



Patlıcanda Polen Dimorfizmi ve Anter Kültürü İlişkisinin İncelenmesi

Şebnem ELLİALTIOĞLU¹

Sevinç BAŞAY²

Şebnem KUŞVURAN^{3*}

¹Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara, Türkiye

²Uludağ Üniversitesi, Orhaneli Meslek Yüksekokulu, Bursa, Türkiye

³Çankırı Karatekin Üniversitesi, Kızılırmak Meslek Yüksekokulu, Çankırı, Türkiye

*Sorumlu Yazar:

E-mail: skusvuran@gmail.com

Geliş Tarihi: 30 Mart 2012

Kabul Tarihi: 15 Mayıs 2012

Özet

Anter kültürü yoluyla haploid bitkilerin elde edilmesi, genelde tüm bitki türlerinde önemli yararlar sağlamakta; özeldense sebze türlerinde gerek hibrit çeşit ıslahı ve gerekse kombinasyon ıslahında ıslah sürecini kısaltıcı ve yeni genotiplerin ortaya çıkması bakımından ıslahçılara büyük kolaylık sağlamaktadır. Ancak haploid bitki elde etme frekansı, birçok faktöre bağlıdır ve bunlardan birisi de mevsimsel farklılıklardır. Anterlerin içinde bulunan polenlerin yapısal olarak birbirinden farklı olmaları, mevsimlerin etkisini açıklamada etkili olabilir. Bu hipotezi açıklamak amacıyla patlıcanda farklı dönemlerde yetiştirilen bitkilerden alınan anterler kültüre alınmış ve aynı zamanda mikrosporları da yapısal olarak incelenmiştir. Kemer ve Aydın Siyahı patlıcan çeşitlerinde S-polen varlığı ile haploid embriyo oluşumu arasındaki ilişki incelenmiştir. Sonbahar dönemi anter kültürü için başarılı bulunmazken, yaz başlangıcında alınan anterlerden haploid embriyo ve bitki elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Patlıcan, *in vitro*, haploidi, polen, mevsim, dimorfizm

Investigations on the Pollen Dimorphism and its relationship with Anther Culture in Eggplant

Abstract

To obtain haploid plants through anther culture, often providing significant benefits to all the plants, in particular the combination of the vegetable crops and breeding and breeding efforts both types of hybrid process in terms of shortening the emergence of new genotypes and breeders is a great facility. However, the frequency of obtaining haploid plants depends on many factors and one of them is seasonal differences. They are structural differences in the pollen grains in the anthers, may be effective in explaining the effect of the seasons. Kemer and Aydın Siyahı eggplant varieties were examined by the presence of S-pollen. For this purpose, eggplant microspores were investigated microscopically for their structural vision at the different seasons. The relationship between the formation of haploid embryos and rate of S-pollen grains was investigated in order to explain our hypothesis. Anther culture was not successful for the autumn period, but at the beginning of summer season was found suitable for culturing anthers to obtain haploid embryos and plants.

Key words: Eggplant, *in vitro*, haploidy, pollen, season, dimorphism

GİRİŞ

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

Bitkideki androgenetik potansiyeli belirleyen parametrelerden birisi anterlerdeki mikro-sporların yapıları ve kaliteleridir. Buna yönelik ilk araştırmaları

yapan Sunderland [1], kültüre alınan bütün anterlerinin içerisinde sitolojik gözlemlerde daha açık renkte boyanan ve büyüklük bakımından da farklılık gösteren polenlerin varlığından bahsetmiştir. Polen dimorfizmi olarak adlandırılan bu durumdaki polenlerin bir bölümü gametofitik yönde gelişmesini sürdürerek normal polenleri oluştururken, diğer bir bölümü ise sporofitik gelişme yönüne kayarak embriyo oluşturma yeteneği kazanmaktadır. Rashid [2], polen dimorfizmini anterlerin içerisinde iki farklı generasyon tipine doğru gelişme potansiyeline sahip iki farklı morfolojide polen tozlarının bulunması şeklinde tanımlamaktadır. Normal olarak angiospermelerde polenlerin büyük oranda gametofitik yönde geliştiklerini, sporofitik olarak

tanımlanan polen tipinin ise sadece kültür koşullarında bitkiye dönüşüm şansına sahip olduğu ifade edilmektedir. Bu çalışmada patlıcanda anter kültürü yoluyla haploid embriyoların elde edilmesi üzerine mevsimsel farklılığın ve polen dimorfizmi olarak adlandırılan farklı yapılarıdaki polen bulunuş oranının etkisi incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada bitkisel materyal olarak Kemer ve Aydın Siyahı patlıcan çeşitlerine ait tohumlar ve bunlardan yetiştirilen bitkiler kullanılmıştır.

Bitkilerin Yetiştirilmesi

Araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde açık arazide ve ısıtılmayan cam serada yürütülmüştür. Açıkta patlıcan yetiştiriciliği yapılan iki yıl, 20 Mart tarihinde ekilen tohumlardan gelişen fideler 12 ve 18 Mayıs tarihinde açık arazide hazırlanan yerlerine dikilmişlerdir. Sonbahar-da tomurcuk elde etmek amacıyla, Temmuz ayı sonunda patlıcan tohumları cam serada hazırlanan yastıklara ekilmiştir. Fidelerin seradaki esas yerlerine dikimi Ağustos ayının sonunda yapılmıştır. Patlıcan fideleri tavalara içerisinde 80 cm sıra arası ve 40 cm sıra üzeri mesafe bırakılarak dikilmişlerdir. Çiçeklenmenin yoğun olarak sağlandığı Haziran sonundan Ağustos ayının başına kadar olan dönemde tomurcuklar toplanarak anterler kültüre alınmıştır. Serada sonbahar döneminde yetiştirilen bitkilerden ise Eylül sonu, Ekim ayı başında anter kültürleri yapılmıştır.

Çiçek Tomurcuklarının Toplanması

Anter kültürü için elverişli olan tek çekirdekli ve 1. polen mitozu aşamasındaki mikrosporları bulunduran morfolojik gelişme dönemine sahip tomurcuklar (3), ayrıca kontrol edilmek amacıyla sitolojik incelemeye tabi tutulmuşlardır. Buna göre %2'lik asetokarmin ile boyanan anterlerin içerisindeki mikrosporların, tek çekirdekli mikrosporlara sahip oldukları görülmüştür. Buna göre patlıcanlarda uygun dönemdeki tomurcukların tomurcuk uzunluğu-nun 15-17 mm olduğu, petallerin sepal ayırım seviyesine ulaştığı ve anter renginin yeşilimsi sarı olduğu belirlenmiştir.

Besin Ortamlarının Bileşimi

Dumas de Vaulx ve ark. (4)'nin önerdiği C (callus) ve R (regeneration) ortam bileşimleri her üç yılda da denemelerde kullanılan besin ortamı olmuştur. DDV temel besin ortamının kullanıldığı çalışmada, anterler kültürün ilk 12 günü "C" ortamında tutulmuşlar, daha sonra farklı aktif kömür dozları ilave edilen ve değişik yapılara sahip "R" ortamlarına transfer edilmişlerdir. Ortamların tümü agar (%0.8) ile katılaştırılmıştır. Denemelerde kullanılan tüm çeşitlerde çiçek tomurcuklarından izole edilen anterlerden 500'er adet olacak şekilde "C" ortamına dikim yapılmış; gelişme

gösteren anterler 0.1 mg/l kinetin içeren R ortamına transfer edilmişlerdir.

Kültüre Alma ve İnkübasyon

Uygun mikrospor gelişme döneminde çiçek tozlarının bulunduğu anterlere sahip çiçek tomurcukları, birkaç damla Tween-20 eklenmiş %20'lik ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 15 dakika süreyle dezenfekte edilmiş, daha sonra üç kez beşer dakika süreyle steril saf su ile durulanmıştır. Anterler, çiçek tomurcukları içerisinden bistüri ve kıvrık uçlu bir pens yardımıyla çıkarılmış ve bekletilmeden ince uçlu bir pens yardımıyla besin ortamı üzerine, dorsal yüzeyi ortamlara temas edecek biçimde ve ortama batırılmaksızın yerleştirilmiştir. Her petri kutusuna 10'ar adet anter dikilmiş ve uygulamalarda eşit sayıda anter kullanılmasına özen gösterilmiştir. Dikim işlemi tamamlanan petri kutularının kenarları streç film ile kapatılmıştır.

Anter dikimi tamamlanan petri kutuları karanlıkta, +35°C'de yüksek sıcaklık şokuna tabi tutulmuş, 8 gün bu koşullarda bekletildikten sonra 12. günün sonuna kadar 25°C±2 sıcaklık ve 16 saatlik fotoperiyodik düzene ayarlanmış iklim odasına alınmışlardır. "DDV-C" ortamı üzerinde 12 günlük süresini tamamlayan anterler şaşırtma ortamı olan "DDV-R" ortamlarına transfer edilmişler, bu kültürler daha sonraki 3 ay boyunca 25°C±2 sıcaklık ve 16/8 saatlik fotoperiyodik düzende inkübe edilmişlerdir.

Polenlerde Yapılan Gözlemler

Anter kültürü için tomurcukların toplandığı günlerde eşzamanlı olarak anthesis dönemindeki çiçeklerden olgun polenler toplanmış ve bunlarda gözlemler yapılmıştır. S poleni sayımı için yapılan gözlemler, %2'lik asetokarmin ile boyanan mikrosporlardan elde edilmiştir. Boyanan polenler açık veya koyu renkte boyanma durumlarına göre S poleni (sporofitik polen) veya G poleni (gametofitik polen) olarak nitelendirilmiştir. Her bir preparatta 3 farklı bölgeden olmak üzere her bir çeşitte 10'ar adet lam üzerinde sayım yapılmıştır. Asetokarmin ile yapılan boyamalar ve polen sayımları, denemelerde yer alan her üç dönemde de (iki yıl yaz dönemi ve bir yıl sonbahar dönemi) anter kültürlerinin yapıldığı günlerde alınan tomurcuklardan elde edilen anterlerde yapılmıştır. Ayrıca Flouresan etki veren Hoechst (%1) boyası kullanılarak, polen taneleri arasında büyüklük bakımından farklılık olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Flouresans boya ile boyanan polenlerde boy ölçümleri otomatik olarak Zeiss marka mikroskopta ölçülmüştür. Ayrıca konfokal mikroskop kullanılarak polenler incelenmiştir.

BULGULAR

1. Yıl denemeleri:

Aydın Siyahı çeşidinde normal yaz periyodunda yetiştirilen bitkilerden izole edilerek kültüre alınan

Çizelge 1. Kemer ve Aydın Siyahı patlıcan çeşitlerinde anter kültüründen elde edilen sonuçlar ve S polen oranları

Genotip	Kültüre Alınan Anter Sayısı	Enfekte Olanlar		Gelişen Anter		Embriyo Oluşumu		Bitki Oluşumu		S polen Oranı
		Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%	
Kemer	500	23	4.6	346	72.5	23	6.6	19	5.5	15.38
Aydın Siyahı	500	18	3.6	353	72.3	0	0	0	0	17.85

anterlerde anter gelişmesi ve kallus oluşumu meydana geldiği halde, embriyo oluşumu sağlanamamıştır. Kemer çeşidinde ise % 6.6 oranında haploid embriyo oluşum oranı elde edilmiştir (Çizelge 1).

Patlıcan anterleri her iki çeşitte de %72 oranında gelişme gösterdikleri halde, 'embriyo oluşumu' sadece Kemer çeşidinde meydana gelmiştir. Anterlerin içerisinden çıkarak büyüyen embriyoların geliştirme ortamlarına alınmasıyla, patlıcan bitkicikleri sağlıklı bir şekilde gelişmelerine devam etmişler ve Kemer çeşidinde %5.5 oranında bitki elde edebilmek mümkün olmuştur.

Asetokarmin ile boyanan polenlerde yapılan sayımlar sonucunda Kemer çeşidinde %15.38, Aydın Siyahı çeşidinde %17.85 oranında S poleni bulunduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre çeşitler arasında S poleni varlığı bakımından önemli düzeyde farklılık bulunmamıştır.

2. Yıl denemeleri:

Kemer ve Aydın Siyahı patlıcan çeşitlerinde, normal yaz periyodunun ardından sonbahar başlangıcında, çiçeklenme döneminde günlük ortalama sıcaklığın 12-16°C arasında değiştiği, ısıtılmayan serada yetiştirilen ve bitkilerden izole edilerek kültüre alınan anterlerde yapılan gözlemler sonucunda elde edilen değerler Çizelge 2'de gösterilmiştir. Bu dönemde yapılan anter kültürlerinde Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin her ikisinde de anter gelişmesi ve kallus oluşumu meydana geldiği halde, embriyo oluşumunun sağlanamamıştır.

Kemer ve Aydın Siyahı patlıcan çeşitlerinde S poleni varlığı, birbirine yakın değerler vermiştir (%16.82, %18.71). Ayrıca bu değerlerle, bir önceki yaz periyodunda elde edilen sayısal veriler de birbirine oldukça yakındır. Çiçeklenme döneminde hava sıcaklığının düşük olması, S polen varlığını bir miktar artırmış olmakla birlikte, bunun anterlerden elde edilen embriyo verimi üzerinde olumlu bir etkisi belirlenmemiştir. Ayrıca sonbahar döneminde ısıtılmayan cam serada yetiştirilen patlıcan bitkilerinde çiçeklenme oranının, yaz döneminde açık arazide yetiştirilenlere göre daha az olduğu, tomurcuk silkmelerinin ortaya çıktığı da gözlenmiştir.

3. Yıl Denemeleri:

Kemer ve Aydın Siyahı patlıcan çeşitlerinde, normal yaz periyodunda tekrarlanan denemede elde edilen değerler Çizelge 3'te gösterilmiştir. Bu dönemde yapılan anter kültürlerinde Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinin her ikisinde de anter gelişmesi ve kallus

oluşumu meydana gelmiş, ancak embriyo oluşumu yine sadece Kemer çeşidinde sağlanabilmiştir. S polen varlığı Kemer çeşidinde %12.42 oranında bulunurken, Aydın Siyahı çeşidinde bu oran %14.11 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda polenler arasında boyanma yoğunluğu ve dolayısıyla renk oluşumu bakımından farklılık belirgin olmadığı halde büyüklük bakımından farklılıklar belirlenmiştir.

Kemer çeşidinde polenlerin ortalama % 5.2'sinde polen çapının 23.62 µm, diğerlerinin ise ortalama 31.25 µm olduğu ölçülmüştür. Çapı 30 µm ve üzerindeki değerlere sahip polenlerin ortalama çapının 32.02 µm olduğu Aydın Siyahı çeşidinde ise, S poleni olabileceği varsayılan küçük çaplı polenlerin ortalama çap değeri 24.25 µm olarak bulunmuştur. Bu polenlerin oranı ise % 4.8'dir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

İki kez yaz periyodunda Ankara koşullarında açık arazide, bir kez de sonbahar döneminde ısıtılmayan cam serada yetiştirilen patlıcan bitkilerinden alınan anterler kullanılarak yapılan anter kültürü denemelerinde Kemer ve Aydın Siyahı çeşitlerinden sadece Kemer çeşidinde *in vitro* haploid embriyo oluşumu elde edilebilmiştir. Aydın Siyahı patlıcan çeşidinde embriyo oluşumu sağlanamamıştır. Kemer çeşidinde yaz döneminde yetiştirilen bitkiler kullanıldığında farklı iki yıl % 6.6 ve % 4.5 oranlarında embriyo oluşumu elde edilmiştir. Genotip etkisinin, anter kültüründeki başarı üzerinde ilk sırada gelen etken olduğu, önceki çalışmalarımızda vurgulanan bir konudur [5].

Aydın Siyahı çeşidinde sadece bu araştırma projesi kapsamında değil, değişik kereler farklı besin ortamı bileşimlerinin de denendiği çalışmalarımızda tek bir embriyo elde etmek bile mümkün olamadığı halde, Yalova'da Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'nde yürütülen bir çalışmamızda, Yalova'da yetiştirilen Aydın Siyahı patlıcan çeşidine ait bitkilerden alınan anterlerde *in vitro* embriyo oluşumu sağlanabilmiştir [6]. Bu durumda, genotipin tek başına etkisinden ziyade, 'genotip x çevre etkileşiminin' daha etken bir rol oynadığı söylenebilir. Heberle-Bors [7], anterlerin içerisinde farklı yapıdaki polenlerin varlığından bahsetmekte ve bunların frekansındaki değişimin bitki yetiştirme koşullarından etkilenebildiğini ilave etmektedir.

Asetokarmin ile yapılan boyamalarda açık renk boyanan ve daha ufak yapılı polenlerin sayısı, her bir görüntü alanındaki toplam polen sayısına göre

oranlanarak bulunan S polen bulunma oranı, çeşitler bazında belirlenmiştir. Buna göre, genel olarak Aydın Siyahı patlıcan çeşidinin, Kemer çeşidine göre daha fazla S poleni bulundurduğu görülmüştür. Ancak, hipotezimizin tersine S polen varlığı daha az bulunan Kemer çeşidinde haploid embriyo oluşturma oranı daha yüksek bulunmuştur. S poleni frekansının yüksek olmasının embriyo veriminin artırılması için yeterli olmayabileceği düşünülmüştür.

Polenlerde dimorfizm olup olmadığının anlaşılması amacıyla farklı boyama ve inceleme yöntemleriyle gözlemler yapılmıştır. Asetokarmin ile yapılan boyamalarda açık ve koyu renkli boyanan ve büyüklükleri farklı olan polenler görüldüğü halde, Flouresan mikroskopunda yapılan incelemede renk yoğunluğu bakımından farklılık belirlenmez iken, polenler büyüklük olarak iki farklı grupta toplanabilmiştir. Ancak renk yoğunluğu veya irilik esasına göre yapılan sayımlar birbirinden farklı sonuçlar vermiştir. İnce kesitler alıp bunları birleştirerek üç boyutlu olarak incelenen materyalin yapısı hakkında bilgi veren konfokal mikroskopunda da patlıcan polenleri arasında büyüklük bakımından farklı

polenlerin bulunduğu belirlenmiştir. Bu konudaki daha net bulguların ortaya konması için sitolojik çalışmalara devam edilmesinde yarar görülmüştür.

Stres koşullarının androgenezisi teşvik etme yönünde ve özellikle tütünde S polenlerinin oluşumu üzerine olumlu etkilerinin bulunduğunu bildiren makalelere [7] rağmen, patlıcanda stres koşullarından biri olan ışık yoğunluğunun azalması veya düşük sıcaklık koşullarında yetiştirme gibi koşullarda çiçek tomurcuklarında silikme meydana geldiği gibi, bunlardan elde edilen anterlerden de embriyo farklılaşması sağlanamamıştır. Bu durumda, tropikal bir bitki kapsamında değerlendirilen bir tür olan patlıcanda yetiştirme koşullarının stres yaratacak durumda olmasının polen oluşum ve gelişimini olumlu etkilemediği de söylenebilir. Polen embriyogenezisi bakımından Ankara koşullarında yanıt vermeyen Aydın Siyahı çeşidinden Yalova'da embriyo elde edilebilmesi, sıcaklığın yanı sıra hava oransal nemi bakımından da daha yüksek değerlere sahip ekolojilerin donör bitki yetiştirilmesi açısından patlıcanda olumlu etki yapabileceğine işaret ediyor olabilir.

Çizelge 2. Kemer ve Aydın Siyahı patlıcan çeşitlerinde anter kültüründen elde edilen sonuçlar ve S polen oranları

Genotip	Kültüre Alınan Anter Sayısı	Enfekte Olanlar		Gelişen Anter		Embriyo Oluşumu		Bitki Oluşumu		S polen Oranı
		Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%	
Kemer	467	12	2.6	286	64.2	0	0	0	0	16.82
Aydın Siyahı	412	9	2.2	278	68.9	0	0	0	0	18.71

Çizelge 3. Kemer ve Aydın Siyahı patlıcan çeşitlerinde anter kültüründen elde edilen sonuçlar ve S polen oranları

Genotip	Kültüre Alınan Anter Sayısı	Enfekte Olanlar		Gelişen Anter		Embriyo Oluşumu		Bitki Oluşumu		S polen Oranı
		Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%	
Kemer	500	28	5.6	383	81.1	21	4.5	20	4.2	12.42
Aydın Siyahı	500	36	7.2	367	79.1	0	0	0	0	14.11

KAYNAKLAR

[1] Sunderland, N., 1971. Anther culture: a progress report. *Sci. Prog. Oxf.*, 59: 527-549.

[2] Rashid, A. 1983. Pollen dimorphism in relation to pollen plant formation. *Physiol. Plant.* 58: 544-548.

[3] Karakullukçu, Ş., 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar, (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enst., 138 s.

[4] Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D., 1982. Culture *in vitro* d'antheres d'aubergine (*S. melongena* L.); Stimulation de la production de plantes qu moyen de traitements a +35°C associes a de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie* 2 (10): 983-988.

[5] Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. Abak, K., 1998. Haploid Bitki Üretimi, (in: Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları, eds: Babaoğlu, M., Gürel.E., Özcan, S.), Selçuk Üniv. Vakfı Yayınları, s:137-189.

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

[7] Heberle-Bors, E., 1982. *In vitro* pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. and its relation to pollen sterility, sex balance, and floral induction of the pollen donor plants, *Planta*, 156: 396-401.