

W. Murcott mandarin çeşidinde anter kültürü çalışmaları

Yıldız AKA KAÇAR^{1*} Özhan ŞİMŞEK¹ Dicle DÖNMEZ² Melda BONCUK¹
Turgut YEŞİLOĞLU¹ Mehmet AKGÖL²

¹Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana

²Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ABD, Adana

Alınış Tarihi: 3 Temmuz 2014 Kabul Tarihi: 6 Ağustos 2014

Özet

Haploid bitkilerin elde edilmesi, bitki ıslahında, ıslah sürecini kısaltan önemli yöntemlerden bir tanesidir. Haploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılan yöntemlerden biri olan anter kültürü çalışmaları birçok bitki türünde yürütülmektedir. Bu çalışmada anterlerden haploid bitki elde etmek amacıyla W. Murcott mandarin çeşidinde, çiçeklenme dönemlerinde farklı boyutlardaki çiçekler toplanmış ve asetokarmin yöntemine göre anterler içerisindeki tek çekirdekli mikrospor aşaması belirlenmiştir. Çalışma sonucunda tek çekirdekli mikrospor aşamasının olduğu dönem çiçeklerin 4-5 mm çapında oldukları dönem olarak belirlenmiş ve bu boyuttaki çiçekler temin edilerek anter kültürü denemesi kurulmuştur. Çalışmada çiçeklere 25°C ve 4°C'de iki gün bekletilmesi şeklinde ön uygulama gerçekleştirilmiş ve ardından çiçeklerde yüzey sterilizasyonu uygulanarak anterler N6 besin ortamı içerisinde kültüre alınmışlardır. Anter kültürü denemelerinde 0 mg l⁻¹ TDZ (Thidiazuron), 0.1 mg l⁻¹ TDZ ve 0.5 mg l⁻¹ TDZ olmak üzere TDZ'nin üç farklı konsantrasyonu denenmiş ve anterlerin yarısı karanlıkta, diğer yarısı ise 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık iklim odası koşullarında kültüre alınmıştır. W. Murcott çeşidinde tek çekirdekli mikrospor aşamasında olan anterlerin kültüre alınması sonucunda yapılan incelemelerde anter eksplantlarında meydana gelen değişimler gözlemlenerek makalede tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Asetokarmin, Haploidi, TDZ, Polen, Mandarin

* Sorumlu yazar (Corresponding author): ykacar@cu.edu.tr

Anther culture studies in W. Murcott mandarin genotype

Abstract

Obtaining haploid plants is one of the important tool that shorten the plant breeding process. Anther culture is one of the method used for obtaining haploid plants. Anther culture studies are carried out for several plant species. In the present study, flowers at different sizes of W. Murcott mandarin were collected at the blooming period. Stage of mononuclear microspore of anthers was determined according to method of acetocarmine. Mononuclear microspore stage of anthers was observed in flowers 4-5 mm in diameter. Anther culture experiments were carried out with 4-5 mm in diameter anthers. In this study, temperature pre-treatment was performed at 4°C and 25°C for two days. Surface sterilization was performed in flowers and anthers were cultured in nutrient medium N6. Anther culture assays were performed with the three different concentrations of TDZ (0 mg l⁻¹ TDZ, 0.1 mg l⁻¹ TDZ, 0.5 mg l⁻¹ TDZ). Half of anthers were cultured in dark condition while the other half in 16 hours light, 8 hours dark climate room conditions. Anthers containing mononuclear microspore stage were cultured and, changes occurring in the anther explants were discussed in the article.

Keywords: Acetocarmine, Haploid, TDZ, Pollen, Mandarin

1. Giriş

İnsan beslenmesinde ve sanayide turuncgiller önemli bir yer tutmaktadır. Yeni turuncgil çeşit ve anaçlarının ıslahı çalışmaları tüm Dünya'da hızlı bir şekilde devam etmektedir. Meyve ıslahında melezleme, seleksiyon, mutasyon gibi klasik ıslah yöntemlerinin yanı sıra protoplast kültürü, somatik hibridizasyon, *in vitro* seleksiyon, genetik transformasyon, haploidi tekniği gibi biyoteknolojik yöntemler de kullanılmaktadır. Klasik ve biyoteknolojik yöntemlerin birlikte kullanılmasıyla hedeflenen amaca daha kısa sürede ulaşmak olasıdır (Germanà, 2006).

Doğada çeşitli şekillerde kendiliğinden ortaya çıkan haploidi uzun yıllardan beri bilinmekle birlikte, spontan haploidlerin ortaya çıkış oranı ve sıklığı çok azdır. Bu nedenle ıslah programlarında kullanım şansları çok sınırlıdır. *In vitro* teknikler kullanarak haploid bitkilerin elde edilmesi ve bunların kromozom sayılarının kimyasal maddeler yardımıyla iki katına çıkartılması olarak özetlenebilecek dihaploidizasyon tekniği, haploid bitkilerin ıslahçılara sunduğu kolaylıklardan yararlanabilmeyi sağlamaktadır (Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz, 2002). Turuncgillerde de haploid bitkiler, triploid çekirdeksiz

çeşit geliştirmede çok büyük önem taşımakta ve bu konuda çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Triploid çeşit ıslahında haploid ve diploid bitkilerin protoplastları somatik hibridizasyon yoluyla birleştirilerek çekirdeksiz bireyler elde edilmektedir (Froelicher vd., 2007).

Haploid bitki elde etme yöntemlerinden biri olan anter kültürünün bitki ıslahı programlarında sağladığı en büyük avantajlardan birisi, geleneksel yöntemler kullanıldığında uzun yıllar içerisinde elde edilebilen homozigot saf hatların, bir generasyonluk kısa bir sürede elde edilmesine olanak tanımasıdır. Anter kültüründen başarı elde etmek, donör bitkiden veya kültür sırasındaki uygulamalardan kaynaklanan birçok faktörün etkisi altındadır. *In vitro* androgenezisin başarıyla uyarılmasında en önemli faktörlerden birisi, mikrosporların gelişme aşamasına bağlı olarak anterlerin alınma zamanıdır. Anter kültürünün temel prensibi; normal yapıda olgun bir polen oluşturma yönündeki gametofitik gelişmeyi, embriyo oluşumu ile sona erecek olan sporofitik gelişme yönüne çevirmektir. Bu noktada, kültüre alınan anterlerdeki mikrosporların hangi gelişme döneminde bulunduğu kritik bir önem taşımaktadır. Mikrosporlar içerisinde nişasta depolanmaya başladıktan sonra, gelişmeyi sporofitik yöne kaydırmak ve haploid embriyo elde etmek için çeşitli uyarılar yapmak etkili olamamaktadır. Bitki türlerinin büyük bir çoğunluğunda androgenesis için en elverişli mikrospor gelişim aşaması, tek çekirdekli (uninucleate) mikrospor veya 1. polen mitozundan hemen sonraki dönemlerdir (Sarıkamış vd., 2000; Ellialtıoğlu vd., 2000).

Turunçgillerde haploidi konusundaki ilk çalışma, limonlarda (*Citrus limon*) anter kültürü aracılığı ile olmuş ve bu çalışma sonucunda yalnızca kallus elde edilebilmiştir (Dirra ve Benbadis, 1975). Daha sonra turunçgil türlerine ait haploid embriyolar ve/veya haploid bitkiler *Poncirus* (Hidaka vd., 1979), *C. microcarpa* (Chen vd., 1980), *C. sinensis* cv. Trovita (Hidaka ve Kajiura, 1989), *C. clemantina* (Germanà vd., 1994), *C. limon* (Germanà, 1992), Mapo (*C. deliciosa* X *C. paradisi*) tanjelo (Germanà vd., 1997) ve *C. madurensis* Lour (Germanà ve Chiancona, 2003) türlerinde rapor edilmiştir.

Bu çalışmada W. Murcott mandarin çeşidinde anter kültürü çalışmaları için uygun çiçek döneminin belirlenmesi ve bu çiçeklere ait anterlerin kallus ve embriyoid geliştirme kapasitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

2.1. Bitkisel materyal

Çalışmada yurtiçi ve yurtdışı pazarlarında önemli yeri olan W. Murcott mandarin çeşidi kullanılmıştır. W. Murcott mandarinini geççi bir çeşit olması ve kendine has bir aromaya sahip olması sebebiyle özellikle son yıllarda ön plana çıkmış bir mandarin çeşididir. Çalışmada kullanılan bitkisel materyal Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Turunçgil Genetik Koleksiyonundan temin edilmiştir. Kullanılan bitkisel materyaller yurtdışından temin edilmiş ve Turunçgil Genetik Kaynakları bünyesinde serada saksılar içinde muhafaza edilen turunç üzerine aşıllı 7 yaşlı ağaçlardan elde edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Polenlerin gelişme aşamasının belirlenmesi

Polenlerin gelişme aşamasının belirlenmesinde aseto-karmin boyama yöntemine ait protokol takip edilmiştir. Kullanılan aseto-karmin çözeltisi 55 ml saf su ve 45 ml glasiyal asetik asit karıştırılıp kaynatılarak hazırlanmıştır. Karışım içine 0.5 g karmin ilave edilmiştir. Karışım 4-5 dakikada soğutulup süzümüştür. Polenlerin gelişme aşamasının belirlenmesi için anterlerde aseto-karmin yöntemi ile boyama gerçekleştirilmiştir. Farklı gelişim aşamalarında alınan anterler 1 N HCl içerisinde 60°C'de 12 dakika bekletilmiş ve ardından destile su ile yıkanmış, suyun fazlası filtre kağıdı ile alınmıştır. Anterler birkaç damla aseto-karmin içerisinde 20 dakika bekletilmiştir. Bir damla karmin içerisinde anterler lam lamel arasında ezilmiştir. Bir yüzüne materyal yapışık olan lamel sırasıyla 1 glasiyal asetik asit (1N): 1 alkol (%60), 1 glasiyal asetik asit (1N): 3 alkol (%70), 1 glasiyal asetik asit (1N): 9 alkol (%80), 1 glasiyal asetik asit (1N): 1 ksilol (%90) ve 1 ksilol (%100) serilerinden geçirilmiş ve her seride 1-2 dakika bekletilmiştir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010).

2.2.2. Mikroskopik incelemeler

Aseto-Karmin boyama yöntemi kullanılarak hazırlanan ezme preparatlar ışık mikroskobu (Nikon, Eclipse, E200) altında incelenmiş ve fotoğraflamaları gerçekleştirilmiştir.

2.2.3. Anterlerin ön uygulamadan geçirilmesi

W. Murcott çeşidine ait yaklaşık 4-5 mm çapındaki anterlere sahip olan çiçek tomurcukları toplanıp laboratuvara getirilmiş ve uygulama gruplarına ayrılmıştır. Toplanan tomurcuklar soğuk şoku uygulaması ve kontrol ortamlarında tutulmak üzere ikiye ayrılmıştır. Soğuk uygulaması yapılan tomurcuklar +4°C'deki buzdolabında 48 saat karanlıkta bekletilmiştir. Kontrol uygulamasında ise tomurcuklar 48 saat 25°C'de tutulmuştur.

2.2.4. Bitkisel materyalin yüzey sterilizasyonu

Kontrol grubuna ait çiçek tomurcukları ile soğuk uygulamasından geçirilmiş çiçek tomurcukları steril kabin içerisinde 3 dk %70'lik etil alkol çözeltisinde bekletildikten sonra 15 dk %2'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde bekletilmiş ve daha sonra 3 kez steril saf su ile çalkalanarak sterilant maddelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

2.2.5. Anterlerin kültüre alınması

Sterilizasyonları tamamlanan çiçek tomurcuklarından anterler steril pens ve bistüri yardımıyla izole edilmiş ve Nitsch ve Nitsch vitaminleri (1969), 18 g l⁻¹ laktöz, 9 g l⁻¹ galaktoz, %5 hindistan cevizi sütü, 500 mg l⁻¹ casein, 200 mg l⁻¹ glutamine, 0.5 mg l⁻¹ biotin, 500 mg l⁻¹ ascorbic acid, 0.02 mg l⁻¹ NAA, 0.02 mg l⁻¹ 2,4-D; 1.0 mg l⁻¹ kinetin, 0.5 mg l⁻¹ 6-BA, 0.5 mg l⁻¹ zeatin ve 0.5 mg l⁻¹ GA3 içeren N6 besin ortamında kültüre alınmıştır (Germanà ve Chiancona, 2003). Anter kültürü denemelerinde 0 mg l⁻¹ TDZ, 0.1 mg l⁻¹ TDZ ve 0.5 mg l⁻¹ TDZ olmak üzere TDZ'nin üç farklı konsantrasyonu denenmiş ve anterlerin bir kısmı karanlıkta, bir kısmı ise 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık iklim odası koşullarında kültüre alınmıştır.

2.2.6. İstatistik analizler

Deneme 3 tekerrürlü, her tekerrürde 3 petri ve her petride 20 adet anter olacak şekilde faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Anterlerin kültüre alınmasına ait deneme planı Çizelge 1'de sunulmuştur. Deneme sonucunda elde edilen veriler ile her tekerrür için anter gelişim yüzde değerleri hesaplanmıştır. Yüzde değerlerinde varyans analizi öncesi açı transformasyonu yapılmış ve varyans analizleri JMP

Çizelge 1. Anterlerin kültüre alınmasına ait deneme planı

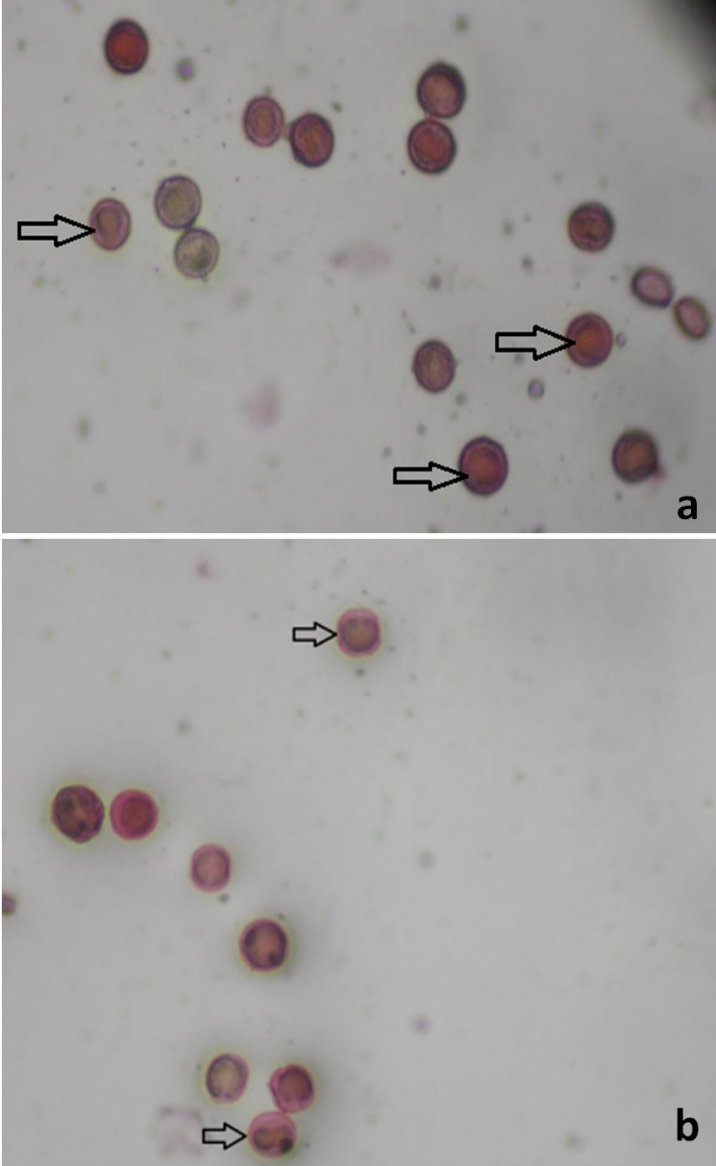
Çiçek tomurcukları											
Soğuk uygulaması (4°C) 48 s						25°C 48 s					
Karanlık			Aydınlık			Karanlık			Aydınlık		
TDZ	TDZ	TDZ	TDZ	TDZ	TDZ	TDZ	TDZ	TDZ	TDZ	TDZ	TDZ
0.0	0.1	0.5	0.0	0.1	0.5	0.0	0.1	0.5	0.0	0.1	0.5
9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
petri	petri	petri	petri	petri	petri	petri	petri	petri	petri	petri	petri
20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
anter	anter	anter	anter	anter	anter	anter	anter	anter	anter	anter	anter
180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180
540 anter			540 anter			540 anter			540 anter		
1080 anter						1080 anter					
2160 anter (toplam kültüre alınan)											

istatistik paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Önemli çıkan ortalamalar arasındaki farklar LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

Anter kültürü çalışmaları incelendiğinde kullanılan hemen hemen her bitki türünde en yüksek embriyo oluşumu tek çekirdekli mikrospor aşamasında gerçekleşmektedir. Bu çalışmanın ilk aşamasında W. Murcott mandarin çeşidinin farklı büyüklükteki çiçek tomurcuklarından izole edilen anterlerde tek çekirdekli mikrospor aşaması belirlenmeye çalışılmıştır. Farklı boyutta alınan çiçek tomurcuklarının anterlerinde yapılan histolojik analizler sonucunda 4-5 mm çapında alınan çiçek tomurcuklarının anterleri anter kültürü için en iyi boyut olarak saptanmıştır. Çalışmada tek çekirdekli aşamaların belirlendiği mikroskopik görüntü ve polen mitozunun daha ileri aşamadaki görüntüsü Şekil 1'de sunulmuştur.

Polen gelişim aşaması anter kültürü başarısını etkileyen kompleks bir faktördür. Anterlerin embriyojenik yetkinliği kullanılan türe göre farklılık gösterir, ancak genel olarak bu yetkinliğin birinci polen mitozu sırasında kazanıldığı düşünülmektedir (Touraev vd., 2001; Malik vd., 2007). Polenler depolama rezervleri biriktirmeye başladıktan sonra genellikle embriyojenik kapasitelerini kaybederler ve gametofitik gelişme yolunu izlerler (Heberle-Bors, 1989; Raghavan, 1990). Germanà vd. (2005), yapmış oldukları çalışmada, *C. clementina* Nules, SRA 63 ve Monreal genotiplerini kullanmışlardır. Çalışmada kullandıkları genotiplerde anter kültürü için uygun polen gelişim aşamasını asetokarmin boyama metodu ile ışık mikroskobu



Şekil 1. a) W. Murcott'a ait tek çekirdekli mikrospor. Boyutlar: Balon çapı: 4.65 mm Boy: 7.80 mm. b) W. Murcott mandarin çeşidinde mikrospor mitozunun daha ileri aşaması. Boyutlar: Balon çapı: 5.12 mm Boy: 8.00 mm

altında belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda 3.5-4.0 mm büyüklüğündeki çiçek tomurcuklarının anter kültürü için en uygun büyüklük olduğunu tespit etmişlerdir. Hideka vd. (1979) *Poncirus trifoliata*'da embriyoidler, pseudobulbiller ve kallusların oluşumu üzerine polen tanelerinin farklı gelişim aşamalarının etkilerini araştırdıkları çalışmada, embriyoid oluşumu için erken tek çekirdekli aşamadaki polen tanelerinin en uygun aşama olduğunu göstermişlerdir. Farklı gelişimsel aşamada olan anterlerden (ana hücre poleninden-bisellüler aşamaya kadar) yalnızca kallusların meydana geldiği bildirilmiştir. Pseudobulbiller polen ana hücrelerinden tetrat ya da bisellüler aşamadaki polen tanelerinden elde edilmiştir. Bitkilerde anter kültürü çalışmaları için önemli bir bölüm olan tek çekirdekli mikrospor aşamasının belirlenmesi için bu çalışmada kullanılan asetokarmin boyama yöntemi dışında farklı boyama ve görüntüleme teknikleri de kullanılabilir. Sarıkamış vd. (2000) lahanada tek çekirdekli mikrosporlara sahip olan anterlerin hangi büyüklüğe sahip tomurcuklarda bulunduğunu belirlemek amacıyla sitolojik incelemeler yapmışlardır. Çalışmalarında parafin yöntemi ve ezme yöntemini kullanmışlardır. Parafin yönteminde örneklerin boyanmasını Heidenhain demir hematoksilin ile gerçekleştirirken ezme yönteminde ise bizim çalışmamızda kullandığımız gibi asetokarmin boyamayı gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda parafin yöntemiyle hazırlanan preparatların bazılarında mikrospor tanelerinin büzüştüğünü belirlemişlerdir. Asetokarmin ile hazırlanan ezme preparatlardaki görüntülerin ise çok net ve açıklayıcı nitelikte bulunduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu tip araştırmalarda her iki yöntemden de daha pratik, hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak merkürük asit veya DAPI (4,6 diamidino 2-phenylindol dichloride) ile boyama sonrasında floresans mikroskobunda yapılacak gözlemlerin aynı amaçla kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Germanà (2006), yapmış olduğu çalışmada, polenlerin gelişme aşamasını DAPI boyama metodu ile araştırmışlar ve örnekleri floresan mikroskobu altında incelemiştir. Tek çekirdekli mikrospor aşaması için en uygun çiçek tomurcuklarının 3.5-4.0 mm büyüklüğündeki çiçek tomurcukları olduğunu belirtmiştir. Ancak her laboratuvar koşulunda floresan mikroskobun bulunmaması ve asetokarmin yönteminin hızlı sonuç vermesi göz önünde bulundurulduğunda, bu yöntemin turuncgiller ve diğer birçok türde rahatlıkla kullanılabilmesi ortaya çıkmaktadır. Yürütülen bu çalışmada ise W. Murcott mandarin çeşidinde tek çekirdekli aşamanın 4-5 mm çapındaki çiçeklerde olduğu tespit edilmiştir. Daha ileri boyutlarda yapılan incelemelerde mitoz bölünmenin devam ettiği ve uygun aşamanın kaybolduğu tespit edilmiştir.

Çizelge. 2. Anterlerden elde edilen gelişim yüzdeleri

Deneme Faktörleri			Ortalamalar (%)		
TDZ (mg l ⁻¹)	Sıcaklık	Kültür Koşulu	TDZ*SCK*KK	TDZ*SCK	TDZ
TDZ 0	4°C	Aydınlık	3.89 de (10.97)	4.16 b (11.54)	8.19 a (14.99)
		Karanlık	4.44 cde (12.11)		
	25°C	Aydınlık	2.77e (9.48)	12.22 a (18.44)	
		Karanlık	21.66 a (27.41)		
TDZ 0.1	4°C	Aydınlık	0.00 f (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 b (0.00)
		Karanlık	0.00 f (0.00)		
	25°C	Aydınlık	0.00 f (0.00)	0.00 d (0.00)	
		Karanlık	0.00 f (0.00)		
TDZ 0.5	4°C	Aydınlık	8.33 bc (16.60)	11.11 a (19.05)	7.22 a (13.24)
		Karanlık	13.89 b (21.50)		
	25°C	Aydınlık	0.00 f (0.00)	3.33 c (7.44)	
		Karanlık	6.66 cd (14.89)		
LSD _{TDZ} = 2.51***			LSD _{SCK} = Ö.D.		LSD _{KK} = 2.05***
LSD _{TDZ*SCK} = 3.55***			LSD _{TDZ*KK} = 3.78***		LSD _{SCK*KK} = 2.90***
LSD _{TDZ*SCK*KK} = 5.03**					

Parantez içinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar ayrı harflerle gösterilmiştir.

P<0.05*, P<0.01**, P<0.001***

W. Murcott mandarin çeşidinde tek çekirdekli mikrospor aşamasında olan anterlerin kültüre alınması sonucunda yapılan incelemelerde anter eksplantlarında gelişmeler gözlemlendiği fakat bu gelişimlerin herhangi bir kallus ve/veya embriyoid yapısına dönüşmediği belirlenmiştir. W. Murcott mandarin çeşidinde yapılan istatistiksel analizler sonucunda TDZ*sıcaklık*kültür koşulu interaksiyonları ortalamaları arasındaki fark önemli bulunmuştur. Yapılan gözlemler sonucunda en iyi gelişimin 25°C ön

uygulaması ile TDZ içermeyen ortamlarda ve karanlık koşullarda kültüre alınmış anterlerde olduğu tespit edilmiştir. TDZ uygulamaları ayrı ayrı değerlendirildiğinde TDZ ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. En fazla gelişimin %8.19 ile TDZ içermeyen ve %7.22 ile 0.5 mg l⁻¹ TDZ içeren ortamlarda olduğu tespit edilmiştir. 0.1 mg l⁻¹ TDZ içeren ortamlarda ise herhangi bir gelişimin gözlenmediği tespit edilmiştir. Anterlerin aydınlık ve karanlık ortamlardaki gelişim yüzdeleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Karanlıkta kültüre alınan anterlerin %7.77'si, aydınlıkta kültüre alınan anterlerin %2.50'sinde gelişim gözlenmiştir. Anterler kültüre alınmadan önce 4°C ve 25°C olmak üzere iki farklı grupta ön uygulamaya tabi tutulmuştur. Bu iki grup ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Elde edilen veriler ile yapılan istatistik analiz sonuçları Çizelge 2'de sunulmuştur.

Anter kültürü çalışmalarında bitki büyüme düzenleyicilerden biri olan TDZ oldukça önemli bir rol oynamaktadır. TDZ bitki doku kültürlerinde özellikle "rekalsitrant" olarak da ifade edilen inatçı türlerin çoğaltılmasında en aktif kullanılan sitokininlerden biridir. TDZ anter kültüründe pek çok bitkide kullanılmıştır. Bu çalışmada, TDZ'nin 0.1 mg l⁻¹ ve 0.5 mg l⁻¹ olmak üzere iki farklı konsantrasyonu ve TDZ içermeyen ortamlar denenmiştir. Çalışma sonucunda, TDZ içerikleri karşılaştırıldığında anter gelişimlerinin TDZ içermeyen ve 0.5 mg l⁻¹ TDZ içeren ortamlarda olduğu tespit edilmiştir. Bitkilerde anterlerden rejenerasyon ve özellikle de haploid bitki eldesi oldukça zor ve karmaşık çalışmalar arasında yer almaktadır. Meyvelerde ve özellikle turunçgillerde yürütülen anter kültürü çalışmaları sınırlı kalmış ve turunçgillerde başarı ile sonuçlanmış çok kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Kültüre alınan anterlerin rejenerasyonunu etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerin arasında en önemli faktörlerden biri genotip diğeri ise ön uygulamalardır. Turunçgillerde haploid bitkilerin elde edilmesi amacıyla yürütülen çalışmalar incelendiğinde anterlerin gelişiminin çok yavaş olduğu ve ilk 6 ayda çok düşük oranda gelişmeler meydana gelebileceği belirtilmiştir. Kültürün 10. ayına kadar gelişimin sürebileceği ve kallus oluşumunun gerçekleşebileceği belirtilmiştir (Germanà, 2007). Çalışma kapsamında kültüre alınan anterlerin gelişimi 12 ay süreyle takip edilmiştir. Bu süre sonucunda bazı anterlerde gelişmeler olduğu fakat istenilen kallus ve embriyo gelişimi olmadığı tespit edilmiştir. Germanà vd. (2005), yapmış oldukları çalışmada *C. clemantine* Nules, SRA 63 ve Monreral genotiplerinin anterlerini Nitsch ve Nitsch vitaminleri ile desteklenmiş N6 besin ortamında kültüre almışlardır. Kültüre aldıkları anterlerin yaklaşık %4'ü genotip, mevsim ve uygulanan denemelere bağlı olarak embriyoid veya embriyojenik kallus

üretmiştir. Bu çalışmada kullanılan W. Murcott mandarin çeşidine ait anterler Nitsch ve Nitsch vitaminleri ile desteklenmiş N6 besin ortamında kültüre alınmış fakat bazı gelişimler gözlenmesine rağmen embriyo oluşumu tespit edilememiştir. Kullandığımız genotipin farklı olması ve diğer koşullar dikkate alındığında anter kültürü çalışmalarında farklı sonuçların ortaya çıkması son derece olağandır.

Anter kültürü çalışmalarında donör bitkinin fizyolojik durumu *in vitro* kültürlerde anterlerin verdiği cevabı önemli bir şekilde etkilemesine rağmen, bu parametre odunsu bitkilerde çalışmanın zorluğundan dolayı sadece otsu bitkilerde araştırılmıştır. Aslında, büyüme koşulları ve donör bitkinin fizyolojik durumu açık alanda kültürü yapılan ve iklimsel koşullardan (sıcaklık, fotoperiyod ve ışık yoğunluğu), kültürel koşullardan (budama, sulama, gübreleme, vb) ve özellikle çiçek indüksiyon ve farklılaşması sırasında toprak yapısından etkilenen çok yıllık bitkilerin anter kültürü çalışmaları standartize edilememektedir. Bu durum aynı protokoller uygulandığında bile odunsu bitkilerin sezona bağlı olarak anter kültürlerinde neden farklı cevap verdiği açıklamaktadır (Germanà, 2009).

Haploidler genellikle zaman alıcı, zahmetli ve bazen oldukça verimsiz olan geleneksel ıslah metodlarının hızını ve etkinliğini artırabilir. Polen embriyogenesis uygulamaları yaygın olmasına ve birçok türün anter kültürüne iyi yanıt vermesine rağmen, diğer ilgi çekici birçok tür hala rekalsitranıtır ve mikrosporların polen embriyoidlerine dönüşümünün hüresel, biyokimyasal ve moleküler mekanizması hala çok az bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı yeni genotipten bağımsız metotların geliştirilmesi gerekmektedir. Androgenesis olarak ta tanımlanan mikrospor veya polen embriyogenesisi hüresel totipotensinin en çarpıcı örneklerinden biri olarak görülür (Reynolds 1997; Germanà, 2011). Geleneksel ıslah metotlarıyla karşılaştırıldığında, gametik embriyogenesis homozigot hatların üretimini mümkün hale getirir ve heterozigot ebeveynlerden tamamen homozigot hatların geliştirilmesi için gerekli olan zamanı kısaltır. Son zamanlarda, mikrospor embriyogenesisin moleküler temeli üzerine yapılan çalışmalar genomik, transkriptomik, proteomik alanlarındaki gelişmelerden faydalanmaktadır. Bu mikrospor embriyogenesisin daha iyi anlaşılmasında ve daha etkili protokollerin geliştirilmesinde oldukça önemli bir paya sahiptir (Germanà, 2011). Anter kültürü aracılığıyla androgenesisin mekanizması türe veya genotipe bağlıdır. Şimdiye kadar *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. aurantifolia*, *C. madurensis* ve *C. reticulata* gibi turuncgil türlerinde anter kültüründen ancak heterozigot rejenerantlar elde edilmiştir (Germanà, 1997; Germanà vd., 2005).

4. Sonuç

Yapılan bu çalışma sonucunda, W. Murcott mandarin çeşidinde tek çekirdekli aşamadaki anterler tespit edilmiştir. Bu aşamadaki anterler ilk olarak 4°C ve 25°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta ön uygulamaya tabi tutulmuştur. Ön uygulamadan sonra anterler Nitsch ve Nitsch vitaminleri ile desteklenmiş N6 besin ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmada, anterlerin gelişimini desteklemek amacıyla 0 mg l⁻¹ TDZ, 0.1 mg l⁻¹ TDZ ve 0.5 mg l⁻¹ TDZ olmak üzere TDZ'nin üç konsantrasyonu kullanılmıştır. Anterlerin yarısı karanlık diğer yarısı 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Yapılan istatistiksel analizlerde en iyi gelişimin TDZ içermeyen ve 0.5 mg l⁻¹ TDZ içeren ortamlarda olduğu tespit edilmiştir. Ön uygulamalar (4°C ve 25°C) arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Kültür koşulları karşılaştırıldığında, karanlık koşullarda kültüre alınan anterlerin daha iyi gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunların arasında genotip, bitkilerin fizyolojik koşulları ve ön uygulamalar en başta gelmektedir. Bu çalışma kapsamında anterlerin gelişim gösterdiği fakat embriyoid oluşturmadığı gözlenmiştir. Bu durumun anter kültürünü etkileyen değişik faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca turunçgillerde yürütülecek anter kültürü çalışmalarında anterlerin daha uzun sürelerde kültürde kalmalarının kallus ve embriyoid gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:ZF2012BAP1).

Kaynaklar

- Chen, Z., Wang, H., & Liao, H. (1980). The induction of *Citrus* pollen plants in artificial media. *Acta Genetica Sinica*, 7:189–192.
- Drira, N., & Benbadis, A. (1975). Analysis, by *in vitro* anther culture, of the androgenetic potential of two *Citrus* species (*Citrus medica* L. and *Citrus limon* L. Burm). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 281:1321–1324.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., & Abak, K. (2000). Haploid Bitki Üretimi. pp. 137-189. *In*: Babaođlu, M., Özcan, S., Gürel, E. (Eds.), Bitki Biyoteknolojisi Cilt:I. Konya, Türkiye.
- Ellialtıoğlu, Ş., & Tıprıdamaz, R. (2002). Soğuk uygulamaları ve aktif kömürün biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü süresince absizik asit

- miktarındaki değişim üzerine etkisi. *Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1):9-18.
- Froelicher, Y., Basense, J.B., Jedidi-Neji, E., Dambier, D., Morillon, R., Bernardini, G., Costantino, G., & Ollitrault, P. (2007). Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Reports*, 26:937-944.
- Germanà, M.A. (1992). Androgenesis in *Citrus*: A review. In: Proceedings of the International Society of Citriculture. Acireale, Italy, 183–189.
- Germanà, M.A. (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tissue Organ*, 86:131–146.
- Germanà, M.A. (2007). Haploidy. pp 167–196. In: Khan, I. (Ed.), *Citrus*. Genetics, breeding and biotechnology. CABI, Wallingford.
- Germanà, M.A. (2009). Haploid and doubled haploids in fruit trees. pp. 241–263. In: Touraev, A., Forster, B., Jain, M. (Eds.), *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, Heidelberg.
- Germanà, M.A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104:283–300.
- Germanà, M.A. & Chiancone, B. (2003). Improvement of the anther culture protocol in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Plant Cell Reports*, 22:181–187.
- Germanà, M.A., Chiancone, B., Lain, O., & Testolin, R. (2005). Anther culture in *Citrus clementina*: a way to regenerate tri-haploids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56:839–845.
- Germanà, M.A., & Recupero, G.R. (1997). Haploid embryos regeneration from anther culture of 'Mapo' tangelo (*Citrus deliciosa* X *C. paradisi*). *Advances in Horticultural Science*, 11:147–152.
- Germanà, M.A., Wang, Y.Y., Barauntbagallo, M.G., Iannolino, G., & Crescimanno, F.G. (1994). Recovery of haploid and diploid plantlets from anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. and *Citrus reticulata* Blanco. *The Journal of Horticultural Science*, 69:473–480.
- Germanà M.A. (1997). Haploidy in *Citrus*. In: Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (Eds.), *In vitro* haploid production in higher plants, vol 5. Kluwer, Dordrecht, 195–217.
- Heberle-Bors, E. (1989). Isolated pollen culture in tobacco: Plant reproductive development in a nutshell. *Sexual Plant Reproduction*, 2:1–10.
- Hidaka, T., & Kajiuira, I. (1989). A simple method for acclimatization of *in vitro* plantlets of Citrus. *Bull Fruit Tree Research Station*, 16:19–28.
- Hidaka, T., Yamada Y., & Shichijo, T. (1979). *In vitro* differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Japan Journal of Breeding*, 29:248-254.
- Malik, M.R., Wang, F., Dirpaul, J.M., Zhou, N., Polowick, P.L., Ferrie, A.M.R., & Krochko, J.E. (2007). Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology*, 144:134–154.

- Nitsch, J.P. & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163:85-87.
- Raghavan, V. (1990). From microspore to embryoid: faces of the angiosperm pollen grain. pp. 213–221. In: Nijkamp, H.J.J., Van Der Plas, L.H.W., & Van Hartrigik, J. (Eds.), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. IAPTC. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Reynolds, T.L. (1997). Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33:1–10.
- Sarıkamış, G., Ellialtıoğlu, Ő., & Yanmaz, R. (2000). Lahanada iek Tomurcuđu Morfolojisi ile Mikrospor Gelişme Dönemi Arasındaki İliŐkinin Belirlenmesi. *III. Sebze Tarımı Sempozyumu*, 11-13 Eylül 2000, Isparta, s: 72-75.
- Topaktaş, M., & Rencüzoğulları, E. (2010). *Sitogenetik*. Nobel Akademik Yayıncılık, 188 s., Ankara.
- Touraev, A., Prosser, M., & Heberle-Bers, E. (2001). The microspore: a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35:53–109.