ISSN 1304-2653

alatarım

Cilt 6, Sayı 2, Aralık 2007



alatarım

Cilt 6, Sayı 2 **Aralık 2007**

Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Adına

Sahibi
Şekip KESER

Yazı İşleri Müdürü
Dr. Ayhan AYDIN

Yayın Kurulu
Dr. Ayhan AYDIN
Dr. Bekir DEMİRTAŞ
Teberdar ÇALIŞKAN
Veysel ARAS
Güçer KAFA

Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Yayınıdır.

Türkçe Olarak Altı Ayda Bir Yayımlanır.

Yazışma Adresi
Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
PK 27 33740 Erdemli-MERSİN

Telefon
0 324 518 00 52
0 324 518 00 54

Belgegeçer
0 324 518 00 80

Web Adresi
www.alata.gov.tr

Elektronik Posta
alatarim@yahoo.com

Baskı
Selim Ofset 0 324 233 27 03
selim.ofset@ttnet.net.tr
www.selimofset.com

Derginin tüm yayın hakları Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne aittir. Kaynak gösterilmesi koşuluyla alıntı yapılabilir.

HAKEM KURULU – SCIENTIFIC BOARD

Prof. Dr. Mehmet Ali ÇULLU
Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU
Prof. Dr. İbrahim ORTAŞ
Prof. Dr. Sevgi PAYDAŞ
Prof. Dr. Nebahat SARI
Prof. Dr. Semih TANGOLAR
Prof. Dr. Serdar TEZCAN
Prof. Dr. M. Rıfat ULUSOY
Doç. Dr. Hamide GÜBBÜK
Doç. Dr. H. Hüseyin ÖZTÜRK
Doç. Dr. Levent SON
Yrd. Doç. Dr. Ahmet BAYRAM
Yrd. Doç. Dr. Halil BOLU
Yrd. Doç. Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Mürüvvet ILGIN
Yrd. Doç. Dr. Gültekin ÖZDEMİR

Alatarım Dergimiz

alatarım dergisi **TÜBİTAK/ULAKBİM Yaşam Bilimleri Veri Tabanı tarafından dizinlenen**, Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü - Alata tarafından yılda 2 defa çıkarılan olan tarımsal içerikli makalelerin yayınlanacağı, hakemli bir dergidir.

2002 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/01AlatarimHaziran2002.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/02AlatarimAralik2002.pdf)
2003 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/03AlatarimHaziran2003.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/04AlatarimAralik2003.pdf)
2004 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/05AlatarimHaziran2004.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/06AlatarimArarlik2004.pdf)
2005 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/07AlatarimHaziran2005.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/08AlatarimAralik2005.pdf)
2006 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/09AlatarimHaziran2006.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/10AlatarimAralik2006.pdf)
2007 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/11AlatarimHaziran2007.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/12AlatarimAralik2007.pdf)
2008 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/13AlatarimHaziran2008.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/14AlatarimAralik2008.pdf)
2009 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/15AlatarimHaziran2009.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/16AlatarimAralik2009.pdf)
2010 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/17AlatarimHaziran2010.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/18AlatarimAralik2010.pdf)
2011 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/19AlatarimHaziran2011.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/20AlatarimAralık2011.pdf)
2012 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/21AlatarimHaziran2012.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/AlatarimAralik2012.pdf)
2013 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/AlatarimHaziran2013.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/Alatarim-Aralik2013.pdf)
2014 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/25AlatarimHaziran2014.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/Diger-belgeler/AlatarimAralik2014.pdf)
2015 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/Diger-belgeler/AlatarimHaziran2015.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/AlatarimAralık2015.pdf)
2016 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/AlatarımHaziran2016.pdf)	Aralık Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/AlatarimAralik2016.pdf)
2017 Yılı	Haziran Sayısı (/alata/Belgeler/alatarim/AlatarimHaziran2017%20(1).pdf)	

alatarım

Cilt 6, Sayı 2 Aralık 2007

İÇİNDEKİLER

1 Haploid Bitki Elde Etme Yollarından Biri: Mikrospor Kültürü
Burcu TUNCER, Ruhsar YANMAZ

9 Doğu Akdeniz Bölgesi Kayısı Bahçelerinde Entegre Mücadele Uygulamaları ve Eğitim Çalışmaları
Naim ÖZTÜRK, Ercan CANIHOŞ

15 Türkiye'de Muz Yetiştiriciliği, Sorunları ve Çözüm Önerileri
Hasan PINAR ,Cengiz TÜRKAY, İhsan CANAN

21 İnorganik ve Organik Gübrelerin Precoce de Tyrinthe Kayısı Çeşidinin Gelişme, Verim ve Kalitesi Üzerine Etkileri
Ayla YILDIZ, Ahmet YILDIZ, İlhan DORAN, Ayhan AYDIN, Davut KELEŞ

30 Türkiye Bağlarına Son Yıllarda Bulaşan Bağ Siyah Yaprakbiti [*Aphis illinoisensis* (Shimer) (Homoptera: Aphididae)] Üzerine Bazı Notlar
Naim ÖZTÜRK

35 Asma (*Vitis* spp.) Anterlerinden Embriyojenik Kallus ve Embriyo Uyartımı Üzerine Farklı Uygulamaların Etkisi
Serpil GÖK TANGOLAR, Fuat ERGENOĞLU, Saadet BÜYÜKALACA

43 Küresel Isınma ve Tarımsal Uygulamalara Etkisi
Kürşat KORKMAZ

CONTENTS

1 One of the Way for Plant Obtention: Microspore Culture
Burcu TUNCER, Ruhsar YANMAZ

9 Integrated Pest Management Studies on Apricot in The Eastern Mediterranean Region and Training Courses
Naim ÖZTÜRK, Ercan CANIHOŞ

15 Banana Cultivation, Problems and Solution Suggestions in Turkey
Hasan PINAR ,Cengiz TÜRKAY, İhsan CANAN

21 The Effects of Inorganic and Organic Fertilizers on the Growth, Yield and Fruit Quality of Apricot Species Precoce de Tyrinthe
Ayla YILDIZ, Ahmet YILDIZ, İlhan DORAN, Ayhan AYDIN, Davut KELEŞ

30 Some Notes About Grapevine Aphid [*Aphis illinoisensis* (Shimer) (Homoptera: Aphididae)] Contaminated Vineyards of Turkey in Recent Years
Naim ÖZTÜRK

35 The Effects of Different Applications on Embryogenic Callus and Embryo Induction from Anters of Grapevine (Vitis spp.)
Serpil GÖK TANGOLAR, Fuat ERGENOĞLU, Saadet BÜYÜKALACA

43 Global Warming and Effect on Agricultural Applications
Kürşat KORKMAZ

alatarım *2007, 6 (2): 1-8*

Haploid Bitki Elde Etme Yollarından Biri: Mikrospor Kültürü

Burcu TUNCER **Ruhsar YANMAZ**
Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 06110 Dışkapı-Ankara

Öz

Islah çalışmalarının süresinin kısaltılması ve çeşit geliştirme çalışmalarında kullanılacak homozigot saf hatların daha kısa sürede elde edilmesinde dihaploidizasyon tekniği önemli avantaj sağlamaktadır. Dihaploidizasyon tekniği; arpa, buğday, mısır, çeltik, kolza, biber, patlıcan, *Brassica*'larda, gerbera, kavun, karpuz, kabak gibi birçok türde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde haploid bitkilerin üretiminde; androgenik yöntemler (anter ve mikrospor kültürü) ve ginogenik yöntemlerden (yumurta (ovül) ve yumurtalık (ovaryum) kültürü, kromozom eliminasyonu, ışınlanmış polenle tozlama) yararlanılmaktadır. Androgenetik yöntemlerden mikrospor kültürü, anter kültürüne alternatif olarak geliştirilmiş bir teknik olup, birçok türde başarıyla kullanılmaktadır.

Makalede mikrospor kültürünün tanıtımı, yapılış şekli, uygulanış şekli ve başarıyı etkileyen faktörlerle ile ilgili bilgilere yer verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikrospor kültürü, haploid bitki

One of the Way for Plant Obtention : Microspore Culture

Abstract

Dihaploidization techniques provide important advantages in shortening breeding period and provide the possibility of obtaining pure lines needed for the development of new cultivars in a shorter period of time. Dihaplodization technique is widely used for barley, wheat, maize, rice, oilseed rape, pepper, eggplant, brassicas, gerbera, melon, watermelon, squash. Currently, for haploid production, androgenic techniques (anther and microspore culture) and gynogenic techniques (ovule and ovary culture, chromosome elimination pollination with irradiated pollen have been used. Microspore culture has been developed as an alternative technique to anther culture and is being used successfully among many plant species.

In this review, introduction of microspore culture, its methodology, applications and factors influencing success have been described.

Key Words: Microspore culture, haploid plant

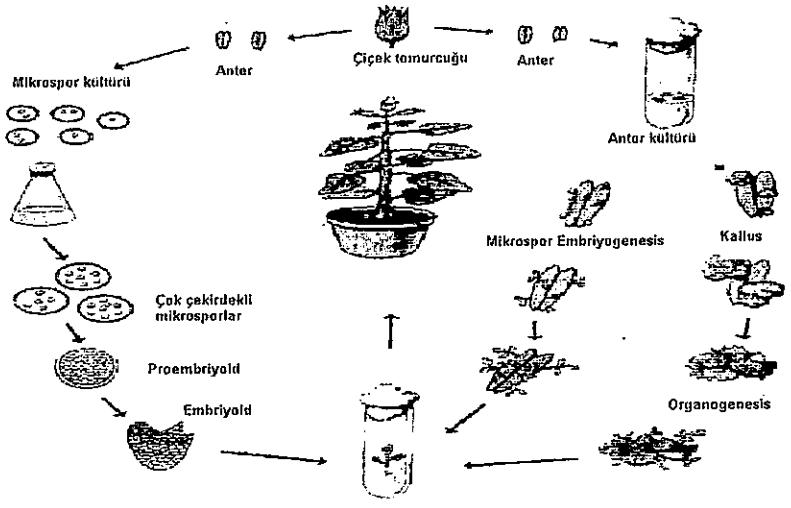
Sorumlu Yazar: B. Tuncer, burcu_7725@hotmail.com
Geliş Tarihi: 26.03.2007 Kabul Tarihi: 28.05.2007

Giriş

Mikrospor kültürü, henüz olgunlaşmasını tamamlamamış mikrosporların anterlerden izole edilerek in vitro koşullarda sıvı besin ortamlarında geliştirilmesi ve bunlardan haploid embriyoların elde edilmesi yöntemidir. Mikrospor kültürü konusunda ilk çalışma Kameya ve Hinata tarafından 1970 yılında *B.oleraceae ve B.oleraceae* x *B. alboglabra* melezi kullanılarak yapılmış ve olgun polen tanelerinden hücre kolonileri elde edilmiş, ancak bu çok hücreli yapıların mikrosporların kendi içerisinde bölünmesinden meydana geldiği kesin olarak gösterilememiştir (Bal, 2002). Daha sonra mikrospor kültürü konusunda Nitsch ve Norreel (1973)'in *Datura innoxia*'da yaptıkları çalışmada başarılı sonuçlar alınmıştır. Diğer haploidi tekniklerinde olduğu gibi mikrospor kültürü de her türde olumlu sonuç vermeyebilmektedir. Yapılan araştırmalar mikrospor kültürünün *Brassica* türleri, *Gramineae* türleri ve *Nicotiana*'da başarılı sonuçlar verdiğini göstermektedir. *Brassica*'larda ilk mikrospor kültürü çalışması *B.napus*'da yapılmış ve *B.napus*'un mikrospor embriyogenesisi için model bir bitki olduğu ortaya konulmuştur (Lichter, 1982). Bundan sonra *Brassica* türüne giren kolza (Segui-Simarro ve ark., 2003; Weber ve ark., 2005), hardal (Barro ve Martin, 1999), çin lahanası (Cao ve ark., 1994), brokoli, karnabahar, baş lahana, brüksel lahanası, kıvırcık yapraklı baş lahanada (Takahata ve Keller, 1991; Duijs ve ark., 1992; Ferrie ve ark., 1999) mikrospor kültüründen

başarılı sonuçlar alınabildiği belirlenmiştir. *Gramineae* familyasına giren türlerden buğday (Holme ve ark., 1999), arpa (Kasha ve ark., 2001) ve mısır (Nageli ve ark., 1999)'da da mikrospor kültürü ile haploid bitki elde etmek mümkün olabilmiştir.
Mikrospor kültürü anter kültürüne göre daha karmaşık bir teknik olmasına karşılık, birçok türde daha başarılı sonuçlar verebilmektedir. Mikrospor kültürünün anter kültürüne göre üstünlüklerini şu şekilde sıralamak mümkündür:
1. Bitkiye dönüşümün (rejenerasyon) somatik dokulardan meydana gelme riski bulunmamaktadır.
2. Anter dokularında bulunan engelleyici maddeler ortamdan uzaklaştırıldığı için sorun olmaktan çıkar.
3. Mikrosporlar ortamdaki besin maddeleri ile doğrudan temas halinde olduklarından besin maddelerini daha iyi bir şekilde alabilmektedir.
4. Bazı türlerde (Örneğin: kolza) haploid embriyo verimi anter kültürüne göre daha yüksektir (Siebel ve Pauls, 1989). *Gramineae* familyasına ait türlerde (Örneğin: buğday) anter kültürüne oranla albino bitki oluşumu azalmaktadır (Holme ve ark., 1999).
5. Mutagenik uygulamalar kolaylıkla yapılabilmekte, mutagen olarak kullanılan kimyasal bileşiğin uygulanması ve ortamdan uzaklaştırılması santrifüjleme yöntemiyle kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir (Bal, 2002).
6. Mikrosporların oluşturduğu populasyon, anterlerin oluşturduğu populasyona göre daha homojen bir deney materyalidir. Karma bir mikrospor populasyonunun farklı deneme birimlerine dağıtılması ile elde edilen sonuçların geçerliliği daha fazladır (Bal, 2002).
7. Mikrospor populasyonları 'santrifüjleme yöntemi' ile birbirinden ayrılabilmekte, istenilen özellikte ve en az varyasyon gösteren mikrospor populasyonu, bulunduğu gradyanttan alınarak homojen deney üniteleri olarak denenen faktörlere dağıtılarak, varyasyon azaltılabilmektedir (Bal, 2002).
8. Gen transferi çalışmalarında da avantajlı bir tekniktir.

Mikrospor Kültürünün Yapılışı



Şekil 1. Mikrospor kültürü ve anter kültürünün yapılışı (Reynolds, 1997)

Şekil 1'de anter kültürü ve mikrospor kültürü tekniklerinin işleyişi şematik olarak verilmiştir. Buna göre anter kültüründe tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler ortama doğrudan dikilirken, mikrospor kültüründe anterlerdeki mikrosporların izolasyon ortamında serbest hale

geçmesi sağlanır. Değişik filtrelerden süzülen mikrospor süspansiyonu bir seri işlemden geçirilerek mikrosporlardan oluşan çökelti, sıvı besin ortamı ile uygun yoğunluğa ulaşılıncaya kadar karıştırılarak kültüre alınır.

1. Mikrosporların İzolasyonu: Tomurcukların veya anterlerin, izolasyonu için türlere özel ortamlar gerekmektedir. Bu ortamlarda anterler ezilerek mikrosporların serbest hale geçmesi sağlanmaktadır. Her tür için farklı izolasyon ortamları geliştirilmiştir. *Brassica*'larda; Nitsch ve Nitsch (1967) tarafından geliştirilen ve Lichter (1981) tarafından modifiye edilen sıvı NLN-13 ortamı (%13 sakkaroz, hormonsuz, PH: 6.1) (Carlos ve Dias, 1999) ve sıvı B5 ortamı (Gamborg ve ark., 1968) (%13 sakkaroz, hormonsuz) (Takahata ve Keller, 1991) izolasyon ortamı olarak kullanılırken, buğdayda ise; mikrosporlar Kyo ve Harada (1986) tarafından geliştirilen açlık ortamı olan B ortamında (20 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM KH_2PO_4, 0.3 M mannitol, PH:7.0) izole edilmektedir (Indrianto ve ark., 1999).

2. Besin Ortamı ve Bileşimi: Mikrospor kültüründe kullanılan temel besin ortamı türlere göre değişmektedir. Çizelge 1'de farklı türlerde kullanılan ve başarılı olduğu belirtilen ortam isimleri ve bileşimleri verilmiştir.

Çizelge 1. Farklı türler için geliştirilmiş olan besin ortamları

Tür	Besin Ortamı	Şeker	B.D.M (mg/l)	Diğer (mg/l)	Kaynak
Buğday	**MS ortamı**	90 g/l maltoz	0.5 kinetin	2000 PAA 975 glutamin 355 A.K.	(Letarte ve ark., 2006)
Buğday	**A2 ortamı** [1/2 N6 makro tuzları (1950 KNO_3, 277 $(NH_4)_2SO_4$, 400 KH_2PO_4, 166 $CaCl_2.2H_2O$, 185 $MgSO_4.7H_20$+1/2B5 mikroelement ve vitamin, PH:6.2]	0.3 M maltoz	-	32 Fe-NaEDTA	(Touraev ve ark., 1996a)
Buğday	**B ortamı** (20 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM KH_2PO_4, 0.3 M mannitol, PH:7.0)	-	-	-	(Kyo ve Harada, 1986)
Arpa	**FHG ortamı** (1900 KNO_3, 165 NH_4N0_3, 170 KH_2PO_4, 440 $CaCl_2.2H_2O$, 370 $MgSO_4.7H_20$, 40 $FeNa_2.EDTA$, 22.3 $MnSO_4.5H_2O$, 6.2 H_3BO_3, 8.6 $ZnSO_4.7H_2O$, 0.025 $CoCl_2.6H_2O$, 0.025 $CuSO_4.5H_2O$, 0.25$NaMoO_4.2H_2O$)	60 g/l maltoz	1 BAP	750 glutamin 10 PAA 100 inositol 0.4 thiamine	(Hunter, 1988)
Brokkoli, Karnabahar	**NLN ortamı** (125 KNO_3, 125 KH_2PO_4, 125 $MgSO_4.7H_20$, 500 $Ca(NO_3).4H_20$, 30 $FeSO_4.7H_2O$, 37 $Na_2.EDTA$, 25 $MnSO_4.4H_2O$, 10 H_3BO_3, 10 $ZnSO_4.7H_2O$, 0.025 $CoCl_2.6H_2O$, 0.025 $CuSO_4.5H_2O$, 0.25 $Na_2MoO_4.H_2O$)	130 g/l sakkaroz	-	100 myo-inositol 0.5 Thiamine-HCl, 0.5 Pyrodoxine-HCl, 0.5 nikotinik asit, 2 glycine, 800 L-Glutamine, 30 Glutathione, 100 L-Serine, Folik asit, 0.5 Biotin	(Carlos ve Dias, 1999)
Baş Lahana	**NLN**	130 g/l sakkaroz	-		(Ferrie ve ark., 1999)
Kolza	**NLN**	130 g/l sakkaroz	-		(Weber ve ark., 2005)

A.K.: Aminoasit kompleksi, B.D.M: Büyümeyi düzenleyici maddeler.

Mikrospor kültürü çalışmalarında kültür ortamında yüksek düzeyde şeker kullanılmaktadır. Kültür ortamının karbonhidrat içeriği ve tipi mikrosporlardan embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkilidir. Genellikle karbonhidrat kaynağı olarak sakkaroz ve maltoz kullanılmaktadır. Kültüre alınan mikrosporlar genel olarak besin ortamında büyümeyi düzenleyici maddelere gerek duymazken (tütün, kolza); bazı türlerde (buğday, arpa) mikrospor yapılarından rejenerasyonunun sağlanabilmesi için besin ortamına ilave hormonlara ihtiyaç duyulmaktadır (Jahne-Gartner ve Lorz, 1999).

3. Mikrospor Yoğunluğu: Kültür ortamında bulunan mikrospor yoğunluğu da başarıyı etkileyen önemli bir faktördür. Karnabaharda; kültür ortamındaki optimum mikrospor yoğunluğunun 100.000 mikrospor/ml (Ferrie ve ark., 1999), *B.carinata*'da ise 150.000 mikrospor/ml yoğunlukta olması durumunda en iyi sonuçların alındığı belirtilmektedir (Barro ve Martin, 1999). Brokkolide ise; 20.000 mikrospor/ml yoğunluktan az (5000, 10.000 mikrospor/ml) olan kültürlerde tomurcuk başına 0.4-13.6 arasında embriyo elde edilirken, ortamdaki mikrospor yoğunluğunun artmasıyla (30.000 mikrospor/ml) tomurcuk başına 42 embriyo elde edildiği bildirilmektedir (Duijs ve ark., 1992).

Mikrospor Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler

Mikrospor kültüründe başarı üzerinde etkili olan faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. Tür ve Genotip: Haploid embriyo oluşum oranı, türlere ve tür içinde de genotiplere göre değişiklik gösterir. *Brassica* cinsi içinde yer alan karnabahar (13 genotip), kıvırcık yapraklı baş lahana (1 genotip) ve baş lahanada (5 genotip) 15 genotipde tomurcuk başına elde edilen embriyo sayısı 0-3000 arasında değişirken (Ferrie ve ark., 1999), çin lahanasında 12 genotipin 9'undan 0.5-57.4 embriyo elde edilebilmiştir (Cao ve ark., 1994).

2. Ana Bitkinin Yetiştirildiği Koşullar: Genotip elverişli olsa bile, bitkinin yetiştirilme dönemindeki koşullar da önem taşımaktadır. Ana bitkinin yetiştirildiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu, günlük ışıklanma süresi, beslenme programı ve bitki sağlığı androgenesisde başarı üzerine etkili olmaktadır. Mikrospor kültürünün başarılı sonuçlar verdiği türlerde (kolza, çin lahanası, tütün) bitkilerin düşük sıcaklık (15/10-12 °C/gündüz/gece) ve kısa gün koşullarında yetiştirilmesi durumunda daha yüksek oranda embriyo elde edildiği belirtilmektedir (Lo ve Pauls, 1992). Tütünde, kısa gün koşullarında, düşük sıcaklıkta yetiştiricilik yapıldığında embriyo oluşturmak üzere programlanan sporofitik polen sayısında artış olmaktadır. NAA ve Alar 85 gibi dişilik yönünde gelişmeyi uyarıcı kimyasal maddelerin ana bitkilere uygulanması ile nitrojen açlığı olarak tanımlanan N'suz beslenme programı uygulamaları da çiçeklenmeyi uyararak, olgun polen oluşumunu azaltmakta, embriyo oluşturma kapasitesindeki sporofitik polen oluşumu artırabilmektedir (Heberle-Bors, 1983).

3. Tomurcuk Gelişme Dönemi: Mikrospor kültüründe kullanılacak mikrosporların, çoğu türde tek çekirdekli (uninucleate) mikrospor gelişme aşaması veya birinci polen mitozundan hemen önceki dönemde olmaları gerekmektedir (Duijs ve ark., 1992; Sarıkamış ve ark., 2000; Ellialtıoğlu ve ark., 2001). Mikrospor gelişme dönemi morfolojik ve sitolojik ölçümlerle belirlenebilir. Morfolojik ölçümler tomurcuk büyüklüğü, anter-dişi organ boyu, taç yaprak uzunluğu dikkate alınarak yapılabilirse de her türde kesin sonuç vermeyebilir (Telmer ve ark., 1992). Sitolojik düzeydeki ölçümler ise daha sağlıklıdır. Sitolojik yöntemler mikrosporları farklı boyama yöntemleri ile boyama esasına dayalıdır. Böylece mikroskop altında incelenen farklı devredeki tomurcuk örneklerinde uygun devredeki mikrosporlar görülebilmekte ve bu aşamadaki anterler kullanılmaktadır (Vergne ve ark., 1987).

4. Haploid Embriyo Oluşumunu Uyarıcı Uygulamalar: Mikrosporlardan haploid embriyo oluşumunu uyarmak amacıyla tomurcuk, anter veya anterlerden izole edilen mikrosporlara sıcaklık şokları, karbonhidrat ve azot açlığı, yüksek PH, ethanol, kolhisin ve gama ışını gibi uygulamalar yapılarak haploid embriyo oluşumu uyarılabilmektedir (Touraev ve ark., 1997).

a. Sıcaklık şokları: Sıcaklık şokları düşük veya yüksek sıcaklık uygulamaları şeklinde yapılır. Mikrospor embriyogenesisi uyarmak amacıyla yapılan sıcaklık uygulamaları ana bitkiye, çiçek tomurcuklarına, anterlere veya izole edilen mikrosporlara yapılır. Soğuk şokları arpa (Kasha ve ark., 2001), buğday (Indrianto ve ark., 1999), biber ve patlıcanda (Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz, 1997) olumlu sonuçlar vermektedir. Yüksek sıcaklık şokları ise özellikle *Brassica* türlerinde etkili bir uygulama olmaktadır. Sıcaklık şokları izole edilen mikrosporların kültüre alınmasından sonra uygulandığında daha etkili olmaktadır. Sıcaklık derecesi ve süresi türlere göre farklılık göstermektedir. Örneğin; brokolide 30 °C'de 2 gün (Duijs ve ark., 1992), karnabahar, baş lahana ve kıvırcık yapraklı baş lahanada 32 °C'de 2 gün (Ferrie ve ark., 1999), çin lahanasında 33°C'de 1 gün (Cao ve ark., 1994), *B. carinata*' da 32 °C'de 3 gün uygulamalarından daha başarılı sonuçlar alındığı belirtilmektedir (Barro ve Martin, 1999).

b. Karbonhidrat ve azot açlığı: Çiçek tomurcuğu veya anterlerin karbonhidrat ve azot bulunmayan açlık ortamında bekletilmesi ile mikrosporların embriyo oluşturması teşvik edilebilmektedir. Karbonhidrat açlığı uygulamasının tütün (Touraev ve ark., 1996b.), buğday (Labbani ve ark., 2005), arpa (Kasha ve ark., 2001) ve elmada (Höfer ve ark., 1999) mikrosporlarda embriyo oluşumunu uyarıcı etkisinin bulunduğu ortaya konulmuştur. Domateste, tek çekirdekli mikrospor aşamasında çiçek tomurcukları mannitol içeren açlık ortamında 10°C'de 7 gün boyunca karanlıkta tutulduğunda simetrik çekirdek bölünmesi ve çok çekirdekli yapıların oluşumunun uyartıldığı (Bal, 2002), buğdayda ise tek çekirdekli mikrosporları içeren başakların 0.1 M mannitol çözeltisinde 4 °C'de 3gün bekletilmesi sonucu embriyo oluşumu açısından olumlu sonuçlar alındığı belirtilmektedir (Labbani ve ark., 2005).

c. Kolhisin uygulamaları: Kolhisin uygulamaları ağırlıklı olarak *Gramineae* ve *Cruciferae* familyasına ait türlerde embriyo oluşumunu uyaran bir stres uygulamasıdır. *B.napus*'dan izole edilen mikrosporlara 50 ve 500 mg/l - 15 saat (Zhou ve ark., 2002), kahvede 100 mg/l - 48 saat kolhisin uygulaması embriyo oluşumunu uyarmaktadır (Herrera ve ark., 2002). Buğdayda ise mikrosporlara 3 mM - 48 saat kolhisin uygulaması ile kontrol grubuna göre (%15), çoğalma kabiliyetinde olan embriyo oranında %53 artış sağlanmış ve albino bitki oluşumu azalmıştır (Hansen ve Andersen, 1998).

d. Gama radyasyon ve ethanol uygulamaları: *Brassica napus* L.'da tomurcuklara 450 ve 900 gray gama ışınının 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 gün süreyle uygulanmasının embriyo oluşum oranını artırdığı, etanol uygulamasının ise olumsuz etki yaptığı belirtilmektedir (Pechan ve Keller, 1989).

e. Hipertonik şoklar: Kışlık ve yazlık buğday genotiplerinde, anterlerin kültüre alınmadan önce 0.8 M sakkaroz ve %3 aktif kömür bulunduran solüsyonda 1-2 saat bekletilmesi sonucunda mikrospor kökenli kalluslardan rejenerasyon sağlanmıştır (Zhang ve ark., 1987). Benzer şekilde, biber mikrosporları önce %6 sakkaroz içeren çözeltide 4 saat tuttulduktan sonra manitol içeren açlık ortamına alındığında %15 oranında embriyonik mikrospor elde edildiği belirtilmektedir (Supena ve ark., 2005).

f. pH: Yüksek pH, bazı türlerde (tütün, aslanağzı) mikrosporların karbonhidrat alımını engellemekte ve meydana gelen açlık sonucu mikrosporlarda nişasta depolanmasını önlemekte ve bunun sonucu olarak da simetrik çekirdek bölünmesi uyartılabilmektedir (Barinova ve ark., 2004).

g. Oligosakkaritler: Brokolide, oligosakkaritlerden **carageenan oligomerlerinin** mikrospor süspansiyonuna katılmasının (170 Nm ve 34 µM/30 dakika) embriyo oluşumunu uyarmada etkili olduğu bildirilmektedir (Lemonnier-Le Penhuzic ve ark., 2001).

h. Aktif kömür uygulamaları: Besin ortamına katılan aktif kömür ortamdaki toksik bileşikleri tutarak, embriyo oluşumunu olumlu yönde etkilemektedir. Brassica cinsine giren sebze türlerinde (karnabahar, brokkoli, lahana, turp), yapılan çalışmalarda kültür ortamına 0.1 ml aktif

kömür eklenmesiyle, haploid embriyo oluşumunun arttığı ve bu artışın özellikle brokolide çok belirgin olduğu belirlenmiştir (Carlos ve Dias, 1999).

i. Ortam yenileme: Mikrosporların besin ortamına alındıktan sonra 2-3 gün aralıklarla taze ortama aktarılması embriyo gelişiminde ve embriyo kalitesinde artışa neden olabilmektedir (Dias ve Correia, 2002).

Kaynaklar

Bal, U., 2002. Domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Izole Edilmiş Mikrospor Kültürü, Ovaryum Kültürü ve *Solanum sisymbriifolium* Lam. ile Tozlanma Yöntemleri ile Haploid Embriyo Oluşumunun Uyartılması. T.Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi (basılmamış),1-156 s., Tekirdağ.

Barinova, I., Clement, C., Martiny, L., Baillieul, F., Soukupova, H., Heberle-Bors, E., Touraev, A., 2004. Regulation of Developmental Pathways in Cultured Microspores of Tobacco and Snapdragon by Medium pH. Planta, 219: 141-146.

Barro, F., Martin, A., 1999. Response of Different Genotype of *Brassica carinata* to Microspore Culture. Plant Breeding, 118: 79-81.

Cao, M., Li, Y.,Liu, F., Dore, C., 1994. Embryo Genesis and Plant Regeneration of Pakchoi (*B.rapa* L.*ssp. chinensis*) via *in vitro* Isolated Microspore Culture. Plant Cell Reports, 13: 447-450.

Carlos, J., Dias, S., 1999. Effect of Activated Charcoal on *Brassica oleracea* Microspore Culture Embryo Genesis. Euphytica, 108: 65-69.

Dias, J.S., Correia, M.C., 2002. Effect of Medium Renovation and Incubation Temperature Regimes on Tronchuda Cabbage Microspore Culture Embryo Genesis. Scientia Horticulturae, 93: 205-214.

Duijs, J.G., Voorrips, R.E., Visser, D.L., Custers, J.B.M., 1992. Microspore Culture is Successful In Most Crop Types of *Brassica oleracea* L. Euphytica, 60: 45-55.

Ellialtıoğlu, Ş., Tıpırdamaz, R., 1997. Soğuk Uygulamalarının ve Aktif Kömürün Patlıcan ve Biberde *in vitro* Androgenesis Üzerine Etkileri. TÜBİTAK-TOGTAG 87 no'lu Proje Sonuç Raporu, 70 s. Ankara.

Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K., 2001. Haploid Bitki Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi (Doku Kültürü ve Uygulamaları) Ders Kitabı Bölüm 5, s.137-189.

Ferrie, A.M.R., Taylor, D.C., Mackenzie, S.L., Keller, W.A., 1999. Microspore embryo genesis of high sn-2 erucic acid *Brassica oleracea* germplazm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 57: 79-84.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Exp. Cell Res., 60: 151-158.

Hansen, N.J.P., Andersen, S.B., 1998. *In vitro* Chromosome Doubling with Colchicine During Microspore Culture In Wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica, 102: 101-108.

Heberle-Bors, E. 1983. Induction of Embryogenic Pollen Grain *in situ* and Subsequent *in vitro* Pollens Embryo Genesis in *Nicotiana tabacum* L. by Treatments of the Pollen Donor Plants with Feminizing Agents. Physiol Plant, 59: 67-72.

Herrera, J.C., Moreno, L.G., Acuna, J.R., De Pena, M., Osorio, D., 2002. Colhicine Induced Microspore Embryo Genesis in Coffee. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 71: 89-92.

Holme, I.B., Olesen, A., Hansen N.J.P., Andersen, S.B., 1999. Anther and Isolated Microspore Culture Response of Wheat Lines from Northwestern and Eastern Europe. Plant Breeding, 118: 111-117.

Höfer, M., Touraev, A., Heberle-Bors, E., 1999. Induction of Embryo Genesis from Isolated Apple Microspores. Plant Cell Reports, 18: 1012-1017.

Hunter, C.P., 1988. Plant Regeneration from Microspores of Barley. Ph.D. Thesis, Wye College, Univ., London.

Indrianto, A., Heberle-Bors, E., Touraev, A., 1999. Assessment of Various Stresses and Carbohydrates for Their Effect on the Induction of Embryo Genesis in Isolated Wheat Microspores. Plant Science, 143:71-79.

Jahne-Gartner, A., Lorz, H.1999 Protocols for Anther and Microspore Culture of Barley. Methods Mol. Biol., 111: 269-279.

Kameya, T., Hinata, K., 1970. Induction of Haploid Plants From Pollen Grains of *Brassica*. Jpn. J. Breed, 20: 82-87.

Kasha, K.J., Hu, T.C., Oro, R., Simion, E., Shim, Y.S., 2001. Nuclear Fusion Leads to Chromosome Doubling During Mannitol Pretreatment of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Microspores. Journal of Experimental Botany, Vol. 52, No. 359, pp. 1227-1238.

Kyo, M., Harada, H., 1986. Control of the Developmental Pathway of Tobacco Pollen *in* vitro. Planta, 168: 427-432.

Labbani, Z., Richard, N., Buyser, J.D., Picard, E., 2005. Chlorophyllian Durum Wheat Plants Obtained by Isolated Microspore Culture: Importance of the Pre-treatments. Genetic, 328: 713-723.

Letarte, J., Simion, E., Miner, M., Kasha, K.J., 2006. Arabinogalactans and Arabinogalactan-proteins Induce Embryo Genesis in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Microspore Culture. Plant Cell Rep., 24: 691-698.

Lemonnier-Le Penhuizic, C., Chatelet, C., Kloareg, B., Potin, P., 2001. Carrageenan Oligosaccarides Enhance Stress-Induced Microspore Embryo Genesis in *Brassica oleracea var. italica*. Plant Science, 160: 1211-1220.

Lichter, B., 1981. Anther culture of *Brassica napus* in A Liquid Culture Medium. Z. Pflanzenphysiol. 103: 229-237.

Lichter, B., 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 105: 427-434.

Lo, K.H., Pauls, K.P., 1992. Plant Growth Environment Effects on Rapeseed Microspore Development and Culture. Plant Physiol., 99: 468-472.

Nageli, M., Schmid, J.E., Stamp, P., Büter, B., 1999. Improved Formation of Regenerable Callus in Isolated Microspore Culture of Maize: Impact of Carbohydrates, Plating Density and Time of Transfer. Plant Cell Reports, 19: 177-184.

Nitsch, C., Nitsch, J.P., 1967. The Induction of Flowering *in vitro* in Stem Segments of *Plumbago indica* L. I. The Production of Vegetative Buds. Planta, 72, 355-370.

Nitsch, C., Norreel, K., 1973. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du polen de Datura innoxia cultivé dans l'anthere ou isolé de l'anthere. C.R. Acad. Sci., 276 D, 303-306.

Pechan, P.M., Keller, W.A., 1989. Induction of microspore embryo genesis in *Brassica napus* L. by gamma irradiation and ethanol stress. *In Vitro* Cellular &Developmental Biology, Vol.25, 11: 1073-1074.

Reynolds, T.L., 1997. Pollen Embryo Genesis. Plant Molecular Biology, 33:1-10.

Sarıkamış, G., Ellialtıoğlu, Ş., Yanmaz, R., 2000. Lahanada Çiçek Tomurcuğu Morfolojisi ile Mikrospor Gelişme Dönemi Arasındaki Ilişkinin Belirlenmesi. 3. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildirileri, Isparta, 72-76.

Segui-Simarro, J.M., Testillano, P.S., Risueno, M.C., 2003. Hsp70 and Hsp90 Change Their Expression and Subcellular Localization After Microspore Embryo Genesis Induction in *Brassica napus* L. Journal of Structural Biology, 142: 379-381.

Siebel, J., Pauls, K.P., 1989. A Comparison of Anther and Microspore Culture A Breeding Tool in *Brassica napus*. Theor. App. Genet., 78:473-479.

Supena, E.D.J., Suharsono, S., Jacobsen, E., 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 Cel Rep, 25:1-10.

Takahata, Y., Keller, W.A., 1991. High Frequency Embryo Genesis and Plant Regeneration in Isolated Microspore Culture of *Brassica oleracea* L. Plant Science, 74: 235-242.

Telmer, C.A., Simmonds, D.H., Newcomb, W. 1992 Determination of Developmental Stage to Obtain High Frequencies of Embryogenic Microspores in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum, 84: 417-424.

Touraev, A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O., Heberle-Bors, E., 1996a. Efficient Microspore Embryo Genesis in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Induced by Starvation at High Temperatures. Sex. Plant Reprod., 9: 209-215.

Touraev, A., Ilham, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E., 1996b. Stress Induced Microspore Embryo Genesis from Tobacco Microspores: An Optimized System for Molecular Studies. Plant Cell Rep., 15: 561-565.

Touraev, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E., 1997. Initiation of microspore embryo genesis by stress. Trends Plant Sci 2: 285-303.

Vergne, P., Delvallee, I., Dumas, C., 1987. Rapid Assessment of Microspore and Pollen Development Stage in Wheat and Maize Using DAPI and Membrane Permeabilization. Stain Technology, 62: 299-304.

Weber, S., Ünker, F., Friedt, W., 2005. Improved Doubled Haploid Production Protocol for *Brassica napus* Using Microspore Colchicine Treatment *in vitro* and Ploidy Determination by Flow Cytometry. Plant Breeding, 124: 511-513.

Zhang, L.J., Anceau, C., Lepoivre, P., Seilleur, P., Semal, J. 1987. An Efficient Method for the Regeneration of Wheat (*Triticum aestivum*). Bull. Reach. Agron. Gembloux, 22: 301-314.

Zhou, W.J., Hagberg, P., Tang, G.X., 2002. Increasing Embryo Genesis and Doubling Efficiency by Immediate Colchicine Treatment of Isolated Microspores in Spring *Brassica napus*. Euphytica, 128: 27-34.