MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hibiscus syriacus L. (AĞAÇ HATMİ)' DE ANTER GELİŞİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

BAHAR DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Filiz VARDAR

İSTANBUL, 2022

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hibiscus syriacus L. (AĞAÇ HATMİ)' DE ANTER GELİŞİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

BAHAR DOĞAN

520119005

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Filiz VARDAR

İSTANBUL, 2022

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden geleni sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Filiz VARDAR' a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardımlarını eksik etmeyen, beni motive etmekten hiç sıkılmayan değerli lisans arkadaşlarım Fatmanur POYRAZ ve Hasan Can KÜÇÜKALİ' ye teşekkür ederim.

Neşesi ile öğrencilik hayatıma renk katan değerli hocam, arkadaşım Dr. Burak TOMAK' a teşekkür ederim.

Tüm yaşantım boyunca verdiğim kararlarda maddi ve manevi olarak beni hep destekleyen annem Lale DOĞAN ve babam Soner DOĞAN' a, varlıklarıyla beni güçlendiren sevgili kız kardeşlerim Pınar DOĞAN ve Ruhsar DOĞAN' a sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz, 2022 **Bahar DOĞAN**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i

İÇİNDEKİLER ii

ÖZET iv

ABSTRACT v

SEMBOLLER vi

KISALTMALAR vii

ŞEKİL LİSTESİ viii

TABLO LİSTESİ ix

1. GİRİŞ **1**

1.1. Malvaceae (Ebegümecigiller) familyası hakkında genel bilgiler 1

1.2. *Hibiscus* cinsi hakkında genel bilgiler 2

1.3. *Hibiscus syriacus* L. (ağaç hatmi)'nin özellikleri ve yapılan çalışmalar 3

1.4. Anter Gelişimi ve Anter Çeper Tabakaları 5

1.5. Programlı Hücre Ölümü 7

2. MATERYAL VE YÖNTEM **10**

2.1. Bitki Materyali 10

2.1.1. Bitki Materyalinin Toplanması ve Fiksasyonu 10

2.2. Araştırma Yöntemleri 11

2.2.1. Parafine Gömme ve Kesit alma 11

2.2.2. Hematoksilen ile Boyama 12

2.2.3. Coomassie parlak mavisi 12

2.2.4. Periyodik Asit-Schiff Reaktifi 13

2.2.4. Sudan siyahı B 14

2.2.5. DAPI 14

2.2.6. *Hibiscus syriacus* L. Polenine Ait Morfolojik Özelliklerin İncelenmesi 15

3. BULGULAR VE TARTIŞMA **16**

3.1. Morfolojik Bulgular 16

3.2. Anter Çeper Tabakalarının Gelişimi 16

3.3. Anter Çeper Tabakalarındaki Programlı Hücre Ölümü.....23

3.4. *H. syriacus* Polenine Ait Morfolojik Özellikler 25

4. SONUÇLAR.....27

KAYNAKLAR 28

ÖZGEÇMİŞ 37

ÖZET

Hibiscus syriacus L. (AĞAÇ HATMİ)'DE ANTER GELİŞİMİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Bitkilerde polen gelişiminin sağlıklı ilerlemesinde anter çeper tabakalarının düzenli gelişimi önemli bir role sahiptir. Bu katmanlardan en dışta bulunan epidermis anter gelişimi sırasında iç dokuyu koruyucu görev üstlenirken altına konumlanan ve boyuna uzamalar gösteren endotesyum tabakasının hücreleri polenler anteri terk edeceği zaman maksimum gelişme göster. Bir veya iki sıralı geçici hücrelerden meydana gelen ara tabakanın altında bulunan tapetum hücrelerinin ise polen verimi ile yakından ilişkisi bilinmektedir. Mikrosporların beslenmesi, ekzin çeper oluşumu, mikrosporların tetrattan salınması, polen tanesinin pistil stigmasında tanınmasının sağlanması gibi süreçlerde önemli rolü olan tapetumun gelişim aşamalarında programlı hücre ölümüne uğradığını gösteren sitolojik çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızın amaçlarından biri, *Hibiscus syriacus* L.'nin anter gelişiminin ve sitokimyasal içeriğinin incelenerek Malvaceae familyasının embriyolojik bulgularına katkı sağlamaktır. Anter gelişiminin farklı aşamalarındaki çeper tabakalarının sitokimyasal yöntemlerle analiz edilmesi amacıyla *H. syriacus*'a ait çiçek tomurcukları farklı gelişim evrelerine göre ayrılarak fikse edilip parafine gömülmüş, sonrasında ışık mikroskobisi için Hematoksilen, Coomassie parlak mavisi, Periyodik asit-Schiff ve Sudan siyahı B boyaları ile boyanmıştır. Bunun yanında anter çeper tabakalarında gerçekleşen programlı hücre ölümünün karakterizasyonu DAPI boyaması ile karakterize edilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre anter çeper tabakalarına ait hücrelerde genç mikrospor safhasında başlayan ve ileri mikrospor safhasında şiddetlenerek devam eden nukleus bozukluklarına bağlı hücre ölümleri gözlenmiştir. Olgun mikrospor safhasında ise tapetum ve ara tabakanın tamamen köreldiği belirlenmiştir. Ayrıca *H. syriacus*'a ait mikrosporların morfolojik ve sitokimyasal incelemelerine de çalışmamızda yer verilmiştir.

Anahtar sözcükler: anter, *Hibiscus syriacus*, Malvaceae, mikrospor, tapetum.

Temmuz, 2022 **Bahar DOĞAN**

ABSTRACT

STUDIES OF ANTHER DEVELOPMENT ON *Hibiscus syriacus* L. (ROSE OF SHARON)

The regular development of anther wall layers plays a key role in the healthy progression of pollen development in plants. While the epidermis anther, which is the outermost layer of these layers, takes on the role of protecting the inner tissue during its development, the cells of the endothecium layer, which are positioned below and show longitudinal elongation, show maximum development when the pollen leaves the anther. It is also known that tapetum cells under the intermediate layer consisting of one or two rows of temporary cells are closely related to pollen yield. There are cytological studies showing that the tapetum, which has an important role in processes such as feeding of microspores, formation of the exine wall, release of microspores from the tetrad, and recognition of the pollen grain in the pistil stigma, undergoes programmed cell death during the developmental stages of the tapetum. One of the aims of our study is to examine the anther cytochemistry and development of *Hibiscus syriacus* L. and to contribute to the embryological findings of the Malvaceae family. In our study, which was carried out by analyzing the wall layers at different stages of anther development by cytochemical methods, the flower buds of *H. syriacus* were separated according to different developmental stages, fixed and embedded in paraffin, then were painted with Hematoxylin, Coomassie bright blue, Periodic acid-Schiff and Sudan black B dyes for light microscopy. In addition, the characterization of apoptosis in the anther wall layers was characterized by DAPI staining. According to the data obtained, cell death due to nuclear disorders, which started in the young pollen stage and continued in the pollen stage with vacuoles, was observed in the cells of the anther wall layers. In the mature pollen stage, it was determined that the tapetum and intermediate layer were completely atrophied. What is more, morphological and cytochemical analyzes of pollen grains of *Hibiscus syriacus* L. were also included in our study.

Key words: anther, *Hibiscus syriacus*, Malvaceae, pollen, tapetum.

July, 2022 **Bahar DOĞAN**

SEMBOLLER

µl : Mikrolitre

ml : Mililitre

nM : Nanomolar

gr : Gram

µm : Mikrometre

M : Molar

nm **:** Nanometre

pH : Power of Hydrogen

R : Çap

E : Ekvator eksen

P : Polar eksen

KISALTMALAR

CBB : Coomessie Brilliant Blue

DAPI : 4′,6-diamidino-2-phenylindole

DK : Dakika

DNA : Deoksiribonükleik asit

NM : Nanometre

PAS : Periyodik Asit-Shiff reaktifi

PHÖ : Programlı hücre ölümü

SBB : Sudan Black B

SS : Standart Sapma

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. *Hibiscus syriacus* L. ve sistematiği..... 10

Şekil 3. 1. Farklı gelişim evrelerinde toplanan *H. syriacus* L. bitkisinin çiçek tomurcuklarına ve kısımlarına ait görüntüler (3.1.j için kaynak: 15 Mayıs 2022, https://freehighschoolscience.wordpress.com/2019/02/25/hibiscus-flower/.) 16

Şekil 3. 2. *H. syriacus* anterlerinin Hematoksilen ile boyandıktan sonraki genel yapısı **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun polen evresi **f.** Olgun polen 18

Şekil 3. 3. *H. syriacus* anterlerinin Coomassie parlak mavisi ile boyandıktan sonraki genel yapısı **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun polen evresi **f.** Olgun polen..... 19

Şekil 3. 4. *H. syriacus* anterlerinin Periyodik Asit-Schiff reaktifi ile boyandıktan sonraki genel yapısı **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun polen evresi **f.** Olgun polen..... 20

Şekil 3. 5. *H. syriacus* anterlerinin Sudan siyahı B ile boyandıktan sonraki genel yapısı **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun polen evresi **f.** Olgun polen 21

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 1. Hibiscus türlerine ait bitki bölümlerinin ve biyoaktif bileşenlerinin aktiviteleri ve incelendikleri çalışmalar (Salem ve ark., 2014). 3
Tablo 2. 1. Parafine gömme işlemi. 11
Tablo 2. 2. Deparafinizasyon işlemi. 12
Tablo 2. 3. Hematoksilen yöntemi (Gill ve ark., 1974). 12
Tablo 2. 4. Coomassie Parlak Mavisi (Heslop-Harrison ve ark., 1973). 13
Tablo 2. 5. PAS yöntemi (Feder ve O'Brien, 1968). 13
Tablo 2. 6. Sudan siyahı B yöntemi (Pearse, 1961). 14
Tablo 2. 7. DAPI boyaması (Schweizer, 1976). 14
Tablo 3. 1. *H. syriacus* polenlerine ait polenlerin ölçüm değerleri. 26

1. GİRİŞ

1.1. Malvaceae (Ebegümecigiller) familyası hakkında genel bilgiler

Malvaceae (Ebegümecigiller), 4225'ten fazla tür ve 243 cins içerdiği tahmin edilen çiçekli bir bitki ailesidir. Bu bitki ailesi otsu, çalılardan ağaçlara kadar çeşitli yaşam formları olan kozmopolit bir ailedir. Malvaceae ailesinin *Sida, Abutilon, Urena, Pavonia, Kydia, Decaschistia, Hibiscus, Bombax, Eriodendron, Thespesia* ve *Cullenia* cinslerine ait bitkiler, tropikal ülkelerde yaygın olarak bulunmaktadırlar. Malvaceae familyasına ait bitkilerin genel özellikleri arasında genellikle yapraklarının alternat, sıklıkla loblu palmat, bileşik palmat ve damarlı palmat olması vardır. Kenarlar düz olabilmekle beraber dişli olduğunda her dişin ucu bir damar ile bitmektedir. Stipüller mevcuttur. Saplar mukus kanalları ve çoğunlukla mukus boşlukları içermektedir. Tüyler yaygın olarak bulunmaktadır ve en tipik şekli yıldızsıdır. Çiçekler genellikle belirli ve belirsiz aksiller salkımlarda bulunmaktadırlar. Çiçekler genellikle tek bir çiçeğe indirgenmekle beraber aynı zamanda gövdeden çiçekli, zıt veya terminal olabilmektedir. Tek eşeyli veya hermafrodit olabilmekle beraber genellikle aktinomorfiktirler. Sıklıkla brakteler ile birleşmekte ve bir epikaliks oluşturmaktadırlar. Çoğunlukla bazal olarak bağlantılı olan beş velvet sepalleri ve beş imbrikat taç yaprağı vardır. Organlar çoğu zaman pistillerin etrafında bir tüp şeklindedir. Pistiller, ikili veya birçok bağlantılı karpellerden oluşmaktadır. Ovaryum, aksiyel yerleşimli, kapitat veya loblu stigma ile bulunmaktadır. Genellikle çanak yaprakların üzerinde konumlanmış, sıkıca paketlenmiş halde salgı tüylerinden yapılmış çiçek nektarları bulunmaktadır. Stamenler stilus çevresinde bir sütun oluşturacak şekilde birleşmiş, sütun tepede filamentlere bölünmüş, her filament tek hücreli anter taşır. Polenleri dikensi çıkıntılara sahiptir. Meyveler çoğunlukla lokülisidal kapsül, şizokarp veya fındıksı şekildedir. Malvaceae'nin üreme ve polen dağılma mekanizmaları oldukça çeşitlidir. Birçok tür böcekleri ve sinek kuşlarını tozlaşma amacıyla çekimlemek için nektar üretir (Vasudeva ve Sharma, 2008).

Hem tıbbi hem de ekonomik açıdan değerli üyeleri içeren bu familyada *Abutilon theophrasti* ve *Modiola caroliniana* türleri Malvaceae familyasına ait yabani otlardandır. Pamuk (dört *Gossypium* türü), kenaf (*Hibiscus cannabinus*), kakao (*Theobroma cacao*), kola cevizi (*Cola* sp.) ve bamya (*Abelmoschus esculentus*) familyaya ait önemli tarım ürünleridir. *Hibiscus syriacus*, *Hibiscus rosa-sinensis* ve *Alcea rosea* familyaya ait bazı bahçe bitkileridir (Vasudeva ve Sharma, 2008).

1.2. *Hibiscus* cinsi hakkında genel bilgiler

Hibiscus cinsine ait dünyanın tropikal ve subtropikal bölgesinde 300'den fazla türü bulunmaktadır. Bu türler genellikle küçük ağaçlar, otsu veya tırmanıcı yapıdadırlar. Sayısız, serbest, parçalanmamış, hemen hemen doğrusal parçalardan oluşan epikaliks mevcuttur. 5 bölümden oluşmuş stilus ve 5 adet boşluktan oluşmuş kapsül meyveden oluşur (Davis, 1967). Ovaryumun her bir hücresi içinde birden fazla tohum taslağı kapsülde genellikle her bir hücrede birden fazla tohum bulunur. Çiçek açarken, kaliks tek bir yöne bölünmez ya da çok nadiren bölünür, 5 lopludan 5 parçalıya, korollaya yapışık değildir, çiçeklenmeden sonra kalıcıdır (Akpan, 2005; Özdoğan ve ark., 2011).

Hibiscus türüne ait birçok bitki süs bitkisi olarak bahçelerde yetiştirilmektedir. Süs bitkisinde haricinde *H. cannabinus* ve *H. sabdariffa* gibi türler ticari olarak kullanılan lif kaynakları olmakla beraber bazı türler gıda ürünü veya tıbbi olarak kullanılmaktadır.

Cinse ait birçok tür eski çağlardan beri çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Alternatif tıpta *H. esculentus* meyveleri tonik, kanama durdurucu, afrodizyak, nemlendirici ve idrar bozukluklarını tedavi edici etkisi dolayısıyla kullanılmaktadır (Parrotta ve ark., 2001). *H. manihot* yaprak ve köklerinin yara ve burkulmalar için lapa olarak; çiçeklerinin kronik bronşit ve diş ağrısının tedavisinde; kabuğun lapa halinin adet söktürücü olarak kabul edildiği bilinmektedir (Riaz ve ark., 2018).

Literatürde yapılan birçok çalışmada *Hibiscus* türleri araştırılmış; flavonoidler, antosiyaninler, terpenoidler, steroidler, polisakaritler, alkaloidler, amino asitler, lipidler, seskiterpen, kinonlar ve naftalin grupları dahil olmak üzere birçok ikincil metabolit sınıfını içerdiği bulunmuştur. Bu bileşiklerin antibakteriyel, antiinflamatuvar, antihipertansif, antifertilite, hipoglisemik, antifungal ve antioksidatif aktiviteye sahip olduğu çalışmalar sonucunda görülmüştür (Kholkute ve ark., 1977; Parmar ve Ghosh, 1978; Gangrade ve ark., 1979; Jain ve ark., 1997; Faraji ve Tarkhani, 1999; Lin ve ark., 2003; Sachdewa ve Khemani, 2003). *Hibiscus* türlerine ait bitki bölümlerinin ve biyoaktif bileşenlerinin aktiviteleri ve incelendikleri çalışmalar Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1. 1.*Hibiscus* türlerine ait bitki bölümlerinin ve biyoaktif bileşenlerinin aktiviteleri ve incelendikleri çalışmalar (Salem ve ark., 2014).

Bitki Kaynağı	Biyoaktif bileşikler, bitkiye ait bölümler, fraksiyonları	Aktiviteleri	Kaynak
H. ablemoschus	Kökün sıvı özütü	Larvasit	Dua et al., 2006
H. cannabinus	Yapraklarında bulunan uçucu yağ	Antifungal	Kobaisy et al., 2001
H. elatus	Flavonoid	Antioksidan	Perez-Trueba et al., 2003
H. macaranthus	Etanol ile ekstrakte edilen kök	Antifungal ve antimikrobiyal	Jain et al., 1997
	Yaprakların sıvı özütü	Dişi antifertilitesi	Telefo et al., 1998
	Yaprakların sıvı özütü	Anabolize edici etki	Moundipa et al., 1999
H. rosa-sinensis	Çiçeklerin benzen ve alkol ile ekstraksiyonu	Antifertilite	Murthy et al., 1997; Kholkute et al., 1976, 1977; Kholkute & Udupa, 1976a, b
	Yaprakların sıvı özütü	Antifertilite	Nivsarkar et al., 2005
	Çiçeklerin benzen, kloroform ve etanol ile ekstraksiyonu	Antispermatojenik	Reddy et al., 1997
	Yapraklarında bulunan gilikozit	Antispazmodik	Agarwal & Shinde, 1967
	Çiçeklerinin etanol ile ekstraksiyonu	Antikonvülzan	Kasture et al., 2000
H. sabdariffa	Yağ ve sabunlaşmayan maddeler	Antifungal ve antibakteriyel	Gangrade et al., 1979
	Çiçeklerin su ile ekstraksiyonu ve protokateşik asit	Antibakteriyel	Liu et al., 2005
	Çiçek tomurcuklarından elde edilen polisakkaritler	Antitümör	Miiller et al., 1992
	Çiçeklerden elde edilen fenolik bileşenler	Antitümör	Tseng et al., 2000
	Antosiyonin	Antitümör	Hou et al., 2005
	Yaprakların sıvı özütü	Antihipertensiv	Obiefuna et al., 1994; Owolabi et al., 1995; Adegunloye et al., 1996
	Çiçeklerden elde edilen fenolik asit	Antioksidan	Tseng et al., 1996
	Çiçeklerin sıvı özütü	Antioksidan	Ali et al., 2003
	Çiçeklerde bulunan antosiyanin	Antioksidan	Wang et al., 2000; Chang et al., 2006
	Metanol ekstraksiyonu	Kas gevşetici	Salah et al., 2002
	Yaprakların sıvı özütü	Antispazmodik	Ali et al., 1991
H. syriacus	Tohum yağı	Antimikrobiyal ve antifungal	Shah et al., 1988
	Kabuktaki yağ asitleri	Antifungal	Masami et al., 1978
	Kök kabuğundan elde edilen naftalinler	Antitümör, antioksidan	Yoo et al., 1998
	Pentasiklik triterpen esterler	Antioksidan	Yun et al., 1999
	Kök kabuğundan elde edilen liganlar	Antioksidan	Lee et al., 1999
H. vitifolius	Çiçeklerden elde edilen flavanoidler	Antiinflamatuvar	Parmar ve Ghosh, 1978
	Flavonol	Hipoglisemik	Raghunathan ve Sulochana, 1994

1.3. *Hibiscus syriacus* L. (ağaç hatmi)'nin özellikleri ve yapılan çalışmalar

Hibiscus syriacus, yaygın olarak bulunan ve Kuzey Amerika'da Sharon gülü olarak anılan bir türdür. Ayrıca Asya Bölgesi'nin doğal çalısıdır (Maganha ve ark., 2010; Özdoğan

ve ark., 2011). Kışın yapraklarını döken, 3-5 metreye kadar boylanabilen, sık ve dik dallı, taze sürgünleri tüylü, sonra tüysüz, kabuğu kahverengi-gri, yuvarlak tepeli bir çalıdır. Yapraklar almaşık dizilişli, yumurtamsı, kenarı çok kaba dişli, düzensiz üç loblu, mat yeşil renklidir. Çiçekler yaprak koltuğundan tek tek çıkar, tek parlak, eflatun-pembe renklidir. Erkek ve dişi organların boyu taç yaprakları geçmez. Yaz sonuna doğru sonbahar aylarında çiçek açar. Meyve şizokarptır. Çiçek rengi kırmızı, beyaz, mavi olan, tek veya katmerlidir. Park ve bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilen çok sayıda kültür formu vardır. Bol güneşli yerlerde ve ılıman iklimlerde yetişir. Drenajı iyi, verimli, kumlu toprakları tercih eder. Kışa ve kuraklığa karşı dayanıklıdır. Bahçelerde, kap içinde balkon ve teraslarda, bazen çit bitkisi gibi (iç mekanlarda) yetiştirilebilir (Özdoğan ve ark., 2011).

H. syriacus antikanser, antioksidan, antiproliferatif, antimikrobiyal, antiviral, antiinflamatuar, yaşlanmayı geciktirici, nöroprotektif aktivite gibi özellikleri ile geleneksel tıpta sıklıkla kullanılan *Hibiscus* türlerinden biridir (Hsu ve ark., 2015; Yun ve ark., 2001; Yang ve ark., 2019; Kim ve ark., 2018; Maganha ve ark., 2010). *H. syriacus*'a ait kök kabuğu lignan, kumarin, hidroksihibiskon A, nonanoik asit ve fenolik asit gibi aktif bileşenleri dolayısıyla sıklıkla çalışmalarda kullanılmaktadır (Hanny ve ark., 1972).

Hibiscus türleri ile yapılan biyoaktif bileşenler ve aktiviteleri çalışmaları yanında taksonlar arasındaki sistematik ayrımların netleştirilebilmesi için birçok morfolojik analizlerin yapıldığı çalışmalar da mevcuttur (Salamah, 2021; Saifudin ve Salamah; 2019). Bunların yanında doku kültürü çalışmaları (Sie ve ark., 2010; Ibrahim ve ark., 2014), dişi ve erkek üreme hücreleri ile embryo-endosperma ve meyve gelişimi ile ilgili çalışmalarda yapılmıştır (Sanyal, 1958; Ashley, 1975; Annahwi ve ark., 2017; Tapec ve ark., 2021). Ayrıca *Hibiscus* türlerinde çiçek gelişimi sırasında hormonal değişim (Trivellini ve ark., 2011) ve transkiptomik analizler de gerçekleştirilmiştir (Trivellini ve ark., 2016). *H. syriacus*'da olduğu gibi diğer *Hibiscus* türlerinde de erkek üreme organı olan anterlerin gelişimi, anter çeper tabakalarının sitokikimyası ve hücre ölümü ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Her ne kadar literatür araştırmalarında *H. syriacus* mikrosporlarının gelişimi, morfolojisi ve dikensi çıkıntılarının gelişimi ile ilgili çalışmalar varsa da olgun polen tanelerinin sitokimyasi ile ilgili veri bulunmamaktadır (Takahashi ve Kouchi, 1988; Shaheen ve ark., 2009). **Bu tez çalışmamızın amacı;** *Hibiscus syriacus*'un anter çeper tabakalarının ve mikrosporlarının gelişimini, sitokimyasal içeriğini ve hücre ölümünün gerçekleştiği ve ilerlediği evreleri belirlemektir.

1.4. Anter Gelişimi ve Anter Çeper Tabakaları

Angiospermlerin birçoğunda olgun anter çeperleri dıştan içeri doğru epidermis, endotesyum, 1-2 sıralı ara tabaka ve tapetum tabakasından oluşmaktadır. En dıştaki tabaka olan epidermise ait hücreler, çoğunlukla tek sıralı yassı hücrelerden oluşmuştur. Epidermis hücreleri anter gelişimi esnasında içteki dokuların genişlemesine uyum sağlayabilmek amacıyla çepere dik bölünmeler geçirmektedir. Epidermis, anteri tamamen sararak içteki dokuları koruyucu görev yapmaktadır. Anterlerin dış yüzeyinde bu tabakadan gelişen trikomlar ve stomalar bulunabilmektedir (Ünal ve Çetinbaş-Genç, 2021).

Epidermisin altında bulunan ve anter çeperinin parçalanmasını sağlayan endotesyum tabakasının hücreleri boyuna uzama göstermektedir. Endotesyum hücrelerinde iç teğetsel çeperden başlayıp üst çeperde sona eren fibrilli kalınlaşmalar gözlemlenmektedir. Bu sırada dış teğetsel çeper ince kalmakla beraber kalınlaşma görülen bölgeler yüksek oranda selüloz ve az miktarda lignin içermektedir. Anterlerde iki mikrosporangiyumun (polen kesesinin) birleştiği stomium isimli yerde endotesyum hücrelerinin çeperlerinde at nalı şeklinde kalınlaşmalar bulunmaz. Bu tabakadaki kalınlaşma farklılıkları anterlerin stomium noktalarından açılmasını ve polenlerin dışarı atılmasını sağlamaktadır. Bu olayın gerçekleşmesinde öncelikle olgun polen aşamasında olgunlaşmış endotesyum hücrelerinin daha içteki dokular ile iletişimi kesilir. Daha sonra terleme yoluyla su kaybeden hücrelerin hacimleri küçülür ve epidermise komşu dış çeperler içe doğru çöker ve anter yüzeyindeki gerilme ile anterin en ince yeri olan stomium bölgelerinden parçalanması gerçekleşir. Böylece anter açılarak olgun polenler dışarı atılmaktadır (Ünal ve Çetinbaş-Genç, 2021).

Endotesyum ile tapetum arasında bulunan genellikle geçici olan ara tabaka hücreleri yassı şekildedirler. Çoğu bitki türünde ara tabaka hücreleri nişasta ve diğer yedek besin maddeleri açısından oldukça zengindir. Bu besin maddeleri polenlerin gelişimi sırasında harcanmaktadır (Ünal ve Çetinbaş-Genç, 2021).

Anter çeperinin en iç tabakası olan tapetum ise mikrospor gelişiminde oldukça önemlidir. Bu tabaka maksimum gelişimine mikrosporogenizin tetrat evresinde ulaşmaktadır. Sporogen dokuyu sarması ve bütün besin maddelerinin bu tabakadan geçmesi fizyolojik olarak da önemini göstermektedir. Tipik olarak yoğun sitoplazmalı, büyük nukleuslu ve tek sıralı hücrelerden oluşmaktadır. Tapetum tabakası; polenlerin beslenmesinde, polenlerin mikrospor tetratından salınmasını sağlayan kallaz enzimini salgılamada, ekzin çeper için gerekli olan sporopolleninin oluşmasında, polenkit ve triphin gibi kompleks lipit ve özel proteinleri salgılayarak polenlerin stigmada tanınmasını sağlamada görev almaktadır (Kim ve ark., 2006; Ünal ve Çetinbaş-Genç, 2021).

Anter çeper tabakası tarafından çevrilmiş olan diploid mikrospor ana hücrelerinin mayoz bölünme ile oluşan mikrospor tetratından dağılan haploit mikrosporlar polen taneleri olarak da tanımlanırlar. Mikrosporlar erkek gametleri taşıyan erkek gametofitlerdir. Bir mikrospor haploit bir bitkiyi oluşturmak için yeterli tüm genetik bilgiyi taşımaktadır. Angiospermlerde mikrosporun fenotipi genetik olarak belirlenir ve mikrospor tetratındaki konumu, çimlenme porlarının sayısı-şekli ve yerleşimi gibi etkenler olgun polen şeklini almasında rol oynarlar (Ünal ve Çetinbaş-Genç, 2021).

Polenler generatif ve vejetatif adlı iki hücreden oluşmaktadırlar. Generatif hücre polen veya polen tüpü içinde mitoz bölünme ile 2 sperm hücresi meydana getirmekten sorumludur. Vejetatif hücre ise polen tüpünü oluşturmaktadır. Olgun bir polen tanesi rüzgâr, su, böcek gibi çeşitli etkenler ile dişi organının stigmasına ulaşarak polen tüpünü oluşturur ve stilüs içinden geçerek tohum taslağına ulaşmaktadır. Mikropil açıklığından içeri giren spermlerden biri yumurtayı dölleyerek zigotu, diğeri ise sekonder nukleusu dölleyerek endospermayı oluşturur. Bu olay çifte döllenme olarak adlandırılmaktadır (Ünal ve Çetinbaş-Genç, 2021).

Polenin dış çeperine ekzin ve iç çeperine de intin denmektedir. Polenin ekzin çeperi polen ve anter çeper tabakalarından tapetum tarafından birlikte sentezlenmektedir. İntin çeper ise yalnızca polen tarafından sentezlenmektedir (Aytuğ, 1967). Olgun polen şekillerinin belirlenmesinde ekvator ekseni (E) ile kutup ekseninin (P) oranlanması etkili olmaktadır. Polenlerde iki çeşit apertür (açıklık) vardır. Por şeklinde apertür içerenlere porat, yarık şeklinde apertür içerenlere kolpat, her ikisini de içeren polenlere ise kolporat polen denmektedir (Erdtman, 1952; Faegri ve Iversen, 1989).

Birçok bitkide polen oluşumu, tapetumun normal işleyişi ve dejenerasyon zamanlamasını içermekle beraber anter fertilitesi için gerekli olan kalsiyum ve karbonhidratların tapetum tarafından sağlanmasını kapsamaktadır (Falasca ve ark., 2013). Tapetum tabakasındaki anormalliklerin mikrosporda karbonhidratların düzensiz dağılımına ve infertiliteye yol açtığı bilinmektedir (Shi ve ark., 2010). Mepham ve Lane (1969) yaptıkları çalışmada angiosperm tapetumunda kontrollü dejenerasyon örnekleri olduğunu teyit ederken, tapetumun dejenerasyondan hemen öncesine kadar yüksek derecede bir organizasyon sürdürdüğünü ve bu durumun programlı hücre ölümü olduğu bildirmiştir. *Lathyrus undulatus* anterlerinin gelişimi sırasında anteri oluşturan somatik hücre sıralarından olan tapetum hücrelerinde genç polen tanelerinin oluştuğu evrede programlı hücre ölümünün başladığı, polende vakuollerin oluştuğu evrede şiddetlenerek ilerlediği ve olgunlaşmış polen evresinde tapetumların

tamamen yok olduğu belirlenmiştir (Vardar ve Ünal, 2012). Araştırıcılar tapetum hücreleri yanında ara tabaka hücrelerinin ve konnektif doku hücrelerinin de programlı hücre ölümüne uğradığını ortaya koymuşlardır.

1.5. Programlı Hücre Ölümü

Programlı hücre ölümü terimi, ilk kez Lockshin ve Williams tarafından 1964 yılında kullanılmıştır (Vardar ve Ünal, 2012). Programlı hücre ölümü (PHÖ), gereksiz veya işlevlerini yitirmiş hücrelerin seçici olarak ortadan kaldırılmasına yol açan genetik olarak kontrol edilen fizyolojik bir hücre ölümü olayıdır (Ellis ve ark., 1991; Pennell ve Lamb. 1997). Gelişmekte olan sistemlerde PHÖ, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasına benzer aktif ve kontrollü bir süreçtir (Sanders ve Wride. 1995). Bu olay prokaryotların ve ökaryotların normal gelişimleri sırasında veya çevresel strese maruz kaldıklarında gerçekleşen ve spesifik genler ve enzimler tarafından kontrol edilen fizyolojik bir süreçtir. Hücre ölümleri tüm canlılar düşünüldüğünde nekroz, apoptoz ve otofaji olmak üzere üç temel grup altında incelenmektedir.

Apoptoz, hücrenin büyümesini ve bölünmesini durdurmak yerine sitoplazmik içeriğinin hücre dışına sızmadan, hücrenin kontrollü ölümüyle sonuçlanmasıdır. Apoptoz süreci çok hücreli organizmalarda yüksek oranda korunmakta ve genetik olarak kontrol edilmektedir (Lockshin ve Zakeri, 2004). Apoptozun başlaması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein proteazın aktivasyonuna bağlıdır. Hücre hasarı tespit edildiğinde, başlatıcı kaspazlar aktif olmayan prokaspazlardan aktive edilir ve efektör kaspazlarını aktive eder. Efektör kaspazlarının aktivasyonu, endonükleazların aktivasyonundan DNA fragmantasyonu, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin yok edilmesi, proteinlerin çapraz bağlanması, fagositik hücreler için ligandların ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile sonuçlanan bir olaylar dizisi başlatmaktadır (Martinvalet ve ark., 2005; Poon ve ark., 2014).

Otofaji, otofagozom isimli organelleri veya sitoplazmik içeriği kapsayan çift veya çoklu zarlı veziküller ile tanımlanan katabolik bir organizasyondur. Otofagozomlar, lizozomlar veya vakuoller ile kaynaşarak hücrenin önce bir kısmını daha sonra tamamını sindirmesine sebep olmaktadır. Bu tip planlı hücre ölümünde apoptotik kaspaz aktivitesi görülmez ancak otofaji ile ilgili genler tarafından kontrol edilmektedir. Otofajiden farklı olarak apoptozda en önemli hedef nukleus ve DNA'dır (Yanık ve ark., 2018).

Nekroz, diğer planlı hücre ölümlerine göre çok daha ani gelişen farklı özelliklere sahiptir. Tipik olarak nekrozda; hücrenin hacmi artmakta, hücreye ait enerji kaynakları azalmakta, hücre zarı ve organellerinde ani bozulmalar meydana gelmekte ve ileriki süreçte hücrenin bütünlüğü bozulmakta ve bulunduğu dokuda inflamasyona sebep olarak parçalanma

görülmektedir. Apoptoz ve otofajiden farkı nekrozun sebep olduğu parçalanmada hücrenin içeriği tamamen sindirilemez ve dokunun diğer hücrelerinde inflamasyona sebep olan hücresel artıklar kalmaktadır (Yanık ve ark., 2018).

Bitkilerde görülen hücre ölümünü başlatan ve devam ettiren moleküler sinyal yolağı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. PHÖ esnasında gözlemlenen nukleusa ait değişiklikleri, kromatin materyalinin yoğunlaşması, DNA'nın fragmente olması, protoplastta görülen plamoliz, sitoiskelette meydana gelen değişiklikler ve kaspaz benzeri enzimatik aktiviteler bitkilerde meydana gelmekle beraber bitkilerdeki PHÖ'de apoptotik süreç görülmemektedir. Bitkilerde görülen PHÖ vakuoler ve nekrotik hücre ölümü olarak 2 grupta incelenmektedir (Yanik ve ark., 2018).

Vakuoler hücre ölümü hayvanlarda görülen otofajik hücre ölümü ile ortak özelliklere sahip olmakla beraber bu hücre ölümünde vakuoller büyük öneme sahiptir. Bitki hücrelerinde çeşitli maddelerin biriktiği depo vokuolü ve hidrolitik enzimler içeren litik vakuol olmak üzere iki tip vakuol bulunmaktadır. Litik vakuollerin hacminin artmasıyla tonoplast parçalanmakta ve hidrolitik enzimler sitoplazmaya dağılarak hücre ölümü gerçekleşmektedir. Tonoplast parçalanmadan önce kromatinde yoğunlaşma ve DNA fragmentasyonu gözlenirken, mitokondri ve plastidler gibi henüz bozulmamış sitoplazmik organeller hücredeki aktivitesine devam etmektedirler. Nekrotik hücre ölümünde ise hücre ve organelleri deplazmolize uğrar, hücre zarında parçalanma meydana gelir ve mitokondri işlevi gerçekleştiremediğinden dolayı hücre solunumu gerçekleşememektedir. Bu durum hücredeki reaktif oksijen türlerinin (ROT) artmasına ve ATP üretiminin azalmasına sabep olmaktadır. Vakuol ilişkili hücresel ölümü bitkinin büyüme sürecinde veya olumsuz koşullarda gerçekleşen bir süreçken, nekroz benzeri hücre ölümü ise bitkilerde ani ve yoğun stres koşullarında gerçekleşen bir ölümdür (Yanık ve ark., 2018).

Bitkilerde vakuoler hücre ölümü doku ve organların gelişim ve olgunlaşma süreçlerinde gözlemlenmektedir. Bu sürecin zamanından önce veya sonra gerçekleşmesi ya da hiç gerçekleşmemesi doku ve organlarda yapı ve fonksiyon bozukluğuna sebep olmaktadır (Yanık ve ark., 2018).

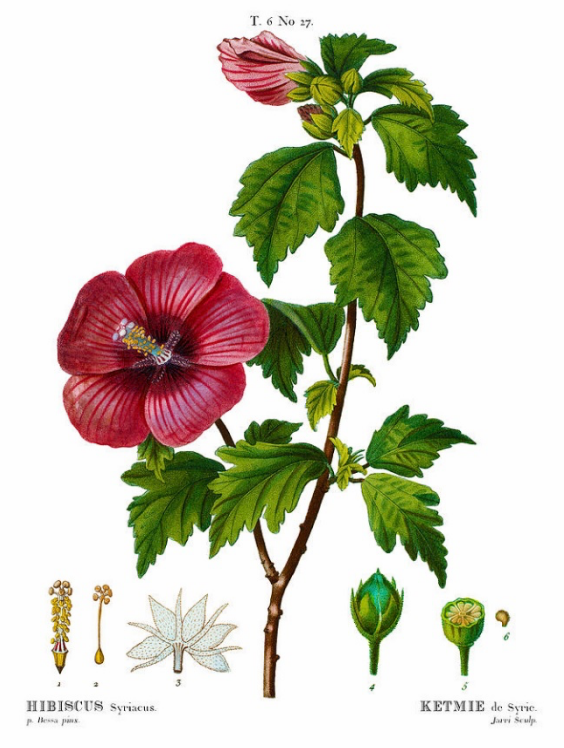
Stamen ve pistil gelişimi sırasında görülen PHÖ bu tip çalışmalar için geniş araştırma alanı sunmaktadır. Stamenlerin gelişimi sırasında anter anter keselerini birleştiren parankimatik yapıdaki konnektif dokuya ait hücreler, anterin çeperini oluşturan tabakalardan tapetum, endotesyum ve ara tabaka hücreleri, polenlerin dağılması için uygun zaman geldiğinde hücre ölümü gerçekleştirmektedir. Ayrıca pistil ve kendine uyuşmaz polenin etkileşimi esnasında da stilus içinde polen tüpü mikropile ulaşmadan körelmektedir. Pistil

gelişimi sırasında mayoz bölünme sonrasında inaktif megasporlarda, nusellus dokusunda, sinergid ve antipodlarda, embriyoyu endospermaya iten hücrelerde, apomiktik kese oluşmasında ve tohum çimlenmesi esnasında endospermada PHÖ görülmektedir (Yanık ve ark, 2018).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

Çalışmamızda kullandığımız *Hibiscus syriacus* L. (ağaç hatmi) bitkisinin sistematiği Sekil 2.1'de gösterildiği gibidir.



Alem: Plantae

Şube: Angiospermae

Sınıf: Magnoliopsida

Takım: Malvales

Familya: Malvaceae

Cins: *Hibiscus*

Tür: *Hibiscus syriacus* L.

Şekil 2. 1. *Hibiscus syriacus* L. ve sistematiği

2.1.1. Bitki Materyalinin Toplanması ve Fiksasyonu

Bitki materyalimiz olan *H. syriacus*'un farklı boy ve evrelerdeki çiçek tomurcukları, 2020 yılının Eylül ayında, İstanbul'un Çekmeköy ilçesinin Ömerli köyünden (41°05'41.3"N 29°19'31.7"E) toplandı. Morfolojik ve embriyolojik analizler için kullandığımız çiçekler asetik asit:etanol (1:3) ile fikse edilip, bir gece vakum pompasında bekletildikten sonra %70 etanol içerisinde +4°C'de saklandı. Fikse edilen anterler aseto-orsein boyası ile muamele edilip ezildikten sonra mayoz bölünme evreleri belirlenerek farklı fiske şişelerinde muhafaza edildi.

2.2. Araştırma Yöntemleri

2.2.1. Parafine Gömme ve Kesit alma

Araziden toplanan *Hibiscus syriacus* tomurcukları Tablo 2.1.'de gösterildiği gibi fikse işlemleri tamamlandıktan sonra parafine gömüldü.

Tablo 2. 1. Parafine gömme işlemi.

Yöntem	**Çözelti**	**Süre**	**Ortam Sıcaklığı**
Fiksasyon	Asetik Asit %100 etanol (1:3)	24 Saat	Oda sıcaklığı
Fazla Fiksatifin Alınması	%96 Etanol	2 dk x2	
	%70 Etanol	2 dk x2	
Saklama	%70 Etanol		+4°C
Dehidrasyon	%80 Etanol	30 dk	
	%96 Etanol	30 dk	
	%100 Etanol	30 dk x2	
Şeffaflaştırma	%100 Etanol:Ksilol (2:1)	30 dk	
	%100 Etanol:Ksilol (1:1)	30 dk	
	%100 Etanol:Ksilol (1:2)	30 dk	
	Ksilol	30 dk x3	
Parafin İnfiltrasyonu	Ksilol:Parafin (1:1)	24 saat	56°C'de etüvde
	Parafin	24 saat x2	56°C'de etüvde
Parafine Gömme			Oda sıcaklığında

Parafine gömme işlemi tamamlandıktan sonra örnekler Leica RM 2125 RT marka mikrotom ile 8-10 µm kalınlığında kesitler alınıp albümin mayer sürülmüş lamlara yerleştirildi. Lamlar 24 saat boyunca 50°C'lik ısıtma tablasında bekletildi. Kesitler Tablo 2.2'de gösterilen işlemler uygulanarak parafinden kurtarıldı ve boyandı. Boyandıktan sonra Tablo 2.2.'de gösterilen sıra tersten kullanılarak tekrar ksilol evresine getirildi ve iki damla entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı. Entellan kuruduktan sonra tüm kesitler Olympus marka mikroskopta KAMERAM programı ile fotoğraflandı.

Tablo 2. 2. Deparafinizasyon işlemi.

Yöntem	Çözelti	Süre
Deparifinizasyon	Ksilol	10 dk x2
	Ksilol: %100 Etanol (2:1)	10 dk
	Ksilol: %100 Etanol (1:1)	10 dk
	Ksilol: %100 Etanol (1:2)	10 dk
	%100 Etanol	10 dk x2
	%96 Etanol	10 dk
	%70 Etanol	10 dk
	%50 Etanol	10 dk
	%35 Etanol	10 dk
	Distile Su	10 dk

2.2.2. Hematoksilen ile Boyama

Anter tabakalarının genel yapısını gözlemlemek amacıyla kesitler parafin kaldırma işleminden sonra Tablo 2.3'te gösterildiği gibi Hematoksilen (Gill ve ark., 1974) ile boyandı. Boyama işlemleri tamamlandıktan sonra tabakaların ters serilerden geçirilen preparatlar entellan ile kapatıldı. Kesitlerin genel yapısı gri-siyah renkte gözlendi.

Tablo 2. 3. Hematoksilen yöntemi (Gill ve ark., 1974).

Yöntem	Çözelti	Süre
Hematoksilen	Hematoksilen	30 dk karanlıkta
	Akan su	5 dk
	Ters seriden geçirerek entellan ile kapatma	

Hematoksilen hazırlanışı: 2 gr hematoksilen, 0.2 gr sodyum iodat ve 17.6 gr alüminyum sülfat 750 ml distile su içerisinde çözüldü. Karışıma 250 ml gliserol ve 20 ml glasiyal asetik asit eklendi. Karanlıkta 1 ay bekletildi.

2.2.3. Coomassie parlak mavisi

Distile su basamağına kadar getirilen kesitler anter çeper tabakalarındaki protein varlığını göstermek amacı ile Tablo 2.4'te gösterildiği üzere Coomassie Parlak Mavisi (Heslop-Harrison ve ark., 1973) ile boyandı. Boyama işleminden sonra kesitlerdeki proteinler mavi-lacivert renkte gözlemlendi.

Tablo 2. 4. Coomassie Parlak Mavisi (Heslop-Harrison ve ark., 1973).

Yöntem	Çözelti	Süre
Coomassie Parlak Mavisi	%2 Coomassie Parlak Mavisi	10 dk 60°C'de etüvde
	Akan su	5 dk
	Ters serilerden geçirerek entellan ile kapatma	

%2 Coomassie Parlak Mavisi hazırlanışı: 0.2 gr Coomassie Parlak Mavisi, metanol: distile su:asetik asit (5:4:1) çözeltisi içinde çözüldü ve süzüldü.

2.2.4. Periyodik Asit-Schiff Reaktifi

Anter tabakalarındaki suda çözünmeyen polisakkaritlerin tespiti için kesitler Tablo 2.5'te gösterildiği gibi Periyodik Asit-Schiff (PAS) Reaktifi (Feder ve O'Brien, 1968) ile boyandı. Boyama işlemi sonucunda suda çözünmeyen polisakkaritlerin pembe renkte gözlemlendiği görüldü.

Tablo 2. 5. PAS yöntemi (Feder ve O'Brien, 1968).

Yöntem	Çözelti	Süre
Periyodik Asit-Schiff Reaktifi	%1 Periyodik Asit	20 dk
	Akan su	10 dk
	Schiff's Reaktifi	30 dk karanlıkta
	%0.5 $Na_2S_2O_5$	5 dk x3
	Akan su	5 dk
	Ters serilerden geçirerek entellan ile kapatma	

%1 Periyodik Asit hazırlanışı: 1 gr Periyodik Asit 100 ml %90 etanol içinde çözündürüldü.

2.2.4. Sudan siyahı B

Anter tabakalarındaki lipit varlığını belirlemek amacı ile kesitler Tablo 2.6'da gösterildiği gibi Sudan siyahı B (Pearse, 1961) ile boyandı. Sudan siyahı B ile boyama işlemi sonucunda lipitler gri-siyah renkte gözlemlendi.

Tablo 2. 6. Sudan siyahı B yöntemi (Pearse, 1961).

Yöntem	Çözelti	Süre
Sudan siyahı B	%1 Sudan siyahı B	60 dk 60°C'de etüvde
	%70 Etanol	Çalkalama x2
	%96 Etanol basamağından itibaren ters serilerden geçirerek entellan ile kapama	

%1 Sudan siyahı B hazırlanışı: 1 gr Sudan siyahı B 100 ml %70 etanol içinde çözdürüldü ve süzüldü.

2.2.5. DAPI

Hazırlanan kesitler, anter çeper tabakalarında gözlenen hücre ölümü sırasında nukleus morfolojisindeki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla floresan bir boya olan DAPI ile boyanmıştır (Schweizer, 1976). Daha sonra 0.05 M pH 7.4 fosfat tamponuyla yıkanan kesitlerden 365 nm dalga boyunda floresan mikroskobunda görüntü alınmıştır. Görüntülenme sonucunda hücre nukleuslarında mavi ışımalar ile morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir.

Tablo 2. 7. DAPI boyaması (Schweizer, 1976).

Yöntem	Çözelti	Süre
DAPI	1µg/1ml DAPI	30 dk karanlık ortamda
	0.05 M pH 7.4 Fosfat tamponu	Çalkalama
	Lamel ile kapama	365 nm dalga boyunda inceleme

1µg/1ml DAPI hazırlanışı: 1 mg/1ml stok çözelti, pH'sı 7.4 olan 0.05M fosfat tamponunun sulandırılması ile hazırlanmıştır.

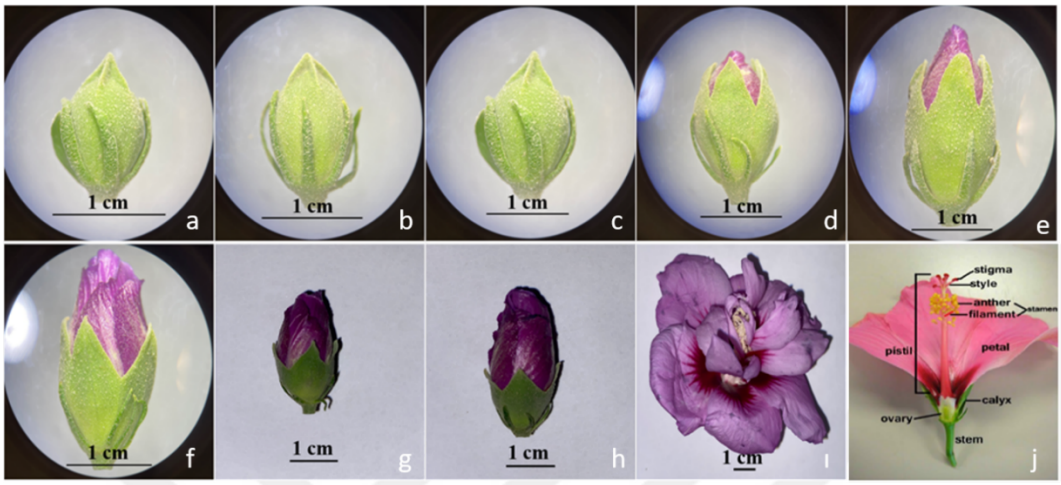
2.2.6. *Hibiscus syriacus* L. Polenine Ait Morfolojik Özelliklerin İncelenmesi

Bitkiye ait polen örnekleri 2021 yılının Ekim ayında, İstanbul Çekmeköy, Ömerli köyünden (41°05'41.3"N 29°19'31.7"E) toplanarak laboratuvara getirilmiş 25°C'deki etüvde 3 gün boyunca ağzı tam kapalı olmayacak şekilde kurutulmuş ve nemsiz ortamda saklanmış daha sonra Wodehouse Yöntemi kullanılarak ışık mikroskobu ile incelemeler yapılmıştır (Wodehouse, 1959). Wodehouse Yöntemine göre, preparat hazırlamak amacıyla 50°C'deki ısıtıcı tabla üzerinde bulunan lamın üzerine incelemenin daha net yapılabilmesi için bir parça gliserin-jelatin eklenmiş daha sonra temiz bir iğne ucu ile polen örneklerinden bir miktar alınarak lam yüzeyindeki eritilmiş gliserin-jelatin ile karıştırılmış ve üzerine lamel kapatılmıştır. Preparatlar lameller altta olacak şekilde ters çevrilerek 1 hafta kurumaya bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda polenin ışık mikroskobu ile morfolojik incelemelerinin yapılabilmesi amacıyla fotoğraf çekimleri yapılarak polenin polar ve ekvatoral eksenlerinin belirlenmesi için en az 60 ölçüm yapılmıştır. Daha sonrasında P/E oranları hesaplanarak polen şekil ve büyüklükleri belirlenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Morfolojik Bulgular

Çalışmada kullanılan *Hibiscus syriacus* L. bitkisinden toplanan farklı evrelerdeki çiçek tomurcuklarına ve kısımlarına ait görüntü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3. 1. Farklı gelişim evrelerinde toplanan *H. syriacus* L. bitkisinin çiçek tomurcuklarına ve kısımlarına ait görüntüler (3.1.j için kaynak: 15 Mayıs 2022, https://freehighschoolscience.wordpress.com/2019/02/25/hibiscus-flower/.)

H. syriacus'da çiçek durumu ve çiçek morfolojisini belirlemek amacıyla çiçek durumları ve çiçekler stereomikroskop altında incelenmiştir. *H. syriacus*'da çiçekler kısa ömürlü olup sadece 1-2 gün açık kalırlar, ancak çok sayıda tomurcuk üretildiğinden yaz boyunca çiçekli kalır. Çiçek tomurcukları başlangıçta yeşil renkli ve yuvarlak hatlıdır (Şekil 3.1). Çiçekler 5 adet yeşil tüylü sepal ve katmerli eflatun-mor petallere sahiptir. Hermafrodit çiçeklerde ovaryum üst durumlu (hipogin), 5 parçalı stilus ve merkezi bir kolon üzerinde çok sayıda stamene sahiptir.

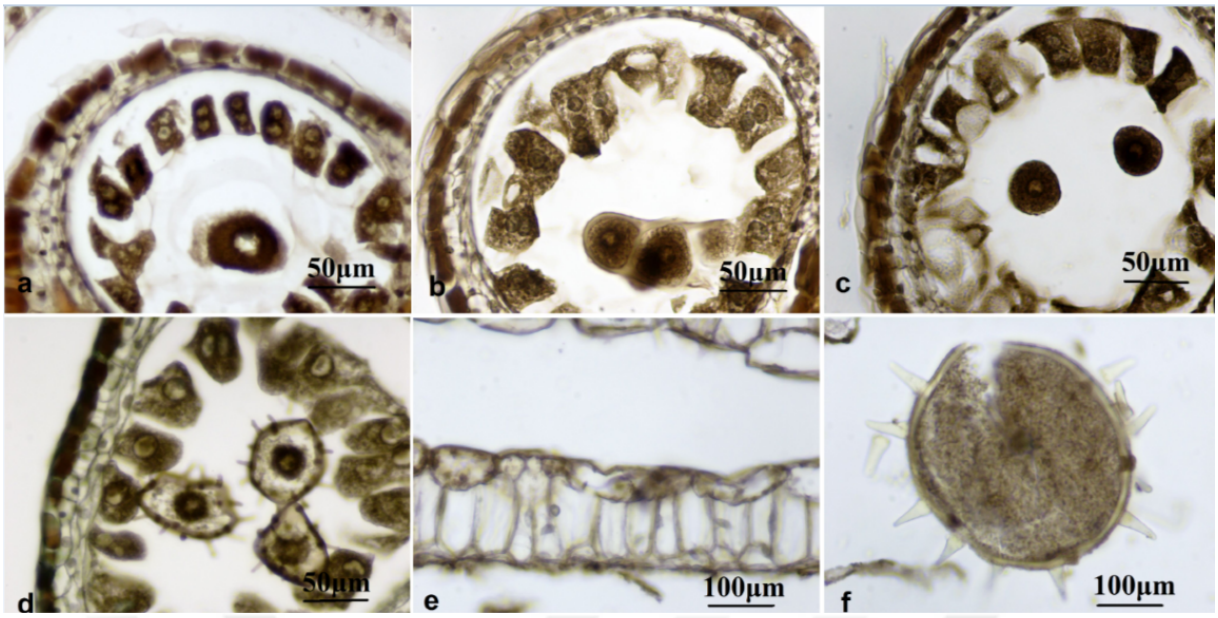
3.2. Anter Çeper Tabakalarının Gelişimi

Çalışmanın temelini oluşturan *H. syriacus* L. tetrasporangiyat anterlerinin gelişim evrelerinin ilk aşamalarında en dış tabakasının epidermis ile çevrili olduğu görülmektedir. Anterler gelişimin en başında küresel-eliptik şekilde ve meristematik hücrelerden oluşmuş homojen bir durumdadır. Gelişim ilerledikçe anter çeper tabakaları endotesyum, ara tabaka, tapetum oluşarak anter hacminde artış görülmekte ve olgunlaşmış anterlerin stomium noktaları açılarak olgun polenler dışarı atılmaktadır.

H. syriacus anterlerinin gelişimleri verilen evrelerde incelenmiştir:

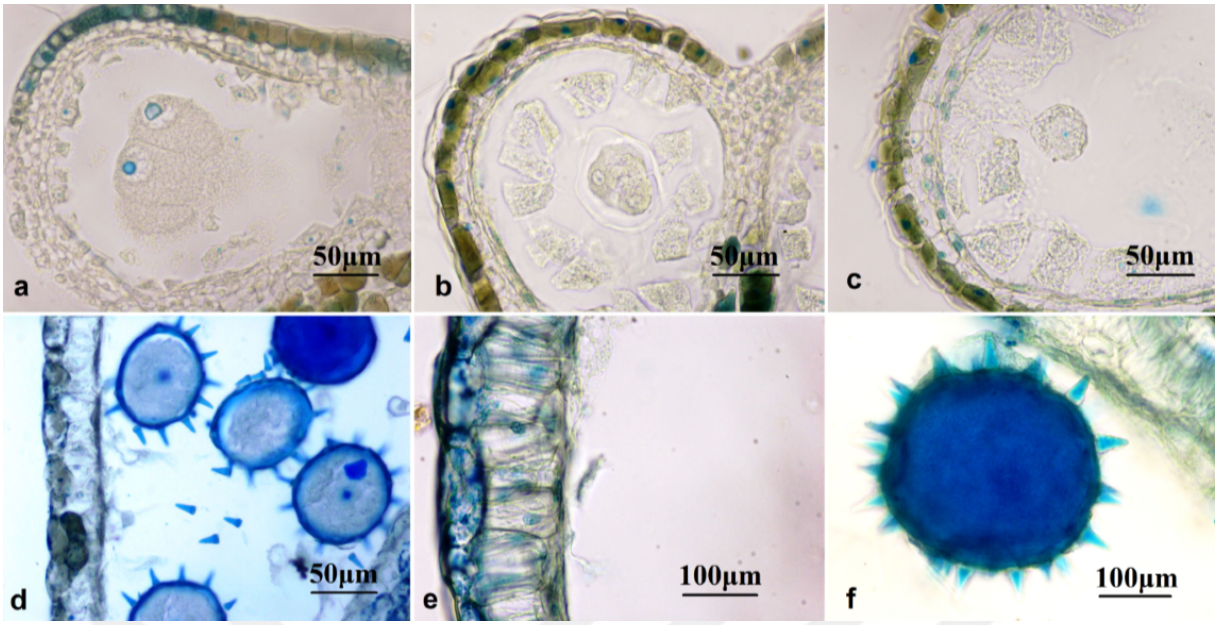
1) Profaz-I evresi
2) Tetrat evresi
3) Genç polen evresi
4) Vakuollü polen evresi
5) Olgun polen evresi

H. syriacus anterlerinin incelenebilmesi için verilen gelişim evrelerine ait anterlerden 8-10 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilen boyasıyla boyanmıştır. Boyama işlemi sonunda anter gelişiminin ilk safhalarında *H. syriacus* anterlerinin dıştan içe doğru epidermis, endotesyum, ara tabaka ve tapetumdan oluştuğu görülmüştür (Şekil 3.1a). Gelişimin erken evrelerinde (profaz I'den itibaren) mitoz bölünmeye uğrayan tapetum tabakasında 2 veya 3 nukleuslu hücreler de tespit edilmiştir (Şekil 3.1a, b). İncelenen bitkinin genç polen evresiyle beraber ara tabaka ve tapetum hücrelerinde değişiklik görülmeye başlanmış ve vakuollü polen evresinden sonra körelme görülmeye başlanmıştır (Şekil 3.1c, d). Gelişim sonunda ise endotesyum ve epidermis tabakalarının varlıklarını sürdürdüğü görülmüştür. Epidermis tabakasının sitoplazmasının gelişimin başından itibaren oldukça yoğun olduğu belirlenmiştir. Olgun polen evresinden itibaren endotesyum tabakasının hacimsel artışla boyuna olacak şekilde uzayarak U şeklini aldığı saptanmıştır (Şekil 3.1e). Gelişimin son aşamasında, stomium bölgelerindeki hücrelerin ölmesi ve birbirinden ayrılmasıyla anterlerin açıldığı ve olgun polen tanelerinin dağıldığı tespit edilmiştir. Olgun polen tanelerinde dikensi çıkıntıların olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1f).



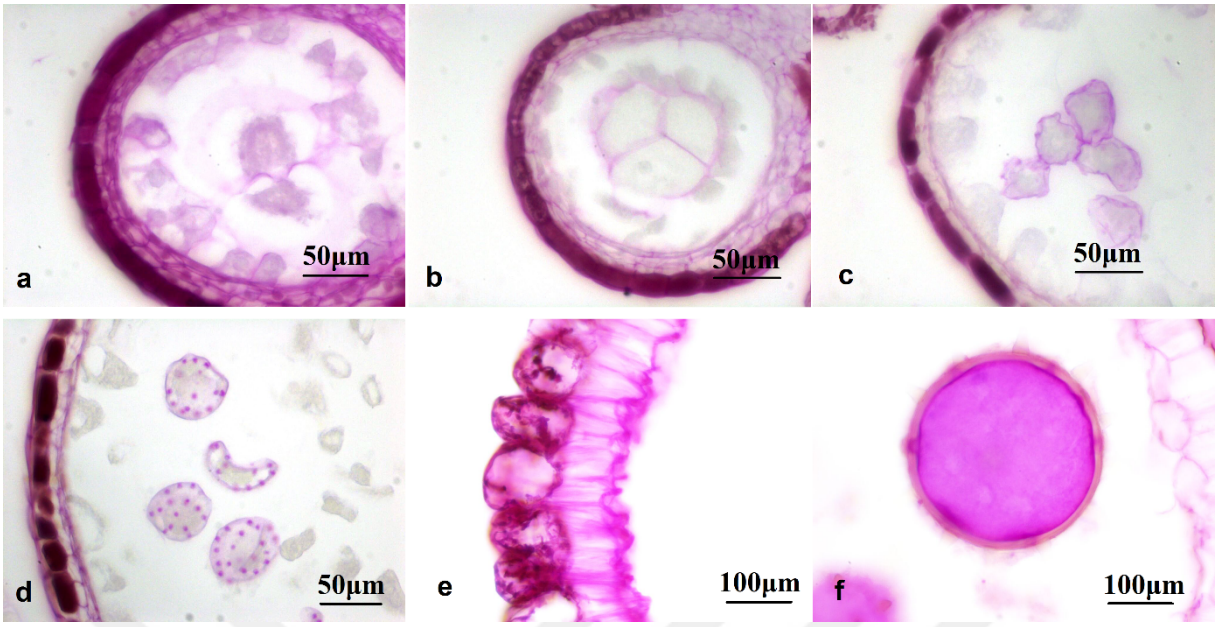
Şekil 3. 2. *H. syriacus* anterlerinin Hematoksilen ile boyandıktan sonraki genel yapısı **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun polen evresi **f.** Olgun polen

H. syriacus anter çeper tabakalarında protein varlığını incelemek amacıyla Coomassie parlak mavisi (CBB) boyaması yapılmıştır. CBB boyanması sonucunda gelişimin başlarında epidermis, endotesyum ve ara tabakanın sitoplazmik içeriklerinin proteince fakir olduğu gözlenirken nukleuslarının protein boyaması ile pozitif reaksiyon verildiği görülmüştür. Gelişimin ilk evrelerinden, tapetumun köreldiği vakuollü polen evresine kadar tapetum hücrelerinde protein varlığına rastlanmamıştır. Vakuollü polen evresinden itibaren polen ekzin çeperlerinde ve sitoplazmasında protein birikiminin oldukça yoğun olduğu belirlenirken, epidermisteki yoğun sitoplazmanın protein içermediği belirlenmiştir (Şekil 3.2).



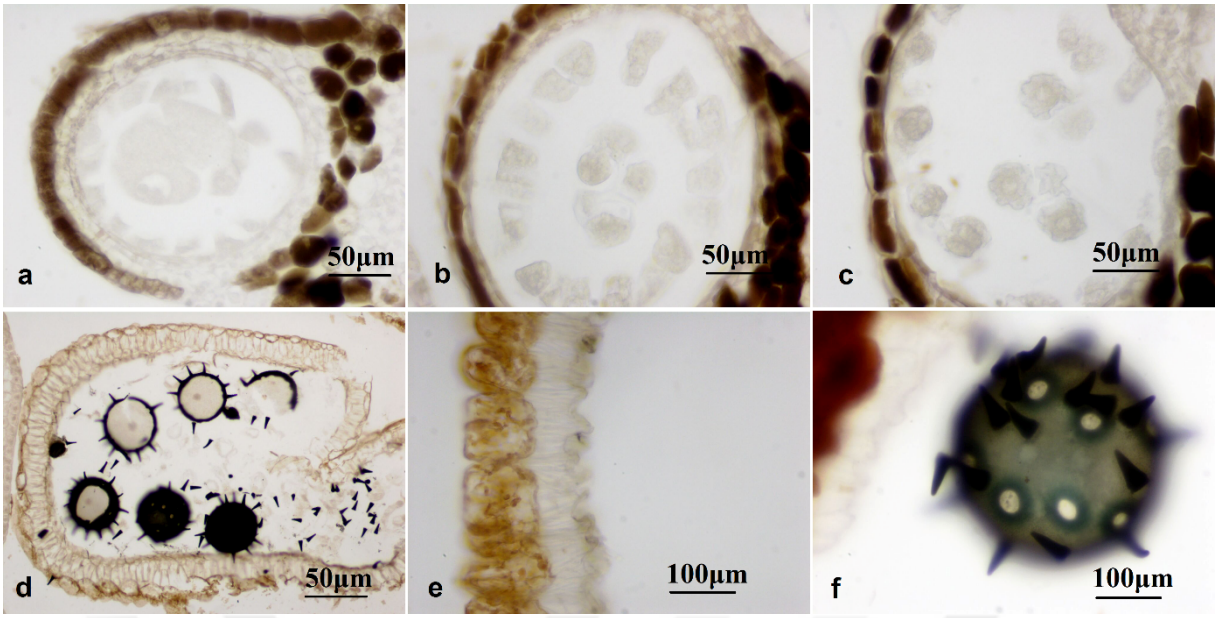
Şekil 3. 3. *H. syriacus* anterlerinin Coomassie parlak mavisi ile boyandıktan sonraki genel yapısı **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun polen evresi **f.** Olgun polen

H. syriacus anterlerine ait çeper tabakalarında bulunan nişasta, selüloz gibi suda çözünmeyen polisakkaritlerin varlığını tespit etmek amacıyla yapmış olduğumuz Periyodik Asit & Schiff (PAS) boyaması ile anter gelişiminin ilk evrelerinde (Profaz I) epidermis, endotesyum, ara tabaka hücreleri kuvvetli PAS pozitif reaksiyon göstermiştir. Tapetum hücrelerinde olduğu gibi diğer tabakalarda da profaz-I evresinden sonraki evrelerde hücre çeperleri hariç PAS negatif sonuç göstermiştir. Ayrıca tetrat evresinde kalloz çeperi bulunan mikrospor tetratlarında PAS pozitif sonuca rastlanmıştır. Olgun polen evresine gelindiğinde epidermisin mevcut polisakkarit varlığı korunurken endostesyumun hücre çeperlerinin kalınlaşmalarında kuvvetli PAS pozitif reaksiyon görülmüştür. Son olarak olgun polen tanelerinin sitoplazması ve intin çeperlerinde kuvvetli boyanma tespit edilmiştir. Kesit alınması sırasında kolaylıkla kopma eğiliminde olan dikensi çıkıntılardan geriye kalan kısımlarda da intin çeperin açığa çıkarak koyu pembe noktalar halinde boyandığı görülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3. 4. *H. syriacus* anterlerinin Periyodik Asit-Schiff reaktifi ile boyandıktan sonraki genel yapısı **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun polen evresi **f.** Olgun polen

H. syriacus anterlerinin çeperlerindeki lipit varlığının incelenmesi amacıyla Sudan Siyahı B (SBB) boyaması yapılmıştır. SBB sonuçlarına göre Profaz-I, tetrat ve genç polen evrelerinde epidermis tabakalarının lipit bakımından oldukça zengin olduğu görülmekle beraber endotesyum, ara tabaka ve tapetum hücrelerinin lipitçe fakir olduğu görülmüştür. Ek olarak bu evrelerde konnektif doku hücrelerinin lipit içeriğinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Vakuollü polen evresinden itibaren lipit yoğunluğu azalmaya başlayan epidermis hücrelerinin olgun polen evresinde halen lipit varlığı gösterdiği belirlenmiştir. Olgun polen tanelerinin sporopollenin yapıdaki ekzin çeperlerinin ise Sudan Siyahı tarafından kuvvetli boyanarak yoğun lipite sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3. 5. *H. syriacus* anterlerinin Sudan siyahı B ile boyandıktan sonraki genel yapısı **a.** Profaz-I evresi. **b.** Tetrat evresi **c.** Genç polen evresi **d.** Vakuollü polen evresi **e.** Olgun polen evresi **f.** Olgun polen

H. syriacus anterlerinde yaptığımız sitokimyasal boyamalar sonucunda elde ettiğimiz verilere göre; epidermis, endotesyum ve ara tabaka hücrelerinin sitoplazmik içeriklerinin suda çözünmeyen polisakkarit bakımından, ayrıca epidermisin sitoplazmik içeriğinin lipit bakımından zengin olduğu görülmekle beraber bu üç tabakanın protein açısından fakir olduğu tespit edilmiştir.

Bitkilerde gelişim ile ilgili histolojik çalışmalarda sitokimyasal bulgular gelişim evrelerinin daha iyi tanımlanabilmesi açısından önem taşımaktadır. Özellikle dişi (pistil) veya erkek organ (stamen) gelişimi ve embriyolojik sürecindeki organik bileşiklerin değişimi ile ilgili birçok çalışma vardır.

van der Linde ve Walbot (2019) *Arabidopsis* anterleri ile yaptığı çalışmada anter çeper tabakalarından ara tabakanın kısa ömürlü ve geçici hücre tiplerinden oluştuğunu, tetratların oluştuğu aşamada bu katmanın yalnızca kalıntılarının kaldığını belirtmekle beraber kalloz çeper dejenere olduğunda ise kalıntıların da tamamen kaybolduğunu belirtmişlerdir.

Chawla ve ark. (2017) *Oryza sativa* ile yaptıkları çalışmada tüm anter çeper tabakalarında PAS pozitif sonuç tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Yun ve Huiqiao (2015) *Lycopersicon esculentum* anterlerinde histokimyasal yöntemlerle polisakkarit ve lipit dağılımını incelemişlerdir. Mayoz bölünmeden önce mikrospor ana hücrelerinin konnektif dokudaki nişasta tarafından oluşturulan kalın polisakkarit çepere sahip olduğunu belirlemişlerdir. Tetrat

evresinde de anterdeki polisakkarit miktarında değişiklik olmadığını, genç polen evresinden itibaren ise konnektif dokudaki nişastanın artışı sonrasında polen intin çeperinde polisakkarit birikimi tespit etmişlerdir. Vakuollü polen evresinde vakuolün lipit ve nişasta içermediğini, polen çeperinin ise polisakkarit açısından zengin olduğunu belirtmişlerdir. Bu aşama ile beraber konnektif dokunun nişasta miktarının azaldığını ve tapetum hücrelerinin morfolojik değişikliğe uğrayarak dejenere olduğunu ve olgun polen tanelerinde bol miktarda lipit ve nişasta birikimi olduğunu bildirmişlerdir.

Mirgorodskaya ve ark. (2015) *Rhododendron ledebourii* anterlerinde yaptıkları çalışmada nişasta granüllerinin endotesyumun plastitlerinde biriktiğini bildirmişlerdir. Ayrıca *R. luteum* anterleri ile yaptıkları aynı çalışmada olgun polen aşamasında epidermis ve endotesyum hücrelerinin plastidlerinin büyük nişasta taneleri içerdiklerini de eklemişlerdir. Wu ve arkadaşları (2015) *Gossypium* spp. anterlerinde Sudan siyahı B kullanarak yaptıkları araştırmalarda anormal lipit metabolizmasının anter çeper tabakalarının gelişimini etkileyerek steriliteye sebep olduğunu ortaya koymuştur. Vardar ve Ünal (2011) *Lathyrus undulatus* anterlerinde yaptıkları çalışmalarda genç polen evresinde tapetum hücrelerinin protein, suda çözünmeyen polisakkarit ve lipitler açısından yoğun şekilde karakterize edildiğini belirtmişlerdir.

Xie ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino steril ve verimli anterlerinin farklı gelişim evrelerini çeşitli sitokimyasal yöntemler kullanarak polisakkarit ve lipit içeriklerini incelemişlerdir. Genç polen evresinde konnektif dokuda bulunan nişasta miktarında meydana gelen azalmaların anter çeper hücrelerinde nişasta tanelerinin birikmesinden kaynaklandığını belirtmişledir. Vakuollü polen evresinde ise verimli anterlerin tapetum hücrelerinde lipit birikiminin varlığı gözlenirken steril anterlerin tapetumunda lipit ve polisakkarit varlığı görülmemiştir. Ariizumi ve ark. (2003) tapetumda sentezlenen lipit yapıdaki sporopollenin öncüllerinin doğru bir şekilde transfer edilmediği durumların anormal ekzin tabakalaşmasına ve asetolize karşı dirence sebep olduğu sonucuna varmışlardır.

Ravi ve arkadaşları (2000) çalışmalarında *Spathoglottis plicata* bitkisinin mikrospor tetratının etrafındaki kalloz çeperde PAS pozitif sonuç gördüklerini belirtmişlerdir. De Halac ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada *Oenothera* anterlerinin epidermis, endotesyum ve ara tabaka hücrelerinin PAS pozitif sonuç gösterirken tapetum hücrelerinde PAS negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada mikrosporların tetrattan salındıktan sonra endekzin tabakasının Sudan siyahı B ile boyandıktan sonra pozitif sonuç verdiğini göstermişlerdir. Evans ve ark. (1992) *Brassica napus* anterlerinde yaptıkları çalışmada olgun polen tanelerinde

gelişimin erken evrelerinde birikmeye başlayan lipitlerin tapetum hücrelerinden köken aldığını bildirmişlerdir. Harrison ve ark. (1973) Malvaceae familyasına ait çeşitli bitkilerin polenlerinin intin çeperlerinde yoğun proteine rastladıklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada olgun polen tanelerinin ekzin çeperlerinin protein ve karbonhidrat bakımından zengin olduğu belirtilmiştir. Ekzin materyallerinin, tapetumun çözünme aşamasında granüler- fibriler içerikli sisterna salan tapetumdan üretildiği açıklanmıştır.

H. syriacus ile yaptığımız çalışmada tapetum hücrelerinin sitoplazmalarının lipit, protein, suda çözünmeyen polisakkarit açısından fakir olduğu görülmekle beraber hücre çeperinin suda çözünmeyen polisakkarit açısından zengin olduğu belirlenmiştir. *H. syriacus* anterlerinde ara tabaka ve tapetum hücrelerinin genç polen evresinde körelme işaretlerini göstermeye başladığı, vakuollü polen evresinde şiddetlendiği ve olgun polen evresinde ise tamamen yok olduğu saptanmıştır. Epidermis tabakasının gelişimin sonuna kadar varlığını sürdürdüğü, lipit ve polisakkaritler bakımından zengin bir sitoplazmaya sahip olduğu görülmüştür. Epidermisle birlikte gelişimin sonuna kadar varlığını sürdüren endodermis tabakası ise vakuollü polen evresinden itibaren genişleyerek fibrilli PAS pozitif fibrilli çeperler içeren bir morfoloji gösterdiği belirlenmiştir. *H. syriacus*'un olgun polen tanelerinin ekzin çeperleri protein ve lipitçe zengin, intin çeperlerinin ise suda çözünmeyen polisakkaritçe zengin olduğu görülmüştür. Olgun polen tanelerinin sitoplazmasının ise oldukça yoğun protein ve suda çözünmeyen polisakkarit içerdiği tespit edilmiştir.

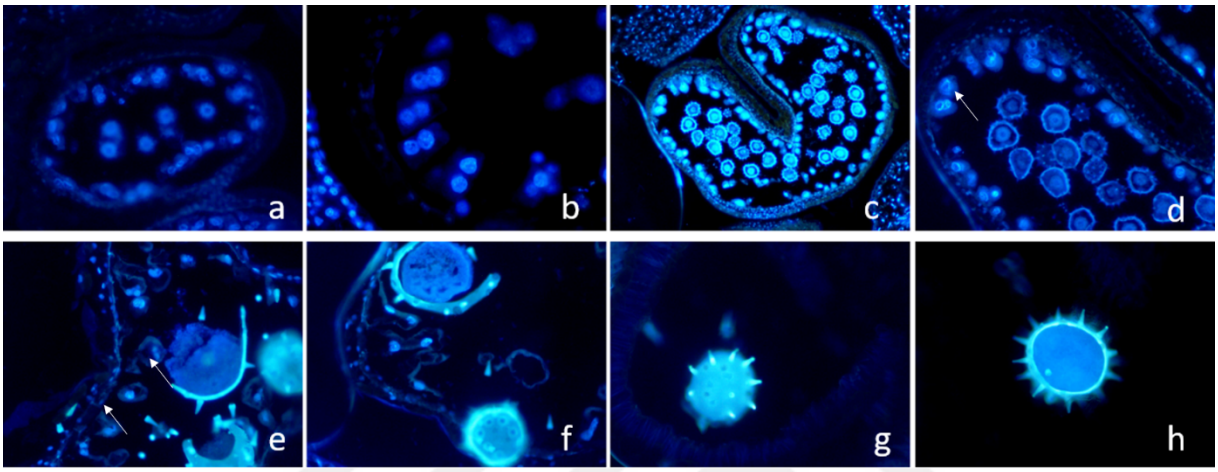
H. syriacus'da olduğu gibi diğer *Hibiscus* türlerinde de erkek üreme organı olan anterlerin gelişimi, anter çeper tabakalarının sitokimyası ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Her ne kadar literatür araştırmalarında *H. syriacus* polenlerinin gelişimi, morfolojisi ve dikensi çıkıntılarının gelişimi ile ilgili çalışmalar varsa da olgun polen tanelerinin sitokimyasi ile ilgili veri de bulunmamaktadır (Takahashi ve Kouchi, 1988; Shaheen ve ark., 2009).

3.3. Anter Çeper Tabakalarındaki Programlı Hücre Ölümü

DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole), elektrostatik etkileşimler yoluyla DNA'nın adenin-timin bakımından zengin bölgelerine güçlü bir şekilde bağlanan ve bu bölgelerde mavi ışıma veren floresan boyadır (Tarnowski ve ark., 1991).

DAPI boyaması sonucunda elde edilen verilere göre, anter gelişiminin ilk evrelerinden itibaren tapetum hücrelerinin mitoz bölünme sonucu iki veya üç nukleusa sahip olduğu belirlenmiştir. Tetrat evresinde tapetum hücrelerinin nukleusları küresel şekilde bütünlüğünü koruyarak yayılım göstermektedir. Genç polen evresinden itibaren tapetum nukleuslarının normal şekillerini kaybettiği, kromatin materyalinin nukleusta anormal şekilde dağıldığı

görülmüştür. Vakuollü polen evresinde ise tapetum ve ara tabaka hücreleri için bu durum artarak devam etmekte ve şiddetli hücre ölümünü göstermektedir. Vakuollü polen evresinde kromatin materyalinin nukleus zarının hemen altına yoğunlaşarak biriktiği belirlenmiştir. Olgun polen evresine gelindiğinde ise tapetum ve ara tabakanın tamamen köreldiği görülmüştür (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 DAPI boyaması **a, b.** Tetrat evresi, **c, d.** Genç polen evresi, **e, f.** Vakuollü polen evresi, **g, h.** Olgun polen

Anter çeper tabakalarında meydana gelen programlanmış hücre ölümünün (PHÖ) verimli üreme hücrelerinin oluşması açısından önemi bilinmektedir. Tapetum hücrelerinin PHÖ ile içeriğini anter loblarına boşaltması yoluyla verimli polenler oluşur ve fertilite sağlanmış olur. DAPI metodu ile bu süreç incelenebilmektedir.

Papini ve ark. (1999) *Lobivia rauschii* ve *Tillandsia albida*'da tapetum nukleuslarındaki şekil bozukluklarını tespit edip, tapetum dejenerasyonunun bir tür PHÖ göstergesi olduğunu bildirmişlerdir.

Ariizumi ve ark. (2005) tapetum hücrelerinde meydana gelen genetik mutasyonların sporofitik süreci kontrol altına alarak steriliteye sebep olduğunu göstermiştir. Limei ve ark. (2010) steril, mutant *Hibiscus cannabinus* L. anterlerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda ara tabakanın dejenerasyonunun gecikmesi, tapetumun ara tabakadan zamanından önce kopması gibi anormalliklerin steriliteye sebep olduğu görülmüştür.

Vardar ve Ünal (2011) *Lathyrus undulatus* anterinde gerçekleşen hücre ölümünü DAPI ve TUNEL yöntemlerini kullanarak incelemişlerdir. İki hücreli olgun polen aşamasında ara tabaka ve tapetumun PHÖ ile dejenere olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları DAPI boyama

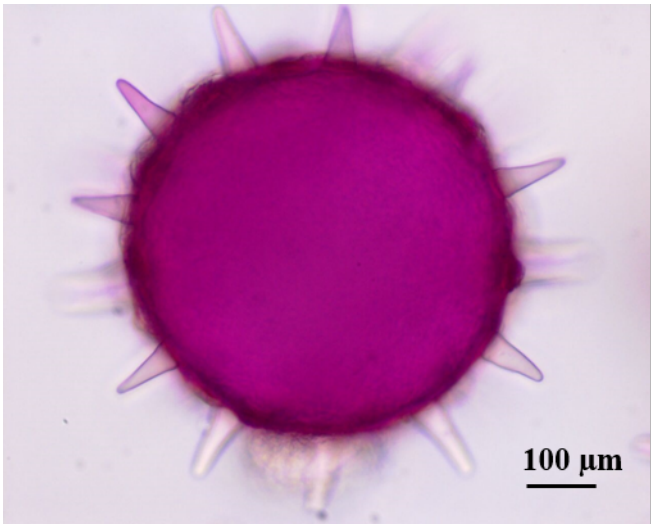
sonuçlarına göre genç polen evresinde granüler bir yapıda olan DNA'nın vakuollü polen evresinde deformasyona uğrayarak düzensiz bir dağılım gösterdiğini bildirmişlerdir.

Solis ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada *Brassica napus* ve *Nicotiana tabacum*'un tapetumundaki PHÖ' nün, global DNA metilasyonu ve MET1 ekspresyonunda bir artış dahil olmak üzere epigenetik değişiklikler tarafından düzenlendiği bildirilmiştir.

Sutthinon ve ark. (2018) yaptıkları çalışmalarda *Garcinia celebica* L.'nin vakuollü polen evresinde tapetum bozunması hemen hemen tamamlanmış olmasına rağmen, bu aşamada içinde kalan sadece birkaç tapetal hücre bulunduğunu ve tapetumun dejenerasyonunun yokluğu ile karakterize edilen bir sonraki aşama olan olgun polen evresinde tamamlandığını ve bu durumun normal bir polen ve tapetum gelişim modeli olduğunu belirtmişlerdir.

Ara tabaka hakkında mevcut bilgilerin oldukça sınırlı olmasına rağmen, kusurlu ara tabakaya sahip birkaç mutant bazı çalışmalarda rapor edilmiştir. Birkaç reseptör benzeri kinazın fonksiyon kaybı sonucunda ortaya çıkan mutantlar, ara tabaka ve polen oluşumunda kusura sebebiyet vermektedir (Mizuno ve ark., 2007; Cui ve ark., 2018). Bu mutant fenotipler, ara tabakanın anter gelişimi ve polen oluşumu için gerekli olduğunu göstermektedir. Xue ve ark. (2021) Arabidopsis hücre duvarı ve nükleer bozunma çalışmalarında ara tabakanın tapetuma benzer şekilde anter gelişiminin son aşamalarında tamamen ortadan kalktığını ortaya çıkarmıştır.

3.4. *H. syriacus* Polenine Ait Morfolojik Özellikler



Şekil 3.6: *H. syriacus* polen tanesinin ışık mikroskobundaki görüntüsü

H. syriacus polenleri ışık mikroskobu düzeyinde incelendi. Polenlerin apertürlerinin dağılımı ve küresel şekilleri nedeniyle P (polar eksen) -E (ekvatoral eksen) ayrımı yapılamamıştır. Bu nedenle sadece çap ölçümleri (R) gerçekleştirildi (Tablo 3.1). Buna göre ortalama çap değerlerinin 88,176 µm olduğu belirlendi. Polenlerin hepsi büyük boyutlu ve sferoidal şekillidirler. İsopolar polenlerin tümü ekinat ornamentasyonludur. Pantoporat tipte ortalama 9,461 µm çapındaki apertürler polenin her tarafına düzensiz bir şekilde dağılım göstermektedir.

Tablo 3. 1. *H. syriacus* polenlerine ait polenlerin ölçüm değerleri.

Ölçülen Değerler	**Sonuçlar**
R (Çap, ± SS)	88,176 ±3,54 µm
Boyut	Büyük
Şekil	Sferoidal
Apertür	Pantoporat
Apertür çapı (± SS)	9,461 ±1,29 µm
Apertür sayısı	>6
Polarite	İsopolar
Ornamentasyon	Ekinat
Dikensi çıkıntı boyu (± SS)	14,46 ±1,29 µm

Bae ve ark., (2015) *H. syriacus* polen morfolojisine ait yapmış oldukları çalışmada polen çapı ölçümlerinin maksimum değerini 172,15 µm, minimum değerini 108,81 µm olarak belirlerken; çalışmamızda polen çapı ölçümlerini maksimum 93,84 µm, minimum 78,89 µm olarak belirledik. Araştırıcılar dikensi çıkıntı boyutunun maksimum 25,29 µm, minimum 8,16 µm olarak bildirirken; tez çalışmamızda dikensi çıkıntı boyutunu maksimum 18,49 µm, minumum 12,10 µm olarak belirledik. Ayrıca araştırmacılar çalışmamıza parelel olarak polen şeklinin sferoidal olarak belirlemişlerdir. İnceledikleri tüm *H. syriacus* polenlerinin dikensi çıkıntılara sahip olduğunu ve bu çıkıntı boyutlarının kendi aralarında önemli ölçüde farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Saensouk ve Saensouk'un (2021) Malvaceae alt familyası olan Malvoideae'ye ait çeşitli bitki polenlerinde yapmış oldukları çalışmada tez çalışmamıza benzer şekilde polen taneleri açıklığını pantoporat, radyal simetrik ve sferoidal olarak belirken farklı olarak poleritenin apolar özellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Ek olarak ekzin oyuntusunun granül, mikro ağsı ve supsilat olduğunu ifade etmişlerdir.

4. SONUÇLAR

Malvaceae (Ebegümecigiller) familyası, *Hibiscus* cinsine ait *Hibiscus syriacus* L. anterlerinin gelişimi, sitokimyasal içeriği ve gelişim sırasında anter dokularında gerçekleşen programlı hücre ölümü ışık ve floresan mikroskobu yöntemleri ile incelendi. H. *syriacus* anterleri çoğu angiosperm gibi 4 loblu, dıştan içe doğru epidermis, endotesyum, ara tabaka ve tapetum tabakalarından oluşur. Epidermis ve endotesyum gelişimin başından sonuna kadar varlığını sürdürür. Ayrıca epidermis dokusu diğer dokularla karşılaştırıldığında lipit ve polisakkarit bakımından zengin oldukça yoğun sitoplazmaya sahiptir. Polisakkarit içerikli endotesyum çeperleri gelişimin sonunda kalınlaşarak karakteristik U şeklini alır. Tapetum ve ara tabaka hücreleri genç polen evresinden itibaren körelme belirtileri gösterir ve olgun polen evresinde tamamen yok olur. Gelişimin sonunda anterler stomium noktalarından açılır ve olgun polen taneleri dışarıya salınır. Büyük sferoidal polen taneleri ekinat tip yüzey ornamentasyon özellikleri göstermektedir. Çalışmamızda uyguladığımız sitokimyasal boyamalar sonucunda epidermis haricinde endotesyum, ara tabaka ve tapetumun sitoplazmik içeriğinin polisakkarit lipit ve protein içermediğini göstermiştir. *H. syriacus*'a ait olgun polen tanelerinin polisakkaritçe zengin intin çeperi ve tozlaşmayla ilişkili ekinat süslemesi içeren protein ve lipitçe zengin ekzin çeperi bulunmaktadır.

DAPI boyama sonuçlarından elde edilen verilere göre gelişimin genç ve vakuollü polen evresinde ara tabaka ve tapetum hücrelerinde programlı hücre ölümünün gerçekleştiği görüldü. *H. syriacus* tohum ve çiçek gelişimi çalışmaları araştırılmış ancak bu çalışmaların günümüzde güncelliğini kaybettiği görülmüştür. Yapmış olduğumuz bu tez çalışması, bitkilerde görülen anter gelişim aşamaları ve bu aşamalarda görülen programlı hücre ölümü mekanizmalarının aydınlatılarak verimli polenlerin elde edilmesi açısından öneme sahiptir. Çalışmamızda elde edilen sonuçların anter gelişimi ve programlı hücre ölümüne ait çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Makale:

1. A comparative light and electron microscopy analysis of microspore and tapetum development in fertile and cytoplasmic male sterile radish. Protoplasma 241: 37–49.
2. Alarcón-Alonso J, Zamilpa A, Aguilar FA, Herrera- Ruiz M, Tortoriello J, Jimenez-Ferrer E. Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. J Ethnopharmacol 2012;139:751-6.
3. Altered tapetal PCD and pollen wall development in the Arabidopsis ms1 mutant. Journal of Experimental Botany 57: 2709–2717.
4. Annahwi, D., Ratnawati, R., & Budiwati, B. (2017). Flower and Fruit Development Phenology and Generative Reproduction Success of Hibiscus rosa-sinensis spp. *วารสาร วิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี มร ย.*, *2*(2), 19-30.
5. Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, Sato S, Kato T, Tabata S, Toriyama K. 2003. A novel male-sterile mutant of Arabidopsis thaliana, faceless pollen-1, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine. Plant Molecular Biology 53: 107–116.
6. Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, Sato S, Kato T, Tabata S, Toriyama K. 2005. The HKM gene, which is identical to the MS1 gene of Arabidopsis thaliana, is essential for primexine formation and exine pattern formation. Sexual Plant Reproduction 18: 1–7.
7. Ashley, T. (1975). Alterations in the Fine Structure of Developing Endosperm of Hibiscus Hybrids. *Caryologia*, *28*(1), 73-80.
8. Aytug, B., 1967. Pallinologic Researches in Polen Morphology and Important Gymnosperms of Turkey (In Turkish). İ.Ü. yay no: 1261, O.F. yay no: 114
9. B.S. Yun, I.K. Lee, I.J. Ryoo, I.D. Yoo, Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarino-lignans from *Hibiscus syriacus*, J. Nat. Prod. 64(9) (2001) 1238–40.
10. B.W. Hanny, R.D. Henson, A.C. Thompson, R.C. Gueldner, P.A. Hedin, Identification of carotenoid constituents in *Hibiscus syriacus,* J. Agric. Food Chem. 20 (1972) 914–916. Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Aragonès G, Rodríguez-Medina I, Rull A, Micol V, et al. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in *humans.*

Phytomedicine 2010;17:186-91.

11. Bae, S. H., Younis, A., Hwang, Y. J., & Lim, K. B. (2015). Various pollen morphology in Hibiscus syriacus. 화훼연구, 23(3), 125-130.
12. *Chang YC, Huang HP, Hsu JD, Yang SF, Wang CJ. Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. Toxicol Appl Pharmacol 2005;205:201-12.*
13. Chawla, M., Verma, V., Kapoor, M., & Kapoor, S. (2017). A novel application of periodic acid–Schiff (PAS) staining and fluorescence imaging for analysing tapetum and microspore development. Histochemistry and cell biology, 147(1), 103-110.
14. Cui, Y., Hu, C., Zhu, Y., Cheng, K., Li, X., Wei, Z., et al. (2018). CIK receptor kinases determine cell fate specification during early anther development in Arabidopsis. Plant Cell 30, 2383–2401. doi: 10.1105/tpc.17.00586
15. *Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I,* Heinrich M. *Hibiscus sabdariffa* L. - A phytochemical and pharmacological review. Food Chem 2014;165:424-43.
16. Davis, M. B. (1967). Pollen accumulation rates at Rogers Lake, Connecticut, during late-and postglacial time Learning Object; Video; Other of cyc.
17. De Halac, I. N., Fama, G., & Cismondi, I. A. (1992). Changes in lipids and polysaccharides during pollen ontogeny in Oenothera anthers. *Sexual Plant Reproduction*, *5*(2), 110-116.
18. Distribution of flavonoids among Malvaceae family members – A review Du CT, Francis FJ. Anthocyanins of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). J Food Sci 1973;38:810-2.
19. E.G. Maganha, R. da Costa Halmenschlager, R.M. Rosa, J.A.P. Henriques, A.L.L. de Paula Ramos, J. Saffi, Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*, Food Chem. 118 (2010) 1–10.
20. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR (1991) Mechanisms and functions of cell death. Annu Rev Cell Biol 7:663-698
21. Erdtman, G., (1952). Pollen morphology and plant taxonomy, Stockholm, Sweden: Almqvist & Wiksell, p. 557
22. Evans, D. E., Taylor, P. E., Singh, M. B., & Knox, R. B. (1992). The interrelationship between the accumulation of lipids, protein and the level of acyl carrier protein during the development of Brassica napus L. pollen. Planta, 186(3), 343-354.
23. Faegri, K. and Iversen, J. (1989) Textbook of Pollen Analysis, ed. K. Faegri, P. E.

Kaland and K. Krzywinski, 4th edn. Wiley, New York.

24. Falasca, G., D'Angeli, S., Biasi, R., Fattorini, L., Matteucci, M., Canini, A., & Altamura, M. M. (2013). Tapetum and middle layer control male fertility in Actinidia deliciosa. Annals of Botany, 112(6), 1045-1055.
25. Faraji, M. H., & Tarkhani, A. H. (1999). The effect of sour tea (Hibiscus sabdariffa) on essential hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*, *65*(3), 231-236.
26. Feder, N., O'Brien, T.P.: Plant microtechnique: Some principles and new methods. Am. J. Bot. 55, 123-142 (1968)
27. Gangrade, H., Mishra, S. H., & Kaushal, R. (1979). Antimicrobial activity of oil and unsaponifiable matter of red roselle. *Indian Drugs*.
28. Gill, G. W., Frost, J. K., & Miller, K. A. (1974). A new formula for a half-oxidized hematoxylin solution that neither overstains nor requires differentiation. *Acta cytologica*, *18*(4), 300-311.
29. Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., ... & Hara-Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. Science, 305(5685), 855-858.
30. Herranz-López M, Fernández-Arroyo S, Pérez- Sanchez A, Barrajón-Catalán E, Beltrán-Debón R, Menéndez JA, et al. Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: perspectives and implications. Phytomedicine 2012;19:253-61.
31. Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., Knox, R. B., & Howlett, B. (1973). Pollen-wall proteins:'gametophytic'and 'sporophytic'fractions in the pollen walls of the Malvaceae. Annals of Botany, 37(3), 403-412.
32. J.E. Yang, H.T.T. Ngo, E. Hwang, S.A. Seo, S.W. Park, T.H. Yi, Dietary enzymetreated *Hibiscus syriacus* L. protects skin against chronic UVB-induced photoaging via enhancement of skin hydration and collagen synthesis, Arch. Biochem. Biophys. 662 (2019) 190–200.
33. Jain, R., Arora, R., & Jain, S. C. (1997). Chemical Constituents And Bioactivity Studies Of Hibiscus Mucranthus Linn. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, *59*(2), 91.
34. Khafaga ER, Koch H, El Afry MM, Prinz D. Stage of maturity and quality of karkadeh (*Hibiscus sabdariffa* L. var. sabdariffa). 1. Organic acids. 2. Anthocyanins. 3. Mucilage, pectin and carbohydrates. 4. Improved drying and harvesting systems. Angew Bot 1980;54:287-318.
35. Kholkute, S. D., Mudgal, V., & Udupa, K. N. (1977). Studies on the antifertility

potentiality of Hibiscus rosa sinensis. *Planta Medica*, *31*(01), 35-39.

36. Kim, Y. H., Im, A., Park, B. K., Paek, S. H., Choi, G., Kim, Y. R., ... & Lee, M. Y. (2018). Antidepressant-like and neuroprotective effects of ethanol extract from the root bark of Hibiscus syriacus L. *BioMed research international*, *2018*.
37. Limei, Z., Suyun, A., & Ruiyang, Z. (2010). A cytological study on microsporogenesis of cytoplasmic male sterile lines in Kenaf Hibiscus cannabinus L.
38. Lin HH, Chan KC, Sheu JY, Hsuan SW, Wang CJ, Cheng JH. *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. Food Chem 2012;132:880-91.
39. Lin, W. L., Hsieh, Y. J., Chou, F. P., Wang, C. J., Cheng, M. T., & Tseng, T. H. (2003). Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. *Archives of Toxicology*, *77*(1), 42-47.
40. Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *36*(12), 2405-2419.
41. Mahmood Ibrahim, A., Binti Kayat, F., Ermiena Surya Mat Hussin, Z., Susanto, D., & Ariffulah, M. (2014). Determination of suitable microspore stage and callus induction from anthers of kenaf (Hibiscus cannabinus L.). *The Scientific World Journal*, *2014*.
42. Martinvalet, D., Zhu, P., & Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, *22*(3), 355-370.
43. Mepham RH, Lane GR (1969) Formation and development of the tapetal periplasmodium in Tradescantia bracteata. Protoplasma 68:175-192
44. Mirgorodskaya, O. E., Koteyeva, N. K., Volchanskaya, A. V., & Miroslavov, E. A. (2015). Pollen development in Rhododendron in relation to winter dormancy and bloom time. Protoplasma, 252(5), 1313-1323.
45. Mizuno, S., Osakabe, Y., Maruyama, K., Ito, T., Osakabe, K., Sato, T., et al. (2007). Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in Arabidopsis thaliana. Plant J. Cell Mol. Biol. 50, 751–766. doi: 10.1111/j.1365-313x.2007.03083.x
46. Oppenheim, R.W., Flavell, R.A., Vinsant, S., Prevette, D., Kuan, C.Y. and Rakic, P., 2001. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 21(13), 4752-4760.

47. Özdogan, F. P., Orhan, N., & Ergun, F. (2011). Studies on the conformity of Hibiscus sabdariffa L. samples from Turkish market to European pharmacopeia. *Fabad J Pharm Sci*, *36*, 25-32.
48. Papini, A., Mosti, S., and Brighigna, L. 1999. Programmed cell death events during tapetum development of angiosperms. Protoplasma, 207 (3-4): 213221. doi:10.1007/BF01283002.
49. Parmar, N. S., & Ghosh, M. N. (1978). Anti-inflammatory activity of gossypin of bioflavonoid isolated from Hibiscus vitifolius Linn. *Indian Journal of Pharmacology*, *10*(4), 277.
50. Pearse, A. G. E. 1961. Histochemistry Theoretical and Applied. 2d ed. Little, Brown & Co., Boston. 998 p.
51. Pennell RI, Lamb C (1997) Programmed cell death in plants. Plant Cell 9:1157-1168
52. Poon, I. K., Lucas, C. D., Rossi, A. G., & Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, *14*(3), 166-180.
53. R.J. Hsu, Y.C. Hsu, S.P. Chen, C.L. Fu, J.C. Yu, F.W. Chang, Y.H. Chen, J.M. Liu, J. Y. Ho, C.P. Yu, The triterpenoids of *Hibiscus syriacus* induce apoptosis and inhibit cell migration in breast cancer cells, BMC Complement. Altern. Med. 15 (2015) 65.
54. Ramirez-Rodrigues MM, Plaza ML, Azeredo A, Balaban MO, Marshall MR. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. J Food Sci 2011;76:C428-35.
55. Rao PR, Seshadri TR. Constitution of hibiscitrin. Proc Indian Acad Sci 1948;27:104-10.
56. Ravi, H., Prabhu, B., Somashekhar, G., Paramanna, N., Raghavendra, K., Shekhar, A., & Basavaraj, A. (2000). Significance of unusual features of the anthers of Spathoglottis plicata Bl. Cytologia, 65(2), 103-112.
57. Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus sabdariffa L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *102*, 575-586.
58. Sachdewa, A., & Khemani, L. D. (2003). Effect of Hibiscus rosa sinensis Linn. ethanol flower extract on blood glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *89*(1), 61-66.
59. SAENSOUK, S., & SAENSOUK, P. (2021). Pollen morphology of subfamily Malvoideae (Malvaceae sensu lato) in Thailand. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 22(12).

60. SAIFUDIN, S., & SALAMAH, A. (2019). Phenotypic plasticity in the ovarium of crested flower of Hibiscus rosa-sinensis. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *20*(5).
61. Salah AM, Gathumbi J, Vierling W. Inhibition of intestinal motility by methanol extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) in rats. Phytother Res 2002;16:283-5.
62. Salamah, A. (2021). Variations in the morphology of Hibiscus rosa-sinensis crested peach flowers in nature. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1725, No. 1, p. 012039). IOP Publishing.
63. Salem, M. Z., Olivares-Pérez, J., & Salem, A. Z. M. (2014). Studies on biological activities and phytochemicals composition of Hibiscus species-A review. *Life Science Journal*, *11*(5), 1-8.
64. Sanders EL Wride MA (1995) Programmed cell death in development. Int Rev Cytol 163:105-173
65. Sanyal, P. (1958). Embryological Investigation in Hibiscus sabdariffa× H. cannabinus and their Reciprocal Crosses. *Nature*, *181*(4619), 1352-1352.
66. Schweizer, D. (1976). DAPI fluorescence of plant chromosomes prestained with actinomycin D. *Experimental cell research*, *102*(2), 408-413.
67. Shaheen, N., Khan, M. A., Hayat, M. Q., & Yasmin, G. (2009). Pollen morphology of 14 species of Abutilon and Hibiscus of the family Malvaceae (sensu stricto). *Journal of Medicinal Plants Research*, *3*(11), 921-929.
68. Shi, S., Ding, D., Mei, S., & Wang, J. (2010). A comparative light and electron microscopic analysis of microspore and tapetum development in fertile and cytoplasmic male sterile radish. *Protoplasma*, *241*(1), 37-49.
69. Solís, M. T., Chakrabarti, N., Corredor, E., Cortés-Eslava, J., Rodríguez-Serrano, M., Biggiogera, M., ... & Testillano, P. S. (2014). Epigenetic changes accompany developmental programmed cell death in tapetum cells. Plant and Cell Physiology, 55(1), 16-29.
70. Solís, M. T., Chakrabarti, N., Corredor, E., Cortés-Eslava, J., Rodríguez-Serrano, M., Biggiogera, M., ... & Testillano, P. S. (2014). Epigenetic changes accompany developmental programmed cell death in tapetum cells. *Plant and Cell Physiology*, *55*(1), 16-29.
71. Subramanian SS, Nair AG. Flavonoids of four Malvaceous plants. Phytochem 1972;11:1518-9.
72. Sutthinon, P., Samuels, L., & Meesawat, U. (2018). Male functionality in Garcinia

celebica L., a candidate ancestor species of mangosteen (G. mangostana L.). Botany, 96(10), 685-693

73. Sylvere Sie, R., Charles, G., Sakhanokho, H. F., Toueix, Y., Dje, Y., Sangaré, A., & Branchard, M. (2010). Protocols for Callus and Somatic Embryo Initiation for'Hibiscus sabdariffa'L.(Malvaceae): Influence of Explant Type, Sugar, and Plant Growth Regulators. *Australian Journal of Crop Science*, *4*(2), 98-106.
74. Takahashi, M., & Kouchi, J. (1988). Ontogenetic development of spinous exine in Hibiscus syriacus (Malvaceae). *American Journal of Botany*, *75*(10), 1549-1558.
75. Tapec, C. A. D., Deepo, D. M., Islam, M., Cho, W. Y., Kim, H. Y., & Lim, K. B. (2021). Embryo development of woody and perennial Hibiscus species. *Scientia Horticulturae*, *275*, 109698.
76. Tarnowski, B. I., Spinale, F. G., & Nicholson, J. H. (1991). DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. Biotechnic & histochemistry, 66(6), 296-302.
77. Trivellini, A., Cocetta, G., Hunter, D. A., Vernieri, P., & Ferrante, A. (2016). Spatial and temporal transcriptome changes occurring during flower opening and senescence of the ephemeral hibiscus flower, Hibiscus rosa-sinensis. *Journal of experimental botany*, *67*(20), 5919-5931.
78. Trivellini, A., Ferrante, A., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., & Serra, G. (2011). Effects of Promoters and Inhibitors of Ethylene and ABA on Flower Senescence of Hibiscus rosa-sinensis L. *Journal of Plant Growth Regulation*, *30*(2), 175-184.
79. Usoh, I. F., Akpan, E. J., Etim, E. O., & Farombi, E. O. (2005). Antioxidant actions of dried flower extracts of Hibiscus sabdariffa L. on sodium arsenite-induced oxidative stress in rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, *4*(3), 135-141.
80. van der Linde, K., & Walbot, V. (2019). Pre-meiotic anther development. Current topics in developmental biology, 131, 239-256.
81. van der Linde, K., & Walbot, V. (2019). Pre-meiotic anther development. *Current topics in developmental biology*, *131*, 239-256.
82. Vardar, F., & Unal, M. (2011). Cytochemical and ultrastructural observations of anthers and pollen grains in Lathyrus undulatus Boiss. *Acta Botanica Croatica*, *70*(1), 53-64.
83. Vardar, F., & Ünal, M. (2012). Ultrastructural aspects and programmed cell death in the tapetal cells of Lathyrus undulatus Boiss. *Acta Biologica Hungarica*, *63*(1), 52-66.
84. Vasudeva N, Sharma SK. Biologically active compounds from the Genus *Hibiscus*.

Pharm Biol 2008;46:145-53.

85. W.K. Whang, K.H. Lee, S.E. Oh, M.Y. Lee, Antidepressant-like and neuroprotective effects of ethanol extract from the root bark of *Hibiscus syriacus* L, Biomed. Res. Int. 2018 (2018) 7383869.
86. WODEHOUSE, R. P., 1959: Pollen graine. McGraw-Hill, New York.
87. Wu, Y., Min, L., Wu, Z., Yang, L., Zhu, L., Yang, X., ... & Zhang, X. (2015). Defective pollen wall contributes to male sterility in the male sterile line 1355A of cotton. Scientific reports, 5(1), 1-8.
88. Xie, C. T., Yang, Y. H., Qiu, Y. L., Zhu, X. Y., & Tian, H. Q. (2005). Cytochemical investigation of genic male-sterility in Chinese cabbage. *Sexual plant reproduction*, *18*(2), 75-80.
89. Xue, J. S., Yao, C., Xu, Q. L., Sui, C. X., Jia, X. L., Hu, W. J., ... & Yang, Z. N. (2021). Development of the middle layer in the anther of Arabidopsis. Frontiers in Plant Science, 12, 52.
90. Y.H. Kim, A.R. Im, B.K. Park, S.H. Paek, G. Choi, Y.R. Kim, Vizcay-Barrena, G., & Wilson, Z. A. (2006). Altered tapetal PCD and pollen wall development in the Arabidopsis ms1 mutant. Journal of Experimental Botany, 57(11), 2709-2717.
91. Yamamoto R, Osima Y. On the Colouring Matter of *Hibiscus sabdariffa* L. (Hiviscin) II. Vol. 30. Tokyo: The Institute of Physical and Chemical Research; 1936.
92. YANIK, F., GENÇ, A. Ç. & VARDAR, F., (2018). Bitkilerde programlı hücre ölümü. Marmara Fen Bilimleri Dergisi, 30(1), 61-70.
93. Yun, Z., & Huiqiao, T. (2015). The distribution features of polysaccharides and lipids in the development of tomato anthers. Horticultural Plant Journal, 1(1), 35-40.

Kitap:

1. Hatsugai, N., & Hara-Nishimura, I. (2018). Measurement of the caspase-1-like activity of vacuolar processing enzyme in plants. In Plant Programmed Cell Death (pp. 163-171). Humana Press, New York, NY.
2. Ünal, M. ve Çetinbaş-Genç, A: Bitki (Angiosperm) Embriyolojisi, Nobel Yayınları, (2021).
3. Parrotta, J. A. (2001). Healing plants of peninsular India. CABI publishing.

Elektronik Yayınlar:

1. freehighschoolscience.‘*Hibiscus* Flower Dissection’.Erişim:15 Mayıs .2022. https://freehighschoolscience.wordpress.com/2019/02/25/hibiscus-flower/.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Bahar Doğan

Uyruk: T.C.

Öğrenim Durumu

Derece	**Bölüm/Program**	**Üniversite/Lise**	**Giriş Yılı**	**Mezuniyet Yılı**
Lise	Sayısal	Özel Birikim Koleji	2010	2014
Üniversite	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2014	2018

Kongre/Sempozyum

DOĞAN, B. & VARDAR, F., (2022). Anther Development and Cytochemistry in *Hibiscus syriacus* L. (Rose of sharon). 1st International Symposium of Biodiversity Studies, May 22-25, Online (Sözlü sunum).