

Patlıcanda şeker, bal ve büyüme düzenleyicilerin anter kültüründe embriyoid oluşumuna etkisi

Naif GEBOLOĞLU¹, Sevtap DOKSÖZ BONCUKÇU¹, Perihan DURNA¹, Mustafa BAYRAM²

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, TOKAT

²Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, TOKAT

Alınış tarihi: 14 Ekim 2016, Kabul tarihi: 18 Kasım 2016

Sorumlu yazar: Naif GEBOLOĞLU, e-posta:naif.gebologluop.edu.tr

Öz

Anter kültüründe besin ortamı bileşenlerinden şeker ve büyüme düzenleyiciler önemli role sahiptir. Genelde besin ortamlarında karbonhidrat kaynağı olarak sakkaroz kullanılmaktadır. Anter kültürü ile ilgili birçok çalışmada sakkarozun %2-4 dozları önerilirken, az sayıda çalışmada şekerin %9-15 arasındaki dozları önerilmektedir. Anter kültürü çalışmalarında karbonhidrat kaynağı olarak şeker yerine bal kullanılması ile ilgili çok az araştırma yapılmıştır. Patlıcanda anter kültüründe şeker yerine bal kullanılmasının etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, farklı sakkaroz ve bal dozları (30, 60, 90, 120 ve 150 mg/l) karşılaştırılmıştır. Büyüme düzenleyici olarak 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ve Kinetinin (Kin) 1, 3 ve 5 mg/l dozları kullanılmıştır. Androgenik performansı yüksek Yamula lokal popülasyonu ile androgenik performansı düşük Anamur F1 genotipleri donör bitki olarak kullanılmıştır. En yüksek ortalama embriyoid oluşumu bal uygulamasında %18.35, şeker uygulamasında %20.95 olmuştur. Yamula daha yüksek androgenik cevap vermiştir. En yüksek embriyoid oluşumu 1,0 mg/l Kinetin + 3,0 mg/l 2,4 D uygulamasından elde edilmiştir. Besin ortamında karbonhidrat kaynağı olarak sakkaroz yerine bal kullanılmasının patlıcanda anter kültüründe embriyoid oluşumu üzerine olumlu etki ederken, besin ortamlarında bal kullanılması ile ilgili daha çok çalışma yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Kinetin, 2,4-D, sakkaroz, bal, embriyogenesis, haploidi

Influence of sugar, honey and growth regulators on embryo induction of eggplant in anther culture

Abstract

Sugar and plant growth regulators have an important role in anther culture. In general, sucrose is used as a carbohydrate source in the nutrient medium. In many studies on the anther culture 2-4% doses of the sucrose are recommended. However, a few studies recommended the sugar between 9-12%. There are very few research about using honey as a carbohydrate source instead of sugar. In this study, different doses of sucrose and honey (30, 60, 90, 120 and 150 mg/l) were compared in eggplant anther culture. Doses of 1, 3 and 5 mg/l of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and Kinetin (Kin) were used as a growth regulator. Yamula (local population) with high androgenic performance and Anamur F1 with low androgenic performance were used as donor plants. The highest average embryonic response was obtained from honey and sucrose 18,35% and 20,95% respectively. Yamula genotype gave higher androgenic response. The highest embryogenesis was obtained from 1.0 mg / l kinetin + 3.0 mg / l 2,4-D treatment. Using honey instead of sucrose in eggplant anther culture gave positive results. There is need for more study about using honey in nutrient media

Key words: Kinetin, 2,4-D, sucrose, honey, embryogenesis, haploidy

Giriş

Anter kültürü tekniği hibrit çeşit üretiminde saf hatların elde edilmesinde klasik ıslah yöntemlerine göre daha hızlı sonuç vermekte ve önemli avantajlar sağlamaktadır (Tipirdamaz ve Ellialtıoğlu, 1998, Germana, 2011, Başay ve Ellialtıoğlu, 2013). Anter kültüründe başarı besin ortamı, genotip, donör bitkinin yetiştirme koşulları, büyüme düzenleyiciler, stres faktörleri, ön uygulamalar, inkübasyon koşulları ve anter alım zamanı gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Bajaj, 1990). Besin ortamında karbonhidrat kaynağı olarak şeker kullanılması anter kültüründe başarı üzerine bitki büyüme düzenleyici maddeler ve genotip kadar etkilidir (Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997). Şekerin in vitro koşullarda bitki hücrelerinde önemli embriyolojik farklılaşmalara neden olduğu çok sayıda çalışma ile ortaya konmuştur (Koch, 1996; Jain ve Babbar, 2003; Yadollahi ve ark., 2011; Yaseen ve ark., 2013). Buğdayda %3 şeker mikrospor kültürü için ideal kabul edilirken, anter kültürü için %9 gibi yüksek oranlar da uygun bulunmakta, %9'dan daha yüksek şeker konsantrasyonları polen bölünmesini inhibe etmekte, 2,4-D ise polenin gametofitik fazdan sporofitik faza geçişinde rol oynamaktadır (Zhongheng, 2002).

Anter kültüründe şeker türevleri arasında en yaygın kullanılan ve en etkili olanı sakkarozdur. Sakkarozdan sonra sırasıyla glikoz, fruktoz ve maltoz gelmektedir (Hema ve ark., 2007). Şeker dışında önemli karbonhidrat kaynaklarından biri de baldır. Bal, üretildiği bölge, balı yapan arının türü ve arının beslendiği bitki türü gibi faktörlere bağlı olarak farklı içeriklere sahip olabilmektedir. Ancak genel olarak balın sakkaroz içeriği düşük, fruktoz ve glukoz içeriği yüksektir. Balın kimyasal bileşimi dikkate alındığında bugüne kadar neden anter kültürü çalışmalarında yeterince denenmediği anlaşılmamaktadır. Bal yüksek oranda şeker türevlerini içermesinin yanında birçok bakımdan zengin ürünlerden biridir. 100 gram bal 15-20 g su, 30-45 g fruktoz, 24-40 g glukoz, 0.1-4.8 g sakkaroz, ve 2.0-8.0 g diğer sakkaritleri içermektedir. Ayrıca 0.1-0.5 g mineral ve 0.2-0.8 g protein içerir (Ajibola ve ark., 2012). Bal anter kültürü çalışmalarında besin ortamında kullanılan Thiamine (Vit. B1), Riboflavin (Vit. B2), Niacin (Vit. B3), Pantothenic acid (Vit. B5), Pyridoxine (Vit. B6), Folic acid (Vit. B9) ve Ascorbic acid (Vit. C) gibi birçok vitamin ile sodyum, kalsiyum,

magnezyum, potasyum, fosfor gibi makro besin elementlerini ve bakır, demir, mangan ve çinko gibi mikro besin elementlerini içermektedir (Bogdanov ve ark., 2008; Ciulu ve ark., 2011; Kováčik ve ark., 2016). Balın toplam fenolik içeriği 56.32 ile 246.21 mg/100g ve toplam antioksidant aktivitesi % 6.48 ile % 65.44 arasında değişmektedir (Al-Mamaray ve ark., 2002). Bal aynı zamanda birçok patojene karşı antimikrobiyal etkiye de sahiptir (Molan, 1992; Cooper ve ark., 2002).

Dünya genelinde önemli sebze türlerinden biri olan patlıcan anter kültürüne yüksek düzeyde olumlu yanıt veren sebze türlerindendir. Patlıcanda ilk androgenik yanıt 1973 yılında alınmıştır. Geçen 43 yıllık sürede genotip, besin ortamı, büyüme düzenleyiciler, stres uygulamaları gibi birçok konuda çok sayıda çalışma yapılmış ve oldukça yüksek başarı oranlarına ulaşılmıştır (Zhiming, 1991; Rotino, 1996; Kumar ve ark., 2003; Khatun ve ark., 2006; Salas ve ark., 2011; Başay ve Ellialtıoğlu, 2013; Rotino, 2016). Patlıcanda anter kültüründe anterlerin karanlıkta 8 gün 35°C'de inkübe edildiği, 2,4-D ve kinetin içeren ortam başarılı protokollerden biridir (Dumas de Vaultx ve Chambonnet, 1982). Birçok araştırmacı bu protokolün modifiye edilmiş şeklini patlıcanın da içinde olduğu birçok sebze türünde başarıyla kullanmıştır (Sanguineti ve ark., 1990; Rizza ve ark., 2002; Rotino ve ark., 2005).

Bu çalışmada patlıcanda anter kültüründe besin ortamına şeker yerine bal ilave edilmesinin embriyoid oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Anter kültüründe başarı üzerine birçok faktörün interaktif etkiye sahip olduğu gerçeğinden hareketle çalışmada bal ve şeker dozlarının yanında anter kültürüne tepkisi birbirinden farklı olan iki genotip ile kinetin ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyonları da denenmiştir.

Materyal ve Metot

Çalışma 2015-2016 yılları arasında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü araştırma alanında ve Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada bitkisel materyel olarak ön çalışmalarda androgenik performansı düşük bulunan Anamur F1 patlıcan çeşidi ve androgenik performansı yüksek Kayseri bölgesinde yerel populasyon olarak kullanılan Yamula genotipi kullanılmıştır. Şekere alternatif olarak Tokat yöresinde elde edilmiş bal kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan balın suda

çözünür kuru madde miktarı (Briks değeri 20°C) refraktometrik yöntemle (Cemeroğlu, 2007), İnvert şeker miktarı, kırılma indisi, nem tayini, pH ve toplam asitlik içeriği Anonim (2002)'ye göre belirlenmiştir. Balın toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlenmiştir.

Örneklerin absorbansına karşılık gelen toplam fenolik bileşik miktarı, gallik asit kullanılarak çizilen standart grafikte belirlenmiş, sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden mg/kg olarak ifade edilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). Balın fizikokimyasal özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Bal örneklerinin fizikokimyasal özellikleri

Fizikokimyasal özellikler	Ölçüm değeri
% Suda Çözünür Kuru Madde (Briks)	82.7±0.000
Kırılma İndisi	1.4971±0.000
Nem (%)	15.8±0.000
pH	3.83±0.007
Asitlik (meq/kg)	36.47±1.004
Toplam Fenolik (mg GAE/kg)	64.535±3.280
İnvert Şeker (g/L)	69.68±1.002

Anter hasadında uygun dönemi belirlemek için farklı evrelerdeki çiçek tomurcuklarından alınan mikrosporlar % 2'lik asetokarmin ile boyanmış, sitolojik ve morfolojik dönemler belirlenmiştir. Tek çekirdekli mikrospor gelişmesinin son evreleri ile birinci polen mitozunun başlangıç evresini en iyi temsil eden morfolojik aşama çanak yaprakların taç yapraklardan hafifçe daha uzun olduğu ve anterlerin yeşilden sarıya dönüşmeye başladığı dönem olarak belirlenmiştir.

Polen embriyogenesi için en uygun mikrospor gelişme dönemine sahip olan anterleri içeren çiçek tomurcukları üç kez saf su ile yıkanmış daha sonra birkaç damla Tween-20 eklenmiş % 20'lik ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Sterilizasyonun ardından üç kez steril saf su ile durulanmıştır. Anterler tomurcuktan çıkarıldıktan sonra besin ortamı üzerine, dorsal yüzeyi ortamla temas edecek biçimde ve ortama batırılmaksızın yerleştirilmiştir. Bir petri kutusuna 10 anter ekilmiştir. Her uygulama için 5 petri ve 50 anter, toplamda 1800 anter kullanılmıştır. Embriyoid sayıları 5 petrinin ortalaması alınarak hesaplanmış ve 10 anterden elde edilen embriyoid sayısı belirlenmiştir.

Çalışmada Dumas de Vault ve ark. (1981), tarafından önerilen besin ortamı (DDV) kullanılmıştır. Anterler önce "C" ortamına yerleştirilmiştir. "C" ortamına 0,03 mg/l B12 vitamini, sakkaroz (30-60-90-120 ve 150 g/l), bal (30-60-90-120 ve 150 g/l), kinetin (1.0, 3.0, 5.0 mg/l) ve 2,4-D (1.0, 3.0, 5.0 mg/l) ilave edilmiştir. Ortamın katılaştırılmasında %0.8 Agar-agar (SIGMA) kullanılmıştır. Besin ortamının pH seviyesi 5.8'e ayarlandıktan sonra 15 dakika süreyle 121 °C'de 1

atm basınç altında otoklavda sterilize edilmiştir. Anterler 8 gün karanlıkta 35°C'de bekletilmiş ve ardından 25±2°C sıcaklık ve 16/8 saat gündüz/gece koşullarına sahip iklim odasına alınarak burada 4 gün bekletilmiştir. 12 gün "C" ortamında bekleyen anterler daha sonra "R" ortamına aktarılmıştır. "R" ortamında 30 g/l sakkaroz ve 0,1 mg/l kinetin kullanılmıştır. "R" ortamı 4 hafta sonra yenilenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Embriyoid oluşumu 10 anterden elde edilen ortalama sayı şeklinde değerlendirilmiştir. Denemede kullanılan uygulamalar arasında en yüksek embriyoid oluşumu Yamula genotipinde 10,70 embriyoid ile 120 gram şeker + 1.0 mg/l kinetin + 3.0 mg/l 2,4-D uygulamasından elde edilmiştir. Besin ortamında bal kullanılan uygulamalarda en yüksek embriyoid oluşumu Yamula genotipinde 8,68 embriyoid ile 60 g/l bal + 3.0 mg/l kinetin + 5,0 mg/l 2,4-D uygulamasından elde edilmiştir. Yamula genotipinde şeker miktarı arttıkça embriyoid oluşumu artmıştır. Anamur F1 genotipinde 30 gram şeker uygulamasından sonuç alınamamış, 90 gram şeker en yüksek ortalama yanıtı vermiş, 120 ve 150 gram şeker dozlarında başarı oranı düşük çıkmıştır. Yamula genotipinde besin ortamında bal kullanılan çalışmada 90 g/l bal uygulaması en başarılı ortam bulunmuştur. Bunu 60 ve 30 gram bal uygulaması izlemiştir. Yamula genotipinde embriyoid oluşumu 120 g/l bal uygulamasında düşüş göstermiş, 150 g/l bal kullanılan ortamlarda her iki genotipte de embriyoid elde edilememiştir. Anamur F1 genotipinde en yüksek başarı 60 gram bal kullanılan ortamdan elde edilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Uygulamalara bağlı olarak oluşan embriyoid sayıları (embriyoid/10 anter)

Genotip	(mg/l)		Şeker (g/l)						Bal (g/l)					
	Kin	2,4-D	30	60	90	120	150	Ort.	30	60	90	120	150	Ort.
Yamula	1	1	1.76		1.25			0.60			6.83			1.37
	1	3		2.37	9.35	10.70	10.29	6.54		3.95	4.53			1.70
	1	5		2.44	1.56		6.50	2.10		2.45	1.85	0.42		0.94
	3	1	0.82	2.27	1.84	1.81	10.53	3.45	2.93	6.11	7.63	2.24		4.37
	3	3		1.37	2.01		3.79	1.44		0.80	2.63			0.69
	3	5		0.33			0.00	0.07		8.68				1.74
	5	1	0.96	0.58	2.59		8.99	2.62	0.77			0.96		0.50
	5	3	2.57					0.51	7.17		1.85			3.24
	5	5			4.56	1.53	1.52	1.52			8.43	1.49		1.98
	Ortalama		0.68	1.04	2.57	1.56	4.62	2.10	1.21	2.44	3.75	0.57		1.84
Anamur F ₁	1	1												
	1	3			3.17	9.73		2.58						
	1	5			0.53			0.11	0.51			0.51		0.20
	3	1			0.42			0.08						
	3	3					4.27	0.85		1.22				0.24
	3	5			8.50			1.70		2.82				0.56
	5	1												
	5	3		1.52				0.30		4.93				0.99
	5	5												
	Ortalama			0.17	1.40	1.08	0.47	0.63	0.06	1.00		0.06		0.22

Karbonhidrat kaynağı olarak bal kullanılması embriyoid oluşumunu teşvik etmiş, ancak şeker uygulamasının üzerine çıkamamıştır. Yamula genotipinde ortalama embriyoid oluşumu şeker ve bal kullanılan ortamlarda sırasıyla 2,10 ve 1,84 embriyoid, Anamur F₁ genotipinde sırasıyla 0,63 ve 0,22 olmuştur. Raina ve Iyer (1982), Datura metel'de şeker kaynağı olarak %2, %3 ve %4 bal kontrol olarak %2 sakkaroz kullanmış, kontrolden %57.4 embriyoid elde ederken, %3 bal uygulamasından %50,8 embriyoid elde etmişlerdir. Kumar ve Murthy (2004), hıyarda sakkaroz, glukoz ve maltozun farklı dozlarını kullandıkları çalışmada en yüksek embriyoid oluşumunu %72-80 oranıyla 90 g/l sakkaroz uygulamasından elde ederken, şeker miktarı 90 g/l'ye kadar arttıkça başarı oranının da arttığını, 90 gramdan yüksek konsantrasyonlarda başarının düştüğünü belirtmektedirler. Salas ve ark. (2011), farklı patlıcan genotiplerinin androgenik performansını inceledikleri çalışmada en yüksek embriyoid oluşumunun %60.9 olduğunu belirtmektedirler.

Literatürdeki birçok çalışmanın aksine çalışmada besin ortamında büyüme düzenleyici olarak Kinetin ve 2,4-D'nin yüksek dozları denenmiştir. Bu dozlar bazı uygulamalarda oldukça yüksek sonuçlar vermiştir. Kinetin ve 2,4-D'nin embriyoid oluşumuna etkisine bakıldığında en yüksek ortalama

performans Yamula genotipinde şeker kullanılan ortamda 6.54 ile 1.0 mg/l Kinetin+3.0 mg/l 2,4-D uygulamasından elde edilirken, bal kullanılan ortamda 4.37 embriyoid ile 3.0 mg/l Kinetin+1.0 mg/l 2,4-D uygulamasından alınmıştır. Androgenik performansı düşük olan Anamur F₁ genotipinde şeker kullanılan ortamda 2.58 ile ortalama en yüksek performans 1.0 mg/l Kinetin+3.0 mg/l 2,4-D uygulamasından elde edilirken, bal kullanılan ortamda 0.99 embriyoid ile 5.0 mg/l Kinetin+3.0 mg/l 2,4-D uygulamasından elde edilmiştir. Başay ve Ellialtıoğlu (2013). Patlıcan da 5 farklı genotipte anter kültürünün embriyoid ve DH hat oluşumuna etkisini araştırdıkları çalışmada Dumas de Vaulx and Chambonnet (1982) tarafından önerilen DDV ortamına 5 mg/l Kinetin ve 5 mg/l 2,4-D ilave etmişler ve embriyoid oluşum oranının genotiplere göre % 0-4.49 arasında değiştiğini belirlemişlerdir.

Sonuç

Patlıcanda anter kültüründe şeker kaynağı olarak bal kullanılması kontrol uygulamasına göre daha düşük düzeyde embriyoid oluşumu sağlamasına rağmen, literatürdeki birçok çalışmaya göre başarı düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle anter kültürü çalışmalarında balın şeker kaynağı olarak daha fazla çalışılması gerekmektedir. Özellikle bileşiminin zengin olması ve antimikrobiyal özelliği balı daha değerli yapmaktadır.

Anter kültürü ile ilgili birçok çalışmada Kinetin ve 2,4-D'nin çoğunlukla 0.01-1.0 mg/l arasındaki dozları kullanılmıştır. 3 ya da 5 mg/l gibi yüksek dozlar çok sınırlı denenmiştir. Çalışmada kinetin ve 2,4-D'nin yüksek dozları olumlu yanıt vermiştir. Kinetin ve 2,4-D'nin yüksek dozları özellikle androgenik performansı düşük veya yanıt alınamayan genotiplerde başarı düzeyini yükseltecektir. Bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- Ajibola, A., Chamunorwa, J.P., Erlwanger, K.H., 2012. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & metabolism*, 9(1):1.
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M., 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition research*, 22(9): 1041-1047.
- Anonim, 2002. TS 3036, Bal. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Bajaj, Y.P.S., 1990. In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 12, Haploids in Crop Improvement I, 372-380.
- Başay, S., Ellialtıoğlu, Ş.Ş., 2013. Effect of genotypical factors on the effectiveness of anther culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Turkish Journal of Biology*, 37(4):499-505.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P., 2008. Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6):677-689.
- Cemeroğlu, B., 2007. Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No; 34, Ankara.
- Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Sanna, G., 2011. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83(3):924-929.
- Cooper, R.A., Molan, P.C., Harding, K.G., 2002. The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied microbiology*, 93(5):857-863.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Huerta, A., 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L.—effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(4):468-475.
- Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D., 1982. Culture in vitro d'anthe's d'aubergine (*Solanum melongena* L.): stimulation de la production de plantes au moyen de traitements à 35°C associées à de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie* 2:983-988.
- Germana, M., 2011. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep* 30:839-857.
- Hema, B.P., Murthy, H.N., 2007. The effect of sugars on niger embryogenesis and plant regeneration in anther culture. *Biologia Plantarum*, 51(4):773-776.
- Jain, N., Babbar, S.B., 2003. Effect of carbon source on the shoot proliferation potential of epicotyl explants of *Syzygium cumini*. *Biologia plantarum*, 47(1):133-136.
- Khatun, F., Meah, M.B., Nasiruddin, K.M., 2006. Regeneration of eggplant through anther culture. *Pak J Biol Sci*, 9:48-53.
- Koch, K.E., 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1):509-540.
- Kováčik, J., Grúz, J., Biba, O., Hedbavny, J., 2016. Content of metals and metabolites in honey originated from the vicinity of industrial town Košice (Eastern Slovakia). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5):4531-4540.
- Kumar, H.A., Murthy, H.N., 2004. Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 78(3), 201-208.
- Kumar, S., Singh, M., Prabhavathi, K., Mathews, A., Kumar, S., Singh, M., Mathews, A., 2003. In vitro induction of haploid in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 22:147-150.
- Molan, P.C., 1992. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee world*, 73(1):5-28.
- Raina, S.K., Iyer, R.D. 1973. Differentiation of diploid plants from pollen callus in anther cultures of *Solanum melongena* L. *Z Pflanzenzucht* 70:275-280.
- Raina, S.K., Iyer, R.D., 1982. Honey-induced pollen embryogenesis in anther cultures of *Datura metel*. *Experientia*, 38(3):358-359.
- Rizza, F., Mennella, G., Collonnier, C., Shiachakr, D., Kashyap, V., Rajam, M.V., Prestera, M., Rotino, G.L., 2002. Androgenic dihaploids from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group Gilo as a source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*. *Plant Cell Rep* 20:1022-1032.
- Rotino, G.L., 1996. Haploidy in eggplant. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro haploid production in higher plants*. Kluwer, Dordrecht, 115-141.

- Rotino, G.L., 2016. Anther Culture in Eggplant (*Solanum melongena* L.). In *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, 453-466.
- Rotino, G.L., Sihachakr, D., Rizza, F., Vale, G., Tacconi, M.G., Alberti, P., Mennella, G., Sabatini, E., Toppino, L., D'Alessandro, A., 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* 27:723-733.
- Salas, P., Prohens, J., Seguí-Simarro, J.M., 2011. Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species. *Euphytica*, 182(2): 261-274.
- Sanguineti, M.C., Tuberosa, R., Conti, S., 1990. Field evaluation of androgenetic lines of eggplant. *Acta Hort* 280:177-182.
- Singleton, V. L., Rossi, J. L., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 16:144-158.
- Tipirdamaz, R., Ellialtıoglu, S., 1998. The effects of cold treatments and activated charcoal on ABA contents of anthers and in vitro androgenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). In 1st Balkan Botanical Congress, Thessaloniki (Greece), 19-22 Sep 1997. Kluwer Academic Publishers.
- Yadollahi, A., Abdollahi, M.R., Moieni, A., Danaee, M., 2011. Effects of carbon source, polyethylene glycol and abscisic acid on secondary embryo induction and maturation in rapeseed (*Brassica napus* L.) microspore-derived embryos. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5):1905-1912.
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., Hafiz, I.A., 2013. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular biology reports*, 40(4):2837-2849.
- Zhiming, D.L., 1991. In vitro anther culture and haploid breeding of *Solanum melongena*. *Biotechnology*, 5, 007.
- Zhongheng, Z.H.Z., 2002. An analytic study of the sucrose concentrations, the exogenous hormones and the low temperature pretreatment influencing the initiation of cell division in wheat pollen culture. *Natural Science Journal of Harbin Normal University*, 3, 021.