kalınlığının indüklenebilir mikrosporların üzerindeki etkilerini azalttığı belirlemişlerdir. Böylece, genç anterlerin kültürünün, daha genç mikrosporun indüklenebilir aşamaları bulmalarına izin vereceğini tespit etmişlerdir. Ayrıca heterostili bir çeşit olan Cristal'de bulunan kısa ve uzun boylu stile sahip tomurcukların embriyogenik tepkisini analiz etmişlerdir. Her çiçek morfolojine

sahip farklı stil uzunluklarında tomurcukların ve anterlerin aynı miktarda embriyo üretildiğini ve anter kültürü için de aynı derecede faydalı olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen sonuçların pratikte uygulanması, yalnızca bu çeşitlerde anter kültürü için değil, aynı zamanda kalın anter duvarlı ve heterositil olan diğer çeşitler için de verimliliğini artırabileceğini ifade etmişlerdir.

Supena ve ark. (2006), Endonezya acı biberinde (*Capsicum annuum* L.) dihaploid üretim yöntemi oluşturmak için çeşitli anter ve mikrospor kültür sistemleri incelemişlerdir. Shed-mikrospor protokolü geliştirilmiş ve daha önce bildirilen biber haploid üretim yöntemlerinden daha iyi performans gösterdiği belirlemişlerdir. Protokolün kritik faktörlerini belirlemişlerdir. Bunları:% 50'den fazla geç tek hücreli mikrospor çiçek tomurcuğu seçimi, tomurcukların 1 gün 4 °C ön muamele edilmesi, bunu müteakiben 9 °C'de 1 hafta boyunca çift katmanlı sistemde kültür yapılması ve daha sonra 28 °C'de sürekli karanlıkta bekletilmesi, katı ortam alt katta % 1 aktif kömür ile birlikte Nitsch bileşenleri ve % 2 maltoz ve sıvı üst tabakada 2.5 µM zeatin ve 5 µM indol-3-asetik asit içermesi gerektiğini bildirmişlerdir. Acı biber testi yapılan on genotipin hepsi bu protokole tepki gösterdiğini tespit etmişlerdir. En iyi genotipler çiçek tomurcuğu başına dört ile yedi bitki ürettiğini belirlemişlerdir. Bu protokolün, acı biber yetiştiriciliği için iki misli haploid bitki üretmek için potansiyel bir araç olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz (2000), Kemer patlıcan çeşidinde tomurcuklara uygulanan soğuk şoku ve besin ortamına katılan aktif kömürün, anterlerdeki içsel absizik asit (ABA) miktarı üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada; uygulanan soğuk şokları (+ 4 ^{0}C de 80 saat ve + 9 ^{0}C de 9 gün) ve aktif kömürün (% 0.1, 1 ve 2), patlıcan anterlerindeki ABA miktarını azaltırken, embriyogenesise olumlu etki yapmadığını ve embriyoların sadece kontrol ortamlarından elde edildiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, anterlerdeki ABA miktarının az veya çok olmasının anter kültüründeki başarı üzerinde tek başına etkili bir faktör olmadığı da ifade edilmiştir. Benzer bir sonuca göre, Karakullukçu (1991),'nun patlıcanda yaptığı

anter kültürü çalışmasında da özellikle başlangıçtaki globüler oluşumlardan çoğunun gelişimleri sonradan bloke olmuş, bazıları kök oluşturup sürgün ucu vermediğini bildirmiştir.

2.4. Protoplast kültürü çalışmaları

Aka Kaçar (2011)'ın bildirdiğine göre, selülozik yapıdaki hücre çeperleri, mekanik ya da enzimatik yollarla çıkarılmış olan hücrelere "protoplast" denilmektedir. Protoplast kültürü kültürünü ise, izole edilen protoplastların, hücre modifikasyonu ve somatik hibridizasyon yöntemleriyle, bitki tür ve çesitlerinin geliştirilmesi amacına yönelik olarak, uygun besin ortamlarında kültüre alınması olarak tanımlamıştır.

İlk protoplast hücresi 1968 yılında (I. Takebe, G. Labib ve G. Melchers) domates bitkisini kök hücrelerinden elde edilmiştir. 1970 yılında (I. Takebe, G. Labib ve G. Melchers) tütün bitkisinin protoplastlarından regenerasyon gerçekleştirilmiştir. Elektrofüzyon tekniğiyle ilk melezleme (H.-U. Koop, H.-G. Schweiger) 1985 yılında yapılmıştır. Somatik diploid hücrelerin birleşmesi, çekirdeklerin de kaynaşması koşuluyla bir tetraploid füzyon ürünü üretmelidir. Durum buysa, bir synkaryon'dan bahsedilir. Çekirdeklerin ayrı kalacağı bir füzyon ürünü, bir heterokaryondur. İlk türler arası heterekaryon ise 1978 yılında (G. Melchers) domates ile patates bitkisi arasında yapılmıştır ancak oluşan bitkiler fertil olmadığı bildirilmiştir. İlk tohum üreten heterekaryon ise *Datura innoxia* ve *Datura stramonium* arasında (O. Schieder) gerçekleştirilmiştir (Anonymous, 2017a).

Patlıcanın kültür formu ile yabani akrabaları arasında yapılan melezlemelerde eşeysel uyuşmazlıklara bağlı olarak başarı sınırlıdır (Sekara ve ark., 2007). Patlıcanın dayanıklılık kaynağı olarak kullanılacak olan akraba türleri ile melezlemelerde sorunlar yaşanması sebebiyle kullanılan geleneksel bitki ıslah yöntemleriyle çok önemli bir ilerleme sağlanamamıştır (Kumar ve ark., 1998). Bu nedenle, patlıcanın kültür formlarına yabani formlarından gen aktarmak için

biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır (Kashyap ve ark., 2003). Biyoteknolojik yaklaşımlar çeşit geliştirme çalışmalarında kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Sekara ve ark., 2007). Patlıcanın dokuları embriyo kurtarma, *in vitro* seleksiyon, somatik hibridizasyon ve genetik transformasyon gibi biyoteknolojik çalışmalar için genetik potasiyele sahiptir (Magioli ve Mansur, 2005). Patlıcanın (*Solanum melongena* L.) protoplastlarının rejenerasyon yeteneği yüksektir ve bu türler arası melezlemede gerekli olan önemli bir özelliktir (Sihachakr ve ark., 1993). Patlıcan doku kültüründe, özellikle biyoteknoloji ve uygulama, somaklonal varyasyon, haploidizasyon, somatik hybridizasyion ve gen transferi için büyük bir potansiyele sahiptir. Somaklonal varyasyon tuz stresi ve hastalıklara dayanıklı hat elde etmek için kullanılmıştır. Bakteriyel ve fungal solgunluklara karşı dayanıklılık ise somatik hibridizasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde aktarılmaktadır. Fakat elde edilen hibritler steril olabilmekte veya morfolojik olarak kültür formundan uzaklaşmaktadır. Bu durumda devreye geriye melezleme yöntemi girmektedir. Patlıcanda genetik mühendisliği ve moleküler işaretleri konusunda bilgi çok az olmakla birlikte, iki genetik bağlantı haritalar RAPD ve RFLP işaretleri kullanarak kurulmuştur (Collonnier ve ark., 2001). Patlıcanda ilk genetik haritalama Doğanlar ve ark. (2002a, 2002b) tarafından türler arası melezlemeden elde edilen F_2 populasyonunda yapılmıştır. Bu çalışmayla patlıcanın 12 linkage grubuna 233 restriction lenght polymorphism (RFLP) markerları yerleştirilmiş, meyve ve bitki özelliklerini kontrol eden 62 QTL tesbit edimiştir. *Solanum linneanum* ve *Solanum melongena* arasında türler arası melezleme yapılarak populasyon geliştirilmiştir. Bu populasyon kullanılarak hastalıklara dayanıklılık ve abiyotik streslere dayanıklılık için haritalama yapılacağı bildirilmiştir (Frary ve ark., 2003).

Rotino ve ark (2002), birkaç *Solanum* spp'de protoplast füzyonu yoluyla somatik melezler elde edildiğini bildirmiştir. Somatik hibridizasyon, hem nükleer hem de sitoplazmik bileşiklerin (deoksiribonükleik asit) rekombinasyonuna izin verebileceğini, bu nedenle, genetik değişkenliği genişletmek için somatik

hibridizasyonun güçlü bir araç olduğunu ve yabani akrabalarından patlıcan gen havuzuna yararlı genler aktarmaya olanak sağlayabileceğini ifade etmişlerdir.

Protoplast füzyonu yaygın olarak ticari bir anaç olarak kullanılan, yenilebilir patlıcan olan *Solanum integrifolium* ile bakteryel solgunluğa toleranslı yabani patlıcan türü *Solanum violaceum* arasında gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen somatik hibrit hatlardan biri (27-14) ebeveynlerinden ara morfolojik özelliklere sahip olduğunu belirlemişlerdir. Mikroskobik gözlemler, hattın amfidiploid olduğunu tespit etmişlerdir. Hibrit hat ve her iki ana türe, kök kesme yöntemi ile *Ralstonia solanacearum* suşuenfekte etmişlerdir. 27-14 hattı, *S. integrifolium*'dan daha az şiddetli bakteriyel solgunluk semptomları geliştirdiğini belirlemişlerdir. Aşılama işleminden yirmi gün sonra sürgün tepe dokusundaki bakteri yoğunluğu, 27-14 hattında *S. integrifolium*'dan daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bakteri çoğalmasının 27-14 hattında engellendiğini ifade etmişlerdir (Tamura ve ark, 2002).

Somatik melezlemede kullanılan protoplast füzyonu patlıcanda seksüel uyuşmazlık durumunda türler arası melezlemede yararlı özellikleri transfer etmek için kullanıldığını bildirmişlerdir. Somatik hibritin en önemli avantajlarından birisi de çekirdek özelliklerin yanında ekonomik öneme sahip sitoplazmik özelliklerinde hibrite aktarılabilmesi olduğunu vurgulamışlardır (Kashyap ve ark., 2003).

Sihachakr ve ark (1988), patlıcanda türler arası somatik melezlemeler başarı ile uygulanabildiğini bildirmişlerdir. *Solanum melongena* L. ve *Solanum khasianum* arasında elektrofüzyon yolu ile somatik hibrtiler elde edildiğini belirtmişlerdir.

Guri ve ark (1987), *Solanum torvum*'un protoplastlarından kallus hücreleri başarılı bir şekilde rejenere edildiğini bildirmişlerdir.

Guri ve Sink (1988a), protoplast füzyonu yöntemi ile *Solanum melongena* ve *Solanum nigrum* arasında türler arası melezleme gerçekleştirildiğini ve southern analizi ile hibridizasyonun gösterildiğini bildirmişlerdir.

Guri ve Sink (1988b), patlıcan (Black Beauty cv) ve *Solanum torvum*'un mezofil protoplastları (her ikisi de 2n = 2x = 24), Menczel ve Wolfe PEG/DMSO prosedürünün bir modifikasyonu kullanılarak füzyon yapmışlardır. Füzyon sonrası protoplastlar, S modifiye edilmiş KM ortamında 1 x 10^5 /ml olacak şekilde yerleştirmişlerdir. Sürgün rejenerasyonundan bir hafta önce, açık yeşil on ayrı kallus elde etmişlerdir. On somatik melez bitkiyi seraya aktarmışlar ve yaprak boyutu ve şekli, çiçek boyutu, şekli, rengi ve bitki boyu gibi morfolojik özellikleri incelemişlerdir. Kromozom sayıları 46-48 (beklenen 2n = 4x = 48) ve polen canlılığı % 5-% 70 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. On melez bitkiden alınan *in vitro* sürgünler *Verticillium* solgunluğuna dayanıklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Collonnier ve ark. (2003), *Solanum melongena* L. (2n = 2x = 24) ile *Solanum torvum* Sw'un (2n = 2x = 24) iki genotipi arasında toprak kökenli hastalıklardan *Ralstonia solanacearum* ve *Verticillium dahliae*'ye dayanıklılığın aktarımı için türler arası somatik melezler elde etmişlerdir. Tüm somatik hibritlerin, 2 tanesi hariç diğerleri *Ralstonia solanacearum* ve *Verticillium dahliae*'ye orta veya yüksek derecede dayanıklı olduğunu tespit etmişlerdir.

Daunay ve ark. (1992), *Solanum melongena* ve *Solanum aethiopicum* group *Aculeatum* arasında fertil somatik hibritlerin elde edildiği bildirmişlerdir. Yaprak mezofil hücreleri elektrofüzyon tekniğiyle melezlemişlerdir. Oluşan 85 kallustan oluşan 35 bitkinin 32 tetraploid, 1 hexaploid ve 2 mixoploid olduğunu belirtmişlerdir.

Iwamoto ve Ezura (2006), *Solanum abutiloides*, *Solanum integrifolium*, *Solanum scarbum* ve *Solanum toxicarium* türleri için kullanılmak üzere protoplast rejenerasyonu için etkili protokol geliştirmişlerdir.

Borgato ve ark (2007a), protoplast izolasyonu için *Solanum virginianum* bitkilerinin yapraklarını kullanmışlardır. Hücre duvarı oluşumunu ve hücre bölünmesini desteklemek için, protoplastlar, sıvı ortamda yüzen ince aljinat katmanlar halinde kültürlemişlerdir. Protoplastlar, 0.5 mg/l zeatin, 1.0 mg/1 2,4-

diklorofenoksiasetik asit ve 1.0 mg/1 a-naftalinasetik asit takviye edilmiş Kao ve Michyaluk (KMp8) ortamında 1.0 x 106/ml yoğunluğunda yerleştirildiğinde, % 42.3'ü 3-4 hafta içinde mikrokalluslar geliştirdiğini bildirmişlerdir. 2.0 g/l zeatin ve 0.1 mg/l 3-indol asetik asit ilave edilmiş katılaştırılmış KMp8 ortamına aktarılan protoplastlardan oluşan kalluslardan yaklaşık 2 hafta içinde % 28'inde organogenesis yoluyla sürgün oluşumu gözlendiğini belirlemişlerdir. Murashige ve Skoog (MS) ortamında büyüme regülatörleri olmaksızın daha fazla gelişme gözlendiğini ve köklerin 1.0 mg/l 3-indol bütirik asit içeren MS ortamına aktarıldıktan sonra geliştiğini tespit etmişlerdir. Regenere olan bitkilerin normal morfolojiye sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

Borgato ve ark (2007b), meyvesi yenen bitkilerde, yıllık bitkiler olmaktan çok yıllıklara geçiş, gelecekteki tarımsal sistemlere daha az enerji girdisi sağlayabileğini bildirmişlerdir. Bunun uygulanabilirliğini *Solanum melongena* için test etmişlerdir. *S. melongena* (2n = 2x = 24) ve çalımsı türlerden biri olan *Solanum marginatum*'un (2n = 2x = 24) yaprak protoplastları elektrofüzyona tabi tutulmuş ve çalımsı gelişmesi olan verimli somatik hibritler rejenere edildiğini belirlemişlerdir. Heterokaryonların seçimi için manyetik hücre ayırıcı (MACS) tekniğini kullanılmışlardır. Serada yetiştilen melezler ebeveyn türlerine kıyasla daha şiddetli bir şekilde büyüdüğünü ve morfolojik özellikleri *S. melongena* ve *S. marginatum* arasında orta düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir. Hibritlerin ortalama % 85 canlı polen ve verimli meyveler ürettiğini belirlemişlerdir. Somatik melezleri 3 yıldan fazla bir süre serada tutmuşlar ve bol tohumlarla iki çeşit meyve oluşturan çiçekler üretmişlerdir. Meyveler ya çimlendirilemeyen tohumlar içeren yeşil çizgili veya tamamen çimlenebilen tohumlu sarı renkli olduğunu bildirmişlerdir. Sitolojik olarak, somatik hibritler beklenen kromozom sayısını 2n = 4x = 48 gösterdiğini mikrosporogenez sırasında kromozom eşleştirmesi, intergenomik eşleşme sıklığının düşük olduğunu belirlemişlerdir. Somatik hibridizasyon ile bir çalımsı çok yıllık türün elde edildiği sonucuna varıldığını bildirmişlerdir. Bu türün kendi başına ya da patlıcan yetiştiriciliğinde yararlılığının yalnızca ekili patlıcan çeşitleri

için çok yıllık çalımsı alışkanlığının iletilmesine değil aynı zamanda *S. melongena* + *S. marginatum* melezlerini geriye melezleme suretiyle yaratılması gereken değişkenliğe de bağlı olacağını belirtmişlerdir.

Toppino ve ark. (2008b), patlıcanın yabani akrabaları olan *Solanum aethiopicum* group *Gilo* ve *Solanum aethiopicum* group *Aculeatum* (*Solanum integrifolium*) ile kültür formu (*Solanum melongena* cv. Dourga) arasında somatik melezleme yapmışlar ve kültür formuna *Fusarium*'a dayanıklılık aktarılarak dayanıklılığı taşıyan genleri haritalamışlardır. Çalışmada kullanılan tetraploid somatik hibtritlerin protoplastların elektrofüzyonu ile elde edildiğini bildirmişlerdir.

Filiponne ve ark. (1992), somatik hibritlerin izoenzim özellikleri ve morfolojik yapıları ile iyi karakterize edilebildiğini bildirmişlerdir. Moleküler ve fizyolojik çalışmalarla hibridizasyon doğrulanabildiğini belirtmişlerdir. Flow sitometri ile ploidi düzeyini tespit etmekte kullanıldığını ifade etmişlerdir.

Sihachakr ve ark. (1989), *Solanum melongena* ve *Solanum torvum* arasında mezofil protoplastları kullanılarak elektrofüzyon yolu ile somatik hibridizasyon gerçekleştirildiğini ve rejenere olan 124 bitkiden 19'unun hibridize olduğu ve bulardan 15'inin kromozom sayısının 46-48 arasında stabil kromozom sayısına sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Jarl ve ark. (1999), *Solanum melongena* ile *Solanum torvum* arasında protoplast füzyonu yaparak somatik hibritleri elde etmişlerdir. İki tür arasında uyuşmazlığı kaldırmak için *Solanum torvum*'un protoplastlarına ışın uygulamışlar, böylece fertil bireyler elde edilebildiğini tespit etmişlerdir. Tarla koşullarında *Verticillium*'a toleranslık gösteren toplam 12 bitkinin ıslah programına dahil edildiğini bildirilmişlerdir.

Bletsos ve ark (1998); Bletsos ve ark (2000), patlıcanın kültür formu içerisinde *Verticillium*'a dayanıklılık açısından genetik çeşitlilik sınırlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle, yabani türlerinden bu hastalığa karşı dayanıklı olan *Solanum torvum* ve *Solanum sisymbriifolium*'dan dayanıklılık genlerinin kültür

formun aktarılması gerektiğini ifade etmişlerdir. Kültür çeşitleri Emi, Tsakoniki ve Langada ile bu yabani türler rasında yapılan melezlemelerde sadece 'Langada' x *S. torvum* melezinden F1 hibrit elde etmişlerdir. Bu F_1 hibritin morfolojik olarak *S. torvum*'a benzediği ancak steril olduğu tespit etmişlerdir. Kolhisin uygulamasının sterilitenin kaldırılmasında başarılı olmadığı bildirmişlerdir.

Samoylov ve ark. (1996), asimetrik somatik melezleme; türler arasında sadece seksüel uyumsuzluğun üstesinden gelinmesinin değil, aynı zamanda nükleer ve mitekondrial genomu birleştirmenin bir yolu olduğunu bildirmişlerdir. Domates (*Lycopersicon esculentum x L. pennellii*) ile patlıcan (*Solanum melongena*) arasında yapılan asimetrik melezlemeden elde edilen üç somatik melez bitkide *S. melongena*'nın tüm chloroplast DNA'sını içerdiği ve mitokondrial genomu (mtDNA) ağırlıklı patlıcan olduğu belirlenmesine rağmen, patlıcan özgü bazı polimorfik bantların oluşmadığını tespit etmişlerdir.

Jadari ve ark. (1992), patatese (*Solanum tuberosum*) *Verticillium* solgunluğuna dayanıklılığı kazandırmak için, dayanıklılık kaynağı olarak *S. torvum* kullanmışlar ve türler arası somatik melezlemeden elde edilen tetraploid hibritleri isozyme analizi ile doğrulamışlardır. Elde edilen hibritlerin tamamının *Verticillium*'a dayanıklı olduğu bildirmişlerdir.

Mısır bitkisinden izole edilen polen ve yumurta hücreleri elektrofüzyonu, kalsiyumlu ortamda füzyonu ve mikroenjeksiyon gibi farklı teknikler kullanarak fertil bitkiler elde edildiğini bildirmişlerdir (Faure ve ark., 1994; Dumas ve Faure, 1995; Kranz ve Dressethaus, 1996).

Gürel ve ark. (2002), daha önceki denemelerden elde edilen ÇBM315 adlı şeker pancarı ıslah hattına ait süspansiyon-kökenli protoplastlar ile yine üç şeker pancarı ıslah hattına (M114, ELK345 ve M1017) ait mezofil-kökenli protoplastların füzyonuna çalışmışlardır. Üç farklı PEG (% 20, % 25 ve % 30) ile üç farklı uygulama süresinin (15, 20 veya 25 dakika) değişik kombinasyonlarını denemişlerdir. Füzyon etkinliği; canlılık, hetereokaryon sıklığı ve füzyona uğrayan protoplastların PE değerlerinin dört haftalık kültürden sonra ölçülmesi ile

belirlemişlerdir. Genel olarak, % 25 PEG ile 20 dakikalık uygulama süresinin kombinasyonunda en yüksek füzyon sıklığı elde etmişler fakat en yüksek canlılık oranı % 20 PEG ile 25 dakikalık uygulama süresi sonunda elde edildiğini bildirmişlerdir. Hetereokaryonların hücre kolonisi oluşturma kapasitesi, düşük PEG düzeylerinin (% 20 veya % 25) kısa süreli uygulamalarla (15 veya 20 dakika) kombine edilmesi halinde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Füzyona uğrayan protoplastlardan makrokallus veya bitki rejenerasyonu ise elde edilemediğini bildirmişlerdir.

Türler arası melez bir domates hibriti '*Lycopersicon esculentum* x *L. Pennellii*' ile patlıcan *Solanum melongena*'nın mezofil protoplastları arasında süspansiyon hücrelerinden türetilen protoplastlar ile modifiye edilmiş bir PEG/DMSO füzyon prosedürü ile asimetrik somatik hibritler elde edildiği bildirilmiştir. Domates hibritine daha önceden *Agrobacterium tumefaciens* ile kanamisine dirençli marker geni aktarıldığını belirtmişlerdir. Protoplast füzyonundan önce domates melezinin protoplastları 9.0 krad'da gama ışınlarına maruz bırakmışlardır. Böylece, patlıcan kanamisin duyarlılığı ile birleştirilmiş ışınlanmış domates hibrit protoplastlarının bölünmemesi somatik hücre hibritlerinin seçilmesinin sağlandığını bildirmişlerdir. Füzyon sonrası rejenere olan kırk dokuz kallusun yaprak benzeri yapıları 50 mg/l kanamisin uygulamışlardır. 49 kallusun sadece dördünün, 50 mg/l kanamisin uygulamasından sonra sürgün ve kök oluşturduğunu ve daha sonra seraya aktarıldığını bildirmişlerdir. Fosfo-izoizomeraz ve peroksidaz izoenzimleri ve nükleer spesifik bir bezelye 45S ribozomal RNA geni ile yapılan hibridizasyonu, somatik hibrit durumunu doğrulamışlardır. Hepsi steril dört melez bitkinin sırasıyla 45, 60, 42 ve 57 kromozom sayılarına sahip olduğunu belirlemişlerdir (Liu ve ark., 1994).

Geerts ve ark. (2008), *Phaseolus vulgaris* L. (PV) ile iki donör tür *Phaseolus coccineus* L. (PC) veya *Phaseolus polyanthus Greenm*'in (PP), arasındaki türler arası melezleme başarısında donör türlerin dişi ebeveyn olarak kullanılmasını gerektirdiğini tespit etmişlerdir. Uyuşmazlık engelleri olmasına

rağmen, bu tür F1 çaprazlarındaki başarı, embriyo aborsiyonu nedeniyle çok sınırlı olduğunu bildirmişlerdir. Globular veya erken kalp şeklindeki embriyolar için kurtarma teknikleri geliştirildiğini ancak melez bitki rejenerasyonu çok zor olduğunu bildirmişlerdir. *Phaseolus* cinsi içinde protoplast füzyon tekniklerinin, PP veya PC ve PV arasındaki melezlemelerin başarılı olmasının bir alternatifi olduğunu vurgulamışlardır. Çok sayıda heterokaryonun elektro-füzyon (750 veya 1500 $V.cm^{-1}$) veya polietilen glikol (PEG 6000) ile füzyon için farklı genotipler ve prosedürler kullanılarak üretildiğini belirtmişlerdir. Her iki teknikte de hem heterokaryonların bölünmeleri hem de heterokaryondan mikrokallus oluşumunun gözlendiğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırma; Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı ile Araştırma ve Uygulama Arazisi, Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Merkezi ve Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM) Sebzecilik ve Süs Bitkileri Bölümü Uygulama Arazisi ve Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan bitkisel materyallerin tohumları Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM)'nden temin edilmiştir. Ülkemizde örtüaltı ve açıkta en fazla yetiştiriciliği yapılan, ancak hastalıklara dayanıklılık özelliği bulunmayan patlıcan çeşidi *Solanum melongena* cv Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Fusarium, Verticillium* ve Nematoda dayanıklı olduğu bilinen *Solanum torvum* Sw yabani türüne ait tohumlar kullanılmıştır.

3.2. Metot

Çalışma 3 kısımda incelenmiştir:

1- Doğada türler arası melezleme

2- *İn vitro* tozlama ve dölleme

3- Patlıcanda protoplast füzyonu protokolünün oluşturulması

3.2.1. Doğada türler arası melezleme

Çalışmanın bu kısmında hem melez bireyler elde etmek hem de tozlamadan sonra dişicik borusunda döllenmeye kadarki aşamaları izlemek amacıyla Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemeler yapılmıştır. Denemenin bu kısmında arazi melezlemeleri ve tohum eldesi, embriyo kurtarma, çiçek tozu çim borusu büyümesinin incelenmesi, çiçek tozu canlılıklarının belirlenmesi, *Solanum torvum* fidelerinin elde edilmesi, *in vitro*

kültürden elde edilen melez bitkilerin dış ortama alıştırılması, melez bireylerin fertilite durumlarının araştırılması, embriyogenik kallus eldesi için uygun ortam denemeleri, anter kültürü protokolünün araştırılması ve flow sitometri yöntemiyle ploidi seviyesinin belirlenmesi araştırılmıştır.

Bu kısımda araştırılan, *Solanum torvum,* Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin yaprak eksplantlarından ve genç meyvelerindeki döllenmiş yumurta hücrelerinden elde edilen embriyogenik kalluslar, protoplast füzyonu çalışmalarında protoplast kaynağı olarak kullanılmştır.

3.2.1.1. Arazi melezlemeleri ve tohum elde edilmesi

Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemeler yapılmıştır (Şekil 3.1). Ancak bu dönemde *Solanum torvum*'un ana ebeveyn olarak kullanıldığı melezlemelerden meyve elde edilememiştir. 'Kemer x *Solanum torvum'* ve 'Aydın Siyahı x *Solanum torvum'* melezlemelerinden 5'er meyve olacak şekilde tohumlar olgunlaşmaya bırakılmış ve olgun meyveler hasat edilerek tohumları çıkartılmıştır.

Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri kendileme yapılarak tohumları alınmıştır Ayrıca *Solanum torvum*'un meyveleri toplanarak tohumları çıkartılmıştır (Şekil 3.2).

3.2.1.2. Embriyo kurtarma

Tozlamadan 25, 30 ve 35 gün sonra her melezleme kombinasyonu için 5'er adet meyve hasat edilmiştir (Şekil 3.3). Hasattan sonra laboratuvara getirilen meyveler musluk suyunda yıkanıp kurulandıktan sonra steril kabin içerisinde yüzey dezenfeksiyonu işlemi (kuru yakma) yapılarak steril kabin içerisinde açılarak tohumları çıkartılmıştır. Her meyveden elde edilen tohumlardan 40 adet embriyo Tek Tek Açma Yöntemi ile binoküler mikroskop altında açılarak içersinde, hormonsuz MS besin ortamı bulunan cam tüplerde *in vitro* kültüre alınmış, kalan tohumlar ise petri kaplarında Doğrudan Ekim Yöntemi'yle *in vitro* kültüre

alınmıştır (Şekil 3.4). Kültüre alınan embriyolar iklim odasında 25±1°C sıcaklık, 16/8 saatlik fotoperiyot ve 2000 lux'lük ışık rejiminde tutulmuşlardır.



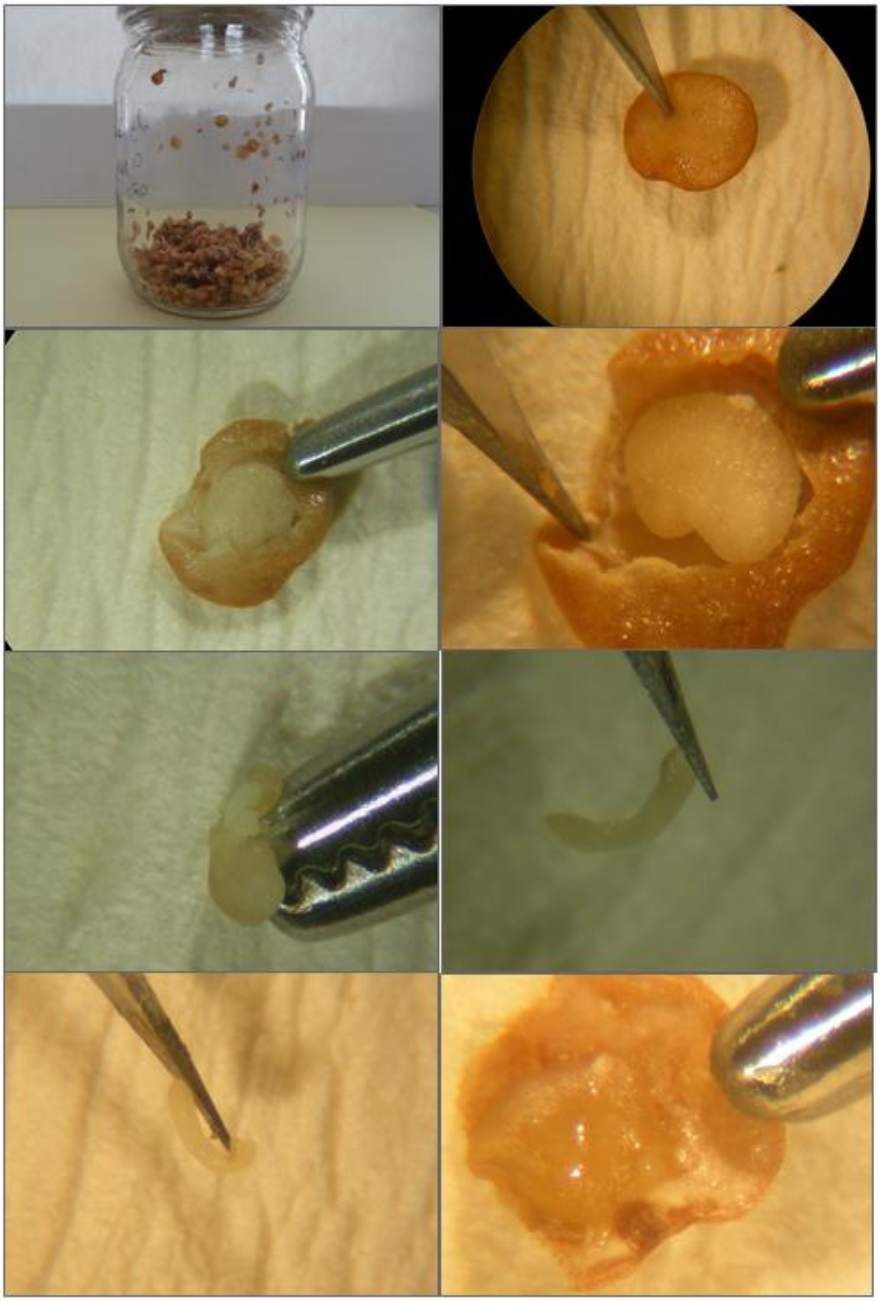
Şekil 3.1. Aydın Siyahı ve Kemer patlıcan çeşidi ile *Solanum torvum* arasında yapılan melezlemelerden görünüm



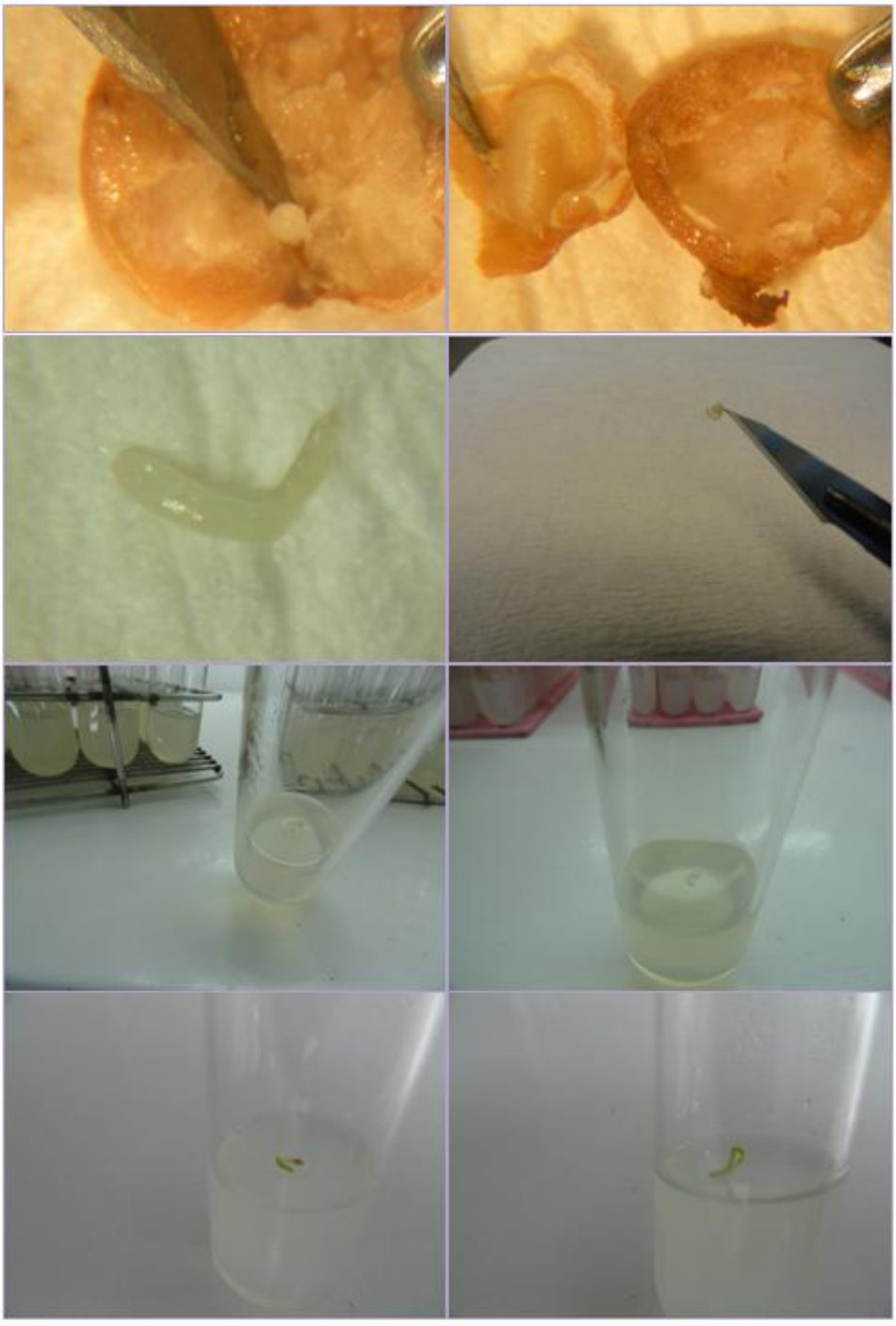
Şekil 3.2**.** ***Solanum torvum*** meyvelerinin hasatı



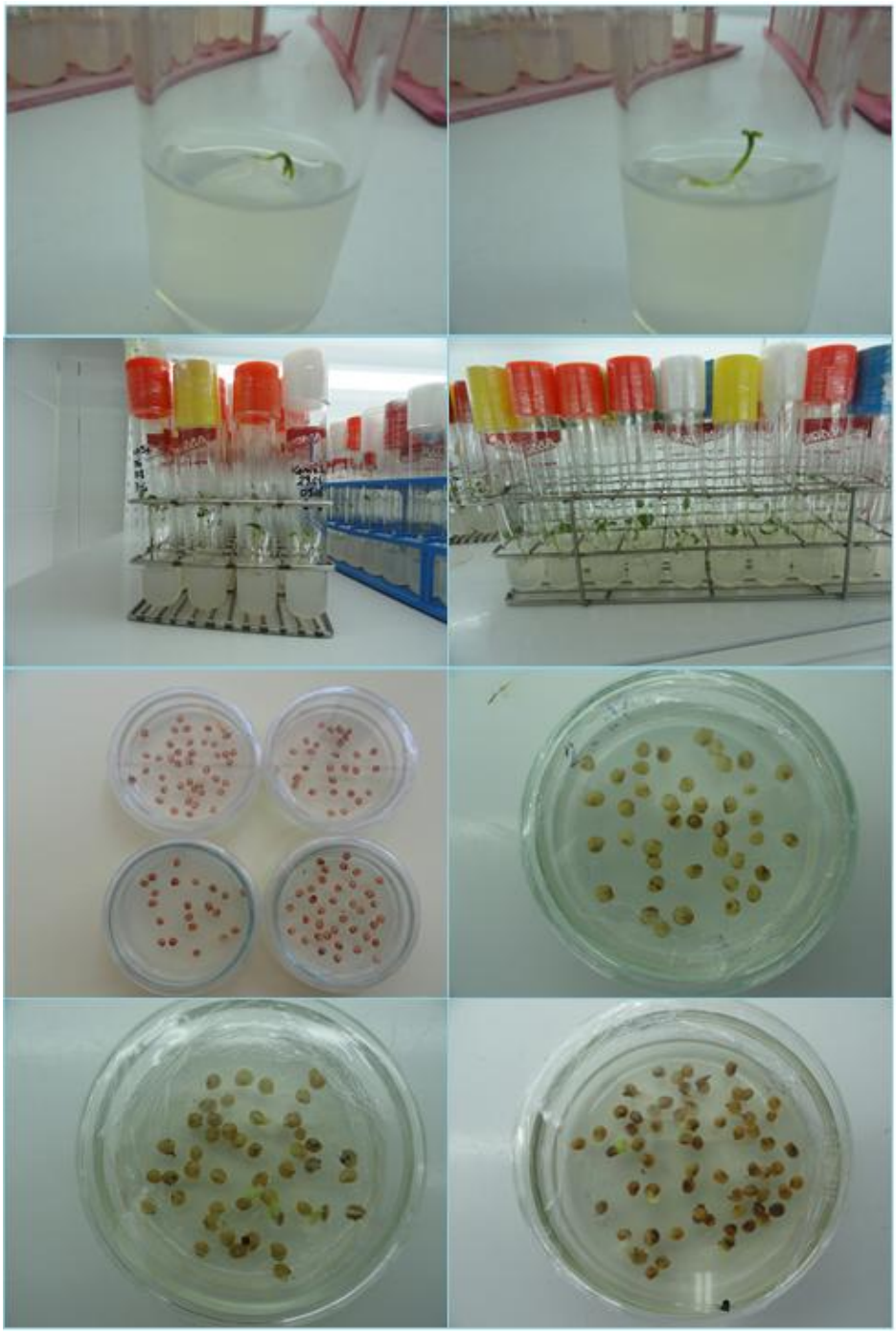
Şekil 3.3**.** Aydın Siyahı ve Kemer patlıcan çeşitlerinin ***Solanum torvum*** ile melezlenmesinden elde edilen meyvelerin farklı hasat tarihlerindeki görünümleri (25., 30. ve 35. gün)



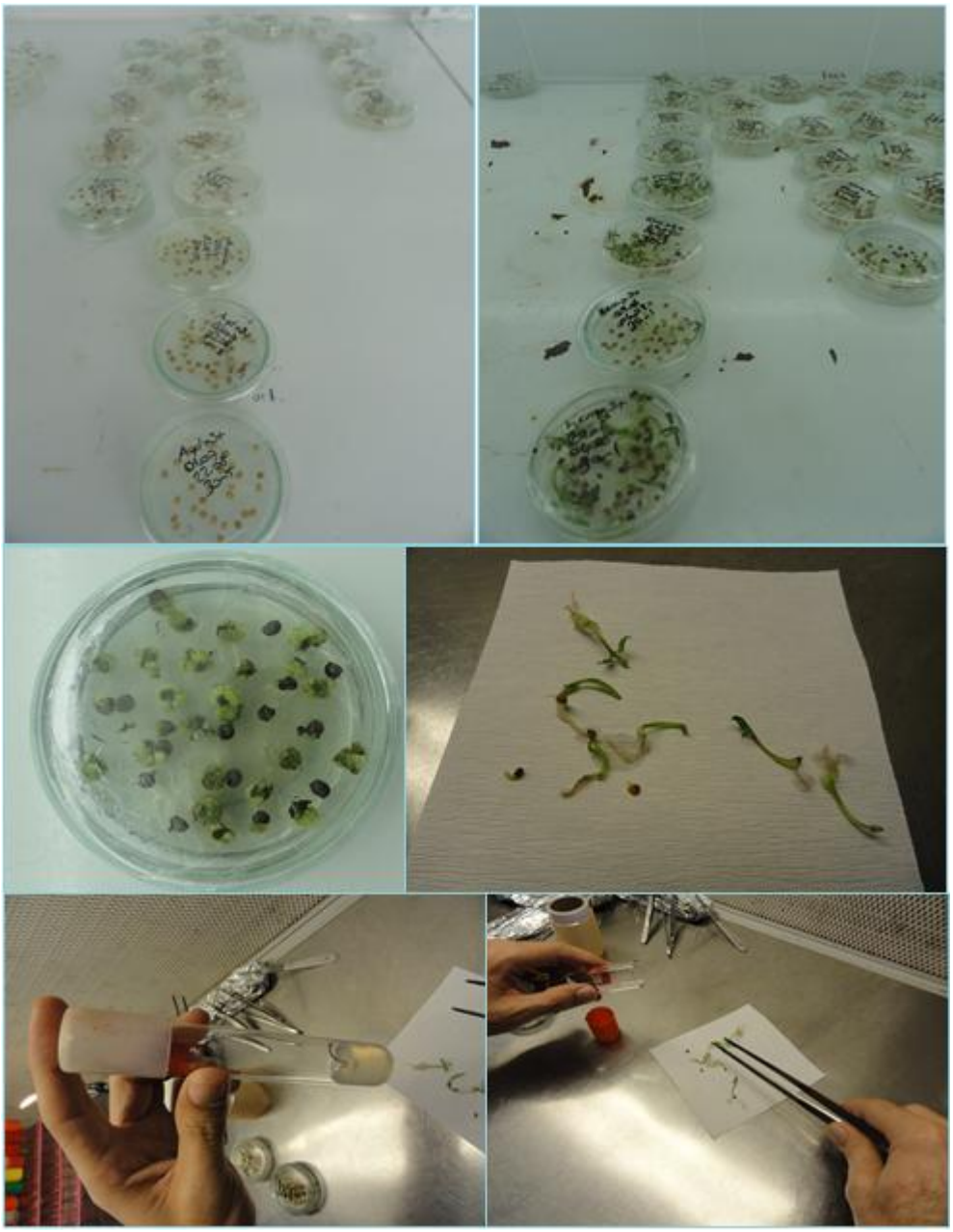
Şekil 3.4. Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında yapılan melezlemelerden elde edilen tohumlarda Tek Tek Açma ve Doğrudan Ekim yöntemleriyle embriyo kurtarma ve melez bitkilerin eldesi



Şekil 3.4. devamı



Şekil 3.4. devamı



Şekil 3.4. devamı

3.2.1.3. Çiçek tozu çim borusu büyümesinin incelenmesi

Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemeler yapılmıştır. Ancak *Solanum torvum*'un ana ebeveyn olarak kullanıldığı melezlemelerden meyve elde edilememiştir. Tozlamadan sonra döllenmenin olmamasının ya da çok düşük olmasının nedenini anlamak amacıyla çiçek tozu çim borusu büyümesi incelenmiştir. Bunun için, tozlamadan sonra 72 saat boyunca her 6 saatte bir her bir melez kombinasyondan 4'er adet çiçek örnekleri alınarak tespit çözeltisi (FPA-70) içersine konulmuş ve mikroskop incelemelerine kadar bozulmadan muhafaza edilmiştir.

Çiçek tozu çim borusu büyümesinin mikroskobik olarak incelenmesi Geraci ve ark. (1978)'nın belirttiği şekilde ezme preparat yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ezme preparat yapmak için önce tespit çözeltisi içerisinde bulunan örnekler, yıkama setine bağlanarak bir gece boyunca (yaklaşık 12 saat) çeşme suyu altında yıkanmış, daha sonra yıkama setinden alınan örnekler 8 N NaOH çözeltisi içersinde konularak 6-8 saat süreyle dokuların yumuşaması sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda örnekler NaOH'den arındırılmak amacıyla yine bir gece boyunca yıkama setine bağlanarak çeşme suyu altında yıkanmıştır (Şekil 3.5). Yıkama işleminin bitmesinin ardından örnekler anilin mavisi boya çözeltisine aktarılmıştır. Örnekler floresans mikroskopta incelemeye hazır hale gelmesi için en az 24 saat anilin mavisi boya çözeltisi içersinde bekletilmiştir.

Anilin mavisi boya çözeltisi hazırlamak için 1 g anilin mavisi ile 11.28 g tripotasyum fosfat, 250 ml saf su içersinde çözünerek anilin mavisi stok çözeltisi hazırlanmış ve fungal enfeksiyonları engellemek için içerisine yaklaşık 1 g thymol kristali eklenmiştir. Hazırlanan bu stok çözelti, bir gün süreyle buzdolabında bekletilmiştir. Kullanılacağı zaman stok çözeltiden bir birim alınarak 3 birim saf su ile seyreltilmiştir.



Şekil 3.5**.** Tespit çözeltisi içerisinde bulunan örneklerin yıkama setine bağlanması

İnceleme yapılacak örneklerde dişicik borusu, yumurtalıkla birleştiği yerden kesilerek bir lam üzerine konulmuş ve uzunlamasına ortadan ikiye kesilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örneklerin üzerine bir damla anilin mavisi boya çözeltisi damlatılmış ve lamelle kapatılarak yumuşak bir lastik silgiyle üstten bastırılarak ezilmeleri sağlanmıştır. Hazırlanan örneklerde çiçek tozu çim boruları floresans mikroskopta incelenmiş ve ölçümleri oküler mikrometre ile gerçekleştirilmiştir. Değişik zaman aralıklarıyla alınan örneklerde çiçek tozu çim borularının kaç günde tohum taslaklarına ulaşarak döllenmeyi gerçekleştirdikleri belirlenmiştir

3.2.1.4. Çiçek tozu canlılık ve çimlenme oranlarının belirlenmesi

Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ve *Solanum torvum'*da çiçek tozu canlılığı için her bir parseli oluşturan bitkilerden karışık olarak toplanan çiçeklerden elde edilen çiçek tozları kullanılmıştır. Çiçek tozlarının canlılıkları TTC testi ile incelenmiştir (Şekil 3.9). Bunun için 0.1 g TTC (Triphenyl Tetrazolium Chlorid) 10 ml saf suda çözdürülüp 6 g sakkaroz eklenerek % 1'lik TTC çözeltisi hazırlanmıştır (Güler ve ark., 1993; Boyacı ve ark., 2009). Hazırlanan bu çözelti lam üzerine damlalık ile damlatılarak çiçek tozları bir sulu boya fırçasıyla bu damlaların üzerine ekilmiş ve lamelle kapatılmıştır. Çiçek tozu canlılıklarının belirlenmesi ekimden 20 saat sonra yapılmış, koyu kırmızı ve kırmızı boyanan

çiçek tozları canlı, açık kırmızı ve pembe boyananlar ile hiç boyanmayanlar cansız olarak kabul edilmiştir (Güler ve ark., 1993). Çiçek tozu canlılık testinde her genotipten 2 lamel hazırlanmış, tesadüfi seçilen 5 alanda sayım yapılıp çiçek tozu canlılık yüzdeleri tespit edilmiştir.

Çiçek tozu çimlenme yeteneğinin belirlenmesi için yine çiçek tozu canlılık testinde olduğu gibi her parselden karışık olarak toplanan çiçeklerden elde edilen çiçek tozları 'petride agar' yöntemiyle incelenmiştir. Güler ve ark. (1993)'nın yapmış olduğu çalışmalarda patlıcan polenlerinin çimlenmesi için tespit ettikleri en uygun ortam olan % 1 agar +% 12 şeker + 300 ppm H_3BO_3 +300 ppm $Ca(NO_3)_2$ kullanılmış, bu ortamlar üzerine ekilen polenler 25 ^{0}C'de 20 saat bekletildikten sonra ışık mikroskobunda sayımları yapılmıştır. Çiçek tozu çimlendirme testinde her genotip için 3 petri kutusu hazırlanmış, tesadüfi seçilen 5 alanda sayım yapılıp çiçek tozu çimlenme yüzdeleri belirlenmiştir.

3.2.1.5. *Solanum torvum* fidelerinin elde edilmesi

Gerek melezlemeler, gerekse protoplast füzyonunda kullanmak üzere *Solanum torvum* tohumlarından elde edilen fideler serada geliştirilerek uygun aşamaya geldiğinde Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Uygulama Arazisine sıra arası 1 m sıra üzeri 80 cm mesafelerde dikilmişlerdir (Şekil 3.6).

3.2.1.6. *İn vitro* kültürden elde edilen melez bitkilerin dış ortama alıştırılması

Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemeler yapılmış, sadece ana ebeveynin Kemer ve Aydın Siyahı olması halinde meyve ve tohum elde edilebilmiştir. Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında yapılan melezlemelerden elde edilen meyveler tozlamadan 25., 30. ve 35. günlerde hasat edilmiş olup tohumlarından embriyolar izole edilerek kültüre alınmıştır.



Şekil 3.6. *Solanum torvum*'un tohumlarından fide elde edilmesi ve araziye şaşırtılması

Embriyo kurtarma tekniği ile doku kültüründe elde edilen bitkiler 1:1 perlit ve torf karışımı olan viyollere dikilmiştir. Dikimden sonra sisleme ünitesi içeren polietilen plastikle örtülü tavalar içeren seraya alınmış ve kademeli olarak nemlendirme azaltılırken havalandırma artırılmış ve 2 hafta sonra normal bir serada gübreleme ve sulamaları yapılarak gelişmeleri sağlanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7**.** Doku kültüründen elde edilen melez bitkilerin dış ortama alıştırılması

3.2.1.7. Melez bireylerin fertilite durumlarının araştırılması

Elde edilen melez bireylerin (Kemer x *Solanum torvum* ve Aydın Siyahı x *Solanum torvum*) (Şekil 3.8) morfolojik gözlemleri alınmıştır. Bu melez bireylerde hem kendileme hem de geriye melezlemeler [(Kemer x *Solanum torvum)* x Kemer ve (Aydın Siyahı x *Solanum torvum)* x Aydın Siyahı] yapılmıştır. Melez bitkilerin çiçek yapısı ve rengi, yaprak yapısı ve bitki gelişimi *Solanum torvum* ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.8**.** Melez bireylerin arazideki görünümü

3.2.1.8. Embriyogenik kallus eldesi için uygun ortam denemeleri

Embriyogenik kallus eldesi için iki farklı eksplant kaynağı denenmiştir. Bu amaçla Aydın Siyahı, Kemer ve *Solanum torvum'*un genç meyvelerindeki döllenmiş yumurta hücreleri ve genç taze yaprakları kullanılmıştır.

Araziden getirilen genç meyvelerin (Şekil 3.9) önce çanak yapraklar uzaklaştırılmış sonra musluk suyunda yıkanmış ve steril kabin içersinde % 70 lik etil alkolde 5 dakika sonra % 1 aktif sodyum hipoklorit içersinde 15 dakika bekletilerek 3 defa steril saf su ile çalkalanmıştır (Şekil 3.10). Aydın Siyahı, Kemer ve *Solanum torvum*'un döllenmiş yumurta hücreleri 1 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l BAP, 1 mg/l 2,4 D + 1 mg/l BAP, 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4 D içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Ayrıca *Solanum torvum* için 3 mg/l BAP içeren MS ortamı da denenmiştir. Her uygulamadan 5 tekerrür, her tekerrürde 5 petri olacak şekilde petriler 25 ^{0}C'de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullara alınmıştır.

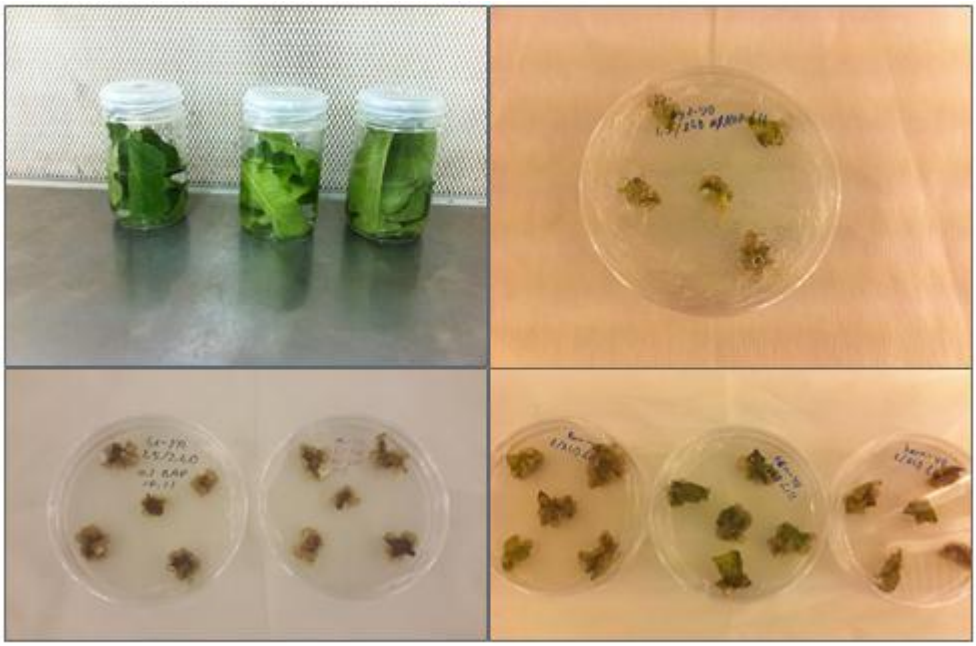


Şekil 3.9**.** Kallus eldesinde kullanılan genç meyveler



Şekil 3.10. Genç meyvelerin sterilizasyonu

Solanum torvum, Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin genç taze yaprakları steril kabin içerisinde % 1 aktif sodyum hipoklorit içersinde 15 dakika bekletilerek 3 defa steril saf su ile çalkalanmıştır. Steril edilen yaprakların yaprak damar arası (YDA) ve yaprak damar üzerlerinden (YDÜ) 0.5 cm^2 büyüklüğünde eksplantlar 1.5 mg/l 2,4 D + 0.1 mg/l BAP ve 2 mg/l 2,4 D içeren MS ortamlarına, her uygulamadan en az 25'er petri olacak şekilde, 25 ^{0}C'de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullara alınmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11**.** *Solanum torvum*, Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin yapraklarından kallus eldesi

3.2.1.9. Patlıcanda anter kültürü protokolünün araştırılması

Anter kültürü çalışmalarında 2012 yılı bahar yarıyılında Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'ye göre C ve R ortamları kullanılmıştır. Ortamlar ve içerikleri Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1**.** Patlıcanda anter kültüründe kullanılan C, R ve V3 ortamları (mg/)

	C ortamı	**R ortamı**	**V3 ortamı**
Makroelementler			
KNO_3	2150	2150	1900
NH_4NO_3	1238	1238	1650
$MgSO_4$-$7H_2O$	412	412	370
$CaCl_2$-$2H_2O$	313	313	440
KH_2PO_4	142	142	170
$Ca(NO_3)_2$-$4H_2O$	50	50	-
NaH_2PO_4-H_2O	38	38	-
$(NH_4)_2SO_4$	34	34	-
KCl	7	7	-
Mikroelementler			
$MnSO_4$-H_2O	22.130	20.130	0.076
$ZnSO_4$-$7H_2O$	3.625	3.225	1.000
H_3BO_3	3.150	1.550	1.000
KI	0.695	0.330	0.010
Na_2MoO_4-$2H_2O$	0.188	0.138	-
$CuSO_4$-$5H_2O$	0.016	0.011	0.030
$CoCl_2$-$6H_2O$	0.016	0.011	-
$AlCl_3$-$6H_2O$	-	-	0.050
$NiCl_2$-$6H_2O$	-	-	0.050
Vitamin ve aminoasitler			
Myo-inositol	100.00	100.00	100.00
Pyrodoxin HCl	5.500	5.500	5.500
Nicotinic acid	0.700	0.700	0.700
Thyamine HCl	0.600	0.600	0.600
Calcium panthotenate	0.500	0.500	0.500
Vitamin B_{12}	0.030	-	-
Biotin	0.005	0.005	0.005
Glycin	0.100	0.100	0.200
Şelatlı Demir			
Na_2-EDTA	18.65	18.65	37.30
$FeSO_4$-$7H_2O$	13.90	13.90	27.80

Çizelge 3.2. Anter kültüründe kullanılan C, R ve V3 ortamlarının içerikleri

	İçerikleri
Ortamlar	**C** ortamı + 5mg/l 2.4-D +5 mg/l Kinetin + 100 g/l sakaroz+ 8 g/l agar
	R ortamı + 0.01 g/l Kinetin + 30 g/l sakaroz + 8 g/l agar
	V3 ortamı + 30 g/l sakaroz + 8 g/l agar

Solanum torvum (acı sarı-sarı arası yani petalin 5-6 mm göründüğü dönem) ve *Solanum melongena*'nın (acı sarı-sarı arası yani petalin 2 mm göründüğü dönem) anterleri tek çekirdekli mikrosporun son aşamasında alınarak steril edilmiştir (Şekil 3.12). Alınan tomurcuklar steril kabin içersinde % 70'lik etil alkolde 5 dakika bekletilmiş daha sonra % 1'lik aktif sodyum hipoklorit içersinde 15 dakika bekletilerek 3 defa steril saf su ile çalkalanmıştır. Steril edilen anterler (Dumas de Vaulx ve ark., 1982) Çizelge 3.1'de içeriği verilen C ortamına konup inkübatörde karanlıkta 35 ^{0}C'de 8 gün bekletilmiştir. Daha sonra petriler 25 ^{0}C'de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullara alınmıştır. Anterler 13. gün sonra C ortamından R ortamına aktarılmıştır. R ortamında kalluslar oluşmuş ancak embriyolar oluşmadığı için V3 ortamına aktarılamamıştır.



Şekil 3.12. *Solanum torvum* ve *Solanum melongena*'da anter kültürü için uygun tomurcuk seçimi

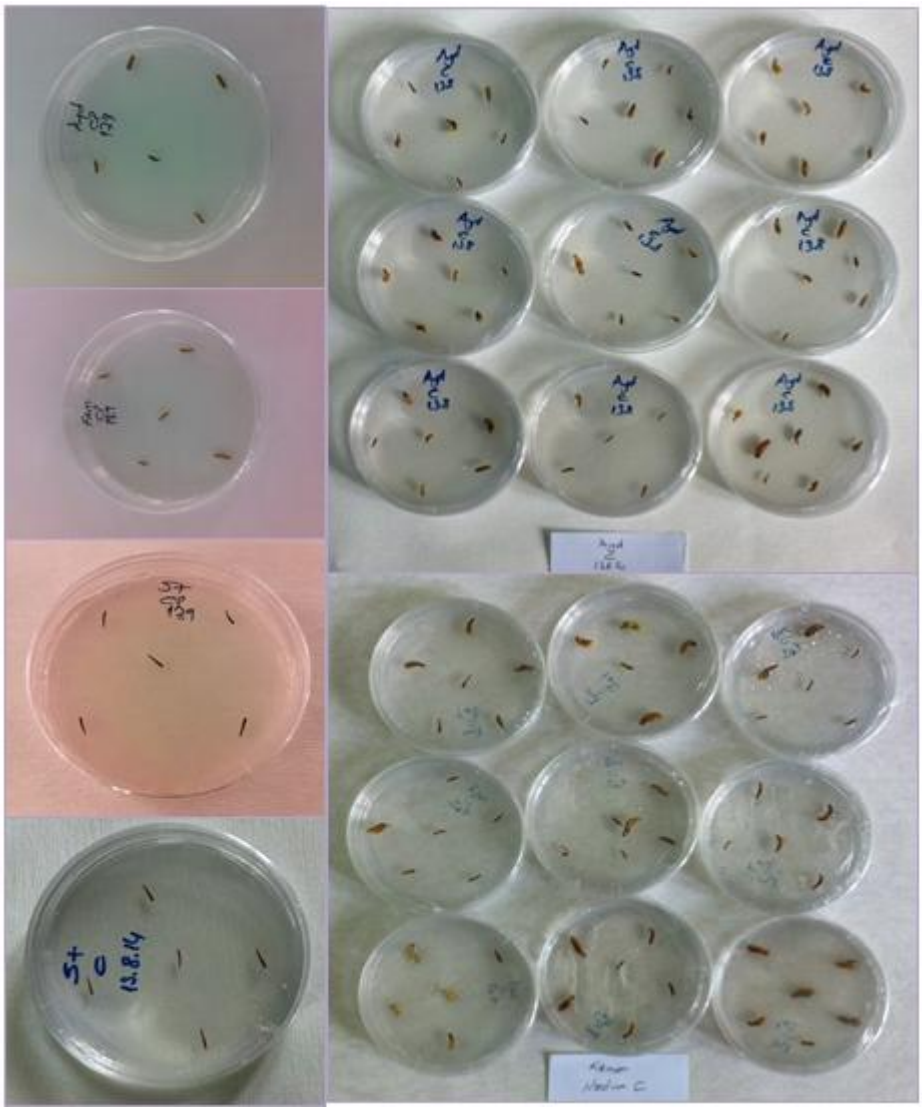
Patlıcan anter kültürü çalışmalarının 2014 yılında bahar ve güz vegetasyon döneminde Dumas de Vaulx ve ark. 1982 (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2) ve CP (Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4) regenerasyon ortamları denenmiştir. Her çiçek tomurcuğundan çıkan anterler CP ve C ortamlarına yerleştirilmiştir (Şekil 3.13). C ortamında anterler inkübatörde karanlıkta 35 ^{0}C'de 8 gün bekletilmiştir. Daha sonra petriler 25 ^{0}C'de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullara alınmıştır. Anterler 13. gün sonra C ortamından R ortamına aktarılmıştır. R ortamında embriyolar oluşmaya başlayınca V3 ortamına aktarılmıştır (Çizelge 3.1). V3 ortamında bitkiler oluştuktan sonra tüplere oradan da dış ortama aktarılmıştır. CP ve R ortamlarında Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerine ait 15'er petri alüminyum folyo ile sarılarak karanlıkta kallus gelişimi incelenmiştir.

Çizelge 3.3**.** Patlıcanda anter kültüründe kullanılan CLC/Ipomoea CP ortamı

Makroelement	mg/l
$CaCl_2$	332.2000
KCl	2235.0000
KH_2PO_4	170.0000
KNO_3	2022.0000
$MgSO_4$	180.7000
NH_4NO_3	1601.0000
Mikroelement	
$CoCl_2$. $6H_2O$	0.0300
$CuSO_4$ $5H_2O$	0.0300
EDTA, Disodium, Dihydrate ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$ $2H_2O$)	37.2600
$FeSO_4.7H_2O$	27.8000
H_3BO_3	6.2000
KI	0.8300
$MnSO_4$. H_2O	16.9000
Na_2MoO_4 .$2H_2O$	0.2500
$ZnSO_4$. $7H_2O$	8.6000
Vitamin	
Myo-Inositol	90.1000
Nicotinic Acid	1.2300
Pyridoxine, Hydrochloride	1.0300
Thiamine, Hydrochloride	1.6900

Çizelge 3.4**.** Anter kültüründe kullanılan CP ortamının içeriği

	İçerik
Ortamlar	**CP** + 3mg/l kinetin +3 mg/l 2.4-D +3 mg/l vitamin B12 + 1mg/l $CaNO_3$ + 1mg/l $AgNO_3$ + 1 mg/l Vitamin C + 1000 µl Fe- EDTA+ 120 g/l sakaroz+ 10 g/l agar

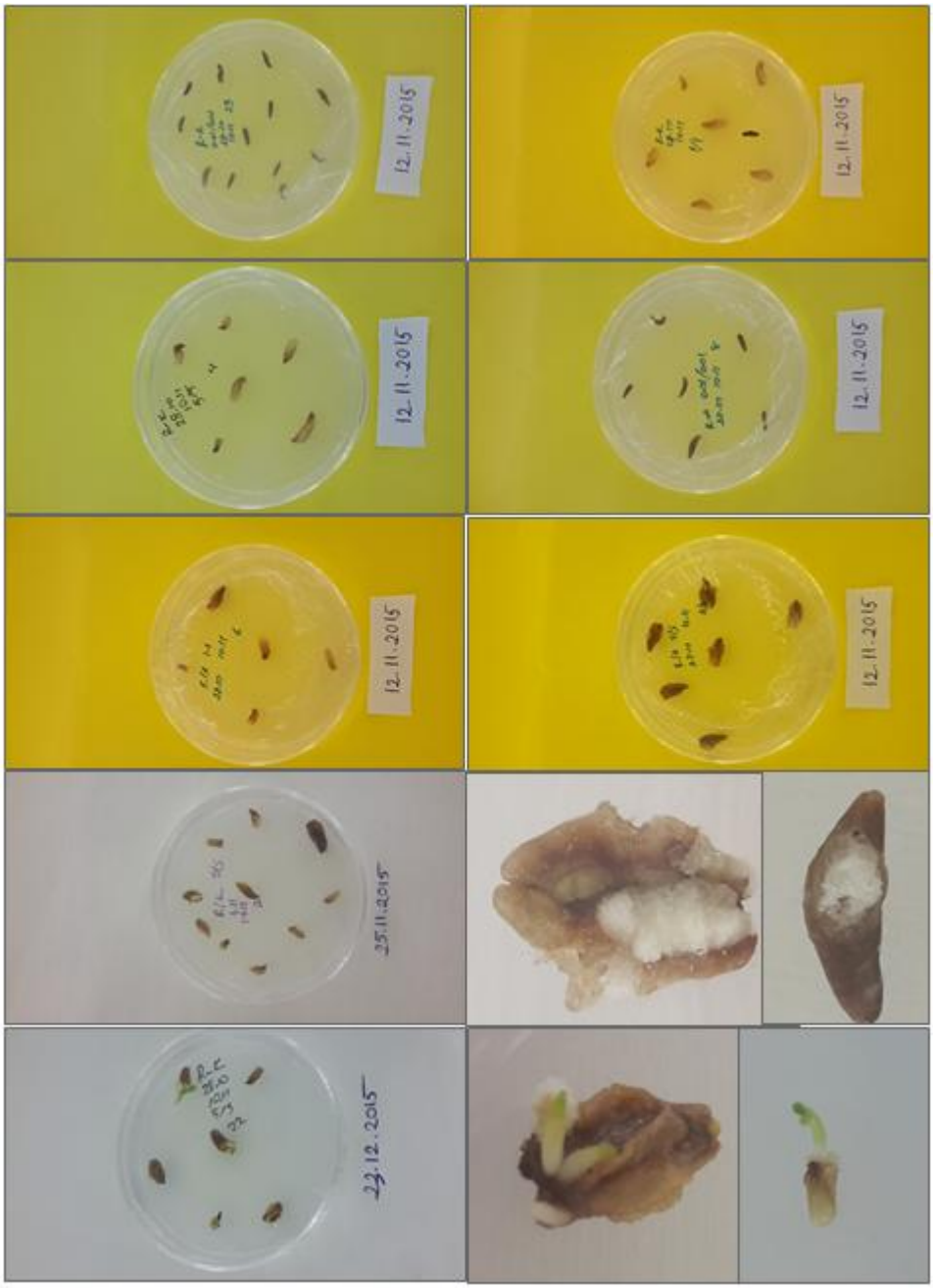


Şekil 3.13. CP ve C ortamlarında ortamlarında Kemer, Aydın Siyahı ve *Solanum torvum* anterlerinin gelişimi

2014 yılı anter kültürü çalışmalarında Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinden bitki elde edilmesine rağmen yeterli olmadığı için 2015 yılında Modifiye edilmiş Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'na göre tekrar denenmiştir. Patlıcan anter kültüründe CP ortamında hiçbir başarılı sonuç elde edilmediğinden tekrar denenmemiştir. Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'de bildirilen C ortamının 3 farklı 2,4 D Kinetin ve sakkaroz dozları denenmiştir (Çizelge 3.5). Çizelge 3.5'teki ortamlara yerleştirilen anterlerden bitki eldesine (Şekil 3.14) ve araziye dikilene kadar aşamaları gözlemlenmiştir (Şekil 3.15).

Çizelge 3.5. Anter kültüründe kullanılan C, R ve V3 ortamlarının içerikleri

	İçerikleri
Ortamlar	**C** ortamı + 5 mg/l 2.4-D +5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz+ 7 g/l agar + 1 mg/l 2.4-D +1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz+ 7 g/l agar + 0.01 mg/l 2.4-D + 0.01 mg/l Kinetin + 30 g/l sakaroz+ 7 g/l agar
	R ortamı + 0.01 g/l Kinetin + 30 g/l sakaroz + 7 g/l agar
	V3 ortamı + 30 g/l sakaroz + 7 g/l agar



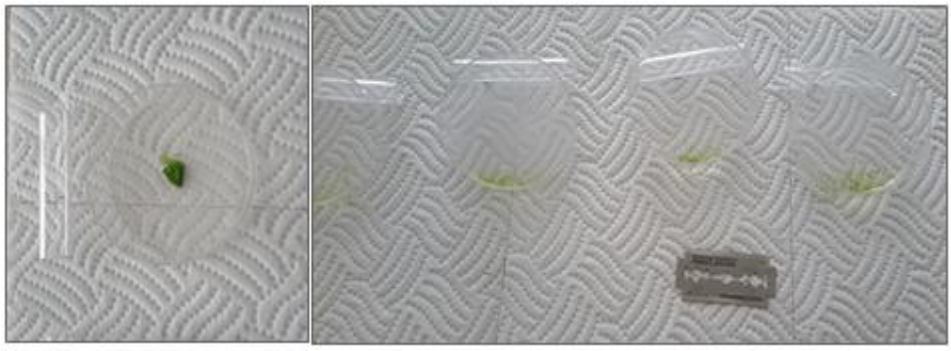
Şekil 3.14. Anterlerden bitki gelişimi



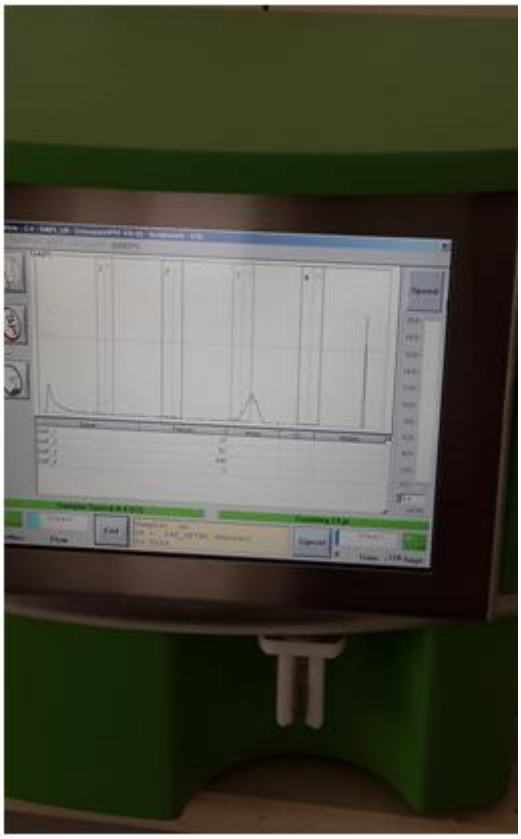
Şekil 3.15**.** Anterlerden oluşan bitkileri kavanozlara, dış ortama ve araziye aktarma

3.2.1.10. Flow sitometri yöntemiyle ploidi seviyesinin belirlenmesi

2015 yılı anter kültürü çalışmalarından elde edilen bitkilerden (konrol bitkisi dahil 80 bitki) yaprak örnekleri Tuna (2014)'e göre alınarak Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde bulunan flow sitometri cihazıyla (Partec CyFlow Space) ploidi düzeyleri incelenmiştir. Flow sitometri analizleri ilgili cihazın kit prosedürüne bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir. Anterlerden oluşan bitkilerin genç yapraklarından alınmış yaklaşık 15 µg doku kullanılmıştır. Bitki dokuları, hücre çekirdeklerinin ayıklanması amacıyla tek taraflı neşterler aracılığıyla içerisinde 0.5 ml doğrama tamponu (Partec HR-A) eklendikten sonra jilet yardımıyla iyice kıyılmıştır (Şekil 3.16). Kıyılmış örnekler 30 µm geçirgenliğindeki filtre yardımıyla süzülerek üzerine DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) içeren Partec HR-B solüsyonu eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kontrol uygulamasına ait Kemer patlıcan çeşidinin yapraklarının DAPI ile boyanmış çekirdeklerinin nüklear DNA içeriği 365 nm dalga boyunda UV led kaynaklı çekirdek floresanından geçirilerek ölçülmüştür. Her yaprak örneği için 1000- 3000 çekirdek analiz edilmiştir. Örneklerin ploidi seviyeleri referans çekirdek DNA miktarının verdiği ortalama ışıma yoğunluğu değeri ile kıyaslama yapılarak belirlenmiştir. Ploidi seviyesi triploid olan bitkinin yaprak hücresi çekirdek DNA içeriği ve ışıma yoğunluk noktası Şekil 3.17'de verilmiştir.



Şekil 3.16**.** Yaprak örneklerinin hazırlanışı



Şekil 3.17**.** Flow sitometri cihazında triploid bitkinin yaprağından elde edilen pik

3.2.2. *İn vitro* tozlama ve dölleme

Tür içi ve türler arası tozlanma ve döllenme problemlerine alternatif bir çözüm olan *in vitro* tozlanma ve döllenme yöntemi *Solanum melongena* ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemelerle denenmiştir.

3.2.2.1. Stigma tozlanması ve döllenmesi

Bu yöntemde bir gün sonra açacak aşamaya gelmiş olan tomurcuklar alınmış ve steril kabin içerisinde % 70'lik etil alkolde 5 dakika sonra % 1 aktif sodyum hipoklorit içersinde 15 dakika bekletilerek 3 defa steril saf su ile çalkalanmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu işleminden sonra tomurcuklar steril kabin

içerisinde açıldıktan sonra dişi organ alınarak besin ortamına yerleştirilerek olgun bir anterden alınan çiçek tozları stigma üzerine yerleştirilmiştir.

3.2.2.2. Plesanta döllenmesi

1-2 gün sonra açacak olan çiçek tomurcukları alınmış ve steril kabin içerisinde % 70'lik etil alkolde 5 dakika sonra % 1 aktif sodyum hipoklorit içersinde 15 dakika bekletilerek 3 defa steril saf su ile çalkalanmıştır. Daha sonra tomurcuklar steril kabin içerisinde, döllenmemiş yumurtaları kapsayan plasenta stero mikroskop altında izole edilerek besin ortamına yerleştirilmiştir. Açılmak üzere olan çiçek tomurcukları yine aynı yöntemle sterilize edilerek ve anterler açılarak içindeki polen daneleri yumurtalara yakın kısma yerleştirilmiştir.

Her iki yöntemde de MS besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamına oksin olarak NAA sitokinin olarak BAP eklenmiştir. Oksin/sitokinin dengesi 1/1, 1/2, 2/1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her melez kombinasyondan petride 5 dişi organ/plesenta olacak şekilde 4 tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır.

Stigma tozlama ve döllemesinde kesim yüzeyinden meydana gelen salgıları engellemek için ayrıca MS ortamına 0.5 mg/l aktif karbon eklenerek de deneme kurulmuştur.

İn vitro tozlama çalışmasında kallus gelişimi, yumurtalık irileşmesi belirlenmiştir.

3.2.3. Patlıcanda protoplast füzyonu protokolü oluşturulması

Yöntem şu aşamalardan oluşmaktadır:

1. Hücre duvarının enzimlerle parçalanarak protoplastların elde edilmesi
2. İki farklı türe ait protoplastların füzyonunun sağlanması
3. Somatik melezlerin selekte edilmesi ve melez protoplastların kültüre alınması
4. Melez bitkilerin rejenerasyonu

3.2.3.1. Embriyogenik kalluslar ve yaprak mezofil protoplastlarının izolasyonu

İn vitro ortamda elde edilen ebriyogenik kalluslar ile *Solanum melongena*'nın genç yaprakları protoplast kaynağı olarak kullanılmıştır. Protoplast izolasyonuna başlamadan önce protoplast füzyonunda kullanılan PEG yönteminde kullanıcak çözeltiler hazırlanmıştır (Şekil 3.18). Hazırlanan çözeltiler ve enzim solüsyonları kullanılacağı zamana kadar -18 ^{0}C'de saklanmıştır. Çalışmaya başlamadan birkaç saat öncesi dondurulmuş çözeltiler çözdürülmüştür. Özellikle enzim solüsyonu çözdürülmesinde enzimlerin parçalanmaması için falkon tüpler hafifçe hareket ettirilmiştir.

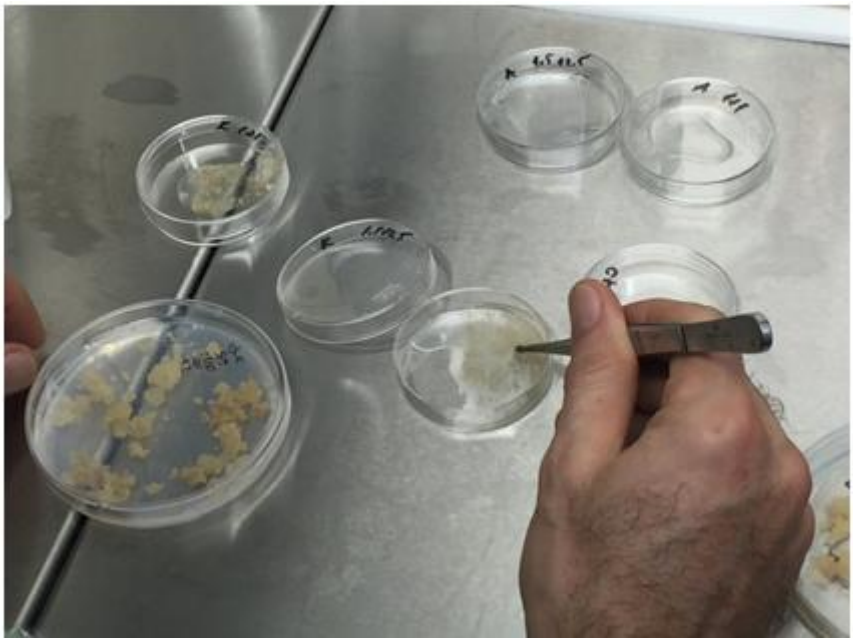
Seradaki bitkilerden alınan Aydın Siyahı ve Kemer çeşidine ait yaprak materyali laboratuvara getirilerek yüzey sterilizasyonu için %70 oranındaki etil alkol içerisinde 2 dk, sonrasında 1-2 damla tween 20 içeren % 10'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk bekletilmiş ve 4-5 kez steril saf su ile durulanarak yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Sterilizasyon işlemi tamamlanan yapraklar pens yardımıyla steril petri kutularına aktarılarak bistüri yardımıyla ince şeritler halinde kesilmiştir. Her genotipe ait yaprak örnekleri üzerine 2,5 ml 0.6 M BH3 protoplast kültür ortamı (Grosser ve Gmitter, 2011) eklenmiştir (Çizelge 3.7). BH3 ortamı eklendikten sonra enzimatik sindirmenin gerçekleşmesi için besin ortamı içerisinde bulunan kıyılmış yaprak parçaları üzerine hücre duvarını parçalayacak olan filtre sterilizasyonu yapılmış enzim solüsyonundan (0.7 M mannitol, 18.0 mM $CaCl_2$, 6.0 mM MES tamponu, 1.4 mM NaH_2PO_4, %1 Onozuka RS cellulase, %1 Macerase, %0.2 Pectolase Y-23, pH 5.6) 2,5 ml eklenmiştir.



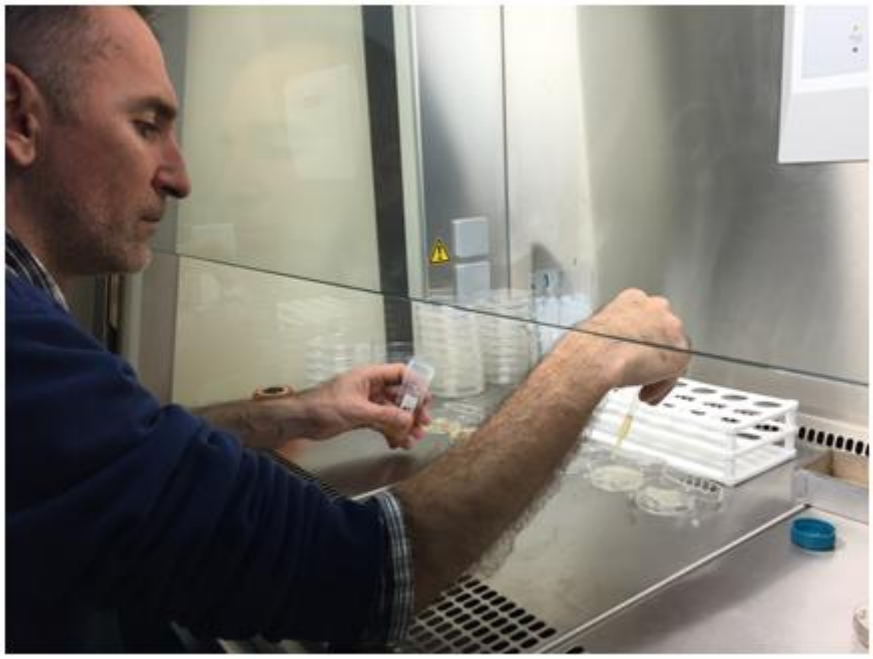
Şekil 3.18**.** Steril kabin içerisinde filtre sterilizasyonu ile hazırlanan PEG çözeltisi

Genotiplere ait embriyogenik kalluslardan yaklaşık 400 mg kolay dağılır (dağılgan) (Şekil 3.19) yapıda olan hücreler seçilerek 60 x15 mm'lik petri kaplarına aktarılmıştır. Kallus hücreleri üzerine 4 ml 0.7 M BH3 protoplast kültür ortamı (Çizelge 3.7) eklenerek kalluslar ortam içerisinde pastör pipet ile hücrelere zarar vermeyecek şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra besin ortamı içerisinde bulunan hücrelerin üzerine 1.5 ml hücre duvarını parçalayacak olan filtre sterilizasyonu yapılmış enzim solüsyonu (0.7 M mannitol, 18.0 mM $CaCl_2$, 6.0 mM MES tamponu, 1.4 mM NaH_2PO_4, %1 Onozuka RS cellulase, %1 Macerase, %0.2 Pectolase Y-23, pH 5.6) eklenmiştir (Şekil 3.20).

Enzim ve protoplast kültürü solüsyonu içerisinde yaprak ve kallus örneklerini içeren petri kapları, hücre duvarının parçalanması için inkübatörlü yatay hareketli çalkalayıcıya aktarılmıştır. Petri kapları 15-16 saat boyunca 26^oC'de 40 rpm'de çalkalanmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.19**.** Embriyogenik kallusların BH3 çözeltisinde dağılması



Şekil 3.20**.** Kalluslara enzim çözeltisi eklenmesi



Şekil 3.21. Kallus ve yaprakları inkübatörlü yatay hareketli çalkalayıcıda BH3+ enzim solüsyonunda bekletme

3.2.3.2. Protoplastların saflaştırılması ve sayımı

Petri kapları içerisinde ve 'BH3 + enzim solüsyonu'nda bekletilen protoplast hücreleri ile birlikte yaprak parçaları da bulunduğu için protoplastları diğer yaprak dokularından ayırmak amacıyla protoplast saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işleminde filtrasyon ve santrifüj yöntemleri kullanılmıştır. Petri kapları içerisindeki enzimatik sindirme solüsyonu 40 µmesh'lik BD Falcon Cell Strainer (REF352340) filtreden geçirilerek pastör pipet yardımı ile 15 ml'lik steril falcon tüplerine aktarılmış ve 100 g devirde 4 dakika santrifüj edilerek hücrelerin tüpe pellet şeklinde çökmesi sağlanmıştır (Şekil 3.22). Daha sonra pellet üzerine yavaş bir şekilde 5ml % 25 sakkaroz içeren CPW besin çözeltisi (27.2 mg/l KH_2PO_4, 100 mg/l KNO_3, 150 mg/l $CaCl_2$, 250 mg/l $MgSO_4$, 2.5 mg/l $Fe2(SO_4)_3.6H_2O$, 0.16 mg/l KI, 0.00025 $CuSO_4$, pH 5.8) eklenerek pellet çözdürülmüştür. Daha sonra 2 ml % 13 mannitol içeren CPW besin çözeltisi pastör

pipet yardımıyla sakkaroz çözeltisi üzerine eklenmiştir (Banks ve Evans, 1976). Böylece falcon tüpünde yoğunluk farkından dolayı iki faz oluşturulmuş ve 10 dakika 100 g de santrifüjlenerek protoplast hücrelerinin oluşan iki faz arasına toplanması sağlanmıştır. Protoplastlar pastör pipet yardımıyla iki faz arasından alınarak falcon tüplerine aktarılmış ve üzerine 15 ml protoplast yıkama solüsyonu (0.8 M Mannitol, 0.5 mM $CaCl_2$) eklenerek 4 dakika 100 g'de santrifüjlenmıştır. Santrifuj sonrası protoplastlar pellet halinde dibe çöktürülüp yıkama solüsyonu falcon tüpünden pastör pipet aracılığı ile uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi iki defa gerçekleştirilmiştir. Son yıkama işlemi sonrasında kalluslarda çökeltiye kadar, yaprakta ise yeşilin yoğun olduğu yere kadar solüsyon çözeltisi atılmış ve kallusta 4 ml, yaprakta ise 1 ml protoplast yıkama solüsyonu eklenerek pellet sayım için çözündürülmüştür. Protoplast sayımında kullanılan lam üzerinde hacmi belli olan kutucuklar yer almaktadır. Bu lam üzerine 1 ml protoplast çözeltisinden bir damla damlatılarak sayım preparatı oluşturulmuş ve mikroskop altında yıkama sonrası protoplast varlığı belirlenmiştir (Dambier ve ark., 2011).

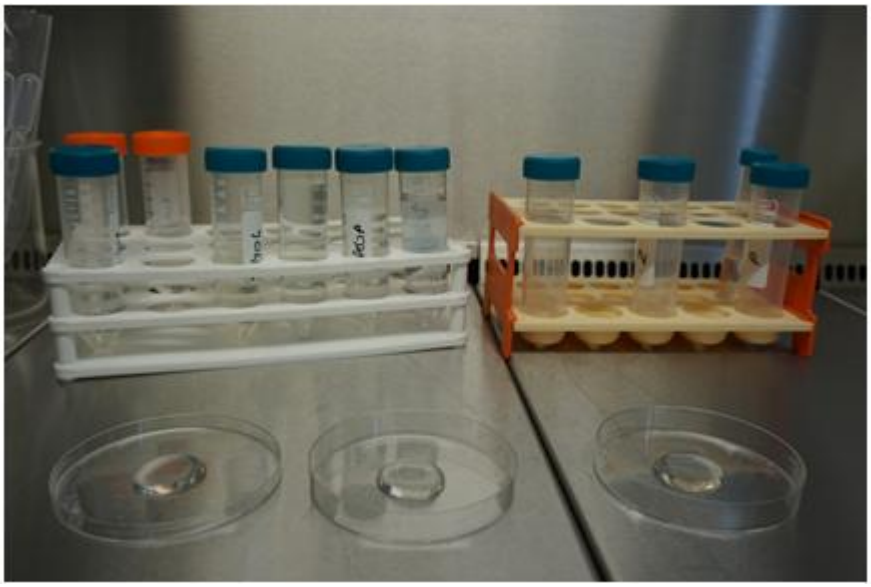


Şekil 3.22**.** Protoplasların santrifüj ile saflaştırılması

3.2.3.3. PEG (polietilen glikol) yöntemiyle protoplastların füzyonu

PEG yöntemiyle protoplast füzyonuna başlamadan önce EMEP (Çizelge 3.7.) katı ortam içeren petrileri hazırlamak gerekmektedir.

PEG (polietilen glikol) yöntemiyle protoplast füzyonu için aşağıdaki protokol, basit, verimli, ucuz ve bitki protoplastlarına toksik olmayan bir protokoldür (Grosser ve Gmitter, 2011). Elektrofüzyon yöntemi de oldukça başarılıdır (Guo ve Deng 1998). BH3 ortamında (Çizelge 3.6) her ebeveyn kaynağından yaklaşık olarak eşit hacimlerde saflaştırılmış protoplastlar karıştırılmıştır (Jarl ve ark., 1999) ve 100 g'da 4 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Yeniden süspanse edilen karışımın iki damlası 60 9 15 mm plastik petriye pipetle alınmış ve her füzyon petri kabına 2 damla taze PEG solüsyonu (% 40 polietilen glikol 8000, 0.3 M glikoz ve pH = 6'da 66 mM CaCl2) ilave edilerek 8 dakika inkübe edilmiştir (Şekil 3.31.). Depolanmış PEG çözeltisi kullanıldıysa, pH yeniden ayarlanmıştır. Daha sonra kullanımdan hemen önce karıştırılan 2 damla PEG plus (A + B) çözeltisi (9: 1 v: v, pH = 6'da A = 0.4 M glikoz, 66 mM $CaCl_2$ ve % 10 dimetil sülfoksit; pH = 10.5'de KOH kullanılarak B = 0.3 M glisin) ilave edilmiştir. 12 dakika daha inkübasyonun ardından (Şekil 3.23), protoplastlarının çevresine 12-15 damla BH3 ortam eklenmiş ve 5 dakika inkübasyondan sonra PEG plus [A + B] solüsyonunu bir pastör pipetle dikkatlice çekilmiş ve 15 damla BH3 ortamı ile eklenmiştir. 10 dakika daha inkübe ettikten sonra, bir pastör pipetle BH3 ortamı çıkarılmış ve 12-15 damla taze BH3 ortamı ile eklenmiştir. Bu yıkama adımı iki kez daha tekrarlanmıştır. Yıkama işlemi yaparken protoplastların çekilmemesine özen gösterilmiştir. Son yıkamadan sonra, füzyonu izlemek için mikroskop altında incelenmiş ve daha sonra protoplastlar EMEP katı ortamı üzerine 8-12 damla ortam eklenen petri kaplarında karanlık koşullarda kültüre alınmıştır.



Şekil 3.23**.** PEG solüsyonu eklenmiş protoplast karışımı

Çizelge 3.6**.** Protoplast kültür ortamı (Grosser ve Gmitter, 2011).

Bileşen	Konsantrasyon (mg/l)			
	0.6 M BH_3	0.7 M BH_3	EMEP	EME
NH_4NO_3	-	-	1,650	1,650
KNO_3	-	-	1,900	1,900
KH_2PO_4	170	170	170	170
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	370	370	370
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	440	440	440
Na_2 EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.8	27.8	27.8	27.8
$MnSO_4 \cdot H_2O$	22.3	22.3	22.3	22.3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6	8.6	8.6	8.6
H_3BO_3	6.2	6.2	6.2	6.2
KCl	1500	1500	-	-
KI	0.83	0.83	0.83	0.83
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	0.25	0.25	0.25
Glutamine	3100	3100	-	-
Thiamine·HCl	10	10	10	10
Pyridoxine·HCl	10	10	10	10
Myo-inositol	100	100	100	100
Malt extract	500	500	500	500
Casein hydrolysate	250	250	-	

Çizelge 3.6. Devamı

Nicotinic acid	1	1	1	1
Mannitol	81.900	81.900	-	-
Sucrose	51.350	85.560	205,400	50,000
Coconut H_2O	20 ml	20 ml	-	-
Fructose	250	250	250	-
Ribose	250	250	250	-
Xylose	250	250	250	-
Mannose	250	250	250	-
Rhamnose	250	250	250	-
Cellobiose	250	250	250	-
Galactose	250	250	250	-
Glucose	250	250	250	-
Sodium pyruvate	20	20	20	-
Citric acid	40	40	40	-
Malic acid	40	40	40	-
Fumaric acid	40	40	40	-
Vitamin B_{12}	0.02	0.02	0.02	-
Calcium pantothenate	1	1	1	-
Ascorbic acid	2	2	2	-
Choline chloride	1	1	1	-
p-aminobenzoic acid	0.02	0.02	0.02	-
Folic acid	0.4	0.4	0.4	-
Riboflavin	0.2	0.2	0.2	-
Biotin	0.01	0.01	0.01	-
Vitamin A (retinol)	0.01	0.01	0.01	-
Vitamin D_3 (cholecalciferol)	0.01	0.01	0.01	-
Agar	-	-	-	8,000

3.2.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Türler arası melezlemelerden elde edilen tohumlarda yapılan Embriyo kurtarmada gelişmeyen embriyo, anormal bitki ve sağlıklı bitki sayıları alınarak % bitkiye dönüşüm değerleri hesaplanmıştır. Doğrudan ekimde ise petrideki tohum sayısı ve çimlenen tohum sayısı alınarak % bitkiye dönüşüm değerleri hesaplanmıştır. Deneme sonunda elde edilen % bitki oluşum değerleri Açıkgöz (1990)'ün önerdiği şekilde açı transformasyonu uygulandıktan sonra "Tesadüf Parselleri Deneme Deseni"ne göre SAS paket programında varyans analizine tabi

tutulmuştur. İstatistiksel olarak önemli bulunan uygulamalara ait ortalamalar LSD çoklu karşılaştırma ile P=0.05 önem düzeyinde karşılaştırılmıştır.

Deneme sonunda elde edilen % çiçek tozu canlılık ve çimlenme değerleri Açıkgöz (1990)'ün önerdiği şekilde açı transformasyonu uygulandıktan sonra "Tesadüf Parselleri Deneme Deseni"ne göre SAS paket programında varyans analizine tabi tutulmuştur. İstatistiksel olarak önemli bulunan uygulamalara ait ortalamalar LSD çoklu karşılaştırma ile P=0.05 önem düzeyinde karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Doğada türler arası melezleme

Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında arazide ve *in vitro* koşullarda melezlemeler yapılmıştır. Bu amaçla hem melez bireyler elde etmek hemde tozlamadan sonra dişicik borusunda döllenmeye kadarki aşamaları izlemek amacıyla Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemeler yapılmıştır. Denemenin bu kısmında, arazi melezlemeleri ve tohum elde edilmesi, embriyo kurtarma, çiçek tozu çim borusu büyümesinin incelenmesi, çiçek tozu canlılıklarının belirlenmesi, melez bireylerin fertilite durumlarının araştırılması ve embriyogenik kallus eldesi için uygun ortam denemeleri yapılmıştır.

4.1.1. Arazi melezlemeleri ve tohum elde edilmesi

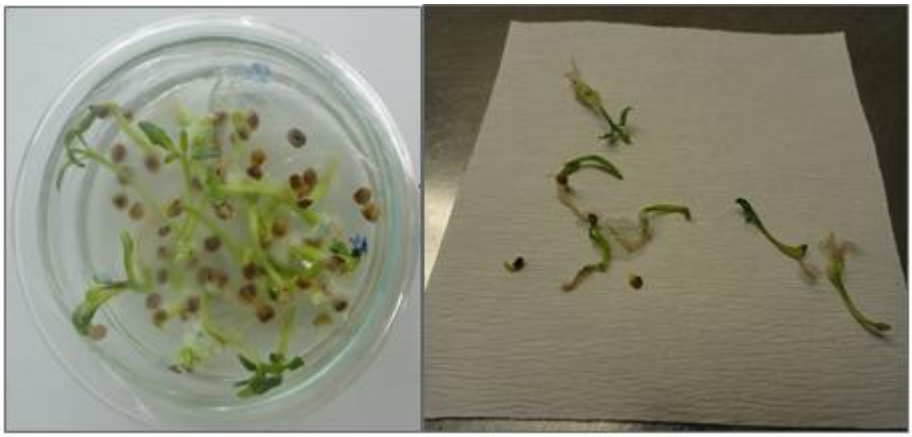
Kemer x *Solanum torvum* ve Aydın Siyahı x *Solanum torvum* melezlemelerinden 15'er meyve olacak şekilde tohumlar olgunlaşmaya bırakılmış ve olgun meyveler hasat edilerek tohumları çıkartılmıştır.

4.1.2. Embriyo kurtarma ile ilgili sonuçlar

Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemeler yapılmıştır. Ancak *Solanum torvum*'un ana ebeveyn olarak kullanıldığı melezlemelerden meyve elde edilememiştir. Tozlamadan 25, 30 ve 35 gün sonra her melezleme kombinasyonu için 5'er adet meyve hasat edilmiştir. Embriyolar Tek Tek Açma Yöntemi (Şekil 4.1) ve Doğrudan Ekim Yöntemi ile (Şekil 4.2) *in vitro* kültüre alınmıştır.



Şekil 4.1**.** Tek Tek Açma Yöntemi ile binoküler mikroskop altında çıkarılan Aydın Siyahı x *S. torvum* ve Kemer x *S. torvum* embriyolarından geliştirilen bitkicikler



Şekil 4.2**.** Doğrudan Ekim Yöntemiyle *in vitro* kültüre alınan Aydın Siyahı x *S. torvum* ve Kemer x *S. torvum* tohumlarından oluşan bitkicikler

Aydın Siyahı x *Solanum torvum* ve Kemer x *Solanum torvum* melezlemelerinden *in vitro* koşullarda embriyo kurtarma tekniği uygulanarak sağlıklı bitki, anormal bitki ve gelişmeyen embriyo durumları belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bitkiye dönüşüm oranları (%) açısından hasat tarihi istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Çeşitlerin etkisi ve hasat tarihi x çeşit

interaksiyonun bakımından ise istatistiksel olarak önemli fark saptanmamıştır (Çizelge 4.2). Hasat tarihi bakımından en yüksek bitki eldesi 35. günde Kemer x *Solanum torvum* melezinden % 90.83, Aydın Siyahı x *Solanum torvum* melezinden % 78.75 oranında bitkiye dönüşüm elde edilmiştir. En düşük bitkiye dönüşüm ise 25. gün hasatlarından elde edilmiştir.

Özellikle dayanıklılıkla ilgili ıslah çalışmalarında yabani türlerden gen aktarımı konusunda türler arası melezlemelerde sorunlarla karşılaşılabileceği ifade edilmiştir. Bazı türlerde melezlemeden 6 ile 25 gün sonra embriyo aborsiyonu görülebildiğini bildirilmektedir. Fakat embriyo kültürü yöntemi ile bu sorunun üstesinden başarı ile gelinebildiğini vurgulanmıştır. Hibrit embriyo abosiyondan önce *in vitro* kültüre alınıp kurtarılabileceğini bildirilmektedir (Kalloo, 1986; Hatipoğlu, 1993; Emiroğlu ve Gürel, 1993). Bizim çalışmamızın sonuçları yapılan bu çalışmalarla uyum içersindedir. Aydın Siyahı x *S. torvum* ve Kemer x *S. torvum* melezlemelerden elde edillen meyvelerde embriyo kurtarma yöntemiyle her iki kombinasyon için en uygun zamanın tozlamadan sonra 35. gün olduğu belirlenmiştir. Türler arası melezlemelerden elde edilen meyvelerin tamamında, tohumların ya çok az endosperme ya da tamamen endospermsiz olduğu gözlenmiştir. Embriyo kurtarma yönteminin tür içi veya türler arası uyuşmazlık problemi olan melezlemerde bitki eldesinde kullanılabilecek *in vitro* teknik olduğunu söyleyebiliriz.

Çizelge 4.1. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* melezlerinin *in vitro* koşullarda embriyo kurtarma tekniği ile bitki eldesi

Embriyo kurtarma	Aydın Siyahı x *Solanum torvum*				Kemer x *Solanum torvum*			
	Toplam	Gelişmeyen embriyo	Anormal bitki	Sağlıklı bitki	Toplam	Gelişmeyen embriyo	Anormal bitki	Sağlıklı bitki
25. gün	40	9	12	19	40	21.8	2.2	16
30. gün	40	8	7.5	24.5	40	6.8	0	33.2
35. gün	40	4.5	4	31.5	40	2.33	1.33	36.33

Çizelge 4.2. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* melezlerinin *in vitro* koşullarda embriyo kurtarma ile bitkiye dönüşüm yüzdeleri

Embriyo kurtarma	**Bitkiye dönüşüm (%)**			
	Hasat tarihi			
Çeşit	**25**	**30**	**35**	**Ort**
Aydın Siyahı x *Solanum torvum*	%47.5 (33.23*)	%61.25 (51.56)	%78.75 (62.91)	52.59
Kemer x *Solanum torvum*	%40 (38.69)	%83 (67.44)	%90.83 (75.89)	58.33
Ort	40.53 **b**	61.49 **a**	69.40 **a**	

Prob>F: Hasat tarihi, 0.0021; Çeşit, 0.0178; Çeşit*hasat tarihi, 0.3221
*: Varyans analizi için ortalama % değerlere açı transformasyonu uygulanmış halidir.

Aydın Siyahı x *Solanum torvum* ve Kemer x *Solanum torvum* melezlemelerinden *in vitro* koşullarda doğrudan ekim tekniği uygulanarak çimlenen tohum sayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Bitkiye dönüşüm oranları (%) açısından hasat tarihi ve çeşitlerin etkisi istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Hasat tarihi x çeşit interaksiyonun bakımından ise istatistiksel olarak önemli fark saptanmamıştır (Çizelge 4.4). Hasat tarihi bakımından Kemer x *Solanum torvum* melezinden 30. günde (% 16.53), Aydın Siyahı x *Solanum torvum* melezinden 35. günde (% 14.53) en yüksek bitkiye dönüşüm elde edilmiştir. En düşük bitkiye dönüşüm ise 25. gün hasatlarından elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* melezlerinin *in vitro* koşullarda doğrudan ekim yöntemiyle bitki eldesi

Doğrudan ekim	**Aydın Siyahı x *Solanum torvum***		**Kemer x *Solanum torvum***	
	Petrideki tohum sayısı	**Çimlenen tohum sayısı**	**Petrideki tohum sayısı**	**Çimlenen tohum sayısı**
25. gün	52.33	1	56.86	5.86
30. gün	38.58	4.83	50.77	11.30
35. gün	37.63	6.75	51.71	10.22

Çizelge 4.4. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* melezlerinin *in vitro* koşullarda doğrudan ekim yöntemiyle bitkiye dönüşüm yüzdeleri

Doğrudan ekim	**Bitkiye dönüşüm (%)**			
	Hasat tarihi			
Çeşit	**25**	**30**	**35**	**Ort**
Aydın Siyahı x *Solanum torvum*	%1.94 (7.97*)	%11.29 (18.67)	%14.53 (21.87)	18.39 **b**
Kemer x *Solanum torvum*	%10.31 (16.90)	%16.53 (23.22)	%15.97 (22.86)	22.63 **a**
Ort	12.43* **b**	20.94 **a**	22.36 **a**	

Prob>F: hasat tarihi, 0.0001; Çeşit, 0.0331; Çeşit*hasat tarihi, 0.6581

*: Varyans analizi için ortalama % değerlere açı transformasyonu uygulanmış halidir.

4.1.3. Çiçek tozu çim borusu büyümesinin incelenmesi ile ilgili sonuçlar

Tozlamadan sonra döllenmenin olmamasının yada çok düşük olmasının nedenini anlamak ve çiçek tozu çim borusu büyümesini incelemek amacıyla, tozlamadan sonra 72 saat boyunca her 6 saatte bir her bir melez kombinasyondan 4'er adet çiçek örnekleri alınarak tespit çözeltisi içerisine konulmuş ve mikroskop incelemelerine kadar bozulmadan muhafazaya alınmıştır. Aydın Siyahı x *Solanum torvum* çiçeklerinde tozlamadan 30 saat sonra sonra çiçek tozu çim boruları yumurtalığa ulaşırken, Kemer x *Solanum torvum* çiçeklerinde tozlamadan 24 saat sonra sonra çiçek tozu çim boruları yumurtalığa ulaşmıştır (Çizelge 4.5 Şekil 4.3). Yumurtalıkta alınan boyuna ve enine kesitlerde (Şekil 4.4), Kemer x *Solanum torvum* çiçekleri 30 saat sonra döllenmeye başlamış, Aydın Siyahı x *Solanum torvum* çiçeklerinde de döllenme 30 saat sonra başlamasına rağmen daha sonraki saatlerde alınan çiçeklerde döllenme sorunları görülmektedir (Çizelge 4.6).

Pessarakli ve Ramdane (2004), canlı polenin çimlenme kapasitesi; çevre koşulları, çimlenme ortamındaki besin miktarları, ortamın nemi sıcaklığı, hava basıncı ve pH, *in vitro*'daki polen çimlenmesini etkilediğini, eğer bunlar ortamda yeterli değil ise polen canlılığı yüksek bile olsa çimlenmenin gerçekleşmediğini bildirmektedir. Jaiki ve Chin (2007), *Solanum torvum*'un polenlerinin çimlenme ve polen tüpü gelişimi açısından patlıcan pistillerinde herhangi bir engelleme ile

kaşılaşılmadığı ancak tersi durumda *Solanum torvum*'un stillerinde patlıcanın polen tüplerinin engellendiği bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızın sonuçları yapılan bu çalışmalarla uyum içersindedir. Ayrıca türler arası melezlemelerde çeşitlerin tozlanma ve döllenmeye birbirinden farklı tepkiler verdiği tespit edilmiştir.

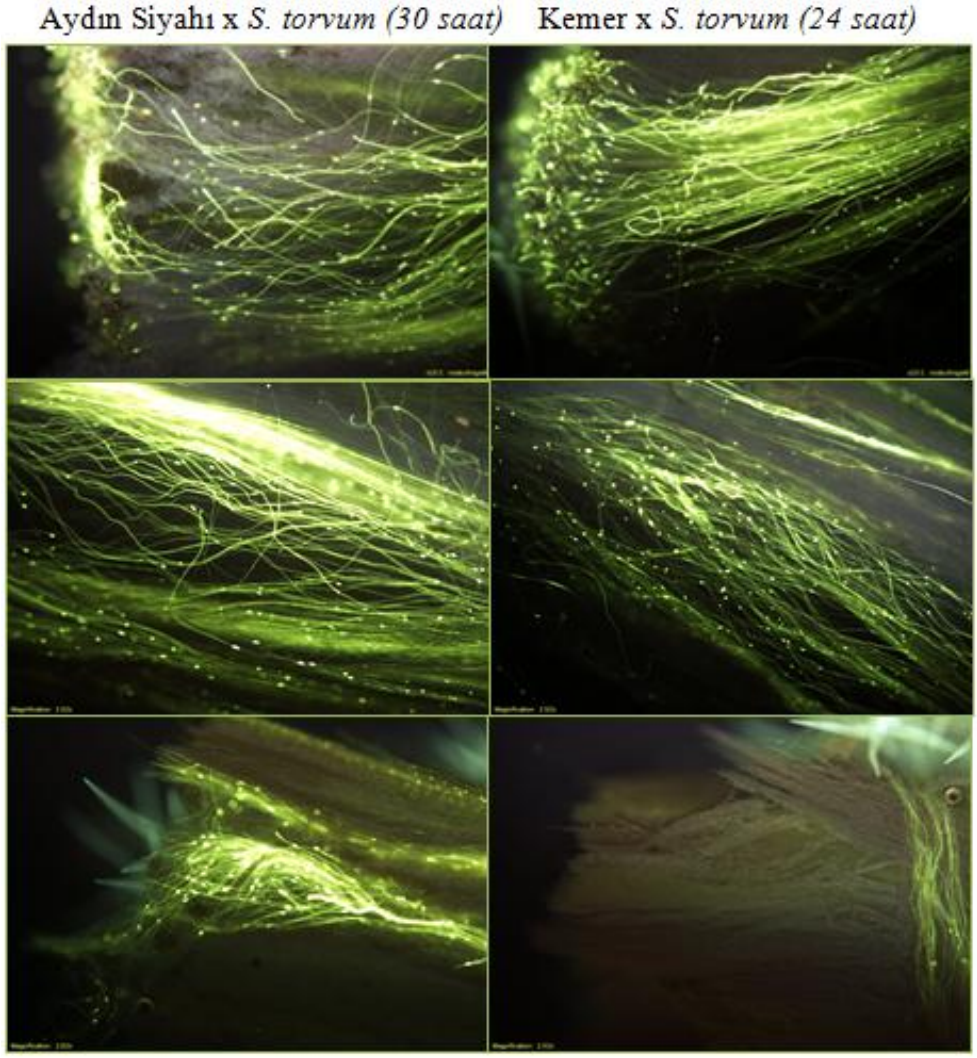
Çizelge 4.5**.** *Solanum melongena* x *Solanum torvum* çiçeklerinde tozlamadan sonra çiçek tozu çim borularının ilerlemesi

Saatler	Aydın Siyahı x *S. torvum*		Kemer x *S. torvum*	
	Dişicik borusu uzunluğu (µM)	Çiçek tozu çim borusu uzunluğu (µM)	Dişicik borusu uzunluğu (µM)	Çiçek tozu çim borusu uzunluğu (µM)
6	9817,95	4299,31	8693,10	2919,45
12	9594,74	5864,48	8654,52	6001,11
18	9574,59	5971,31	11435,39	8143,65
24	10344,35	9410,04	8477,56	8477,56
30	9250,41	9250,41	9624,69	9624,69
36	9861,51	9861,51	8730,15	8730,15
42	10208,77	10208,77	9052,86	9052,86
48	11242,86	11242,86	9825,12	9825,12
54	10635,33	10635,33	8891,18	8891,18
60	10445,03	10445,03	8854,38	8854,38
66	10928,70	10928,70	9551,09	9551,09
72	10847,73	10847,73	8282,47	8282,47

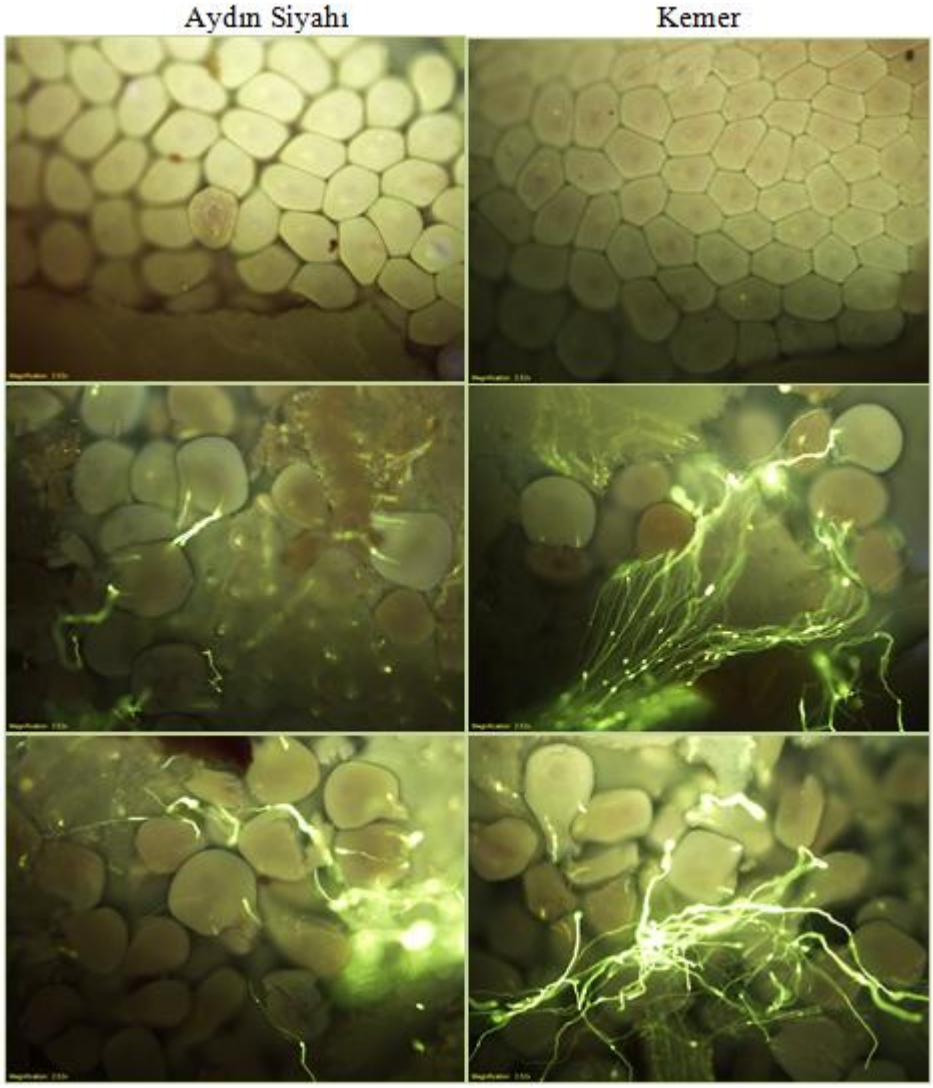
Çizelge 4.6. Tozlamadan sonra farklı saatlerde alınan *Solanum melongena* x *Solanum torvum* çiçeklerinin döllenme durumu

Saatler	Kesitler	Örnek	Aydın Siyahı x *S. torvum*		Kemer x *S. torvum*	
			Çiçek tozu çim borusu girişi	Döllenme	Çiçek tozu çim borusu girişi	Döllenme
6	Boyuna kesit	1	-	-	-	-
		2	-	-	-	-
	Enine kesit	1	-	-	-	-
		2	-	-		-
12	Boyuna kesit	1	-	-	-	-
		2	-	-	-	-
	Enine kesit	1	-	-	-	-
		2	-	-	-	-
18	Boyuna kesit	1	-	-	-	-
		2	-	-	-	-
	Enine kesit	1	-	-	-	-
		2	-	-	-	-
24	Boyuna kesit	1	-	-	-	-
		2	-	-	-	-
	Enine kesit	1	+	-	-	-
		2	-	-	-	-
30	Boyuna kesit	1	-	-	+	+
		2	+	+	-	-
	Enine kesit	1	-	-	+	-
		2	+	+	-	-
36	Boyuna kesit	1	-	-	+	+
		2	-	-	+	+
	Enine kesit	1	-	-	+	+
		2	-	-	+	+
42	Boyuna kesit	1	+	-	+	+
		2	+	-	+	-
	Enine kesit	1	+	+	-	-
		2	-	-	+	-
48	Boyuna kesit	1	-	-	+	+
		2	+	-	+	+
	Enine kesit	1	+	+	+	+
		2	+	-	+	+
54	Boyuna kesit	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
	Enine kesit	1	-	-	+	+
		2	+	+	+	+
60	Boyuna kesit	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
	Enine kesit	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
66	Boyuna kesit	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
	Enine kesit	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
72	Boyuna kesit	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+
	Enine kesit	1	+	+	+	+
		2	+	+	+	+

Not: +: var - yok



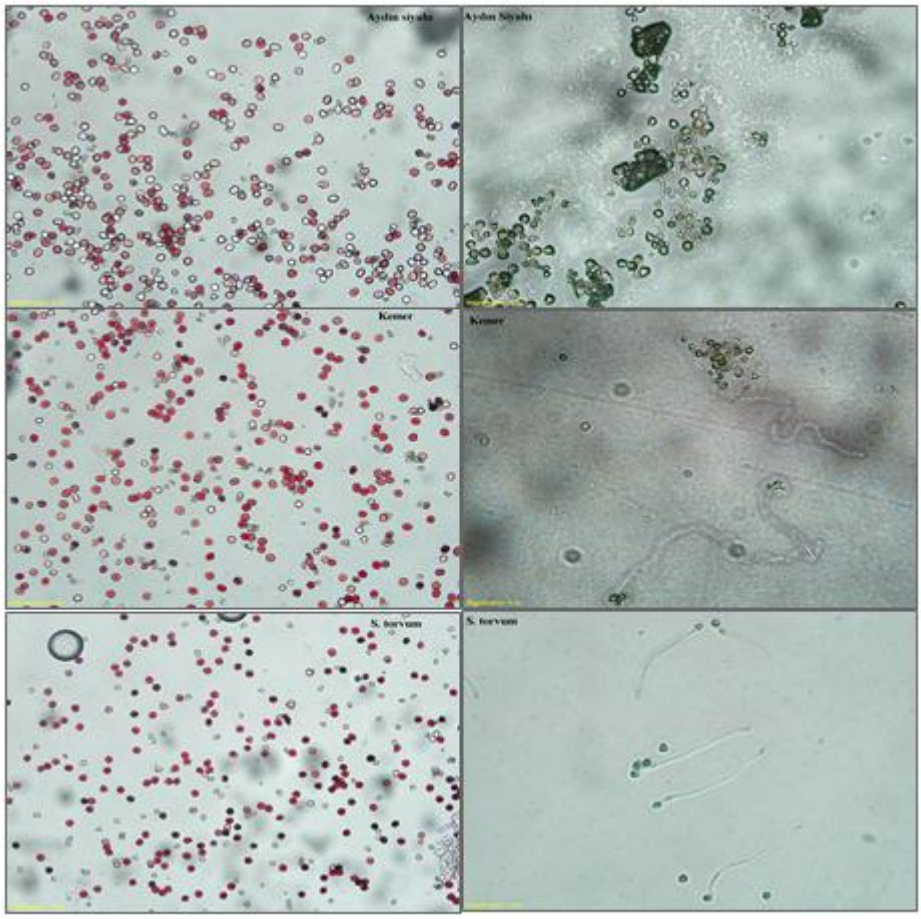
Şekil 4.3. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* çiçek tozu çim borularının sırasıyla stigma, dişicik borusu ve yumurtalık girişindeki durumu



Şekil 4.4**.** Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinin yumurta hücrelerinin döllenmesi

4.1.4. Çiçek tozu canlılık ve çimlenme oranlarının belirlenmesi ile ilgili sonuçlar

Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ve *Solanum torvum'*da çiçek tozu canlılığı ve çimlenmesi açısından (Şekil 4.5) istatistiki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir. En yüksek polen canlılığı Kemer (% 70.4) çeşidinden en yüksek polen çimlenmesi *Solanum torvum*'dan (% 22.8) elde edilmiştir (Çizelge 4.7).



Şekil 4.5**.** Aydın Siyahı, Kemer çeşitleri ve *Solanum torvum'*da çiçek tozu canlılık ve çimlenmesi

Çizelge 4.7**.** Aydın Siyahı, Kemer ve *Solanum torvum*'un polen çimlenme ve canlılık yüzdeleri

Çeşitler	**Çiçek Tozu Çimlenmesi (%)**	**Çiçek Tozu Canlılığı (%)**
Aydın Siyahı	20.8 (20.9)	62.7 ab (58.5)
Kemer	22.4 (28.2)	70.4 a (55.4)
Solanum torvum	22.8 (28.1)	56.4 b (50.9)
LSD	9.306 ÖD	7.795 ÖD

(1): Ortalamalar arasındaki farklar ayrı harflerle gösterilmiştir.
(2): Ö.D.: Önemli Değil.. ***:p<0.001; **:p<0.01; * :p<0.05
(3): Parantez içinde yüzde değerlerin transforme edilmiş hali gösterilmiştir.

4.1.5. Melez bireylerin fertilite durumlarının araştırılması

Elde edilen melez bireylerin (Kemer x *Solanum torvum* ve Aydın Siyahı x *Solanum torvum*) morfolojik gözlemleri yapılmıştır (Çizelge 4.8). Bu melez bireylerde hem kendileme hem de geriye melezlemeler [(Kemer x *Solanum torvum)* x Kemer ve (Aydın Siyahı x *Solanum torvum)* x Aydın Siyahı] yapılmış ancak meyve oluşmamıştır (Şekil 4.6). Melez bitkilerin çiçek yapısı ve rengi, yaprak yapısı ve bitki gelişimi *Solanum torvum* ile kıyaslanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.6**. (**Kemer x *Solanum torvum*) x Kemer geriye melezleme

Çizelge 4.8. Çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılan çeşit ve melezlerin bitkisel özellikleri

	Bitki gelişimi Dik-yarı dik-yayvan	**Gövde tüylülüğü** Çok-orta-az	**Gövde rengi** Grimsi yeşil-yeşil-mor	**Sürgün ucu rengi** Grimsi yeşil-yeşil-mor	**Yaprak rengi** Açık yeşil-yeşil-koyu yeşil	**Yaprak tüylülüğü** Çok-orta-az	**Tomurcuk dikenliliği** Çok-orta-az-yok	**Çiçek rengi** Beyaz-açık mor-mor-koyu mor	**Çiçek iriliği** İri-orta-küçük-çok küçük	**Çiçek yapısı** Salkım-tekil
Aydın Siyahı	Dik	Az	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Az	Az	Açık mor	Orta	Tekli
Kemer	Yarı dik	Az	Yeşil	Yeşil mor	Yeşil	Az	Az	Açık mor	Orta	Tekli
Solanum torvum	Dik	Orta	Mor	Yeşil	Açık Yeşil	Az	Orta	Beyaz	Çok küçük	Salkım
Aydın Siyahı x *S. torvum*	Yayvan	Orta	Mor	Yeşil	Yeşil	Az	Yok	Açık mor	Küçük	Salkım
Kemer x *S. torvum*	Yayvan	Orta	Mor	Yeşil mor	Yeşil	Az	Yok	Açık mor	Küçük	Salkım

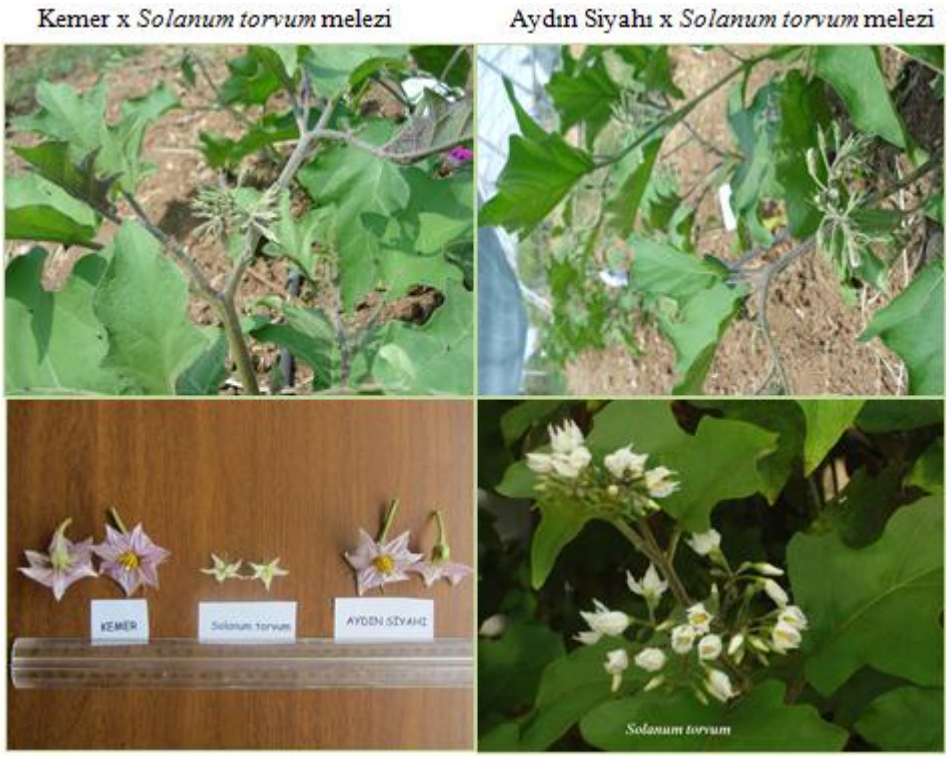


Şekil 4.7. *Solanum melongena* x *Solanum torvum* melezi ile *Solanum torvum*'un bitkisel özelllikleri

Kemer x *Solanum torvum* melezi ile Aydın Siyahı x *Solanum torvum* melezi bitkiler yaprak rengi dışında birbirlerine benzerdir. Kemer x *Solanum torvum* melezi bitkilerin yaprak rengi Kemer çeşidine benzemiştir. Bu melez bitkiler S*olanum torvum* bitkilerine yaprak şekli, dikenlilik, tüylülük, çiçeklenme (Şekil 4.8), çalımsı gelişim yönünden, *Solanum melongena*'ya da çiçek rengi ve büyüklüğü, diken rengi, bitki gelişimi yönünden benzemiştir. Ancak elde edilen bu melez bireyler kısır olmuştur.

Bletsos ve ark. (1998); Bletsos ve ark. (2000), patlıcanın kültür formu içerisinde *Verticillium*'a dayanıklılık açısından genetik çeşitlilik sınırlıdır. Bu nedenle, yabani türlerinden bu hastalığa karşı dayanıklı olan *Solanum torvum* ve *Solanum sisymbriifolium*'dan dayanıklılık genlerinin kültür formun aktarılması gerekmektedir. Kültür çeşitleri ile yabani türler arasında yapılan melezlemelerde sadece 'Langada' x *S. torvum* melezinden F1 hibrit elde edilebilmiştir. Bu F_1 hibritin morfolojik olarak *S. torvum*'a benzediği ancak steril olduğu tespit edilmiştir. Kolhisin uygulamasının sterilitenin kaldırılmasında başarılı olmadığı bildirilmiştir. Collonnier ve ark. (2001), bakteriyel ve fungal solgunluklara karşı dayanıklılık ise somatik hibridizasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde aktarılmaktadır. Fakat elde edilen hibritler steril olabilmekte veya morfolojik olarak kültür formundan uzaklaşmaktadır. Bu durumda devreye geriye melezleme yöntemi girmektedir. Jarl ve ark. (1999), *Solanum melongena* ile *Solanum torvum* arasında protoplast füzyonu yaparak somatik hibritleri elde etmişlerdir. İki tür arasında uyuşmazlığı kaldırmak için *Solanum torvum*'un protoplastlarına ışın uygulamışlar, böylece fertil bireyler elde edilebildiğini tespit etmişlerdir. Tarla koşullarında *Verticillium*'a toleranslık gösteren toplam 12 bitkinin ıslah programına dahil edildiğini bildirilmişlerdir.

Yapılan çok sayıda araştırmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Türler arası melezlemelerde (yabani formlarla melezlemelerde) uyuşmazlık problemiyle karşılaşılabilmektedir.



Şekil 4.8**.** Çalışmada kullanılan bitkilerin çiçek görünümleri

4.1.6. Embriyogenik kallus eldesi için uygun ortam denemeleri ile ilgili bulgular

Aydın Siyahı, Kemer ve *Solanum torvum*'un döllenmiş yumurta hücreleri 1 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l BAP, 1 mg/l 2,4 D + 1 mg/l BAP, 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4 D ayrıca *Solanum torvum* için 3 mg/l BAP içeren MS ortamında 5 tekerrür her tekerrürde 5 petri olacak şekilde yerleştirilmiştir. Deneme sonucunda 1 mg/l Kin uygulamasının Aydın Siyahı, Kemer ve *Solanum torvum*'un döllenmiş yumurta hücrelerinden kallus eldesinde başarılı olduğu tespit edilmiştir. (Çizelge 4.9 Şekil 4.9). En yüksek kallus eldesi ise 1 mg/l Kinetin uygulanan Aydın Siyahı çeşidinden (% 84) elde edilmiştir.

Patlıcanda farklı eksplant kaynakları kullanılarak kallus indüksiyonu için yapılan çalışmalarda, eksplant kaynağına göre değişen oksin ve sitokinin

dozlarında başarılı olunmuştur. Kantharajah ve Golegaonkar (2004), Patlıcan, genel olarak morfogenezise ve özellikle de somatik embriyogenesise oldukça müsait olduğunu vurgulanmıştır. Genotip, eksplant türü ve yeri, büyüme regülatörleri, poliaminler ve diğer bazı faktörlerin somatik embriyogenesisi etkilediği bildirilmiştir. Çoğu araştırma somatik embriyogenesisin indüksiyonu, gelişimi ve olgunlaşması üzerine yoğunlaştığı belirtilmiştir. Rahman ve ark. (2006), *Solanum melongena* L.'nin kotiledon ve mibrid eksplantlarından somatik embriyolar elde edildiğini bildirmişlerdir. Kallus indüksiyonu için, ortama tek başına veya BAP ile farklı konsantrasyonlarda oksin ile ilave edildiğini belirtmişlerdir. En iyi kallus oranının % 83-85'lik, 2.0 mgl/l NAA + 0.05 mg/1 BAP içeren MS ortamında kültürlenen her iki eksplanttan elde edildiğini bildirmişlerdir. BAP, GA3, NAA ve Zeatin ile takviye edilen MS ortamına kalluslar aktarıldıktan sonra, somatik embriyogenesis ve sürgün oluşumunun sağlandığı belirlenmiştir. Kotiledon türevi kalluslar, 2.0 mg/l Zeatin + 1.0 mg/1 BAP'a sahip olan MS ortamında alt kültürlendiğinde rejenerasyon için daha iyi performans (% 82) gösterdiği tespit etmişlerdir. Swamynathan ve ark (2010), *Solanum melongena*'nın (Thengaithittu çeşidinin) *in vitro* rejenerasyonunun tespit etmişlerdir. Olgun tohumların embriyoları, kotiledon ve sürgün eksplantları farklı konsantrasyonlarda NAA, kinetin, 2,4-D, TDZ ve BAP kombinasyonları ile takviye edilmiş MS ortamına aktarmışlardır. Kotiledon kültürleri tek başına NAA (10.6 mg/l) ilave edilmiş ortamda kallus üretimi için oldukça verimli olduğonu belirlemişlerdir. Bununla birlikte, embriyo eksplant kültürleri, kallus üretiminde NAA (8.0 mg/l) ve Kinetin (0.1 mg/l) ile takviye edilen MS ortamında embriyogenesis için iyi yanıtlar verdiğini belirlemişlerdir. Sürgün kültürüne tepkinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir. NAA varlığında, embriyo ve kotiledon kültürleri sırasıyla % 40 ve % 80 oranında yanıt gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yapılan kallus indüksiyonu çalışmalarında oksin ve sitokinin farklı oranlarda kullanımında başarılı sonuçlar alınırken bizim çalışmamızda ise kallus indüksiyonu için farklı ortamlar denemiş ve 1 mg/l Kinetin uygulanan MS

uygulamasından embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Bilindiği üzere bitkinin bütün kısımlarından kallus elde edilebilir ancak rejenere kabiliyeti yüksek, embrogenik kalluslar çoğunlukla gametik hücrelerden elde edilmektedir. Patlıcanda döllenmiş yumurta hücrelerinden embriyogenik kallusların elde edilerek protoplast füzyonuna rejenere kabililiyeti yüksek hücrelerle başlanması amaçlanmıştır.



Şekil 4.9. *Solanum melongena* ve *Solanum torvum*'un döllenmiş yumurta hücrelerinin 1 mg/l Kinetin ortamında kallus gelişimi

Çizelge 4.9. Farklı ortamlarda *Solanum melongena* ve *Solanum torvum*'un döllenmiş yumurta hücrelerinden kallus gelişimi (mg/l)

Çeşitler	Ortamlar	Kültüre alınan petri sayısı	Kallus Oluşumu	
			petri	%
Aydın Siyahı	1 2.4 D + 0.5 BAP	25	5	20
	1 2.4 D + 1 BAP	25	4	16
	1 2.4 D	25	5	20
	1 Kin	25	21	84
Kemer	1 2.4 D + 0.5 BAP	25	5	20
	1 2.4 D + 1 BAP	25	3	12
	1 2.4 D	25	3	12
	1 Kin	25	17	68
Solanum torvum	1 2.4 D + 0.5 BAP	25	-	-
	1 2.4 D + 1 BAP	25	-	-
	1 2.4 D	25	-	-
	1 Kin	25	19	76
	3 BAP	25	9	36

Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinin yaprakları sera içersinde yetiştirilen bitkilerden, *Solanum torvum*'un ise açıkta yetiştirilen bitkilerden alındığı için *Solanum torvum'*da enfeksiyonlu petri sayısı oldukça yüksek çıkmıştır (Çizelge 4.10). Buna rağmen rejenerasyonu kültür çeşitlerine göre daha zor olan *Solanum torvum'*dan istenilen özellikte kalluslar elde edilmiştir (Şekil 4.10). Diğer önemli nokta ise çalışmada kullanılan tüm genotipler için YDA eksplantları için 1.5 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l BAP, YDÜ eksplantları için 2 mg/l 2,4 D uygulamaları daha başarılı bulunmuştur. En Yüksek kallus eldesi ise Kemer çeşidinin YDA eksplantlarının 1.5 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l BAP ortamından sağlanmıştır (% 40).

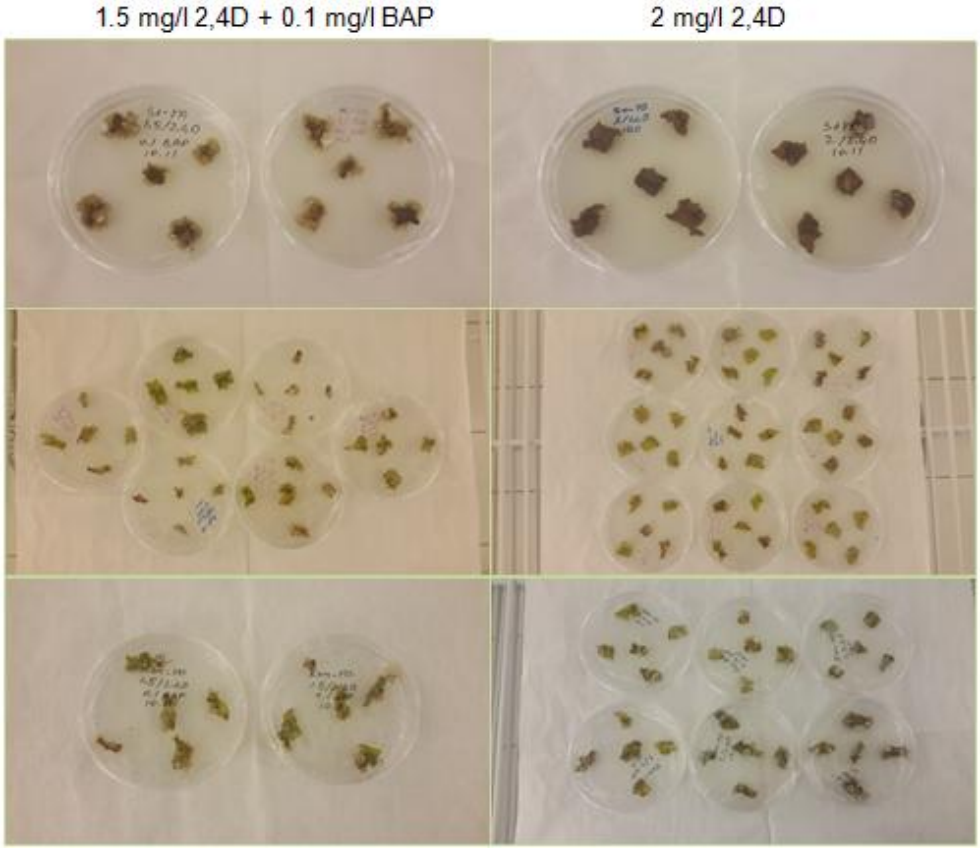
Kantharajah ve Golegaonkar (2004), Patlıcan, genel olarak morfogenezise ve özellikle de somatik embriyogenesise oldukça müsait olduğunu vurgulanmıştır. Rahman ve ark. (2006), *Solanum melongena* L.'nin kotiledon ve mibrid eksplantlarından somatik embriyolar elde edildiğini bildirmişlerdir. Kallus indüksiyonu için, ortama tek başına veya BAP ile farklı konsantrasyonlarda oksin ilave edildiğini belirtmişlerdir. Swamynathan ve ark (2010), *Solanum melongena*'nın (Thengaithittu çeşidinin) olgun tohumların embriyoları, kotiledon

ve sürgün eksplantları farklı konsantrasyonlarda NAA, kinetin, 2,4-D, TDZ ve BAP kombinasyonları ile takviye edilmiş MS ortamına aktarmışlardır. Kotiledon kültürleri tek başına NAA (10.6 mg/l) ilave edilmiş ortamda kallus üretimi için oldukça verimli olduğonu belirlemişlerdir. Bununla birlikte, embriyo eksplant kültürleri, kallus üretiminde NAA (8.0 mg/l) ve Kinetin (0.1 mg/l) ile takviye edilen MS ortamında embriyogenesis için iyi yanıtlar verdiğini belirlemişlerdir.

Sonuçlar literatürlerle uyum içersindedir. Faklı miktardaki oksin ve sitokinin dozlarında kalluslar elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar protoplast füzyonunda kullanılmıştır.

Çizelge 4.10. *Solanum torvum*, Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin genç yapraklarından kallus eldesi

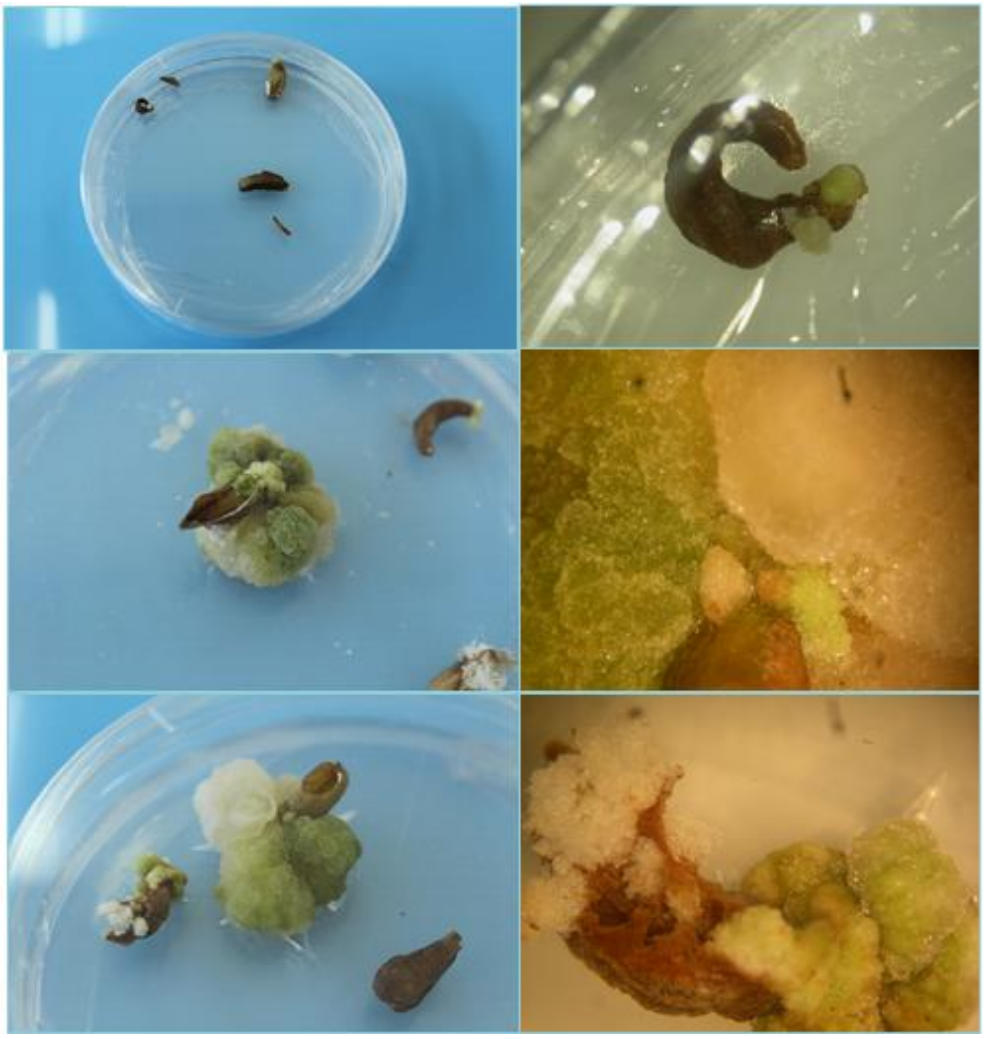
Uygulama	Toplam petri sayısı	Enfeksiyon oluşumu		Enfeksiyon ve kallus oluşumu		Kallus oluşumu	
		adet	%	adet	%	adet	%
St-YDA 2 2,4D	26	26	100	-	-	-	-
St-YDA 1.5 2,4D + 0,1 BAP	27	21	77.7	2	7.4	4	14.8
St-YDÜ 2 2,4D	26	24	92.3	-	-	2	7.7
St-YDÜ 1.5 2,4D + 0,1 BAP	25	24	96	1	4	-	-
Ayd-YDA 2 2,4D	27	16	59.3	5	55.6	6	22.2
Ayd-YDA 1.5 2,4D + 0,1 BAP	25	13	52	5	20	7	28
Ayd-YDÜ 2/2,4D	26	14	53.8	3	11.5	9	34.6
Ayd-YDÜ 1.5 2,4D + 0,1 BAP	26	18	69.2	8	30.8	-	-
Kem-YDA 2 2,4D	25	6	24	14	56	5	20
Kem-YDA 1.5 2,4D + 0,1 BAP	25	12	48	3	12	10	40
Kem-YDÜ 2 2,4D	27	12	44.4	6	22.2	9	33.3
Kem-YDÜ 1.5 2,4D + 0,1 BAP	26	7	26.9	15	57.7	4	15.4
Toplam	**311**	**193**		**62**		**56**	



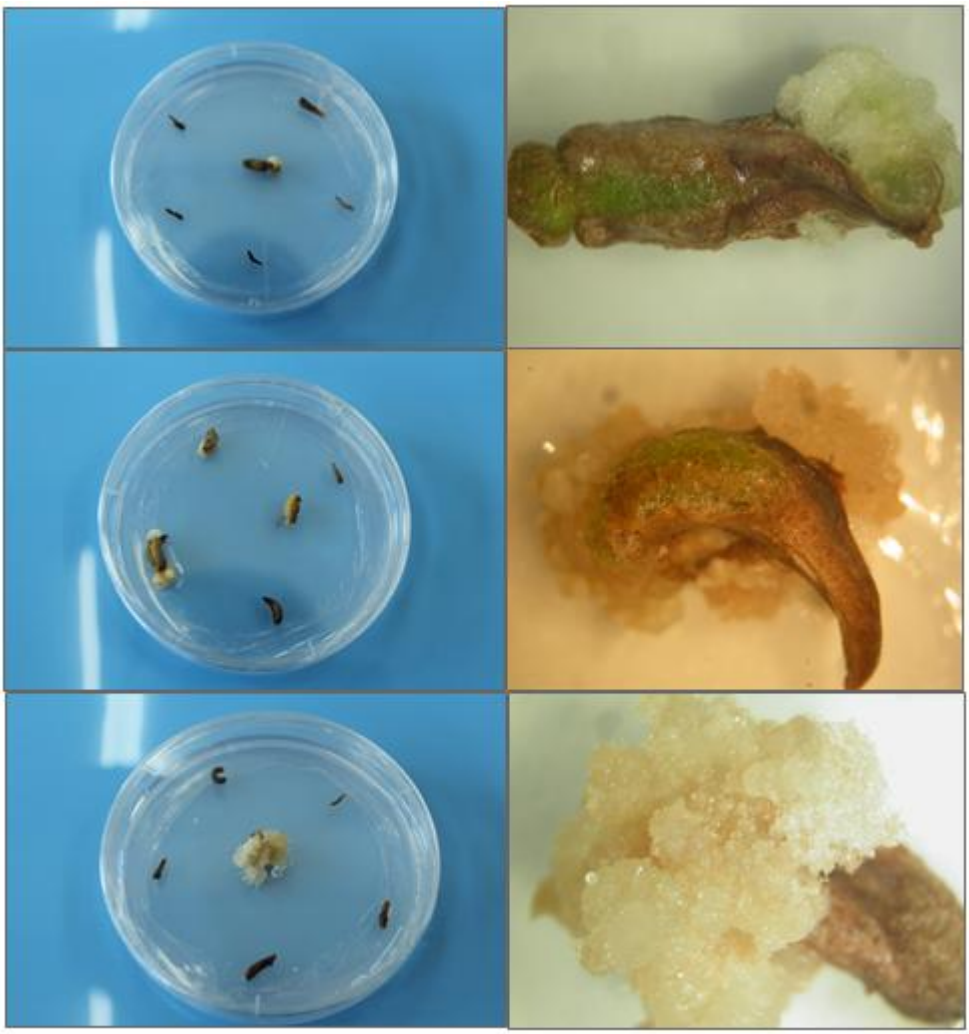
Şekil 4.10**.** Yaprak ekplantlarından kallus gelişimi

4.1.7. Patlıcanda anter kültürü protokolünün araştırılması ile ilgili sonuçlar

Anter kültürü çalışmalarına 2012 yılı bahar yarıyılında Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'na göre başlanmıştır. Bu dönemde *Solanum torvum*'dan kallus ve bitki eldesi sağlanamamıştır. Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinden ise sadece kallus gelişimi sağlanmıştır (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).



Şekil 4.11**.** Aydın Siyahı çeşidinin R ortamında kallus gelişimi



Şekil 4.12**.** Kemer çeşidinin R ortamında kallus gelişimi

Anter kültürü çalışmalarına 2014 yılı yaz döneminde Dumas de Vaulx ve ark. (1982), ve CP ortamlarında kültüre alınan antelerden en yüksek kallus gelişimi R ortamında Aydın Siyahı çeşidinden (% 26.65) elde edilmiştir (Çizelge 4.11). CP ortamında hiçbir genotipten kallus ve bitki elde edilmemiştir. Tüm genotiplerden elde edilen kallusların büyüklükleri çoğunlukla çok küçük (1) olmuştur (Çizelge 4.12). Kallus tipi ve rengi bakımından en fazla kalluslar kompakt-beyaz

görünümünde olmuşlardır (Çizelge 4.13). Bu dönemde hiçbir ortamda bitki oluşmamıştır.

Çizelge 4.11**.** Patlıcan genotiplerinde 2014 yaz döneminde anter kültüründen elde edilen sonuçlar

Çeşitler	**Ortamlar**	**Kültüre Alınan Anter Sayısı**	**Kallus Oluşumu**		**Bitki Oluşumu**	
			(adet)	**(%)**	**(adet)**	**(%)**
Aydın Siyahı	**R**	434	107	26.65	-	-
	CP	93	-	-	-	-
Kemer	**R**	450	114	25.33	-	-
	CP	89	-	-	-	-
Solanum torvum	**R**	144	5	3.47	-	-

Çizelge 4.12. 2014 yaz döneminde anter kültüründen elde kallus büyüklükleri

Çeşitler	**Ortamlar**	**Kallus Büyüklüğü**				
		1	**2**	**3**	**4**	**5**
Aydın Siyahı	**R**	71	17	7	9	3
	CP	-	-	-	-	-
Kemer	**R**	92	6	3	5	8
	CP	-	-	-	-	-
Solanum torvum	**R**	5	-	-	-	-

Not: 1 çok küçük; 2 küçük; 3 orta; 4 büyük; 5 çok büyük

Çizelge 4.13**.** 2014 yaz döneminde anter kültüründen elde kallus tipi ve rengi

Çeşitler	**Ortamlar**	**Kallus Tipi ve Rengi**							
		Dağılgan Sarı	**Dağılgan Beyaz**	**Dağılgan Sarı-yeşil**	**Dağılgan beyaz-yeşil**	**Unsu yeşil**	**Unsu beyaz**	**Kompakt Yeşil**	**Kompakt beyaz**
Aydın Siyahı	**R**	-	5	3	-	-	5	38	57
	CP	-	-	-	-	-	-	-	-
Kemer	**R**	-	3	-	4	2	1	7	99
	CP	-	-	-	-	-	-	-	-
Solanum torvum	**R**	-	-	-	-	1	-	-	3

Aydın Siyahı, Kemer ve *Solanum torvum*'un serada 2014 yılı güz peryodunda yetiştirilen bitkilerinden izole edilerek kültüre alınan anterlerde yapılan gözlemler sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.14.'de verilmiştir. Bu dönemde anter kültürü çalışmalarında, Dumas de Vaulx ve ark. (1982) ve CP regenerasyon ortamlarında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve tamamen karanlık koşullarda denenmiştir. Her çiçek tomurcuğundan çıkan anterler CP ve C ortamlarına birer petriye yerleştirilmiştir. C ortanımda anterler inkübatörde karanlıkta 35 ^{0}C'de 8 gün bekletilmiştir. Daha sonra petriler 25 ^{0}C'de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullara alınmıştır. Anterler 13. gün sonra C ortamından R ortamına aktarılmıştır. R ortamında embriyolar oluşmaya başlayınca V3 ortamına aktarılmıştır. V3 ortamında bitkiler oluştuktan sonra tüplere oradan da dış ortama alıştırılarak aktarılmıştır (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14). CP ve R ortamlarında *Solanum torvum,* Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinin 10'er petri aliminyum folye ile sarılarak karanlıkta kallus gelişimi incelenmiştir.

Farklı ortam ve koşulların denendiği çalışmada her genotiplerden belli miktarlarda kallus oluşumu görülmüştür. En yüksek kallus oluşum oranları karanlık koşullarda R ve V3 ortamlarında yerleştirilen Aydın Siyahı ve Kemer anterlerinden elde edilmiştir (sırasıyla % 30.9 ve % 29.8). *Solanum torvum*'dan ise sadece R ortamında % 7.2 oranında kallus oluşmuştur. CP ortamında Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinden az sayıda kallus elde edilmiştir (Şekil.4.15) Anter kültüründe direkt olarak embriyo oluşumu gerçekleşebildiği gibi bazen kallus oluşumunun ardından embriyo oluşumu gerçekleşebilmektedir. Bu dönemde elde edilen bitkilerin tamamı kallus oluşumunun ardından gerçekleşmiştir. En yüksek bitki eldesi R ortamında Aydın Siyahı çeşidinden elde edilmiştir (% 4.6). Bunu Kemer çeşidinin karanlık koşullarda R-V3 ortamındaki anterler takip etmiştir (% 1.3). Kemer çeşidi R oartamında % 1.2 oranında embriyo oluşum oranı elde edilirken, bitkiye dönüşüm oranı % 0.8 olmuştur.

Çizelge 4.14. Patlıcan genotiplerinde 2014 güz döneminde anter kültüründen elde edilen sonuçlar

Çeşitler	Ortamlar	Kültüre Alınan Anter Sayısı	Kallus Oluşumu		Embriyo Oluşumu		Bitki Oluşumu	
			adet	%	adet	%	adet	%
Aydın Siyahı	R	560	138	24.6	-	-	26	4.6
	R-V3 Karanlık	333	103	30.9	-	-	-	-
	CP	773	1	0.13	-	-	-	-
	CP-Karanlık	55	-	-	-	-	-	-
Kemer	R	592	123	20.8	7	1.2	5	0.8
	R-V3 Karanlık	319	95	29.8	-	-	4	1.3
	CP	805	4	0.5				
	CP-Karanlık	51	9	17.6	-	-	-	-
Solanum torvum	R	292	21	7.2	-	-	-	-
	R-V3 Karanlık	51	-	-	-	-	-	-
	CP	70	-	-	-	-	-	-
	CP-Karanlık	45	-	-	-	-	-	-

Karanlık koşullardaki R-V3 ortamlarındaki anterlerden 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullardaki R-V3 ortamlarına kıyasla daha büyük kalluslar elde edilmiştir. Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinin her iki ortamda oluşan kalluslarının büyüklükleri daha homojen bir dağılım göstermiştir (Çizelge 4.15). Farklı ortamlardan elde edilen kallusların büyüklükleri çoğunlukla çok küçük (1) olmuştur. Kallus tipi ve rengi bakımından kallusların büyük çoğunluğu ya kompakt-beyaz ya da dağılgan beyaz görünümünde olurken karanlık koşullardan elde edilen kallusların çoğu dağılgan beyaz olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.16).

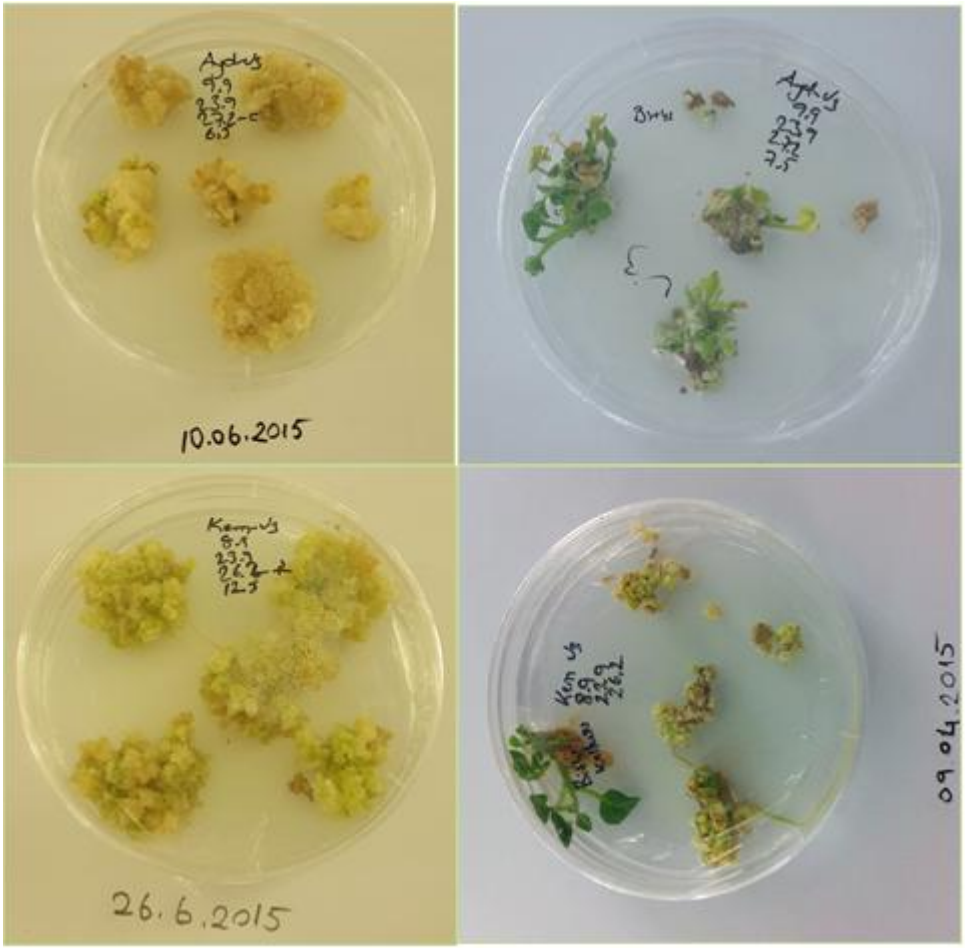
Çizelge 4.15. 2014 güz döneminde anter kültüründen elde edilen kallus büyüklükleri

Çeşitler	Ortamlar	Kallus Büyüklüğü				
		1	2	3	4	5
Aydın Siyahı	R	68	27	10	9	23
	R-V3 Karanlık	9	5	3	9	25
	CP	1	-	-	-	-
	CP- Karanlık	-	-	-	-	-
Kemer	R	72	16	13	4	22
	R-V3 Karanlık	2	8	4	3	16
	CP	4	-	-	-	-
	CP- Karanlık	2	3	3	1	-
Solanum torvum	R	18	3	4	3	9
	R-V3 Karanlık	-	-	-	-	-
	CP	-	-	-	-	-
	CP- Karanlık	-	-	-	-	-

Not: 1 çok küçük; 2 küçük; 3 orta; 4 büyük; 5 çok büyük

Çizelge 4.16**.** 2014 güz döneminde anter kültüründen elde edilen kallus tipi ve rengi

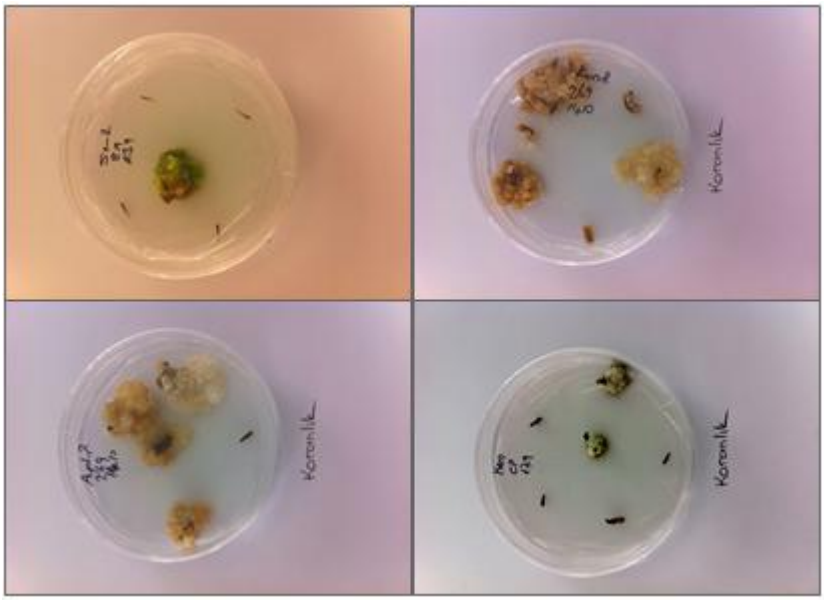
Çeşitler	Ortamlar	Kallus Tipi ve Rengi							
		Dağılgan beyaz	Dağılgan yeşil	Dağılgan beyaz-yeşil	Kompakt beyaz	Kompakt yeşil	Kompakt yeşil-beyaz	Unsu beyaz	Unsu yeşil
Aydın Siyahı	R	28	6	11	56	27	1	9	5
	R-V3 Karanlık	51	-	-	-	-	-	-	-
	CP	-	-	-	-	1	-	-	-
	CP- Karanlık	-	-	-	-	-	-	-	-
Kemer	R	33	2	10	45	28	5	1	3
	R-V3 Karanlık	26	-	-	5	-	-	2	-
	CP	-	-	-	1	3	-	-	-
	CP- Karanlık	-	-	-	9	-	-	-	-
Solanum torvum	R	9	4	3	3	2	-	-	-
	R-V3 Karanlık	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP- Karanlık	-	-	-	-	-	-	-	-



Şekil 4.13. Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinde anter kültürü ortamından (Dumas de Vaulx ve ark. 1982'e göre) elde edilen kallus ve bitkiler



Şekil 4.14. Anter kültürüyle oluşan bitkileri dış ortama alıştırma



Şekil 4.15**.** ***Solanum torvum***, Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinin anterlerinin farklı ortam ve koşullardaki kallus gelişimi

2014 yılı anter kültürü çalışmalarında Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinden bitki elde edilmesine rağmen yeterli olmadığı için 2015 yılının yaz ve güz dönemlerinde tekrar denenmiştir. Patlıcan anter kültüründe CP ortamında hiçbir başarılı sonuç elde edilmediğinden tekrar denenmemiştir.

2015 yaz döneminde Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinin anter kültürü çalışmaları Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'na göre yapılmıştır. Yaz döneminde yeterli sayıda anter petrilere yerleştirilmesine karşın kallus gelişimi düşük olduğu gibi hiç bitki oluşmamıştır. Yaz döneminde serada yetiştirilen patlıcan bitkilerinde alınan anterler, kültür ortamında gelişmeye bırakıldıklarında; gelişme olarak kabul edilen olgu, anterlerin kültür ortamına alındıktan sonra şişerek farklılaşmaları veya bozulma, kuruma olmaksızın canlılıklarını sürdürmeleri olarak değerlendirilmiştir. Kemer çeşidinin anterlerinin % 4.8'i gelişirken, aydın Siyahı çeşidinin % 3.2'si gelişmiştir. Benzer şekilde en yüksek kallus eldesi % 4.5 ile Kemer çeşidinden olurken, Aydın Siyahı çeşidinin ise % 2.5 olmuştur (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17**.** Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinin 2015 yaz döneminde anter kültüründen elde edilen sonuçlar

Çeşitler	**Kültüre Alınan Anter Sayısı**	**Gelişen anter sayısı**		**Kallus Oluşumu**		**Bitki Oluşumu**	
		adet	**%**	**adet**	**%**	**adet**	**%**
Aydın Siyahı	761	24	3.2	19	2.5	-	-
Kemer	1445	70	4.8	65	4.5	-	-

2015 yılı güz döneminde anter kültürü çalışmalarında modifiye edilmiş Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'e göre Aydın Siyahı ve Kemer çeşitleri ile tekrar denenmiştir. Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'de bildirilen C ortamının 3 farklı 2,4 D, Kinetin ve sakkaroz dozları denenmiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. Anter kültüründe kullanılan modifiye edilmiş C, R ve V3 ortamlarının içerikleri

	İçerikleri
Ortamlar	**C** ortamı + 5 mg/l 2.4-D +5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz+ 7 g/l agar + 1 mg/l 2.4-D +1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz+ 7 g/l agar + 0.01 mg/l 2.4-D + 0.01 mg/l Kinetin + 30 g/l sakaroz+ 7 g/l agar
	R ortamı + 0.01 g/l Kinetin + 30 g/l sakaroz + 7 g/l agar
	V3 ortamı + 30 g/l sakaroz + 7 g/l agar

Anter kültürü çalışmalarına 2015 yılı güz döneminde modifiye edilmiş Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'nın kullandıkları ortam, 0.01 mg/l 2.4-D + 0.01 mg/l Kinetin + 30 g/l sakkaroz ortamında Aydın Siyahı çeşidinin anter gelişim oranı % 75.2, Kemer çeşidinin ise % 72.6 olmuştur. Kültüre alınan antelerden en yüksek kallus gelişimi Aydın Siyahı çeşidinde % 3.3 olurken, Kemer çeşidinin ise % 2.1 olarak tespit edilmiştir. Yine benzer şekilde en yüksek embriyo oluşumu (% 4.23) ve bitki eldesi (% 3.78) Aydın Siyahı çeşidinden elde edilmiştir. (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. 2015-Güz döneminde 0.01/0.01 ortamında anter kültüründen elde edilen sonuçlar

Çeşitler	Kültüre Alınan Anter Sayısı	Gelişen Anterler		Kallus Oluşumu		Embriyo Oluşumu		Bitki Oluşumu	
		adet	%	adet	%	adet	%	adet	%
Aydın Siyahı	899	676	75.2	22	3.3	38	4.23	34	3.78
Kemer	1338	971	72.6	28	2.1	17	1.27	1	0.07

1 mg/l 2.4-D +1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz ortamında Aydın Siyahı çeşidinin anter gelişim oranı % 82.9, Kemer çeşidinin ise % 77.9 olmuştur. Aydın Siyahı çeşidinin kallus gelişimi % 34.7, Kemer çeşidinin ise % 21.6 olmuştur. En yüksek embriyo oluşumu (% 54.2) ve bitki eldesi (% 36.4) Aydın Siyahı çeşidinden elde edilmiştir. Kemer çeşidinin bu ortamda embriyo oluşum oranı % 21.5, bitki oluşum oranının % 14.1 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20. 2015-Güz döneminde 1/1 ortamında anter kültüründen elde edilen sonuçlar

Çeşitler	Kültüre Alınan Anter Sayısı	Gelişen Anterler		Kallus Oluşumu		Embriyo Oluşumu		Bitki Oluşumu	
		adet	%	adet	%	adet	%	adet	%
Aydın Siyahı	936	776	82.9	325	34.7	507	54.2	341	36.4
Kemer	1290	1005	77.9	278	21.6	277	21.5	182	14.1

5 mg/l 2.4-D + 5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz ortamında Aydın Siyahı çeşidinin anter gelişim oranı % 85.5, Kemer çeşidinin ise % 78.6 olduğu belirlenmiştir. Aydın Siyahı çeşidinin kallus gelişimi % 53,1, Kemer çeşidinden ise % 34 oranında kallus elde edilmiştir. En yüksek embriyo oluşumu (% 35.7) ve bitki eldesi (% 38.8) Kemer çeşidinin anterlerinden elde edilmiştir. Aydın Siyahı çeşidinin 5/5 ortamında embriyo oluşum oranı % 29.1, bitki oluşum oranının ise % 28.1 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21. 2015-Güz döneminde 5/5 ortamında anter kültüründen elde edilen sonuçlar

Çeşitler	Kültüre Alınan Anter Sayısı	Gelişen Anterler		Kallus Oluşumu		Embriyo Oluşumu		Bitki Oluşumu	
		adet	%	adet	%	adet	%	adet	%
Aydın Siyahı	922	788	85.5	490	53.1	268	29.1	171	28.1
Kemer	1323	1040	78.6	450	34.0	472	35.7	394	33.8

Farklı C ortamlarında (0.01 mg/l 2.4-D + 0.01 mg/l Kinetin + 30 g/l sakaroz + 7 g/l agar, 1 mg/l 2.4-D +1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz + 7 g/l agar, 5 mg/l 2.4-D +5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz+ 7 g/l agar) kültüre alınan Aydın Siyahı ve Kemer çeşidinin anterlerinin kallus büyüklükleri bakımından oldukça anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. C ortamına uygulanan 2.4 D, Kinetin ve sakaroz dozlarının artmasıyla hem kallus miktarı hemde kallus irilikleri artmıştır. 5 mg/l 2.4-D + 5 mg/l Kinetin uygulanan C ortamındaki (5/5) Kemer çeşidinin anterlerinden çok küçük (1) kallus sayısı en fazla olurken, çok büyük kallusların (5) sayısı en fazla 5 mg/l 2.4-D + 5 mg/l Kinetin uygulanan C ortamında Aydın Siyahı anterlerinden elde edilmiştir (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. 2015-Güz döneminde anter kültüründen elde edilen kallus büyüklükleri

Çeşitler	C ortamı	Kallus Büyüklüğü				
		1	2	3	4	5
Aydın Siyahı	**0.01/0.01**	13	3	3	0	0
	1/1	126	106	64	18	12
	5/5	180	135	89	41	46
Kemer	**0.01/0.01**	25	1	0	1	0
	1/1	102	77	50	28	19
	5/5	216	92	57	45	37
Toplam		662	414	263	133	114

Not: 1 çok küçük; 2 küçük; 3 orta; 4 büyük; 5 çok büyük

Anter kültüründe oluşan kallusların embriyogenik karekterli olması, kallustan bitki oluşmasını desteklemektedir. Çalışmanın bu döneminde anter kültüründen elde edilen bitkilerin oldukça fazla oluşu, dağılgan kallusların fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Tüm uygulamalarda (0.01/0.01, 1/1 ve 5/5) ve çeşitlerde (Aydın Siyahı ve Kemer) oluşan kallluslar en fazla dağılgan tipte olmuştur. En fazla dağılgan sarı renkli kallus 5/5 uygulamasında Aydın Siyahı çeşidinden (163 adet)elde edilirken bunu yine 5/5 uygulamasında Kemer çeşidi (128 adet) izlemiştir (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23**.** 2015-Güz döneminde anter kültüründen elde edilen kallus tipi ve rengi

Çeşitler	**C ortamı**	**Kallus Tipi ve Rengi**							
		Dağılgan Sarı	**Dağılgan Beyaz**	**Dağılgan Sarı-yeşil**	**Dağılgan beyaz-yeşil**	**Unsu Beyaz**	**Kompakt Yeşil**	**Kompakt sarı**	**Kompakt Yeşil-beyaz**
Aydın Siyahı	**0.01/0.01**	5	1	-	-	-	1	-	1
	1/1	158	7	26	5	6	3	-	6
	5/5	163	104	57	19	16	4	2	16
Kemer	**0.01/0.01**	3	1	1	-	-	-	-	-
	1/1	71	57	34	43	3	7	4	-
	5/5	128	19	52	4	2	15	4	-

2015 güz döneminde Ekim ayı boyunca serada yetiştirilen patlıcanlardan alınan anterden, hem direkt bitki oluşumu (Şekil 4.17) hemde indirekt bitki (Şekil 4.18) oluşumunda oldukça yüksek başarı sağlanmıştır (Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21). 2015-Güz döneminde anter kültüründen elde edilen bitkilerin viyollere aktarılan bitki sayısı 501, araziye aktarılan bitki sayısı ise 90 adet olmuştur (Çizelge 4.24, Şekil 4.16). 1/1 uygulamasında Kemer çeşidinde bitki elde edilemezken Aydın Siyahı çeşidinden 19 bitki *İn vitro* ortamdan dış ortama

aktarılmış (Şekil 4.22) ve bunların 6'sı araziye şaşırtılmıştır. Gerek viyollere (171 bitki) gerek araziye şaşırtılan (27 bitki) en fazla bitki sayısı Aydın Siyahı çeşidinin 1/1 uygulamasından elde edilmiştir. Bunu Kemer çeşidinin 5/5 uygulaması takip etmiştir (sırasıyla, viyollere 124, araziye 22 bitki).

İçerisinde olgunlaşmamış çiçek tozlarını (mikrospor) bulunduran anterlerin tomurcuklardan izole edilerek *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına alınması ve burada mikrosporlardan haploid embriyoların elde edilmesine anter kültürü adı verilmektedir (Ellialtıoğlu, 2010). Anter kültürlerinde asıl amaç, ıslah çalışmalarında homojen yapıda başlangıç materyali elde etmektir. Ancak bizim çalışmamızdaki amacımız ise patlıcanda anter kültürü protokolünün oluşturularak *Solanum melongena* ve *Solanum torvum* arasında somatik hibridizasyon yoluyla elde edilebilecek bitkileri fertil dihaploid bitkilere dönüştürmektir. Böylelikle somatik hibridizasyondan elde edilecek tetraploid bitkiler dihaploid bitkilere dönüştürülmesi sağlanacaktır. Benzer bir çalışmada, Rizza ve ark. (2002), patlıcan ve *Solanum aethiopicum gilo* arasında somatik hibritlerin anter kültürlerinden dihaploid bitkiler elde etmişlerdir. Dihaploid androjenik bitkilerde polen canlılığının somatik hibritlere göre önemli bir şekilde azaldığını tespit etmişlerdir. Ancak dihaploidlerin çoğunun partenokarpik meyveler ürettiğini belirlemişlerdir. *Solanum aethiopicum Gilo* ve somatik hibritler *Fusarium oxysporum* f sp. *melongenae* tarafından sebep olunan fungal hastalığa tam direnç gösterdiği bildirilmiştir.

Patlıcanda kültür çeşitleri ve yabani türlerde anter kültüründe çok sayıda başarılı çalışmalar yapılmıştır. Ellialtıoğlu (2000), anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerin, genotip, dönor bitkinin yetişme koşulları, anterlerin gelişme koşulları, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı, inkübasyon koşulları olduğunu bildirmiştir. Rotino (1996), patlıcanda haploid bitki üretimine yol açan doğal parthenogenesis olmadığını bildirmiştir. Başay ve ark. (2010), anter kültürüle Bonica F_1 çeşidi % 14.29 oranında bitki ettiklerini, *S. torvum* ve *S. sodomeum* türlerinde anter kültüründe başarılı olunamadığını

belirlemişlerdir. Ayrıca anter kültüründe genotip etkisinin yanı sıra donör bitkinin yetişme koşullarının, anter kültüründen alınan sonucu etkileyen önemli bir faktör olduğunu tespit etmişlerdir. Alpsoy ve Şeniz (2007), anter kültürüyle Urfa Yerlisi çeşidinden % 3.67 oranında bitki elde etmişlerdir. Başay ve ark (2011), yaz döneminde yetiştirilen patlıcanlardan elde edilen tomurcuklarla kurulan anter kültüründe, embriyo oluşumunun daha yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. Anter kültürü ile haploid bitkiler elde ettikten sonra, *in vitro* koşullar altında dihaploid bitkiler elde etmek için 1 saat veya 2 saat boyunca % 0.5 ve % 1 konsantrasyonlarda kolhisin uygulamışlardır. Matsubara ve ark. (1992), tek çekirdekli mikrospor aşamasında alınan anterleri farklı 2.4 D ve kinetin dozları içeren MS ortamında kültüre almışlar ve daha sonra yüksek ve düşük sıcaklığa maruz bırakılmışlardır. Başay ve Ellialtıoğlu (2013), anter kültüründe kullanılan çiçek tomurcuklarının, yeşilimsi-sarı anterleri içeren çiçek tomurcukları, petallerin görünür olmadığı bir çiçek boyutuna eş değer zaman olarak düşünülen tek çekirdekli mikrosporun son aşamasında iken almışlardır. Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz (2000), Kemer patlıcan çeşidinde tomurcuklara uygulanan soğuk şoku ve besin ortamına katılan aktif kömürün, patlıcan anterlerindeki ABA miktarını azaltırken, embriyogenesise olumlu etki yapmadığını belirlemişlerdir.

Dumas De Vaulx ve Chambonnet (1982), + 35 °C'de karanlıkta inkübe edilen anterlerden gelen bitkilerin üretiminin, *in vitro* kültürün ilk 8 gününde + 25 °C'de kültüre alınan anterlerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde artırdığını tespit etmişlerdir (sırasıyla her 100 anterde 12.0 ve 3.4 bitki, çeşitli kültür ortamlarında alınan veriler). Bazı 2,4 D ve kinetin konsantrasyonlarında, sıcaklık uygulamasının anterden bitkiye dönüşümü artırdığını belirlemişlerdir. En iyi sonuçların +35°C'de 8 günde 0.01 mg/l 2,4 D ve kinetin uygulmasından elde etmişlerdir. Her 100 kültüre alınan anterlerden 25 – 30 bitki oluştuğunu belirlemişlerdir. Kültürden 12 gün sonra oksin içermeyen ve 0.1 mg/l kinetin içeren yeni besin ortamına aktarılması gerektiğini vurgulamışlardır. Anterden türetilen bitkilerin % 15-50'si

diploid olduğunu bildirmişlerdir. Fakat ilk kültür ortamında 2,4 D yerine IAA kullanımı ile sadece haploid bitkiler elde edildiğini belirlemişlerdir.

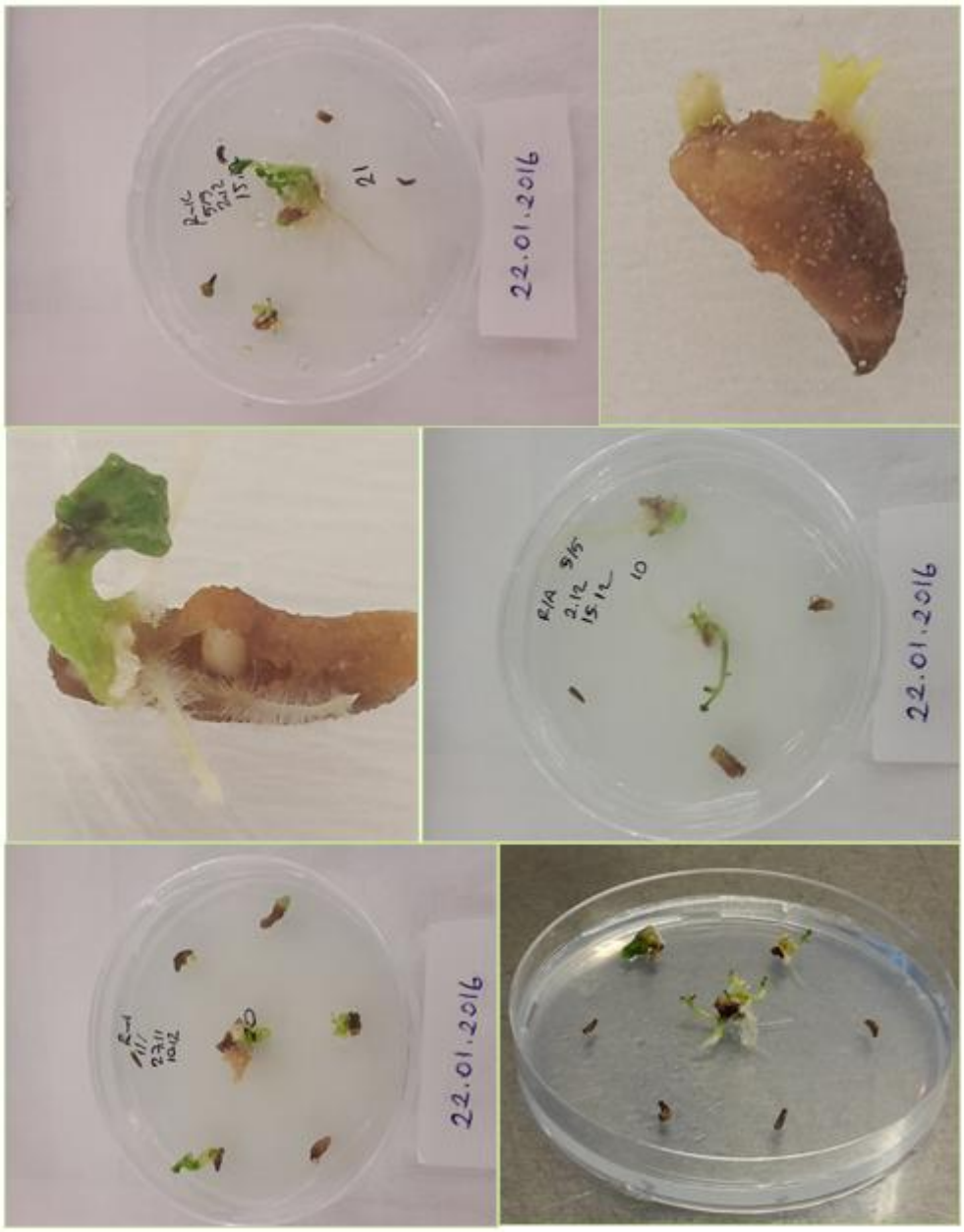
Anter kültürü çalışmalarımızın her döneminde kullanılan ve 2015 yılı güz döneminde biraz modifiye edilerek kullanılan Dumas De Vaulx ve Chambonnet (1982), anter kültür ortamı, patlıcanda anter kültürü çalışmalarının çoğuna temel teşkil etmiştir. Modifiye edilmiş Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'nın kullandıkları ortamda anter kültürü çalışmalarında oldukça yüksek bitki eldesi sağlanmıştır. (her 100 anterde 36.4 bitki).

Çizelge 4.24**.** 2015-Güz döneminde anter kültüründen elde edilen bitkilerin dış ortama alınması

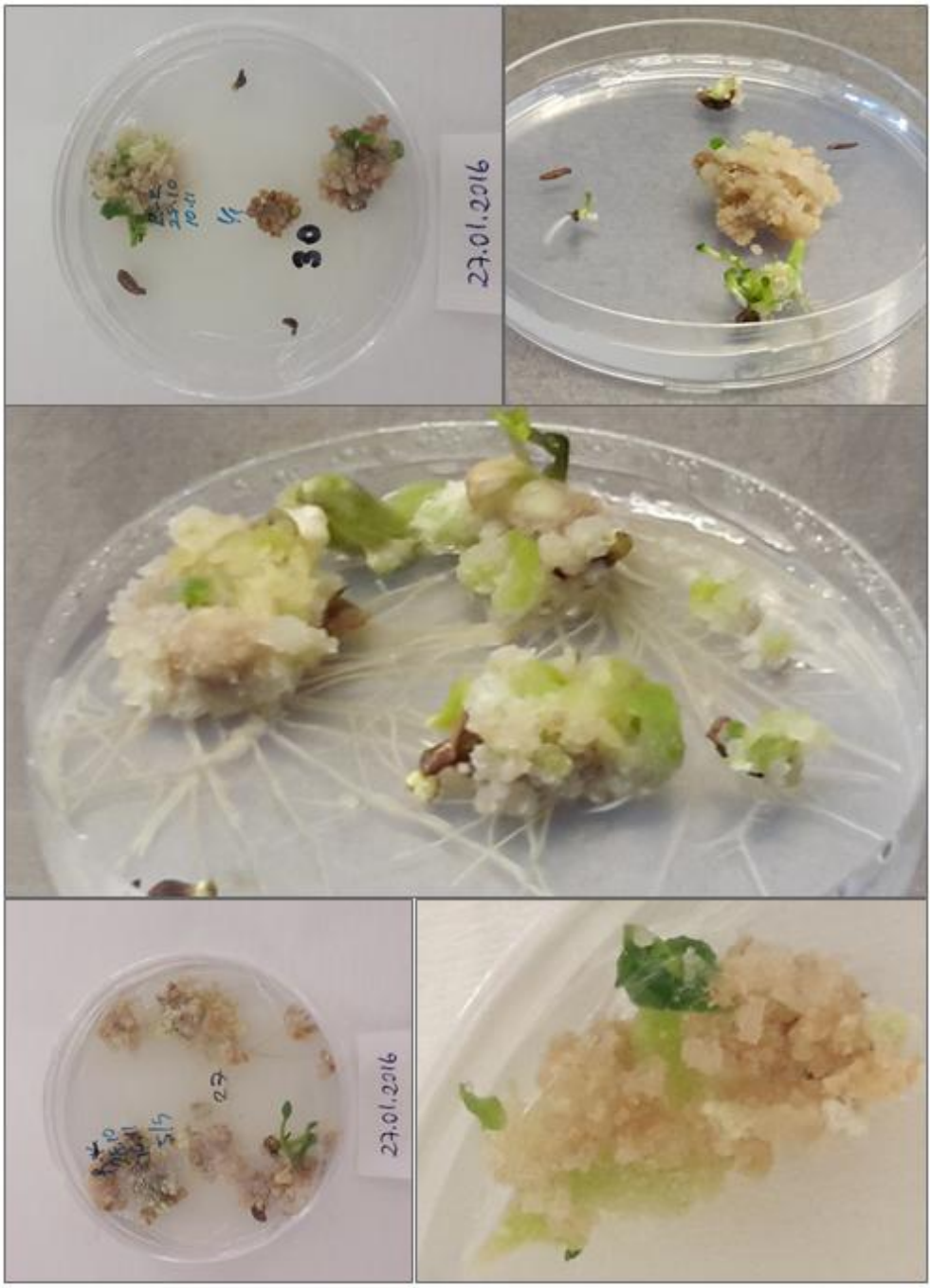
Çeşitler	**C ortamı**	**Viyollere aktarılan bitki sayısı**	**Araziye aktarılan bitki sayısı**
Aydın Siyahı	**0.01/0.01**	19	6
	1/1	171	27
	5/5	115	22
Kemer	**0.01/0.01**	-	-
	1/1	72	13
	5/5	124	22
TOPLAM		**501**	**90**



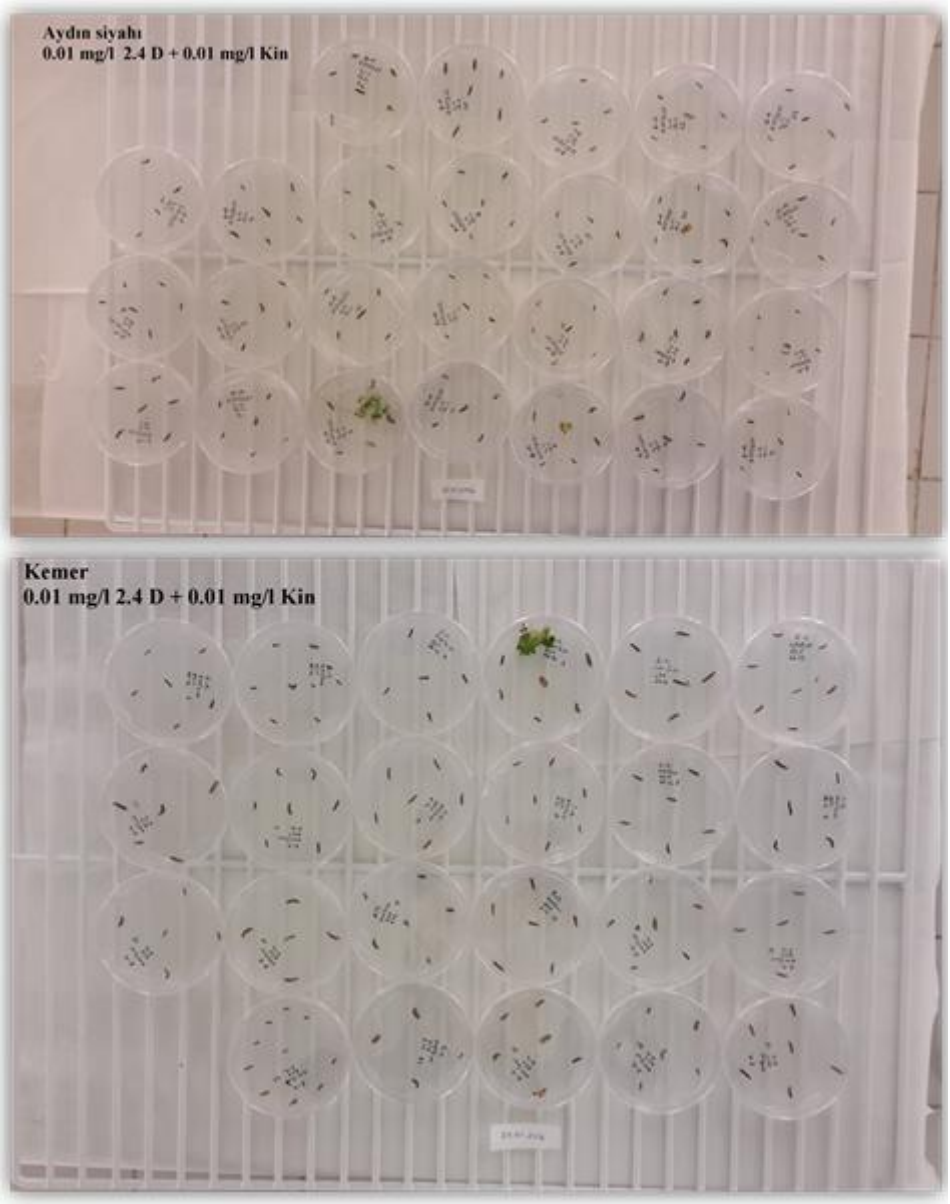
Şekil 4.16**.** Anter kültüründen elde edilen bitkileri dış ortama alıştırma



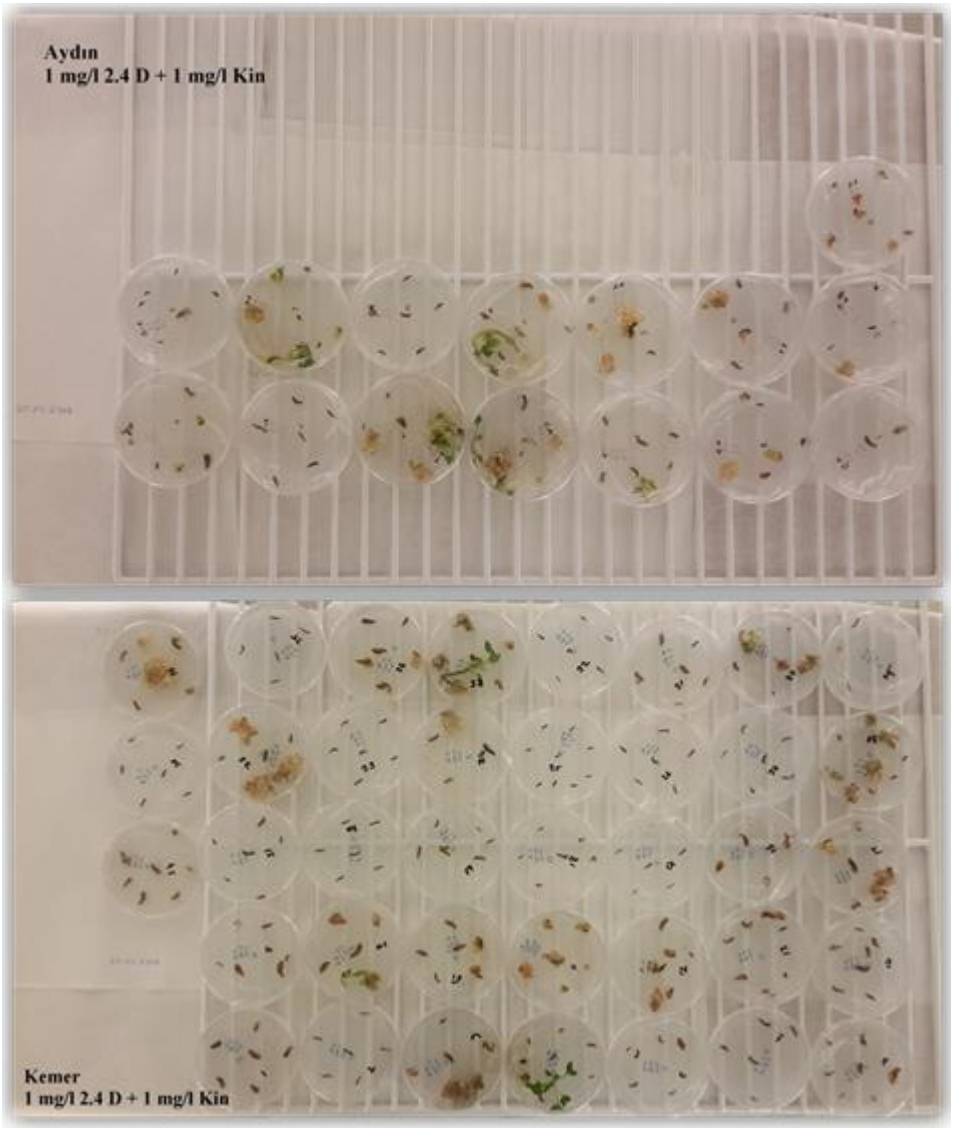
Şekil 4.17**.** Anterlerden direkt bitki oluşumu



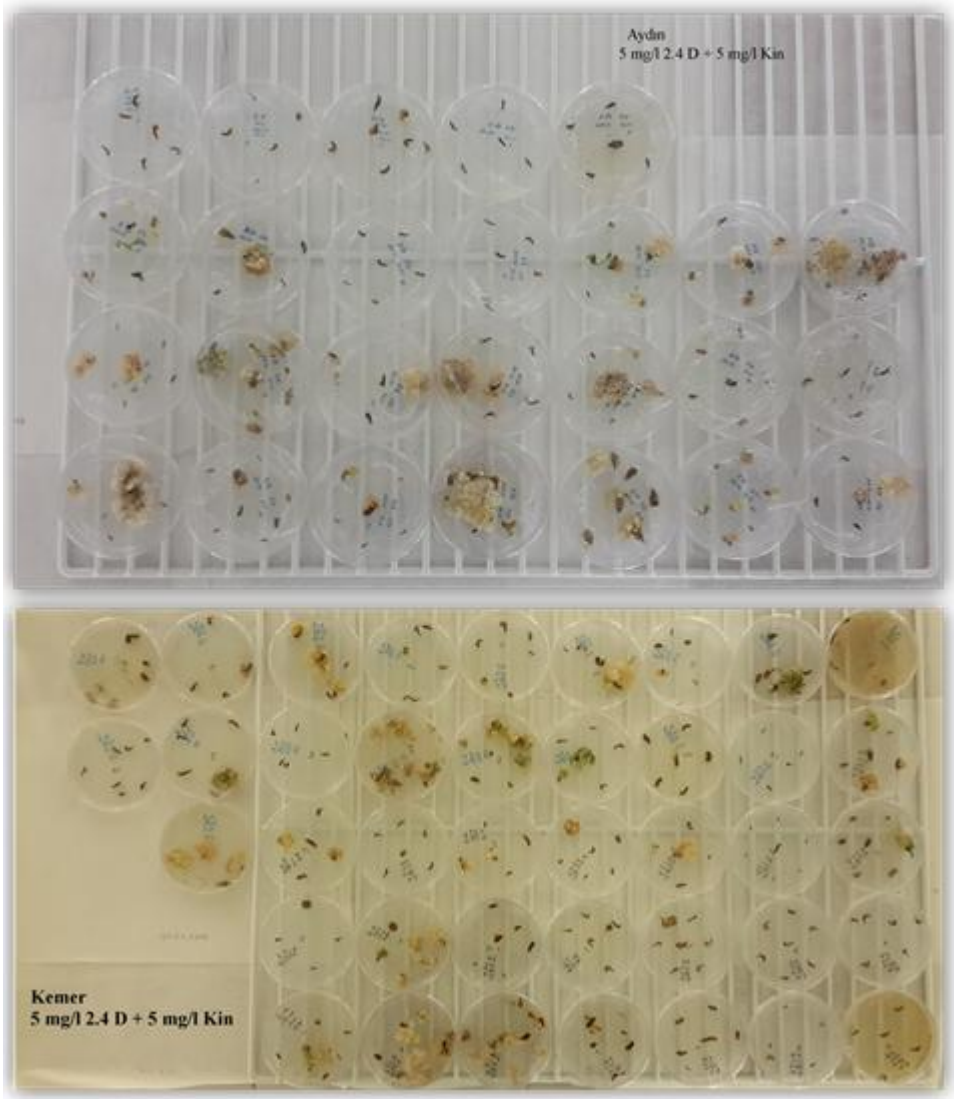
Şekil 4.18**.** Anterlerden indirekt bitki oluşumu



Şekil 4.19. 0.01 mg/l 2.4-D + 0.01 mg/l Kinetin + 30 g/l sakaroz içeren ortamda (0.01/0.01) patlıcan anterlerinin gelişimi



Şekil 4.20. 1 mg/l 2.4-D + 1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakaroz içeren ortamda (1/1) patlıcan anterlerinin gelişimi



Şekil 4.21. 5 mg/l 2.4-D + 5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakaroz içeren ortamda (5/5) patlıcan anterlerinin gelişimi



Şekil 4.22. 2015 güz yarıyılında anter kültüründen elde edilen bitkilerin araziye şaşırtılması

4.1.8. Flow sitometri yöntemiyle ploidy seviyesinin belirlenmesi ile ilgili bulgular

Anter kültüründen elde edilen ve ploidi seviyesi incelenen 79 bitkiden, 60'ı haploid, 13'ü diploid, 4'ü triploid, 1'i tetraploid ve 1'i mixoploid olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.25). Çizelge 4.24'de ploidi seviyesi belirlenen bitkilerin 26 tanesi Aydın Siyahı 1/1, 20 tanesi Aydın Siyahı 5/5, 23 tanesi Kemer 5-5 ve 8 tanesi Kemer 1/1 uygulamasından elde edilmiştir.

Çizelge 4.25**.** 2015-güz döneminde anter kültüründen elde edilen bitkilerin ploidi seyiyeleri

Kontrol	Diploid	**Ayd 1-1**	Haploid	**Kem 5-5**	Diploid
Ayd 5-5	Diploid	**Ayd 1-1**	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 5-5	Triploid	**Ayd 5-5**	Haploid	**Kem 1-1**	Haploid
Ayd 1-1	Haploid	**Ayd 5-5**	Haploid	**Kem 1-1**	Haploid
Ayd 5-5	Haploid	**Ayd 1-1**	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 1-1	Haploid	**Ayd 1-1**	Haploid	**Kem 1-1**	Haploid
Ayd 1-1	Tetraploid	**Ayd 1-1**	Haploid	**Kem 1-1**	Haploid
Ayd 1-1	Triploid	**Ayd 1-1**	Haploid	**Kem 1-1**	Diploid
Ayd 5-5	Haploid	**Ayd 1-1**	Haploid	**Kem 5-5**	Diploid
Ayd 1-1	Haploid	**Ayd 5-5**	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 1-1	Haploid	**Ayd 5-5**	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 1-1	Triploid	**Ayd 5-5**	Haploid	**Kem 5-5**	Mixoploid
Ayd 1-1	Haploid	**Ayd 5-5**	Haploid	**Kem 5-5**	Diploid
Ayd 1-1	Haploid	**Ayd 5-5**	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 5-5	Haploid	**Ayd 5-5**	Diploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 1-1	Haploid	**Ayd 5-5**	Diploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 1-1	Haploid	**Ayd 1-1**	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 5-5	Haploid	**Ayd 1-1**	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 5-5	Triploid	**Ayd 5-5**	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 5-5	Diploid	**Ayd 5-5**	Diploid	**Kem 5-5**	Diploid
Ayd 5-5	Haploid	**Ayd 1-1**	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 0.01/0.01	Haploid	**Kem 5-5**	Diploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 0.01/0.01	Haploid	**Kem 1-1**	Haploid	**Kem 5-5**	Diploid
Ayd 1-1	Haploid	**Kem 1-1**	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid
Ayd 1-1	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid		
Ayd 1-1	Haploid	**Kem 5-5**	Haploid		
Ayd 1-1	Haploid	**Kem 1-1**	Haploid		
Ayd 1-1	Haploid	**Kem 5-5**	Diploid		

4.2. *İn vitro* tozlama ve dölleme ile ilgili sonuçlar

Tür içi ve türler arası tozlanma ve döllenme problemlerine alternatif bir çözüm olan *in vitro* tozlanma ve döllenme yöntemi *Solanum melongena* ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemelerle denenmiştir.

4.2.1. Stigma tozlanması ve döllenmesi

4.2.2. Plesanta (Ovaryum) döllenmesi

Her iki yöntemde de, MS besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamına oksin olarak NAA sitokinin olarak BAP eklenmiştir. Oksin/sitokinin (mg/l) dengesi 1/1, 1/2, 2/1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her melez kombinasyondan petride 5 dişi organ/plesenta olacak şekilde 4 tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır.

Stigma tozlama ve döllemesinde kesim yüzeyinden meydana gelen salgıları engellemek için ayrıca MS ortamına 0.5 mg/l aktif karbon eklenerek de deneme kurulmuştur.

İn vitro tozlama çalışmasında kallus gelişimi, yumurtalık irileşmesi ve bitki gelişimi belirlenmiştir (Şekil 4.23). Çizelge 4.26'da verilen sonuçlara göre, *in vitro* ortamda *Solanum torvum* ile *Solanum melongena* arasındaki melezleme çalışmalarında en fazla kallus gelişimi 1 mg/l NAA / 2 mg/l BAP içeren ortamda (11 adet) Aydın Siyahı x *Solanum torvum*'un ovaryum döllemesinden elde edilmiştir. Yine aynı şekilde en fazla yumurtalık/yumurta irileşmesi (11 adet) de 1 mg/l NAA / 2 mg/l BAP içeren ortamda Aydın Siyahı x *Solanum torvum*'un ovaryum döllemesinden meydana gelmiştir. Kemer çeşidi dişi ebeveyn olarak kullanıldığında her iki *in vitro* tozlama dölleme yönteminde de kallus gelişimi meydana gelmemiştir. *Solanum torvum* dişi ebeveyn olarak kullanıldığında daha fazla kallus elde edilmiştir (Çizelge 4.26)

Aktif karbon ilave edilmiş Aydın Siyahı x *Solanum torvum* ve Kemer x *Solanum torvum* stigma tozlamalarında denenen bütün ortamlarda kallus gelişimi ve yumurtalık irileşmesi meydana gelmiştir (Çizelge 4.27 ve Şekil 4.24).

Denemede *in vitro* koşullarda resiprokal melezlemelerle tozlama ve dölleme yaparak kalluslar elde edilmiş ve gelişen kalluslar alt kültürlere alınmasına rağmen bitki elde edilememiştir.

Boyacı'nın (2001) bildirdiğine göre, Hatipoğlu (1993), *in vitro* tozlanma ve döllenme tekniklerinin üç şekilde uygulandığını belirtmiştir: Stigma tozlanması ve döllenmesi, plesanta döllenmesi ve izole edilmiş yumurtanın *in vitro* döllenmesi. *İn*

vitro tozlanma ve döllenme tekniklerinin sebze ıslahında kullanım alanlarının ise, kendine uyuşmazlığın önlenmesi, melezlenme uyuşmazlığının önlenmesi, haploid bitkilerin elde edilmesi, çiçek veya yumurtalığın ana bitki üzerinde olgunlaşmadan döküldüğü durumlarda tohum elde edilmesi, döllenme fizyolojisinin incelenmesi amacıyla da kullanılıdığını bildirmiştir.

İn vitro tozlama ve dölleme tekniği ile tür içi ve türler arası hibritlerin elde edilmesi yanında döllenme problemi olan bazı türlerde çözüm olabileceği bildirilmektedir (Taji, ve Williams, 2004; Stewart, 1981; Kranz ve Dressethaus, 1996).

Douglas (1990), kendine uyuşmaz türlerin *in vitro* ortamda kendilenmelerine ve türler arası melezlemeye olanak sağlayabileceğini vurgulamıştır. *İn vitro* tozlama aynı zamanda partenogenesis ve haploid bitki eldesine olanak sağladığını bildirmiştir.

Faure ve ark (1994),. beslenme ve çevresel koşulların tanımlanmasına olanak tanıyan *in vitro* tozlama yöntemi, dölleme süreci üzerindeki çevresel stres etkilerinin incelenmesi için uygun bir teknik olduğunu ifade etmişlerdir.

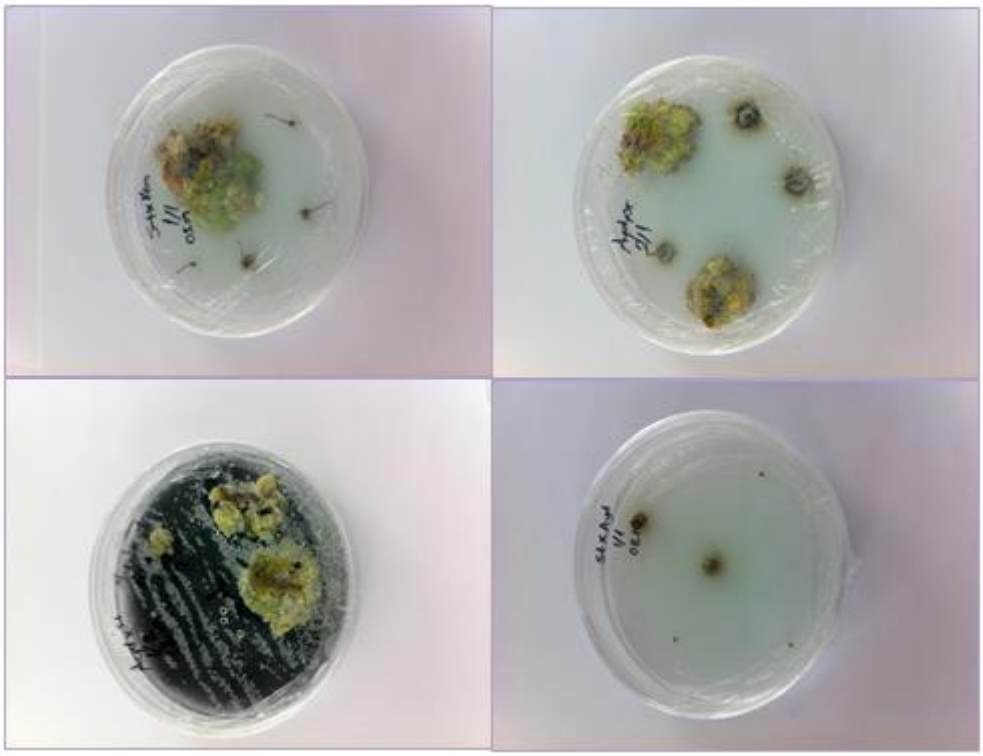
Çalışmanın bu kısmında türler arası melezlemeye olanak sağlayabilen *in vitro* tozlama dölleme yöntemleriyle, *Solanum torvum* ile *Solanum melongena* arasında resiprokal melezlemeler yapılarak iki tür arasında somatik hibrit bitkiler elde edilmeye çalışılmıştır. Daha önce *in vitro* tozlama ve dölleme ile ilgili çok fazla çalışma olmadığından *in vitro* ortamda farklı büyüme regülatörleri kullanılarak protokol oluşturulmaya çalışılmıştır. Çalışmada denenen 1/1, 1/2, 2/1 oranlarında NAA/BAP içeren MS ortamlarında kallus ve yumurtalık/yumurta irileşmesi istenilen düzeyde olmamış ancak çalışmamızda *in vitro* ortamda tozlama ve dölleme çalışmalarında yetiştirme ortamına aktif kömür ilavesinin olumlu etkilerinin olduğunu söyleyebiliriz. Patlıcanda *in vitro* ortamda farklı büyüme regülatörleri kullanılarak *in vitro* tozlama dölleme yöntemine protokol oluşturulması gerekmektedir.

Çizelge 4.26**.** *İn vitro* tozlama/dölleme ile melezleme

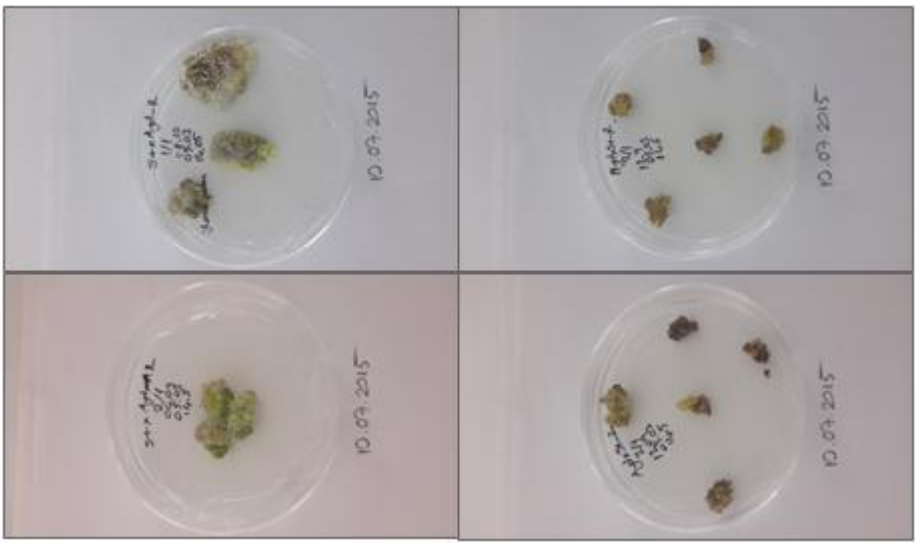
Ortamlar	*İn vitro* tozlama/ dölleme	Ovaryum/tozlama sayısı	Kallus gelişimi	Yumurtalık/yumurta irileşmesi
Ayd x St 1 NAA / 1 BAP	Stigma	20	-	-
	Ovaryum	20	-	-
Ayd x St 1 NAA / 2 BAP	Stigma	20	-	-
	Ovaryum	20	11	11
Ayd x St 2 NAA / 1 BAP	Stigma	20	2	2
	Ovaryum	20	-	-
Kem x St 1 NAA / 1 BAP	Stigma	20	-	-
	Ovaryum	20	-	-
Kem x St 1 NAA / 2 BAP	Stigma	20	-	-
	Ovaryum	20	-	-
Kem x St 2 NAA / 1 BAP	Stigma	20	-	-
	Ovaryum	20	-	-
St x Ayd 1 NAA / 1 BAP	Stigma	20	4	4
	Ovaryum	20	5	2
St x Ayd 1 NAA / 2 BAP	Stigma	20	-	-
	Ovaryum	20	5	3
St x Ayd 2 NAA / 1 BAP	Stigma	20	1	1
	Ovaryum	20	-	-
St x Kem 1 NAA / 1 BAP	Stigma	20	3	1
	Ovaryum	20	5	2
St x Kem 1 NAA / 2 BAP	Stigma	20	1	1
	Ovaryum	20	2	5
St x Kem 2 NAA / 1 BAP	Stigma	20	-	-
	Ovaryum	20	-	-

Çizelge 4.27**.** Stigma tozlamasında aktif karbon ilave edilmiş ortamlar

Aktif karbon Stigma	Ovaryum sayısı	Kallus gelişimi	Yumurtalık irileşmesi
Ayd x St 1 NAA / 1 BAP	25	2	3
Ayd x St 1 NAA / 2 BAP	20	3	5
Ayd x St 2 NAA / 1 BAP	20	9	8
Kem x St 1 NAA / 1 BAP	24	9	5
Kem x St 1 NAA / 2 BAP	20	1	1
Kem x St 2 NAA / 1 BAP	25	9	5



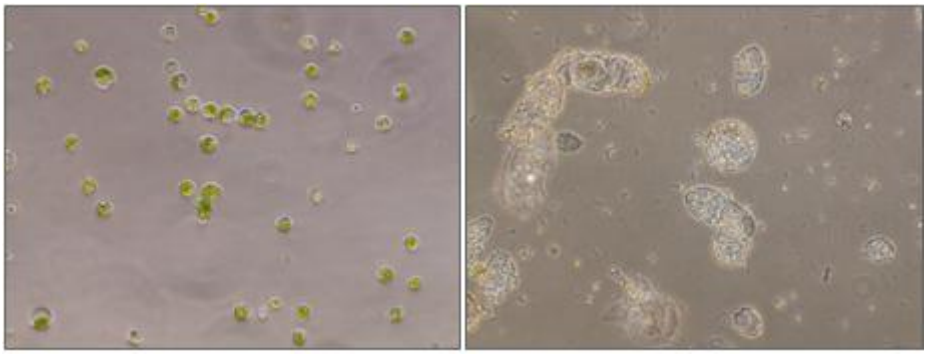
Şekil 4.23**.** *İn vitro* melezlemelerden meydana gelen kalluslar



Şekil 4.24**.** Alt kültüre alınmış *in vitro* melezlemelerden meydana gelen kalluslar

4.3. Patlıcanda protoplast füzyonu protokolü oluşturulması ile ilgili sonuçlar

Protoplast füzyonunda kullanılması planlanan rejenerasyon kabiliyeti yüksek kallus veya genç bitkilerin çalışmaya başlamadan önce hazır olması gerekmektedir. *İn vitro* ortamda elde edilen ebriyogenik kalluslar ile *Solanum melongena*'nın genç yaprakları protoplast kaynağı olarak kullanılmıştır (Şekil 4.25).

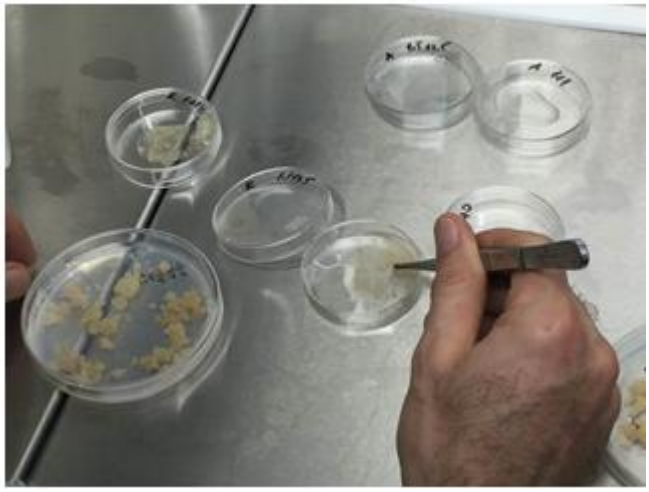


Şekil 4.25**.** Patlıcan yaprak ve kalluslarından izole edilen protoplastlar

4.3.1. Embriyogenik kalluslar ve yaprak mezofil protoplastlarının izolasyonuna ait sonuçlar

Grosser ve Gmitter (2011), Embriyogenik kallus veya süspansiyon kültüründen, protoplast izolasyonu için kullanılan hücrelerin, bölünme fazında olması gerektiğini bildirmişlerdir. Kalluslar için en iyi sonuçların, 2 hafta alt kültüre alınmış 4-12 günlük eksplantlar olduğunu belirtmiştir. Patlıcanda kalluslardan ve yaprak mezofil hücrelerinden en yüksek sayıda protoplast izolasyonu sağlamak için farklı enzim (1, 1.5 ve 2) ve BH3 kombinasyonları (2.5, 4 ve 8 ml) denenmiştir. Kalluslar için en iyi kombinasyonun 1.5 ml enzim solusyonu + 2.5 ml BH3 kültür ortamı, yaprak mezofil hücreleri için en iyi kombinasyonun 1.5 ml enzim solusyonu + 4 ml BH3 kültür ortamı kullanımının en yüksek protoplast verimliliğini sağladığı belirlenmiştir.

Genotiplere ait embriyogenik kalluslardan yaklaşık 400 mg dağılgan (Şekil 4.26) yapıda olan hücreler seçilerek 60 x15 mm'lik petri kaplarına aktarılmıştır. Kallus hücreleri üzerine 1,5 ml 0.7 M BH3 protoplast kültür ortamı, yaprak mezofil hücreleri için 0.6 M BH3 protoplast kültür ortamı kullanılmıştır.

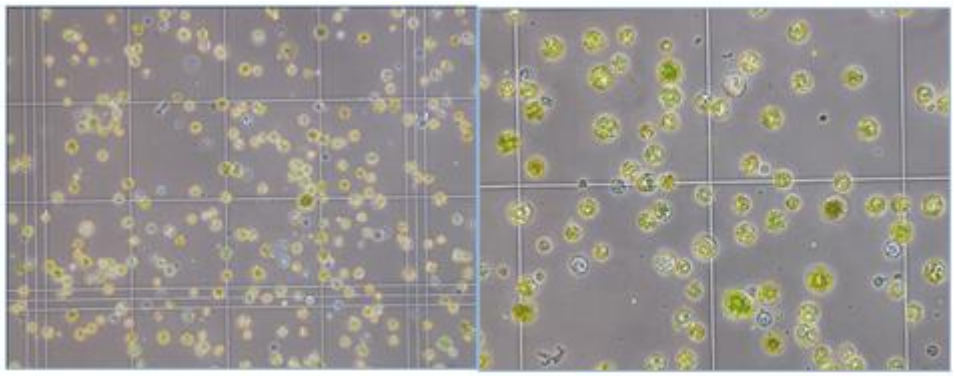


Şekil 4.26**.** Embriyogenik kallusların BH3 çözeltisinde dağılması

4.3.2. Protoplastların saflaştırılması ve sayımı

BH3 + enzim solüsyonunda bekletilen petri kapları içerisinde protoplast hücreleri ile birlikte yaprak parçaları da bulunduğu için protoplastları diğer dokulardan ayırmak amacıyla protoplast saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işleminde filtrasyon ve santrifüj yöntemleri kullanılmıştır.

Protoplast sayımında kullanılan lam üzerinde hacmi belli olan kutucuklar yer almaktadır. Bu lam üzerine 1 ml protoplast çözeltisinden bir damla damlatılarak sayım preparatı oluşturulmuş (Şekil 4.27) ve mikroskop altında yıkama sonrası protoplast varlığı belirlenmiştir (Şekil 4.28) (Dambier ve ark., 2011).



Şekil 4.27**.** İzole edilen protoplastların yoğunluğunun tespiti

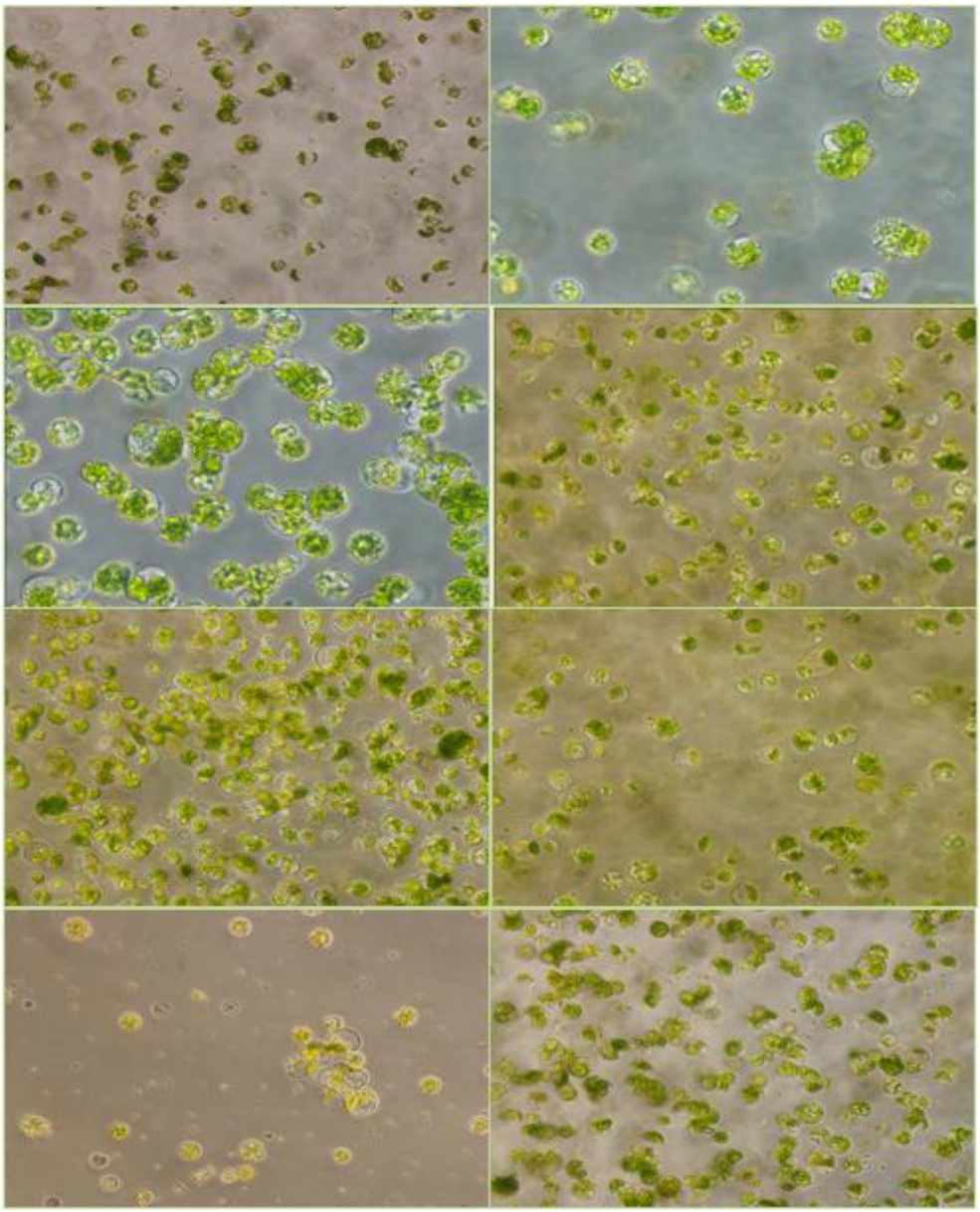


Şekil 4.28**.** Binoküler mikroskopta protoplastların kontrolü ve sayımı

4.3.3. PEG yöntemiyle protoplastların füzyonu ile ilgili bulgular

PEG (polietilen glikol) yöntemiyle protoplast füzyonu için protokol, basit, verimli, ucuz ve bitki protoplastlarına toksik olmayan bir protokoldür (Grosser ve Gmitter, 2011). Elektrofüzyon yöntemi de oldukça başarılıdır (Guo ve Deng 1998).

PEG yöntemiyle birleştirilen protoplastlar (Şekil 4.29), EMEP katı ortamı üzerine 8-12 damla ortam eklenerek petri kaplarında karanlık koşullarda kültüre alınmıştır.



Şekil 4.29**.** PEG plus (A+B) solüsyonundan sonra protoplasların füzyonu

Kültürden 4-6 hafta sonra birleşmeye başlayan protoplast hücrelerinden mikro kalluslar gözlenmiştir (Şekil 4.30). Ancak mikro kalluslardan sonra gelişim elde edilememiştir. Benzer şekilde türler arası somatik melezleme çalışmasında,

Geerts ve ark. (2008), *Phaseolus vulgaris* L. (PV) ile iki donör tür *Phaseolus coccineus* L. (PC) veya *Phaseolus polyanthus Greenm*'in (PP), türleri arasında hem elektrofüzyon hemde PEG yöntemiyle hem heterokaryonların bölünmeleri hem de heterokaryondan mikrokallus oluşumunun gözlendiğini bildirmişlerdir.

Aka Kaçar (2011)'ın bildirdiğine göre, selülozik yapıdaki hücre çeperleri, mekanik ya da enzimatik yollarla çıkarılmış olan hücrelere "protoplast" denilmektedir. Protoplast kültürünü ise, izole edilen protoplastların, hücre modifikasyonu ve somatik hibridizasyon yöntemleriyle, bitki tür ve çesitlerinin geliştirilmesi amacına yönelik olarak, uygun besin ortamlarında kültüre alınması olarak tanımlamıştır.

Patlıcanın kültür formu ile yabani akrabaları arasında yapılan melezlemelerde seksüel uyuşmazlıklara bağlı olarak başarı sınırlıdır (Sekara ve ark., 2007). Patlıcanın dayanıklılık kaynağı olarak kullanılacak olan akraba türleri ile melezlemelerde sorunlar yaşanması sebebiyle kullanılan geleneksel bitki ıslah yöntemleriyle çok önemli bir ilerleme sağlanamamıştır (Kumar ve ark., 1998). Bu nedenle, patlıcanın kültür formlarına yabani formlarından gen aktarmak için biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır (Kashyap ve ark., 2003). Biyoteknolojik yaklaşımlar çeşit geliştirme çalışmalarında kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Sekara ve ark., 2007). Patlıcanın dokuları embriyo kurtarma, *in vitro* seleksiyon, somatik hibridizasyon ve genetik transformasyon gibi biyoteknolojik çalışmalar için genetik potasiyele sahiptir (Magioli ve Mansur, 2005). Patlıcanın (*Solanum melongena* L.) protoplastlarının rejenerasyon yeteneği yüksektir ve bu türler arası melezlemede gerekli olan önemli bir özelliktir (Sihachakr ve ark., 1993). Patlıcan doku kültüründe, özellikle biyoteknoloji ve uygulama, somaklonal varyasyon, haploidizasyon, somatik hybridizasyion ve gen transferi için büyük bir potansiyele sahiptir. Rotino ve ark (2002), birkaç *Solanum* spp'de protoplast füzyonu yoluyla somatik melezler elde edildiğini bildirmiştir. Somatik hibridizasyon, hem nükleer hem de sitoplazmik bileşiklerin (deoksiribonükleik asit) rekombinasyonuna izin verebileceğini, bu nedenle, genetik değişkenliği genişletmek için somatik

hibridizasyonun güçlü bir araç olduğunu ve yabani akrabalarından patlıcan gen havuzuna yararlı genler aktarmaya olanak sağlayabileceğini ifade etmişlerdir.

Kashyap ve ark. (2003), somatik melezlemede kullanılan protoplast füzyonu patlıcanda seksüel uyuşmazlık durumunda türler arası melezlemede yararlı özellikleri transfer etmek için kullanıldığını bildirmişlerdir. Somatik hibritin en önemli avantajlarından birisi de çekirdek özelliklerin yanında ekonomik öneme sahip sitoplazmik özelliklerinde hibrite aktarılabilmesi olduğunu vurgulamışlardır.

Sihachakr ve ark (1988), patlıcanda türler arası somatik melezlemeler başarı ile uygulanabildiğini bildirmişlerdir. *Solanum melongena* L. ve *Solanum khasianum* arasında elektrofüzyon yolu ile somatik hibritler elde edildiğini belirtmişlerdir.

Guri ve ark (1987), *Solanum torvum*'un protoplastlarından kallus hücreleri başarılı bir şekilde rejenere edildiğini bildirmişlerdir. Guri ve Sink (1988a), protoplast füzyonu yöntemi ile *Solanum melongena* ve *Solanum nigrum* arasında türler arası melezleme gerçekleştirildiğini ve southern analizi ile hibridizasyonun gösterildiğini bildirmişlerdir.

Guri ve Sink (1988b), patlıcan (Black Beauty cv) ve *Solanum torvum*'un mezofil protoplastları (her ikisi de 2n = 2x = 24), Menczel ve Wolfe PEG/DMSO prosedürünün bir modifikasyonu kullanılarak füzyon yapmışlardır. Elde ettikleri 10 melez bitkiden alınan *in vitro* sürgünler *Verticillium* solgunluğuna dayanıklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Collonnier ve ark. (2003), *Solanum melongena* L. (2n = 2x = 24) ile *Solanum torvum* Sw'un (2n = 2x = 24) iki genotipi arasında toprak kökenli hastalıklardan *Ralstonia solanacearum* ve *Verticillium dahliae*'ye dayanıklılığın aktarımı için türler arası somatik melezler elde etmişlerdir. Tüm somatik hibritlerin, *Ralstonia solanacearum* ve *Verticillium dahliae*'ye orta veya yüksek derecede dayanıklı olduğunu tespit etmişlerdir.

Daunay ve ark. (1992), *Solanum melongena* ve *Solanum aethiopicum* group *Aculeatum* arasında fertil somatik hibritlerin elde edildiği bildirmişlerdir.

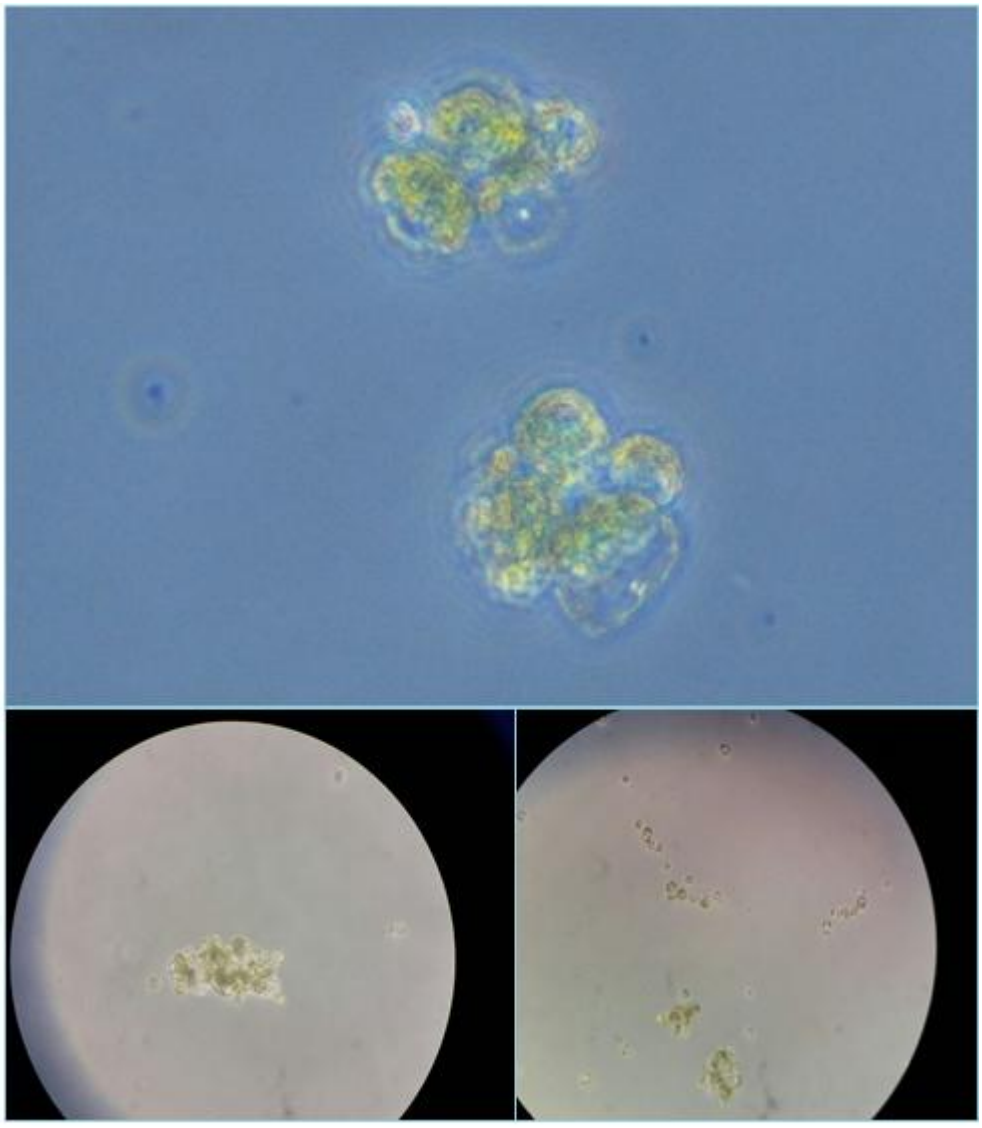
Yaprak mezofil hücreleri elektrofüzyon tekniğiyle melezlemişlerdir. Oluşan 85 kallustan oluşan 35 bitkinin 32 tetraploid, 1 hexaploid ve 2 mixoploid olduğunu belirtmişlerdir.

Borgato ve ark (2007b), *S. melongena* (2n = 2x = 24) ve çalımsı türlerden biri olan *Solanum marginatum*'un (2n = 2x = 24) yaprak protoplastları somatik hibridizasyon ile bir çalımsı çok yıllık bir türün elde edildiğini bildirmişlerdir. Toppino ve ark. (2008b), patlıcanın yabani akrabaları olan *Solanum aethiopicum* group *Gilo* ve *Solanum aethiopicum* group *Aculeatum* (*Solanum integrifolium*) ile kültür formu (*Solanum melongena* cv. Dourga) arasında somatik melezleme yapmışlar ve kültür formuna *Fusarium*'a dayanıklılık aktarılarak dayanıklılığı taşıyan genleri haritalamışlardır. Çalışmada kullanılan tetraploid somatik hibtritlerin protoplastların elektrofüzyonu ile elde edildiğini bildirmişlerdir.

Sihachakr ve ark. (1989), *Solanum melongena* ve *Solanum torvum* arasında mezofil protoplastları kullanılarak elektrofüzyon yolu ile somatik hibridizasyon gerçekleştirildiğini ve rejenere olan 124 bitkiden 19'unun hibridize olduğu ve bulardan 15'inin kromozom sayısının 46-48 arasında stabil kromozom sayısına sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Jarl ve ark. (1999), *Solanum melongena* ile *Solanum torvum* arasında protoplast füzyonu yaparak somatik hibritleri elde etmişlerdir. İki tür arasında uyuşmazlığı kaldırmak için *Solanum torvum*'un protoplastlarına ışın uygulamışlar, böylece fertil bireyler elde edilebildiğini tespit etmişlerdir. Tarla koşullarında *Verticillium*'a toleranslık gösteren toplam 12 bitkinin ıslah programına dahil edildiğini bildirilmişlerdir.

Solanum melongena ile yabani türler arasında çok sayıda somatik hibridizasyon çalışması ve dayanıklı bitkiler elde edilmesine rağmen patlıcanda *Fusarium* ve *Verticillium, Nematod'*a dayanıklı ticari bir çeşit geliştirilememiştir. Bu konudaki çalışmalar arttıkça fertil *Fusarium* ve *Verticillium, Nematod'*a dayanıklı ve kültür çeşitleri ıslah edilecektir.



Şekil 4.30**.** PEG yöntemiyle proplast füzyonu sonrası oluşan mikro-kalluslar

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemizde ve dünyada önemli miktarlarda yetiştiriciliği yapılan sebze türü olan patlıcanda hastalık ve zararlılara dayanıklı yeni çeşitlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Hastalıklar önemli verim kaybına sebep olmakta fungusitlerin pahalı olması, çevreye verdiği zarar ve hastalığı tamamen kontrol edememesi dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinin ve kullanılmasının önemini ortaya koymaktadır.

Solanum melongena L. ve *Solanum torvum* Sw. türleri arasında doğal ve *in vitro* koşullarda melezleme olanaklarının araştırıldığı doktora çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında arazide ve *in vitro* koşullarda melezlemeler yapılmıştır. Arazide Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemelerde *Solanum torvum*'un ana ebeveyn olarak kullanıldığı melezlemelerden meyve elde edilememiştir. Aydın Siyahı x *S. torvum* ve Kemer x *S. torvum* melezlemelerden elde edillen meyvelerde embriyo kurtarma yöntemi için her iki kombinasyonda en uygun zamanın tozlamadan sonra 35. gün olduğu belirlenmiştir. Meyvedeki tohum sayısı az olan çok hassas çalışmalarda Tek Tek Açma yönteminden faydalanılabilir. Doğrudan ekim yöntemi hem daha az işgücü hem de zaman kazancı nedeniyle embriyo kurtarma da başarıyla kullanılabilir.
2. Tozlamadan sonra döllenmenin olmamasının ya da çok düşük olmasının nedenini anlamak amacıyla her bir melez kombinasyonun çiçek tozu çim borusunun büyümesi incelenmiştir. Aydın Siyahı x *Solanum torvum* çiçeklerinde tozlamadan 30 saat sonra çiçek tozu çim boruları yumurtalığa ulaşırken, Kemer x *Solanum torvum* çiçeklerinde tozlamadan 24 saat sonra sonra çiçek tozu çim boruları yumurtalığa ulaşmıştır. Yumurtalıkta alınan

boyuna ve enine kesitlerde Kemer x *Solanum torvum* çiçekleri 30 saat döllenmeye başlamış, Aydın Siyahı x *Solanum torvum* çiçeklerinde de döllenme 30 saat sonra başlamasına rağmen daha sonraki saatlerde alınan çiçeklerde döllenme sorunları görülmüştür.

3. Kemer ve Aydın Siyahı çeşitleri ve *Solanum torvum'*da çiçek tozu canlılığı ve çimlenmesi açısından istatistiki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir. En yüksek polen canlılığı Kemer (% 70.4) çeşidinden, en yüksek polen çimlenmesi *Solanum torvum*'dan (% 22.8) elde edilmiştir.
4. Çalışmada elde edilen melez bitkilerin (Kemer x *Solanum torvum* ve Aydın Siyahı x *Solanum torvum* morfolojik gözlemleri yapılmıştır. Bu melez bireylerde hem kendileme hem de geriye melezlemeler [(Kemer x *Solanum torvum)* x Kemer ve (Aydın Siyahı x *Solanum torvum)* x Aydın Siyahı] yapılmış ancak meyve oluşmamıştır. Kemer x *Solanum torvum* melezi ile Aydın Siyahı x *Solanum torvum* melezi bitkiler yaprak rengi dışında birbirlerine benzer özellikte olmuştur. Melez bitkiler S*olanum torvum* bitkilerine yaprak şekli, dikenlilik, tüylülük, çiçeklenme çalımsı gelişim yönünden, *Solanum melongena*'ya da çiçek rengi ve büyüklüğü, diken rengi, bitki gelişimi yönünden benzemiştir. Ancak elde edilen bu melez bireyler kısır olmuştur.
5. Patlıcanda embriyogenik kalluslar elde edilerek protoplast füzyonuna rejenere kabililiyeti yüksek hücrelerle başlanması amaçlanmıştır. Aydın Siyahı, Kemer ve *Solanum torvum'*un döllenmiş yumurta hücrelerinden kallus indüksiyonu için farklı ortamlar denenmiş ve 1 mg/l Kinetin uygulanan MS uygulamasından embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. En yüksek kallus eldesi ise 1 mg/l Kinetin uygulanan Aydın Siyahı çeşidinden (% 84) elde edilmiştir. *Solanum torvum*, Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin genç taze yaprakların YDA ve YDÜ'den alınan eksplantlar 1.5 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l BAP ve 2 mg/l 2,4 D içeren MS ortamında alınmıştır. Rejenerasyonu kültür çeşitlerine göre daha zor olan *Solanum*

torvum'dan istenilen özellikte kalluslar elde edilmiştir. Diğer önemli nokta ise çalışmada kullanılan tüm genotipler için YDA'dan alınan eksplantlar için 1.5 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l BAP, YDÜ'den alınan eksplantlar için 2 mg/l 2,4 D uygulamaları daha başarılı bulunmuştur. En yüksek kallus eldesi ise Kemer çeşidinin YDA eksplantlarının 1.5 mg/l 2,4 D + 0,1 mg/l BAP ortamından sağlanmıştır (% 40).

6. Islah çalışmalarında anter kültürü %100 homozigot saf hatların elde edilmesinde kullanılmaktadır. Çalışmada anter kültürü protoplast füzyonu çalışmalarında elde edilecek olan tetraploid bitkilerin ploidi seviyesini diploid hale getirmek hem de anter kültüründen oluşan kallusların protoplast füzyonu çalışmalarında haploid eksplant kaynağı olması amacıyla kullanılmıştır. Anter kültürü çalışmalarına 2012 yılı bahar yarıyılında Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'nın kullanmış olduğu yönteme göre başlanmıştır. Bu dönemde *Solanum torvum*'dan kallus ve bitki eldesi sağlanamamıştır. Aydın Siyahı ve Kemer çeşitlerinden ise sadece kallus elde edilmiştir. 2014 yılı yaz döneminde ise, Dumas de Vaulx ve ark. (1982), ve CP ortamlarında kültüre alınan antelerden en yüksek kallus gelişimi R ortamında Aydın Siyahı çeşidinden (% 26.65) elde edilmiştir. CP ortamında hiçbir genotipten kallus ve bitki elde edilmemiştir. 2014 yılı güz dönemi anter kültürü çalışmalarında, en yüksek kallus oluşum oranları karanlık koşullarda R ve V3 ortamlarında yerleştirilen Aydın Siyahı ve Kemer anterlerinden elde edilmiştir (sırasıyla % 30.9 ve % 29.8). *Solanum torvum*'dan ise sadece R ortamında % 7.2 oranında kallus oluşmuştur. CP ortamında Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinden az sayıda kallus elde edilmiştir. En yüksek bitki eldesi R ortamında Aydın Siyahı çeşidinden elde edilmiştir (% 4.6). Bunu Kemer çeşidinin karanlık koşullarda R-V3 ortamındaki anterler takip etmiştir (% 1.3). 2015 yaz döneminde anter kültürü çalışmalarında Dumas de Vaulx ve ark. (1982) kullanmış olduğu yönteme göre Aydın Siyahı ve Kemer çeşitleri kullanılmıştır. Yaz

döneminde yeterli sayıda anter petrilere yerleştirilmesine karşın kallus gelişimi düşük olduğu gibi hiç bitki oluşmamıştır. En yüksek kallus eldesi % 4.5 ile Kemer çeşidinden olurken, Aydın Siyahı çeşidinin ise % 2.5 olmuştur. 2015 yılı güz döneminde anter kültürü çalışmalarında modifiye edilmiş Dumas de Vaulx ve ark. (1982)'a göre Aydın Siyahı ve Kemer çeşitleri ile tekrar denenmiştir. Modifiye edilmiş Dumas de Vaulx ve ark. (1982), 0.01 mg/l 2.4-D + 0.01 mg/l Kinetin + 30 g/l sakkaroz ortamında en yüksek bitki eldesi (% 3.78) Aydın Siyahı çeşidinden elde edilmiştir. 1 mg/l 2.4-D +1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz ortamında en yüksek bitki eldesi (% 36.4) Aydın Siyahı çeşidinden elde edilmiştir. Kemer çeşidinin bu ortamda bitki oluşum oranının % 14.1 olarak tespit edilmiştir. 5 mg/l 2.4-D + 5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz ortamında en yüksek bitki eldesi (% 33.8) Kemer çeşidinin anterlerinden elde edilmiştir. Aydın Siyahı çeşidinin bu ortamda bitki oluşum oranının ise % 28.1 olduğu belirlenmiştir. 2015-Güz döneminde anter kültüründen elde edilen bitkilerin viyollere aktarılan bitki sayısı 501, araziye aktarılan bitki sayısı ise 90 adet olmuştur. Anter kültüründe oluşan kallusların embriyogenik karekterli olması, kallustan bitki oluşmasını desteklemektedir. Çalışmanın bu döneminde anter kültüründen elde edilen bitkilerin oldukça fazla oluşu, dağılgan kallusların fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Tüm uygulamalarda (0.01/0.01, 1/1 ve 5/5) ve çeşitlerde (Aydın Siyahı ve Kemer) oluşan kallluslar en fazla dağılgan tipte olmuştur. Patlıcan anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerin başında anterlerin uygun zamanda alınması gelmektedir. 2014 ve 2015 yıllarında yürütülen anter kültürü çalışmalarında güz döneminde daha başarılı sonuçlar alınmıştır (en fazla tek bir anterden 53 bitki). Anter kültüründe başarıyı etkileyen diğer faktör uygun uygun hormon ve sakkaroz dozu seçimi olduğunu söylemek gerekir. Çünkü aynı koşullarda aynı yetiştirme ortamına yerleştirilen anterler sadece hormon ve sakkaroz miktarı daha düşük olmasından bitkiye

dönüşmemiştir. 5 mg/l 2.4-D +5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz içeren artamda Kemer çeşidinden 394 bitki elde edilirken 0.01 mg/l 2.4-D +0.01 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz içeren ortamdaki Kemer çeşidinden sadece 1 tane bitki elde edilmesi bunu kanıtlar niteliktedir. 2015 yılı güz döneminde kullanılan Aydın Siyahı, Kemer çeşitlerinde C ortamında eklenen 1 mg/l 2.4-D + 1 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz ve 5 mg/l 2.4-D + 5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz dozlarının her ikisinde de yeterli sayıda bitki elde edilmesine rağmen 5 mg/l 2.4-D +5 mg/l Kinetin + 120 g/l sakkaroz eklenmiş C ortamında bitkiyle birlikte kallus oluşumu fazla olmuştur.

7. 2015 yılı anter kültürü çalışmalarından elde edilen ve ploidi seviyesi incelenen 79 bitkiden, 60'ı haploid, 13'ü diploid, 4'ü triploid, 1'i tetraploid ve 1'i mixoploid olarak belirlenmiştir.
8. Türler arası tozlanma ve döllenme problemlerine alternatif bir çözüm olan *in vitro* tozlanma ve döllenme yöntemi *Solanum melongena* ile *Solanum torvum* arasında resiprokal melezlemelerle denenmiştir. Bu amaçla stigma tozlanması ve döllenmesi ve plesanta (ovaryum) döllenmesi yapılmıştır en fazla kallus gelişimi 1 mg/l NAA / 2 mg/l BAP içeren ortamda Aydın Siyahı x *Solanum torvum* 'un ovaryum döllemesinden elde edilmiştir. Yine aynı şekilde en fazla yumurtalık/yumurta irileşmesi de 1 mg/l NAA / 2 mg/l BAP içeren ortamda Aydın Siyahı x *Solanum torvum*'un ovaryum döllemesinden meydana gelmiştir. Kemer çeşidi dişi ebeveyn olarak kullanıldığında her iki *in vitro* tozlama dölleme yönteminde de kallus gelişimi meydana gelmemiştir. *Solanum torvum* dişi ebeveyn olarak kullanıldığında daha fazla kallus elde edilmiştir. Aktif karbon ilave edilmiş Aydın Siyahı x *Solanum torvum* ve Kemer x *Solanum torvum* stigma tozlamalarında denenen bütün ortamlarda kallus gelişimi ve yumurtalık irileşmesi meydana gelmiştir.

9. *İn vitro* ortamda elde edilen ebriyogenik kalluslar ile *Solanum melongena*'nın genç yaprakları protoplast kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışmada, hem kalluslardan hemde yaprak mezofil hücrelerinden etkin protoplast izolasyon koşulları (uygun enzim ve BH3 kombinasyonları) belirlenmiştir. Kalluslar için 1.5 ml enzim solusyonu + 2.5 ml BH3 kültür ortamı, yaprak mezofil hücreleri için 1.5 ml enzim solusyonu + 4 ml BH3 kültür ortamı kullanımının en yüksek protoplast verimliliğini sağladığı belirlenmiştir. Başarılı bir şekilde izole edilen saflaştırılan protoplastların füzyonu için PEG yöntemi kullanılmıştır. PEG yöntemiyle birleştirilen protoplastlar EMEP katı ortamı üzerine 8-12 damla ortam eklenerek petri kaplarında karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Kültürden 4-6 hafta sonra birleşmeye başlayan protoplast hücrelerinden mikro kalluslar gözlenmiştir. Ancak mikro kalluslardan sonra gelişim elde edilememiştir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile palıcanda *Solanum melongena* ve *Solanum torvum* arasında yapılan melezlemeden bitki elde edilmesi, türler arası hibrit bitkilerin kısırlık sorununu çözmek amacıyla haploidizasyon tekniğinden yararlanabilmek üzere tekniklerin uygulanabilecek protokollerinin oluşturulması veya var olanlarının geliştirilmesi, protoplast füzyonuna ilişkin temel bilgilerin elde edilmesi gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarla, patlıcanda anaç ıslahı konusunda yeni adımlar atılabilecektir.

KAYNAKLAR

Aka Kaçar, Y., 2011. Protoplast Kültürü ve Somatik Melezleme. http://www.bahcebitkileri.org/wp-content/uploads/2011/04/6.hafta-protoplast-kulturu-ve-somatik-melezleme.pdf (Ders Notu).

Ali, M., Matsuzoe, N., Okubo, N., Fujieda, K., 1992. Resistance of Non-tuberous *Solanum* to Root-knot Nematode. J. Japan Soc. Hort. Sci. 60(4):921-926.

Alpsoy, H.C., Şeniz, V., 2007. Researches on the *In Vitro* Androgenesis and Obtaining Haploid Plants in Some Eggplant Genotypes. Acta Hort. (ISHS) 729:137-141.

Anonymous, a. http://www1.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e29/29c.htm. Botany online, 1996-2004.

Bal, U., Ellialtioğlu, S., ve Abak, K. 2009. Induction of symmetrical nucleus division and multi-nucleate structures in microspores of *Solanum melongena* L. cultured *in vitro*. Scientia Agricola, 66(4):535-539.

Banks, M.S., Evans, P.K., 1976. A comparison of the isolation and culture of mesophyll protoplasts from several *Nicotiana* species and their hybrids. Plant Sci. Letters 7, 409-416.

Başay, S., 2006. Patlıcan (*Solanum melongena* L.)'da *Verticillium dahliae* Kleb.'e Dayanıklı Hatların Geliştirilmesi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilimdalı, Doktora Tezi, 125s.

Başay, S., Ellialtıoğlu, Ş., ve Şeniz, V., 2010. Yerli ve Yabancı Patlıcan Çeşitlerinde Anter Kültürü Yoluyla Haploid Embriyo Oluşumu. VIII. Sebze Tarımı Sempozyumu, 23-26 Haziran 2010, Van. Bildiri Kitabı s:588-590.

Başay, S., Şeniz, V., ve Ellialtıoğlu, Ş., 2011. Obtaining dihaploid lines by using anther culture in the different eggplant cultivars. Journal of Food, Agriculture & Environment, Vol.9 (2): 188-190.

Başay, S., ve Ellialtıoğlu, Ş.Ş., 2013**.** Effect of genotypical factors on the effectiveness of anther culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). Turk J Biol (2013) 37: 499-505 © Tübitak.

Bletsos, F., Roupakias, D., Maria Tsaktsira, M., and Scaltsoyjannes, A., 2004. Production and Characterization of Interspecific Hybrids Between Three Eggplant (*Solanum melongena* L.) Cultivars and *Solanum macrocarpon* L. Scientia Horticulturae, 101, 11–21.

Bletsos, F.A., Roupakias, D.G., Thanassoulopoulos, C.C., 2000. Gene Transfer from Wild *Solanum* Species to Eggplant Cultivars: Prospects and Limitations. Acta Horticulturae No. 522:71-78.

Bletsos, F.A., Roupakias, D.G., Tsaktsira, M.L., Scaltsojannes, A.B., Thanassoulopoulos, C.C., 1998. Interspecific hybrids between three eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars and two wild species (*Solanum torvum* Sw. and *Solanum sisymbriifolium* Lam.). Plant Breeding 117, 159–164.

Boiteux, L.S., and Charchar, J.M., 1996. Genetic Resistance to Root-Knot Nematode (*Meloidogyne javanica*) in Eggplant (*Solanum melongena*). Plant Breeding. Volume 115, Issue 3, pages 198-200.

Borgato, L., Conicella, C., Pisani, F., and Furini, A., 2007b. Production and Characterization of Arboreous and Fertile *Solanum melongena* + *Solanum marginatum* Somatic Hybrid Plants. Planta, 226:961–969.

Borgato, L., Pisani, F., and Furini, A., 2007a. Plant Regeneration from Leaf Protoplasts of *Solanum virginianum* L. (*Solanaceae*). Plant Cell Tiss Organ Cult, 88:247–252.

Boyacı, H.F., 2001. Sebze Islahında İn Vitro Teknikler ve Biyoteknolojinin Kullanım Alanları. Derim, Cilt 18, Sayı 4. 180-189.

Boyacı, H.F., Yılmaz, S., Çelik, İ., ve Yeşilova, Ö., 2006. Patlıcanda (*Solanum melongena* L.) Kullanılan Bazı Anaçların Verim ve Verim Bileşenlerine Etkisi. VI. Sebze Tarımı Sempozyumu, 19 - 22 Eylül, Kahramanmaraş. S:253-258.

Boyacı, H.F., 2007. Patlıcanlarda *Fusarium* Solgunluğuna Dayanıklılık Kaynakları ve Dayanıklılığın Kalıtımı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 96s.

Boyacı, H.F., Oğuz, A., Ünlü, M., Eren, A., Topçu, V., Erkal, S., 2009. Partenokarp ve Partenokarp Olmayan Patlıcanların (*Solanum melongena* L.) Bazı Vejetatif ve Generatif Gelişme Parametreleri Arasındaki İlişkiler. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi, 26(1).

Cappelli, C., Stravato, V.M, Rotino, G.L, Buonaurio, R., 1995. Sources of resistance among *Solanum* spp. to an Italian isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*. In: Andrásfalvi A, Moór A, Zatykó (eds) EUCARPIA, 9th Meet Genet Breed Capsicum Eggplant. SINCOP, Budapest, pp 221-224.

Clain, C., Da Silva, D., Fock, I., Vaniet, S., Carmeille, A., Gousset, C., Sihachakr, D., Luisetti, J., Kodja, H., Besse, P., 2004. RAPD genetic homogeneity and high levels of bacterial wilt tolerance in *Solanum torvum* Sw. (*Solanaceae*) accessions from Reunion Island. Plant Science, Volume 166 (6), P:1533-1540.

Collonnier, C., Fock, I., Kashyap, V., Rotino, G.L., Daunay, M.C., Lian, Y., Mariska, I.K., Rajam, M.V., Servaes, A., Ducreux G., Sihachakr D., 2001. Applications of biotechnology in eggplant. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 65(2): 91-107.

Collonnier, C., Fock, I., Mariska, I., Servaes, A., Vedel, F., Siljak-Yakovlev, S., Souvannavong, V., and Sihachakr, D., 2003. GISH Confirmation of Somatic Hybrids Between *Solanum melongena* and *S. torvum*: Assessment of Resistance to both Fungal and Bacterial Wilts. Plant Physiology and Biochemistry 41, 459–470.

Çağlar, G., ve Bağcı, S., 2004. Bazı *Cucumis* Türleri Arasındaki Melezlemelerde Embriyo Kurtarma Yoluyla *İn Vitro* Hibrit Bitki Regenerasyonu. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 17(2), 175-182.

Dambier, D., Benyahia, H., Pensabene-Bellavia, G., Aka Kaçar, Y., Froelicher, Y., Belfalah, Z., Lhou, B., Handaji, N., Printz, B., Morillon, R., Yesiloglu, T., Navarro, L., Ollitrault, P., 2011. Somatic hybridization for citrus rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. Plant Cell Rep., 30(5):883-900.

Daunay, M.C., Chaput, M.H., Sihachakr, D., Allot, M., Vedel, F., Ducreux, G., 1992. Production and characterization of fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. Theor. Appl. Genet. 85, 6-7: 841-850.

Daunay, M.C., 2000. Solanaceae Genetic Resources in Europe. Report of a Network Coordinating Group on Vegetables, Ad hoc meeting - 26-27 May 2000 - Vila Real, Portugal. 22-33s.

Daunay, M.C., Lester, N.R., Gebhardt, C., Hennart, W., Jahn, M., 2001. Genetic Resources of Eggplant (*Solanum melongena* L.) and Allied Species: A New Challenge for Molecular Genetics and Eggplant Breeders, pp.251-274 in *Solanaceae* V, Edited by R.G. Van Den Berg, G. W. Barendse and C. Mariani. Nijmegen University, Press Nijgemen, The Netherlands.

Derviş, S., Halit Yetişir, H., Yıldırım, H., Tok, F.M., Kurt, Ş., and Karaca, F., 2009. Genetic and Pathogenic Characterization of *Verticillium dahliae* Isolates from Eggplant in Turkey. Phytoparasitica, 37:467–476.

Doğanlar, S., Frary, A., Daunay M.C., Lester, R.N. Thanksley, S.D., 2002b. Conservation of Gne Function in the Solanaceae as Revealed by Comparative Mapping of Domestication Traits in Eggplant. Genetics 161:1713-1726.

Doğanlar, S., Frary, A., Daunay, M.C., Lester, R.N., Thanksley, S.D., 2002a. A comparative Genetic Linkage Map of Eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for Genome Evolution in the *Solanaceae*. Genetics 161:1697-1711.

Douglas, GC., 1990. Fertilization *In Vitro* and Culture of Fertilized Ovules of Higher Plants. Methods Mol Biol., 6:209-17.

Dumas De Vaulx, R., and Chambonnet, D., 1982.Stimulation of plant production in eggplant (*Solanum melongena* L.) anther culture by treatment at +35°C and low growth substance concentrations. Agronomie 2 (10), 983-988.

Dumas, C., Faure, J.E., 1995. Use of *In Vitro* Fertilization and Zygote Culture in Crop Improvement. Current Opinion in Biotechnology, 6:183-l 88.

Ellialtıoğlu, Ş.Ş., 2000. Haploid Bitkilerin Bitki Islahı Programlarında Kullanımı. Biki Islahı Kursu, Seminer Notları (Yayımlanmamış), Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Samsun.

Ellialtıoğlu, Ş.Ş., 2010. Patlıcan Islahı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Ders Notları. http://www.agri.ankara.edu.tr/bahce/1099_patlican_islahi.pdf.

Ellialtıoğlu, Ş.Ş., ve Tıpırdamaz, R., 2000. Patlıcan Anter Kültüründe İçsel Absizik Asit Miktarını Azaltıcı Uygulamaların Androgenetik Embriyo Oluşumuna Etkisi. Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi, 24(1):23-32.

Emiroğlu, Ü., ve Gürel, A., 1993. Modern Biotechnology in Plant Breeding. The Biotechnology Revolution. Short Course. Organised By Ege Univ. Biotechnology Centre and Faculty of Agriculture, Department of Crop Science, February 8-12, Bornova-İzmir.

FAO, 2014. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC.

Faure, J.E., Digonnet, C., Mol, R., Matthys-Rochon, E., and Dumas, C., 1994. *In Vitro* Pollination and Fertilisation in Maize *(Zea mays* L.): Technical Procedures and Prospects for the Dissection of The Double Fertilisation Process. Plant Science, 104- 1-10.

Filippone, E., Penza, R., and Romano, R., 1992. *Capsicum* Newsletter Special Issue. Proc Vlllth Internat Meeting EUCARPIA Working Group on Genetics and Breeding of *Capsicum* and *Eggplant*, pp 260–265.

Frary, A., Doğanlar, S., Daunay, M.C., Tanksley, S.D., 2003. QTL analysis of morphological traits in eggplant and implications for conservation of gene function during evolution of solanaceous species. Theor. Appl. Genet. 107: 359-370.

Geerts, P., Druart, P., Ochatt, S., Baudoin, J.-P., 2008. Protoplast Fusion Technology for Somatic Hybridisation in *Phaseolus.* Biotechnol. Agron. Soc. Environ., Volume 12 (2008) No:1 41-46.

Geraci, G., Reforgiato, G., Depasquale, F., 1978. Pollen tubes penetration in citrus styles. Proc. Int. Soc. Citric., 58-59.

Gousset, C., Collonnier, C., Mulya, K., Mariska, I., Rotino, G.L., Besse, P., Servaes, A., and Sihachakr, D., 2005. *Solanum torvum*, as a Useful Source of Resistance Against Bacterial and Fungal Diseases for Improvement of Eggplant (*S. melongena* L.). Plant Science, 168, 319–327.

Grosser, J.W., and Gmitter, F.G. Jr., 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in *citrus*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 104:343–357.

Gudeva, L.K., and Trajkova, F., 2012. Anther Culture of Pepper: Morphological Characterisitic of Fruits of Androgenetic Pepper Lines (*Capsicum annuum* L.). Journal of Research in Agriculture, 1(2): 136-145.

Guo, W.W., and Deng, X.X., 1998. Somatic hybrid plantlets regeneration between *Citrus* and its wild relative, *Murraya paniculata* via protoplast electrofusion. Plant Cell Rep 18:287–300.

Guri, A., Sink, K.C., 1988a. Organelle composition in somatic hybrids between an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* and *Solanum melongena*. Plant Sci. 58, 51–58.

Guri, A., Sink, K.C., 1988b. Interspecific Somatic Hybrid Plants Between Eggplant (*Solanum melongena*) and *Solanum torvum*. Theor Appl Genet. 76(4):490-6.

Guri, A., Volokita, M., Sink, K.C., 1987. Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum torvum*. Plant Cell Rep. 6, 302–304.

Güler, H.Y., K. Abak and S. Eti. 1995. Method, medium and incubation time suitable for *in vitro* germination of eggplant (*S. melongena*) pollen. Acta Horticulture 412: 99-105.

Gürel, S., Gürel, E., and Kaya, Z., 2002. Protoplast Fusion in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). Turk J Biol, 26 163-170.

Hatipoğlu, R., 1993. Biyoteknolojiye Giriş. Çukurova Ünv. Ziraat Fak. Ders Kitabı, No:129.

Iwamoto, Y., Ezura, H., 2006. Efficient plant regeneration from protoplasts of eggplant rootstock cultivar and its wild relatives. Plant Biotechnology 23, 525–529.

Jadari, R., Sihachakr, D., Rossignol, L., Ducreux, G., 1992. Transfer of resistance to *Verticillium dahliae* Kleb. from *Solanum torvum* S.W. into potato (*Solanum tuberosum* L.) by protoplast electrofusion. Euphytica 64**:** 39-47.

Jaiki, M., Chin, S. W., 2007. Study of pollen-pistil relationship between eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relative *Solanum torvum* S.W. International cooperation. V.2 (2):90-106.

Jamil, M.D., Parvaiz, M., Tufail, M., Arshad, J., Hussain S., and Imtiaz, S., 2013. Callogenesis, Regeneration of Shoot and Root of Brinjal (*Solanum melongena L.*). World Applied Sciences Journal 26 (8): 1039-1045, 2013.

Jarl, C.I., Rietveld, E.M., De Haas, J.M., 1999. Transfer of fungal tolerance through interspecific somatic hybridisation between *Solanum melongena* and *S. torvum*. Plant Cell Rep. 18: 791-796.

Kalloo, Dr., 1986. Vegetable Breeding Volume III, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 136-140.

Kalloo, G., 1993. Genetic Improvement of Vegetable Crops (Edited by: G. Kalloo and B. O. Bergh). Printed in Great Britain by B.P.C.Cwheatons Ltd, Exeter, ISBN 008 040826 5 Sh: 587-604.

Kantharajah, A.S., and Golegaonkar, P.G., 2004. Somatic Embryogenesis in Eggplant. Scientia Horticulturae, 99, 107–117.

Karakullukçu, Ş.Ş., 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerine Araştırmalar, (Doktora Tezi), Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enst., Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı,136s. Ankara.

Kashyap, V., Vinod Kumar, S., Collonnier, C., Fusari, F., Haicour, R., Rotino, G.L., Sihachakr, D., Rajam, M.V., 2003. Biotechnology of Eggplant. Scientia Hort. 97(1): 1-25.

Kennet, R., Barkai-Golan, R., Chorin, M., Dishon, I., Katan, Y., Netzer, D., Palti, J., Volcani, Z., 1970. A revised checklist of fungal and bacterial diseases of vegetable crops in Israel. Spec Publ Volcani Inst Agric Res Bet Dagan, Bet Dagan, pp 39.

Khatun, F., Meah, M.B., and Nasiruddin, K.M., 2006. Regeneration of Egglant Through Anther Culture. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(1): 48-53.

Kranz, E., and Dressethaus, T., 1996. *In vitro* fertilization with isolated higher plant gametes. Elsevier Science Ltd, Vol. 1, No. 3.

Kumar, P.A., Mandaokar, A.D., Sharma, R.P., 1998. Genetic engineering for the crop improvement of eggplant (*Solanum melongena* L.) . AgBiotech Newsand Information, 10:10, 329-332.

Kumar, S., Singh, M., Prabhavathi, K., and Mathews, A., 2003. *In Vitro* Induction of Haploid in Eggplant (*Solanum melongena* L.). Capsicum and Eggplant Newsletter, 22: 147-150.

Liu, K.B., Li, Y.M., and Sink, K.C., 1994. Asymmetric somatic hybrid plants between an interspecific *Lycopersicon* hybrid and *Solanum melongena*. Plant Cell Reports, Volume 14, Number 10, Pages 652-656.

Luc, M., Sikera, R. A., Bridge, J., 2005. Reflections on Nematology in Subtropical and Tropical Agriculture. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture 2nd Edition (eds M. Luc, R. A. Sikera, J. Bridge).

Magioli, C., and Mansur, E., 2005. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. Acta bot. bras., 19(1): 139-148.

Matsubara, S., Hu, Kailin., and Murakami , K., 1992. Embryoid and Callus Formation from Pollen Grains of Eggplant and Pepper by Anther Culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 61(1): 66-77.

Miyoshi, K., 1996. Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant *(Solanum melongena* L.). Plant Cell Reports, 15:391-395.

Mochizuki, H., Yamakawa, K., 1979. Resistance of selected eggplant cultivars and related wild *Solanum* species to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*). Bull. Veg. & Ornam. Crops Res. Stn. Ser. A No. 6: 1-10.

Monma, S., Sato, T., ve Matsunaga, H., 1996. Evaluation of Resistance to Bacterial, F*usarium*, and *Verticillium* Wilt in Eggplant and Eggplant-Related Species Collected in Ghana. Capsicum and Eggplant Newslatter, 16:71-72.

Mutlu, N., Boyacı F. H., Göçmen M., Abak K., 2008. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. Theor Appl Genet (2008) 117:1303–1312.

Pessarakli, M. M., Ramdane, D., 2004. Pollination and Breeding of Eggplant. Food, Agriculture& Environment, Vol. 2 (1): 218-219.

Rahman, M., Asaduzzaman, M., Nahar, N., and Bari, M.A., 2006. Effıcient Plant Regeneration from Cotyledon and Midrib Derived Callus in Eggplant (*Solanum melongena* L.). J. Bio-Sci. 14: 31-38.

Rizza, F., Mennela, G., Collonnier, C., Sihachakr, D., Kashyap, V., Rajam, M.V., Prestera, M., and Rotino, G.L., 2002. Androgenic Dihaploids From Somatic Hybrids Between *Solanum melongena* and *Solanum aethiopicum* group *Gilo* as a Source of Resistance to *Fusarium oxysporum* f sp. *melongenae*. Genetic Transformation and Hybridization. Plant Cell Repots, 20: 1022-1032.

Rotino, L.G., 1996. Haploidy in Eggplant. *In vitro* Haploid Production in Higher Plants. Kluwer Academic Publisher, Important Selected Plants, Vol.3, 114-141.

Rotino, G.L., Perri, E., Zottini, M., Sommer, H., Spena, A., 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. Nature Biotechnology 15, 1398 – 1401.

Rotino, G. L., Sunseri, F., Acciari, N., Arpaia, S., Mennella, G., Spena, A., Zottini, M., 2002. Transgenic parthenocarpic and insect resistant eggplant. In: Transgenic Plants and Crops, Ed. Khachatourians, G., McHughen, A., Scorza, R., Nip, W., Hui, Y. H., Marcel Dekker Inc., ISBN:0-8247-0545-9, 587-601.

Rotino, G.L., Sihachakr, D., Rizza, F., Valè, G., Tacconi, M.G., Alberti, P., Mennella, G., Sabatini, E., Toppino, L., D'Alessandro , A., and Acciarri, N., 2005. Current status in production and utilization of dihaploids from somatic hybrids between eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relatives Acta Physiologiae Plantarum, Vol. 27. No. 4B, 723-733.

Salam, M.A., Rashid, M.A., Rahman, M.A., Masud, M.A.T., Masum, A.S.M.H., Hossain, M.M., 2002. Performance of Some Grafted Eggplant Genotypes on Wild *Solanum* Root Stocks Against Root-Knot Nematode. Journal of Biological Sciences, 2(7):446-448.

Salas, P., Prohens , J., and Seguı´-Simarro, J.M., 2011. Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species. Euphytica, 182:261–274.

Salas, P., Rivas-Sendra, A., •Prohens , J., and Seguı´-Simarro, J.M., 2012. Influence of the Stage for Anther Excision and Heterostyly in Embryogenesis Induction from Eggplant Anther Cultures. Euphytica, 184:235–250.

Samoylov, V. M., Izhar, S., Sink, K. C., 1996. Donor chromosome elimination and organelle composition of asymmetric somatic hybrid plants between an interspecific tomato hybrid and eggplant. Theor Appl Genet, 93:268-274.

Sekara, A., Cebula S., Kunicki E., 2007. Cultivated eggplants – origin, breeding objectives and genetic resources, a review. Folia Horticulturae Ann. 19/1, 97-114.

Sihachakr, D., Chaput, M.H., Serraf, I., Ducreux, G., 1993. Regeneration of plants from protoplasts of eggplant (*Solanum melongena* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 23, Plant Protoplasts and Genetic Engineering IV. Springer, Berlin, pp. 108–121.

Sihachakr, D., Haicour, R., Chaput, M.H., Barrientos, E., Ducreux, G., Rossignol, L., 1989. Somatic hybrid plants produced by electrofusion between *Solanum melongena* L. and *Solanum torvum* Sw. Theor Appl Genet, 77:1-6.

Sihachakr, D., Haicour, R., Serraf, I., Barrientos, E., Herbreteau, C., Ducreux, G., Rossignol, L., Souvannavong, V., 1988. Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* C.B. Clark. Plant Sci. 57, 215–223.

Skálová, D., Navrátılová, B., Ondøej, V., Lebeda, A., 2010. Optimizing Culture for *In vitro* Pollination and Fertilization in *Cucumis Sativus* and *C. Melo*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 52/1: 111–115.

Stewart, J.M., 1981. *In Vitro* Fertilization and Embryo Rescue. Environmental and Experimental Botany, Vol. 21, No. 3/4, pp. 301 to 315.

Stravato V.M., and Cappelli, C., 2000. Behaviour of *Solanum* spp. on inoculation with different isolates of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *melongenae.* Oeppeppo Bulletin 30, 247-249.

Sundar, A.N., and Jawahar, M., 2010. Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis from anthers of *Datura stramonium* L. Journal of Agricultural Technology 6(4): 741-745.

Supena, E.D.J., Suharsono, S., Jacobsen, E., and Custers, J.B.M., 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep 25: 1–10.

Swamynathan, B., Nadanakunjidam, S., Ramamourti, A., Sindhu, K., and Ramamoorthy, D., 2010. *In-Vitro* Plantlet Regeneration Through Somatic Embryogenesis in *Solanum melongena* (Thengaithittu Variety). Academic Journal of Plant Sciences 3 (2): 64-70.

Taji, A.M., Williams, J.S., 2004. *In vitro* Pollination and Fertilization. Encyclopedia of Plant and Crop Science, s587 -589.

Tamura, N., Murata, Y., and Mukaihara, T., 2002. A Somatic Hybrid Between *Solanum integrifolium* and *Solanum Violaceum* that is Resistant to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia Solanacearum.* Plant Cell Rep, 21:353–358.

Taşkın, H., 2005. Bazı Biber Genotiplerinde Anter Kültürü ile Haploid Embriyo Uyartımında Embriyo Kalitesinin Artırılmasına Yönelik Bazı Uygulamalar. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, (Yüksek Lisans Tezi) Adana.

Toppino, L., Vale, G., Rotino, G. L., 2008a. Inheritance of *Fusarium* wilt resistance introgressed from *Solanum aethiopicum* Gilo and Aculeatum groups into cultivated eggplant (*S. melongena*) and development of associated PCR-based markers. Mol. Breeding DOI 10.1007/s11032-008-9170-x.

Toppino, L., Mennella, G., Rizza, F., D'Alessandro, A., Sihachakr, D., Rotino, G. L., 2008b. ISSR and Isozyme Characterization of Androgenetic Dihaploids Reveals Tetrasomic Inheritance in Tetraploid Somatic Hybrids between *Solanum melongena* and *Solanum aethiopicum* gr *Gilo*. Journal of Heredity doi:10.1093/jhered/esm122.

Tuna, M. (2014). 2. Flow Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı Çalıştayı. Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 16-17 Ocak 2014, Tekirdağ.

Tuncay, B., 2007. Patlıcanda (*Solanum melongena* L.) Somatik Embriyogenezis ve Organogenezis Üzerinde Bir Araştırma. Ankara Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 42 sayfa.

Tümbilen, Y., 2007. Determination of Genetic Diversity Between Eggplant and Its Wild Relatives. İzmir Institute of Technology, Molecular Biology and Genetics, Master of Science, 76s.

Verba, V.M., Mamedov, M.I., Pyshnaya, O.N., Suprunova, T.N., and Shmykova, N.A., 2010. Isolation of Eggplant Interspecific Hybrids by the Method of Embryo Culture. Сельскохозяйственная биология, № 5, с. 66-71.

Yamakawa, K., Mochizuki, H., 1979. Nature and inheritance of *Fusarium* wilt resistance in eggplant cultivars and related wild *Solanum* species, Bull. Vegatable and Ornamental Crops, Station A (Yasai Shibenko Hokoku, A), No. 6:19.

Yanmaz, R., Duman, İ., Yaralı, F., Demir, K., Sarıkamış, G., Sarı, N., Balkaya, A., Kaymak, H.Ç., Akan, S., Özalp, R., 2015. Sebze Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1 s579-605.

Zayova, E., Vassilevska-Ivanova, R., Kraptchev, B., and Stoeva, D., 2012. Indirect Shoot Organogenesis of Eggplant (*Solanum melongena* L.). Journal of Central European Agriculture, 13(3), p.446-457.

ZhiQiang, S., LingJuan, G., JianBing, H., and WeiQiang, O., 2009. Effects of Different Culture Factors on Callus Rate of Eggplant Anthers. Guizhou Agricultural Sciences, No.4 pp.20-23 ref.15.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini 1994 yılında Alanya'da tamamladı. 1996 yılında lisans eğitimine başladığı Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden 2000 yılında Bölüm birincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladı. 2009 yılında Yüksek Öğretim Kurulunun 2547 sayılı Kanunun 35. Maddesi uyarınca Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne Araştırma Görevlisi olarak görevlendirildi. Evli ve Umut Can adında bir oğlu bulunmaktadır.