



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



BİBERDE REJENERASYON VE NA-H ANTİPORTIR VE İZOPENTENİL TRANSFERAZ GENLERİNİN AKTARILMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Doktora Tezi

Tolga İZGÜ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BİBERDE REJENERASYON VE NA-H ANTİPORTIR
VE İZOPENTENİL TRANSFERAZ GENLERİNİN
AKTARILMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Tolga İZGÜ

Danışmanlar :
Prof. Dr. Hülya İLBİ
Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Bahçe Bitkileri Doktora Programı

İzmir
2019

Tolga İZGÜ tarafından doktora tezi olarak sunulan “**Biberde Rejenerasyon ve Na-H Antiportır ve İzopentenil Transferaz Genlerinin Aktarılması Üzerine Araştırmalar**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10/09/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Hülya İLBİ



Raportör Üye : Doç. Dr. Birsen ÇAKIR AYDEMİR



Üye : Prof. Dr. Burçin ÇOKUYSAL



Üye : Prof. Dr. Yıldız KAÇAR



Üye : Doç. Dr. İlknur SOLMAZ



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Biberde Rejenerasyon ve Na-H Antiportör ve İzopentenil Transferaz Genlerinin Aktarılması Üzerine Araştırmalar**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10/09/2019

Tolga İZGÜ

ÖZET**BİBERDE REJENERASYON VE NA-H ANTİPORTIR VE
İZOPENTENİL TRANSFERAZ GENLERİNİN AKTARILMASI
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

İZGÜ, Tolga

Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya İLBİ

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Neslihan Yeşim YALÇIN MENDİ

Eylül 2019, 155 sayfa

Bu tez çalışmasında, dört farklı biber hattına (sivri, çarliston, kapyra ve dolma) *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla kuraklığa ve tuzluluğa tolerans sağlayan *PSARKIPT* ve *AtNHX1* genlerinin aktararak, transformasyon ve rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada, biber hatlarının rejenerasyon ve transformasyon protokolleri geliştirilmiştir. Rejenerasyon denemelerinde somatik embriyogenesis ve organogenesis için farklı protokoller araştırılmıştır. En iyi bitki rejenerasyonları, BA ve IAA'nın farklı kombinasyonlarında, organogenesis denemelerinde elde edilmiştir. En yüksek sürgün gelişimleri ise sivri biberin hipokotil eksplantından %80 oranında 4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA'da, çarliston biberin hipokotil eksplantından %80 oranında 3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA'da, kapyra biberin hipokotil eksplantından %80 oranında 5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA'da ve dolma biberin hipokotil eksplantından %84 oranında 5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA'da belirlenmiştir. Geliştirilen sürgünler köklendirilmiş ve bitkicikler elde edilmiştir.

Transformasyon denemelerinde toplam 3857 eksplanttan 119 sürgün gelişirken, bunların 87 adedi PCR'da pozitif sonuç vermiştir. Transformasyon frekansları ise *AtNHX1* geni için kapyra biberde %2.44, çarliston biberde %2.53, sivri biberde %2.92 ve dolma biberde %1.18 iken, *PSARKIPT* için ise kapyra biberde %1.73, çarliston biberde %3.74, sivri biberde %2.30 ve dolma biber için ise %1.34 olarak belirlenmiştir. PCR ile doğrulaması yapılan aday transgenik biber

hatlarının mikroçoğaltımları gerçekleştirilmiştir. *AtNHX1*'li transgenik biber hatlarının mikroğaltım oranları, %81-87 arasında değişirken *PSARKIPT*'li aday transgenik hatlar ise %80-84 arasında değişim göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Capsicum annuum* L., transgenik, *Agrobacterium tumefaciens*, genetik transformasyon, rejenerasyon



ABSTRACT**REGENERATION AND TRANSFORMATION OF PEPPER
PLANTS WITH NA-H ANTIporter AND ISOPENTENYL
TRANSFERASE GENES**

İZGÜ, Tolga

PhD in Horticulture Sciences

Supervisor: Prof. Hülya İLBİ

Co-Supervisor: Prof. Neslihan Yeşim YALÇIN MENDİ

September 2019, 155 pages

In this thesis, transformation of *PSARKIPT* and *AtNHX1* genes causing tolerance to drought and salinity by *Agrobacterium tumefaciens* to four different lines of pepper (Green, banana, capia and bell) was aimed.

In the present study, regeneration and transformation protocols of pepper lines were developed. Different protocols for somatic embryogenesis and organogenesis were investigated in regeneration experiments. Optimum plant regeneration was obtained in different combinations of BA and IAA in organogenesis assays. The highest shoot development was determined as 80% from hypocotyl explant of green pepper in 4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, 80% from hypocotyl explant of banana pepper in 3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, 80% from hypocotyl explant of capia pepper in 5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA and 84% from hypocotyl explant of bell pepper in 5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA. Then, shoots were rooted and a complete plant forms were obtained.

In the transformation experiments, 119 shoots were developed from 3857 explants and 87 of them were produced positive results in PCR analysis. The transformation frequencies for the *AtNHX1* gene as 2.44% for capia pepper, 2.53% for banana pepper, 2.92% for green pepper and 1.18% for bell pepper while *PSARKIPT* gene as 1.73% for capia pepper, 3.74% for banana pepper, 2.30% for green pepper and 1.34% for bell pepper were determined. Micropropagation of the putative transgenic pepper lines confirmed by PCR was performed. While the

micropropagation rates of the *AtNHX1* putative transgenic pepper lines ranged from 81-87%, the putative transgenic lines with *PSARKIPT* ranged from 80-84%.

Keywords: *Capsicum annuum* L., transgenic, *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation, regeneration



ÖNSÖZ

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince bitki biyoteknolojisi alanına odaklanmak ve bu alanda kendimi geliştirmek en büyük hedeflerimden birisiydi. Teknolojinin ve diğer yeniliklerin hızla geliştiği biyoteknoloji konusunda çalışma ve bunları yakından takip edebilme fırsatıyla tanıştım. Bu alanda birçok projede görev olarak tecrübe ve bilgi birikimimi arttırmaya çalıştım. Hem yurtiçi hem de yurt dışında katıldığım konferans, eğitim ve araştırma programlarında birbirinden değerli bilim insanlarını tanıyarak onların tecrübelerinden faydalandım. Tez sürecimin gelişmesi ve olgunlaşması safhasında değerli hocalarımdan katkısı yadsınmaz. Eş danışman hocamın Kaliforniya Üniversitesi ziyareti ile kurduğu işbirliği neticesinde temin ettiği *Agrobacterium* ırkları tez çalışmamın başlangıcı niteliğindedir. Daha sonra belirlediğimiz bitkisel metaryaller ile bu yolculuk devam etti. Genetik mühendisliği konusunda kendimi daha ileri düzeyde geliştirmek için TÜBİTAK-BİDEB bursu ile Kaliforniya Üniversitesi/ABD’de bir yıl süresince tez çalışmamın belli bir kısmını çalışma şansını yakaladım. Ayrıca oradaki projelerde de görev almam bana önemli ölçüde bilgi ve tecrübe kazandırdı.

Dünyada her geçen gün artan kuraklık ve tuzluluk gibi faktörler nedeniyle tarım alanların büyük kayıplar gerçekleşmektedir. Günümüzde biyoteknolojik çalışmalarının önemi daha belirgin şekilde görülmektedir. Bu nedenle genetik mühendisliği ve abiyotik stres mekanizmasının araştırılması ile yeni tolerant/dayanıklı ürünlerin geliştirilmesi sayesinde ülkemize transgenik teknolojisinin tanıtılmasının önem arz ettiği düşüncesindeyim. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının bu alanda çalışan diğer araştırmacılar için iyi bir kaynak olacağı kanaatini taşımaktayım.

İzmir
10/09/2019

Tolga İZGÜ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Biber Genel Bilgi.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	13
2.1 Biberde Doku Kültürü Çalışmaları.....	13
2.2 Biberde Gen Aktarım Çalışmaları.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Bitkisel Materyaller.....	34
3.2 <i>In vitro</i> Rejenerasyon Denemeleri.....	35
3.2.1 Bitkisel materyallerin hazırlanması.....	35
3.2.2 Somatik embriyogenesis denemeleri.....	37
3.2.3 Organogenesis denemeleri.....	38
3.2.4 Transformasyon çalışmaları.....	40

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.5 Moleküler analizler.....	47
3.2.6 Aday transgenik biber hatlarının mikroçoğaltımı	50
3.2.7 İstatistik analizler.....	50
4. BULGULAR.....	52
4.1 <i>In vitro</i> Rejenerasyon Bulguları.....	52
4.1.1 Somatik embriyogenesis ve kallus oluşum bulguları	52
4.1.2 Organogenesis denemeleri ile kallus ve sürgün oluşum bulguları.....	66
4.1.3 Transformasyon denemeleri için belirlenmiş optimum rejenerasyon ortam bulguları.....	100
4.2 Biber Hatlarında Transformasyon Bulguları.....	102
4.3 Moleküler Analiz Bulguları.....	104
4.3.1 DNA izolasyon bulguları.....	104
4.3.2 <i>AtNHX1</i> geni PCR Bulguları.....	105
4.3.3 <i>PSARKIPT</i> geni PCR bulguları.....	109
4.4 Aday Transgenik Biber Hatlarının Mikroçoğaltım Bulguları.....	113
4.4.1 Aday Transgenik (<i>AtNHX1</i> ve <i>PSARKIPT</i>) biber hatlarının mikroçoğaltım bulguları.....	114
5. TARTIŞMA.....	116
5.1 Biber Hatlarında Rejenerasyon Denemeleri.....	116
5.1.1 Somatik embriyogenesis denemeleri.....	116
5.1.2 Organogenesis denemeleri.....	120
5.1.3 Transformasyon öncesi mikroçoğaltım denemeleri.....	124

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

5.2 Transformasyon Denemeleri.....	125
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	128
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	131
TEŞEKKÜR.....	153
ÖZGEÇMİŞ.....	155
EKLER.....	
Ek 1 pH7m24GW-35S: <i>AtNHX1</i> plazmid sekansı.....	
Ek 2 pCAMBIA-SARK: <i>IPT</i> plazmid sekansı.....	
Ek 3 <i>NHX1</i> Primerler (Sarı: forward primer, Yeşil: reverse primer).....	
Ek 4 <i>IPT</i> primerler (Sarı: forward primer, Yeşil: reverse primer).....	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Biberde biyoteknolojik yöntemler kullanılarak geliştirilebilecek özellikler.....	8
3.1 Tez çalışmasında kullanılan biber hatlarına ait meyveler, A) Sivri biber, B) Çarliston biber, C) Kapyra biber, D) Dolma biber.....	34
3.2 Biber tohumlarının yüzey sterilizasyon aşamaları, A) %70'lik etil alkol ve sodyum hipoklorit uygulamaları sonrası steril saf suda yıkama, B, C, D) Tohumların filtre kağıdından çıkarılması ve fazla suyun emdirilmesi, E ve F) Tohumların çimlendirme ortamına transferi.....	35
3.3 Biber tohumlarının MS besin ortamında çimlenmesi, A) Kök yapılarının oluşumu, B, C) Çimlenmiş fideler, D, E) Kotiledon ve hipokotil eksplantlar.....	36
3.4 <i>In vitro</i> denemelerde kullanılan eksplant tipleri, A) Kotiledon eksplant, B) Hipokotil eksplant.....	37
3.5 <i>A. tumefaciens</i> 'deki <i>PSARKIPT</i> plazmid yapısı.....	41
3.6 <i>A. tumefaciens</i> 'deki <i>AtNHX1</i> plazmid yapısı.....	42
3.7 Transformasyonun aşamaları, A) LB ortamında çoğaltımı gerçekleştirilmiş <i>Agrobacterium</i> ırkları, B, C) Kotiledon ve hipokotil eksplantların hazırlanması ve <i>Agrobacterium</i> solüsyonu ile inkübasyonu, D, E) Transformasyon uygulaması yapılmış kotiledon ve hipokotil eksplantlarının BBD içermeyen MS besin ortamlarına transferi.....	44
3.8 Transformasyon işlemi gerçekleştirilmiş biber hatları, A) Ön kültür uygulamaları (3 gün karanlıkta) B ve C) Steril saf su ile yıkama işleminin ardından steril kaba filtre kağıdında eksplantların fazla suyunun emdirilmesi ve antibiyotik içeren besin ortamlarına transferi.....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.9 Transformasyon sonrası eksplantların hazırlanması, A, B ve C) Transformasyon sonrası eksplantların steril saf su ile yıkanarak fazla bakteri solüsyonunun uzaklaştırılması.....	45
4.1 Büyükalaca ve Mavituna (1996)'nın geliştirdiği protokole göre elde edilen embriyojenik kallus yapıları, A, B, C ve E) Kotiledon eksplantlardan gelişen kompakt kallus yapıları, D ve F) Kallus yapılarında gelişen embriyojenik yapılar (Okla gösterilen, erken globüler safha).....	56
4.2 Büyükalaca ve Mavituna (1996)'nın geliştirdiği protokole göre elde edilen embriyojenik kallus yapıları, A, B ve C) Hipokotil ekspanlarda gelişen erken globüler safha	56
4.3 Sivri biber hattında hipokotil eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A, B ve C) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, D, E ve F) Embriyo gelişim ortamında kallusların stereo mikroskop altında görünimleri (Erken globüler safha-E ve erken kalp safhası-F).....	57
4.4 Sivri biberde kotiledon eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları (Yayma şeklinde ortama transfer edilen kalluslar), B ve C) Kallus yapılarından mersitematik erken yapıların oluşması, D, E ve F) Embriyo gelişim ortamında kallusların stereo mikroskop altında görünimleri (Erken globüler safha-E ve erken kalp safhası-F).....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.5 Çarliston biber hattında hipokotil eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A ve B) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, C, D, E ve F) Kallus yapılarından ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü ve embriyo geliştirme ortamına transferi..... 58
- 4.6 Çarliston biber hattında kotiledon eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A, B ve C) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, D, E ve F) Kallus yapılarının ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü (30. gün) ve embriyo geliştirme ortamına transferi..... 58
- 4.7 Kapy biber hattında hipokotil eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri (Büyükalaca ve Mavituna, 1996), A ve B) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, C, D, E ve F) Kallus yapılarının ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü (30. gün) ve embriyo geliştirme ortamına transferi (kahverengi bölgelerde meristematik hücrelerin gelişimi bu tipte yoğun olarak gözlenmesine rağmen henüz embriyo aşamaları gözlenmemiştir.)..... 59
- 4.8 Kapy biber hattında kotiledon eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri (Büyükalaca ve Mavituna, 1996), A ve B) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, C, D, E ve F) Kallus yapılarının ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü (30. gün) ve embriyo geliştirme ortamına transferi (kahverengi bölgelerde meristematik hücrelerin gelişimi bu tipte yoğun olarak gözlenmesine rağmen embriyo aşamaları gözlenmemiştir.)..... 59

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.9 Dolma biber hattında hipokotil eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A ve B) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, C, D, E ve F) Kallus yapılarının ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü (30. gün) ve embriyo geliştirme ortamına transferi (kahverengi bölgelerde meristematik hücrelerin gelişimi gözlenerek erken globüler yapıların oluşumu tespit edilmiştir.)..... 60
- 4.10 Dolma biber hattında kotiledon eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, C, D, E ve F) Kallus yapılarının ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü (30. gün) ve embriyo geliştirme ortamına transferi (kahverengi bölgelerde meristematik hücrelerin gelişimi gözlenerek erken globüler yapıların oluşumu tespit edilmemiştir.)..... 61
- 4.11 Dört farklı biber hattından elde edilen kallus hücrelerinin ışık mikroskopunda incelenmesi, A ve B) Sivri, çarliston, kapyra ve dolma biber eksplantlarından alınan kallus örnekleri, C) Sivri biber hattından gelişen kallus hücreleri (Yuvarlak ve oval yapıda kallus hücreleri), D) Çarliston biber hattından gelişen yuvarlak yapıdaki kallus hücresi, E) Dolma biber hattından gelişen uzamış kallus hücreleri, F) Kapyra biber hattından gelişen ve farklılaşmaya başlayan oval yapıdaki kallus hücre kümesi..... 65
- 4.12 Kallus hücrelerinin ışık mikroskobu altında genel görünümü (40X büyütme), A) Kapyra biber (Yuvarlak ve oval yapıda kallus hücreleri), B) Dolma biber (Uzamış kallus hücreleri), C) Sivri biber, D) Çarliston biber (Uzamış ve yuvarlak kallus hücreleri)..... 65
- 4.13 2 mg/l 2,4-D+1 mg/l TDZ içeren besin ortamında kotiledon eksplantlarda sürgün benzeri yapıların oluşumu (3. hafta)..... 67

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.14 Sivri biber hattının hipokotil eksplantlarından sürgün yapılarının gelişimi (4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, 15. gün).....	81
4.15 Charleston biber hattının hipokotil eksplantında sürgün gelişimi (3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, 18. gün).....	84
4.16 Kapy biber hatlarında sürgün oluşumları, A) Kotiledon eksplantlardan sürgün yapılarının gelişimi (2 mg/l BA+1 mg/l IAA, 20. gün), B) Hipokotil eksplantlardan sürgün yapılarının gelişimi (5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, 15. gün).....	86
4.17 Dolma biber hattında hipokotil eksplantlardan sürgünlerin gelişimi (5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, 20. gün).....	89
4.18 Sanatombi and Sharma (2008)'nin geliştirdiği protokole göre eksplantların gelişimi, A, B, C ve D) Hipokotil eksplantlardan sürgün benzeri yapıların gelişimi, E ve F) Kotiledon eksplantlarında abnormal yapıların gelişimi.....	92
4.19 Sanatombi and Sharma (2008)'nin geliştirdiği protokolde eksplantların gelişimi, A ve B) Kotiledon eksplantlarda kallus gelişimi ve eksplantların kararması, C) Hipokotil eksplantlarda kararma.....	93
4.20 Sanatombi and Sharma (2008)'nin protokolünde oluşan sürgün benzeri yapılar.....	97
4.21 Mikroçoğaltımları gerçekleştirilen ve köklendirilen biber bitkicikleri.....	101
4.22 Transformasyon sonrası kapy biberin hipokotil eksplantlarında sürgün gelişimi.....	103
4.23 Transformasyon sonrası sivri biberin hipokotil eksplantlarında sürgün gelişimi.....	104
4.24 Transformasyon sonrası charliston biberin hipokotil eksplantlarında sürgün gelişimi.....	104
4.25 Transformasyon sonrası dolma biberin hipokotil eksplantlarında sürgün gelişimi.....	104

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.26 <i>AtNHX1</i> gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	105
4.27 CaMV 35S promotor gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	105
4.28 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	106
4.29 <i>AtNHX1</i> gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	106
4.30 CaMV 35S promotor gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	106
4.31 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	107
4.32 <i>AtNHX1</i> gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	107
4.33 CaMV 35S promotor gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	107
4.34 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	108
4.35 <i>AtNHX1</i> gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	108
4.36 CaMV 35S promotor gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	109
4.37 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	109
4.38 <i>PSARKIPT</i> gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	110
4.39 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	110
4.40 SARK promotor bölgesine ait jel görüntüsü.....	110
4.41 <i>PSARKIPT</i> gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	111
4.42 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	111
4.43 SARK promotor bölgesine ait jel görüntüsü.....	111
4.44 <i>PSARKIPT</i> gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	112
4.45 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	112
4.46 SARK promotor bölgesine ait jel görüntüsü.....	112
4.47 <i>PSARKIPT</i> gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	113
4.48 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü.....	113

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.49 SARK promotor bölgesine ait jel görüntüsü.....	113
4.50 Aday transgenik biber hatlarının mikroçoğaltımı.....	115



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Dünyada biber üretimi.....	2
1.2 Ülkemizde biber üretimi verileri.....	3
2.1 Bazı biber türlerinde yapılmış rejenerasyon çalışmaları.....	25
2.2 Bazı biber türlerinde yapılmış transformasyon çalışmaları.....	28
3.1 MS bazal besi yerinde bulunan makro-mikro, diğer maddeler ve konsantrasyonları.....	36
3.2 Somatik embriyogenesis denemelerinde kullanılan protokoller ve içerikleri.....	38
3.3 Organogenesis üçüncü denemelerinde kullanılan ortamların içerikleri.....	40
3.4 LB besin ortamı içeriği ve antibiyotik dozları.....	43
3.5 Sivri biber hattında transformasyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiş en iyi rejenerasyon ortamları ve içerikleri.....	45
3.6 Kapya biber hattında transformasyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiş en iyi rejenerasyon ortamları ve içerikleri.....	46
3.7 Charlston biber hattında transformasyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiş en iyi rejenerasyon ortamları ve içerikleri.....	46
3.8 Dolma biber hattında transformasyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiş en iyi rejenerasyon ortamları ve içerikleri.....	46
3.9 DNA izolasyon yönteminde kullanılan tampon çözeltisinin içeriği..	47
3.10 PCR döngü koşulları; (35 döngü).....	49
3.11 PCR analizinde kullanılan primer setleri.....	49
3.12 PCR reaksiyonlarında uygulanan protokol.....	49
3.13 Transgenik hatların mikroçoğaltımında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 Sivri biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus oluşum oranları.....	53
4.2 Çarliston biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus oluşum oranları.....	53
4.3 Kapyra biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus oluşum oranları.....	54
4.4 Dolma biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus oluşum oranları.....	54
4.5 Somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları.....	55
4.6 Sivri biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda embriyo oluşum oranları.....	62
4.7 Çarliston biberde Somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda embriyo oluşum oranları.....	62
4.8 Kapyra biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda embriyo oluşum oranları.....	63
4.9 Dolma biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda embriyo oluşum oranları.....	63
4.10 Somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda embriyo gelişim oranları.....	64
4.11 Sivri biber birinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişim oranları.....	67
4.12 Sivri biber birinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları.....	69
4.13 Çarliston biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları.....	70
4.14 Çarliston biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişim oranları.....	72

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.15 Kapy a biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda kapy a biberde sürgün gelişim oranları.....	74
4.16 Kapy a biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları.....	76
4.17 Dolma biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişim oranları.....	78
4.18 Dolma biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları.....	80
4.19 Sivri biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi.....	82
4.20 Sivri biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi.....	83
4.21 Çarliston biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi.....	84
4.22 Çarliston biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi.....	85
4.23 Kapy a biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi.....	87
4.24 Kapy a biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi.....	88
4.25 Dolma biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişim oranları.....	89
4.26 Dolma biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları.....	90
4.27 Sivri biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.28 Üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda biber hatlarında sürgün gelişimi.....	92
4.29 Sivri biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi.....	93
4.30 Üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda biber hatlarında kallus gelişimi.....	94
4.31 Çarliston biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi.....	95
4.32 Çarliston biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi.....	96
4.33 Kapyra biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi.....	97
4.34 Kapyra biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi.....	98
4.35 Dolma biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi.....	99
4.36 Dolma biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi.....	100
4.37 Transformasyon denemelerinde kullanılan en iyi rejenerasyon ortamları.....	100
4.38 Biber hatlarının mikroçoğaltım oranları.....	101
4.39 Biber hatlarında transgenik sürgün oluşumu ve transformasyon frekansı.....	103
4.40 <i>AtNHX1</i> biber hatlarının mikroçoğaltımı.....	114
4.41 <i>PSARKIPT</i> biber hatlarının mikroçoğaltım oranları.....	115

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
μL	Mikrolitre
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
Ca	Kalsiyum
Cl	Klor
cm	Santimetre
CO ₂	Karbon dioksit
dk	Dakika
g	Gram
GA ₃	Giberellik Asit
H	Hidrojen
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
ha	Hektar
HCl	Hidroklorik Asit
K	Potasyum
km	Kilometre
KNO ₃	Potasyum Nitrat
l	Litre
mg	Miligram
mM	Milimolar
MPa	Mega Pascal

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

Simgeler	Açıklama
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NO	Nitrik Oksit
O ⁻²	Süperoksit
P	Fosfat
rpm	Revolutions Per Minute (Dakikada dönme sayısı)
μM	Mikromolar
ABA	Absisik Asit
ALS	Asetolaktat Sentaz
AP	Askorbat Peroksidaz
AtNHX1	Arabidopsis thaliana Na-H antiportır-1
BAP	6-Benzilaminopürin
CaCS	<i>Capsicum</i> 'un capsaicinoid sentetazını kodlayan bölge
CIT	Callus Induced Transformation (Kallus Kaynaklı Transformasyon)
Cor	Soğuğa duyarlı
CTAB	Setrimonyum Bromür
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
bç	Baz çifti

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein (Yeşil Floresan Proteini)
GR	Glutatyon Redüktaz
IAA	İndol Asetik Asit
IBA	İndol Bütirik Asit
IPT	Isopentenyl transferase (İzopentenil transferaz)
KAT	Katalaz
KIN	Soğukla İndüklenen
L.	Linnaeus
LB	Luria Bertani
LSD	Least Significant Difference (En Önemsiz Fark)
MDA	Malondialdehit
MES	Metasülfonik Asit
MS	Murashige ve Skoog Besin Ortamı
NAA	Naftalen Asidik Asit
PAA	Fenil Asetik Asit
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction (Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
RD	Resistant to Dehydration (Dehidrasyona duyarlı)
RNA	Ribonükleik Asit
SARK	Senescence Associated Receptor Kinase-Senesens İle İlişkili Reseptör Kinaz
SNP	Sodyum Nitroprussid
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOS-1	Salt Overly Sensetive-1
TAE	Tris-asetat-EDTA
T-DNA	Transfer DNA
TDZ	Thidiazuron
TIBA	2,3,5-Triiodobenzoic acid Free acid
Ti	Tumor Inducing (Tümör İndükleyici)
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
WPM	Woody Plant Media
YSP	Yaprak su potansiyeli

1. GİRİŞ

1.1 Biber Genel Bilgi

Biberin anavatanının Orta ve Güney Amerika olduğu bilinmektedir. Kristof Colomb 1492’de Amerika kıtasını keşfi sırasında Peru, Şili, Brezilya ve Meksika’daki Kızılderililerin biber yetiştirdiğini rapor etmiştir. 1943 yılında İspanya’ya geçen biber; Osmanlı İmparatorluğu döneminde 16. yüzyılda İstanbul’a getirilmiştir (Hekimoğlu ve Altındeğer, 2009). Genellikle ılık-tropik iklimlerde yetiştirilen ve tek yıllık bir bitki olan biber hem dünyada hem Türkiye’de çok fazla tüketilen ve yaygın bir şekilde üretilen bir sebzedir (Özalp, 2010).

Biber, *Capsicum* cinsine ait olup Solanaceae familyasında yer almaktadır. Biberin taksonomik hiyerarşisi;

Alem	: Bitkiler
Alt Alem	: Tracheobionta
Üst Şube	: Spermatophyta
Şube	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Alt Sınıf	: Asteridae
Takım	: Solanales
Familya	: Solanaceae
Cins	: <i>Capsicum</i> L. – biber
Tür	: <i>Capsicum annuum</i> L.

Capsicum cinsi içerisinde 38 tür bulunmakta olup, ancak bunlardan yalnızca altısı kültür çeşidi olarak kullanılmaktadır. Bunlar; *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*, *C. assamicum* ve *C. annuum*’dur. Bunların arasında, *C. annuum* (2n=24) dünyada en çok üretilen tür iken, *C. chinense* ise en acı meyve tipine sahiptir (Ferri et al., 2018). *C. annuum* türünün birçok varyetesi bulunmaktadır. Bunlar; *C. annuum* var. *cerasiforme*, *C. annuum* var. *conoide*, *C. annuum* var. *fasciculatum*, *C. annuum* var. *langum* ve *C. annuum* var. *grossum* ‘dur (Aybak, 2002).

Ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen biber tipleri; süs biberleri, turşuluk biberler, kurutmalık yapılan yerel biberler, kapyra, dolmalık, çarliston ve sofralık olarak sivri biberler gibi tiplerdir. Bunların yanında üretim potansiyeli daha düşük olan Jalapeno biber, Şili biberi, iri dolmalık (blok biberler-California Wonder), Yunan çarlisi ve Macar biberi gibi tipleri de yetiştirilmektedir (Özalp, 2010). Bu varyetelerle beraber ülkemizde birçok ticari çeşit üreticilerin kullanımı için piyasada yer almaktadır. Bunlardan bazıları; Yağlık-28, Çarliston 52, Demre-2, Kandil Dolmalık, Ilıca-256, Yalova Çarliston 341, Çorbacı, Yalova, Tatlı sivri, Bağcı Çarliston, Çetine 150, Ege Acı Sivri 48/4 ve Dolmalık Biber çeşitlerini sıralayabiliriz.

Ülkemizde toplam 27 milyon ton sebze üretimi yapılmakta olup, biber üretimi seralarda ve açıkta yetiştiriciliği yapılan tüm sebze türleri arasında üretim miktarı olarak 4. sırada yer almaktadır. Toplam üretim ise 2.159.348 tondur (Çizelge 1.1) (FAO, 2018).

Çizelge 1.1 Dünyada biber üretimi (FAO, 2018)

Ülkeler	Üretim (ton)
Çin	15.800.000
Meksika	2.294.400
Türkiye	2.159.348
Endonezya	1.726.382
İspanya	999.600
ABD	889.269
Toplam	23.868.999

Ülkemizde biber üretiminin %82'si açık alan, %18'lik kısmı da örtü altı tarımı olarak gerçekleştirilmektedir ve Akdeniz bölgesi %28 payla birinci sırada yer almaktadır (Özalp, 2010). Ülkemizde çok çeşitli biber türü, farklı tüketim amaçlarına yönelik olarak üretilmektedir. Bunları gruplandıracak olursak birinci sırada sivri biberler gelmekte; sivri biberleri takiben salçalık ve dolmalık tüketim amacı için üretilen biberler yer almaktadır. Ülkemizde biber üretim verileri incelendiğinde, 2017 yılı itibari ile kapyra, dolmalık, sivri ve çarliston biber üretimi toplam 2.607.362 tondur (Çizelge 1.2) (TÜİK, 2019).

Çizelge 1.2 Ülkemizde biber üretimi verileri (TÜİK, 2019)

Yıl	Biber Üretimi (Ton)			
	Kapya (Salçalık)	Dolmalık	Sivri	Çarliston
	Capia ⁽²⁾	Bell	Green	Banana ⁽⁵⁾
1988	-	470.000	260.000	-
1989	-	525.000	328.000	-
1990	-	320.000	580.000	-
1991	-	350.000	570.000	-
1992	-	380.000	574.000	-
1993	-	385.000	580.000	-
1994	-	368.000	640.000	-
1995	-	330.000	750.000	-
1996	-	350.000	800.000	-
1997	-	330.000	800.000	-
1998	-	390.000	1.010.000	-
1999	-	393.000	1.069.000	-
2000	-	390.000	1.090.000	-
2001	-	410.000	1.150.000	-
2002	-	410.000	1.340.000	-
2003	-	420.000	1.370.000	-
2004	615.000	375.000	710.000	-
2005	685.000	400.000	744.000	-
2006	673.981	392.617	775.577	-
2007	674.788	357.246	725.192	-
2008	690.531	371.050	734.596	-
2009	700.038	384.273	752.692	-
2010	782.173	387.626	816.901	-
2011	730.493	364.930	879.846	-
2012	748.422	383.213	910.725	-
2013	814.372	398.470	946.506	-
2014	829.809	391.009	907.126	104.364
2015	879.775	393.109	919.004	115.568
2016	957.030	418.435	967.466	114.891
2017	1.107.713	420.904	945.361	134.194

(2) Veriler 2004 yılından itibaren derlenmeye başlamıştır.

(5) Veriler 2014 yılından itibaren derlenmeye başlamıştır.

Biber tohumları 8°C'nin üstündeki sıcaklıklarda çimlenebilmektedir. Çimlenmesi için optimum sıcaklık gece ve gündüz farklı olmaksızın 24°C'dir. En iyi çimlenmeyi ise 21-28°C arasında göstermektedir. Fide döneminde gece ve gündüz olmak şartı ile ideal ortam sıcaklıkları 18-23°C'ye düşürülebilmektedir. Biber bitkisi, gün uzunluğuna karşı duyarsız bir bitkidir ve ışığı çok sevmektedir. Biber seralarında topraktaki tuz oranının litrede 3 gramdan az olması, toprak pH'sının 6.0-6.5 arasında olması ve oransal hava neminin %70-75 oranlarında olması istenmektedir (Tüzün, 2014; Keleş, 2015)

Biyoteknolojik ıslah yöntemleri ve geleneksel ıslah yöntemleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Geleneksel ıslah ve biyoteknolojik ıslah yöntemleri arasındaki major fark ne hedef ne de süreç değildir. Asıl fark hız, hassasiyet, güvenilirlik ve kapsamdır (Navarro et al., 2006). Klasik ıslah yöntemlerinde

istenilen hedef gen ile birlikte fonksiyonu bilinmeyen başka genlerde aktarılmaktadır. Ancak genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilen gen aktarımı sadece istenilen hedef tek genin aktarılmasına olanak sağlamaktadır.

A. tumefaciens, transgenik bitki üretiminde oldukça yaygın kullanılan bir metottur. Her çeşit bitki hücresine bu bakteriyi kullanarak gen aktarmak mümkündür, ancak gen aktarılan hücre oranı son derece düşük olmaktadır. Hücrelere gen aktarımını en fazla etkileyen etmenlerin başında “aktarımı yapılan hücrenin rejenerasyon kabiliyeti” gelmektedir. Rejenerasyon kabiliyeti (totipotensi) olmayan hücrelere yapılan gen aktarımı hiçbir anlam ifade etmemekte ve ayrıca gen aktarılan hücrelerden yeni bitkilerin oluşması gerekmektedir. Bitki dokularındaki hücrelerin oldukça az bir bölümü hem gen aktarımı hem de rejenerasyon kabiliyetine sahiptir. Bu nedenle bitkilere tarımsal önemi olan genleri aktarabilmek için bitki hücreleri ve dokularından etkili bir rejenerasyon protokolünün geliştirilmesi oldukça önemlidir (Özcan ve Özgen, 1996). Genetik mühendisliği bitkilerde yeni çeşit ve anaçların geliştirilmesi, istenen özelliklerin seçimi ve genetik çeşitliliğin oluşturulmasında yeni çözümler sunmuştur. Bitki genetik mühendisliği uygulamaları ile; “spesifik bir genetik bilgiyi kodlayan yabancı bir DNA parçasının donör organizmalardan alıcı bitki türlerine transferi mümkün olmuştur”. Bu şekilde; yalnızca akraba olan türler arasında gen alışverişi sınırlandırılmasına son verilmiş, klonlanan sentetik veya doğal nükleik asit dizileri bitki hücrelerine aktarılabilir hale gelmiştir (Kumlay ve Dursun, 2003).

Rhizobiaceae familyasının bir türü olan *Agrobacterium tumefaciens*, kök boğazında oluşan yaralardan bitkiyi enfekte ederek kök boğazı uruna sebep olan Gram (-) negatif bir bakteridir. *Agrobacterium* enfeksiyonu sonucunda bitki hücresinde bulunan Ti (Tumor inducing) plazmidi üzerinde yer alan hareketli bir DNA parçası olan T-DNA (Transfer DNA) bitki hücrelerine geçmekte ve kromozomlarla sabit olarak bütünleşmektedir (Zaenen et al., 1974; De La Riva et al., 1998). Araştırmacılar T-DNA sınırları içerisine yerleştirilen herhangi bir DNA parçasının kolaylıkla bitki hücresine aktarılabilirdiğini keşfetmişlerdir (Leesmans et al., 1982; Schell and Van Montagu, 1983).

Bitkilerde genetik mühendisliği çalışmalarında ilk adım etkili bir rejenerasyon sisteminin geliştirilmesidir. Birçok bitki türünün *in vitro* rejenerasyonunda somatik embriyogenesis ve organogenesis en çok kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Fakat bu yöntemler için optimum rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesinde birçok faktörün etki ettiği bilinmektedir. Bu faktörler; kullanılan eksplant kaynağı, içsel bitki büyüme düzenleyici seviyesi, kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonu ve konsantrasyonu, ışık ve sıcaklık rejimi, besin ortamı kompozisyonu, genotip ve genetik etkenler olarak sıralanabilir (Dabazua and Pena, 2001; Ochoa-Alejo and Ramirez-malagon, 2001; Gammoudi et al., 2017). Solanaceae familyasına ait olan *Capsicum* cinsinde rejenerasyonun optimizasyonu için birçok çalışma yapılmıştır (Günay and Rao, 1978; Ramirez-Malagon and Ochoa-Alejo, 1996; Christopher and Rajam, 1996; Manoharan et al., 1998; Mok and Norzulaani, 2007; Aniel Kumar and Tata, 2010; Kumar et al., 2012a; Verma et al., 2013a). Ancak *Capsicum* cinsinin hem *in vitro* rejenerasyona hem de genetik transformasyona inatçı olmasından dolayı protokollerin geliştirilmesine hala ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (Liu et al., 1990; Steinitz et al., 1999; Kothari et al., 2010; Maligeppagol et al., 2016; Gammoudi et al., 2017).

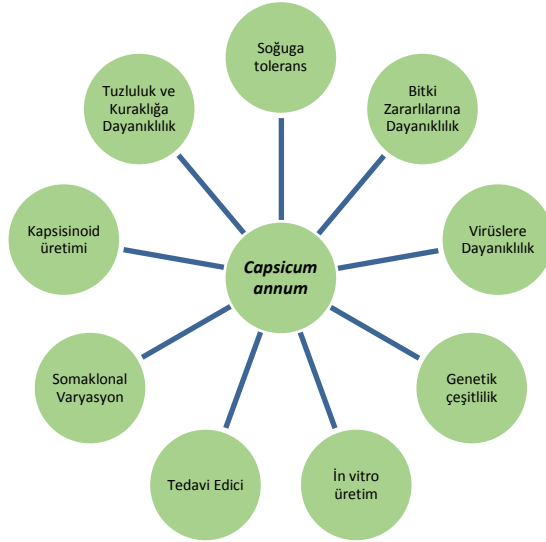
Organogenesis, bitki dokularının herhangi bir kısmının eksplant kaynağı (kök, gövde, yaprak, göz gibi) olarak kullanılmasıyla, tek kutuplu bir yapının (sürgün veya kök) oluşması olarak bilinmektedir. Bu kompleks fenomen kendiliğinden oluşabileceği gibi, dış faktörlerin uyartımı ile de gerçekleşebilir. İki farklı yaklaşıma göre, sürgünler eğer meristematik olmayan dokulardan oluşursa adventif sürgün, meristematik dokulardan oluşursa aksiller sürgün olarak isimlendirilmektedir. Bu iki yaklaşım için kimyasal ve fiziksel faktörlerin sinerjistik etkisinin büyük önem taşıdığı bildirilmektedir (Kothari et al., 2010; Hegde et al., 2017a). Somatik embriyogenesisde olduğu gibi organogenesisde de etkili bir rejenerasyon protokolünün geliştirilmesinde birçok faktörün etkisi bulunmaktadır. Bu faktörler; uygun eksplant seçimi, eksplant yaşı, besin ortamı içeriği, bitki büyüme düzenleyicileri, genotip, karbonhidrat kaynağı, katılaştırıcı ajanlar, ışık rejimi, sıcaklık, nem vb., olarak sıralanabilir. *Capsicum* cinsinde organogenesis protokolünü geliştirmek üzere farklı eksplantlar kullanılarak yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Organogenesis çalışmalarında kullanılan eksplant

kaynakları; kotildeon ve hipokotil (Günay and Rao, 1978), zigotik embriyo (Agrawal and Chandra, 1983), genç fideler (Philips and Hubstenberger, 1985), hipokotil, kotiledon, gövde, yaprak, kök, sürgün ucu, embriyo (Agrawal et al., 1989), kotiledon ve hipokotil (Arroyo and Revilla, 1991), genç fideler (Ediba and Hu, 1993), olgun tohumlar (Ezura et al., 1993), sürgün ucu (Madhuri and Rajam, 1993), sürgün ucu (Christopher and Rajam, 1994), kotiledon (Hyde and Phillips, 1996), hipokotil, kotiledon, yaprak (Christopher and Rajam, 1996), yaralanmış hipokotil (Ramirez-Malagon and Ochoa-Alejo, 1996), kotiledon (Franck-Duchenne et al., 1998), kotiledon (Husain et al., 1999), zigotik embriyo (Arous et al., 2001), fide ve embriyonal eksplantlar (Dabauza and Pena, 2001), yaprak, kotiledon (Venkataiah et al., 2003), sürgün ucu (Sanatombi and Sharma, 2007a, 2007b), kotiledon (Joshi and Kothari, 2007), yaprak, kotiledon ve hipokotil (Sanatombi and Sharma, 2008), kotiledon, hipokotil (Orlinska and Nowaczyk, 2015), kotiledon, hipokotil (Hegde et al., 2017a, 2017b), yaprak, kotiledon, hipokotil, epikotil (Renfiyeni et al., 2017), sürgün gözleri (Haque and Ghosh, 2018), kotiledon, hipokotil (Gammoudi et al., 2017), kotiledon, hipokotil, sürgün ucu (Bhutia et al., 2018) olarak bilinmektedir.

Son yıllarda gelişen biyoteknolojik yöntemler ile bitkilere yeni özelliklerin hızlı bir şekilde kazandırılmasının önü açılmıştır. Modern ıslah yöntemleri olarak da isimlendirilen biyoteknolojik metotlar veya bitki genetik mühendisliği uygulamaları sayesinde, klasik ıslah yöntemlerinin olumsuzlukları ortadan kaldırılabilir. Özellikle ıslah süresinin kısaltılması sayesinde hem ekonomiden hem de zamandan tasarruf edilmekte ayrıca melezlemede karşılaşılan genetik sorunları ve gen kaynaklardan faydalanmadaki sınırlamaların kolayca üstesinden gelinebilmektedir (Kumlay ve Dursun, 2003). Genetik mühendisliğindeki ilerlemeler sayesinde birçok bitki türüne farklı özellikler kazandırılabilir. Bu özelliklerin başında; abiyotik stres faktörleri (kuraklık, düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık, yüksek asidite, tuzluluk, vs), biyotik stres faktörleri (bakteriyel, viral ve fungal hastalıklar, nematodlar) ile herbisit ve pestisitlere dayanıklılık gibi birçok özellik sıralanabilir (Glick and Pasternak, 1998). Günümüzde bitkilere gen transferinde *Agrobacterium tumefaciens* ve biyolistik en yaygın kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır (Kothari et al., 2010). Birçok bitki türüne *Agrobacterium tumefaciens* ve biyolistik aracılığıyla farklı genlerin

aktarımı gerçekleştirilmiştir. Bu transgenik bitkilerden bazıları; mısır (Chumakov et al., 2006), buğday (Supartana et al., 2006), çeltik (Supartana et al., 2005), soya (Chee et al., 1989), dut (Ping et al., 2003), nohut (Srivastava et al., 2014), ayçiçeği (Sujatha et al., 2012), pamuk (Keshamma et al., 2008) olarak sıralanabilir. *Capsicum* cinsinde de *Agrobacterium* aracılığıyla yapılmış birçok gen aktarım çalışması mevcuttur (Liu et al., 1990; Wang et al., 1991; Dong et al., 1992; Engler et al., 1993; Lee et al., 1993; Ye et al., 1993; Zhu et al., 1996; Kim et al., 1997; Ramírez-Malagón, 1997; Christopher and Rajam, 1997; Subhash and Christopher, 1997; Lim et al., 1996; Manoharan et al., 1998; Mihálka et al., 2000; Milhalka et al., 2003; Lee et al., 2004; Hasnat et al., 2008; Kumar et al., 2009; Heidmann et al., 2011; Jung et al., 2011; Subramanyam et al., 2011; Kumar et al., 2012b; El Nagar et al., 2012; Verma et al., 2013b; Arthikala et al., 2014; Maligeppagol et al., 2016; Bulle et al., 2016; Shivakumara et al., 2017; Chee et al., 2018; Mahto et al., 2018). Ancak *Capsicum* cinsinde yapılan bu çalışmaların çoğu protokol geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun en büyük sebebi ise bu cinsin rejenerasyona ve transformasyona direnç göstermesidir (Kothari et al., 2010). Biberde transformasyon etkinliğini azaltan en önemli iki faktör: (i) sürgün oluşumunun genotipe bağlı olması (Christopher and Rajam, 1996; Kim et al., 2002) ve genotipin transformasyon oranını etkilemesi, (ii) kotiledon ve hipokotil eksplantların yara kısımlarının *Agrobacterium* enfeksiyonu sonucunda çok düşük oranda elde edilen transformasyon etkinliğinin nedeninin tam olarak anlaşılamaması (Lee et al., 2004) olarak belirtilmiştir. Bunlara ek olarak, kullanılan *Agrobacterium* ırkı, kokültivasyon ve rejenerasyon ortamı da transformasyonu etkileyen faktörler arasında yer almaktadır (Li et al., 2003; Dabauza and Pena, 2003; El Nagar et al., 2012).

Özellikle günümüzde yapılacak biyoteknolojik ve genetik mühendisliği çalışmaları ile biber bitkisinin birçok özelliği iyileştirilerek (hastalığa, tuzluluğa, kuraklığa dayanıklılık), farklı alanlarda kullanımına olanak sağlanabilecektir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Biberde biyoteknolojik yöntemler kullanılarak geliştirilebilecek özellikler

Dünyada ve ülkemizde bitki yetiştiriciliğini ve verimini etkileyen en önemli etmenlerin başında abiyotik stres faktörleri gelmektedir. Abiyotik stres faktörleri, çevrede farklı miktar ve seviyede bulunan; su, tuz ve sıcaklığın etkisi olarak üç grup altında toplanırlar. Abiyotik stres faktörü olan bu üç grubun değişen etkisi ile dünya genelindeki zirai alanlarda yaklaşık %70 oranında ürün kaybı olmaktadır (Shivakumara et al., 2017). Günümüzde zirai ürünlerin kaybını azaltmakta klasik ıslah çalışmalarıyla beraber genetik mühendisliği yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Birçok bitki türüne tuzluluk ve kuraklığa karşı toleransı sağlamak amacıyla abiyotik stres mekanizmalarında görev alan genler, transkripsiyon faktörleri ve promotor bölgeleri aktarılmıştır. Son yıllarda abiyotik stres ile ilgili araştırmalarda öne çıkan çalışmalar ise tütünde kuraklığa tolerans için *SARK* promotoru (Dellatore et al., 2012), domateste tuzluluğa tolerans için *TaNHX2* geni (Yarra et al., 2012), pamukta kuraklığa toleransı sağlamak için *ipt* geni (Kuppu et al., 2013; Bedada et al., 2016), mısırdaki kuraklığa toleransı sağlamak için *ipt* geni (Oneto et al., 2016) ve dallı darıda (*Panicum virgatum* L.) tuza tolerans için *PVNHX1* geninin (Huang et al., 2017) aktarılmasıdır. Biberde abiyotik stres çalışmaları büyük çoğunlukla klasik yöntemler kullanılarak belirlenmektedir. Birçok abiyotik stres çalışması, arazi veya sera ortamında kültüre alınan biber hatlarının farklı NaCl uygulamaları veya sulama rejimleri kullanılması ile hassas, tolerant ve dayanıklı bireylerin seçimine dayanmaktadır (Gomez et al., 1996; Kreij, 1999; Chartzoulakis and Klapaki, 2000a, 2000b; Aktaş, 2002; Değer, 2010; Yıldızlı, 2014; Gammoudi et al., 2017; Eroğlu,

2015; Al-Rubaye, 2017; Cengiz, 2017; Balasankar et al., 2017). Literatürde abiyotik strese karşı dayanıklı transgenik biber hatlarının geliştirilmesine ait çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmalar ise tuzluluğa tolerans için *osmotin* geni aktarılmış transgenik biber hatları (Subramanyam et al., 2011), kuraklığa tolerans için *dreb1A* transkripsiyon faktör geni aktarılmış transgenik biber hatları (Maligeppagol et al., 2016), tuzluluğa tolerans için Na^+/H^+ antiportör geni (*TaNHX2*) aktarılmış transgenik biber hatları (Bulle et al., 2016) ile tuzluluk ve kuraklığa tolerans için DNA helikaz 45 (*PDH45*) geni aktarılmış transgenik biber hatlarıdır (Shivakumara et al., 2017).

Son yıllarda tuza tolerans çalışmalarında kullanılan *NHX* gen ailesi (Na^+/H^+ antiportör) hücrelerde iyon (Na^+ ve K^+) homeostasisi, hücrel pH'nın düzenlenmesi, hücre büyüme ve gelişmesi ile tuz toleransında önemli bir rol oynamaktadır (Bassil et al., 2011a; Mccubbin et al., 2014). İntegral membran proteinleri olarak da bilinen Na^+/H^+ antiportörler, plazma membranı (Shi et al., 2003), endozomal kompartmanlar (Rodriguez-Rosales et al., 2008; Bassil et al., 2011b) ve kofullarda (Apse and Blumwald, 2007; Leidi et al., 2010) bulunurlar. Bitki *NHX*'leri hem Na^+/H^+ hem de K^+/H^+ arasındaki değişimi sağlaması ile tuza tolerans ve K^+ beslenmesine etki ederler (Venema et al., 2002; Aps et al., 2003; Leidi et al., 2010; Bassil and Blumwald, 2014). Yapılan araştırmada, *Arabidopsis*'e klonlanan ve yüksek seviyede ifade olan *AtNHX1*'in hücre içinde Na^+ 'nın kompartmanlara dağılmasını sağlayarak tuza tolerans gösterdiğini bildirmişlerdir (Apse et al., 1999). *Arabidopsis*'de yapılan çalışmalar sonucunda *NHX*'ler üç sınıfa ayrılmaktadırlar. Bu üç sınıfı sekiz farklı izoform temsil etmektedir. Bu izoformların iki farklı tipi plazma membranında (*SOS1/AtNHX7* ve *AtNHX8*), altı izoform ise kofulda (*AtNHX1*, *AtNHX2*, *AtNHX3*, *AtNHX4*) veya veziküllerde (*AtNHX5* ve *AtNHX6*) lokalize olmaktadır (Bassil and Blumwald, 2014).

Bitkiler tuz stresi ve sodyumun (Na^+) toksik etkisiyle başa çıkabilmek için iyon homeostasisini ve osmotik ayarlamayı sağlayan birçok adaptasyon mekanizması geliştirmişlerdir (Bohnert et al., 1995). Bitkiler Na^+ -ATPases eksikliğinde, Na^+ homeostasisini, çoğunlukla Na^+/H^+ antiportörlerin aktivitesi ve ifadesi ile sağlarlar. Aşırı sitosolik Na^+ 'un uzaklaştırılmasında bitkiler iki mekanizma kullanırlar: (i) plazma membranında bulunan Na^+/H^+ antiportörleri

(SOS1-tip) ile bitki hücrelerinden Na^+ 'un uzaklaştırılması (Shi et al., 2003), (ii) kofullar Na^+ - H^+ antiportırlar ile Na^+ 'un koful kompartmanlarına transferi şeklinde gerçekleşir. Plazma membranı ve kofullardaki Na^+ - H^+ antiportırların çalışması ve uyarılması protonların etkilenmesi ile gerçekleşir. Bu protonların uyarılması, plazma membranında H^+ -adenosine triphosphatase, kofullarda H^+ -adenosine triphosphatase ve H^+ -inorganik pyrophosphatase'ın sırayla devreye girmesiyle başlar (Apse et al., 2003). Koful içindeki Na^+ 'un dışarı atılmasına en önemli ve etkili strateji sitozol içerisindeki Na^+ içeriğinin azaltılması ve ayrıca su alımı ile hücre osmotik dengesinin sağlanması, hücrenin turgor durumu ve genişlemesi buna katkı sağlamaktadır (Chinnusamy et al., 2005). Ayrıca kofullar Na^+ - H^+ antiportırlar, endozomal pH'nin düzenlenmesinde (Yamaguchi et al., 2001), Na^+ homeostasisinde, veziküler trafikte ve protein hedeflenmesinde önemli rol oynarlar (Bowers et al., 2000; Apse et al., 2003; Sottosanto et al., 2004).

Bitkilerde ilk defa kofullar Na^+ - H^+ antiportır geni olan *AtNHX1*, *Arabidopsis thaliana*'dan karakterize edilerek klonlanmıştır (Gaxiola et al., 1999). *Arabidopsis thaliana*'daki *NHX* gen ailesi altı intraselüler NHX-tip antiportır içermekte ve bunlarda iki grup içinde sınıflandırılmaktadır (Brett et al., 2005; Pardo et al., 2006; Rodriguez-Rosales et al., 2009). Birinci grup olan NHX1, NHX2, NHX3 ve NHX4 kofullarda lokalize olurken, ikinci grupta yer alan NHX5 ve NHX6 ise endozomal kompartmanlarda lokalize olmuşlardır (Bassil et al., 2011b; Barragan et al., 2012). Bitki NHX transportırları birçok fizyolojik fonksiyon ile ilişkilidir. Örnek olarak, çiçekte renk oluşumunun düzenlenmesinde (Yamaguchi et al., 2001; Ohnishi et al., 2005; Yoshida et al., 2009), hücreSEL K^+ homeostasis regülasyonunda (Venema et al., 2002; Pardo et al., 2006; Apse and Blumwald, 2007; Leidi et al., 2010), hücre genişlemesinde (Apse et al., 2003; Bassil et al., 2011a), veziküler trafikte ve protein hedeflenmesinde (Bowers et al., 2000; Brett et al., 2005; Bassil et al., 2011a) ve tuz toleransında (Apse et al., 1999; Hernandez et al., 2009; Bassil et al., 2011a) etkili birçok fizyolojik fonksiyon ile ilişkilidir. *NHX1*'in yaprak gelişiminin ve fidelerin oluşumunda ve özellikle de geniş epidermal hücrelerin oluşumunda etkili olduğu belirlenmiştir (Apse et al., 2003). *AtNHX1* ile *Saccharomyces cerevisiae*'nın Na^+ - H^+ antiportırları olan *ScNHX1* ile önemli ölçüde sekans homolojisi göstermektedir. Ayrıca *AtNHX1* ile fonksiyonel benzerlik gösteren *ScNHX1*, bitki koful membran fraksiyonu olarak lokalize olmuşlardır (Quintero et al., 2000; Sottosanto et al.,

2004). *AtNHX1*'in yüksek düzeyde ifade olması ile transgenik bitkilerde tuz toleransı artarken, sağlanan bu toleransın kofullarda artan Na^+/H^+ değişim aktivitesi ve kofulda sodyumun biriktirilmesi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan diğer araştırmalarda, *NHX5* ve *NHX6*'nın Golgi ve trans-Golgi ağında lokalize olduğu ve bu bölgede endozomal ürünlerle koful arasındaki trafiği sağladığı, tuz stresi ve hücre genişlemesinde çalıştıklarını göstermişlerdir (Bassil et al., 2011b; Reguera et al., 2014). Buna rağmen, diğer koful grubu üyelerinden olan *NHX2*, *NHX3* ve *NHX4*'ün büyüme ve gelişmede nasıl rol aldıkları bilinmemektedir.

Bitki büyüme düzenleyicileri stres sinyallerinin iletilmesinde önemli rol oynarlar. En hızlı cevaplardan biri su stresine karşı bitkinin köklerinde ABA depolamasıdır (Thompson et al., 2007). Depolanan ABA ksilemler aracılığıyla sürgün ve yapraklara taşınarak stomaların kapanmasına neden olur ve sonuç olarak da transpirasyonun önlenmesi ile su kaybının önüne geçerler (Schroeder et al., 2001). Sitokininlerinde doğrudan abiyotik stres ile ilişkileri vardır (Hare and Cress, 1997). Yapılan abiyotik stres çalışmalarında sitokinin sinyal yolağıyla ilişkili birçok proteinin bu genler tarafından kodlandığı ve stres durumunda farklı etkiler gösterdikleri belirtilmiştir (Argueso et al., 2009). Bilindiği üzere ABA, sitokininlerin antagonistidir ve kuraklık stresi sonucunda bitkilerde sitokinin seviyesi azalır. Su stresi koşullarında hayatta kalan bitkilerin yapraklarındaki senesensin engellendiği ve prolin seviyesinin arttığı görülmüştür (Alvarez et al., 2008). İçsel sitokinin seviyesinde yapılan manipülasyon ile senesensin ertelendiği ve su stresi altındaki bitkilerin daha tolerant oldukları belirlenmiştir (Gan and Amasino, 1997). Bu bitkilerde Isopentenyl transferase (*IPT*)'ın yüksek seviyede ifade olduğu ortaya konulmuştur. Ancak kuraklık stresi altındaki *IPT* geni içeren transgenik bitkilerde kullanılan farklı tiplerdeki promotorlar bu durumu etkilemektedir (Ma, 2008). Transgenik tütün (*N. tabacum*) bitkisinde *IPT* genini kontrol eden ve kuraklık ile uyarılabilir promotor (drought-induced promoter) olan *SARK* (senescence associated receptor kinase-senesens ile ilişkili reseptör kinaz) kullanıldığında, kuraklık toleransının, fotosentez kapasitesinin ve verimin daha fazla arttığı görülmüştür (Peleg et al., 2011). Diğer bitki türlerine *IPT* geninin aktarılmasıyla geliştirilen transgenik hatların kuraklığa toleransı ile ilgili birçok çalışma literatürde yer almaktadır. Bu çalışmalar; kuraklığa toleran *PSARKIPT* transgenik yer fıstığı hatları (Qin et al., 2011), kuraklığa toleran *PSARKIPT*

transgenik çeltik hatları (Peleg et al., 2011; Reguera et al., 2013), çevresel stres faktörlerine karşı tolerant *PSARKIPT* transgenik tütün hatları (Rivero et al., 2007, 2009, 2010; Delatorre et al., 2012), kuraklığa tolerans için geliştirilmiş olan transgenik *PSARKIPT* pamuk hatları (Kuppu et al., 2013), kuraklığa tolerans için geliştirilmiş olan transgenik *PSARKIPT* mısır hatları (Bedada et al., 2016; Oneto et al., 2016), kuraklığa tolerans için *GMSARKIPT* geni içeren transgenik *Arabidopsis* hatları (Huo et al., 2012), kuraklığa ve tuzluluğa tolerans için *PSARKIP*'li *Arabidopsis* hatları (Golan et al., 2016), kuraklık ve soğuk stresine tolerans gösteren *PSAG12IPT*'li transgenik patlıcan hatları (Xiao et al., 2017), kuraklığa tolerant *PSARKIPT* transgenik tatlı patates (Nawiri et al., 2017) olarak sıralanabilir.

Biber bitkisinin abiyotik stres koşullarına karşı çok hassas olduğu bilinmektedir. Bu nedenle üretim aşamasını olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörler arasında yer almaktadır. Biberde abiyotik stres ile ilgili araştırmalar çoğunlukla sera ortamında, hidrofonik ortamda veya saksılarda kültüre alınan biber hatlarının farklı NaCl uygulamaları veya sulama rejimleri kullanılması ile hassas, tolerat ve dayanıklı bireylerin seçimine dayanmaktadır (Gomez et al., 1996; Kreji, 1999; Chartzoulakis and Klapaki, 2000a, 2000b; Aktaş, 2002; Demir, 2008; Değer, 2010; Yıldızlı, 2014; Eroğlu, 2015; Al-Rubaye, 2017; Emirzeoğlu, 2017; Cengiz, 2017; Balanskar et al., 2017). Ayrıca farklı kimyasalların kullanımı (Prolin, glisin betain, salisilik asit, vb.) ile abiyotik stres etmenlerinin etkileri azaltılmaya çalışılmıştır. Ancak klasik yöntemlerle üstün özellikli tolerat/dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi veya seçilmesi yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda gelişen biyoteknoloji ve genetik mühendisliği yöntemleri ile abiyotik strese karşı tolerat çeşitlerin geliştirilmesinde büyük yol alınmıştır. Fakat literatürde abiyotik strese karşı tolerat transgenik biber hatlarının geliştirilmesine ait çok az araştırma bulunmaktadır. Bu durum *Capsicum* cinsinin hem rejenerasyona hem de genetik transformasyona karşı inatçı olmasından kaynaklanmaktadır. Günümüzde yapılan birçok araştırma hala bu cins için protokol geliştirme üzerine odaklanmıştır.

Bu tez çalışmasında dört farklı biber (sivri, çarliston, kapy ve dolma biber) hattının rejenerasyon protokolleri geliştirilerek, *AtNHX1* (Tuzluluğa tolerans) ve *PSARKIPT* (Kuraklığa tolerans) genlerinin *A. tumefaciens* aracılığıyla aktratımı ile transformasyon etkinlikleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Biberde Doku Kültürü Çalışmaları

Günay and Rao (1978), yaptıkları çalışmada kırmızı biberde 8.88 BA μ M + 2.85-5.71 μ M IAA eklenmiş besin ortamında sürgün tomurcuklarında rejenerasyonu sağladıklarını belirtmişlerdir.

Saxena et al. (1981), Kaliforniya Wonder çeşidinin mezofil protoplastından bitki üretimi için bir protokol tanımlamışlardır. Yaptıkları çalışmada, rejenerasyon için en başarılı protokolü, 1 mg/l 2,4-D, NAA ve BAP içeren MS ortamında kotiledon ve hipokotil eksplantların direkt organogenezis sonucu elde etmişlerdir.

Agrawal et al. (1989), yaptıkları çalışmada biber bitkisinin, BAP, Kinetin, IBA, IAA, 2,4-D içeren MS ortamları arasında, BAP eklenmiş MS ortamının sürgün farklılaşmasında en iyi sonucu gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Valera-Montero and Ochoa-Alejo (1992), 3 farklı şili biberinin hipokotillerini kullanarak bitki rejenerasyon çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Tomurcuk elde etmek amacıyla BA ve IAA'nın üç farklı konsantrasyonunu içeren MS ortamı kullanmıştır. Kullanılan çeşitler arasında hipokotil başına 4 ila 20.1 arasında tomurcuk gözlenmiştir. Tüm çeşitler göz önünde bulundurulduğunda en iyi büyüme gelişiminin 5 mg/l BA ile 0.3 mg/l IAA içeren besin ortamında gerçekleştiği tespit edilmiştir. Tomurcuk içeren hipokotiller sürgünlerin uzaması amacıyla 15-30 gün boyunca bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Hipokotil başına uzayan sürgünlerin sayısı 1 ila 3.2 arasında değişmiştir. Bu gelişen sürgünler MS ortamı ile ıslatılmış kum üzerinde köklendirilmiştir.

Ebida and Hu (1993), tarafından yapılan bir çalışmada; 22.2 μ M BA + 0.54 μ M NAA eklenmiş MS ortamında biber bitkisinin sürgün ucu rejenerasyonunu gösterdiği fakat köklendirmeyi gerçekleştiremediğini, fakat IAA ve NAA eklenmiş MS ortamında bir ay içerisinde tomurcukların %70'inde köklenmenin gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Harini and Lakshmi Sita (1993), yaptıkları çalışmada direkt somatik embriyogenesis yoluyla olgunlaşmamış zigotik embriyolarından *Capsicum annum* L. (Şili çeşidi)'da *in vitro* rejenerasyon protokolünü geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, yüksek sakkaroz, hindistan cevizi sütü ve 2,4-D eklenmiş MS ortamına eksplantlar ekilmiş ve 15 gün içerisinde ilk somatik embriyolar gözlenmiştir. Somatik embriyolar direkt olarak 13 embriyonal eksen ve kotiledon kenarlarından çoğalmışlardır. Yapılan histolojik çalışmalar, embriyo gelişiminin safhalarını ortaya çıkarmıştır. Hem başlangıç hem de olgunlaşma safhaları, aynı ortamdan elde edilmiştir. En son olarak da, somatik embriyolar 1 mg/l gibereellik asit eklenmiş sakkaroz ortamına aktarıldıktan sonra çimlendirilmiştir. Harini ve Lakshmi Sita (1993), bu çalışma sonucunda üretilen bitkilerin sitolojik ve morfolojik açıdan benzerlik gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Christopher and Rajam (1994), bazı biber türlerinde (*C. praetermissum* ve *C. annum*), *in vitro* klonal üretim çalışmasında, BA veya kinetin içeren MS ortamının farklı konsantrasyonlarının sürgün uç eksplantlarında, sürgün profelirasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Kültür işleminden 4 hafta sonra *C. annum*'daki en yüksek orandaki sürgün gelişimi, 88.8 μ M BA veya 116.2 μ M kinetinin bulunduğu MS ortamında elde edilmiştir. Üretilen sürgünlerin köklendirilmesi, 5.7 μ M IAA içeren MS ortamından sağlanmıştır. En iyi köklenme (% 80-100), BA veya Kinetin'e ilave olarak TIBA eklenmiş ortamlardaki sürgünlerde gözlenmiştir. Kinetin veya BA eklenmiş ortamdan üretilen bitkiler başarılı bir biçimde toprağa aktarılmıştır. Çiçeklenen bitkilerde %100'lük polen canlılığı tespit edilmiştir.

Binzel et al. (1996), biber bitkisi üzerinde yaptıkları bir çalışmada, direkt somatik embriyogenesis yoluyla olgunlaşmamış zigotik embriyolardan tam bir bitki üretimini gerçekleştirmişlerdir. Somatik embriyoların 2,4-D, Thidiazuron ve yüksek oranda sakkaroz (%6-10) içeren MS ortamında, kallus olmaksızın zigotik embriyo ucunda, embriyo ekseninde ve kotiledonlarında direkt olarak oluştuklarını, en güzel sonuçların 2,4-D, hindistan cevizi sütü (%10) ve yüksek sakkaroz (%8) içeren MS ortamında gözlendiğini ve embriyoların olgunlaşma ve indüksiyon işlemlerinin tamamının aynı ortamda tamamlandığını, embriyo farklılaşmasının ise eş zamanlı olmadığını ve bazı embriyoların ilginç bir şekilde şişip, biçim değiştirdiğini belirtmişlerdir.

Büyükalaca ve Mavituna (1996), yaptıkları çalışmada *C. annuum* var. Ace çeşidinin olgun zigotik embriyolarını kullanarak somatik embriyoların üretimini, süspansiyon kültürlerinde ve bioreaktörlerde gerçekleştirmişlerdir. En iyi embriyojenik kallus yapılarını 9.05 μ M 2,4-D ve %3 sakkaroz içeren MS besin ortamında elde etmişlerdir. Embriyojenik kallusları 4.52 μ M 2,4-D ve %3 sakkaroz içeren sıvı kültür ortamına aktararak somatik embriyo uyartımını sağlamışlardır. Potasyum sitrat ön uygulamasından sonra embriyo oluşumunun devam etmesi için 6 g/l prolin ve konsantrasyonu düşürülmüş amonyum (10mM) içeren besin ortamlarına aktarmışlardır. Somatik embriyolar, 1.89 μ M ABA içeren ½ MS besin ortamında gelişerek, %97 oranında bitkiciğe dönüşümleri sağlanmıştır.

Prakash et al. (1997), NAA, 2,4-D ve BAP eklenmiş MS ortamında biberin mezofil protoplastından mikroçoğaltımını gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir.

Franck-Duchenne and Wang (1998), yaptıkları çalışmada tatlı biber'in (*Capsicum annum* L.) *in vitro* ortamda direkt organogenesis yoluyla rejenerasyonu başarmışlardır. Tomurcuk sürgünleri zeatin varlığında, 24-Epi-brassinolida (EBR) ortamına daha fazla kök uzaması amacıyla yerleştirilmiştir. Test edilen genotipler ve kullanılan protokollerin ışığında farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar EBR'nin her zaman direkt olarak kök uzamasını doğrudan sağlamadığı fakat büyüme düzenleyicilerine eklendiğinde kök uzamasında olumlu bir etkide bulunduğunu belirlemişlerdir. Bitkiciklerin 0.5 M'lık NAA içeren besin ortamında köklendiğini ve dış koşullara başarıyla aktarıldığını belirtmişlerdir.

Tsuro et al. (1999), biber (*Capsicum annum* L.) alınan eksplantları sitokinin (BA, Kinetin, Zeatin, Thidiazuron) içeren MS ortamına aktarılmışlar ve en yüksek sürgün oranını, Thidiazuron (TDZ) içeren MS ortamında gözlemlemişlerdir. Elde edilen sürgünler BA+IAA içeren MS ortamına aktarıldığında, sürgünlerde köklenme (%70) gözlenmiştir. TDZ'den alınan eksplantlarda ise %72-94 oranında köklenme saptanmıştır. Dış ortama aktarılan bitkiciklerin, %68-84 oranında yaşadıkları belirtilmiştir.

Kintzios et al. (1999), yaptıkları çalışmada biberin yaprak eksplantlarından yüksek sitokinin içeren ortamlarda, somatik embriyo eldesini başardıklarını belirtmişlerdir.

Arous et al. (2001), Tunus şili biberinin olgun tohumlardan elde edilen embriyoları, BAP içeren MS ortamına aktarmışlar, daha sonra elde edilen sürgünleri BAP ve NAA içeren MS ortamına aktardıklarında organogenik embriyoları elde etmişlerdir. Son olarak bu organogenik embriyolar köklendirme ortamlarına (BAP+NAA) aktarılmıştır. Köklendirmede en etkili sonuçlar hormonsuz MS ortamında gözlenmiştir (%72).

Küsek et al. (2003), biberin zigotik embriyolarının MS ortamında oksinlerin (özellikle 2,4-D, 4-Asetik asit, 2-etil ester) etkisiyle direkt somatik embriyogenesi gerçekleştirdiklerini ifade etmişlerdir.

İnce (2003), Demre Sivrisi biber çeşidine ait tohumlarından elde edilen fidelerin hipokotil, kotiledon ve gerçek yaprak parçacıklarını, farklı hormon kombinasyonları içeren MS besin ortamlarında kültüre almıştır. Araştırma sonucunda, denenen bitki büyüme düzenleyicilerin tamamı kullanılan tüm eksplantlar için kallus oluşumunu teşvik etmiştir. En iyi sürgün gelişimi, 4 günlük kotiledon eksplantlarında 2 mg/l BAP içeren MS besin ortamlarında, hipokotil ve birinci gerçek yaprak eksplantlarından ise 0.1 mg/l NAA+ 2 mg/l BAP kombinasyonund elde edilmiştir. Oluşan sürgünler 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamında ya da 0.5 mg/l IAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Köklendirilen bitkiler ilk olarak saksılara daha sonra sera koşullarına aktarılmıştır.

Kumar et al. (2005), Arka abhir ve Arka lohith hint acı biber çeşitlerinde kotiledon, apikal meristem ve kök eksplantlarını kullanarak *in vitro* koşullarda direk sürgün gelişimini başarıyla sağlamışlardır. Belirtilen biber çeşitlerinde rejenerasyon potansiyelini, eksplantları adaksiyel olarak besin ortamına transferi sonucu yükseltmişlerdir. Apikal meristem, kotiledon ve yapraklar adaksiyel pozisyonda tomurcuk geliştirme ortamına yerleştirmişlerdir. Besin ortamı olarak 2-(N-morpholine) Ethanesulphonicacid (MES), BA, IAA ve gümüş nitrat içeren MS

besin ortamı kullanılmıştır. Çalışma sonucunda geliştirdikleri protokolün biber rejenerasyonu için etkili bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Qin et al. (2005), biberde kotiledon eksplantlarından bitki rejenerasyonunda farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini araştırmışlardır. Çalışmada 8 farklı biber çeşidinin kotiledon eksplantlarını ve farklı bitki büyüme düzenleyici içeren MS ortamını kullanmışlardır. Rejenerasyon denemelerinde, sürgün indüksiyonu, sürgün uzaması, köklendirme ve dış koşullara alıştırma çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. AgNO₃ önemli oranda sürgün gelişimini teşvik etmiştir. GA₃ ise sürgün uzamasında anahtar rol oynamıştır. Boyu uzatılmış sürgünler ise IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Köklendirilen bitkicikler, dış koşullara başarıyla aktarılmıştır.

Thamidala and Karampuri (2006), MS ortamında yetiştirilen biber bitkisinden alınan meristematik eksplantları, mikroçoğaltımı sağlamak amacıyla farklı sitokinin (BA, Kinetin, Zeatin, Kinetin, Thidiazuron) içeren ortamlara aktarmışlar, en yüksek sürgün üretiminin Thidiazuron içeren MS ortamında oluştuğunu belirtmişlerdir.

Rodeva et al. (2006), 3 farklı Bulgar biber çeşidine ait kotiledon ve hipokotil eksplantlarını kullanarak rejenerasyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla, 1-3 mg/l BAP, 1 mg/l IAA, 0.5 mg/l GA₃ içeren MS besin ortamı kullanmışlardır. Tüm çeşitler için hazırlanan tüm besin ortamlarında yüksek seviyede kallus ve organ gelişimi tespit edilmiştir. Bitki rejenerasyonu en yüksek 3 mg/l BAP içeren besin ortamındaki içeren kotiledon eksplantlarından elde edilmiştir.

Ercan vd. (2006), biber çeşitlerinden Kekova ve Sera Demre-8'in kış mevsiminde ısıtılmaksızın sera ortamında ve yaz mevsiminde arazi ortamında büyütüldüğünü, çiçek tomurcuklarının toplanıp, kış mevsiminde kasım ayından Mayıs ayına, yaz mevsiminde nisan ayından aralık ayına kadar bir hafta aralıklarla ekiminin yapıldığını, mevsimsel etkilere bağlı olarak biber çeşitlerinin farklı embriyogenik cevaplar verdiğini, Kekova çeşidinin yaz mevsiminde, Demre çeşidinin ise kış mevsiminde en yüksek embriyogenik ürün verdiğini ve her iki

mevsimde de en yüksek oranda embriyo gelişiminin 4 aylık bitkilerden elde edildiğini ifade etmişlerdir.

Kumar et al. (2007), yaptıkları çalışmada biberin kök ve kotiledonundan almış oldukları 6 parçayı, 6 mg/l BAP bulunan MS ortamına aktarılmışlardır. Parçaların apikal kısmından sadece sürgün, orta kısmından kök ve bazal kısmından ise çok sayıda sürgün oluştuğunu gözlenmişlerdir. Hipokotil kısımlarından elde edilen sürgünlerde önemli oranda köklenme gözlenmiş ve önemli bir kısmı bitkiciklere dönüştürülmüştür. Bu bitkiciklerin kök, apikal meristem ve yapraklarından alınan eksplantlar, BA, IAA, gümüş nitrat ve 2 mg/l MES (metanosülfonik asid)'lik ortamlara transfer edilmişlerdir. Bu işlemlerin sonucunda köklenme (%75) ve bitki oluşumu (%82) gözlenmiştir.

Mok and Norzulaani (2007) *Capsicum annuum* var Kulai'nin 8-14 günlük fidelerinden hipokotil ve kotiledon eksplantlarını çeşitli BAP ve IAA konsantrasyonları içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Çalışmada eksplant tiplerinin etkisi, fidelerin gelişim evreleri ve farklı ortamlarda alt kültür süreleri incelenmiştir. Hipokotillerden elde edilen genç dokuların, yaşlı dokulara göre daha fazla tomurcuk oluşturduğu gözlenmiştir. Hipokotil eksplantlarının kotiledon eksplantlarına göre daha iyi tepki gösterdiği belirlenmiştir. Her iki haftada bir eksplantların kahverengileşmesini önlemek ve adventif tomurcuk oluşumu ve gelişimini teşvik etmek için alt kültür yapılmıştır. Hipokotil eksplantlarda optimum tomurcuk oluşturma etkinliği 2 hafta boyunca 3 mg/l BAP ve 0.3 mg/l IAA içeren MS ortamına alındıktan sonra 2 mg/l BAP ve 0.15 mg/l IAA içeren MS ortamlarına transfer edilmesi ile elde edilmiştir. Tomurcuk oluşum yüzdesi 75.48 ± 4.71 olarak tespit edilmiştir.

Sanatombi and Sharma (2007a), yaptıkları çalışmada, *in vitro* ortamda yetiştirilen bitkilerden alınan sürgünleri BAP içeren (6-Benzilaminopürin) MS ortamına ve IAA, Kinetin, BAP kombinasyonu içeren MS ortamına transfer etmiştir. En yüksek sürgünler Kinetin ve BAP içeren ortamda gözlenmiştir. Sürgünlerde, IBA içeren ortamlarda köklenme gözlenmiştir. Köklendirilen bitkicikler başarılı bir biçimde toprağa aktarılmıştır.

Sanatombi and Sharma, (2007b), yaptıkları çalışmada, biberin 3 farklı türünden elde edilen yaprak, kotiledon ve hipokotil eksplantlarından direkt organogenez yoluyla *in vitro* üretim sağlamışlardır. Yaprak ve kotiledon eksplantları hipokotil eksplantlarından çok daha fazla sayıda sürgün üretmiş ve maksimum sürgün sayısı 6-BAP ve 3-IAA içeren MS ortamında gözlenmiştir. Köklendirme işlemi 2.8 M'lık IAA ve 2.4-2.9 M'lık IBA ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Dört hafta bekletilen köklenmiş bitkicikler, dış ortama adaptasyon amacıyla toprağa aktarılmıştır. Dış koşullara aktarılan bitkiciklerin canlılık oranı %90 olarak tespit edilmiştir.

Sanatombi and Sharma (2007c), *in vitro* koşullarda çimlendirdikleri biber bitkisinden alınan eksplantları, BAP, IAA ve Kinetin içeren MS ortamlarına aktarmışlar, en yüksek miktarda sürgün oluşumunun BAP ve Kinetin içeren MS ortamlarında meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Sanatombi and Sharma (2007d), bir süs biberi olan *Moruk amuba* 'dan alınan eksplantların sadece sitokinin içeren veya Sitokinin+IAA içeren MS ortamlarına aktarıldığında, en yüksek sürgün oluşumunun sırasıyla Zeatin ve BAP içeren IAA kombinasyonlu MS ortamlarında tespit edildiğini ifade etmişlerdir.

Sanatombi and Sharma (2008), Capsicum cinsine ait altı farklı çeşidin (Umorok, Meiteimorok, Haamorok, Mashingkha, Chiengpi ve Uchithi) yaprak, kotiledon ve hipokotil kısımlarından *in vitro* rejenerasyon protokolü geliştirmiştir. En yüksek sürgün gelişimlerini yaprak ve kotiledon eksplantlardan MS + 8.8 μ M BAP + 11.4 μ M IAA içeren ortamlarda elde etmişlerdir. Gelişen sürgünler 2.8-5.7 μ M IAA ve 2.4-4.9 μ M IBA içeren farklı ortamlarda en iyi köklenme göstermişlerdir. Sera koşullarına aktarılan bitkicikler %90 oranında canlılıklarının sürdürmüşlerdir.

Kaparakis and Alderson (2008), sitokininlerin somatik embriyogenesis üzerine olan etkisini araştırmışlar, BA ve Zeatin hormonlarının somatik embriyogenesisi azalttığını, Kinetin ve 2IP hormonlarının ise somatik embriyogenesis üzerinde önemli bir etkisi olmadığını belirtmişlerdir.

Aboshama (2011), iki farklı biber genotipine ait hipokotil eksplantlarından etkili bir direk somatik embriyogenesis protokolü geliştirmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda TDZ ve 2,4-D ilave edilmiş besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamı olarak WPM ve MS olmak üzere iki farklı besin ortamı kullanılmıştır. Ayrıca farklı sakkaroz konsantrasyonları denenmiştir. Somatik embriyo oluşum sayısı açısından WPM'nin MS'e göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. En yüksek embriyo sayısının ise 80 g/l sakkaroz içeren WPM besin ortamında olduğu bildirilmiştir. Besin ortamına eklenen 1 mg/l AgNO₃, somatik embriyo oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına somatik embriyo sayısını artırmıştır. 1.5 ve 2 mg/l AgNO₃ konsantrasyonları ise somatik embriyogenesisi olumsuz etkilemiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bitkicikler, dış koşullara aktarılmış ve 21 gün sonra %54 oranında yaşama oranı tespit edilmiştir.

Aniel Kumar and Tata (2010), *Capsicum annuum* var. Kulai'nin 8-14 günlük fidelerinden hipokotil ve kotiledon eksplantlarını çeşitli BAP ve IAA konsantrasyonları içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Çalışmada eksplant tiplerinin etkisi, fidelerin gelişim evreleri ve farklı ortamlarda alt kültür süreleri incelenmiştir. Hipokotillerden elde edilen genç dokuların, yaşlı dokulara göre daha fazla tomurcuk oluşturduğu gözlenmiştir. Hipokotil eksplantlarının kotiledon eksplantlarına göre daha iyi tepki gösterdiği belirlenmiştir. Her iki haftada bir eksplantların kahverengileşmesini önlemek ve adventif tomurcuk oluşumu ve gelişimini teşvik etmek için alt kültür yapılmıştır. Hipokotil eksplantlarda optimum tomurcuk oluşturma etkinliği 2 hafta boyunca 3 mg/l BAP ve 0.3 mg/l IAA içeren MS ortamına alındıktan sonra 2 mg/l BAP ve 0.15 mg/l IAA içeren MS ortamlarına transfer edilmesi ile elde edilmiştir. Tomurcuk oluşum yüzdesi %75.48±4.71 olarak tespit etmişlerdir.

Kumar et al. (2012a), adventif sürgün tomurcuklarını, X235 biber genotipinin 14 günlük kotiledon eksplantlarını kullanarak *in vitro* koşullarda elde etmişlerdir. Çalışmada bitki büyüme düzenleyicilerinden BAP ve IAA'nın çeşitli konsantrasyonlarını kullanarak sürgün tomurcuğu farklılaşması için kotiledon eksplantlarını kullanmışlardır. Test edilen ortamlar arasında 5mg/l BAP ve 1 mg/l IAA içeren MS ortamında kültüre alınan bitkiler eksplant başına maksimum sürgün (19.2) oluşumunu gerçekleştirmiştir. Etkili *F* sürgün uzaması ve köklenmesi

sırasıyla 0.5 mg/l GA₃ ve 0.5 mg/l IBA içeren MS ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Köklenmiş bitkiler dış koşullara aktarılmış ve bitkilerin hayatta kalma oranı %80-90 arasında bulmuşlardır.

Bonilla and Chen (2015), Şili biberine ait sürgün ucu ve nod eksplantlarından *in vitro* bitki rejenasyonu üzerine BA ve IAA'nın etkisini araştırmışlardır. Çalışmada farklı BA ve IAA konsantrasyonlarını kullanarak başarılı bitki rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Sürgün ucu kültürü denemelerinde önemli bir farklılık olmamasına rağmen, nod eksplantlarını kullandıklarında BA ve IAA içermeyen ortamlarda ve 8.88-22.2 µM BA içeren ortamlarda daha çok sürgün geliştiğini bildirmişlerdir. 44.4 µM BA içeren ortamlarda ise çoklu sürgün yoğunluğu olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sürgünler, 5.71 ya da 11.42 µM IAA içeren ortamlarda köklendirilmiştir. Köklenen bitkicikler, dış koşullara başarıyla alıştırılmıştır.

Orlinska and Nowaczyk (2015), 4 farklı biber çeşidinde farklı eksplant tiplerini kullanarak *in vitro* bitki rejenerasyon çalışmalarını yürütmüşlerdir. Çalışmada California Wonder (ATZ X Sono) F1, Jalapeno ve SF-9 çeşitlerini kullanmışlardır. Organogenesis çalışmalarını 2 mg/l glisin, 2 mg/l etan sülfonik asit, 1.7 mg/l AgNO₃, 0.4 mg/l IAA ve 6 mg/l BA içeren MS ortamında gerçekleştirmişlerdir. Kullanılan çeşitlerin üçünde organogenesisin etkinliğinin benzer olmasına rağmen SF-9 çeşidinde organogenesis başarısı daha düşük olarak tespit edilmiştir. Ortamdaki glisin eksikliğinin direk organogenesisi teşvik ettiği belirlenmiştir. Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi amacıyla 1.1 mg/l IAA içeren MS ortamı kullanılmıştır. Dışarıya aktarılan bitkilerin, %86-97 arasında yaşama oranına sahip olduğu belirlenmiştir.

Grozeva and Todorova (2015), biberde *in vitro* bitki rejenerasyonu çalışmalarını gerçekleştirmiş ve elde ettikleri bitkilerde karakterizasyon çalışmaları yürütmüşlerdir. Çalışmalarında iki biber genotipine ait hipokotil ve kotiledon eksplantlarını, besin ortamı olarak MS0 besin ortamı kullanmışlardır. MS0 besin ortamında bulunan makro ve mikro elementlerinin konsantrasyonlarında değişiklik yapmışlar, 1/2, 1/4, 1/2 ve 3/4 MS0 oranlarını kullanmışlardır. Besin ortamına 3 mg/l BA, 0.3 mg/l IAA, 0.3 mg/l GA₃ eklenmiştir. Kontrol ortamı içerisinde

indirekt rejenerasyon sıklığı daha yüksek bulunurken, elde edilen sürgünlerin uzamasında, 0.2 mg/l AgNO_3 ve 0.3 mg/l GA_3 , 1, 1/2 MS0 ortamının daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Rejenerasyon sonucunda elde edilen R0 bitkiciklerinde morfolojik karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Morfolojik karakterizasyonda bitki boyu, meyve ağırlığı, yaprak ebadı ve meyve başına düşen tohum sayısı hesaplanmıştır. R1 bitkilerinde ise bitkilerin morfolojisi ve üretkenliği ebeveyleleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen bireylerin birçoğunun ebeveynlerine göre daha kısa, daha kalın perikarplı ve bitki başına daha düşük üretkenliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Gammoudi et al. (2017), rekalsitrant olarak tanımladıkları biberde etkili bir rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Çalışmalarında tomurcuk oluşumunu teşvik etmek amacıyla 22 μM BA ve 5.71 μM IAA içeren MS ortamı kullanmışlardır. Toplam 8 farklı biber çeşidine ait kotiledon ve hipokotil eksplantlarını etilen inhibitörü olan AgNO_3 içeren ve içermeyen ortamlarda kültüre almışlardır. AgNO_3 içeren ortamlarda tomurcuk ve kallus oluşumunun her eksplant tipinde de daha düşük olduğu belirlenmiştir. Fakat sürgün gelişiminin AgNO_3 içeren ortamda daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Sürgünlerin uzatılması amacıyla 2.88 μM GA_3 ya da 34.5 μM 1-amino siklopropan-1-karboksilik asit kullanılmıştır. Çalışma sonucunda köklendirilmiş ve dış koşullara aktarılmış bitkilerin, AgNO_3 içeren besin ortamlarından elde edildiği belirlenmiştir.

Hegde et al. (2017a), Bharat ve Indra F1 çeşitlerinin tohumlarını in vitro şartlarda çimlendirmiş, çimlenen tohumlardaki kotiledon eksplantlarını kullanarak rejenerasyon sağlamışlardır. İki türün tohumlarına çimlendirme için farklı uygulamalar yapılmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirilmiş olan Tohumlar 1/2 MS besi yerinde kültüre alınmış ve rejenerasyon sağlanmıştır. Tohumlar Kültüre alınmadan önce iki gün boyunca su ve 2 mg/l GA_3 'de bekletilen tohumlarda çimlenme oranları sırasıyla %90.45 ve % 84.59 olarak belirlenmiştir. Ayrıca tohumların çimlenmesinde geçen gün sayısının sırasıyla 9.67 ve 10.33 olarak belirlemişlerdir. Kotiledon eksplantlarının besi yerleri ile temas eden abaksiyal ve adaksiyal kısımları arasındaki farklılıklarda belirlenmiştir. Doku kültürü çalışmaları sonucunda genotip, eksplantların besi yerine temas eden kısımları ve bitki büyüme düzenleyicilerinde farklılıkları saptamışlardır. İnda çeşidinde 7.5 mg/l

zeatin ve 2 mg/l GA₃ içeren MS besisi yerinde abaksial kısmı besisi yerine temas eden eksplantlarda maksimum rejenerasyon oranını %96.3, eksplant başına düşen sürgün sayısını 4.56, sürgün uzama katsayısını %82.1 olarak saptanmışlardır. Rejenere olan sürgünleri köklenmeleri için 0.5 mg/l IBA içeren MS besisi yerine aldıklarında %100 oranında köklenme elde etmişlerdir. Dış ortama aktarılan bitkilerin hayatta kalma oranını Indra çeşidinde %92.31, Bharat da ise %85.71 olarak tespit etmişlerdir.

Hegde et al. (2017b), *Capsicum annuum* F₁ hibridlerinde (Bharat ve Indra) hipokotil eksplantlardan rejenerasyon çalışması yapmışlardır. Eksplantlar steril koşullarda çimlendirilmiş bitkiciklerden alınmıştır. Her iki hibridin tohumları çimlendirmeyi kolaylaştırmak için 2 mg/l GA₃ içeren distile su içerisinde ıslatılmıştır. En yüksek rejenerasyon ve uzama oranı sırası ile % 44 ve % 66.85 ile Indra hibrid çeşidinden 7.5 mg/l zeatin ve 2 mg/l GA₃ içeren ortamda elde edilmiştir. Indra ve Bharat hibrit çeşitlerinden 0.5 mg/l IBA içeren MS ortamında elde edilen optimum kök sayısı sırası ile 27.56 ve 23.65 olarak, kök uzunlukları ise 4.94 cm ve 7.71 cm olarak bildirilmiştir.

Ashwani et al. (2017), *Capsicum frutescens* türünün KT-OC ve BOX-RUB çeşitlerinde yaprakların proksimal bağlantı kısımlarını sürgün gelişimi için kültüre almışlardır. KT-OC çeşidinde yaprak proksimal bağlantı kısımlarından 44.4 µM BA +5.71 µM IAA+ 10 µM Gümüş nitrat ve 1.98 mg/l içeren MS besisi yerinde maksimum 8- 10 adet sürgün elde edilmiştir. Eksplantlardan 4 haftalık kültür süresince %60 oranında sürgün gelişimi elde etmişlerdir. Aynı besisi yerinde kültüre alınan petiyol eksplantlarında ise eksplant başına 2-4 adet sürgün oluşumu saptamışlar ve %40 oranında sürgün gelişimi olduğunu belirtmişlerdir. Kotiledon yaprakların proksimal kısımlarının kesilmesi ile elde edilen eksplantlarda en etkili sürgün tomurcuğu oluşumu %100 oran ile 22.2 µM BA ve 14.68 µM PAA içeren MS besisi yerinde sırasıyla KT-OC ve BOX RUB çeşitlerinde 10±1.7 ve 8±1.9 olacak şekilde belirlemişlerdir. Etkili sürgün uzaması 22.2 µM BA + 14.68 µM PAA+10 µM Gümüş nitrat içeren besisi yerinde olduğu belirtilmiştir. Elde edilen sürgünler hormonsuz ½ MS besisi yerinde %70 oranında köklendirilmiştir.

Renfiyeni et al. (2017), Kampung, Kopay ve Trisula çeşitlerini 30 g/l sükröz, IAA, BA, NAA ve TDZ içeren MS besi yerinde kallus, sürgün ve kök oluşumu için kültüre almışlardır. En etkili besi yerinin 4 mg/L BAP, 0.5 mg/L L2 vitamini içeren MS besi yerinde olduğunu belirtmişlerdir. En iyi sürgün gelişimi ve uzama 1 mg/L BAP, 5 mg/L AgNO₃ 2 mg/L GA₃ ve 2 mg/L Kalsiyum pentotnat ve L2 içeren besi yerinde olduğunu belirtmişlerdir. Köklendirme için ise en etkili besi yerini 0.4 mg/L NAA içeren Woody plant medium olarak belirtmişlerdir.

Bhutia et al. (2018), Dalle Kurshani çeşidinde rejenerasyon kapasitelerini ve salisilik asit uygulmasının etkisini görmek için yapmış oldukları çalışmada kotiledon, sürgün ucu ve hipokotil eksplantlarını kullanmışlardır. Eksplantlar farklı büyüme düzenleyicileri ile kombine edilmiş ve 500 µM salisilik asit içeren MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Her üç eksplant tipinde de rejenerasyon sağlanmış olsa da en etkili sürgün gelişimi 2.75 ile kotiledon eksplantlarında gözlemlenmiştir. Araştırmacılar 4 mg/l TDZ ve 500 µM salisilik asit içeren MS besi yerini eksplant başına 2.93 sürgün oranı ile indirek rejenerasyon için en etkili besi yeri olarak belirlemişlerdir. 2 mg/l GA₃ ve 0.5 mg/l IAA içeren MS besi yerinin sürgün uzaması (3.1±0.33) ve köklenme (6.35±0.98) için en etkili besi yeri olduğunu belirtmişlerdir.

Haque and Gosh (2018), Meksika ve Hindistan'ın farklı yerlerinden toplanmış olan 10 farklı biber türünde sürgün gelişimi in vitro rejenerasyon denemeleri kurmuşlardır. Tohumların çimlendirilmesi için 30 g/l sükröz içeren ½ MS besi yeri kullanmışlardır. Tohumların çimlenmesinden elde edilen sürgünlerin nodları BA ve IAA içeren MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Rejenerasyonda genotiplere göre farklılıklar belirlenmiştir (Sürgün oluşumları, 8.9±5.2 Capsi-10, 15.3±0.69 Capsi 5). En etkili kök oluşumu 2 mg/l IBA+1 mg/l NAA+1.5 mg/l Spermidin içeren MS besi yerinde en düşük Capsi 9'da 18.4±0.2 en yüksek Capsi-5'te 36.8±0.29 olarak belirlenmiştir. Dış ortama aktarılan bitkiciklerin yaşama oranlarını %40-86.7 olarak belirtmişlerdir.

Patil et al. (2018) *Capsicum annuum* L. tohumlarındaki düşük çimlenme problemini çözmek için benzylaminopurin (BAP)'in tohum çimlenmesi ve sürgün ucu ve boğum segmentlerinden mikroçağaltımı teşvik etmesindeki etkisini araştırmışlardır. Eksplantların in vitro'da gelişen bitkiciklerden elde edildiği bu

çalışmada, tohumların çimlendirilmesi ve sürgün mikroçoğaltımı için farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1, 1.5, 2 ve 2.5 mg/l) BAP içeren bazal MS ortamı kullanılmıştır. Eksplant başına rejenere olan sürgün sayısı, sürgün ucu eksplantlarda boğum segmentlerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Rejenere olmuş sürgünler için en uygun köklenme ortamının ise 0.5 g/l IBA içeren bazal MS ortamı olduğu belirtilmiştir.

Zemene and Worku (2018), Etiyopya’da kültürü yapılan *Capsicum annuum* L. (yeşil biber) da sürgün tomurcuklarını kullanarak başarılı bir rejenerasyon protokolü uygulamışlardır. Kotiledon eksplantların rejenerasyonu için en iyi performansın 6 mg/l 6-benzylaminopurine ve 1 mg/l indole-3-butyric acid içeren MS ortamı olduğu bildirilmiştir. Çalışmada sadece kotiledon eksplantların keskin uç kısımlarından direk rejenerasyon sağlanmıştır. Sürgün tomurcuklarının büyümesi 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IBA içeren MS ortamında gerçekleşmiştir. Güçlü kök gelişimi sağlayan bitkiler sera koşullarına aktarılmış ve %85 oranında hayatta kalma oranı göstermişlerdir.

Literatürde *Capsicum* cinsine ait birçok rejenerasyon çalışması bulunmaktadır. Yapılan diğer rejenerasyon çalışmaları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Bazı biber türlerinde yapılmış rejenerasyon çalışmaları

No	Tür/Çeşit	Eksplant tipi	Rejenerasyon Tipi	BBD+Besin Ortamı	Referans
1	<i>Capsicum annum</i> <i>C. frutescens</i>	Kotiledon Hipokotil	Organogenesis	BA(8.88µM)+IAA (2.85-5.71 µM)	Gunay and Rao (1978)
2	<i>C. frutescens</i>	Zigotik Embriyo	Organogenesis	BA (2.22µM)	Agrawal and Chandra (1983)
3	<i>Capsicum annum</i>	Fide	Organogenesis	BA (2.22-4.44 µM)	Phillips and Hubstenberger (1985)
4	<i>C. annum</i>	Hipokotil, kotiledon, gövde, yaprak, kök, sürgün, embriyo	Organogenesis	BA (2.22µM)+IAA (2.85-5.71 µM)	Agrawal et al. (1989)

Çizelge 2.1 (devamı)

No	Tür/Çeşit	Eksplant tipi	Rejenerasyon Tipi	BBD+Besin Ortamı	Referans
5	<i>C. annuum</i>	Kotiledon, hipokotil	Organogenesis	BA(2.22, 4.40, 8.90 μ M)+IAA (0.57, 5.71 μ M)	Arroyo and Revilla (1991)
6	<i>C. annuum</i>	Fide	Organogenesis	BA (22.2 μ M)+NAA (0.54 μ M)	Ebida and Hu (1993)
7	<i>C. annuum</i>	Olgun Tohum	Organogenesis	MS without PGRs	Ezura et al. (1993)
8	<i>C. annuum</i>	Olgunlaşmamış zigotik Embriyo	Direk Somatik Embriyogenesis	2–10% sucrose, 10% CW, 2,4-D (4.53–22.6 μ M)	Harini and Lakshmi Sita (1993)
9	<i>C. annuum</i>	Olgunlaşmış Zigotik Embriyo	İndirek Somatik Embriyogenesis	3% sucrose 2,4-D (4.52 μ M)	Büyükalaca ve Mavituna (1996)
10	<i>C. annuum</i>	Sürgün	Aksiller Meristem	BA (8.88 μ M)	Madhuri and Rajam (1993)
11	<i>C. annuum</i> <i>C. praetermissum</i>	Sürgün ucu	Aksiller Meristem	BA (66.6, 88.8 μ M)	Christopher and Rajam (1994)
12	<i>C. annuum</i>	Olgunlaşmamış Zigotik Embriyo	Direk Somatik Embriyogenesis	6–10% sucrose, 2,4-D (9 μ M) TDZ (10 μ M)	Binzel et al. (1996)
13	<i>C. annuum</i>	Kotiledon	Organogenesis	BA (8.88 μ M)+IAA (2.85 μ M)+ AgNO ₃ (5.85 μ M)	Hyde and Phillips (1996)
14	<i>C. annuum</i> <i>C. praetermissum</i> <i>C. baccatum</i>	Hipokotil, kotiledon, yaprak	Organogenesis	BA (13.3 μ M)+IAA (5.71 μ M) BA (44.4 μ M) BA (22.2 μ M)	Christopher and Rajam (1996)
15	<i>C. annuum</i>	Yaralanmış hipokotil	Organogenesis	BBD'siz MS ortamı	Ramírez-Malagón and Ochoa-Alejo (1996)
16	<i>C. annuum</i>	kotiledon	-	BA (13, 35 μ M)+IAA (3.4–5.9 μ M)+ EBr (0.1 μ M)	Franck-Duchenne et al. (1998)
17	<i>C. annuum</i>	kotiledon	Organogenesis	BA (22.2–31 μ M)+PAA (14.7 μ M)	Husain et al. (1999)
18	<i>C. annuum</i>	Zigotik Embriyo	Organogenesis	BA (22.2 μ M)+NAA (5.37 μ M)	Arous et al. (2001)
19	<i>C. annuum</i>	Fide, embriyonal eksplant	Organogenesis	TDZ (4.5–9 μ M)	Dabauza and Pena (2001)
20	<i>C. annuum</i>	Yaprak, Kotiledon	Organogenesis	TDZ (4.5–13.5 μ M)	Venkataiah et al. (2003)
21	<i>C. annuum</i>	Kotiledon, genç yaprak	Adventif sürgün oluşumu	BA (17.8, 26.6, ve 35.5 μ M)	Golegaonkar and Kantharajah (2006)
22	<i>C. frutescens</i>	Sürgün ucu	Aksiller çoğaltma	BA (22.2 μ M)+Kin (4.6 μ M)	Sanatombi and Sharma (2007a,b)
23	<i>C. annuum</i>	Kotiledon	Organogenesis	BA (22.2 μ M)+PAA (14.7 μ M)	Joshi and Kothari (2007)
24	<i>C. annuum</i> <i>C. frutescens</i> <i>C. chinense</i>	Yaprak, Kotiledon, hipokotil	Organogenesis	BA (8.8 μ M)+IAA (11.4 μ M)	Sanatombi and Sharma (2008)

2.2 Biberde Gen Aktarım Çalışmaları

Liu et al. (1990), altı farklı dolmalık biber (*Capsicum annum* L.) çeşidinde ve bir adet Guatemalan yabani tipinde *in vitro* rejenerasyon ve transformasyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Yabani tipte, en iyi rejenerasyon oluşmuştur. Yolo Wonder L. çeşidinde 10 mg/l BA ve 1 mg/l IAA'da karanlık koşullarda, sürgün tomurcuklarının uzaması sağlanmıştır. Transformasyon sonrası yaprak benzeri yapılardan sürgün tomurcukları elde edilmesine rağmen GUS testi sonucunda sadece vasküler dokularda ilgili genlerin transfer olduğu belirlenmiştir. Tam anlamıyla transgenik bitki elde edilememiştir.

Mihalka et al. (2003), *Agrobacterium tumefaciens*'in 'Shooter' mutantlarıyla basit, etkili ve üniversal gen aktarım teknolojisini ikili transformasyon sistemi kullanarak geliştirmişlerdir. Çalışmada izopentenil transferaz (*ipt*) geninin ekspresyonuna göre pozitif seçim yapılmıştır. Bitkisel materyal olarak tütün, biber, domates ve kavun çeşitleri kullanılmıştır. 'Shooter' mutantlar karşılaştırıldıktan sonra, özel suşların, tütün yaprağı eksplantlarıyla birlikte ko-kültüvasyonundan sonra sıklıkla fenotipik olarak normal sürgünler ürettiği belirlenmiştir. Elde edilen sürgünler, apikal baskınlık göstermiştir. Bu suşlara binary vektörler verildiğinde, büyüme düzenleyici içermeyen ortam üzerinde seçici olmayan koşullar altında üretilen bazı rejenerantlarda kararlı şekilde bütünleşmiş ikili vektör T-DNA dizileri bulunmuştur. Bu tür fenotipik olarak normal transformantlar tipik olarak sabit olarak entegre edilmiş bir *ipt* genini içermediğini belirlemişlerdir.

Delis et al. (2005), Bryza biber çeşidinde *Agrobacterium tumefaciens* ve hipokotil eksplantlarının kokültürü sonucunda meydana gelen farklılaşma ve yapısal değişimleri araştırmışlardır. Bu amaçla, Bryza biber çeşidi hipokotil eksplantlarında 5 mg/l BAP ve 1 mg/l IAA içeren MS besin ortamında *in vitro* organogenesis teşvik edilmiştir. Daha sonra hipokotil eksplantları *A. tumefaciens* LBA 4404 (pBI121) ile muamele edilmiştir. İki günlük kültür süresinden sonra ilk hücre bölünmeleri epidermis ve kortekste gözlenmiştir. 6-7 gün sonra ise eksplantların %58.4'ünde birçok adventif tomurcuk oluşumu gözlenmiştir. Kültürün ileri aşamalarında ise eksplantların %8.4'ünün tomurcuktan sürgüne dönüştüğü belirlenmiştir. Histolojik analiz sonuçlarında ise hipertrofi ve kortekste

nekrotik hücrelerin varlığı gözlenmiştir. Nekrotik değişiklikler ayrıca vasküler demetlerde de gözlenmiştir. Kanamisin içeren seçici besin ortamı içerisinde *A. tumefaciens* ile birlikte hipokotil eksplantlarının kokültüvasyonu ile hipokotil meristematik dokularının oluşumu güçlü bir şekilde etkilenmiştir. Bu durum vasküler demetlerdeki adventif tomurcukların nekrosisine neden olmuştur.

Solanacea familyasının birçok üyesinin doku kültürü rejenerasyonuna bakıldığında, özellikle biber ve tatlı biberin (*Capsicum annum* L.) rejenerasyon ve transformasyon konusunda oldukça inatçı olduğu görülmektedir. Yapılan birçok çalışma, rejenerasyon ve transformasyon optimizasyonunun sağlanmasına yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda farklı rejenerasyon yöntemlerinin optimizasyonu ile bu konuda büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Literatürde yapılmış olan diğer transformasyon çalışmaları Çizelge 2.2’de sunulmuştur.

Çizelge 2.2 Bazı biber türlerinde yapılmış transformasyon çalışmaları

Tür	Transformasyon	Eksplant	Sonuç	Referans
<i>C. annum</i>	Agrobacterium strains A282 and C58; pCV 3850 (nptII, gus)	Hipokotil, kotiledon, yaprak	GUS pozitif	Liu et al. (1990)
<i>C. annum</i>	<i>A. tumefaciens</i> strain LBA 4404, p5T35 AD (acetolactate synthase (ALS) gene, gus, pSLJ 1911, (npt II, gus), pWTT2039 (hpt, gus)	Kotiledon	Transforme dokular, GUS pozitif	Engler et al. (1993)
<i>C. annum</i>	<i>A. tumefaciens</i> strain LBA 4404, pROK1/105 (CMV I ₁₇ N-Satellite RNA)	Kotiledon	Transforme bitkiler (%4 transformasyon frekansı)	Lee et al. (1993)
<i>C. annum</i>	nptII <i>A. tumefaciens</i> strain GV 3III-SE, (CMV-CP, nptII)	Genç yapraklar	Transforme bitkilerde gen (CMVCP) ekspresyonu	Zhu et al. (1996)
<i>C. annum</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Genç yapraklar	Transgenik hatlar	Kim et al. (1997)
<i>C. annum</i>	pROK1/105 (cmv. Satellite RNA, nptII)	Kotiledon	Transgenik bitkiler	Manoharan et al. (1998)
<i>C. annum</i>	<i>A. tumefaciens</i> strain EHA 105, (pBI 121)(npt II, gus)	Yaralama	Saçak Kökler	Jayashankar et al. (1997)
<i>C. annum</i>	<i>A. rhizogenes</i> strain K 599(gus)	Hipokotil ve kotiledon	%40.8 transgenik bitkiler	Li et al. (2003)
<i>C. annum</i>	<i>A. tumefaciens</i> strain LBA 4404(nptII) <i>A. tumefaciens</i> strain EHA 105, LBA	Hipokotil ve kotiledon	Kallus aşamasında transforme bitkiler	Lee et al. (2004)
<i>C. annum</i>	4404,pCAMBIA 2300(TMV-CP,PPII) <i>A. tumefaciens</i> strain	hipokotil	Transforme sürgünler	Delis et al. (2005)
<i>C. annum</i>	LBA4404, pBI121(nptII) PEG mediated transformation, pCAMBIA:Ac(hpt, gus)	Mezofil protoplastlar	Transformasyon ve kısa süreli gen ifadesi	Jeon et al. (2007)
<i>C. frutescens</i>	EHA 101 harbouring binary vector pTCL5	Hipokotil segmentler	Transformasyon	Hasnat et al. (2008)

Kumar et al. (2009), açık tozlanan iki dolmalık biber varyetesi olan Arka Gaurav ve Arka Mohini çeşitlerine *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarım çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada *A. tumefaciens*'in EHA105 ırkını kullanarak B-glucuronidase (*uid A*) ve higromisin fosfotransferaz II (*hpt II*) genlerini aktarmışlardır. T0 ve T1 hatlarının farklı gelişme evrelerinde GUS histokimyasal testi, PCR, Southern blot ve RT-PCR analizlerini yaparak transgenik hatların seçimlerini yapmışlardır. Sonuçta %17.8 ve %11.4 oranında T0 Arka Gaurav ve Arka Mohini transgenik hatlarının kimerik olduğunu belirlemişlerdir. Bu hatlardan %35 ve %29 oranında kimerik bitkiler tespit etmişlerdir.

Tonoplastta bulunan NHX-tip antiportörlerin birçok bitki türünde tuz toleransını arttırdığı ve bunu kofulda Na^+ iyonunu dışarı atarak gerçekleştirdiği bilinmektedir (Leidi et al., 2010). Bununla birlikte, şimdiye kadar tanımlanan tüm izoformların, Na^+/H^+ ve K^+/H^+ değişimini katalizlediğini belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, transgenik domates hatlarında yüksek seviyede ifade olan *AtNHX1*'nin tüm büyüme koşullarında geniş K^+ koful havuzlarına sahip oldukları ancak tuz stresi altında zengin Na^+ 'un depolanmasında aynı istikrarı gösteremediklerini belirtmişlerdir. Yüksek seviyede ifade olan *AtNHX1*'ler hücreler arası boşluktaki K^+ 'yı yüksek kapasitede tutarak tuz şokuna karşı direnç göstermişlerdir.

Jung et al. (2011), Biberin genetik transformasyonu için güvenilir ve yüksek verimli bir metot oluşturmuşlardır. Bu amaçla *Agrobacterium* aracılı transformasyon yöntemi kullanmışlar ve *GFP* (yeşil florasan proteini) kullanarak transgenik bitkilerin takibini kolay bir şekilde yapmışlardır. *GFP* genini aktarmak için kallus kaynaklı bir transformasyon (CIT) sistemi kullanmışlardır. *GFP* ekspresyonu T0, T1 ve T2 biberlerinin tüm dokularında gözlenmiştir. Çalışmada 4.200 eksplanttan toplam 38 T0 biber elde edilmiştir. Transformasyon etkinliği genotipe bağlı olarak %0.47 ila 1.83 arasında değişmiştir. Geliştirilen bu teknik, biberin genetik transformasyon sürecinde zaman ve ekonomiden tasarruf sağlamıştır. Ek olarak, *GFP* ile birlikte hedef transgen CaCS (*Capsicum*'un capsaicinoid sentetazını kodlayan bölge) bölgesi kırmızı biber çeşitlerine aktarılmış ve GFP kallus dokularında başarılı bir şekilde gözlenmiştir.

Subramanyam et al. (2011), tuza toleranslı transgenik şili biberlerini (*Capsicum annum* L. var. Aiswarya 2103) geliştirmek için *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 ırkı içinde yer alan *Nicotiana tabaccum*'daki *osmotin* genini aktarmışlardır. Dört haftalık biberlerin yapraklarını transformasyon çalışmalarında eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır. Transformasyonda kullanılan *A. tumefaciens* EHA105 ırkı içinde bulunan pBINASCOSM plazmidindeki, *osmotin* geni ve bitki seçici markır geni *npt II*, *CaMV 35S* promotorunun kontrolü altında ifade olmaktadır. Transgenin integrasyonu ve ifadesi PCR ve Southern blot analizleri ile doğrulanmıştır. T2 şili biberi hatlarında, *osmotin* geninin stabilitesi ve doğrulanması Western blot analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Putatif transgenik hatlardaki klorofil, proline, glisinbetaine, APX, SOD, DHAR, MDHAR, GR ve nisbi su içeriklerindeki artış biyokimyasal analizler sonucu belirlenmiştir. Tuz stresi altındaki putatif transgenik hatlarında *osmotin* geninin yüksek seviyede ifade olduğu ancak morfolojik özellik yönünden kontrol bitkisi ile aynı özelliği taşıdığını görülmüştür. Ürün miktarı bakımından, 300 mM NaCl'de yetiştirilen her bir transgenik hattın, ortalama 3.32 kg meyve verdiği saptanmıştır.

Agrobacterium tumefaciens aracılığıyla yapılan genetik transformasyon, biberde işlevsel genomik kaynakların geliştirilmesi ve önemli agronomik özelliklerin ortaya çıkarılması için kullanılabilecek güçlü bir biyoteknolojik araçtır. Bununla birlikte, biber *agrobacterium* ile transformasyon için yüksek oranda rekalsitrant kabul edilir ve mevcut transformasyon protokolleri ya verimsiz, külfetli veya yüksek genotip bağımlıdır. Biber transformasyonu çalışmalarında genel problem, hem rejenerasyon hem de transformasyon için yetkin olan hücrelerin üretilmemesidir. Heidmann et al. (2011) yapmış oldukları çalışmada, *Brassica napus* *BABY BOOM AP2/ERF* transkripsiyon faktörünün ektopik ekspresyonunun bu problemin üstesinden geldiğini ve rekalsitrant tatlı biber (*C. annum*) çeşitlerinden transgenik bitkilerin rejenerasyonunda kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Transgenik bitkilerde *BABY BOOM*'un geçici aktivasyonu ile prolifik hücre rejenerasyonunu indükleyerek somatik embriyo üretiminin arttırılabileceği bildirilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen veriler ışığında, yüksek oranda rejenerasyon ve transformasyona rekalsitrant sebze çeşitleri için bu sistemin kullanılabileceği bildirilmiştir.

Kumar et al. (2012b), kırmızı biberlerde etkili bir bitki rejenerasyon ve *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon protokolü geliştirmişlerdir. Çalışmalarında, hipokotil eksplantları kullanarak etkili bir *Agrobacterium* ile transformasyon protokolü optimize etmişlerdir. Toplam altı farklı kırmızı biber çeşidi (ACA-10, Kashi Anmol, LCA-235, PBC-535, Pusa Jwala ve Supper) için etkili ve tekrarlanabilir bir oksinsiz rejenerasyon yöntemi geliştirmişlerdir. Altı kırmızı biber çeşidinin fidelerinden alınan eksplantlar (hipokotiller, kotiledon yapraklar ve yaprak diskleri), BAP veya BA/IAA ile kombinasyonu içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. IAA'nın rejenerasyon ortamına eklenmesi ile eksplantların kesilmiş uçlarından kallus oluşumu, rozet yaprakların oluşumu ve ölü sürgün tomurcuklarının oluşumu ile sonuçlanmıştır. Sürgün tomurcuklarının rejenerasyonu, diğer gelişme göstermeyen eksplantlardan farklı olarak, farklı BAP konsantrasyonları içeren MS ortamında kültüre alınan hipokotillerden sağlanmıştır. Çalışmada GA₃'ün sürgün uzatma ortamına 0.5 mg/l konsantrasyonda eklenmesi, LCA-235 ve Supper çeşitlerinde uzamayı arttırırken, diğer çeşitlerde bir tepki göstermemiştir. Biber çeşidi Pusa Jwala'ya *Agrobacterium tumefaciens* yoluyla Chilli yaprak kıvrımı Joydebpur virüsü ile ilişkili satellit DNA β molekülünün β C1 ORF bölgesi aktarılmıştır. Varsayılan transformantlardaki transgen entegrasyonu, PCR ve Southern hibridizasyon analizi ile doğrulanmıştır.

Arthikala et al. (2014), mantar hastalığına dirençli bitkiler geliştirmek için dolmalık biberde bitki transformasyon stratejisinde yer alan doku kültüründen bağımsız *Agrobacterium* aracılı transformasyon yöntemi kullanarak güvenilir bir protokol geliştirmişlerdir. Bu amaçla *NPR1* genini dolmalık biberlere aktarmışlardır. Bu yöntemin, genotipten bağımsız ve çeşitli bitki ürünlerinde kullanılabileceğini bildirerek, geleneksel rejenerasyon bazlı transformasyon protokollerine göre avantajlı olduğunu bildirmişlerdir. Yöntemde temel olarak, apikal meristemin farklılaşan hücrelerinin *Agrobacterium tumefaciens* ile inokülasyonunu izlemişlerdir. Çalışmada belirtilen transformasyon stratejisi ile birlikte, transformasyon etkinliği oldukça yüksek olan sonuçlar elde etmişlerdir. Bu teknolojinin, ekonomik açıdan önemli bitki türlerinden transgenik bitkilerin geliştirilmesinde çok yönlü bir araç olarak kullanılabileceği ve bu yöntemin 3-5 ay daha hızlı sonuç verdiği belirtilmiştir.

Bulle et al. (2016), Şili biberine tuz stresine toleransı artırmak için *TaNHX2* genini aktarmışlardır. Transformasyon çalışmalarında, *TaNHX2* genini taşıyan binary vektörünü içeren *A. tumefaciens* kullanmışlardır. Plazmid içerisinde CaMV 35S promotörü vardır. *NPTII* seçici gen olarak kullanılmıştır. Transformasyon çalışmaları sonucunda genin varlığı PCR ve qRT-PCR analizleri ile doğrulanmıştır. Transgenik bitkilerden T1 bitkileri elde edilmiş ve T1 bitkilerinde bu genin ifade seviyesi kontrol bitkisine göre karşılaştırılmıştır. Ayrıca Southern Blot analizleri ile *TaNHX2* geninin varlığı ve integrasyonu doğrulanmıştır. Bitkilerde ayrıca biyokimyasal analizleri incelemişlerdir. Bu kapsamda prolin, klorofil, superoksit dismutaz, askorpat peroksidaz, relatif su içeriği, H₂O₂ ve malondialdehit içerikleri tuz stresi koşullarındaki transgenik ve kontrol bitkilerinde karşılaştırılmıştır.

Maligeppagol et al. (2016), çalışmalarında iki yerel biber çeşidinin (G4 ve LCA334) *in vitro* rejenerasyonunu optimize etmişler ve ikili vektör pCAMBIA 2301 kullanarak G4 çeşidine, desikasyon uyarıcı promotör rd29A'nın kontrolü altında *dreb1A* transkripsiyon faktörünü aktarmışlardır. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamında bitkilerin *in vitro* rejenerasyonları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; 0.25 mg/l zeatin ve 2 mg/l fenil asetik asit (PAA) en yüksek rejenerasyon oranını (%37.86) vermişlerdir. Eksplantlar arasında kotiledon, hipokotillere (%24.73) kıyasla daha yüksek (%51) bir rejenerasyon tepkisi sergilemiş ve genotip G4, LCA334'e göre daha iyi (%33.80) rejenerasyon oranına sahip olarak tespit edilmiştir. Sürgünlerin köklenmesi, diğer hormonlara kıyasla 2 mg/l indol bütirik asit (IBA) bulunan MS ortamında en yüksek olarak belirlenmiştir. Transgen varlığı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve Southern blotlama ile doğrulanmıştır. Dış koşullara aktarılan transformantlar saksılarda büyütülmüş ve kuraklık toleransı için taranmıştır. Transformantların bazıları, kontrol bitkilerine kıyasla daha düşük solgunluk ile kuraklığa karşı toleransın arttığını göstermiştir.

Chee et al. (2018), *Capsicum frutescens*'te *in vitro* bitki rejenerasyonu ve GFP taraması ile direk transformasyon protokolü geliştirmişlerdir. Biber çeşidi olarak Hotlava çeşidini kullanmışlardır. Transformasyonda biyolistik yöntemini kullanmışlardır. Buna ek olarak hipokotil eksplantlarından başarılı bir şekilde rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir.

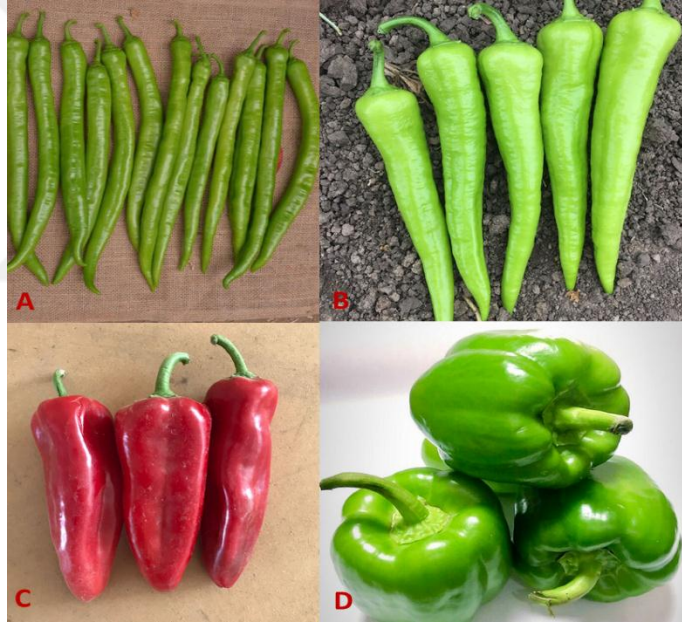
Mahto et al. (2018), yaptıkları çalışmada, iki seçkin Hint biber çeşidi (*Capsicum annuum* L.), Pusa Sadabahar ve Pusa Jwala için etkili bir transformasyon protokolü tanımlamışlardır. Eksplant olarak genç fidelerden elde edilen hipokotiller ve kotiledonlardan rejenerasyon ortamı optimize ederek transformasyon çalışmalarında kullanmışlardır. 1 mg/l IAA ve 5 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantlarından yüksek miktarda sürgün rejenerasyonu sağlanmışlardır. Rejenerasyon frekansı Pusa Sadabahar'da %81 ve Pusa Jwala'da %78 olarak tespit edilmiştir. Transformasyon protokolü, GUS ve *NPT-II* marker genleriyle pCAMBIA2301'yi barındıran LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* ırkı kullanılarak optimize edilmiştir. Sonuç olarak, hipokotil eksplantların her iki çeşit içinde kotiledon eksplantlara göre transformasyona uygun olduğunu göstermiştir. Ayrıca, hipokotil eksplantlarının 72 saat boyunca *Agrobacterium* hücreleriyle ($OD_{600} = 0.2-0.5$) birlikte yetiştirilmesinin, her iki kültür çeşidinde yaklaşık %30'luk yüksek transformasyon verimi elde etmek için en uygun olduğu bulunmuştur. Köklendirilmiş transgenik bitkilerin yaklaşık % 85-90'ı dış koşullarda hayatta kalmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında ve Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yürütülmüştür.

3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Bitkisel Materyaller

Tez kapsamında dört farklı biber tipine ait (Sivri, kapya, çarliston, dolma) dört çeşidin ebeveyn saf hatları rejenerasyon ve transformasyon denemelerinde kullanılmıştır. Bu hatlar AD-Rossen Tarım'dan temin edilmiştir. Biber hatlarına ait görüntüler Şekil 3.1'de sunulmuştur.



Şekil 3.1 Tez çalışmasında kullanılan biber hatlarına ait meyveler, A) Sivri biber, B) Çarliston biber, C) Kapya biber, D) Dolma biber

3.2 *In vitro* Rejenerasyon Denemeleri

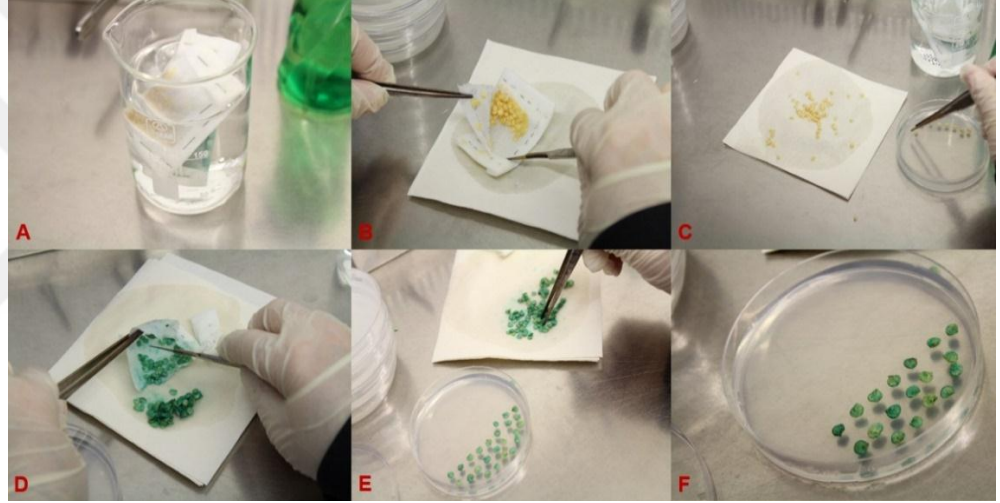
In vitro rejenerasyon denemeleri kapsamında biber hatlarının tohumları *in vitro* koşullarda çimlendirilerek elde edilen genç fidelerin hipokotil ve kotiledon kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. *In vitro* rejenerasyon denemeleri iki aşamada yürütülmüştür. İlk olarak somatik embriyogenesis denemeleri

kurulmuştur. İkinci olarak organogenesis denemeleri kapsamında rejenerasyon çalışmaları yürütülmüştür.

3.2.1 Bitkisel materyallerin hazırlanması

3.2.1.1 Biber tohumlarının yüzey sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu uygulaması, biber tohumları %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dk. bekletme ve bir kez steril saf su ile yıkama, ardından %20'lik sodyum hipoklorit (Domestos®) çözeltisinde 10 dk. bekletme ve ardından 3-4 kez steril saf su ile yıkama işlemi yapılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



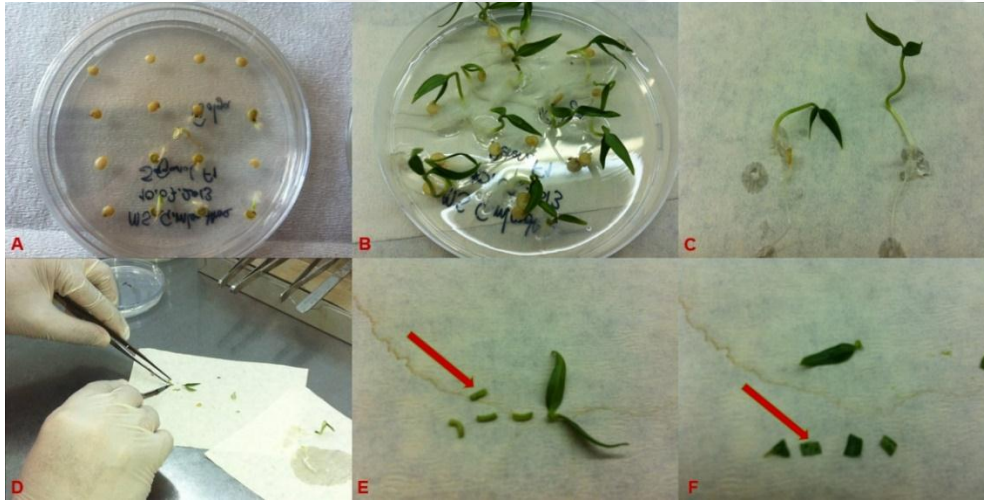
Şekil 3.2 Biber tohumlarının yüzey sterilizasyon aşamaları, A) %70'lik etil alkol ve sodyum hipoklorit uygulamaları sonrası steril saf suda yıkama, B, C, D) Tohumların filtre kağıdından çıkarılması ve fazla suyun emdirilmesi, E ve F) Tohumların çimlendirme ortamına transferi

3.2.1.2 Biber tohumlarının *in vitro*'da çimlendirilmesi

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen biber tohumları, her petride 16 tohum olacak şekilde MS bazal (Murashige and Skoog, 1962) (Çizelge 3.1) (MS bazal ortamı, 30g/l sakkaroz ve 3.5 g/l gelrite, pH:5.7-5.8) ortamı içeren petrilere (90x15 mm) aktararak, karanlıkta $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de kültüre alınmışlardır. Tohumların çimlenerek genç fidelere dönüşümü yaklaşık 9-10 gün sürmüştür (Şekil 3.3).

Çizelge 3.1 MS bazal besi yerinde bulunan makro-mikro, diğer maddeler ve konsantrasyonları (Murashige and Skoog, 1962)

Makro Elementler	mg/l
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂	332.2
KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	36.72
Vitaminler ve aminoasitler	mg/l
Myo-inositol	100.0
Pyridoxine-HCl	50
Nicotinik Asit	50
Thiamin – HCL	10
Glycine	2.0
Diğer	g/l
Sakkaroz	30
Gelrite	3.5
pH	5.7



Şekil 3.3 Biber tohumlarının MS besin ortamında çimlenmesi, A) Kök yapılarının oluşumu, B, C) Çimlenmiş fideler, D, E) Kotiledon ve hipokotil eksplantlar

3.2.1.3 Çimlenen tohumlardan eksplantların hazırlanması

Çimlenen fideciklerin (9-10 gün arası, büyütme odası koşullarında) hipokotil ve kotiledon kısımları pens ve bistüri yardımıyla alınarak rejenerasyon deneme

ortamları bulunan petri kaplarına transfer edilmiş ve kültüre alınmışlardır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 *In vitro* denemelerde kullanılan eksplant tipleri, A) Kotiledon eksplant, B) Hipokotil eksplant

3.2.2 Somatik embriyogenesis denemeleri

Somatik embriyogenesis denemelerinde biber hatları için üç farklı deneme kurulmuştur (Çizelge 3.2). Literatür taraması sonucunda, Binzel et al. (1996), Büyükalaca ve Mavituna (1996), Harini and Lakshima (1993) protokolleri denenmiştir. Somatik embriyogenesis çalışmaları kapsamında, sivri biber, çarliston biber, kapyra biber ve dolma biber hatlarının hipokotil ve kotiledon eksplantlarından gelişen embriyojenik kallus yapıları, embriyo gelişimini sağlamak amacıyla, ön uygulama ve embriyo geliştirme ortamlarında kültüre alınarak gelişimleri takip edilmiştir. Somatik embriyogenesis denemelerinde kontrol grubu olarak BBD içermeyen MS bazal ortamı kullanılmıştır. Gelişen kallus yapılarının rejeneratif özelliğinin belirlenmesi amacıyla kallus hücreleri ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Dört biber (Sivri, kapyra, çarliston, dolma) hattı için 10 tekerrür (petri), her tekerrürde 5 eksplant (5 kotiledon ve 5 hipokotil/petri) olacak şekilde deneme kurulmuştur.

Somatik embriyogenesis denemelerinde incelenen kriterler;

- Kallus oluşum oranı (%)
- Kallus yapısı (Rengi, dağılgan/kırılğan, sert, camsı)
- Embriyo oluşum oranı (%)

Çizelge 3.2 Somatik embriyogenesis denemelerinde kullanılan protokoller ve içerikleri

No	Tür/çeşit	Metod	Eksplant tipi	Ortam içeriği	Referans
1)	<i>Capsicum annuum</i> L. (viz., New Mexico - 6 (NM-6))	Direk somatik embriyogenesis	Hipokotil ve kotiledon	<u>Embriyo geliştirme:</u> MS bazal ortamı+9 µM 2,4-D+%10 hindistan cevizi sütü+%8 sakkaroz+%0.25 phytigel. <u>Embriyo çimlendirme:</u> MS bazal ortamı+%2 sakkaroz+10 µM AgNO ₃ +2.8 µM GA ₃ veya 0.05 µM TDZ	Binzel et al. (1996)
2)	<i>Capsicum annuum</i> var. Ace	İndirek somatik embriyogenesis	Hipokotil ve kotiledon	<u>Embriyojenik kallus geliştirme:</u> MS bazal ortamı+9.05µM 2,4-D+%3 sakkaroz+%0.8 agar <u>Embriyojenik kallus geliştirme 2:</u> MS bazal ortamı (KNO ₃ free)+6 g/L K-citrate+9.05µM 2,4-D+%3 sakkaroz+%0.8 agar <u>Embriyo geliştirme:</u> MS bazal ortamı+10µM NH ₄ NO ₃ +6 g/L prolin+%3 sakkaroz+%0.8 agar <u>Embriyo olgunlaştırma:</u> ½ MS bazal ortamı+1.89 µM ABA+%3 sakkaroz+%0.8 agar	Büyükalaca ve Mavituna (1996)
3)	<i>Capsicum annuum</i> L.	Direk somatik embriyogenesis	Hipokotil ve kotiledon	MS bazal ortamı+%2-10 sakkaroz+%10 hindistan cevizi sütü+4.53 mg/L 2,4-D veya 22.6 mg/L 2,4-D+7 g/L agar	Harini and Lakshima (1993)

3.2.3 Organogenesis denemeleri

Rejenerasyonun etkinliğini arttırabilmek amacıyla biber hatlarının kotiledon ve hipokotil eksplantlarından organogenesis denemeleri kurulmuştur. Organogenesis denemeleri kapsamında besin ortamı içeren petrilere aktarılan eksplantlar büyütme odası koşullarında (16 saat fotoperiyodisite, 25±2°C) kültüre alınmışlardır.

3.2.3.1 Rejenerasyon denemelerinin kurulması

Organogenesis denemelerinde üç farklı protokol denenmiştir. Organogenesis çalışmaları kapsamında kurulan denemeler aşağıda belirtilmektedir;

1. Deneme: MS bazal ortamı, 2,4-D (0, 0.5, 1 ve 2 mg/l)+TDZ (0, 0.5, 1 ve 2), 30 g/l sakkaroz, 1 mg/l MES, 3.5 g/l gelrite

2. Deneme: MS bazal ortamı, BA (1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l)+IAA (0.5, 1 mg/l), 30 g/l sakkaroz, 1 mg/l MES, 3.5 g/l gelrite

3. Deneme: Sanatombi and Sharma (2008) ile Hyde and Philips (1996)'in protokolleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Birinci denemede, 2,4-D (0, 0.5, 1 ve 2 mg/l)+TDZ (0, 0.5, 1 ve 2)'nin toplam 16 kombinasyonu ile deneme kurulmuştur. Dört biber (Sivri, kapa, çarliston, dolma) hattı için her konsantrasyonda 5 tekerrür (petri), her tekerrürde 5 eksplant (5 kotiledon ve 5 hipokotil/petri) olacak şekilde deneme yapılmıştır.

İkinci denemede, BA (1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l)+IAA (0.5, 1 mg/l)'nin toplam 10 kombinasyonu ile deneme kurulmuştur. Dört biber (Sivri, kapa, çarliston, dolma) hattı için her konsantrasyonda 5 tekerrür (petri), her tekerrürde 5 eksplant (5 kotiledon ve 5 hipokotil/petri) olacak şekilde deneme yapılmıştır.

Üçüncü denemede, Sanatombi and Sharma (2008) ile Hyde and Philips (1996)'in protokolleri denemelerde kullanılarak karşılaştırılmıştır. Dört biber (Sivri, kapa, çarliston, dolma) hattı için 10 tekerrür (petri), her tekerrürde 5 eksplant (5 kotiledon ve 5 hipokotil/petri) olacak şekilde denemeler kurulmuştur.

Orgaonogenesis denemelerinde incelenen kriterler:

- Kallus oluşum oranı (%)
- Sürgün gelişim oranı (%)
- Köklenme oranı (%)

Çizelge 3.3 Organogenesis üçüncü denemelerinde kullanılan ortamların içerikleri

	Tür/çeşit	Metod	Eksplant tipi	Ortam içeriği	Referans
1)	<i>Capsicum</i> ssp. (Meiteimorok, Haomorok, Umorok, Chiengpi, Mashingkha, Uchithi)	Direk organogenesis	Yaprak, kotiledon ve hipokotil	<u>Sürgün geliştirme:</u> MS ortamı+8.8 µM BAP ve 11.4 µM IAA+%3 sakkaroz+%0.8 agar <u>Köklendirme:</u> MS ortamı+ 2.8 µM veya 5.7 µM IAA veya 2.4 µM veya 4.9 µM IBA+%3 sakkaroz+%0.8 agar	Sanatombi and Sharma (2008)
2)	<i>Capsicum</i> <i>annuum</i> L.	Organogenesis	Kotiledon	<u>Sürgün geliştirme:</u> MS salt ortamı+L2 vitaminleri+%2 glukoz+0.5 mg/L IAA, 2 mg/L BA+%0.8 phytagar <u>Sürgün geliştirme-2:</u> MS salt ortamı+L2 vitaminleri+%3 glukoz+%0.8+2 mg/L GA ₃ +2 mg/L BA+5 mg/L gümüş nitrat+%0.8 phytagar <u>Köklendirme:</u> MS salt ortamı+Nitsch's vitaminleri+%3 sakkaroz veya glukoz+1.0 mg/L NAA+%0.8 phytagar	Hyde and Philips (1996)

3.2.3.2 Sürgün geliştirme denemeleri

Kotiledon ve hipokotil eksplantlardan rejenere olan sürgünler yaklaşık 1-2 cm boya eriştiğinde sürgün geliştirme ortamına transfer edilmişlerdir. Sürgün geliştirme denemelerinde GA₃ (0, 0.5 ve 1 mg/l)'ün farklı konsantrasyonları denenmiştir.

3.2.3.3 Köklendirme denemeleri

Gelişen sürgünler köklendirilmek üzere 0.5 ve 1 mg/l IAA içeren MS bazal besin ortamı bulunan tüplere aktarılmıştır. Üç hafta süresince büyütme odası koşullarında kültüre alınan sürgünlerin haftalık olarak gözlemleri alınmıştır.

3.2.4 Transformasyon çalışmaları

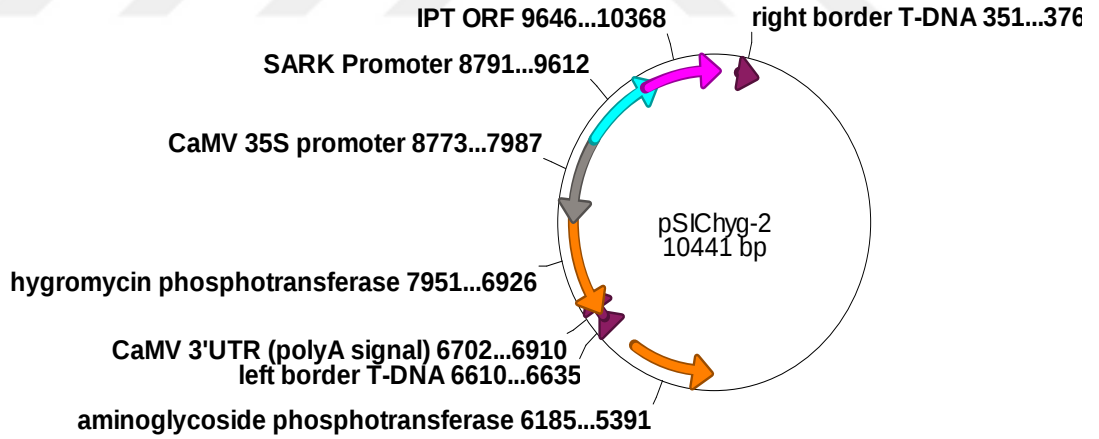
Rejenerasyon denemeleri sonrası her biber hattı için optimizasyon sağlandıktan sonra transformasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1 Transformasyon çalışmalarında kullanılan rekombinant *A. tumefaciens* bakteri ırkları

Transformasyon denemelerinde kullanılan *A. tumefaciens* pSICHyg-2 ve pUBINHX1 rekombinant bakteri ırkları Kaliforniya Davis Üniversitesi Bitki Bilimi Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Eduardo BLUMWALD'dan temin edilmiştir.

-Kuraklığa dayanıklılık genini (*PSARKIPT*) içeren *A. tumefaciens* bakteri ırkı ve özellikleri

A. tumefaciens EHA105 ırkı içerisinde kuraklığa dayanıklılığı sağlayan pSICHyg-2 plazmidi bulunmaktadır. pSICHyg-2 plazmidindeki SARK promotoru kontrolü altında *IPT* (isopentenyl transferase) geninin ifadesi gerçekleşmektedir (Şekil 3.5). Plazmid yapısında bitki seleksiyon markır geni olarak Higromisin fosfotransferaz dayanıklılık geni T-DNA bölgesinde bulunmaktadır. T-DNA bölgesi dışında antibiyotik direnç genleri yer almaktadır (Kanamisin, rifampisin ve spektomisine dayanıklılık genleri) (Şekil 3.5).

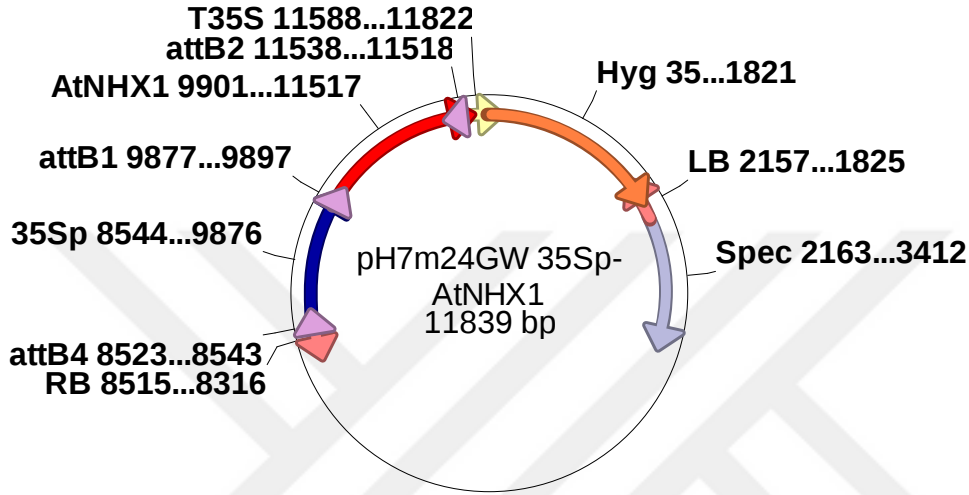


Şekil 3.5 *A. tumefaciens*' deki *PSARKIPT* plazmid yapısı

-Tuzluluğa dayanıklılık genini (*AtNHX1*) içeren *A. tumefaciens* bakteri ırkı ve özellikleri

A. tumefaciens AGL1 ırkı içerisinde tuzluluğa dayanıklılığı sağlayan pUBINHX1 plazmidi bulunmaktadır. pUBINHX1 plazmidindeki CaMV 35S

promotoru kontrolü altında *AtNHX1* (Na-H antiporter) geninin ifadesi gerçekleşmektedir (Şekil 3.6). Plazmid yapısında bitki seleksiyon markır geni olarak Higromisin fosfotransferaz dayanıklılık geni T-DNA bölgesinde bulunmaktadır. T-DNA bölgesi dışında antibiyotik direnç genleri bulunmaktadır (spektomisin, karbensilin ve rifampisin dayanıklılık genleri) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 *A. tumefaciens*' deki *AtNHX1* plazmid yapısı

3.2.4.2. Transformasyonda kullanılacak *A. tumefaciens* bakteri ırklarının yoğunluğunun belirlenmesi ve inokülasyon solüsyonunun hazırlanması

Bakteri çözeltilisinin yoğunluğunu belirlemek amacı ile spektrofotometrik (Nanodrop) ölçüm yapılmıştır. -80°C'de muhafaza edilen (%20' lik gliserol stokta) *Agrobacterium tumefaciens* bakteri ırkları 10 ml sıvı LB (Bertani, 1951) (Çizelge 3.4) içeren ortamda 28 °C' de 200 rpm' de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübe edilen bakteri ırklarının O.D.₆₀₀ =(0.5-0.6) absorbans değeri elde edilerek transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.4 LB besin ortamı içeriği ve antibiyotik dozları

LB Besiyeri (1 L)	g/l	LB Ortamına Eklenen Antibiyotik Miktarları	
		<i>A. tumefaciens</i> EHA105	<i>A.tumefaciens</i> AGL1
Trypton	10	Kanamisin 50 mg/l	Spektomisin 50 mg/l
Yeast ekstrakt	5	Rifampisin 25 mg/l	Rifampisin 25 mg/l
NaCl	10	Spektomisin 50 mg/l	Karbensilin 10 mg/l
Bacto Agar	14		
pH=7			

3.2.4.3 Hipokotil ve kotiledon eksplantların *A. tumefaciens* ile inokülasyonu ve rejenerasyonu

Dokuz gün süreyle karanlık koşullar altında *in vitro*'da çimlendirilen biber tohumlarının kotiledon ve hipokotil kısımları transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Kotiledonlar ikiye ayrıldıktan sonra yara dokusu oluşturmak amacı ile kenarlarından kesilmiştir. Kotiledon kısmı bisturi ile 4 eşit parçaya ayrılarak eksplantlar elde edilmiştir. Hipokotil kısımları da 4 eşit parçaya bölünerek kullanılmıştır. Hazırlanan hipokotil ve kotiledon eksplantlar yoğunluğu $O.D_{600} = (0.5-0.6)$ ayarlanmış *A. tumefaciens* + 200 μ M Asetosiringon çözeltisinde 28°C'de, 100 rpm'de 20 dakika inkübe edilmiştir (Şekil 3.7). İnkübasyon sonrası eksplantlar steril filtre kağıtları üzerinde fazla inokülasyon sıvısı alındıktan sonra 3 gün süresince MS bazal besin ortamında karanlıkta 25°C'de kokültüvasyona bırakılmışlardır. Ön kültür sonrası kotiledon ve hipokotil eksplantlar ön kültür ortamından alınarak boş steril petri kabında, steril saf su ile 4-5 defa yıkanmış ve optimum rejenerasyon ortamları belirlenmiş olan ortamlara aktarılmıştır (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). Deneme süresince eksplantlar iki haftada bir süreyle alt kültüre alınarak taze besin ortamlarına aktarılmıştır. Antibiyotik (Higromisin ve sefuroksim sodyum) ilavesi gereken çalışmalarda, antibiyotik sterilizasyonu 0.2 mikron çapta por genişliğine sahip filtreler kullanılarak yapılmış ve daha sonra otoklav ile steril edilen besin ortamlarına ilave edilmiştir. Otoklav şartları altında antibiyotiklerin protein yapısı bozulacağından besin ortamlarına sonradan eklenmiştir.

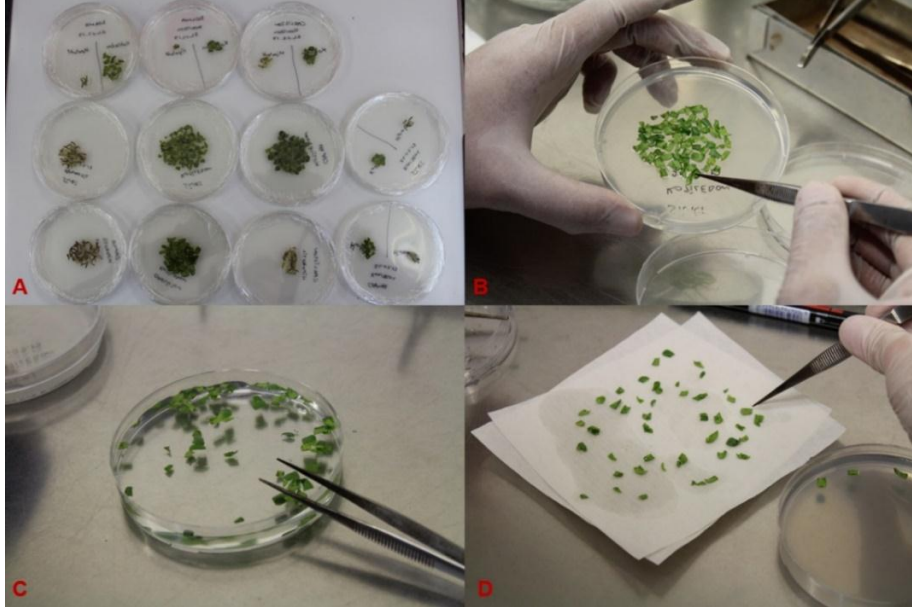
Transformasyon sırasında ve sonrasında izlenen yol;

- Kotiledon ve hipokotil eksplantlarının *Agrobacterium* ile inokülasyonu

- İnokülasyon sonrası ön kültür uygulaması (3 gün karanlıkta)
- Ön kültür sonrası kotiledon ve hipokotil eksplantlarının steril saf su ile yıkanması
- Seçici seleksiyon ortamına (rejenerasyon) transfer edilmesi
- Rejenere olan sürgünlerin geliştirilmesidir.



Şekil 3.7 Transformasyonun aşamaları, A) LB ortamında çoğaltımı gerçekleştirilmiş *Agrobacterium* ırkları, B, C) Kotiledon ve hipokotil eksplantların hazırlanması ve *Agrobacterium* solüsyonu ile inkübasyonu, D, E) Transformasyon uygulaması yapılmış kotiledon ve hipokotil eksplantlarının BBD içermeyen MS besin ortamlarına transferi



Şekil 3.8 Transformasyon işlemi gerçekleştirilmiş biber hatları, A) Ön kültür uygulamaları (3 gün karanlıkta) B ve C) Steril saf su ile yıkama işleminin ardından steril kaba filtre kağıdında eksplantların fazla suyunun emdirilmesi ve antibiyotik içeren besin ortamlarına transferi



Şekil 3.9 Transformasyon sonrası eksplantların hazırlanması, A, B ve C) Transformasyon sonrası eksplantların steril saf su ile yıkanarak fazla bakteri solüsyonunun uzaklaştırılması

Rejenerasyon denemeleri sonucunda, dört biber hattı için transformasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiş en iyi besin ortam ve içerikleri Çizelge 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.5 Sivri biber hattında transformasyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiş en iyi rejenerasyon ortamları ve içerikleri

Sivri Biber Hattı						
Rejenerasyon Ortamı (M1)		Seçiçi Seleksiyon Ortamı (M2)		Sürgün Geliştirme Ortamı (M3)		Köklendirme Ortamı (M4)
Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	0.5 mg/l IAA MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz
4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	2 mg/l BA+1 mg/l IAA	4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	2 mg/l BA+1 mg/l IAA	0.5 mg/l GA ₃	0.5 mg/l GA ₃	
MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		
Antibiyotik içerikleri						
--		500 mg L ⁻¹ sefuroksim sodyum		500 mg L ⁻¹ sefuroksim sodyum		
--		200 mg L ⁻¹ Hygromisin		200 mg L ⁻¹ Hygromisin		

Çizelge 3.6 Kapyta biber hattında transformasyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiş en iyi rejenerasyon ortamları ve içerikleri

Kapya Biber Hattı						
Rejenerasyon Ortamı (M1)		Seçici Seleksiyon Ortamı (M2)		Sürgün Geliştirme Ortamı (M3)		Köklendirme Ortamı (M4)
Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	0.5 mg/l IAA MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz
5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	2 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	2 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	0.5 mg/l GA ₃	0.5 mg/l GA ₃	
MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		
Antibiyotik içerikleri						
--		500 mg L ⁻¹ sefuroksim sodyum		500 mg L ⁻¹ sefuroksim sodyum		
--		200 mg L ⁻¹ Hygromisin		200 mg L ⁻¹ Hygromisin		

Çizelge 3.7 Çarliston biber hattında transformasyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiş en iyi rejenerasyon ortamları ve içerikleri

Çarliston Biber Hattı						
Rejenerasyon Ortamı (M1)		Seçici Seleksiyon Ortamı (M2)		Sürgün Geliştirme Ortamı (M3)		Köklendirme Ortamı (M4)
Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	0.5 mg/l IAA MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz
3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	2 mg/l BA+1 mg/l IAA	3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	2 mg/l BA+1 mg/l IAA	0.5 mg/l GA ₃	0.5 mg/l GA ₃	
MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		
Antibiyotik içerikleri						
--		500 mg L ⁻¹ sefuroksim sodyum		500 mg L ⁻¹ sefuroksim sodyum		
--		200 mg L ⁻¹ Hygromisin		200 mg L ⁻¹ Hygromisin		

Çizelge 3.8 Dolma biber hattında transformasyon denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiş en iyi rejenerasyon ortamları ve içerikleri

Dolma Biber Hattı						
Rejenerasyon Ortamı (M1)		Seçici Seleksiyon Ortamı (M2)		Sürgün Geliştirme Ortamı (M3)		Köklendirme Ortamı (M4)
Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	Hipokotil eksplant	Kotiledon eksplant	0.5 mg/l IAA MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz
5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	2 mg/l BA+1 mg/l IAA	5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	2 mg/l BA+1 mg/l IAA	0.5 mg/l GA ₃	0.5 mg/l GA ₃	
MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		MS bazal ortamı 30 g/l sakkaroz		
Antibiyotik içerikleri						
--		500 mg L ⁻¹ sefuroksim sodyum		500 mg L ⁻¹ sefuroksim sodyum		
--		200 mg L ⁻¹ Hygromisin		200 mg L ⁻¹ Hygromisin		

3.2.5 Moleküler analizler

Dört farklı biber hattında *in vitro* rejenerasyon ve transformasyon denemeleri sonrası elde edilen aday transgenik bitkiciklerin moleküler analizleri yapılmıştır. Moleküler analizler için öncelikle alınan yaprak örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Aday transgenik bitkilerin ilgili gen bölgelerini doğrulamak amacıyla PCR analizleri yapılmıştır. PCR analizlerinde, tuzluluğa tolerans sağlayan *AtNHX1* geni, *CaMV* 35S promotor bölgesi, Higromisine dayanıklılık geni, kuraklığa dayanıklılık sağlayan *pSARKIPT* geni, *SARK* promotoru ve Higromisin dayanıklılık genleri taranmıştır. İlgili gen bölgelerine ait primerler Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) programı kullanılarak dizayn edilmiştir.

3.2.5.1 Aday transgenik biber hatlarının moleküler yöntemlerle analizleri

-DNA İzolasyonu

Çalışmada MiniPrep CTAB DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır. DNA izolasyonu aşamasında kullanılan tampon çözeltinin içeriği Çizelge 3.9'da gösterilmiştir. İzolasyon sırasında ekstraksiyon tampon çözeltiler dışında kloroform:izoamilalkol (24:1 oranında), Tris-EDTA (Tris 1 M pH:8, EDTA: 0.5 M pH:8), RNase A (10 mg/ml) solüsyonu, izopropanol ve etil alkol (%99) kullanılmıştır.

Çizelge 3.9 DNA izolasyon yönteminde kullanılan tampon çözeltisinin içeriği

Solüsyon	Konsantrasyon
CTAB	% 2
NaCl (5 M)	1.4 M
EDTA (0,5 M) pH 8,0	0.2 M
TRIS-HCl (1 M) pH 8,0	0.1 M

DNA izolasyon aşamaları;

- Hazırlanmış olan ekstraksiyon solüsyonundan her tüpe 396 µl ve 4 µl β-merkaptetanol eklenmiştir.
- Bir pipet aracılığıyla tüpler homojenlik sağlanana kadar karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 65°C'de 20 dk. bekletilmiş ve iki defa karıştırılmıştır.

- Her tüpe 400 µl kloroform:izoamilalkol eklenmiş ve 15 dk. karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.
- Tüpler 5 dk. 13.000 devirde santrifüj edilmiştir. Bekleme sırasında her örnek için yeni temiz bir santrifüj tüpü hazırlanıp etiketlenmiştir ve her birinin içine 400 µl soğuk (-20°C) izopropanol eklenmiştir.
- Santrifüj tamamlandığında tüplerin üst kısmındaki sıvı kısım steril pipet aracılığıyla 400 µl soğuk (-20°C) izopropanol içeren santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 sa. – 20°C’de bekletilmiştir.
- Bir saatin ardından tüpler 5 dk. 13.000 devirde santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Pelletin kuruması için tüpler ters bırakılarak bekletilmiştir.
- Kuruyan Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür. Her tüpe 4 µl RNAase A eklenmiş ve 15 dk. oda sıcaklığında tüpler bekletilmiştir.
- Her tüpe 500 µl soğuk EtOH (%100) eklenmiştir ve tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 sa. –20°C’de bekletilmiştir.
- 5 dk. 13.000 devirde santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüş ve pelletin kuruması için tüpler ters çevrilmiştir.
- Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür.
- Örnekler –20°C’de saklanmıştır.

-DNA kalite ve miktarının belirlenmesi;

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA’ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop ND 100) ölçümler yapılarak belirlenmiştir.

-Rekombinant *A. tumefaciens* bakteri ırklarının (*AtNHX1* ve *PSARKIPT*) hazırlanması;

Sıvı LB besin ortamında 28 °C’de 48 sa. inkübe edilen bakteri solüsyonundan 3 µl alınarak PCR analizlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

-PCR protokolünün optimizasyonu ve uygulanması;

Elde edilen aday transgenik bitkiciklerde T-DNA integrasyonunu doğrulamak amacıyla PCR analizleri yapılmıştır. PCR döngü koşulları Çizelge 3.10’da, PCR analizlerinde kullanılan primer setleri Çizelge 3.11’de, PCR analizlerinde kullanılan protokol ise Çizelge 3.12’de sunulmuştur.

Çizelge 3.10 PCR döngü koşulları; (35 döngü)

95 °C 3 dk	Ön denatürasyon
95 °C 30 sn	DNA’ nın denatürasyonu
** 30 sn	Primerlerin bağlanması
72 °C 1 dk	Yeni iplikçeğin yazılımı
72 °C 5 dk	Son yazılım
+4 °C	∞

**Primer bağlanma sıcaklığı kullanılan primere göre değiştirilmiştir.

Çizelge 3.11 PCR analizinde kullanılan primer setleri

No	Gen	Primer Dizileri (5’- 3’)	Amplifikasyon Uzunluğu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
1	<i>AtNHX1</i>	(F) AGTGTGCGAACTGCCTTCGT (R) TGTATCAAGAAGCTATACCTTGGGAAGG	420	55.0
2	<i>CaMV</i> 35S P	(F) AGCTCAACTCAAGCCCAAGA (R) TAACCATCTGTGGGTCAGCA	272	56.0
3	Higromisin	(F) GGATATGTCCTGCGGGTAAA (R) ACATTGTTGGAGCCGAAATC	480	55.0
4	<i>PSARKIPT</i>	(F) TACCTTGATGATCGGCCTCT (R) TTTGCGTCAAGCTGCAATAG	413	55.0
5	<i>SARK</i> Promotor	(F) TTGGGGTGGTAGAAGGAATG (R) CCCTAAGCCAATGACCTTGA	480	55.0

Çizelge 3.12 PCR reaksiyonlarında uygulanan protokol

Kullanılan Materyal	Konsantrasyon	Miktar
Master Mix	2X	16.25 µl
Primer (Forward)	20 µM	1.25 µl
Primer (Reverse)	20 µM	1.25 µl
MgCl ₂	25 mM	1.25 µl
H ₂ O	-----	3 µl
Taq Polimeraz	500 ünite	0.125 µl
DNA	50 ng	3 µl

-Elektroforez koşulları;

Elde edilen PCR ürünlerinin üzerine 3 µl yükleme bufferı eklenmiş ve % 1’lik agaroz jel içerisinde 1X TAE (Trizma Base, Glacial Asetic Asit, EDTA (Na₂.EDTA.H₂O) buffer eklenerek 120 voltluk elektrik akımı altında 3.5 saat

süreyle koşulmuştur. Elektroforez işleminden sonra %0.1'lik ethidium bromide ile boyanmış UV ışığı altında fotoğrafları çekilmiştir. Elde edilen DNA bantlarının büyüklüklerini belirlemede 100 bp'lik markır kullanılmıştır.

3.2.6 Aday transgenik biber hatlarının mikroçoğaltımı

Moleküler olarak doğrulanan aday transgenik biber hatlarının çoğaltımı için mikroçoğaltım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Rejenerasyon denemelerinde her hat için optimize edilen mikroçoğaltım protokolü, aday transgenik hatlar için kullanılmıştır. Mikroçoğaltımı çalışmalarında her hattan elde edilen transgenik hatlar besin ortamı içeren (Çizelge 3.13) tüplere aktararak büyütme odası koşullarında (16 saat fotoperiyodisite ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de) kültüre alınmışlardır. Dört haftada bir gözlemleri alınan sürgünlerden kardeşleme işlemi yapılarak çoğaltım katsayısı arttırılmıştır. Her gelişen sürgünden iki yaprak içeren kısım ayrılarak tekrar besin ortamına transfer edilmiştir.

Çizelge 3.13 Aday Transgenik hatların mikroçoğaltımında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri

Aday transgenik hatlar	En iyi sürgün geliştirme ortamı*
Transgenik sivri biber hatları için	4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA
Transgenik çarliston biber hatları için	3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA
Transgenik kapya biber hatları için	5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA
Transgenik dolma biber hatları için	5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA
Transgenik sivri biber hatları için	4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA
*MS bazal ortamı+30 g/l sakkaroz+3.5 g/l gelrite	

3.2.7 İstatistik analizler

Rejenerasyon denemeleri, organogenesis ve somatik embriyogenesis olmak üzere iki aşamada yürütülmüştür. Hipokotil ve kotiledon eksplantların rejenerasyon denemeleri her biber hattı için ayrı olarak kurulmuştur. *In vitro* denemelerin tamamında kontrol ortamı olarak BBD içermeyen MS bazal besin ortamı kullanılmıştır. Tüm rejenerasyon ve transformasyon denemeleri faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme düzenine göre kurulmuştur. Gözlemler sonucu elde edilen yüzde (%) değerlere istatistik analiz öncesi açılı transformasyonu

uygulanmıştır. Verilerin analizi JMP (versiyon 5.01) paket programı ile yapılmış ve ortalamaların önem seviyeleri LSD ($P<0.01$) testi ile karşılaştırılmıştır.



4. BULGULAR

Tez çalışmasında, dört farklı biber hattının (Sivri, çarliston, kapyra ve dolma) rejenerasyonu ve *A. tumefaciens* aracılığı ile *AtNHX1* ve *PSARKIPT* genlerinin aktarılması ile aday transgenik biber hatlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında, biber hatlarının rejenerasyon kapasiteleri, aday transgenik hatların moleküler olarak doğrulanmaları incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

4.1 *In vitro* Rejenerasyon Bulguları

4.1.1 Somatik embriyogenesis ve kallus oluşum bulguları

Biber hatlarında optimum somatik embriyogenesis protokolünün geliştirilmesi amacıyla farklı araştırmalarda kullanılan protokoller denenmiştir. Somatik embriyogenesis denemelerinde üç farklı protokolün kallus, embriyo ve sürgün gelişim üzerine etkileri araştırılmıştır. Somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus oluşumlarına ait istatistik veriler Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4’de sunulmuştur.

Kallus oluşum bulguları değerlendirildiğinde en iyi kallus gelişimleri, sivri biber için %95 oranında kotiledon ve %85 oranında hipokotil eksplantında, çarliston biber için %95 oranında kotiledon ve %90 oranında hipokotil eksplantında, kapyra biber için %95 oranında kotiledon ve %92.5 oranında hipokotil eksplantında, dolma biber için ise %82.5 oranında kotiledon ve %77.5 oranında hipokotil eksplantlarında Büyükalaca ve Mavituna (1996) protokolünden elde edilmiştir. Harini and Lakshma Sita (1993) protokolünün kallus oluşumları incelendiğinde, sivri biber için kotiledon eksplanttan %80 oranında, hipokotil eksplanttan ise %75, çarliston biber için %77.5 kotiledon ve %67.5 hipokotil eksplantta, kapyra biber hattı için %57.5 kotiledon ve %52.5 hipokotil eksplantlarında, dolma biber için ise %40 hipokotil ve %32.5 kotiledon eksplantlarında belirlenmiştir. Diğer deneme olan Binzel et al. (1996)’daki gelişimler incelendiğinde ise tüm biberlerde çok düşük oranda kallus oluşumları elde edilmiştir. Bu deneme için kallus oluşumları sadece sivri biberin kotiledon

eksplantından %5 oranında elde edilmiştir. Diğer biber hatlarında kallus gelişimi gerçekleşmemiştir.

Çizelge 4.1 Sivri biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus oluşum oranları (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
Binzel et al. (1996)	0.00 d (0.00)	5.00 d (6.64)	2.50 C (3.32)
Büyükalaca ve Mavituna (1996)	85.00 b (70.07)	95.00 a (83.35)	90.00 A (76.71)
Harini and Lakshima Sita (1993)	75.00 c (60.26)	80.00 bc (65.17)	77.50 B (62.72)
Eksplant Ortalaması	40.00 B (32.58)	45.62 A (39.62)	

LSD_{Uygulama}: 5.64***, LSD_{Eksplant}: 3.98**, LSD_{Uygulama*Eksplant}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Çizelge 4.2 Çarliston biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus oluşum oranları (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
Binzel et al. (1996)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
Büyükalaca ve Mavituna (1996)	90.00 a (76.71)	95.00 a (83.35)	92.50 A (80.03)
Harini and Lakshima Sita (1993)	67.50 b (55.51)	77.50 b (61.85)	72.50 B (58.68)
Eksplant Ortalaması	39.37 A (33.05)	43.12 A (36.30)	

LSD_{Uygulama}:4.73***, LSD_{Eksplant}: 3.34*, LSD_{Uygulama*Eksplant}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Çizelge 4.3 Kapyra biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus oluşum oranları (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
Binzel et al. (1996)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
Büyükalaca ve Mavituna (1996)	95.00 a (83.35)	92.50 a (80.03)	93.75 A (81.69)
Harini and Lakshima Sita (1993)	52.50 b (46.44)	57.50 b (49.46)	55.00 B (47.95)
Eksplant Ortalaması	36.87 A (32.45)	37.50 A (32.37)	

LSD_{Uygulama}: 5.39***, LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{Uygulama*Eksplant}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamlar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Çizelge 4.4 Dolma biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus oluşum oranları (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
Binzel et al. (1996)	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
Büyükalaca ve Mavituna (1996)	77.50 b (61.85)	82.50 a (68.49)	80.00 A (65.17)
Harini and Lakshima Sita (1993)	40.00 c (39.09)	32.50 c (34.48)	36.25 B (36.78)
Eksplant Ortalaması	29.37 A (25.23)	28.75 A (25.74)	

LSD_{Uygulama}: 5.22***, LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{Uygulama*Eksplant}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamlar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Üç farklı protokolde kallus gelişim oranları ile eksplant, genotip ve uygulama arasındaki interaksiyonlar incelendiğinde (Çizelge 4.5), genotip bazında sivri (%42.81) ve çarliston (%41.25) biberler istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Genotip*Uygulama interaksiyonunda ise Büyükalaca ve Mavituna (1996) protokolünde sivri biber (%90), çarliston biber (%92.5) ve kapyra biberde (%93.75) en yüksek değerler elde edilmiştir.

Çizelge 4.5 Somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları (%)

Genotip	Uygulama	Eksplant	Genotip* Uygulama *Eksplant	Genotip*Uygulama	Genotip
Sivri Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 k (0.00)	0.00 F (0.00)	42.81 A (36.10)
		Kotiledon	0.00 k (0.00)		
	Büyükalaca ve Mavituna (1996)	Hipokotil	85.00 bc (70.07)	90.00 A (76.71)	
		Kotiledon	95.00 a (83.35)		
	Binzel et al. (1996)	Hipokotil	0.00 k (0.00)	2.50 F (3.32)	
		Kotiledon	5.00 k (6.64)		
Harini and Lakshima Sita (1993)	Hipokotil	75.00 ef (60.26)	77.5 BC (62.72)		
	Kotiledon	80.00 cde (65.17)			
Çarliston Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 k (0.00)	0.00 F (0.00)	41.25 AB (34.68)
		Kotiledon	0.00 k (0.00)		
	Büyükalaca ve Mavituna (1996)	Hipokotil	90.00 ab (76.71)	92.50 A (80.03)	
		Kotiledon	95.00 a (83.35)		
	Binzel et al. (1996)	Hipokotil	0.00 k (0.00)	0.00 F (0.00)	
		Kotiledon	0.00 k (0.00)		
Harini and Lakshima Sita (1993)	Hipokotil	67.50 fg (55.51)	72.5 C (58.68)		
	Kotiledon	77.50 def (61.85)			
Kapyra Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 k (0.00)	0.00 F (0.00)	37.18 B (32.41)
		Kotiledon	0.00 k (0.00)		
	Büyükalaca ve Mavituna (1996)	Hipokotil	95.00 a (83.35)	93.75 A (81.69)	
		Kotiledon	92.50 a (80.03)		
	Binzel et al. (1996)	Hipokotil	0.00 k (0.00)	0.00 F (0.00)	
		Kotiledon	0.00 k (0.00)		
Harini and Lakshima Sita (1993)	Hipokotil	52.50 hi (46.44)	55.00 D (47.95)		
	Kotiledon	57.50 gh (49.46)			
Dolma Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 k (0.00)	0.00 F (0.00)	29.06 C (25.48)
		Kotiledon	0.00 k (0.00)		
	Büyükalaca ve Mavituna (1996)	Hipokotil	77.50 def (61.85)	80.00 B (65.17)	
		Kotiledon	82.50 cd (68.49)		
	Binzel et al. (1996)	Hipokotil	0.00 k (0.00)	0.00 F (0.00)	
		Kotiledon	0.00 k (0.00)		
Harini and Lakshima Sita (1993)	Hipokotil	40.00 ij (39.09)	36.25 E (36.78)		
	Kotiledon	32.50 j (34.48)			

LSD_{Genotip}: 2.64*** LSD_{Uygulama}: 2.64*** LSD_{Eksplant}: 1,81** LSD_{Genotip*Uygulama}: 5.29*** LSD_{Uygulama*Eksplant}: 3.74*

LSD_{Deneme*Eksplant}: Ö.D LSD_{Genotip*Deneme*Eksplant}: Ö.D Ö.D: Önemli Değil

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

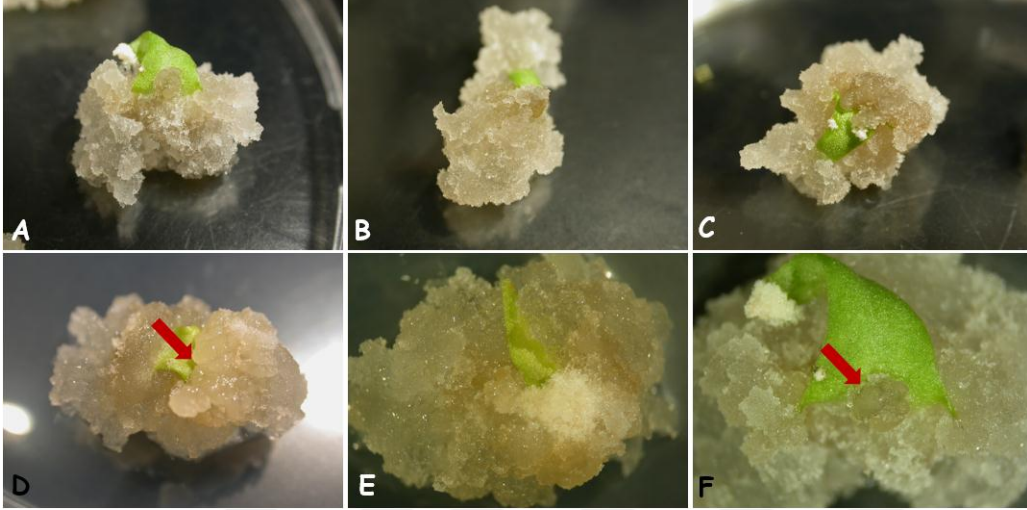
Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

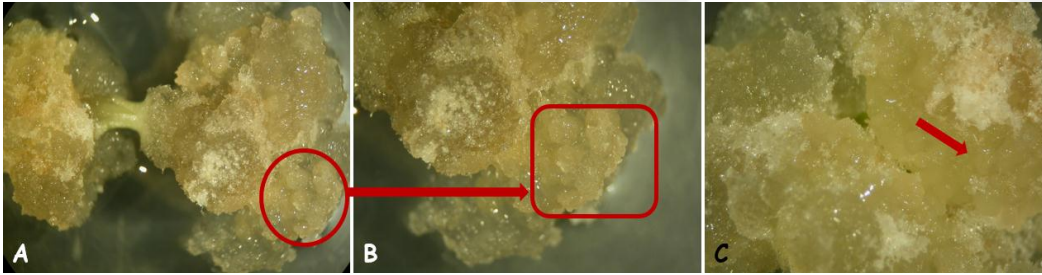
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Sivri biber için kallus oluşumlarının hem kotiledon hem de hipokotil eksplantlarda 2. haftadan itibaren gelişmeye başladığı gözlenmiştir. Sivri biberde gelişen kallus yapılarının, kompakt ve kırılğan yapıda oldukları gözlenmiştir. Ön uygulama ortamında 30 gün süresince kültüre alınan kalluslar daha sonra embriyo geliştirme ortamına aktararak gelişimleri gözlenmiştir. Embriyo gelişim ortamında hipokotil eksplantlardan gelişen kallus yapılarında erken globüler ve kalp safhaları gözlenmeye başlanmıştır (Şekil 4.1 ve 4.2). Kotiledon eksplantlardan gelişen kallus yapılarının hipokotilden gelişenlere göre daha yumuşak yapıda olduğu gözlenmiştir. Bu doğrultuda gelişen bazı kallus yapıları ön uygulama ortamına yayma şeklinde transfer edilerek kültüre alınmıştır (Şekil 4.3). Yayılan kallus yapılarının bazı bölgelerinde şişerek kahverengi yapılar meydana getirdiği

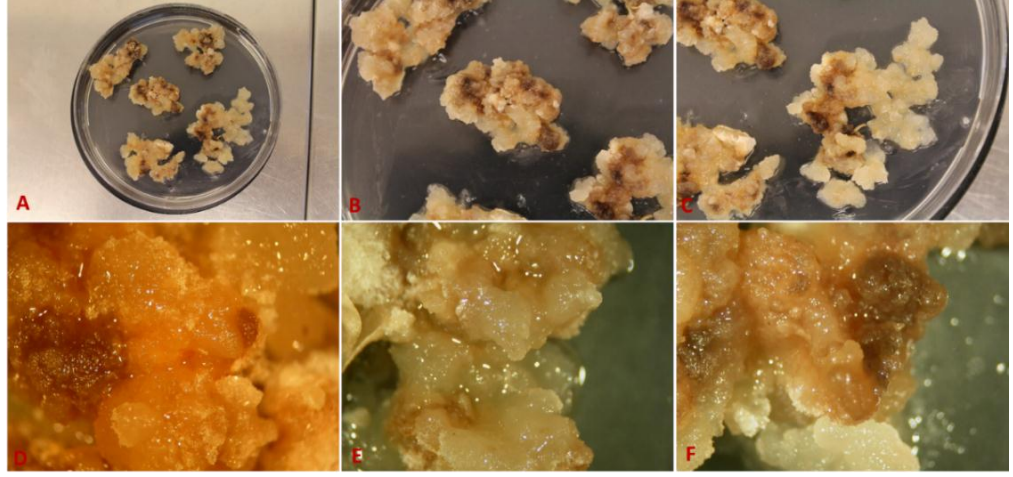
belirlenmiştir (Şekil 4.4). Meristematik bölgelerin bu bölgede yoğun olduğu literatürde belirtilmiştir (Büyükalaca ve Mavituna, 1998). Fakat bu kallus yapılarından da herhangi bir gelişim gözlenmemiştir.



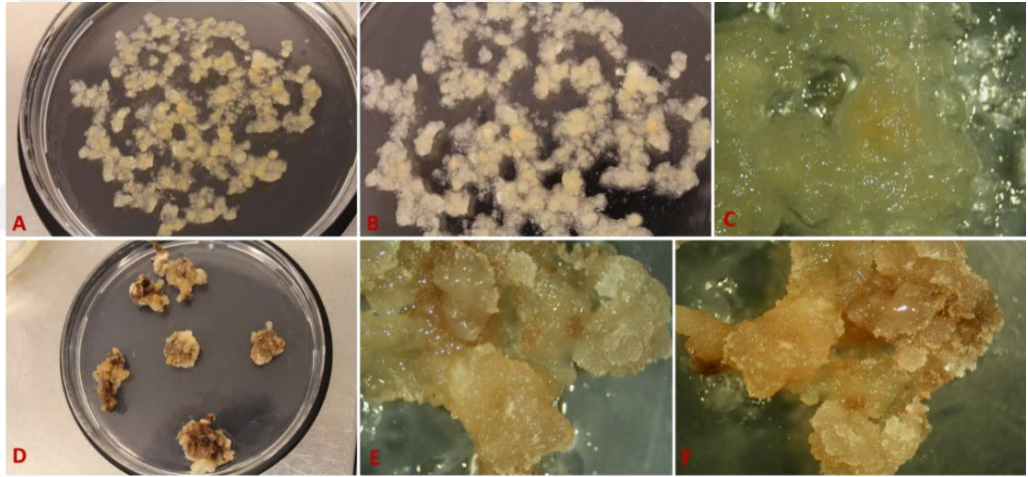
Şekil 4.1 Büyükalaca ve Mavituna (1996)'nın geliştirdiği protokole göre elde edilen embriyojenik kallus yapıları, A, B, C ve E) Kotiledon eksplantlardan gelişen kompakt kallus yapıları, D ve F) Kallus yapılarında gelişen embriyojenik yapılar (Okla gösterilen, erken globüler safha)



Şekil 4.2 Büyükalaca ve Mavituna (1996)'nın geliştirdiği protokole göre elde edilen embriyojenik kallus yapıları, A, B ve C) Hipokotil eksplantlarda gelişen erken globüler safha (Okla gösterilen)



Şekil 4.3 Sivri biber hattında hipokotil eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A, B ve C) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, D, E ve F) Embriyo gelişim ortamında kallusların stereo mikroskop altında görünmleri (Erken globüler safha-E ve erken kalp safhası-F)



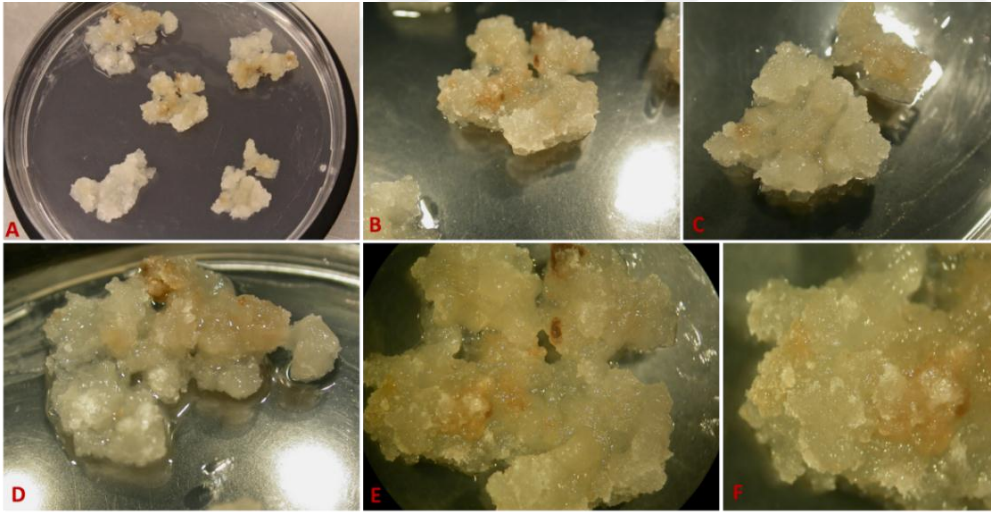
Şekil 4.4 Sivri biberde kotiledon eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları (Yayma şeklinde ortama transfer edilen kalluslar), B ve C) Kallus yapılarından mersitematik erken yapıların oluşması, D, E ve F) Embriyo gelişim ortamında kallusların stereo mikroskop altında görünümüleri (Erken globüler safha-E ve erken kalp safhası-F)

Çarliston biberin hipokotil eksplantlarından gelişen kallus yapılarının kompakt ve kahverengi yapıda oldukları gözlenmiştir. Bu aşamada hipokotil eksplantlarından gelişen kallus yapılarında herhangi bir embriyo safhasının oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.5). Kotiledon eksplantlarından gelişen kallus yapıları incelendiğinde, kallus yapılarının başlangıçta beyaz, yumuşak yapıda oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.6). Ön uygulama ortamına transferden sonra kallus yapılarının değişerek kahverengi ve kompakt yapı oluşturdıkları ve

kahverengileşen bölgelerden erken safha embriyo yapılarının oluşmaya başladığı gözlenmiştir.



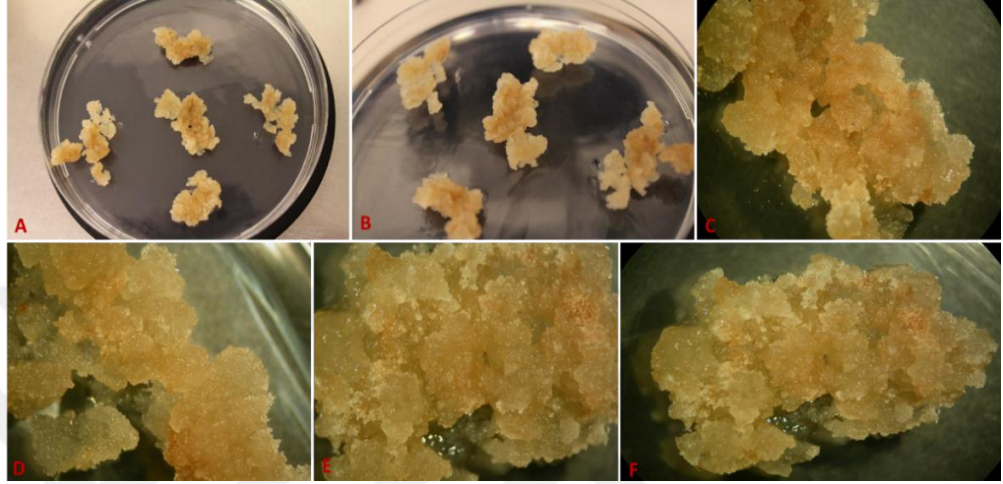
Şekil 4.5 Charlston biber hattında hipokotil eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A ve B) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, C, D, E ve F) Kallus yapılarından ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü ve embriyo geliştirme ortamına transferi



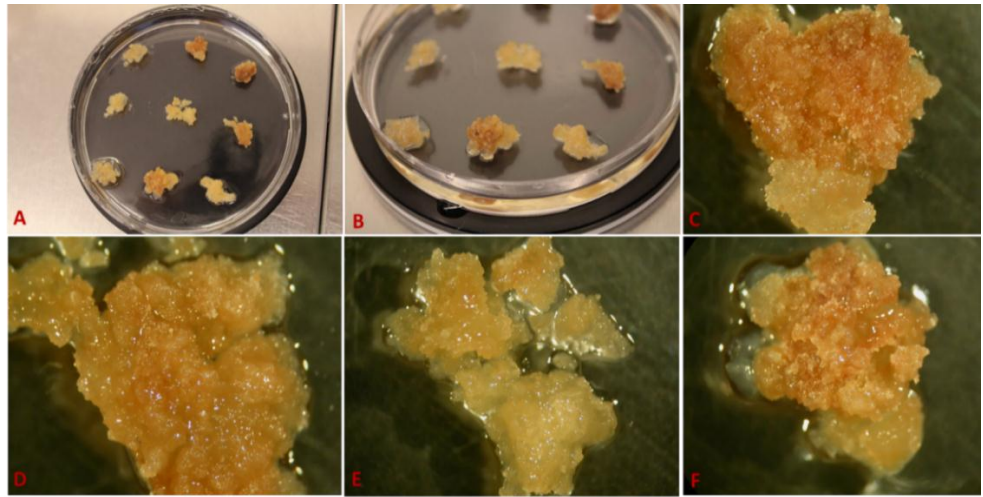
Şekil 4.6 Charlston biber hattında kotiledon eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A, B ve C) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, D, E ve F) Kallus yapılarının ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü (30. gün) ve embriyo geliştirme ortamına transferi (kahverengi bölgelerde meristematik hücrelerin gelişimi ile beraber erken globüler safhalar gözlenmiştir)

Kapya biberin kotiledon ve hipokotil eksplantlarından elde edilen kallus yapıları, embriyojenik özellik açısından, kriterlere en uygun kallus yapısı olarak belirlenmiştir. Bu kriterler; mikroskopik gözlemler sonucu hücrelerin oval-

yuvarlak yapıda olması, kallus yapısının kompakt, kırılğan ve kahverengiye yakın renkte olması şeklinde sıralanabilir (Şekil 4.7). Hipokotil eksplantlarından meydana gelen kallus yapılarında hücrelerin kümeler oluşturarak farklılaşmaya başladıkları gözlenmiştir (Şekil 4.8). Benzer özellikler kotiledon eksplantlarından gelen kallus yapılarında da gözlenmiştir.

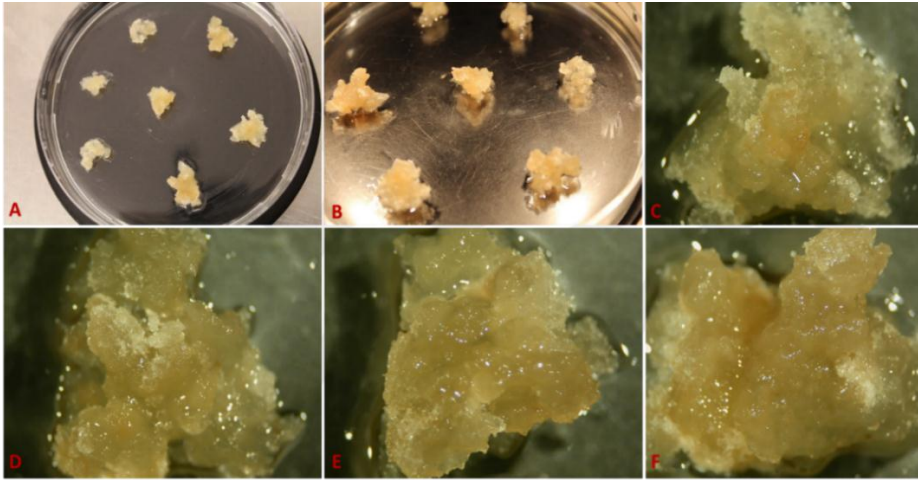


Şekil 4.7 Kapa biber hattında hipokotil eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri (Büyükalaca ve Mavituna, 1996), A ve B) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, C, D, E ve F) Kallus yapılarının ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü (30. gün) ve embriyo geliştirme ortamına transferi (kahverengi bölgelerde meristematik hücrelerin gelişimi bu tipte yoğun olarak gözlenmesine rağmen henüz embriyo aşamaları gözlenmemiştir.)

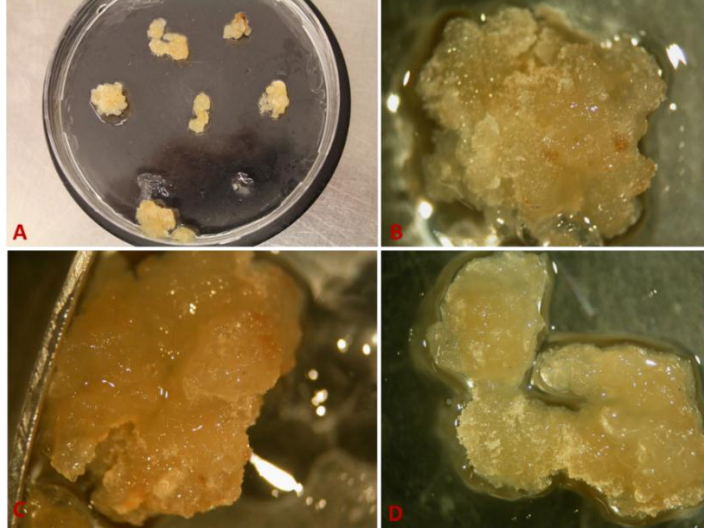


Şekil 4.8 Kapa biber hattında kotiledon eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri (Büyükalaca ve Mavituna, 1996), A ve B) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, C, D, E ve F) Kallus yapılarının ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü (30. gün) ve embriyo geliştirme ortamına transferi (kahverengi bölgelerde meristematik hücrelerin gelişimi bu tipte yoğun olarak gözlenmesine rağmen embriyo aşamaları gözlenmemiştir.)

Dolma biberin hipokotil ve kotiledon eksplantlarından gelişen kallus yapıları incelendiğinde, kallus yapılarının yumuşak, dağılgan ve sarımsı yapıda geliştikleri gözlenmiştir. Hipokotil ve kotiledon eksplantlarından gelişen kalluslarda erken globüler safhaların oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10). Kallus yapıları hücrel olarak incelendiğinde, hücrelerin boyuna uzadığı belirlenmiş bu da embriyojenik özelliğin yitirilebileceği şeklinde yorumlanmıştır. Özellikle yuvarlak/oval yapıya sahip kallus hücrelerinin embriyojenik gelişmeye daha yatkın olduğu belirtilmiştir (Büyükalaca ve Mavituna, 1998). Aynı durum kotiledon eksplantlardan gelişen kallus yapıları içinde tespit edilmiştir.



Şekil 4.9 Dolma biber hattında hipokotil eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A ve B) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, C, D, E ve F) Kallus yapılarının ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü (30. gün) ve embriyo geliştirme ortamına transferi (kahverengi bölgelerde meristematik hücrelerin gelişimi gözlenerek erken globüler yapıların oluşumu tespit edilmiştir.)



Şekil 4.10 Dolma biber hattında kotiledon eksplantlarından oluşan kallus yapılarının gelişimleri, A, B) Ön uygulama ortamında kültüre alınan kallus yapıları, C, D, E ve F) Kallus yapılarının ön uygulama ortamında kahverengi yapılara dönüşümü (30. gün) ve embriyo geliştirme ortamına transferi (kahverengi bölgelerde meristematik hücrelerin gelişimi gözlenerek erken globüler yapıların oluşumu tespit edilmemiştir.)

Üç deneme sonucunda embriyo gelişimi tüm biber hatları için sadece Büyükalaca ve Mavituna (1996) protokolünde elde edilmiştir. Binzel et al. (1996) ve Harini and Lakshma Sita (1993) protokollerinde embriyojenik yapılar gözlenmemiştir. Embriyo gelişim oranları incelendiğinde ise sivri biber için %32.5 hipokotil, %30 kotiledon (Çizelge 4.6), çarliston biber için %50 hipokotil, %40 kotiledon (Çizelge 4.7), kapyra biber için %42.5 hipokotil, %57.5 kotiledon (Çizelge 4.8) ve dolma biber için ise %15 hipokotil, %12.5 kotiledon (Çizelge 4.9) olarak tespit edilmiştir. Somatik embriyogenesis bulgularına göre, Büyükalaca ve Mavituna (1996), Binzel et al. (1996) ile Harini and Lakshma Sita (1993) geliştirdiği protokollerin araştırmada kullanılan biber hatlarında istenilen sonuca ulaşmakta etkili olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.6 Sivri biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda embriyo oluşum oranları (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Binzel et al. (1996)	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Büyükalaca ve Mavituna (1996)	32.50 a (34.48)	30.00 a (32.89)	31.25 A (33.69)
Harini and Lakshima Sita (1993)	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Eksplant Ortalaması	8.12 A (8.62)	7.50 A (8.22)	0.00 B (0.00)

LSD_{Uygulama}:3.72***, LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{Uygulama*Eksplant}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamlar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Çizelge 4.7 Çarliston biberde Somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda embriyo oluşum oranları (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama Ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Binzel et al. (1996)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Büyükalaca ve Mavituna (1996)	50.00 a (45.00)	40.00 b (39.09)	45.00 A (42.04)
Harini and Lakshima Sita (1993)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Eksplant Ortalaması	12.50 A (11.25)	10.00 A (9.77)	

LSD_{Uygulama}:3.78***, LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{Uygulama*Eksplant}:5.35*

Ö.D.: Önemli Değil

Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamlar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Çizelge 4.8 Kapy biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda embriyo oluşum oranları (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Binzel et al. (1996)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Büyükalaca ve Mavituna (1996)	42.50 b (40.53)	57.50 a (49.60)	50.00 A (45.07)
Harini and Lakshima Sita (1993)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Eksplant Ortalaması	10.62 B (10.13)	14.37 A (12.40)	

LSD_{Uygulama}:3.17***, LSD_{Eksplant}:2.24*, LSD_{Uygulama*Eksplant}:4.48*

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Çizelge 4.9 Dolma biberde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda embriyo oluşum oranları (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Binzel et al. (1996)	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Büyükalaca ve Mavituna (1996)	15.00 a (18.18)	12.50 a (16.60)	13.75 A (17.39)
Harini and Lakshima Sita (1993)	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Eksplant Ortalaması	3.75 A (4.54)	3.12 A (4.15)	

LSD_{Uygulama}: 4.38***, LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{Uygulama*Eksplant}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Somatik embriyogenesis denemeleri kapsamında embriyo gelişiminde sadece genotip*uygulama interaksiyonunun önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Uygulama*genotip interaksiyon oranları incelendiğinde en yüksek gelişimler Büyükalaca ve Mavituna (1996)'nın protokolünde kapy biber için %50, çarliston biber için %40 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10 Somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda embriyo gelişim oranları (%)

Genotip	Uygulama	Eksplant	Genotip*Uygulama*Eksplant	Genotip*Uygulama	Genotip
Sivri Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	7.81 B (8.42)
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
	Büyükalaca ve Mavituna (1996)	Hipokotil	32.50 de (34.48)	31.25 B (33.69)	
		Kotiledon	30.00 e (32.89)		
	Binzel et al. (1996)	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
	Harini and Lakshma Sita (1993)	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
Çarliston Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	11.25 A (10.51)
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
	Büyükalaca ve Mavituna (1996)	Hipokotil	50.00 ab (45.00)	45.00 A (42.04)	
		Kotiledon	40.00 cd (39.09)		
	Binzel et al. (1996)	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
	Harini and Lakshma Sita (1993)	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
Kapyia Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	12.50 A (11.26)
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
	Büyükalaca ve Mavituna (1996)	Hipokotil	42.50 bc (40.53)	50.00 A (45.07)	
		Kotiledon	57.50 a (49.60)		
	Binzel et al. (1996)	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
	Harini and Lakshma Sita (1993)	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
Dolma Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	3.43 C (4.34)
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
	Büyükalaca ve Mavituna (1996)	Hipokotil	15.00 f (18.18)	13.75 C (17.39)	
		Kotiledon	12.50 f (16.60)		
	Binzel et al. (1996)	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		
	Harini and Lakshma Sita (1993)	Hipokotil	0.00 g (0.00)	0.00 D (0.00)	
		Kotiledon	0.00 g (0.00)		

LSD_{Genotip}: 1.70*** LSD_{Uygulama}: 1.70*** LSD_{Eksplant}: 0.0 D LSD_{Genotip*Uygulama}: 3.40*** LSD_{Genotip*Eksplant}: 0.0 D.

LSD_{Uygulama*Eksplant}: 0.0 D LSD_{Genotip*Uygulama*Eksplant}: 0.0 D 0.0 D. Önemli Değer

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

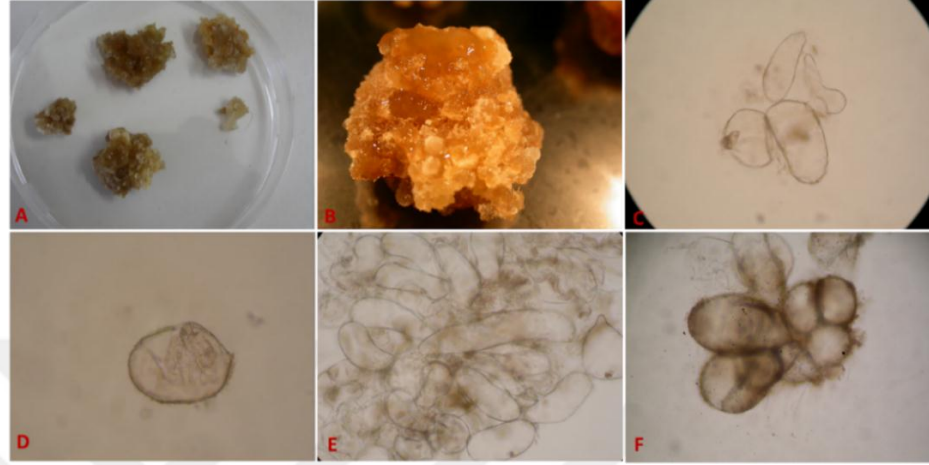
Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

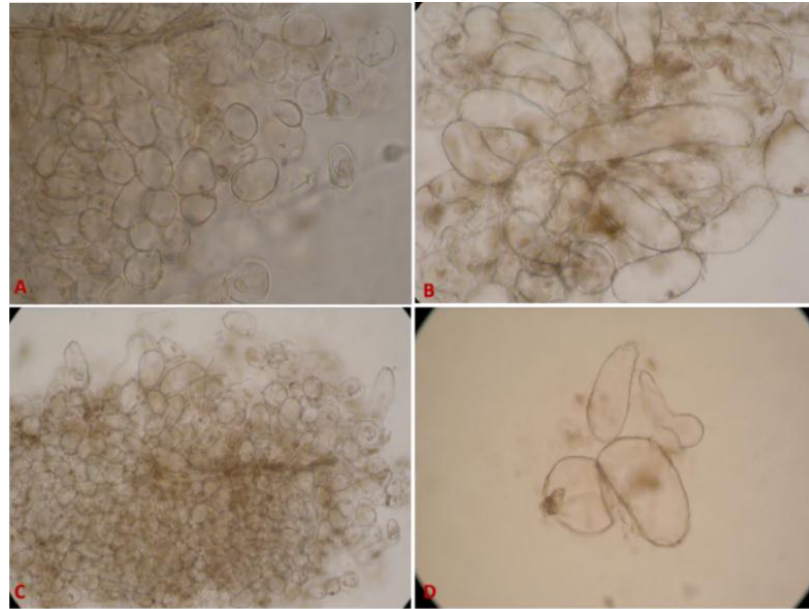
Kallus hücrelerinin ışık mikroskopunda incelenmesi;

Kallus geliştirme ortamında gelişen kallus yapılarının embriyojenik özelliğe sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla her hat ve eksplant tipinden gelişen kallus yapılarından pens ucuyla örnek alınarak lam üzerine transfer edilmiştir. Lam üzerindeki kallus parçası üzerine bir damla çeşme suyu ilave edildikten sonra lamelle kapatılmıştır. Kurşun kalemin arka tarafıyla hafifçe vurularak yayılan kallus yapıları ışık mikroskobu altında 10x ve 40x objektiflerde incelenmiştir. Büyükalaca ve Mavituna (1998)'ya göre, kallus hücrelerinin giderek uzaması ve uzun hücre yapıları oluşturması kallusların embriyojenik özelliğini yitirdiğini göstermektedir. Kallus tiplerinden gelişen hücreleri incelediğimizde, kapyia, sivri ve çarliston biber hatları ve her iki eksplanttan oluşan kallus hücrelerinin yuvarlak ve oval yapıda oldukları belirlenmiştir (Şekli 4.11 ve 4.12). Ancak dolma biber

hattından gelen kallus yapılarına bakıldığında çok fazla uzamış hücrelerin olduğu belirlenmiştir. Her ne kadar dolma biberde, hipokotil eksplanttan elde edilen kallus yapılarında erken globüler evre belirlense de gelişimin daha ileriye gitmediği belirlenmiştir.



Şekil 4.11 Dört farklı biber hattından elde edilen kallus hücrelerinin ışık mikroskopunda incelenmesi, **A ve B)** Sivri, çarliston, kapy ve dolma biber eksplantlarından alınan kallus örnekleri, **C)** Sivri biber hattından gelişen kallus hücreleri (Yuvarlak ve oval yapıda kallus hücreleri), **D)** Çarliston biber hattından gelişen yuvarlak yapıdaki kallus hücresi, **E)** Dolma biber hattından gelişen uzamış kallus hücreleri, **F)** Kapy biber hattından gelişen ve farklılaşmaya başlayan oval yapıdaki kallus hücre kümesi



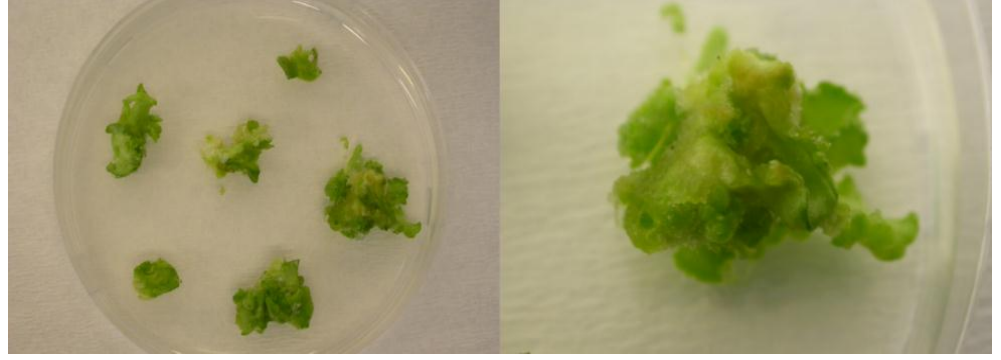
Şekil 4.12 Kallus hücrelerinin ışık mikroskobu altında genel görünümü (40X büyütme), **A)** Kapy biber (Yuvarlak ve oval yapıda kallus hücreleri), **B)** Dolma biber (Uzamış kallus hücreleri), **C)** Sivri biber, **D)** Çarliston biber (Uzamış ve yuvarlak kallus hücreleri)

4.1.2 Organogenesis denemeleri ile kallus ve sürgün oluşum bulguları

Organogenesis çalışmaları kapsamında üç farklı deneme (1. Deneme: 2,4-D+TDZ; 2. Deneme: BA+IAA; 3. Deneme: Sanatombi and Sharma (2008) ile Hyde and Philips (1996)) gerçekleştirilmiştir. Deneme bulguları aşağıdaki alt başlıklarda verilmiştir.

4.1.2.1 Deneme 1: 2,4-D+TDZ ortam bulguları

Sivri biber hattında kurulan birinci deneme kapsamında, 2,4-D (0, 0.5, 1 ve 2 mg/l)+TDZ (0, 0.5, 1 ve 2 mg/l)'nin farklı kombinasyonları denenmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda hem hipokotil hem de kotiledon eksplantlarında abnormal yapıda sürgünlerin oluştuğu belirlenmiştir. Bu sürgün benzeri yapılardan gelişen yaprakların anormal büyüklükte ve belirgin yaprak damarları olduğu gözlenmiştir. Ancak oluşan abnormal sürgün yapılarının gelişimi ikinci altkültür işleminden sonra durmuş ve sürgün yapılarında sararmalar meydana gelmiştir. İstatistik analizler sonucunda sürgün benzeri yapıların en iyi 2 mg/l 2,4-D+1 mg/l TDZ içeren besin ortamında, %40 oranında kotiledon eksplantlarından geliştiği belirlenmiştir (Şekil 4.13). Bunu takiben 1 mg/l 2,4-D+2 mg/l TDZ içeren besin ortamında, hem hipokotil hem de kotiledon eksplantlarından %36 oranında sürgün benzeri yapıların geliştiği görülmüştür (Çizelge 4.11). Elde edilen bulgulara göre 2,4-D ve TDZ denemeleri sonucunda uygun rejenerasyon protokolüne ulaşamamıştır. İstatistik analizler sonucunda sürgün gelişiminde kotiledon eksplantlarının hipokotil eksplantlarına göre daha başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Eksplant ortalamaları değerlendirildiğinde sürgün benzeri yapıların %15.50 oranında kotiledon eksplantlarından gelişirken, hipokotil eksplantlarındaki gelişim oranı ise %8.25 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.13 2 mg/l 2,4-D+1 mg/l TDZ içeren besin ortamında kotiledon eksplantlarda sürgün benzeri yapıların oluşumu (3. hafta)

Çizelge 4.11 Sivri biber birinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişim oranları (%)

BBD (2,4-D+TDZ) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 h (0.00)	0.00 h (0.00)	0.00 H (0.00)
0+0.5	8.00 fhg (10.62)	20.00 cdef (23.78)	14.00 DE (17.20)
0+1	12.00 efg (15.93)	32.00 ab (34.16)	22.00 BCD (25.05)
0+2	4.00 gh (5.31)	8.00 fhg (10.62)	6.00 FGH (7.96)
0.5+0	0.00 h (0.00)	0.00 h (0.00)	0.00 H (0.00)
0.5+0.5	0.00 h (0.00)	24.00 abcd (29.09)	12.00 EF (14.54)
0.5+1	8.00 fhg (10.62)	24.00 abcd (29.09)	16.00 DE (19.86)
0.5+2	4.00 gh (5.31)	16.00 cdef (21.25)	10.00 EFG (13.28)
1+0	0.00 h (0.00)	0.00 h (0.00)	0.00 H (0.00)
1+0.5	0.00 h (0.00)	0.00 h (0.00)	0.00 H (0.00)
1+1	16.00 cdef (21.25)	16.00 cdef (21.25)	16.00 CDE (21.25)
1+2	36.00 a (36.47)	36.00 a (36.69)	36.00 A (36.58)
2+0	0.00 h (0.00)	0.00 h (0.00)	0.00 H (0.00)
2+0.5	4.00 gh (5.31)	4.00 gh (5.31)	4.00 GH (5.31)
2+1	16.00 def (18.47)	40.00 a (39.00)	28.00 ABC (28.73)
2+2	24.00 abcd (29.09)	28.00 abc (31.63)	26.00 AB (30.36)
Eksplant Ortalama	8.25 B (9.90)	15.50 A (17.62)	

LSD_{BBD}: 8.21*** LSD_{Eksplant}: 2.90*** LSD_{BBD*Eksplant}: 11.61***

Parantez içerisinde verilmiş değerler açış transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

2,4-D ve TDZ deneme bulguları incelendiğinde hem hipokotil hem de kotiledon eksplantlarından yoğun kallus yapılarının oluştuğu belirlenmiştir. Özellikle 2,4-D'nin tek başına kullanıldığı besin ortamlarında kallus oluşumlarının daha yoğun olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda en yüksek kallus gelişimi 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ ve 1 mg/l 2,4-D içeren besin ortamlarında bulunan kotiledon eksplantlarda, %100 oranında bulunmuştur (Çizelge 4.12). 2 mg/l 2,4-D+1 mg/l TDZ içeren besin ortamında bulunan kotiledon eksplantlarında ise bu gelişimin %96 oranında olduğu belirlenmiştir. Hipokotil eksplantlardaki kallus gelişimi incelendiğinde, en yüksek kallus oluşumları 2 mg/l 2,4-D'de %96 ve 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda ise %92 oranında tespit edilmiştir. Her iki eksplant tipi içinde kallus oluşumları yara dokularının olduğu kısımlardan 10. günde başlamıştır. İlk oluşan kallus yapıları beyaz renkte iken 20. günden sonra kallusların rengi sarı ve kahverengiye dönüşmüştür. Elde edilen kallus yapılarından sürgün veya sürgün benzeri yapılara dönüşüm gerçekleşmemiştir. Kallus gelişiminde kotiledon eksplantların hipokotil eksplantlara oaranla daha iyi sonuç verdikleri görülmüştür. Eksplant ortalamalarına bakıldığında en iyi kallus gelişimi %49 ile kotiledon eksplantta görülürken, hipokotil eksplanttaki gelişim %37.75 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.12 Sivri biber birinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları (%)

BBD (2,4-D+TDZ) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 H (0.00)
0+0.5	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 H (0.00)
0+1	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 H (0.00)
0+2	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 H (0.00)
0.5+0	44.00 ghi (41.53)	52.00 efgh (46.15)	48.00 D (43.84)
0.5+0.5	12.00 k (15.93)	32.00 ij (34.16)	22.00 EF (25.05)
0.5+1	12.00 k (15.93)	12.00 k (15.93)	12.00 G (15.93)
0.5+2	8.00 k (10.62)	36.00 hij (36.47)	22.00 F (23.54)
1+0	92.00 b (79.37)	100.00 a (90.00)	96.00 A (84.68)
1+0.5	64.00 def (53.30)	92.00 b (79.37)	78.00 B (66.33)
1+1	56.00 efg (48.46)	56.00 efg (48.46)	56.00 CD (48.46)
1+2	24.00 j (29.09)	32.00 ij (34.16)	28.00 E (31.63)
2+0	92.00 b (79.37)	100.00 a (90.00)	96.00 A (84.68)
2+0.5	84.00 c (68.74)	100.00 a (90.00)	92.00 A (79.37)
2+1	68.00 de (55.83)	96.00 ab (84.68)	82.00 B (70.26)
2+2	48.00 fghi (43.84)	76.00 cd (60.90)	62.00 C (52.37)
Eksplant Ortalama	37.75 B (33.88)	49.00 A (44.39)	

LSD_{BBD}: 7.45***, LSD_{Eksplant}: 2.63***, LSD_{BBD*Eksplant}: 10.53***

Parantez içerisinde verilmiş değerler açış transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Çarliston biber hattında gerçekleştirilen birinci organogenesis denemesi olan 2,4-D (0, 0.5, 1 ve 2 mg/l)+TDZ (0, 0.5, 1 ve 2)'de en iyi kallus gelişimi, %92 oranında 2 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l TDZ içeren besin ortamında, kotiledon eksplantta belirlenmiştir. Hipokotil eksplantta ise en iyi gelişim %88 oranında 1 mg/l 2,4-D içeren besin ortamında tespit edilmiştir. Hipokotil eksplantlarından kallus yapılarının ilk gelişim 10. günden itibaren gözlemlenirken, kotiledon eksplantlarında ise 15. günden itibaren gelişim gözlenmiştir. Hem kotiledon hem de hipotokil eksplantlarında oluşan kallus yapıları başlangıçta beyaz-kırılgan yapıda iken daha sonra sarı, yeşil ve kahverengi renkte daha kompakt yapılara döndükleri gözlenmiştir. Oluşan kallus yapılarından herhangi bir rejenerasyon

gözlenmemiştir. Kallus gelişimlerinde BBD ortalamaları incelendiğinde en iyi gelişim 1 mg/l 2,4-D'de %88 olarak belirlenmiştir. Eksplantlar arasındaki ortalamalara bakıldığında kotiledon eksplantının (%39.25) hipokotil eksplantın (%27) göre kallus gelişimine daha iyi cevap verdiği görülmüştür (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 Çarliston biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları (%)

BBD (2,4-D+TDZ) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 H (0.00)
0+0.5	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 H (0.00)
0+1	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 H (0.00)
0+2	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 H (0.00)
0.5+0	44.00 fgh (41.53)	72.00 cd (58.36)	58.00 C (49.95)
0.5+0.5	8.00 kl (10.62)	36.00 ghi (36.69)	22.00 DE (23.66)
0.5+1	8.00 kl (10.62)	24.00 ij (29.09)	16.00 EF (19.86)
0.5+2	0.00 l (0.00)	24.00 ij (29.09)	12.00 FG (14.54)
1+0	88.00 ab (74.06)	88.00 ab (74.06)	88.00 A (74.06)
1+0.5	48.00 efgh (43.84)	64.00 def (53.30)	56.00 C (48.57)
1+1	12.00 k (15.90)	48.00 efgh (43.84)	30.00 D (29.89)
1+2	0.00 l (0.00)	16.00 jk (18.47)	8.00 G (9.23)
2+0	68.00 cd (58.84)	80.00 bc (66.21)	74.00 B (62.52)
2+0.5	72.00 cd (58.36)	92.00 a (79.37)	82.00 AB (68.87)
2+1	56.00 defg (48.46)	68.00 cde (55.83)	62.00 C (52.14)
2+2	28.00 hi (31.63)	16.00 jk (18.47)	22.00 DE (25.05)
Eksplant Ortalama	27.00 B (24.62)	39.25 A (35.17)	

LSD_{Eksplant}:3.07***, LSD_{BBD}:8.68***, LSD_{Eksplant*BBD}:12.28***

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler aç transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Çarliston biberde, 2,4-D-TDZ farklı kombinasyonlarında yapılan gözlemler sonucunda hem hipokotil hem de kotiledon eksplantlarında sürgün benzeri yapıların oluştuğu belirlenmiştir. Sürgün benzeri yapılardan oluşan yapraklarda şekil

bozuklukları olduğu gözlenmiştir. Normal yapraklara benzemeyen bu yapılarda ikinci altkültür işleminden sonra sararmalar oluşmuş ve kurumuşlardır. İstatistik analizler sonucunda sürgün benzeri yapıların en iyi 2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ içeren besin ortamında, %36 oranında kotiledon eksplantlarından geliştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Hem hipokotil hem de kotiledon eksplantlarında ise 1 mg/l 2,4-D+2 mg/l TDZ içeren besin ortamında, %36 oranında sürgün benzeri yapıların geliştiği görülmüştür. Elde edilen bulgulara göre 2,4-D ve TDZ denemeleri sonucunda optimum rejenerasyon protokolüne ulaşamamıştır. Eksplant ortalamaları değerlendirildiğinde sürgün gelişiminde kotiledon eksplantların (%8.75) hipokotil eksplantlara (%5) göre daha önemli çıktıkları belirlenmiştir. Charleston biberde elde edilen bulgulara göre oluşan sürgün benzeri yapılardan rejenerasyon sağlanamamıştır.

Çizelge 4.14 Çarliston biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişim oranları (%)

BBD (2,4-D+TDZ) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 D (0.00)
0+0.5	0.00 d (0.00)	12.00 c (15.93)	6.00 CD (7.96)
0+1	8.00 cd (10.62)	24.00 ab (29.09)	16.00 A (19.86)
0+2	0.00 d (0.00)	28.00 a (31.63)	14.00 ABC (15.81)
0.5+0	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 D (0.00)
0.5+0.5	12.00 c (15.93)	12.00 c (15.93)	12.00 ABC (15.93)
0.5+1	12.00 c (15.93)	8.00 cd (10.62)	10.00 ABC (13.28)
0.5+2	16.00 bc (18.47)	0.00 d (0.00)	8.00 BC (9.23)
1+0	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 D (0.00)
1+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 D (0.00)
1+1	0.00 d (0.00)	00.00 d (0.00)	0.00 D (0.00)
1+2	16.00 bc (18.47)	12.00 c (15.93)	14.00 AB (17.20)
2+0	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 D (0.00)
2+0.5	0.00 d (0.00)	36.00 a (36.69)	18.00 A (18.34)
2+1	16.00 bc (18.47)	8.00 cd (10.62)	12.00 ABC (14.54)
2+2	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 D (0.00)
Eksplant Ortalama	5.00 B (6.12)	8.75 A (10.40)	

LSD_{Eksplant}:2.89***; LSD_{BBD}:8.68***; LSD_{Eksplant*BBD}:11.87**

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Kapya biber hattında kurulan birinci deneme kapsamında (2,4-D; 0, 0.5, 1 ve 2 mg/l+TDZ; 0, 0.5, 1 ve 2) yapılan gözlemler sonucunda hem hipokotil hem de kotiledon eksplantlarında sürgün yapılarının oluştuğu belirlenmiştir. Bu sürgün benzeri yapılardan gelişen yapraklarda şekil bozuklukları (iri ve düzensiz) olduğu gözlenmiştir. Oluşan anormal sürgün yapılarının gelişimi ikinci altkültür işleminden sonra durmuş ve sürgün yapılarında sararmalar meydana gelmiştir. İstatistik analizler sonucunda sürgün benzeri yapıların en iyi 1 mg/l 2,4-D+1 mg/l TDZ içeren besin ortamında %36, 0.5 mg/l 2,4-D+2 mg/l TDZ ortamında %28 oranında hipokotil eksplantlarından geliştiği belirlenmiştir. 0.5 mg/l 2,4-D içeren

besin ortamında ise kotiledon eksplantlarından %20 oranında sürgün benzeri yapıların geliştiği görülmüştür (Çizelge 4.15). Elde edilen bulgulara göre 2,4-D ve TDZ denemeleri sonucunda uygun rejenerasyon protokolüne ulaşamamıştır. İstatistik analizler sonucunda sürgün gelişiminde hipokotil eksplantlarının (%8.25) kotiledon eksplantlarına (%6.5) göre daha iyi sonuç verdikleri belirlenmiştir. Ancak eksplantlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. BBD ortalamaları değerlendirildiğinde, sürgün benzeri yapılar en iyi 2 mg/l 2,4-D+2 mg/l TDZ içeren besin ortamında %22 oranında geliştiği belirlenmiştir. İstatistiksel olarak sürgün benzeri yapıların gelişiminde BBD ve BBD*eksplant etkileşimi önemli bulunmuştur.



Çizelge 4.15 Kapyra biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda kapyra biberde sürgün gelişim oranları (%)

BBD (2,4-D+TDZ) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 E (0.00)
0+0.5	4.00 cd (5.31)	20.00 ab (26.56)	12.00 BC (15.93)
0+1	12.00 bc (15.93)	12.00 bc (15.93)	12.00 BC (15.93)
0+2	0.00 d (0.00)	4.00 cd (5.31)	2.00 DE (2.65)
0.5+0	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 E (0.00)
0.5+0.5	0.00 d (0.00)	4.00 cd (5.31)	2.00 DE (2.65)
0.5+1	20.00 ab (26.56)	8.00 cd (10.62)	14.00 ABC (18.59)
0.5+2	28.00 a (28.85)	12.00 bc (15.93)	20.00 AB (22.39)
1+0	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 E (0.00)
1+0.5	8.00 cd (10.62)	0.00 d (0.00)	4.00 DE (5.31)
1+1	36.00 a (36.69)	0.00 d (0.00)	18.00 ABC (18.34)
1+2	8.00 cd (10.62)	8.00 cd (10.62)	8.00 CD (10.62)
2+0	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 E (0.00)
2+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 E (0.00)
2+1	4.00 cd (5.31)	4.00 cd (5.31)	4.00 DE (5.31)
2+2	12.00 bc (15.93)	32.00 a (34.16)	22.00 A (22.05)
Eksplant Ortalama	8.25 A (9.74)	6.50 A (8.11)	

LSD_{BBD}: 8.23***, LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{BBD*Eksplant}: 11.64***

Ö.D.: Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Kapyra biber hattında birinci organogenesis denemesinde (2,4-D; 0, 0.5, 1 ve 2 mg/l+TDZ; 0, 0.5, 1 ve 2)'de en iyi kallus gelişimleri, %100 oranında 0.5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ, 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l ve 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D+1 mg/l TDZ içeren besin ortamında, kotiledon eksplantlarında belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Hipokotil eksplantında ise en iyi gelişim %100 oranında 1 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l içeren besin ortamında tespit edilmiştir. Hipokotil eksplantlarından kallus yapılarının ilk gelişim 10. günden itibaren gözlemlenirken, kotiledon eksplantlarında ise 7. günden itibaren gelişim gözlenmiştir. Diğer biber hatlarına göre en yoğun kallus gelişimi

kapya biber hattında gözlenmiştir. Hem kotiledon hem de hipotokil eksplantlarında oluşan kallus yapıları başlangıçta beyaz-kırılgan yapıda iken daha sonra sarı ve kahverengi renkte daha kompakt yapılara döndükleri gözlenmiştir. İstatistiksel olarak BBD, eksplant ve BBD*eksplant interaksiyonu kallus gelişim yönünden önemli bulunmuştur. Ancak oluşan kallus yapılarından herhangi bir rejenerasyon gözlenmemiştir. Kallus gelişimlerinde BBD ortalamaları incelendiğinde en iyi gelişimler, 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l'de %100 olarak belirlenmiştir. Eksplantlar arasındaki ortalamalara bakıldığında, kotiledon eksplantın (%62.50) hipokotil eksplanta (%49.75) göre kallus gelişimine daha iyi cevap verdiği görülmüştür.



Çizelge 4.16 Kapyra biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları (%)

BBD (2,4-D+TDZ) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 g (0.00)	0.00 g (0.00)	0.00 H (0.00)
0+0.5	0.00 g (0.00)	0.00 g (0.00)	0.00 H (0.00)
0+1	0.00 g (0.00)	0.00 g (0.00)	0.00 H (0.00)
0+2	0.00 g (0.00)	0.00 g (0.00)	0.00 H (0.00)
0.5+0	84.00 c (68.74)	100.00 a (90.00)	92.00 B (79.37)
0.5+0.5	32.00 f (34.16)	84.00 c (68.74)	58.00 D (51.45)
0.5+1	32.00 f (34.16)	68.00 d (55.83)	50.00 E (45.00)
0.5+2	32.00 f (34.16)	48.00 e (43.84)	40.00 FG (39.00)
1+0	100.00 a (90.00)	100.00 a (90.00)	100.00 A (90.00)
1+0.5	92.00 b (79.37)	100.00 a (90.00)	96.00 AB (84.68)
1+1	84.00 c (68.74)	88.00 bc (74.06)	86.00 C (71.40)
1+2	20.00 f (26.56)	48.00 e (43.84)	34.00 G (35.20)
2+0	100.00 a (90.00)	100.00 a (90.00)	100.00 A (90.00)
2+0.5	100.00 a (90.00)	100.00 a (90.00)	100.00 A (90.00)
2+1	92.00 b (79.37)	100.00 a (90.00)	96.00 AB (84.68)
2+2	32.00 f (31.63)	64.00 d (53.30)	46.00 EF (42.46)
Eksplant Ortalama	49.75 B (45.43)	62.50 A (54.97)	

LSD_{BBD}: 5.87***, LSD_{Eksplant}: 2.07***, LSD_{BBD*Eksplant}: 8.31***

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Dolma biber hattında kurulan birinci denemenin (2,4-D; 0, 0.5, 1 ve 2 mg/l + TDZ; 0, 0.5, 1 ve 2mg/l) bulgularına göre, hem hipokotil hem de kotiledon eksplantlarında düşük oranda sürgün benzeri yapıların oluştuğu belirlenmiştir. Oluşan sürgün benzeri yapılar gelişmelerini tamamlayamamışlardır. Diğer hatlara göre dolma biber rejenerasyona en geç cevap veren hat olarak görülmüştür. Sürgün benzeri yapıların oluşumu ilk kültür tarihinden itibaren hipokotil eksplant için 3. haftada, kotiledon eksplant için ise 4. haftada gözlenmiştir. İstatistik analizler sonucunda sürgün benzeri yapıların en iyi 2 mg/l 2,4-D+2 mg/l TDZ içeren besin

ortamında, %16 oranında hipokotil eksplantlarında ve 0.5 mg/l 2,4-D+1 mg/l TDZ içeren besin ortamında %16 oranında kotiledon eksplantlarından geliştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.17). Elde edilen bulgulara göre 2,4-D ve TDZ denemeleri sonucunda uygun rejenerasyon protokolüne ulaşamamıştır. İstatistik analizler sonucunda sürgün gelişiminde kotiledon ve hipokotil eksplantlarının aynı oranda (%4) çıktıkları belirlenmiştir. BBD ortalamaları değerlendirildiğinde sürgün benzeri yapılar en iyi %14 oranında 2 mg/l 2,4-D+2 mg/l TDZ içeren besin ortamında geliştikleri tespit edilmiştir.



Çizelge 4.17 Dolma biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişim oranları (%)

BBD (2,4-D+TDZ) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
0+0.5	0.00 c (0.00)	8.00 abc (10.62)	4.00 BC (5.31)
0+1	0.00 c (0.00)	8.00 abc (10.62)	4.00 BC (5.31)
0+2	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
0.5+0	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
0.5+0.5	0.00 c (0.00)	4.00 bc (5.31)	2.00 C (2.65)
0.5+1	16.00 a (21.25)	4.00 bc (5.31)	10.00 AB (13.28)
0.5+2	8.00 abc (10.62)	12.00 ab (15.93)	10.00 AB (13.28)
1+0	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
1+0.5	8.00 abc (10.62)	0.00 c (0.00)	4.00 BC (5.31)
1+1	12.00 ab (15.93)	0.00 c (0.00)	6.00 BC (7.96)
1+2	4.00 bc (5.31)	8.00 abc (10.62)	6.00 BC (7.96)
2+0	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
2+0.5	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
2+1	4.00 bc (5.31)	4.00 bc (5.31)	4.00 BC (5.31)
2+2	12.00 ab (15.93)	16.00 a (21.25)	14.00 A (18.59)
Eksplant Ortalama	4.00 A (5.31)	4.00 A (5.31)	

LSD_{BBD}: 8.10***, LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{BBD*Eksplant}: 11.45*

Ö.D.: Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Dolma biberde birinci organogenesis denemesinde (2,4-D; 0, 0.5, 1 ve 2 mg/l+TDZ; 0, 0.5, 1 ve 2)'de en iyi kallus gelişimleri, %92 oranında 0.5 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l 2,4-D içeren besin ortamında, kotiledon eksplantlarında belirlenmiştir (Çizelge 4.18). Hipokotil eksplantında ise en iyi gelişim %84 oranında 2 mg/l 2,4-D içeren besin ortamında tespit edilmiştir. Hipokotil eksplantlarından kallus yapılarının ilk gelişim 15. günden itibaren gözlemlenirken, kotiledon

eksplantlarında ise 10. günden itibaren gelişim gözlenmiştir. Diğer biber hatlarına göre en düşük kallus gelişimi dolma biber hattında gözlenmiştir. Hem kotiledon hem de hipotokil eksplantlarında oluşan kallus yapıları başlangıçta beyaz-kırılgan yapıda iken daha sonra sarı ve kahverengi renkte daha kompakt yapılara döndükleri gözlenmiştir. İstatistiksel olarak BBD, eksplant ve BBD*eksplant interaksyonu kallus gelişim yönünden önemli bulunmuştur. Ancak oluşan kallus yapılarından herhangi bir rejenerasyon gözlenmemiştir. Kallus gelişimlerinde BBD ortalamaları incelendiğinde en iyi gelişim 2 mg/l 2,4-D'de %100 olarak belirlenmiştir. Eksplantlar arasındaki ortalamalara bakıldığında, kotiledon eksplantının (%47) hipokotil eksplantına (%33.5) göre kallus gelişimine daha iyi cevap verdiği görülmüştür.



Çizelge 4.18 Dolma biberde birinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları (%)

BBD (2,4-D+TDZ) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 H (0.00)
0+0.5	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 H (0.00)
0+1	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 H (0.00)
0+2	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 H (0.00)
0.5+0	52.00 def (46.15)	92.00 a (79.37)	72.00 B (62.76)
0.5+0.5	16.00 hi (21.25)	80.00 ab (68.99)	48.00 D (45.12)
0.5+1	20.00 hi (23.78)	44.00 fg (41.53)	32.00 EF (32.66)
0.5+2	20.00 hi (23.78)	28.00 gh (31.63)	24.00 FG (27.70)
1+0	76.00 bc (60.90)	84.00 ab (68.74)	80.00 B (64.82)
1+0.5	68.00 cd (55.83)	56.00 def (48.46)	62.00 CD (52.14)
1+1	56.00 def (48.46)	44.00 fg (41.53)	50.00 D (45.00)
1+2	12.00 hi (15.93)	24.00 h (29.09)	18.00 G (22.51)
2+0	84.00 ab (68.74)	92.00 a (79.37)	88.00 A (74.06)
2+0.5	48.00 ef (43.84)	88.00 a (74.06)	68.00 BC (58.95)
2+1	64.00 cde (53.30)	68.00 cd (55.83)	66.00 C (54.56)
2+2	20.00 hi (26.56)	52.00 def (46.15)	36.00 E (36.35)
Eksplant Ortalama	33.5 B (30.53)	47.00 A (41.55)	

LSD_{BBD}:7.89***, LSD_{Eksplant}:2.79***, LSD_{BBD*Eksplant}: 11.16***

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

4.1.2.2. Deneme 2: BA+IAA ortam bulguları

Sivri biberde gerçekleştirilen ikinci organogenesis denemesi olan BA (1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l)+IAA (0.5 ve 1 mg/l)'da en iyi en sürgün gelişimi hipokotil eksplantında, 4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA içeren besin ortamında %80 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.19). Ayrıca hipokotil eksplantlarında, 4 mg/l BA+1 mg/l

IAA içeren besin ortamında %52 oranında sürgün gelişiminin olduğu tespit edilmiştir. Kotiledon eksplantlarındaki sürgün gelişimi incelendiğinde ise en iyi sonuç 3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA içeren besin ortamında %48 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre, rejenerasyon çalışmalarında kullanılan hipokotil eksplantlarının kotiledon eksplantlarına göre daha iyi sonuç verdiği istatistiksel olarak belirlenmiştir. Sürgün yapılarının oluşum zamanları incelendiğinde ise, hipokotil eksplantları için; kültür başlangıcından itibaren ikinci haftanın sonunda sürgün yapılarının oluştuğu, benzer şekilde kotiledon eksplantları için 20. günün sonunda sürgün yapılarının oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.14). Oluşan sürgünlerin diğer denemelerden oluşan sürgün yapılarına göre normal gelişim gösterdikleri belirlenmiştir. Transformasyon sonrası rejenerasyon çalışmalarında, hipokotil ve kotiledon eksplantlar için sürgün gelişiminin en iyi olduğu belirlenen BBD konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu ortamlar hipokotil eksplantlar için 4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, kotiledon eksplantlar içinde 3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.14 Sivri biber hattının hipokotil eksplantlarından sürgün yapılarının gelişimi (4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, 15. gün)

Çizelge 4.19 Sivri biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi (%)

BBD (BA+IAA) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 h (0.00)	0.00 h (0.00)	0.00 G (0.00)
1+0.5	4.00 gh (5.31)	4.00 gh (5.31)	4.00 FG (5.31)
1+1	4.00 gh (5.31)	4.00 gh (5.31)	4.00 FG (5.31)
2+0.5	20.00 def (21.00)	16.00 def (21.25)	18.00 CDE (21.12)
2+1	12.00 efg (15.93) efg	32.00 bcd (34.16)	22.00 BCD (25.05)
3+0.5	16.00 efg (18.47)	48.00 b (43.84)	32.00 ABC (31.15)
3+1	24.00 cde (26.31)	40.00 bc (39.23)	32.00 AB (32.77)
4+0.5	80.00 a (66.21)	12.00 efg (15.93)	46.00 A (41.07)
4+1	52.00 b (46.15)	8.00 fgh (10.62)	30.00 BCD (28.39)
5+0.5	36.00 bc (36.69)	4.00 gh (5.31)	20.00 DE (21.00)
5+1	24.00 cde (29.09)	0.00 h (0.00)	12.00 EF (14.54)
Eksplant Ortalama	24.72 A (24.59)	15.27 B (16.45)	

LSD_{BBD}: 10.10*** LSD_{Eksplant}: 4.30*** LSD_{BBD*Eksplant}: 14.28***

Parantez içerisinde verilmiş değerler açığa transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Kallus gelişimleri incelendiğinde her iki eksplant tipinde de kallus gelişiminin çok zayıf olduğu ya da hiç olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen kallus yapılarının da beyaz, camsı ve rejeneratif özellikte olmadığı ve bir süre sonra kurumaya başladıkları gözlenmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise en iyi kallus gelişimlerinin 1 mg/l BA+1 mg/l IAA içeren besin ortamında %20 hipokotil ve %28 kotiledon eksplantlarda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20 Sivri biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi (%)

BBD (BA+IAA) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
1+0.5	4.00 c (5.31)	12.00 b (15.93)	8.00 B (10.62)
1+1	20.00 a (26.56)	28.00 a (28.85)	24.00 A (27.70)
2+0.5	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
2+1	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
3+0.5	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
3+1	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
4+0.5	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
4+1	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
5+0.5	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
5+1	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 C (0.00)
Eksplant Ortalama	2.18 A (2.89)	3.63 A (4.07)	

LSD_{Eksplant}: Ö.D. ; LSD_{BBD}: 4.80*** ; LSD_{Eksplant*BBD}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

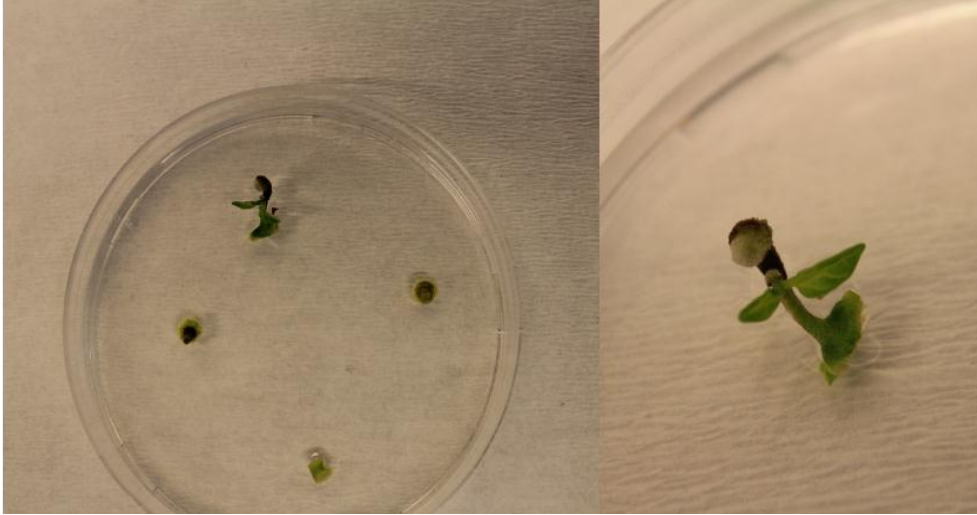
Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamlar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Çarliston biberde gerçekleştirilen ikinci organogenesis denemesi olan BA (1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l)+IAA (0.5 ve 1 mg/l)'da en iyi en sürgün gelişimi hipokotil eksplantında, 3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA içeren besin ortamında %80 olarak belirlenmiştir. Ayrıca hipokotil eksplantlarında, 3 mg/l BA+1 mg/l IAA içeren besin ortamında %68 oranında sürgün gelişiminin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.21). Kotiledon eksplantlarındaki sürgün gelişimi incelendiğinde ise en iyi sonuç 2 mg/l BA+1 mg/l IAA içeren besin ortamında %68 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, rejenerasyon çalışmalarında kullanılan hipokotil eksplantların kotiledon eksplantlarına göre daha iyi sonuç verdiği istatistiksel olarak belirlenmiştir. Sürgün yapılarının oluşum zamanları incelendiğinde ise, kültür başlangıcından itibaren 18. günün sonunda hipokotil eksplantlardan, kotiledon eksplantlardan ise 25. günün sonunda sürgün yapılarının oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Çarliston biber hattının hipokotil eksplantında sürgün gelişimi (3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, 18. gün)

Çizelge 4.21 Çarliston biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi (%)

BBD (BA+IAA) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 F (0.00)
1+0.5	0.00 (0.00)	4.00 ij (5.31)	2.00 EF (2.65)
1+1	0.00 (0.00)	12.00 hi (15.93)	6.00 E (7.96)
2+0.5	24.00 fg (29.09)	16.00 gh (18.47)	20.00 CD (23.78)
2+1	32.00 ef (34.16)	68.00 ab (55.83)	50.00 B (45.00)
3+0.5	80.00 a (66.21)	52.00 bcd (46.15)	66.00 A (56.18)
3+1	68.00 ab (55.83)	36.00 def (36.69)	52.00 B (46.26)
4+0.5	56.00 bc (48.46)	28.00 ef (31.63)	42.00 B (40.04)
4+1	52.00 bcd (46.15)	12.00 hi (15.93)	32.00 C (31.04)
5+0.5	44.00 cde (41.53)	4.00 ij (5.31)	24.00 CD (23.42)
5+1	40.00 cdef (39.23)	4.00 ij (5.31)	22.00 C (22.27)
Eksplant Ortalama	36.00 A (32.79)	21.45 B (21.51)	

LSD_{Eksplant}: 7.93***; LSD_{BBD}: 3.38***; LSD_{Eksplant*BBD}: 11.22***

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Kallus gelişimlerinin kotiledon ve hipokotil eksplantlarında çok zayıf olduğu, bu kallus yapılarının rejeneratif özellikte olmadığı ve gelişim göstermedikleri

gözlenmiştir. Her iki eksplant tipinden elde edilen kallus yapılarının sarı-kahverengi renkte ve rejenere özellikte olmayan yapılar olduğu gözlenmiştir. Çarliston biber hattında en iyi kallus gelişimlerinin 1 mg/l BA+0.5 mg/l IAA içeren besin ortamında %12 oranında hipokotil ve %16 oranında kotiledon eksplantlarında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.22). Transformasyon sonrası rejenerasyon çalışmalarında, hipokotil ve kotiledon eksplantlar için sürgün gelişiminin en iyi olduğu belirlenen BBD konsantrasyonları kullanılmıştır.

Çizelge 4.22 Çarliston biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi (%)

BBD (BA+IAA) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 B (0.00)
1+0.5	12.00 ab (15.93)	16.00 a (21.25)	14.00 A (18.59)
1+1	8.00 bc (10.62)	12.00 ab (15.93)	10.00 A (13.28)
2+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 B (0.00)
2+1	4.00 d (5.31)	0.00 d (0.00)	2.00 B (2.65)
3+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 B (0.00)
3+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 B (0.00)
4+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 B (0.00)
4+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 B (0.00)
5+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 B (0.00)
5+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 B (0.00)
Eksplant Ortalama	2.18 B (2.89)	2.54 A (3.38)	

LSD_{Eksplant}: Ö.D. ; LSD_{BBD}:5.73*** ; LSD_{Eksplant*BBD}: Ö.D.

Ö.D. Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

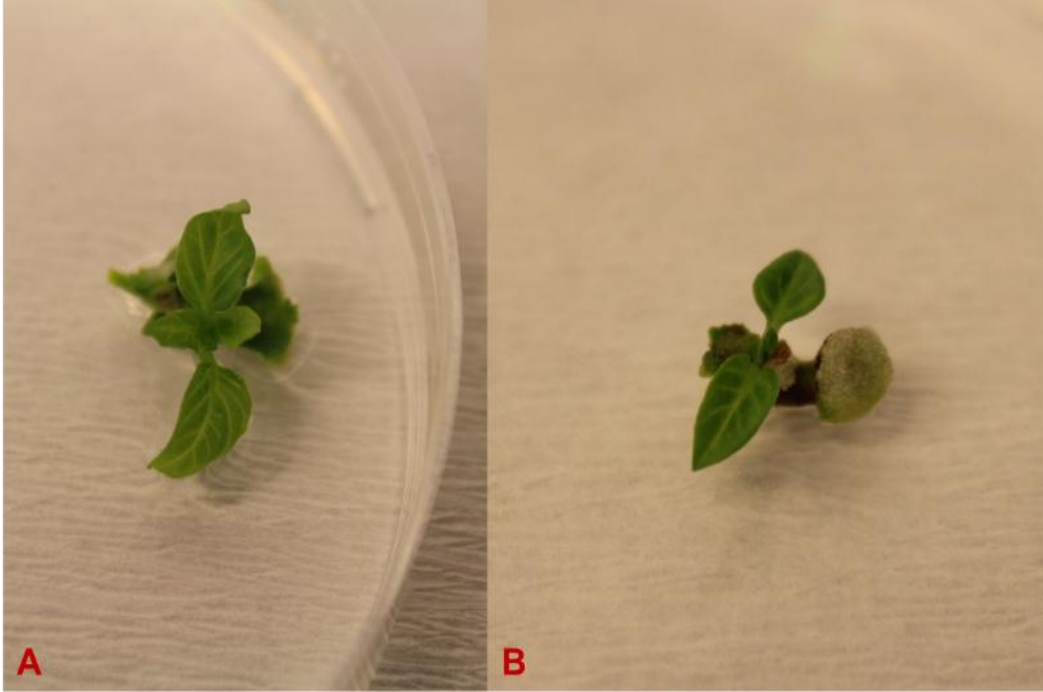
Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Kapya biber hattında gerçekleştirilen ikinci organogenesis denemesi (BA; 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l+IAA; 0.5 ve 1 mg/l) sürgün gelişim bulguları incelendiğinde, en iyi en sürgün gelişimi hipokotil eksplantında, 5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA içeren besin ortamında %80 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.23). Ayrıca hipokotil eksplantlarında, 5 mg/l BA+1 mg/l IAA içeren besin ortamında %56 oranında sürgün gelişiminin olduğu tespit edilmiştir. Kotiledon eksplantlarındaki sürgün

gelişimi incelendiğinde ise en iyi sonuç 2 mg/l BA+1 mg/l IAA içeren besin ortamında %48 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, rejenerasyon çalışmalarında kullanılan hipokotil eksplantların (%27.7) kotiledon eksplantlara (%16.72) göre daha iyi sonuç verdiği istatistiksel olarak belirlenmiştir. Sürgün yapılarının oluşum zamanları incelendiğinde ise, kültür başlangıcından itibaren 15. günün sonunda hipokotil eksplantlarından, kotiledon eksplantlardan ise 20. günün sonunda sürgün yapılarının oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.16). Oluşan sürgün yapıların altkültür süresince gelişimlerine devam ettikleri belirlenmiştir. Kapa biber hattı için en uygun protokol BA+IAA denemelerinde belirlenmiş ve bu konsantrasyonlar transformasyon çalışmalarında kullanılmaya devam edilmiştir.



Şekil 4.16 Kapa biber hatlarında sürgün oluşumları, A) Kotiledon eksplantlardan sürgün yapılarının gelişimi (2 mg/l BA+1 mg/l IAA, 20. gün), B) Hipokotil eksplantlardan sürgün yapılarının gelişimi (5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, 15. gün)

Çizelge 4.23 Kapyra biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi (%)

BBD (BA+IAA) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 E (0.00)
1+0.5	16.00 fgh (21.25)	8.00 hij (10.62)	12.00 CD (15.93)
1+1	8.00 hij (10.62)	4.00 ij (5.31)	6.00 DE (7.96)
2+0.5	28.00 cdef (31.63)	48.00 bc (43.84)	38.00 A (37.73)
2+1	24.00 defg (29.09)	36.00 bcde (36.69)	30.00 AB (32.89)
3+0.5	32.00 cdef (34.16)	20.00 efgh (23.78)	26.00 AB (28.97)
3+1	8.00 hij (10.62)	40.00 bcd (39.00)	24.00 BC (24.81)
4+0.5	12.00 ghi (15.93)	16.00 fgh (21.25)	14.00 C (18.59)
4+1	36.00 bcde (36.47)	8.00 hij (10.62)	22.00 BC (23.54)
5+0.5	80.00 a (66.21)	4.00 ij (5.31)	42.00 A (35.76)
5+1	56.00 b (48.46)	0.00 j (0.00)	28.00 BC (24.23)
Eksplant Ortalama	27.27 A (27.68)	16.72 B (17.86)	

LSD_{BBD}: 9.36***, LSD_{Eksplant}: 3.99***, LSD_{BBD*Eksplant}: 13.23***

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Kapyra biber hattında ikinci deneme kapsamında, kallus bulguları incelendiğinde, çok düşük oranda kallus yapıları elde edilmiştir. Elde edilen kallus yapılarından herhangi bir rejenerasyon sağlanamamıştır. İstatistik analizler sonucunda sadece BBD'ler önemli olarak bulunmuştur. Eksplantlarda gelişim incelendiğinde, 1 mg/l BA+0.5 mg/l IAA içeren besin ortamlarında kotiledon eksplantından %28, hipokotil eksplantından %20 oranında kallus elde edilmiştir (Çizelge 4.24). Gözlemler sonucunda kallus yapılarının beyaz ve camsı yapıda oldukları belirlenmiştir. Elde edilen kalluslardan herhangi bir rejenerasyon gelişimi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.24 Kapyra biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi (%)

BBD (BA+IAA) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
1+0.5	20.00 ab (26.56)	28.00 a (31.63)	24.00 A (29.09)
1+1	12.00 c (15.93)	20.00 b (23.78)	16.00 B (19.86)
2+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
2+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
3+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
3+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
4+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
4+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
5+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
5+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
Eksplant Ortalama	2.90 A (3.86)	4.36 A (5.03)	

LSD_{BBD}: 4.09***, LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{BBD*Eksplant}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Dolma biber hattında gerçekleştirilen ikinci organogenesis denemesi (BA; 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l+IAA; 0.5 ve 1 mg/l) sürgün gelişim bulguları incelendiğinde, en iyi en sürgün gelişimi hipokotil eksplantında, 5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA içeren besin ortamında %84 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.25). Ayrıca hipokotil eksplantlarında, 4 mg/l BA+1 mg/l IAA içeren besin ortamında %56 oranında sürgün gelişiminin olduğu tespit edilmiştir. Kotiledon eksplantlardaki sürgün gelişimi incelendiğinde ise en iyi sonuç 2 mg/l BA+1 mg/l IAA içeren besin ortamında %52 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, rejenerasyon çalışmalarında kullanılan hipokotil eksplantlarının (%32.36) kotiledon eksplantlarına (%21.09) göre daha iyi sonuç verdiği istatistiksel olarak belirlenmiştir. Sürgün yapılarının oluşum zamanları incelendiğinde, hipokotil eksplantları için; kültür başlangıcından itibaren 20. günün sonunda, kotiledon eksplantları için ise; 23. günün sonunda sürgün yapılarının oluştuğu gözlenmiştir. Oluşan sürgün yapıların altkültür süresince gelişimlerine devam ettikleri

belirlenmiştir (Şekil 4.17). Dolma biber hattı için en uygun protokol BA+IAA denemelerinde belirlenmiş ve bu konsantrasyonlar transformasyon çalışmalarında kullanılmaya devam edilmiştir.



Şekil 4.17 Dolma biber hattında hipkotil eksplantlardan sürgünlerin gelişimi (5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA, 20. gün)

Çizelge 4.25 Dolma biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişim oranları (%)

BBD (BA+IAA) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 C (0.00)
1+0.5	4.00 f (5.31)	4.00 f (5.31)	4.00 C (5.31)
1+1	0.00 f (0.00)	8.00 f (10.62)	4.00 C (5.31)
2+0.5	32.00 cde (34.16)	32.00 cde (34.16)	32.00 A (34.16)
2+1	24.00 de (29.09)	52.00 b (46.15)	38.00 A (37.62)
3+0.5	32.00 cde (34.16)	44.00 bc (41.53)	38.00 A (37.85)
3+1	44.00 bc (41.53)	40.00 bcd (39.00)	42.00 A (40.27)
4+0.5	52.00 b (46.15)	20.00 e (26.56)	36.00 A (34.96)
4+1	56.00 b (48.46)	20.00 e (26.56)	38.00 A (37.51)
5+0.5	84.00 a (68.74)	8.00 f (10.62)	46.00 A (39.68)
5+1	28.00 cde (31.63)	4.00 f (5.31)	16.00 B (18.47)
Eksplant Ortalama	32.36 A (30.84)	21.09 B (22.09)	

LSD_{Eksplant}:3.28***, LSD_{BBD}: 7.70***, LSD_{Eksplant*BBD}:10.89***

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Dolma biber hattında, BA ve IAA'nın farklı konsantrasyonlarında elde edilen kallus oluşumlarından herhangi bir rejenerasyon elde edilememiştir. Kallus yapıları diğer hatlara göre daha düşük oranda oluşum göstermişlerdir. En iyi kallus gelişimi 1 mg/l BA+0.5 mg/l IAA içeren besin ortamında %36 oranında kotiledon eksplantında belirlenmiştir (Çizelge 4.26). Hipokotil eksplantlarında çok düşük oranda kallus oluşumları gerçekleşmiştir. Hipokotil eksplantlarında ise kallus oluşumları sadece 1 mg/l BA+1mg/l IAA'da %16, 2mg/l BA+0.5 mg/l IAA'da ise %12 oranında oluştuğu belirlenmiştir. Düşük oranlarda gelişen kallus yapılarından herhangi bir rejenerasyon oluşumu gözlenmemiştir. Hem kotiledon hem de hipotokil eksplantlarında oluşan kallus yapılarının beyaz-kırılgan yapıda oldukları daha sonra kahverengiye döndükleri gözlenmiştir.

Çizelge 4.26 Dolma biberde ikinci organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişim oranları (%)

BBD (BA+IAA) mg/l	Eksplant		BBD Ortalama
	Hipokotil	Kotiledon	
0+0 (Kontrol)	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
1+0.5	16.00 c (18.47)	36.00 a (36.69)	26.00 A (27.58)
1+1	12.00 c (15.93)	24.00 b (29.09)	18.00 B (22.51)
2+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
2+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
3+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
3+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
4+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
4+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
5+0.5	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
5+1	0.00 d (0.00)	0.00 d (0.00)	0.00 C (0.00)
Eksplant Ortalama	2.54 B (3.12)	5.45 A (5.98)	

LSD_{Eksplant}:1.95**, LSD_{BBD}: 4.59***, LSD_{Eksplant*BBD}:6.49***

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

4.1.2.3. Deneme 3: Sanatombi and Sharma (2008) ile Hyde and Philips (1996)

ortam bulguları

Sivri biberin üçüncü organogenesis denemesinde iki farklı protokolün (Sanatombi and Sharma, 2008 ve Hyde and Philips, 1996) kallus ve sürgün gelişimi üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Sürgün gelişimleri incelendiğinde, en iyi gelişim %20 oranında kotiledon eksplantlarında, Sanatombi and Sharma (2008)'nin geliştirdiği protokolda belirlenmiştir (Çizelge 4.27). Ancak oluşan sürgün yapılarının anormal özellik gösterdiği görülmüştür. Oluşan sürgün benzeri yapıların çok küçük yapraklı veya geniş yapraklı olduğu homejen özellik göstermedikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.18). Hyde and Philips (1996)'in geliştirdiği protokol bulguları değerlendirildiğinde çok az oranda sürgün benzeri yapıların oluştuğu gözlenmiştir. Ancak bu yapıların bitkiciğe dönüşümleri gerçekleşmemiştir. Uygulanan her iki protokolün sivri biberin rejenerasyonu için yetersiz olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişiminin diğer biber hataları ile arasındaki ilişki incelendiğinde, genotip*uygulama interaksiyonunun önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.28). En yüksek oran Sanatombi and Sharma, (2008)'nin protokolünde %40 ile kopya ve çarliston biberde görülürken, sivri biber ise %31.25 ile üçüncü sırada yer almıştır.

Çizelge 4.27 Sivri biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama Ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Sanatombi and Sharma (2008)	7.50 b (9.96)	20.00 a (24.82)	13.75 A (17.39)
Hyde and Philips (1996)	5.00 b (6.64)	5.00 b (6.64)	5.00 B (6.64)
Eksplant Ortalaması	4.16 A (5.53)	8.33 A (10.48)	

LSD_{Uygulama}: 7.20*** LSD_{Eksplant}: Ö.D. LSD_{Eksplant*Uygulama}: Ö.D.

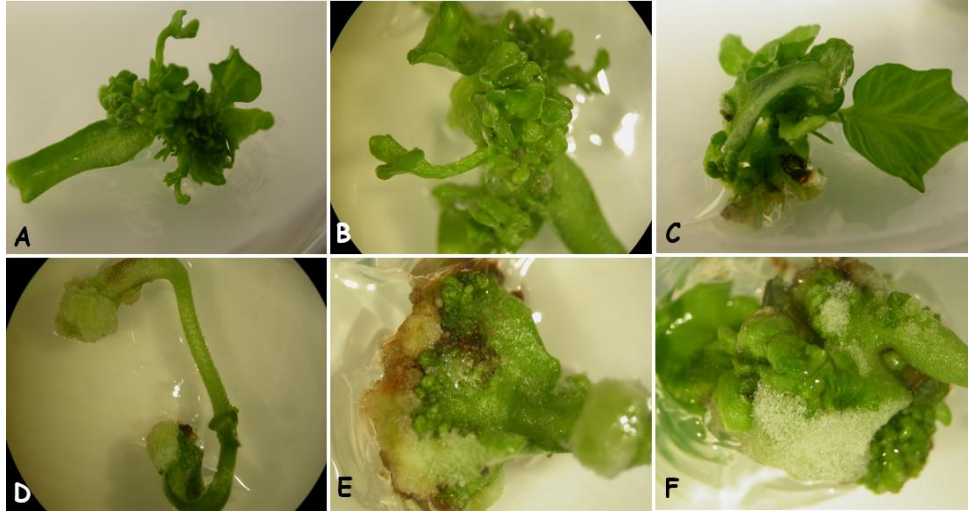
Ö.D.: Önemli Değil,

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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



Şekil 4.18 Sanatombi and Sharma (2008)'nın geliştirdiği protokole göre eksplantların gelişimi, A, B, C ve D) Hipokotil eksplantlardan sürgün benzeri yapıların gelişimi, E ve F) Kotiledon eksplantlarında abnormal yapıların gelişimi

Çizelge 4.28 Üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda biber hatlarında sürgün gelişimi (%)

Genotip	Uygulama	Eksplant	Genotip*Uygulama*Eksplant	Genotip*Uygulama	Genotip
Sivri Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D	10.41 A (11.20)
		Kotiledon	0.00 e (0.00)	(0.00)	
	Sanatombi and Sharma (2008)	Hipokotil	37.50 a (37.50)	31.25 B (33.61)	
		Kotiledon	25.00 b (29.73)		
	Hyde ve Philips (1996)	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D	
		Kotiledon	0.00 e (0.00)	(0.00)	
Çarliston Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D	13.33 A (12.98)
		Kotiledon	0.00 e (0.00)	(0.00)	
	Sanatombi and Sharma (2008)	Hipokotil	45.00 a (41.83)	40.00 A (38.94)	
		Kotiledon	35.00 a (36.06)		
	Hyde and Philips (1996)	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D	
		Kotiledon	0.00 e (0.00)	(0.00)	
Kapyra Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D	13.33 A (13.00)
		Kotiledon	0.00 e (0.00)	(0.00)	
	Sanatombi and Sharma (2008)	Hipokotil	40.00 a (38.94)	40.00 A (39.02)	
		Kotiledon	40.00 a (39.09)		
	Hyde and Philips (1996)	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D	
		Kotiledon	0.00 e (0.00)	(0.00)	
Dolma Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D	4.16 B (4.95)
		Kotiledon	0.00 e (0.00)	(0.00)	
	Sanatombi and Sharma (2008)	Hipokotil	17.50 c (19.76)	12.50 C (14.86)	
		Kotiledon	7.50 d (9.96)		
	Hyde and Philips (1996)	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D	
		Kotiledon	0.00 e (0.00)	(0.00)	

LSD_{Genotip}:2.40***; LSD_{Uygulama}:2.08***; LSD_{Eksplant}:1.70*; LSD_{Genotip*Uygulama}:4.16*** LSD_{Genotip*Eksplant}: Ö.D.; LSD_{Eksplant*Uygulama}: 2.94** ; LSD_{Genotip*Eksplant*Uygulama}:Ö.D., Ö.D. :Önemli Değil

Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Organogenesis çalışmalarında, kallus yapılarının oluşumu sadece Sanatombi and Sharma (2008)'nın protokolünde gözlenmiştir. En iyi kallus gelişimi %37.25 oranında hipokotil eksplantlarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.29). Hyde and Philips (1996)'in geliştirdiği protokolde kallus oluşumu gözlenmemiştir. Sanatombi and

Sharma (2008)'nın protokolünde oluşan kallus yapıları beyaz-sarı renkte ve camsı yapıda olduğu ve rejeneratif özellik göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.19). Kallus oluşumlarının diğer hatlar ile ilişkisi incelendiğinde, en iyi kallus gelişimi, Sanatombi and Sharma (2008)'nın protokolünde, %17.5 ile çarliston biber ve %13.75 ile sivri biberde belirlenmiştir (Çizelge 4.30).



Şekil 4.19 Sanatombi and Sharma (2008)'nın geliştirdiği protokolde eksplantların gelişimi, A ve B) Kotiledon eksplantlarda kallus gelişimi ve eksplantların kararması, C) Hipokotil eksplantlarda kararma

Çizelge 4.29 Sivri biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama Ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Sanatombi and Sharma (2008)	37.25 a (37.50)	25.00 b (29.73)	31.25 A (33.61)
Hyde and Philips (1996)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Eksplant Ortalaması	12.50 A (12.50)	8.33 B (9.91)	

LSD_{Uygulama}: 4.60***, LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{Eksplant*Uygulama}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

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

Çizelge.4.30 Üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda biber hatlarında kallus gelişimi (%)

Genotip	Deneme	Eksplant	Genotip*Deneme*Eksplant	Genotip*Deneme	Genotip
Sivri Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D (0.00)	6.25 A (8.01)
		Kotiledon	0.00 e (0.00)		
	Sanatombi and Sharma (2008)	Hipokotil	7.50 de (9.96)	13.75 A (17.39)	
		Kotiledon	20.00 ab (24.82)		
	Hyde and Philips (1996)	Hipokotil	5.00 de (6.64)	5.00 CD (6.64)	
		Kotiledon	5.00 de (6.64)		
Çarliston Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D (0.00)	7.50 A (9.09)
		Kotiledon	0.00 e (0.00)		
	Sanatombi and Sharma (2008)	Hipokotil	27.50 a (31.31)	17.50 A (20.63)	
		Kotiledon	7.50 de (9.96)		
	Hyde and Philips (1996)	Hipokotil	5.00 de (6.64)	5.00 CD (6.64)	
		Kotiledon	5.00 de (6.64)		
Kappa Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D (0.00)	6.25 A (8.30)
		Kotiledon	0.00 e (0.00)		
	Sanatombi and Sharma (2008)	Hipokotil	12.50 bcd (16.60)	11.25 AB (14.94)	
		Kotiledon	10.00 cd (13.28)		
	Hyde and Philips (1996)	Hipokotil	5.00 de (6.64)	7.50 BC (9.96)	
		Kotiledon	10.00 cd (13.28)		
Dolma Biber	Kontrol	Hipokotil	0.00 e (0.00)	0.00 D (0.00)	6.83 A (7.16)
		Kotiledon	0.00 e (0.00)		
	Sanatombi and Sharma (2008)	Hipokotil	5.00 de (6.64)	12.50 AB (14.86)	
		Kotiledon	20.00 abc (23.09)		
	Hyde and Philips (1996)	Hipokotil	0.00 e (0.00)	5.00 CD (6.64)	
		Kotiledon	10.00 cd (13.28)		

LSD_{Genotip}: Ö.D.; LSD_{Deneme}: 3.54***; LSD_{Eksplant}: Ö.D.; LSD_{Uygulama*Deneme}: Ö.D.;

LSD_{Uygulama*Eksplant}: 7.08***; LSD_{Eksplant*Deneme}: Ö.D.; LSD_{Uygulama*Eksplant*Deneme}: 10.02**, Ö.D. Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Çarliston biberde gerçekleştirilen üçüncü organogenesis denemesinde iki farklı protokolün (Sanatombi and Sharma, 2008 ve Hyde and Philips, 1996) kallus ve sürgün gelişimi üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Sürgün gelişimleri incelendiğinde, en iyi gelişim %45 oranında hipokotil eksplantlarda, Sanatombi and Sharma (2008)'nin geliştirdiği protokole belirlenmiştir (Çizelge 4.31). Ancak oluşan sürgün yapılarının çok zayıf olduğu ve gelişmediği gözlenmiştir. Oluşan sürgünler genellikle küçük yapraklı ve vitrifiye dokular şeklinde olduğu görülmüştür. Hyde and Philips (1996)'in geliştirdiği protokol bulguları değerlendirildiğinde sürgün benzeri yapıların oluştuğu gözlenmemiştir. Uygulanan her iki protokole çarliston biberin rejenerasyonu için yetersiz olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişiminin diğer hatlar ile arasındaki ilişki incelendiğinde, genotip*uygulama interaksyonunun önemli olduğu görülmüştür. İstatistiksel analizler göre genotip*uygulama interaksyonuna bakıldığında en yüksek oran Sanatombi and Sharma, (2008)'nin protokolünde %40 ile kappa ve çarliston biberde görülmüştür. Elde edilen bulgular sonucunda hem Sanatombi and Sharma (2008) hem de Hyde and Philips, (1996)'in geliştirdiği protokollerde çarliston biber hattı için rejenerasyon sağlanamamıştır.

Çizelge 4.31 Çarliston biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama Ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Sanatombi and Sharma (2008)	45.00 a (41.83)	35.00 b (36.06)	40.00 A (38.94)
Hyde and Philips (1996)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Eksplant Ortalaması	15.00 A (13.94)	11.66 A (12.02)	

LSD_{Uygulama}: 3.55***, LSD_{Eksplant}: Ö.D. LSD_{Eksplant*Uygulama}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Üçüncü organogenesis denemelerindeki kallus gelişimleri incelendiğinde, her iki protokol içinde düşük oranda kallus yapılarının oluştuğu görülmüştür. Üçüncü denemenin kallus bulgularına göre, en iyi kallus oluşumu Sanatombi and Sharma (2008)'nin protokolünde %27.50 oranında hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir (Çizelge 4.32). Kotiledon eksplanttaki kallus gelişimi ise %7.5 olarak belirlenmiştir. Her iki eksplanttan gelişen kallus yapılarının genelde dağılgan-camsı yapıda oldukları ve çok yavaş geliştiği gözlemlerde tespit edilmiştir. Hyde and Philips (1996)'in denemeleri sonucunda hipokotil ve kotiledon eksplantlardan kallus oluşumu %5 olarak belirlenmiştir. Sanatombi and Sharma (2008)'nin gözlem sonuçları ile benzer yapıda kalluslar elde edilmiştir. Her iki protokol sonucunda elde edilen kallus yapılarından rejenerasyon gerçekleşmemiştir.

Çizelge 4.32 Çarliston biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi (%)

Deneme	Eksplant		Deneme ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Sanatombi and Sharma (2008)	27.50 a (31.31)	7.50 b (9.96)	17.50 A (20.63)
Hyde and Philips (1996)	5.00 bc (6.64)	5.00 bc (6.64)	5.00 B (6.64)
Eksplant Ortalaması	10.83 A (12.65)	4.16 B (5.53)	

LSD_{Deneme}: 6.73***, LSD_{Eksplant}: 5.49** LSD_{Eksplant*Deneme}: 9.52**, Ö.D.: Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Kapya biberde gerçekleştirilen üçüncü organogenesis denemesinde iki farklı protokolün (Sanatombi and Sharma, 2008 ve Hyde and Philips, 1996) kallus ve sürgün gelişimi üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Sürgün ve kallus gelişimlerinin her iki denemede de etkisiz olduğu görülmüştür. Sürgün gelişimleri incelendiğinde, en iyi gelişim %40 oranında hipokotil ve kotiledon eksplantlarında, Sanatombi and Sharma (2008)'nin geliştirdiği protokolde belirlenmiştir (Çizelge 4.33). Ancak oluşan sürgün yapılarının çok zayıf olduğu ve gelişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.20). Oluşan sürgünler genellikle küçük yapraklı ve vitrifiye dokular şeklinde olduğu görülmüştür. Hyde and Philips (1996)'in geliştirdiği protokol bulguları değerlendirildiğinde sürgün benzeri yapıların oluştuğu gözlenmemiştir. Uygulanan her iki protokolde kapya biberin rejenerasyonu için yetersiz olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişiminin diğer hatlar ile arasındaki ilişki incelendiğinde, genotip*uygulama interaksiyonunun önemli olduğu görülmüştür. İstatistiksel analizler göre genotip*uygulama interaksiyonuna bakıldığında en yüksek oran Sanatombi and Sharma, (2008)'nin protokolünde %40 ile kapya ve çarliston biberde görülmüştür. Elde edilen bulgular sonucunda hem Sanatombi and Sharma (2008) hem de Hyde and Philips, (1996)'in geliştirdiği protokollerde çarliston biber hattı için rejenerasyon sağlanamamıştır.

Çizelge 4.33 Kapy biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama Ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Sanatombi and Sharma (2008)	40.00 a (38.94)	40.00 a (39.09)	40.00 A (39.02)
Hyde and Philips (1996)	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Eksplant Otalaması	13.33 A (12.98)	13.33 A (13.03)	

LSD_{Deneme}: 3.26*** LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{Eksplant*Deneme}: Ö.D.

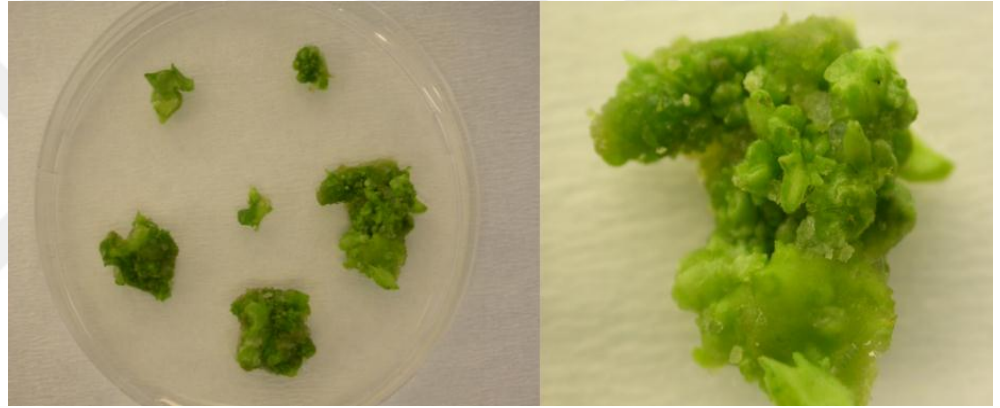
Ö.D.: Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001



Şekil 4.20 Sanatombi and Sharma (2008)'nin protokolünde oluşan sürgün benzeri yapılar

Kapy biber hattında kallus yapılarının oluşumu iki deneme (Sanatombi and Sharma, 2008 ve Hyde and Philips 1996)'nin protokolünde de gözlenmiştir. En iyi kallus gelişimi %12.50 oranında hipokotil eksplantında tespit edilmiştir. Hyde and Philips (1996)'in geliştirdiği protokolde kallus oluşumu ise %10 oranında kotiledon eksplantında belirlenmiştir (Çizelge 4.34). Sanatombi and Sharma (2008)'nin protokolünde oluşan kallus yapıları beyaz-sarı renkte ve kırılgan yapıda olduğu gözlenmiştir. Her iki protokol bulguları sonucunda edilen kallus yapıları rejeneratif özellik göstermemiştir. Kallus oluşumlarının genotip*uygulama*eksplant interaksyonu ilişkisi incelendiğinde, en iyi kallus gelişimi, Sanatombi and Sharma (2008)'nin protokolünde, %45 ile çarliston biberde hipokotil eksplantta ve %40 ile kapy biberde hem kotiledon hem de hipokotil belirlenmiştir.

Çizelge 4.34 Kapyra biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama Ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 b (0.00)	0.00 b (0.00)	0.00 B (0.00)
Sanatombi and Sharma (2008)	12.50 a (16.60)	10.00 a (13.28)	11.25 A (14.94)
Hyde and Philips (1996)	5.00 ab (6.64)	10.00 a (13.28)	7.50 A (9.96)
Eksplant Ortalaması	5.83 A (7.74)	6.66 A (8.85)	

LSD_{Uygulama}: 7.94** LSD_{Eksplant}: Ö.D., LSD_{Eksplant*Uygulama}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

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

Dolma biberde gerçekleştirilen üçüncü organogenesis denemesinde iki farklı protokolün (Sanatombi and Sharma, 2008 ve Hyde and Philips, 1996) kallus ve sürgün gelişimi üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Normal sürgün rejenerasyonunun her iki denemede görülmediği belirlenmiştir. Ancak sürgün benzeri yapıların oluştuğu görülmüştür. Sürgün benzeri yapıların gelişimleri incelendiğinde, en iyi gelişim %17.5 oranında hipokotil eksplantında, Sanatombi and Sharma (2008)'nin geliştirdiği protokolde belirlenmiştir. Benzer olarak kotiledon eksplantında %7.5 olarak gelişim tespit edilmiştir (Çizelge 4.35). Ancak oluşan sürgün benzeri yapılarının çok zayıf olduğu ve gelişmediği gözlenmiştir. Oluşan sürgün benzeri yapılar genellikle küçük yapraklı ve vitrifiye dokular şeklinde olduğu görülmüştür. Hyde and Philips (1996)'in geliştirdiği protokol bulguları değerlendirildiğinde sürgün benzeri yapıların oluştuğu gözlenmemiştir. Uygulanan her iki protokolde dolma biberin rejenerasyonu için yetersiz olduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişiminin diğer hatlar ile arasındaki ilişki incelendiğinde, genotip*uygulama interaksyonunun önemli olduğu görülmüştür. İstatistiksel analizlere göre genotip*uygulama interaksyonuna bakıldığında en yüksek oran Sanatombi and Sharma, (2008)'nin protokolünde %40 ile kapyra ve çarliston biberde görülürken, en düşük ise %12.5 oranında dolma biberde belirlenmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda hem Sanatombi and Sharma (2008) hem de Hyde and Philips, (1996)'in geliştirdiği protokollerde dolma biber hattı için rejenerasyon sağlanamamıştır.

Çizelge 4.35 Dolma biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimi (%)

Uygulama	Eksplant		Deneme ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Sanatombi and Sharma (2008)	17.50 a (19.76)	7.50 b (9.96)	12.50 A (14.86)
Hyde and Philips (1996)	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Eksplant Ortalaması	5.83 A (6.58)	2.50 A (3.32)	

LSD_{Uygulama}: 6.41 *** LSD_{Eksplant}: Ö.D. LSD_{Eksplant*Uygulama}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamalar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Dolma biber hattında kallus yapılarının oluşumu iki deneme (Sanatombi and Sharma, 2008 ve Hyde and Philips 1996)'nin protokolünde de gözlenmiştir. En iyi kallus gelişimi %12.50 oranında, Sanatombi and Sharma (2008)'nin protokolünde, hipokotil eksplantında tespit edilmiştir (Çizelge 4.36). Hyde and Philips (1996)'in geliştirdiği protokolde kallus oluşumu ise %10 oranında kotiledon eksplantında belirlenmiştir. Sanatombi and Sharma (2008)'nin protokolünde oluşan kallus yapıları beyaz-sarı renkte ve kırılkan yapıda olduğu gözlenmiştir. Her iki protokol bulguları sonucunda elde edilen kallus yapıları rejeneratif özellik göstermemiştir. Kallus oluşumlarının genotip*uygulama*eksplant interaksyonu ilişkisi incelendiğinde, en iyi kallus gelişimi, Sanatombi and Sharma (2008)'nin protokolünde, %27.5 ile çarliston biberde hipokotil eksplantta ve %20 ile dolma ve sivri biber kotiledon eksplantında belirlenmiştir.

Çizelge 4.36 Dolma biberde üçüncü organogenesis denemeleri sonucunda kallus gelişimi (%)

Uygulama	Eksplant		Uygulama ortalaması
	Hipokotil	Kotiledon	
Kontrol	0.00 c (0.00)	0.00 c (0.00)	0.00 B (0.00)
Sanatombi and Sharma (2008)	5.00 bc (6.64)	20.00 a (23.09)	12.50 A (14.86)
Hyde and Philips (1996)	0.00 c (0.00)	10.00 ab (13.28)	5.00 B (6.64)
Eksplant Ortalaması	1.66 B (2.21)	10.00 A (12.12)	

LSD_{Uygulama}: 7.05*** LSD_{Eksplant}: 5.74** LSD_{Eksplant*Uygulama}: Ö.D.

Ö.D.: Önemli Değil

Kontrol: BBD içermeyen MS ortamı

Parantez içerisinde verilmiş değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ortalamlar arasındaki farklılıklar aynı harflerle gösterilmiştir.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

4.1.3 Transformasyon denemeleri için belirlenmiş optimum rejenerasyon ortam bulguları

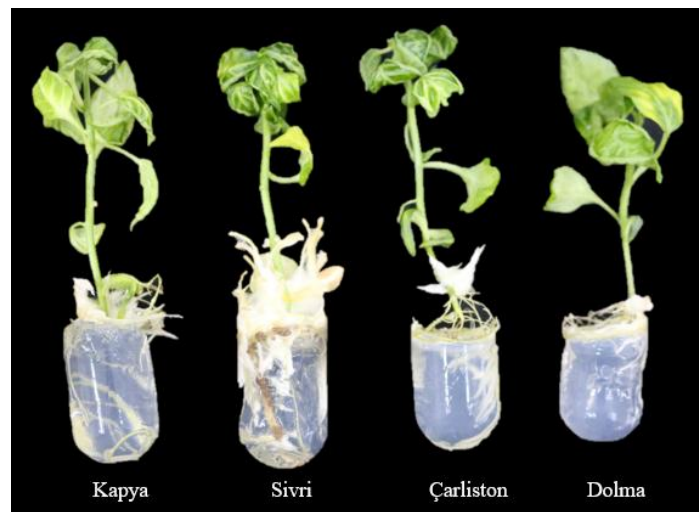
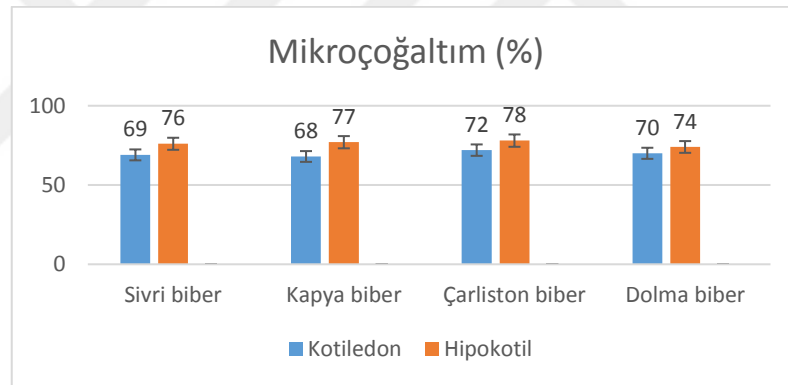
Rejenerasyon denemeleri sonucunda biber genotipleri için belirlenen en iyi konsantrasyonlar transformasyon denemelerinde kullanılmıştır. En iyi rejenerasyon ortamları ikinci organogenesis denemeleri (BA ve IAA kombinasyonu) sonucunda belirlenmiştir. Sivri, çarliston, kapyra ve dolma biber için gerçekleştirilen transformasyon çalışmalarında kullanılan en iyi rejenerasyon ortamları Çizelge 4.37’de sunulmuştur.

Çizelge 4.37 Transformasyon denemelerinde kullanılan en iyi rejenerasyon ortamları

Biber Hatları	Eksplant	En iyi sürgün oluşturma ortamları	Rejenerasyon oranları
Çarliston biber	kotileon	2 mg/l BA+1 mg/l IAA	%68
	hipokotil	3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	%80
Sivri biber	kotileon	3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	%48
	hipokotil	4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	%80
Kapyra biber	kotileon	2 mg/l BA+1 mg/l IAA	%48
	hipokotil	5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	%80
Dolma biber	kotileon	2 mg/l BA+1 mg/l IAA	%52
	hipokotil	5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA	%84

Rejenerasyon denemeleri sonucunda elde edilen sürgünlerin mikroçoğaltımları gerçekleştirilmiştir. Hipokotil ve kotiledon eksplantlardan elde edilen sürgünler optimize edilen en iyi rejenerasyon ortamlarına aktararak çoğaltımları yapılmıştır (Şekil 4.21). Üç altkültür süresince sürgünlerin gelişimleri takip edilmiştir. Çoğaltım bulguları incelendiğinde en yüksek kardeşlenme %78 oranında çarliston biberin hipokotil eksplantlarından oluşan sürgünlerden elde edilirken, kapy biberin hipokotil eksplantlarından oluşan sürgünlerden %77, sivri biberin hipokotil eksplantlarından oluşan sürgünlerden %76, dolma biberin hipokotil eksplantlarından oluşan sürgünlerden %74 olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.38). Elde edilen tüm sürgünler köklendirme ortamlarına transfer edilmiştir. 0.5 mg/l IAA köklendirme ortamlarında tüm sürgünlerde köklenme gözlenmiştir (%100).

Çizelge 4.38 Biber hatlarının mikroçoğaltım oranları



Şekil 4.21 Mikroçoğaltımları gerçekleştirilen ve köklendirilen biber bitkicikleri

4.2 Biber Hatlarında Transformasyon Bulguları

Tez çalışmasında *AtNHX1* ve *PSARKIPT* genlerinin transformasyonlarında kullanılan sivri, çarliston, kapyra ve dolma biber tohumları *in vitro*'da, 7-10 gün karanlık ortam koşullarında çimlendirilmiş ve elde edilen hipokotil ve kotiledon eksplantlar transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Transformasyon sonrası hipokotil ve kotiledon eksplantlar sırasıyla, rejenerasyon ortamı (M1), seçici seleksiyon ortamı (M2), sürgün geliştirme ortamı (M3) ve köklendirme ortamında (M4) kültüre alınmışlardır. Transformasyonu yapılan eksplantlar 4 hafta sonra taze besin ortamlarına (M2) transfer edilmişlerdir. Altkültür işlemi sonrası yapılan gözlemlerde tüm hatlar için hipokotil eksplantların rejenerasyon yeteneklerinin kotiledon eksplantlara göre daha iyi oldukları gözlenmiştir. Transformasyon denemelerinde dört biber hattı için toplamda 3857 eksplant hem *AtNHX1* hem de *PSARKIPT* genleri için kullanılmıştır.

Biber hatlarında transgenik sürgünlerin oluşumları, eksplant başına oluşan sürgünlerin sayısı belirlenerek hesaplanmıştır. Transformasyon sonrası hatların sürgün oluşumuna cevapları incelendiğinde, *AtNHX1* için en iyi gelişimler sivri (20 adet sürgün) ve çarliston (17 adet sürgün) biberlerde görülmüştür. Bu hatların cevabının diğer iki hatta göre daha hızlı olduğu belirlenmiştir. Çok sayıda sürgün benzeri yapılar oluşmasına rağmen bu yapılar bir süre sonra sararıp kuruyarak canlılıklarını yitirmişlerdir. *AtNHX1* ile kokültüvasyon sonrası aday transgenik sürgün oluşumlarına en iyi cevap sivri (14 adet sürgün) ve çarliston biber (11 adet sürgün) hatlarında görülmüştür. *PSARKIPT* için en iyi sürgün gelişimleri çarliston (20 adet sürgün) ve sivri biber (17 adet sürgün) hatlarında belirlenirken, aday transgenik sürgün oluşumları ise en iyi çarliston (18 adet sürgün) ve sivri biber (11 adet sürgün) hatlarında tespit edilmiştir. Tüm biber hatlarında hipokotil eksplantlarda sürgün oluşumlarının kotiledon eksplantlara göre daha etkili olduğu ve oluşan sürgünlerin hızlı bir şekilde geliştiği gözlenmiştir (3. hafta). Tüm biber hatlarının hem *AtNHX1* hem de *PSARKIPT* için transformasyon etkinliklerine bakıldığında, frekansın %1.18'den %3.74 arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.39). *PSARKIPT* ile yapılan transformasyon sonucunda en yüksek transformasyon frekansı %3.74 ile çarliston biberde belirlenmiştir. *AtNHX1* için ise en yüksek transformasyon frekansı %2.92 ile sivri biberde görülmüştür. Diğer biber hatları ile

kıyaslandığında, dolma biber hattı her iki gen olan *AtNHX1* (%1.18) ve *PSARKIPT* (%1.34) için en düşük transformasyon frekansına sahip oldukları belirlenmiştir. Transformasyon denemeleri sonucunda tüm biber hatlarından gelişen 119 adet sürgün M3 ortamına transfer edilmiştir. M3 ortamında sürgünler, 4 hafta süresince kültüre alınarak uzamaları sağlanmıştır. Gelişen sürgünler M4 ortamında %100 köklendirilerek aday transgenik biber hatları elde edilmiştir. Toplam 119 bitkicikten yapılan PCR analizleri sonucunda 87 adedi aday transgenik olarak belirlenmiştir. Transformasyon sonrası biber hatlarının uygulama ait rejenerasyon gelişimleri Şekil 4.22, 23, 24 ve 25’de sunulmuştur.

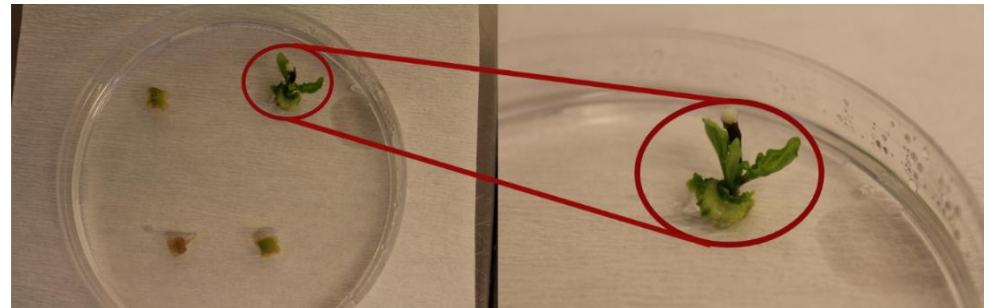
Çizelge 4.39 Biber hatlarında transgenik sürgün oluşumu ve transformasyon frekansı

Transgen/Hat	Eksplant sayısı ^c	Sürgün oluşumu	Aday transgenik sürgün oluşumu ^a	Transformasyon frekansı ^b (%)
<i>AtNHX1</i>				
Kapya	450	14	11	2.44
Çarliston	475	17	12	2.53
Sivri	480	20	14	2.92
Dolma	510	8	6	1.18
<i>PSARKIPT</i>				
Kapya	462	13	8	1.73
Çarliston	481	20	18	3.74
Sivri	478	17	11	2.30
Dolma	521	10	7	1.34
Toplam	3857	119	87	

^aEksplant başına düşen sürgün sayısı

^bTransformasyon frekansı= (Aday transgenik sürgün oluşumu/Eksplant sayısı) x 100

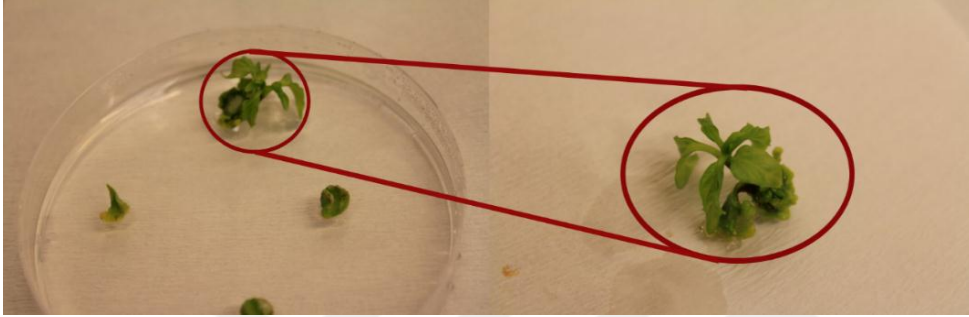
^cEksplant sayısı= hipkotil + kotiledon eksplant toplamı



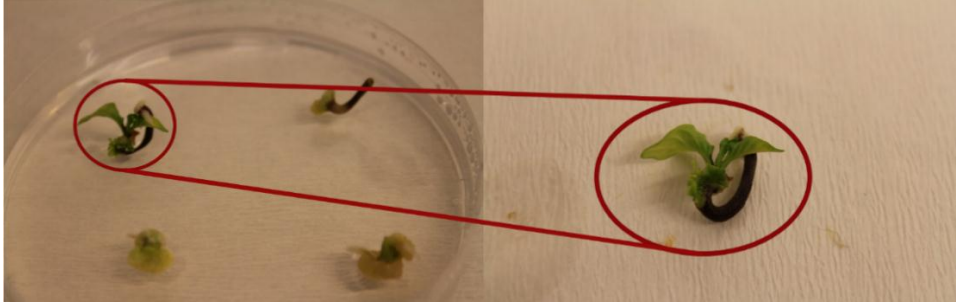
Şekil 4.22 Transformasyon sonrası kapya biberin hipokotil eksplantlarında sürgün gelişimi



Şekil 4.23 Transformasyon sonrası sivri biberin hipokotil eksplantlarında sürgün gelişimi



Şekil 4.24 Transformasyon sonrası çarliston biberin hipokotil eksplantlarında sürgün gelişimi



Şekil 4.25 Transformasyon sonrası dolma biberin hipokotil eksplantlarında sürgün gelişimi

4.3 Moleküler Analiz Bulguları

4.3.1 DNA izolasyon bulguları

Tez kapsamında DNA analizleri için kullanılan aday transgenik biber örneklerinden DNA izolasyonları yapılmış ve izolasyonları gerçekleştirilen DNA'ların miktar ve kalitelerine spektrofotometre aracılığıyla bakılmıştır. Çalışmada kullanılan aday transgenik biber hatlarına ait DNA'lar incelendiğinde

DNA miktarları yüksek bulunmuştur. Tez kapsamında izolasyonları gerçekleştirilen DNA'ların saflık oranları 1.78-2.13 arasında değişmiştir. PCR uygulamalarında ise DNA'nın miktar ve özellikle saflığı amplifikasyon açısından daha da önem kazanmaktadır.

4.3.2 *AtNHX1* Geni PCR Bulguları

4.3.2.1 Aday transgenik (*AtNHX1*) sivri biber hatlarında PCR bulguları

Rejenerasyon ve transformasyon denemeleri sonucunda, 20 adet aday transgenik sivri biber hattı elde edilmiştir. *AtNHX1* geni (Tuzluluğa dayanıklılık geni, 403 bç), CaMV 35S promotor bölgesi (272 bç) ve higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgelerinin (480 bç) taranması sonucu 14 adedi ilgili bölgelerde bant vermiştir (Şekil 4.26, 27 ve 28).



Şekil 4.26 *AtNHX1* gen bölgesine ait jel görüntüsü (403 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Sivri Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-20: Aday transgenik sivri biber hatları



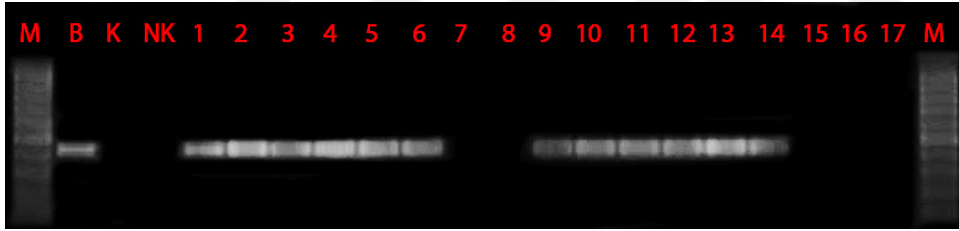
Şekil 4.27 CaMV 35S promotor gen bölgesine ait jel görüntüsü (272 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Sivri Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-20: Aday transgenik sivri biber hatları



Şekil 4.28 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Sivri Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-20: Aday transgenik sivri biber hatları

4.3.2.2 Aday transgenik (*AtNHX1*) çarliston biber hatlarında PCR bulguları

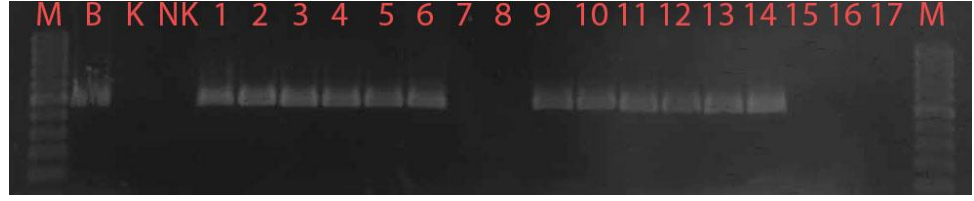
Rejenerasyon ve transformasyon denemeleri sonucunda, 17 adet aday transgenik çarliston biber hattı elde edilmiştir. *AtNHX1* geni (Tuzluluğa dayanıklılık geni, 403 bç), CaMV 35S promotor bölgesi (272 bç) ve higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgelerinin (480 bç) taranması sonucu 12 adedi ilgili bölgelerde bant vermiştir (Şekil 4.29, 30 ve 31).



Şekil 4.29 *AtNHX1* gen bölgesine ait jel görüntüsü (403 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Çarliston Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-17: Aday transgenik çarliston biber hatları



Şekil 4.30 CaMV 35S promotor gen bölgesine ait jel görüntüsü (272 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Çarliston Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-17: Aday transgenik çarliston biber hatları



Şekil 4.31 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Çarliston Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-17: Aday transgenik çarliston biber hatları

4.3.2.3 Aday transgenik (*AtNHX1*) kapya biber hatlarında PCR bulguları

Rejenerasyon ve transformasyon denemeleri sonucunda, 14 adet aday transgenik kapya biber hattı elde edilmiştir. *AtNHX1* geni (Tuzluluğa dayanıklılık geni, 403 bç), CaMV 35S promotor bölgesi (272 bç) ve higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgelerinin (480 bç) taranması sonucu 11 adedi ilgili bölgelerde bant vermiştir (Şekil 4.32, 33 ve 34).



Şekil 4.32 *AtNHX1* gen bölgesine ait jel görüntüsü (403 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Kapya Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-14: Aday transgenik kapya biber hatları



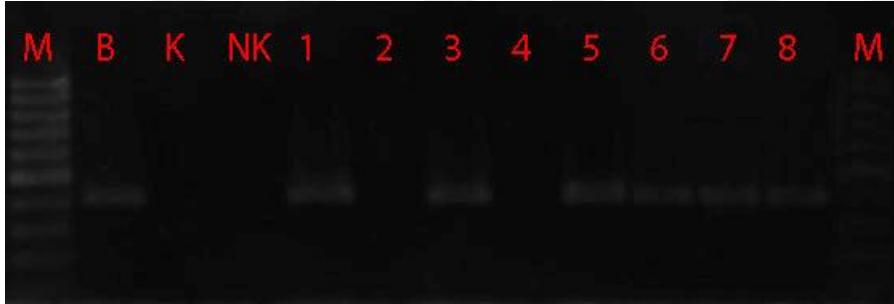
Şekil 4.33 CaMV 35S promotor gen bölgesine ait jel görüntüsü (272 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Kapya Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-14: Aday transgenik kapya biber hatları



Şekil 4.34 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Kapyra Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-14: Aday transgenik kapyra biber hatları

4.3.2.4 Aday transgenik (*AtNHX1*) dolma biber hatlarında PCR bulguları

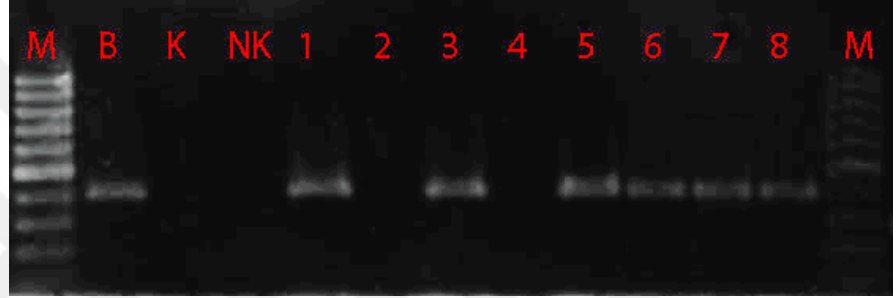
Rejenerasyon ve transformasyon denemeleri sonucunda, 8 adet aday transgenik dolma biber hattı elde edilmiştir. *AtNHX1* geni (Tuzluluğa dayanıklılık geni, 403 bç), CaMV 35S promotor bölgesi (480 bç) ve higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgelerinin (272 bç) taranması sonucu 6 adedi ilgili bölgelerde bant vermiştir (Şekil 4.35, 36 ve 37).



Şekil 4.35 *AtNHX1* gen bölgesine ait jel görüntüsü (403 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Dolma Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-8: Aday transgenik dolma biber hatları



Şekil 4.36 CaMV 35S promotor gen bölgesine ait jel görüntüsü (272 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Dolma Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-17: Aday transgenik dolma biber hatları



Şekil 4.37 Hgromisin gen bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Dolma Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-17: Aday transgenik dolma biber hatları

4.3.3 *PSARKIPT* geni PCR bulguları

4.3.3.1 Aday transgenik (*PSARKIPT*) sivri biber hatlarında PCR bulguları

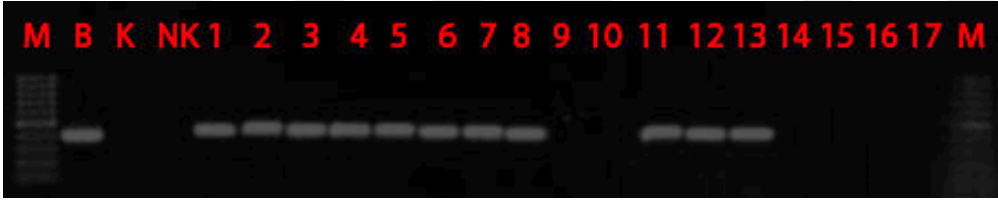
Rejenerasyon ve transformasyon denemeleri sonucunda, 17 adet aday transgenik sivri biber hattı elde edilmiştir. *PSARKIPT* geni (Kuraklığa dayanıklılık geni-402 bç), SARK promotor bölgesi (480 bç) ve higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgelerinin (480 bç) taranması sonucu 11 adedi ilgili bölgelerde bant vermiştir (Şekil 4.38 39 ve 40).



Şekil 4.38 *PSARKIPT* gen bölgesine ait jel görüntüsü (402 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan sivri biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-17: Aday transgenik sivri biber hatları



Şekil 4.39 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Sivri Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-17: Aday transgenik sivri biber hatları



Şekil 4.40 SARK promotor bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan Sivri Biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-17: Aday transgenik sivri biber hatları

4.3.3.2 Aday transgenik (*PSARKIPT*) çarliston biber hatlarında PCR bulguları

Rejenerasyon ve transformasyon denemeleri sonucunda, 20 adet aday transgenik çarliston biber hattı elde edilmiştir. *pSARKIPT* geni (Kuraklığa dayanıklılık geni-402 bç), SARK promotor bölgesi (480 bç) ve higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgelerinin (480 bç) taranması sonucu 18 adedi ilgili bölgelerde bant vermiştir (Şekil 4.41, 42 ve 43).



Şekil 4.41 *PSARKIPT* gen bölgesine ait jel görüntüsü (402 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan çarliston biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-20: Aday transgenik çarliston biber hatları



Şekil 4.42 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan çarliston biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-20: Aday transgenik çarliston biber hatları



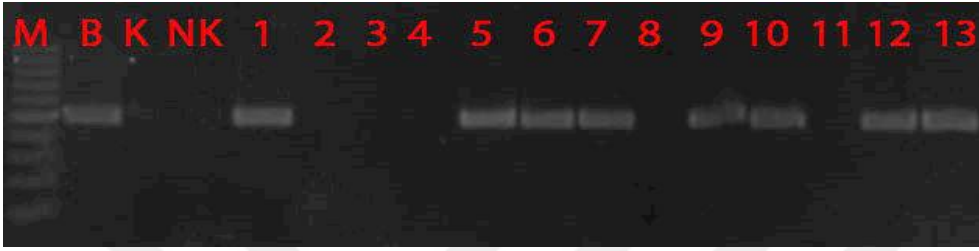
Şekil 4.43 SARK promotor bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan çarliston biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-20: Aday transgenik sivri biber hatları

4.3.3.3. Aday transgenik (*PSARKIPT*) kapya biber hatlarında PCR bulguları

Rejenerasyon ve transformasyon denemeleri sonucunda, 13 adet aday transgenik kapya biber hattı elde edilmiştir. *PSARKIPT* geni (Kuraklığa dayanıklılık geni-402 bç), SARK promotor bölgesi (480 bç) ve higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgelerinin (480 bç) taranması sonucu 8 adedi ilgili bölgelerde bant vermiştir (Şekil 4.44, 45 ve 46).



Şekil 4.44 *PSARKIPT* gen bölgesine ait jel görüntüsü (402 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan dolma biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-13: Aday transgenik kopya biber hatları



Şekil 4.45 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan kopya biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-13: Aday transgenik kopya biber hatları



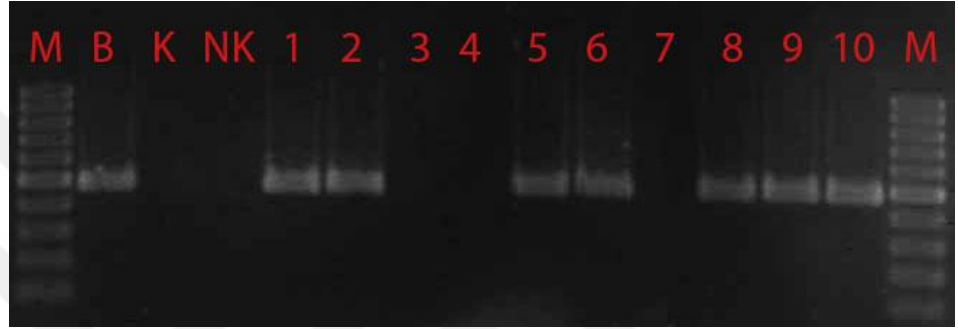
Şekil 4.46 SARK promotor bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan kopya biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-13: Aday transgenik kopya biber hatları

4.3.3.4. Aday Transgenik (*PSARKIPT*) dolma biber hatlarında PCR Bulguları

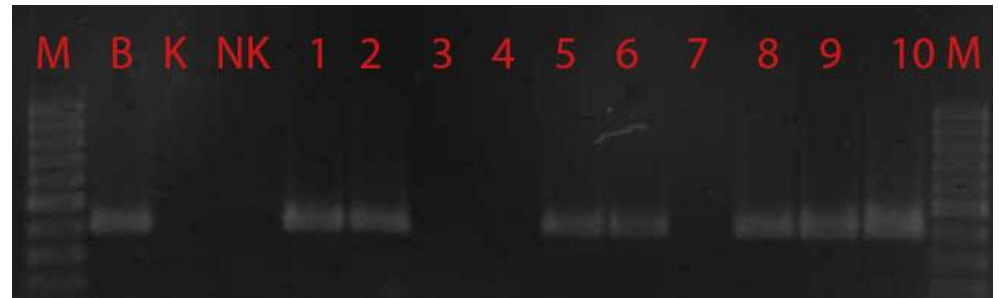
Rejenerasyon ve transformasyon denemeleri sonucunda, 10 adet aday transgenik dolma biber hattı elde edilmiştir. *pSARKIPT* geni (Kuraklığa dayanıklılık geni-402 bç), SARK promotor bölgesi (480 bç) ve higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgelerinin (480 bç) taranması sonucu 7 adedi ilgili bölgelerde bant vermiştir (Şekil 4.47, 48 ve 49).



Şekil 4.47. PSARKIPT gen bölgesine ait jel görüntüsü (402 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan dolma biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-10: Aday transgenik dolma biber hatları



Şekil 4.48 Higromisine dayanıklılık sağlayan gen bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan dolma biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-10: Aday transgenik dolma biber hatları



Şekil 4.49 SARK promotor bölgesine ait jel görüntüsü (480 bç). M: Markır (100 bç), B: *A. tumefaciens* (Pozitif Kontrol), K: Transgenik olmayan dolma biber (Kontrol), NK: Negatif Kontrol (DNA'sız örnek), 1-10: Aday transgenik dolma biber hatları

4.4. Aday Transgenik Biber Hatlarının Mikroçoğaltım Bulguları

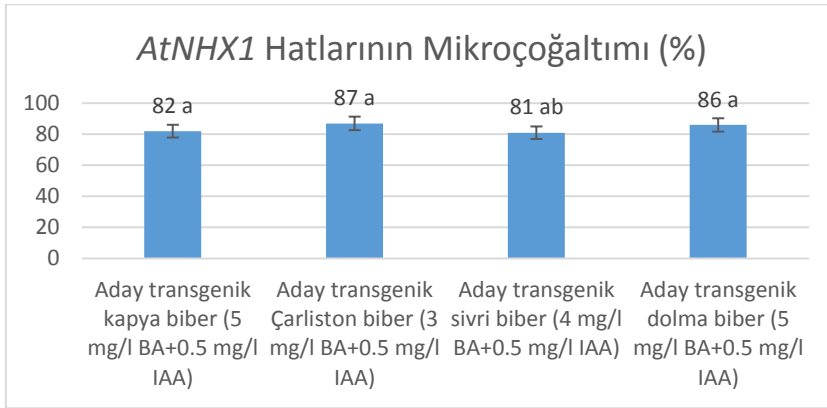
Transformasyon ve rejenerasyon sonrası elde edilen aday transgenik biber hatlarının *in vitro*'da mikroçoğaltım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Mikroçoğaltım

denemeleri kapsamında, moleküler analizler ile doğrulanan aday transgenik biber hatları çoğaltılmıştır.

4.4.1 Aday transgenik (*AtNHX1* ve *PSARKIPT*) biber hatlarının mikroçoğaltım bulguları

PCR analizleri sonucunda ilgili gen bölgeleri doğrulanan aday transgenik biber hatları *in vitro*'da çoğaltılmıştır. *AtNHX1* geninin transformasyonu sonucunda PCR ile doğrulanan 14 adet aday transgenik sivri biber hattı, 12 adet aday transgenik çarliston biber hattı, 11 adet aday transgenik kapyra biber hattı ve 6 adet aday transgenik dolma biber hattı, optimize edilen rejenerasyon ortamlarına transfer edilerek mikroçoğaltımları gerçekleştirilmiştir. Mikroçoğaltımları bulguları incelendiğinde, aday transgenik biber hatlarının mikroçoğaltım ortalamaları %84 olarak bulunmuştur. En yüksek mikroçoğaltım %87 oranında aday transgenik çarliston biberde ve %86 oranında aday transgenik dolma biber hatlarında belirlenmiştir (Çizelge 4.40).

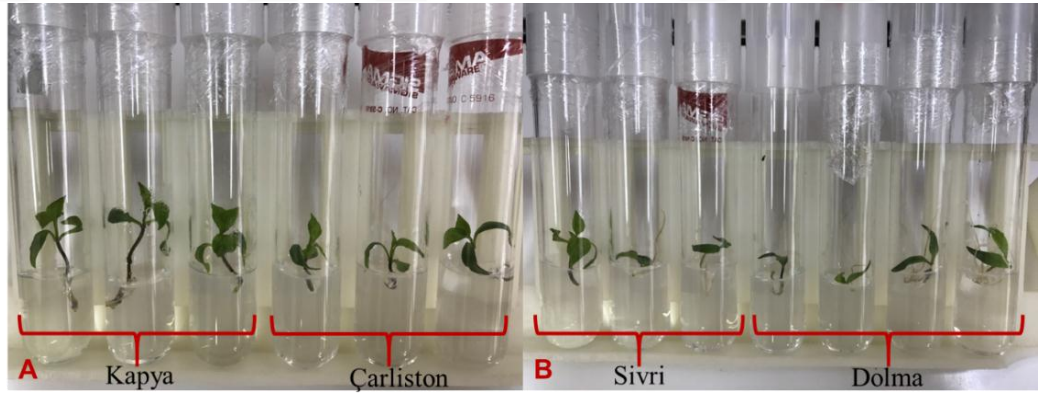
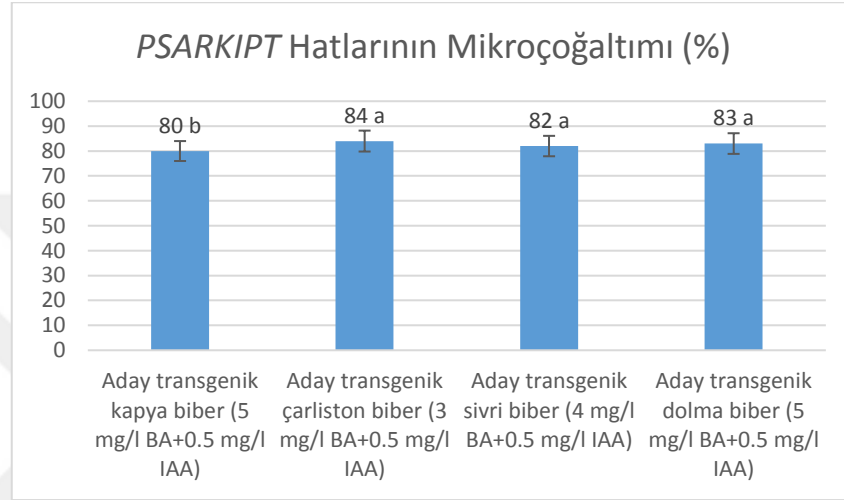
Çizelge 4.40 *AtNHX1* biber hatlarının mikroçoğaltımı



PSARKIPT geninin PCR ile doğrulanması sonucunda, 11 adet aday transgenik sivri biber hattı, 18 adet aday transgenik çarliston biber hattı, 8 adet aday transgenik kapyra biber hattı ve 7 adet aday transgenik dolma biber hattının mikroçoğaltımları gerçekleştirilmiştir. Mikroçoğaltım sonucunda en yüksek çoğaltım oranı %84 ile aday transgenik çarliston biber hatlarında bulunmuştur. Beş altkültür süresince kardeşlemeleri yapılan aday transgenik biber hatları yeterli sayıya ulaşıncaya sürgün geliştirme ve köklendirme ortamlarına transfer edilmişlerdir.

(Çizelge 4.41). Elde edilen sürgünler, sürgün geliştirme ortamına (0.5 mg/l GA₃ içeren MS besin ortamı) transfer edilerek gelişimleri sağlanmıştır. Beşinci hafta sonunda uzayan sürgünler 0.5 mg/l IAA içeren besin ortamlarına transfer edilerek köklendirmeleri gerçekleştirilmiştir. İkinci haftanın sonunda sürgünlerde kök yapıları oluşmaya başlamıştır (Şekil 4.50).

Çizelge 4.41 PSARKIPT biber hatlarının mikroçoğaltım oranları



Şekil. 4.50 Aday transgenik biber hatlarının mikroçoğaltımı

5. TARTIŞMA

Tez çalışmasında, sivri, çarliston, kapyra ve dolma biber hatlarına, tuzluluk ve kuraklığa tolerans sağlayan, *AtNHX1* ve *PSARKIPT* genlerinin *Agrobacterium tumefaciens* ile transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon denemelerinden önce dört farklı biber hattında rejenerasyon denemeleri kurulmuş ve her hat için optimum rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. Optimize edilen rejenerasyon protokolleri transformasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Geliştirilen aday transgenik biber hatları moleküler analizler (PCR) ile doğrulandıktan sonra aday transgenik hatların mikroçoğaltımları yapılmıştır.

5.1 Biber Hatlarında Rejenerasyon Denemeleri

5.1.1 Somatik embriyogenesis denemeleri

Somatik embriyogenesis, somatik hücrelerden bipolar yapıların elde edilmesiyle, pratikte hem çoğaltım hem de genetik transformasyon sağlayan etkili bir yöntem olarak bilinmektedir (Khan et al., 2006). Bu nedenle ilk stratejide, Binzel et al. (1996), Büyükalaca ve Mavituna (1996) ve Harini and Lakshmi Sita (1993)'nın geliştirdiği üç farklı protokol somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılmıştır. Tez çalışmasında somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda dört farklı biber hattında çok düşük oranda embriyojenik yapılar elde edilmiştir. Ancak embriyoların bitkiciğe dönüşümü sağlanamamıştır. Bunun nedeninin ise besin ortamında birlikte bulunan 2,4-D, TDZ ve hindistan cevizi sütünün antagonistik etkisinin somatik embriyo oluşumu ve gelişimini olumsuz etkilediği olarak yorumlanmaktadır (Binzel et al., 1996). Çalışmada kullanılan Binzel et al. (1996) protokolünde yalnızca sivri biber hattının hipokotil eksplantlarından rejenerasyon tomurcuğu ve yaprak benzeri yapıların oluştuğu görülmüştür. Sivri biberde oluşan rejenerasyon benzeri yapıların ortamda bulunan TDZ'nin uyarıtımı sonucu gerçekleşmiş olduğu düşünülmektedir. Tez çalışmasında Binzel et al. (1996)'un protokolünde kullanılan TDZ'nin farklı tepki vermesinin diğer bir nedeni de organogenik uyarıcı etkisinden kaynaklanmaktadır (Sanatombi and Sharma, 2006). Bu tepki sivri biberin hipokotil eksplantlarından rejenere olan yaprak ve sürgün benzeri yapıların oluşmasına neden olurken, kapyra, çarliston ve dolma biber

hatlarının kotiledon ve hipokotil eksplantlarının gelişimine etki etmemiştir. TDZ'nin biberde farklı eksplant kaynakları kullanılarak (yara dokusu açılmış fideler, yaprak, kotiledon kısımlar ve sürgün uçları) organogenesisi uyartıcı etkiye bulunduğu bilinmektedir (Szasz et al., 1995; Hyde and Philips, 1996; Dabauza and Pena, 2001; Venkataiah et al., 2003; Khan et al., 2006). *C. annuum* L.'de tek başına kullanılan TDZ'nin direk somatik embriyogenesi olumlu yönde etkilediği bildirmişlerdir (Khan et al., 2006). Ancak Binzel et al. (1996) ise TDZ'nin tek başına kullanımının somatik embriyogenesis için yeterli olmadığını, organogenesis (hipokotil ve kotiledon eksplantlardan sürgün oluşumu için) için ideal bir yöntem olduğunu belirtmiştir. TDZ'nin son yıllarda hem organogenesis hem de somatik embriyogenesis için kullanıldığı ancak yürütülen çalışmaların çoğunun organogenesis üzerinde yoğunlaştığı görülmüştür (Mythili et al., 2017; Renfiyeni et al., 2017). Diğer somatik embriyogenesis denemesi olan Harini and Lakshmi Sita (1993) protokolünde, dört biber hattı içinde kallus yapılarının oluştuğu gözlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan Harini and Lakshmi Sita (1993)'nin protokolünde dört hat için elde edilen kallus yapılarından herhangi bir somatik embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Harini and Lakshmi Sita (1993) yaptıkları çalışmada direk somatik embriyo oluşumunu teşvik ederken, tez çalışmasında kullanılan sivri, kapyra, çarliston ve dolma biber hatlarından somatik embriyoya dönüşüm gerçekleşmemiştir. Yapılan birçok çalışma, 2,4-D'nin tek başına kullanımının kallus oluşumunu teşvik ettiğini göstermektedir (Büyükalaca ve Mavituna, 1996). Ancak bu durum kullanılan eksplant kaynağına ve 2,4-D'nin konsantrasyonuna göre değişiklik göstermektedir (Kintzios et al., 1999; Kaparakis and Alderson, 2008). Tez çalışmasında, Harini and Lakshmi Sita (1993)'nin protokolünde, sivri biberin hipokotil eksplantlarında beyaz-kırılgan yapıda kallus oluşumları elde edilmiştir. Benzer durum çarliston, kapyra ve dolma biberin hipokotil ve kotiledon eksplantlarındaki kallus yapılarında da görülmüştür. Ancak bu kallus yapılarının da embriyoya ve bitkiciğe dönüşmediği görülmüştür. Bodhipadma and Leung (2002) olgun ve olgunlaşmamış zigotik embriyoları kullanarak, Harini and Lakshmi Sita (1993), Binzel et al. (1996) ve Büyükalaca ve Mavituna, (1996)'nin protokollerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada, Harini and Lakshmi Sita (1993)'nin protokolünden sadece üç çeşidin (Sweet Banana, Yolo Wonder ve Ace) olgunlaşmamış zigotik embriyolarından çok düşük oranda somatik embriyo yapıları elde edilmiştir. Bu protokoldeki genel sorunun elde edilen kallus

(Kırılğan-kompakt) yapılarının bitkiciğe dönüşmemesi olduğunu bildirmişlerdir. Benzer durum tez çalışmasında da görülmektedir. Bu durumun nedeni ise uzun süre 2,4-D'li besin ortamında kalan kalluslarda somatik embriyo oluşumunun engellendiği ve bitkiciğe dönüşümün gerçekleşmediği bildirilmiştir (Bodhipadma and Leung, 2002). Tez çalışmasında uygulanan Büyükalaca ve Mavituna, (1996)'nın protokolünde embriyojenik kallus gelişimleri sivri biber hattında %95 oranında kotiledon ve %85 oranında hipokotil eksplantlarında, çarliston biber hattında %95 oranında kotiledon ve %90 oranında hipokotil eksplantlarında, kapya biber hattında %95 oranında hipokotil ve %92.5 oranında kotiledon eksplantlarında, dolma biber hattında ise %82.5 oranında hipokotil ve %77.5 oranında kotiledon eksplantlarında elde edilmiştir. Büyükalaca ve Mavituna, (1996)'nın Ace çeşidinin hipokotil ve kotiledon eksplantlarını kullanarak elde ettikleri embriyojenik kallus oranları ile tez çalışmasından elde edilen embriyojenik kallus oranlarının birbirine çok yakın olduğu görülmüştür (%90-100). Embriyojenik kallus gelişiminin diğer hatlara göre dolma biberde biraz daha düşük olduğu belirlenmiştir. Somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan eksplant tipi, ortam içeriği ve bitki büyüme düzenleyicileri embriyojenik kallus oluşumunu ve bitki rejenerasyonunu etkileyen en önemli faktörler olarak bilinmektedir. Ayrıca içsel bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarı da büyük önem taşımaktadır. Bununla beraber dolma biber de daha düşük oranda embriyojenik kallus oluşumunun nedeninin genotip etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Kothari et al., 2010). Tez çalışmasında Büyükalaca ve Mavituna, (1996)'nın protokolünden elde edilen kallus yapılarının, sivri biberin kotiledon ve hipokotil eksplantları için kırılğan ve sarımsı, çarliston biberin hipokotili için kompakt ve kahverengi, kotiledonları için beyaz ve yumuşak, kapya biberin kotiledon ve hipokotil eksplantları için kahverengi ve kırılğan, dolma biberin kotiledon ve hipokotil eksplantları için yumuşak ve sarımsı oldukları gözlenmiştir. Büyükalaca ve Mavituna (1996) çalışmalarında dört farklı tipte kallus yapıları elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu kallus yapılarını embriyojenik ve embriyojenik olmayan kalluslar olarak sınıflandırmışlardır. Embriyojenik kallusları beyaz-sarımsı, kahverengi-kırılğan; düşük embriyojenik özellik gösteren kallusları; yeşil-kompakt, embriyojenik olmayan kallusları ise sarımsı-nodüler-kırılğan olarak tanımlamışlardır. Bu sınıflandırmaya göre tez çalışmasındaki sivri, çarliston ve kapya biber hatlarının hipokotil ve kotiledon eksplantlarından elde edilen kallus yapılarının embriyojenik yapıda olduklarını söyleyebiliriz. Ancak dolma biber

hattından elde edilen kallus yapıları bu sınıflandırmaya göre embriyojenik özellik taşıyor olarak değerlendirilmiştir. Tez çalışmasının başlangıcında Büyükalaca ve Mavituna (1996)'nın protokolünden dört biber hattı içinde kallus yapılarının elde edilmesi embriyo oluşumu için önemli bir adım olarak görülmüştür. Kallusların ön uygulama ve embriyo gelişim ortamlarına aktarılmasından sonra düşük oranda erken somatik embriyo oluşumları tespit edilmiştir. Fakat dört biber hattında da embriyolar olgunlaşarak bitkiciğe dönüşüm gerçekleşmemiştir. Lee et al. (2004) elde ettiği kallus yapılarını altı farklı tipte sınıflandırmıştır (Tip A, B, C, D, E ve F). Bu kallus yapıları, Tip A; beyaz, sert yüzey ve yeşil renkli kallus, Tip B; sert yapıda koyu yeşil kallus, Tip C; sarı ve kırılkan; Tip D; sarı-sert yüzeyli, Tip E; nemli ve şeffaf ve Tip F; yeşil, nemli ve kırılkan olarak değerlendirilmiştir. Tip A ve Tip B'den gelişen kalluslardan sürgünlerin geliştiği ancak Tip C, D, E ve F'den oluşan kalluslardan sürgünlerin gelişmediği bildirilmiştir. Tez çalışmasından elde edilen kallus yapılarının Lee et al. (2004)'un sınıflandırdığı kallus yapılarından Tip A ve B kategorisiyle uyumlu olduğu görülmektedir. Kallus yapıları birçok araştırmada kullanılan yöntemlere göre (indirek organogenesis veya indirek somatik embriyogenesis) farklı tipte sınıflandırılabilir. Bunun nedeni ise embriyojenik veya organogenik özellik gösteren kallusların renklerinin ve yapılarının büyük ölçüde farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır (Lee et al., 2004; Kothari et al., 2010). Tez çalışmasında sivri biber hipokotil için %32, kotiledon için %30; çarliston biber hipokotil için %50, kotiledon için %40; kapyra biber hipokotil için %42.5, kotiledon için %57.5; dolma biber için ise biber hipokotil için %15, kotiledon için %12.5 oranında somatik embriyo gelişimi göstermiştir. Ancak tüm hatlardan embriyo gelişimleri globüler aşamada tutuklu olarak kalmış ve embriyolar olgunlaşmamıştır. Büyükalaca ve Mavituna (1996) ise en iyi gelişimi %62 oranında olgun zigotik embriyolardan elde etmişlerdir. Bunu takiben %56 oranında petiyol, %47 oranında hipokotil, %35 oranında kotiledon eksplantlarında somatik embriyo gelişimleri gerçekleşmiştir. Tez çalışması ile Büyükalaca ve Mavituna (1996)'nın embriyo oluşum bulguları karşılaştırıldığında, sadece çarliston ve kapyra biberin hipokotil ve kotiledon eksplantlarından elde edilen somatik embriyo oranlarının Büyükalaca ve Mavituna (1996)'ya göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında embriyojenik kallusların dönüşümü için sıvı kültür kullanmayı tercih etmiştir. Tez çalışmasında ise Büyükalaca ve Mavituna (1996)'nın protokolünde modifikasyona gidilerek, sıvı

kültür yerine katı kültür kullanımı tercih edilmiştir. Bunun nedeni ise, bu sistemin başarılı olması durumunda, genetik transformasyon denemelerinde kullanılacak olmasından dolayı sıvı kültürde yüksek oranda agro-enfeksiyon riskini önlemektedir (Lee et al., 2004). Tez çalışmasında biber hatlarında oluşan embriyo yapıları kallus oluşumundan 3 hafta sonra belirginleşmeye başlamıştır. Benzer sonuçları, Jo et al. (1996) ve Steinitz et al. (2003) yaptıkları çalışmalarda da belirtmişlerdir. Somatik embriyogenesis denemelerinde ortaya çıkan en büyük problemlerin başında embriyoların belirli aşamada tutuklu kalarak çimlenmemesidir (Winkelmann et al., 2015). Ayrıca aynı zamanlarda oluşan globüler, kalp, torpedo aşamalarının olgunlaşma ve çimlenmelerinde senkronizasyon probleminin olmasından dolayı somatik embriyogenesis çalışmalarında bu sorun sıklıkla ortaya çıkmaktadır (Binzel et al., 1996; Bodhipadma et al., 2002; Kaparakis and Alderson, 2008).

5.1.2 Organogenesis denemeleri

Tez çalışmasında ikinci strateji olarak organogenesis denemeleri kurulmuştur. Organogenesis çalışmalarında dört biber hattı için 3 farklı deneme (1. Deneme: 2,4-D+TDZ; 2. Deneme: BA+IAA; 3. Deneme: Sanatombi and Sharma (2008) ile Hyde and Philips (1996) kurularak etkileri karşılaştırılmıştır. 1. deneme olan 2,4-D (0, 0.5, 1 ve 2 mg/l)+TDZ (0, 0.5, 1 ve 2 mg/l) kombinasyonlarında sivri, çarliston, kapyra ve dolma biber hatlarında kallus ve sürgün benzeri yapıların oluşumları gerçekleşmiştir. En iyi kallus gelişimleri, sivri biber hattı için %100 oranında kotiledon (2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ ve 1 mg/l 2,4-D), çarliston biber hattı için %92 oranında kotiledon (2 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l TDZ), kapyra biber hattı için %100 oranında kotiledon (0.5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ, 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ, 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l 2,4-D+1 mg/l TDZ) ve hipokotil (1 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ) ve son olarak dolma biber hattı için %92 oranında kotiledon (0.5 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l 2,4-D) eksplantlarından elde edilmiştir. Renfiyeni et al. (2017)'un yaptığı çalışma ile tez çalışmasından elde edilen kallus oranları oldukça yakın görülmektedir (%92-100). Tez çalışmasında her hat için kallus yapılarının oluşmaya başlama zamanı 10. günden itibaren gözlenmiştir. Ancak Renfiyeni et al. (2017) MS+4 mg/l 2,4-D ortamında kallusların 4. günden itibaren geliştiklerini

bildirmişlerdir. Tez çalışmasının 1. denemesinde 2,4-D konsantrasyonu maksimum 2 mg/l olarak kullanılmıştır. Sonuçlarımıza göre 2,4-D seviyesinin kallus oluşumu için yeterli düzeyde olduğu, elde edilen kallus oranlarından anlaşılmaktadır. Biberde *in vitro*'da, embriyojenik veya organogenik oluşumları etkileyen diğer önemli bir etkende içsel etilen seviyesidir. Bazı araştırmacılar *Capsicum* cinsinin rejenerasyonunun zor olmasını içsel etilen seviyesine bağlamaktadırlar (Santana-Buzzy et al., 2006; Gammoudi et al., 2017). Fakat bazı araştırmacılar ise rejenerasyon denemelerinde kullanılacak eksplant kaynağının aktarımı sırasında gaz formunda bulunan etilenin ortaya çıkmasının rejenerasyonu pozitif veya negatif yönde etkileyebileceğini bildirmişlerdir (Trujillo-Moya and Gisbert, 2012). Tez çalışmasında kallus oluşumlarının bu durumdan etkilenmediği görülmüştür. BA-IAA kombinasyonlarında çok düşük miktarda kallus oluşurken, 2,4-D-TDZ kombinasyonlarında daha yüksek oranlarda kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Bu farklılık içsel etilenden değil, 2,4-D'nin kallus uyartıcı etkisinden kaynaklanmıştır. Benzer çalışmalarda da 2,4-D'li ortamlarda yüksek kallus gelişimleri elde edilmiştir (Büyükalaca ve Mavituna, 1996). Tez çalışmasında 1. denemeden oluşan sürgün benzeri yapılar, sivri biber için %36 oranında kotiledon ve hipokotilden (2 mg/l 2,4-D+2 mg/l TDZ), çarliston biberde %36 oranında kotiledondan (2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ), kapy biberde %32 oranında kotiledondan ve dolma biberde %16 oranında kotiledondan (2 mg/l 2,4-D+2 mg/l TDZ) elde edilmiştir. Dabuza and Pena (2001) ve Venkataiah et al. (2003) ise sadece TDZ'li ortamlarda başarı ile sürgünleri geliştirmişlerdir. Tez kapsamında elde edilen sürgün benzeri yapılar genellikle anormal özellik göstermişlerdir. Bunun nedeninin ortamda bulunan 2,4-D'nin TDZ'yi baskılayabileceği olarak düşünülmektedir. Ayrıca çarliston biberin kotiledon eksplantlarından 2 mg/l 2,4-D+0.5 mg/l TDZ içeren ortamda, sürgün benzeri yapıların oluşması da beklenmedik bir durum olarak gözlenmiştir. Çünkü yüksek oksin düşük sitokinin bulunan ortamlar genellikle kallogenesis oluşumunu teşvik etmektedir. Diğer ilginç sonuç ise TDZ'nin (0.5, 1 ve 2 mg/l) tek başına kullanıldığı ortamlarda benzer şekilde sürgün benzeri yapıların oluşumu gerçekleşmekte ancak gelişmesi devam etmemektedir. Bunun nedeninin, TDZ'nin tek başına veya diğer bitki büyüme düzenleyicileri (IAA, BA, Kinetin, Zeatin, 2,4-D) ile kullanımının sürgün oluşumunda önemli olmadığını ve TDZ'nin sürgün oluşumunda BA'dan daha etkili bir sitokinin olduğudur (Alibert, 1990; Venkataiah and Subhash, 2001; Venkataiah et al., 2003; Kothari et al., 2010). Ancak farklı

araştırmalarda farklı sonuçlar görülmektedir. Örneğin Tunus biber çeşitlerinde en iyi sürgün oluşumu 5 mg/BA+1 mg/l NAA'dan elde edilirken (Arous et al., 2001), diğer bir çalışmada farklı sitokininlerin (BA, 2İP, Zeatin ve TDZ) biberde sürgün oluşumu ve gelişiminde etkili olmadığı bildirilmiştir (Tomaszewska-Sowa et al., 2002). Tez çalışmasının 2. denemesi olan BA (1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l) ve IAA (0.5 ve 1 mg/l)'da en iyi sürgün oluşumları elde edilmiştir. Dört biber hattı içinde optimum rejenerasyon ortamları bu protokolden geliştirilmiş ve sürgünler başarıyla bitkiciğe dönüştürülmüştür. En iyi sürgün oluşum oranları, sivri biberin hipokotil (4 mg/l BA+0.5 mg/l IAA), çarliston biberin hipokotil (3 mg/l BA+0.5 mg/l IAA) ve kapya biberin hipokotillerinde (5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA) %80 oranında iken dolma biberin hipokotil eksplantından (5 mg/l BA+0.5 mg/l IAA) %84 oranında elde edilmiştir. Organogenesis çalışmalarının ikinci denemesinde elde edilen sürgün yapıları genellikle yüksek sitokinin (3-5 mg/l BA) düşük oksin (0.5 mg/l IAA) içeren ortamlardan elde edilmiştir. Literatür incelendiğinde, biberde organogenesis çalışmalarında en yaygın kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi ve kombinasyonu olarak BA ve IAA göze çarpmaktadır (Günay and Rao, 1978; Agrawal et al., 1989; Arroya and Revilla, 1991; Christopher and Rajam, 1996; Ramirez-Malagon and Ochoa-Alejo, 1996; Hyde and Philips, 1996; Sanatombi and Sharma, 2006; Sanatombi and Sharma, 2008; Renfiyeni et al., 2017; Haque and Gosh, 2018; Gammoudi et al., 2017). Biberde yapılan ilk organogenesis çalışmalarından biri olan Günay and Rao, (1978)'da benzer şekilde en iyi sürgün gelişimini kotiledon eksplanlarından 2 mg/l BA+1 mg/l IAA'da elde etmiştir. Araştırmacılar BA ve IAA'nın birlikte kullanımının sürgün oluşumunda etkili olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışmasında da benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır. Özellikle BA ve IAA kombinasyonu, dört biber hattı içinde etkili olarak sürgün oluşumunu teşvik etmiş ve sürgün oluşumunda, hipokotil eksplantlarının kotiledon eksplantlarına göre daha iyi cevap verdiği belirlenmiştir. Sekiz farklı biber genotipinde (*C. praeternisum*, *C. baccatum* ve *C. annuum* cvs. G4, Bhiwapuri, Tatlı biber, Cayenne biber ve hibrid biber) yapılan organogenesis çalışmalarında, yaprak eksplantlarının (%56), kotiledon ve hipokotil eksplantlarına göre daha yüksek oranda sürgün oluşturduğu bildirilmiştir (Christopher and Rajam, 1996). Araştırmacılar çalışmalarında BA'nın tek başına kullanımının, BA ve IAA kombinasyonuna göre sürgün oluşturmada daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (Christopher ve Rajam, 1996). Tez çalışmasında ise BA'nın tek başına kullanımının dört biber hattı içinde sürgün

oluşumunda yetersiz olduğu tespit edilmiştir. Tezde rejenerasyon denemelerinde tüm kontrol gruplarında bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı kullanılmıştır. Ancak hipokotil ve kotiledon eksplantlarında hiçbir gelişme gözlenmemiştir. Ancak Ramirez-Malagon and Ochoa-Alejo, (1996) 21 şili biberinde en iyi sürgün oluşumlarını, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamından elde etmişlerdir (26.8/eksplant başına). Bu durum Ramirez-Malagon and Ochoa-Alejo, (1996)'nın araştırma sonuçları ile tez çalışması sonuçları arasında büyük farklılık göstermektedir. Bu araştırmacıların bulduğu sonuç hem tez çalışması hem de son yıllarda yapılan organogenesis çalışmaları ile uyum göstermemektedir. 1970'li yıllardan günümüze kadar yapılan birçok çalışmada, biber genotiplerinde rejenerasyonun hala zor olduğu ve genotip etkisinin bu durumda önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir. Tez araştırmasında dört biber hatıtında, BA (3-5 mg/l)-IAA (0.5 mg/l) kombinasyonlarında daha yüksek sürgün oluşumları (ortalama %80) elde edilmiştir. Ashwani et al. (2017) ise 10 mg/l BA+1 mg/l IAA'da kotiledon yaprakların proksimal kısımlarında %60, petiyolden ise %40 oranında sürgün oluşumu sağlarken, 5 mg/l BA+2 mg/l PAA (fenil asetik asit)'da ise kotiledon yapraklarının proksimal kısımlarında %100 oranında sürgün oluşumu elde etmişlerdir. Ashwani et al. (2017) kullandığı BA konsantrasyonunu düşürmesi (10 mg/'den 5 mg/l'ye) ve farklı bir oksin olarak PAA'yı kullanmasıyla daha etkili bir sonuç elde etmiştir. Ancak kullandığı ortamda PAA'nın IAA'dan daha etkili olduğu görülmektedir. Bu durum kullanılan türün farklı olmasından da kaynaklanabilmektedir. *C. annuum*'da organogenesis çalışmalarında IAA'nın etkili bir oksin olduğu birçok çalışmada bildirilmektedir. Fakat genotip etkisinin önemli bir faktör olduğu *Capsicum* cinsinde, *C. frutescens*'de elde edilen bu sonucun *C. annuum*'da nasıl cevap vereceği ise bilinmemektedir. Tez araştırmasının 3. denemesi olan Sanatombi and Sharma, (2008) ve Hyde and Philips, (1996) protokolleri sonucunda dört biber hattı için istenilen rejenerasyon sonuçlarına ulaşılammıştır. Tezde 2 mg/l BA+2 mg/l IAA ortamında sivri, kapy, çarliston ve dolma biberin kotiledon ve hipokotil eksplantlarından sürgün benzeri yapıların geliştiği görülmüştür. Ancak bu yapılar gelişimlerini tamamlayamamışlardır. Özellikle sivri biber hattında sürgün benzeri yapılar daha belirgin gözlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan Sanatombi and Sharma, (2008) protokolünde en düşük sürgün benzeri yapıların oluşumu dolma biber hattında gözlenmiştir (%17 hipokotil, %7.5 kotiledon). Diğer biber hatlarında ise bu değer %25-45 arasında

değişiklik göstermiştir. Sanatombi and Sharma, (2008)'nin çalışmasında yaprak ve kotiledon eksplantları ön plana çıkarken, tez çalışmasında ise hipokotil eksplantlar daha iyi gelişim göstermiştir. Birçok araştırmacı biberde kotiledon eksplantlarının hipokotil eksplantlarına göre sürgün gelişiminde daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Günay and Rao, 1978; Golegaonkar and Kantharajah, 2006; Kumar et al., 2012 a). Son yıllarda yapılan çalışmalar ise hipokotil eksplantlarının, sürgün gelişiminde kotiledon eksplantları kadar etkili olduğunu göstermiştir (Valadez-Bustos et al., 2009; Kothari et al., 2010; Hegde et al., 2017a). Bu durumun biberde ıslah çalışmaları sonucunda elde edilen hibrit varyetelerin açılım göstermesiyle hem genotip hem de eksplant üzerine etkisi olabileceğini göstermektedir (Kothari et al., 2010). Diğer deneme olan Hyde and Phillips (1996)'in protokolünde dört biber hattında rejenerasyon sağlanamamış, sadece sivri ve kopya biber hattı için çok az oranda (%5-10) sürgün benzeri yapıların oluştuğu tespit edilmiştir. Charlston ve dolma biber hatlarında gelişim gözlenmemiştir. Benzer oranlar BA-IAA denemesinde de elde edilmiştir. Hyde and Phillips (1996)'in protokolünden farklı olarak BA-IAA denemelerinde gümüş nitrat kullanılmamıştır.

5.1.3 Transformasyon öncesi mikroçoğaltım denemeleri

Transformasyon öncesi rejenerasyonları gerçekleştirilen biber hatlarının *in vitro*'da klonal olarak çoğaltımı büyük önem taşımaktadır. Çünkü transformasyon sonrası elde edilecek aday transgenik sürgünlerin diğer analizlerde kullanılmak üzere yeterli sayıya ulaşması gerekmektedir. Bu nedenle organogenesis denemeleri sonucunda sürgün gelişimleri optimize edilen biber hatlarının mikroçoğaltımına aynı protokollerle devam edilmiştir. Sürgünler yaklaşık 3-4 cm'lik aşamaya geldiklerinde sürgün uçları kesilerek besin ortamlarına transfer edilmiştir. Tez çalışmasında dört biber hattı için bu oran %80-84 arasında değişiklik göstermiştir. Patil et al. (2018) ise en iyi mikroçoğaltım oranlarını sürgün ucu için %93 oranında 2 mg/ BA'dan, nodal segment için %86 oranında 1.5 mg/l BA'dan elde etmişlerdir. Sürgün uçlarının meristematik hücrelerce zengin olmasından dolayı yüksek seviyede hücre bölünmeleri gerçekleşmektedir. Bu nedenle sürgün uçlarının mikroçoğaltım çalışmalarında eksplant kaynağı olarak kullanılması ve sitokininlerle uyarılması sonucu çoklu sürgün oluşumları meydana gelmektedir (Patil et al., 2018). Özellikle *C. annuum*'da sürgün ucu eksplantlarından çoklu

sürgün oluşumunda, BA'nın çok etkili bir sitokinin olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Sobhakumari and Lalithakumari, 2003; Rao et al., 2006; Zemene and Worku, 2018). Tez çalışmasında mikroçoğaltımda BA-IAA'nın beraber kullanılması ile mikroçoğaltım oranının diğer çalışmalara göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun sebebi ise IAA'nın meristematik hücrelerin aktivitesini etkileyerek sürgün gelişimini durdurabileceği olarak yorumlanmaktadır (Patil et al., 2018). Haque and Gosh, (2018)'de en iyi mikroçoğaltım oranlarını 6 ve 8 mg/l BA içeren ortamlardan elde etmişlerdir (11 sürgün/eksplant). Ancak ortama düşük miktarda IAA'nın (0.5 veya 1 mg/l) eklenmesi durumunda sürgün oluşumunda artış gözlemişlerdir (15 sürgün/eksplant). Benzer durum tez çalışmasında da gözlenmiştir. Düşük IAA (0.5 mg/l) kullanımının sürgün oluşumunda olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir. Patil et al. (2018) BA'nın tek kullanımını önerirken, Haque and Gosh, (2018) araştırmasında BA'nın düşük konsantrasyonda IAA ile kullanımının *Capsicum* cinsi için en iyi mikroçoğaltım ortamı olabileceğini bildirmişlerdir. Tez çalışmasında, Haque and Gosh, (2018) ve Patil et al. (2018)'a göre daha düşük mikroçoğaltım oranlarının elde edilmesinin sebebi olarak, genotip etkisinin ön plana çıktığı görülmektedir. Başka bir araştırmada ise Pusa Jwala hipokotil eksplantlarında 5 mg/l BA+1 mg/l IAA ortamında %78.33 oranında, Pusa sadabahar hipokotil eksplantlarında 5 mg/l BA+1 mg/l IAA ortamında %80.78 oranında elde etmişlerdir (Mahto et al., 2018). Tez çalışmasında da rejenerasyon ve mikroçoğaltımda benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır (%80-84). Ayrıca hem tezde hem de Mahto et al. (2018)'un yaptığı çalışmada hipokotil eksplantlarından gelişen sürgünlerin mikroçoğaltımda daha etkinliği olduğu görülmektedir. Benzer şekilde yüksek BA (3-5 mg/l) ve düşük IAA (0.5-1 mg/l) kombinasyonlarının her iki çalışmada da etkili olduğu belirlenmiştir.

5.2 Transformasyon Denemeleri

Tez çalışmasında dört biber hattına, *A. tumefaciens* AGL1 ve EHA105 ırkları içerisinde bulunan *AtNHX1* (*Arabidopsis thaliana*-Na-H antiportör-1) ve *PSARKIPT* (Senesensle ilişkili reseptör kinaz promotörü - isopentenyltransferase) genlerinin, hipokotil ve kotiledon eksplantlarına transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuçta ise dört biber (*A. tumefaciens* AGL1 ve EHA105 ırkları) hattı için transformasyon frekansı, %1.18-3.74 arasında bulunmuştur.

AtNHX1 ve *PSARKIPT* genlerinin transferi sonucunda dört biber hattının toplam 119 bitkiciğinin PCR analizlerine göre 87 adedi aday transgenik olarak belirlenmiştir (%73.1). Heidmann et al. (2011) *BABY BOOM* geninde Fiesta ve Ferrari'nin transformasyon etkinliğini sırasıyla %0.6 ve %1.1 olarak bulmuştur. Li et al. (2003) 409 putatif transgenik bitkiden 167 adedinin PCR'da pozitif bant verdiğini (%40.8) saptamış, Lee et al. (2004) P915 hattı için %0.19 (15/37500), P409 hattı için %0.03 (15/37500), P410 ve P101 hatları için ise %0 transformasyon oranlarını belirlemiştir. Kumar et al. (2012 b) 90 sürgünden 11 adedinin PCR'da pozitif sonuç verdiğini bulmuş (%12.2), Maligeppagol et al. (2016) *Dreb1A* geni için transformasyon oranını %37.86, Bulle et al., (2016) *taNHX2* geni için transformasyon etkinliğini %18.17, Mahto et al. (2018) transformasyon oranlarını ise Pusa Jwala için %30.3, Pusa Sadabahar için ise %29.5 olarak saptamıştır. Tez çalışmasında özellikle genotip faktörünün ve kullanılan *Agrobacterium* ırklarının transformasyon etkinliğinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Transformasyonu etkileyen diğer bir faktör ise *A. tumefaciens*'in hücre yoğunluğudur. Yapılan birçok çalışmada transformasyona başlanmadan önce *Agrobacterium*'un uygun yoğunluğu belirlenerek kullanılmaktadır. Tez araştırmasında gerçekleştirilen transformasyon denemelerinde ise hem *AtNHX1* ve hem de *PSARKIPT* genlerini taşıyan *A. tumefaciens* ırkları 0.5-0.6 yoğunluğunda kullanılmıştır. Sonuçta dört biber hattı içinde herhangi bir nekrotik yapı veya dokularda kararma gözlenmemiştir. Literatürde belirtildiği üzere biberde transformasyonda kullanılacak uygun *Agrobacterium* yoğunluğunun belirlenmesi transformasyon etkinliğinde kritik rol oynamaktadır. Transformasyon çalışmalarında yoğun miktarda *Agrobacterium* kullanılması durumunda kültür ortamında aşırı bakteri kontaminasyonu olacağı için bu durum eksplantların ölümüne yol açacaktır (Kumar et al., 2012 b). Transgenik bitkilerin doğrulanmasında hem moleküler hem de histokimyasal yöntemler kullanılabilir. Örneğin Kumar et al. (2012a) transformasyon esnasında kullandığı *A. tumefaciens* yoğunluğunu başlangıç ölçümünde 0.6-0.8 olarak belirlediği hücre konsantrasyonunu, 0.5-1.0 arasında seyrelterek kullandığında eksplantlarda farklı nekrotik yapıların oluştuğunu gözlemlemiş ve rejenerasyonu büyük oranda düşürdüğünü belirtmiştir. Kullandığı çeşit için en iyi yoğunluğu 0.05-1 arası olarak belirlemiştir. Li et al. (2003) transformasyonda 0.38-0.42, Heidmann et al. (2011) 0.3-0.4, Arthikala et al. (2014) ise 1.2-1.5 yoğunluklarında *A.*

tumefaciens kullanmışlardır. Tez çalışmasında elde edilen aday transgenik biber hatlarının (*AtNHX1* ve *PSARKIPT*) moleküler olarak doğrulanmasında üç farklı primer çifti kullanılmıştır. Bu primerler T-DNA bölgesindeki gen bölgelerini (*AtNHX1* ve *PSARKIPT*), promotor bölgelerini (CaMV 35S ve SARK promotorları) ve her iki bölge içinde ortak olan higromisin direnç genini (*hpt II*) doğrulamak için seçilmiştir. Literatür incelendiğinde birçok çalışmada transgenlerin doğrulanmasında T-DNA üzerindeki birden fazla gen bölgesinin kontrolünün yapıldığı görülmektedir. Kumar et al. (2009) T0, T1 ve T2 transgenik biber hatlarının konformasyonunu, *uid A* ve *hpt II* gen bölgelerini kontrol ederek gerçekleştirmiştir. Subramanyam et al. (2011)'da benzer şekilde hem *osmotin* hem de *nptII* genlerini PCR'da kontrol etmişlerdir. Mahto et al. (2018)'da CaMV 35S promotor ve *GUS* gen bölgesini PCR'da taramışlardır. Birden fazla gen bölgesinin kontrol edilmesinin sebebi ise transformasyon sırasında T-DNA bölgesinin integrasyonunda olabilecek kırılmalar sonucu gen bölgelerinin tam olarak aktarılamaması veya oluşabilecek kimerik yapıların belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Arthikala et al., 2014).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Küresel iklim değişikliği sonucunda yakın gelecekte su stresi riskinin artacağı tahmin edilmektedir. Bu sebeple, tuzluluğa ve kuraklığa tolerant/dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi bitki biyoteknolojisinin oldukça önemli ve stratejik amaçlarından biridir (Gimeno et al., 2009). Bununla beraber hızlı bir gelişim gösteren transgenik teknolojisi sayesinde geleneksel tarım yöntemleri kullanılarak üretilmesi zor olan yeni ürünlerin geliştirilmesi elzem hale gelmiştir. Bu sayede birçok tarım ürününe istenilen özellikler (abiyotik ve biyotik strese tolerans, yüksek verim, vb.) nokta atışı ile kazandırılarak, tüm dünyada hızla artan yiyecek ihtiyacının karşılanabilmesi sorununun önüne geçilebilecektir. Çevresel stresler arasında kuraklık ve tuzluluk stresi bitki büyüme ve verimini en olumsuz etkileyen faktörlerdendir (Reddy et al., 2004). Kuraklık ve tuzluluk, tarımın evrensel olarak en önemli sorunlarından. Büyüme ve gelişme sırasında, besin alımını sınırlamakta, metabolizmayı yavaşlatmakta ve bu durum sonuçta ürüne yansımaktadır (Aydın vd., 2016). Bu yüzden mevcut genetik kaynakların kuraklık ve tuzluluk stresine dayanım koşullarının araştırılması ve artırılması önemli konular arasında yer almaktadır. *In vitro* koşullarda tuzluluk ve kuraklık stresi ile ilgili çalışmalar bitkilerde yoğun olarak yürütülmektedir. Bitki doku kültürü çalışmaları ile de bitkilerin hızlı bir şekilde bazı özellikler açısından taranması mümkün olabilmekte, kuraklık ve tuzluluk taraması da bu özellikler arasında yer almaktadır. Ancak bitki doku kültürü çalışmalarının sonunda yapılan bazı değerlendirmelerin arazi koşullarında da tekrar edilmesi önerilmektedir. Dünyada meydana gelen iklim değişikliği etkisi sebebiyle kuraklık ile ilgili risklerde günden güne daha da artmaktadır.

Tez çalışması kapsamında sivri, kapyra, çarliston ve dolma biber hatlarına *A. tumefaciens* aracılığı ile *AtNHX1* ve *PSARKIPT* genlerinin aktarılması ile rejenerasyon ve transformasyon protokollerinin geliştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Araştırmada ilk olarak biber hatları için en uygun rejenerasyon ortamları optimize edilmiştir. En iyi rejenerasyon sonuçları organogenesis denemeleri sonucunda BA ve IAA'nın kombinasyonlarında elde edilmiştir. Transformasyon sonrası elde edilen aday transgenik biber hatlarının moleküler olarak doğrulanması ile *in*

vitro'da mikroçoğaltımları yapılmıştır. *In vitro*'da köklendirilen aday transgenik biber hatları 1 mg/l IAA'da başarı ile köklendirilmiştir. Sonuç olarak, *AtNHX1* ve *PSARKIPT* genleri aktarılan aday transgenik biber hatlarının geliştirilmesi için en uygun rejenerasyon ve transformasyon protokolleri belirlenmiştir.

Tez araştırması sonucunda yapılması önerilen çalışmalar;

1. *Capsicum* cinsinin bilinen en önemli dezavantajlarından biri, *in vitro* rejenerasyona ve genetik transformasyona karşı inatçı olmasıdır. İleride yapılması olası rejenerasyon çalışmalarında farklı eksplant kaynaklarının, bitki büyüme düzenleyicilerinin, karbonhidratların kaynaklarının, vb. kullanılarak daha etkili bir prosedürün geliştirilmesi gerekmektedir. Özellikle etkili bir somatik embriyogenesis protokolünün geliştirilmesi ile hem çoğaltım hem de genetik transformasyon çalışmaları için zamandan önemli ölçüde tasarruf edilecektir.
2. Aday transgenik biber hatlarında bulunan transgenlerin (*AtNHX1* ve *PSARKIPT*) kopya sayılarının tespit edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle ilerde bu genlerle yapılacak transformasyon çalışmalarında elde edilecek transgenik hatların Southern blot analizi ile kopya sayılarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca Northern blot ve Western blot ile hem mRNA hem de protein analizlerinin yapılması başarılı bir transformasyon doğrulamasını güçlendirecektir.
3. Normalde transgenik araştırmalarda T0 hatları ile beraber T1, T2 hatta T3 jenerasyonlarının da kullanımı önerilmektedir. Bunun sebebi ise düşük frekanslı rejenerasyon ve transformasyon çalışmaları sonucunda az miktarda T0 hatlarının elde edilmesidir. Ancak ilerde yapılması planlanan araştırmalarda T1, T2 hatta T3 jenerasyonlarına kadar ulaşarak bu analizlerin hem kontrollü iklim odası koşullarında (veya serada) hem de arazi şartlarında abiyotik stres etkenlerinin araştırılması gerekmektedir. Ayrıca elde edilecek jenerasyonlarda homozigoti analizlerinin yapılması da önerilmektedir.

4. Tez çalışmasının devamında aday transgenik bitkilere abiyotik stres uygulamaları sonrası, fizyolojik ve biyokimyasal değişimlerin tespit edilmesi de önemli konular arasında yer almaktadır. Özellikle oksidatif stresle ilişkili enzim seviyeleri (Lipid peroksidaz, askorbat peroksidaz, malondialdehit, süperoksit dismutaz, vb.), K/Na-Ca/Na içerikleri, yaprak klorofil miktarı, yaprak oransal su içeriği, stoma geçirgenliği gibi kriterlerin incelenmesi önerilmektedir. Bunlara ek olarak meyve verimi, taze ve kuru ağırlık değişimleri gibi parametrelerinde incelenmesi daha sağlıklı sonuçlar verecektir.
5. Araştırmada kullanılan *AtNHX1* ve *PSARKIPT* genlerinin tek vektöre klonlanarak aktarılması veya bu genleri ayrı olarak taşıyan transgenik hatların melezlenmesi ile her iki geni taşıyan transgenik biber hatlarının geliştirilmesi önerilmektedir. Sonuçta hem tuzluluğa hem de kuraklığa tolerans sağlayan iki gen tek hatta ifade olarak iki özelliği bir arada taşıyacaktır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aboshama, H.M.S.**, 2011, Direct somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). World J. Agric. Sci, 7(6), 755-762pp.
- Agrawal, S., Chandra, N. and Kothari S.L.**, 1989, Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Mathania). Plant Cell Tissue Organ Cult, 16:47–55pp.
- Agrawal, S. and Chandra, N.**, 1983, Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in culture embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania. Curr Sci, 52:645–6pp.
- Aktaş, H.**, 2002, Biberde tuza dayanıklılığın fizyolojik karakterizasyonu ve kalıtımı. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 105s.
- Alibert, O.**, 1990, Essais de regeneration par organogenese chez le piment (*Capsicum annuum* L.). Memoire pour l'obtention du D.E.S.S. de Productivite Vegetale Universite Paris. Station d'Amelioration des Plantes, Maraicheres-INRA 84141 Montfavet, 37p.
- Al-Rubaye, O.A.M.**, 2017, Tuzlu koşullar altında güçlü kök yapısına sahip anaçların biber (*Capsicum annuum* L.) saf hatlarının bitki gelişimi üzerine etkileri. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 112s.
- Alvarez, S., Marsh, E.L., Schroeder, S.G. and Schachtman, D.P.**, 2008, Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. Plant, Cell & Environment, 31(3), 325-340pp.
- Aniel Kumar, O.A. and Tata, S.S.**, 2010, *In vitro* Shoot bud differentiation from hypocotyl explants of chili peppers (*Capsicum annuum* L.). Notulae Scientia Biologicae, 2(1), 66-69pp.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A. and Blumwald, E.**, 1999, Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. Science, 285, 1256–1258pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Apse, M.P., Sottosanto, J.B. and Blumwald, E.,** 2003. Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T- DNA insertional mutant of *AtNHX1*, the Arabidopsis vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. The plant journal, 36(2), 229-239pp.
- Apse, M.P. and Blumwald, E.,** 2007, Na⁺ transport in plants. FEBS letters, 581(12), 2247-2254pp.
- Argueso, C.T., Ferreira, F.J. and Kieber, J.J.,** 2009, Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. Plant, cell & environment, 32(9), 1147-1160pp.
- Arous, S., Boussaid, M. and Marrakchi, M.,** 2001, Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chili (*Capsicum annuum* L.). J Appl Hortic, 3:17–22pp.
- Arroyo, R. and Revilla, M.A.,** 1991, In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. Plant Cell Rep, 10 414–23–26pp.
- Ashwani, S., Ravishankar, G.A. and Giridhar, P.,** 2017, Silver nitrate and 2-(N-morpholine) ethane sulphonic acid in culture medium promotes rapid shoot regeneration from the proximal zone of the leaf of *Capsicum frutescens* Mill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 129(1), 175-180pp.
- Arthikala, M.K., Nanjareddy, K., Lara, M. and Sreevathsa, R.,** 2014, Utility of a tissue culture-independent Agrobacterium-mediated in planta transformation strategy in bell pepper to develop fungal disease resistant plants. Scientia Horticulturae, 170, 61-69pp.
- Aybak, H.Ç.,** 2002, Biber Yetiştiriciliği. Hasad Yayıncılık. 160s.
- Balasankar, D., Praneetha, S., Arumugam, T., Manivannan, N., Jeyakumar, P. and Arulmozhiselvan, K.,** 2017, Assessment of salinity tolerance in chilli (*Capsicum annuum* L.) genotypes. IJCS, 5(6), 1194-1198pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barragán, V., Leidi, E.O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J.A., Cubero, B. and Pardo, J.M.,** 2012, Ion exchangers *NHX1* and *NHX2* mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, tpc-111p.
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y. C., Ohto, M. A., Ushijima, K., Nakano, R., Esumi, T., Coku, A., Belmonte, M. and Blumwald, E.,** 2011a, The *Arabidopsis* Na^+/H^+ antiporters *NHX1* and *NHX2* control vacuolar pH and K^+ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *The Plant Cell*, tpc-111p.
- Bassil, E., Ohto, M. A., Esumi, T., Tajima, H., Zhu, Z., Cagnac, O., Belmonte, M., Peleg, Z., Yamaguchi, T. and Blumwald, E.,** 2011b, The *Arabidopsis* intracellular Na^+/H^+ antiporters *NHX5* and *NHX6* are endosome associated and necessary for plant growth and development. *The Plant Cell*, tpc-110p.
- Bassil, E. and Blumwald, E.,** 2014, The ins and outs of intracellular ion homeostasis: *NHX*-type cation/ H^+ transporters. *Current opinion in plant biology*, 22, 1-6pp.
- Bedada, L.T., Seth, M.S., Runo, S.M., Teffera, W., Mugoya, C., Masiga, C.W., Oduor, R.O., Blumwald, E. and Wachira, F.,** 2016, Drought tolerant tropical maize (*Zea mays* L.) developed through genetic transformation with isopentenyltransferase gene. *African Journal of Biotechnology*, 15(43), 2447-2464pp.
- Bertani, G.,** 1951, Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62:293-30p.
- Bhutia, K.L., Meetei, N.T. and Khanna, V.K.,** 2018, In vitro direct regeneration of Dalle Khursani (*Capsicum annum*) from salicylic acid treated explants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 1008-1012pp.
- Binzel, M.L., Sankhla, N., Joshi, S. and Sankhla, D.,** 1996, Induction of direct embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell Rep*, 15:536–40p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bodhipadma, K. and Leung, D.W.M.,** 2002, Factors important for somatic embryogenesis in zygotic embryo explants of *Capsicum annuum* L. Journal of Plant Biology, 45(1), 49-55pp.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G.,** 1995, Adaptations to environmental stresses. The Plant Cell, 7;1099-1111pp.
- Bonilla, M.D.O. and Chen, F.C.,** 2015, Effect of 6-Benzyladenine (BA) and Indole-3-Acetic Acid (IAA) on the in vitro regeneration of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). J. International Cooperation, 10(2):109-120pp.
- Bowers, K., Levi, B.P., Patel, F.I. and Stevens, T.H.,** 2000, The sodium/proton exchanger NHX1 is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Biology of the Cell, 11(12), 4277-4294pp.
- Brett, C.L., Donowitz, M. and Rao, R.,** 2005, Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. Am J Physiol Cell Physiol, 288:223-239p.
- Bulle, M., Yarra, R. and Abbagani, S.,** 2016, Enhanced salinity stress tolerance in transgenic chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plants overexpressing the wheat antiporter (*TaNHX2*) gene. Molecular breeding, 36(4), 36p.
- Büyükalaca, S. ve Mavituna, F.,** 1996, Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell Tiss Organ Cult, 46:227–35s.
- Cengiz, A.,** 2017, Biber bitkisinde kuraklık stresi ile nitrik oksit arasındaki ilişkinin belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 72s.
- Chartzoulakis, K.S. and Klapaki, G.,** 2000a, Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. Scientia Horticulturae, 86(3), 247-260pp.
- Chartzoulakis, K.S. and Klapaki, G.,** 2000b, Effects of NaCl salinity on growth and yield of two pepper cultivars. Acta Hort. 511, 143-150pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chee, P.P., Fober, K.A. and Slightom, J.L.**, 1989, Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant physiology, 91(3), 1212-1218pp.
- Chee, M.J.Y., Lycett, G.W. and Chin, C.F.**, 2018, Development of a direct transformation method by *GFP* screening and in vitro whole plant regeneration of *Capsicum frutescens* L. Electronic Journal of Biotechnology, 34, 51-58pp.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. and Zhu, J.K.**, 2005, Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science, 45(2), 437-448pp.
- Christopher, T. and Rajam, M.V.**, 1994, *In vitro* clonal propagation of *Capsicum* spp. Plant Cell Tissue Organ Cult, 38:25–9pp.
- Christopher, T. and Rajam, M.V.**, 1996, Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. Plant Cell Tissue Organ Cult, 46:245–50pp.
- Christopher, T. and Rajam, M.V.**, 1997, *In vitro* plant regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation in red pepper. In Vitro, 33-73pp.
- Chumakov, M.I., Rozhok, N.A., Velikov, V.A., Tyrnov, V.S. and Volokhina, I.V.**, 2006, *Agrobacterium*-mediated in planta transformation of maize via pistil filaments. Russian Journal of Genetics, 42(8), 893-897pp.
- Dabauza, M. and Pena, L.**, 2001, High efficiency organogenesis in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) tissues from different seedlings explants. Plant Growth Regul, 33:221–9p.
- Değer, Ö.**, 2010, Biber fidelerinde yapraktan ve topraktan yapılan glisinbetain (GB) uygulamalarıyla tuz stresine karşı toleransın artırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 99s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Delatorre, C.A., Cohen, Y., Liu, L., Peleg, Z. and Blumwald, E.,** 2012, The regulation of the SARK promoter activity by hormones and environmental signals. *Plant science*, 193, 39-47pp.
- Delis, M., Garbaczewska, G. and Niemirowicz-Szczytt, K.,** 2005, Differentiation of adventitious buds from *Capsicum annuum* hypocotyls after co-culture with *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Biol Crac*, 17:193–8pp.
- De La Riva, G., A., Gonzales-Cabrera, J., Vazquez-Padron, R., Ayra-Pardo, C.,** 1998, *Agrobacterium*: A Natural Tool for Plant Transformation Elect J. Biotech., 1:2-16p.
- Dong, C., Jiang, C.H., Feng, L. and Guo, J.,** 1992, Transgenic pepper plants (*Capsicum annuum* L.) containing CMV Sat- RNA-cDNA. *Acta Horti Sin* (in Chinese), 19:184–6p.
- Ebida, A.I.A. and Hu, CY.,** 1993, *In vitro* morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explant. *Plant Cell Rep*, 13:107–10p.
- El Nagar, M.M.,** 2012, Somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.) and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-Mediated transformation. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(11), 5550-5563pp.
- Engler, D.E., Guri, A.Z., Lauritis, J.A. and Schloemer, L.M.P.,** 1993, Genetically transformed pepper plants and method for their production. USA Patent, 5:262–316pp.
- Ercan, N., Sensoy, A., Funda, K. ve Sensoy Sırrı, A.,** 2006, Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) *Scientia Horticulturae*, 110 (1): 16–20pp.
- Eroğlu, B.,** 2016, Tuz stresi altındaki biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisinde antioksidatif sistem üzerine bazı organik ve inorganik bileşiklerin karşılaştırılmalı etkinliklerinin araştırılması. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 96s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ezura, H., Nishimiya, S. and Kasumi, M.,** 1993, Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep, 12:676–80p.
- Ferri, M., Gruarin, N., Barbieri, F. and Tassoni, A.,** 2018, *Capsicum* spp in vitro liquid cell suspensions: A useful system for the production of capsaicinoids and polyphenols. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 152(3), 436-444pp.
- França, M.G.C., Thi, A.T.P., Pimentel, C., Rossiello, R.O.P., Zuily-Fodil, Y. and Laffray, D.,** 2000, Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. Environmental and Experimental Botany, 43(3), 227-237pp.
- Franck-Duchenne, M., Wang, Y., Ben Tahar, S. and Beachy R.N.,** 1998, In vitro stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide. Plant Cell Tissue Organ Cult, 53:79-84pp.
- Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO),** <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV> (Erişim tarihi: 12 Ocak 2019).
- Gammoudi, N., San Pedro, T., Ferchichi, A. and Gisbert, C.,** 2017, Improvement of regeneration in pepper: a recalcitrant species. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 54(2), 145-153pp.
- Gan, S. and Amasino, R.M.,** 1997, Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence). Plant physiology, 113(2), 313pp.
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S.L., and Fink, G.R.,** 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 1480–1485pp.
- Glick, B.R. and Pasternak, J.J.,** 1998, Principles and applications of recombinant DNA. ASM, Washington DC, 683p.
- Golan, Y., Shirron, N., Avni, A., Shmoish, M. and Gepstein, S.,** 2016, Cytokinins induce transcriptional reprogramming and improve arabidopsis

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

plant performance under drought and salt stress conditions. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 63p.

Golegaonkar, P.G. and Kantharajah, A.S., 2006, High-frequency adventitious shoot bud induction and shoot elongation of chile pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(4), 341-344pp.

Gomez, I., Pedreño, J.N., Moral, R., Iborra, M.R., Palacios, G. and Mataix, J., 1996, Salinity and nitrogen fertilization affecting the macronutrient content and yield of sweet pepper plants. *Journal of Plant Nutrition*, 19(2), 353-359pp.

Grozeva, S. and Todorova, V., 2015, *In vitro* regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.) and characterization of plant-regenerants. *Electronic Journal of Biology*, 11(10), 17-22pp.

Günay, A.L. and Rao, P.S., 1978, In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Sci Lett*, 11:365–72p.

Haque, S.K.M. and Ghosh, B., 2018, An improved micropropagation protocol for the recalcitrant plant *Capsicum* – a study with ten cultivars of *Capsicum* spp. (*C. annuum*, *C. chinense*, and *C. frutescens*) collected from diverse geographical regions of India and Mexico. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93:1, 91-99pp.

Hare, P.D. and Cress, W.A., 1997, Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant growth regulation*, 21(2), 79-102.

Harini, I. and Lakshmi Sita, G., 1993, Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci* 1993;89:107–12p.

Hasnat, R., Abbasi, N.A., Hafiz, I.A., Ahmad, T. and Chudhary, Z., 2008, Effect of different bacterial dilutions on transformation efficiency of hot chilli (*Capsicum frutescens* L.) varieties. *Pak J Bot*, 40:2655–62p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hegde, V., Partap, P.S. and Yadav, R.C.,** 2017a, *In vitro* regeneration of capsicum (*Capsicum annuum* L.) from cotyledon explants. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(5), 225-237pp.
- Hegde, V., Partap, P.S. and Yadav, R.C.,** 2017b, Plant regeneration from hypocotyl explants in capsicum (*Capsicum annuum* L.). Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 6(7), 545-557pp.
- Heidmann, I., De Lange, B., Lambalk, J., Angenent, G.C. and Boutilier, K.,** 2011, Efficient sweet pepper transformation mediated by the *BABY BOOM* transcription factor. Plant cell reports, 30(6), 1107-1115pp.
- Hekimoğlu, B. ve Altındeğir, M.,** 2009, Samsun ili kapya biber üretimi. Samsun Tarım İl Müdürlüğü Strateji Geliştirme Birimi. Nisan 2009.
- Huang, Y., Guan, C., Liu, Y., Chen, B., Yuan, S., Cui, X., Zhang, Y. and Yang, F.,** 2017, Enhanced growth performance and salinity tolerance in transgenic switchgrass via overexpressing vacuolar Na⁺ (K⁺)/H⁺ antiporter gene (*PvNHX1*). Frontiers in plant science, 8, 458p.
- Huo, W., Yan, X., Sun, X. and Li, H.,** 2012, Heterologous expression of *isopentenyl transferase (IPT)* gene directed by senescence associated receptor protein kinase (SARK) promoter in Arabidopsis. Agricultural Biotechnology, 1(3), 35-41pp.
- Husain, S., Jain, A. and Kothari, S.L.,** 1999, Phenylacetic acid improves bud elongation and in vitro plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L. Plant Cell Rep, 19: 64-8p.
- Hyde, C. and Phillips G.C.,** 1996, Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration on chile pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 32:72-80pp.
- İnce, A.G.,** 2003, Demre sivrisi biber çeşidinin (*Capsicum annuum* L.) *in vitro* rejenerasyonu üzerine araştırmalar, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Antalya.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jayashankar, S., Bagga, S. and Phillips, G.C.,** 1997, Sweet pepper (*Capsicum annuum*) transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. HortScience, 32:454p.
- Jeon, J.M., Ahn NY, Son BH, Kim, C.Y., Han, C.D. and Kim, G.D.,** 2007, Efficient transient expression and transformation of PEG-mediated gene uptake into mesophyll protoplasts of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult, 88:225–32p.
- Jo, J.Y., Choi, E.Y., Choi, D.S. and Lee, K.W.,** 1996, Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Plant Biology (Korea Republic), 39(2), 127-135pp.
- Joshi, A. and Kothari, S.L.,** 2007, copper levels in the medium improves differentiation and elongation from cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L. Plant Cell Tissue Organ Cult, 88:127–33p.
- Jung, M., Shin, S.H., Park, J.M., Lee, S.N., Lee, M.Y., Ryu, K.H., Paek, K.Y. and Harn, C.H.,** 2011, Detection of transgene in early developmental stage by GFP monitoring enhances the efficiency of genetic transformation of pepper. Plant biotechnology reports, 5(2), 157-167pp.
- Kaparakis, G. and Alderson G.P.,** 2008, Role of cytokinins in somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.) Journal of Plant Growth Regulation. 27: 2: 110–114pp.
- Keleş, D.,** 2015, Biber (*Capsicum annuum* L.) yetiştiriciliği. Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, Erdemli-Mersin.
- Keshamma, E., Rohini, S., Rao, K.S., Madhusudhan, B. and Udayakumar, M.,** 2008, Tissue culture-independent in planta transformation strategy: an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer method to overcome recalcitrance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). J Cot Sci 12:264–272pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khan, H., Siddique, I. and Anis, M.,** 2006, Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. Biol Plant, 50:789–92p.
- Kim, J.Y., Jung, M., Kim, H.S., Lee, Y.H., Choi, S.H. and Lim, Y.P.,** 2002, A new selection system for pepper regeneration by mannose. J Plant Biotechnol, 4:129–34p.
- Kintzios, S., Drossopoulos, J.B., Shortsianitis, E. and Peppes, D.,** 1999, Induction of somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*. 1:1–3pp.
- Kothari, S.L., Joshi, A., Kachhwaha, S. and Ochoa-Alejo, N.,** 2010, Chilli peppers - a review on tissue culture and transgenesis. Biotechnology advances, 28(1), 35-48pp.
- Kreij, C.D.,** 1999, Production, blossom-end rot, and cation uptake of sweet pepper as affected by sodium, cation ratio, and EC of the nutrient solution. Gartenbauwissenschaft, 64(4), 158-164pp.
- Kumar, V., Gururaj, H.B., Narasimha Prasad, B.C. and Giridhar Ravishankar G.A.,** 2005, Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annum* L. *Scientia Horticulturae*, 106(2): 237-246pp.
- Kumar, V., Sharma, A., Prasad, B.C.N., Gururaj, H.B., Giridhar, P. and Ravishankar, G.A.,** 2007, Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(1), 11p.
- Kumar, A.M., Reddy, K.N., Sreevathsa, R., Ganeshan, G. and Udayakumar, M.,** 2009, Towards crop improvement in bell pepper (*Capsicum annum* L.): Transgenics (*uid A::hpt II*) by a tissue-culture-independent *Agrobacterium*-mediated in planta approach. *Scientia horticulturae*, 119(4), 362-370pp.
- Kumar, O., Rupavathi, T. and Subba Tata, S.,** 2012 a, Adventitious shoot bud induction in chili pepper (*Capsicum annum* L. cv. X-235). *International Journal of Science and Nature*, 3(1), 192-196pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, R.V., Sharma, V.K., Chattopadhyay, B. and Chakraborty, S.,** 2012b, An improved plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(4), 357-364pp.
- Kumlay, A.M. ve Dursun, A.,** 2003, Bitki Genetik Mühendisliği ve Ekonomik Öneme Sahip Bazı Bitkilerde Genetik Mühendisliği Uygulamaları/Plant Genetic Engineering and Its Applications on Economically Important Plants. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 34(2).
- Kuppu, S., Mishra, N., Hu, R., Sun, L., Zhu, X., Shen, G., Blumwald, E., Payton, P. and Zhang, H.,** 2013, Water-deficit inducible expression of a cytokinin biosynthetic gene *IPT* improves drought tolerance in cotton. *PLoS One*, 8(5), 64-190p.
- Küsek, M., Steinitz, B., Yona T., İlan, P. and Aaron, Z.,** 2003, Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In vitro Cellular and Development Biology- Plant*, 39(3): 296–303pp.
- Leesmans, J., Langenakens, J., De Greve, H., Deblaere, R., Van Montagu M. and Schell, J.,** 1982, Broad Host Range Cloning Vectors Derived From the W-plasmid *Sa. Gene*, 19: 361-364pp.
- Lee, Y.H., Kim, H.S., Kim, J.Y., Jung, M., Park, Y.S. and Lee, J.S.,** 2004, A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation. *Plant Cell Rep*;23:50–8pp.
- Lee, S.J., Kim, B.D., Paek, K.H.,** 1993, *In vitro* plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from cotyledon explants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). *Korean J Plant Tissue Cult*, 20:289–94pp.
- Leidi, E. O., Barragán, V., Rubio, L., El- Hamdaoui, A., Ruiz, M. T., Cubero, B., fernandez, J.A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quintero, F.J. and Pardo, J.M.,** 2010, The *AtNHX1* exchanger mediates potassium

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal*, 61(3), 495-506pp.

Li, D., Zhao, K., Xie, B., Zhang, B. and Luo, K., 2003, Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep*, 21:785–8p.

Lim, H.T., Lee., K, Yoo, Y.S. and Yang, D.C., 1996, Plant regeneration of hot pepper and expression of mouse adenosine-deaminase gene via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Hortscience* 31:572p.

Liu, W., Parrott, W.A., Hildebrand, D.F., Collins, G.B. and Williams, E.G., 1990, *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Rep*, 9:360–4p.

Ma, Q.H., 2008, Genetic engineering of cytokinins and their application to agriculture. *Critical reviews in biotechnology*, 28(3), 213-232pp.

Madhuri, V. and Rajam, M.V., 1993, Apical shoot meristem culture in red pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Plant Biochem Biotech*, 2:67-8p.

Mahto, B.K., Sharma, P., Rajam, M.V., Reddy, P.M. and Dhar-Ray, S., 2018, An efficient method for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Indian Journal of Plant Physiology*, 23(3), 573-581pp.

Maligeppagol, M., Manjula, R., Navale, P.M., Babu, K.P., Kumbar, B.M. and Laxman, R.H., 2016, Genetic transformation of chilli (*Capsicum annuum* L.) with *Dreb1A* transcription factor known to impart drought tolerance. *Indian Journal of Biotechnology (IJBT)*, 15(1), 17-24pp.

Manoharan, M., Sree Vidya, C.S. and Lakshmi Sita, G., 1998, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var. *Pusa jwala*). *Plant Sci*, 131:77–83pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mccubbin, T., Bassil, E., Zhang, S., and Blumwald, E.,** 2014, Vacuolar Na^+/H^+ NHX-Type antiporters are required for cellular K^+ homeostasis, microtubule organization and directional root growth. *Plants* 3(3), 409-426pp.
- Mihálka, V., Balazs, E. and Nagy, I.,** 2003. Binary transformation systems based on 'shooter' mutants of *Agrobacterium tumefaciens*: a simple, efficient and universal gene transfer technology that permits marker gene elimination. *Plant cell reports*, 21(8), 778-784pp.
- Mok, S.H. and Norzulaani, K.,** 2007, Trouble shooting for recalcitrant bud formation in *Capsicum annuum* var. Kulai. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology & Biotechnology*, 15(1), 33-38pp.
- Murashige, T. and Skoog, F.,** 1962, A resived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarium*, 84 (15): 473–497pp.
- Mythili, J.B., Rajeev, P.R., Vinay, G. and Nayeem, A,** 2017, Synergistic effect of silver nitrate and coconut water on shoot differentiation and plant regeneration from cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEb)*, 55(3): 184-190pp.
- Navarro, R.L., Warriar S.G. and Maslog, C.C.,** 2006, Genes are gems: Reporting agri-biotechnology. A sourcebook for journalists. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International crops research institute for the semi-arid tropics, BOE 041.136p.
- Nawiri, S.O., Oduor, R.O. and Jalemba, A.M.,** 2017, Genetic engineering of sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) using *isopentenyl transferase* gene for enhanced drought tolerance. *Asian Journal of Agriculture*, 1(02), 85-99pp.
- Ochoa-Alejo, N. and Ramirez-Malagon, R.,** 2001, *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 701-729pp.
- Ohnishi, T., Sugahara, S., Yamada, T., Kikuchi, K., Yoshiba, Y., Hirano, H.Y. and Tsutsumi, N.,** 2005, OsNAC6, a member of the NAC gene family, is

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

induced by various stresses in rice. *Genes & genetic systems*, 80(2), 135-139pp.

Oneto, C.D., Otegui, M.E., Baroli, I., Beznec, A., Faccio, P., Bossio, E., Blumwald, E. and Lewi, D., 2016, Water deficit stress tolerance in maize conferred by expression of an isopentenyltransferase (IPT) gene driven by a stress-and maturation-induced promoter. *Journal of biotechnology*, 220, 66-77pp.

Orlinska, M. and Nowaczyk, P., 2015, In vitro plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. genotypes using different explant types. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 60-68pp.

Özalp, R., 2010, Ülkemizde biber üretimi ve örtüaltı biber yetiştiriciliği. *Tarım Türk Dergisi*. 24(5): 29-32pp.

Özcan, S. ve Özgen, M., 1996, Bitki Genetik Mühendisliği. *Kükrm Dergisi*, 1: 69-65s.

Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O. and Quintero, F.J., 2006, Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of experimental botany*, 57(5), 1181-1199pp.

Patil, Y.K., Thakur, V.V., Choudhari, N.B., Zote, R.K. and Lagad, V.S., 2018, Influence of Plant Growth Regulators on Seed Germination and Regeneration of Shoots and Roots in Chili (*Capsicum annum* L.). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 7(2), 242-248pp.

Peleg, Z., Reguera, M., Tumimbang, E., Walia, H. and Blumwald, E., 2011, Cytokinin- mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water- stress. *Plant Biotechnology Journal*, 9(7), 747-758pp.

Phillips, G.C. and Hubstenberger, J.F., 1985, Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 4:261–9p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ping, L.X., Nogawa, M., Shioiri, H., Nozue, M., Makita, N., Takeda, M., Bao, L. and Kojima, M.,** 2003, In planta transformation of mulberry trees (*Morus alba* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Insect Biotechnology and Sericology, 72(3), 177-184pp.
- Prakash, A.H., Sankara Rao, K. and Udaya Kumar, M.,** 1997, Plant regeneration from protoplast of *Capsicum annum* L. cv. California Wonder. *J. Biosci.*, 22(3): 339-344pp.
- Qin, C., Dong, Z. L., Liu, W.X., Zhirui, D.E.N.G. and Liang, T.A.N.G.,** 2005, Effects of exogenous plant growth regulator on in vitro regeneration of cotyledonar explants in pepper. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 33, 25p.
- Qin, H., Gu, Q., Zhang, J., Sun, L., Kuppu, S., Zhang, Y. and Zhang, H.,** 2011, Regulated expression of an isopentenyltransferase gene (*IPT*) in peanut significantly improves drought tolerance and increases yield under field conditions. *Plant and Cell Physiology*, 52(11), 1904-1914pp.
- Quintero, F.J., Blatt, M.R. and Pardo, J.M.,** 2000, Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS Lett.* 471, 224–228pp.
- Rao, S.R.I.N.A.T.H., Pratibha, G.S., Parashuram, Y.J. and Kaviraj, C.P.,** 2006, High frequency plant regeneration from shoot tip explants of chilli (*Capsicum annum*). *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 7, 163-166pp.
- Ramírez-Malagón R.E,** 1997, de regeneración de plantas in vitro y de transformación genética de chile (*Capsicum annum* L.) Ph.D. thesis, CINVESTAV–Unidad Irapuato, Mexico.
- Ramírez-Malagón, R. and Ochoa-Alejo, N.,** 1996, An improved and reliable chilli pepper (*Capsicum annum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Rep.* 16:226–31p.
- Reguera, M., Peleg, Z., Abdel-Tawab, Y.M., Tumimbang, E., Delatorre, C.A. and Blumwald, E.,** 2013, Stress-induced CK synthesis increases drought

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. *Plant Physiology*, 113p.

Reguera, M., Bassil, E. and Blumwald, E., 2014, Intracellular NHX-type cation/H⁺ antiporters in plants. *Molecular plant*, 7(2), 261-263pp.

Renfiyeni, Syukriani, L., Asben, A. and Jamsari, J., 2017, Optimal media for in-vitro regeneration of two local genotypes of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) from West Sumatera. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 7(3), 904-909pp.

Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S. and Blumwald, E., 2007, Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19631-19636pp.

Rivero, R.M., Gimeno, J., Van Deynze, A., Walia, H. and Blumwald, E., 2010, Enhanced cytokinin synthesis in tobacco plants expressing *PSARK::IPT* prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought. *Plant and cell physiology*, 51(11), 1929-1941pp.

Rivero, R.M., Shulaev, V. and Blumwald, E., 2009, Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiology*, 150(3), 1530-1540pp.

Rodeva, V., Grozeva, S. and Todorova, V., 2006, *In vitro* answer of Bulgarian pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genetika*, 38(2), 129-136pp.

Rodríguez-Rosales, M.P., Gálvez, F.J., Huertas, R., Aranda, M.N., Baghour, M., Cagnac, O. and Venema, K., 2009, Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant signaling & behavior*, 4(4), 265-276pp.

Sanatombi, K. and Sharma G.J., 2006, *In vitro* regeneration and mass multiplication of *Capsicum annuum* L. *J Food Agric Env* 2006;4:205–8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sanatombi, K. and Sharma, G.J.,** 2007a. Micropropagation of *Capsicum frutescens* L. using axillary shoot explants. *Scientia Horticulturae*, 113(1): 96–99pp.
- Sanatombi, K. and Sharma, G.J.,** 2007b, Micropropagation of *Capsicum annum* L. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*. 35(1): 255–965pp.
- Sanatombi, K. and Sharma, G.J.,** 2007c, Micropropagation of *Capsicum annum* L. *Not Bot Horti Agrobot Cluj*, 35:57–64pp.
- Sanatombi, K. and Sharma, G.J.,** 2007d, Micropropagation of *Capsicum frutescens* L. using axillary shoot explants. *Sci Hortic Amsterdam*, 113:96–9p.
- Sanatombi, K. and Sharma G.J.,** 2008, *In vitro* plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants. *Biol Plant*, 52:141–5p.
- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Iglesias-Andreu, L.G., Montalvo-Peniche, M. D.C., López-Puc, G. and Barahona-Pérez, F.,** 2006, Improvement of *in vitro* culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience*, 41(2), 405-409pp.
- Saxena, P.K., Gill, R., Rashid, A. and Maheshwari, S.C.,** 1981, Isolation and culture of protoplasts of *Capsicum annum* L. and their regeneration into plants flowering *in vitro*. *Protoplasma*, 108(3-4), 357-360pp.
- Schell, J. and Van Montagu, M.,** 1983. The Plasmids as Natural and as Practical Gene Vectors for Plants. *Bio/Technol.*, 1:75p.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M. and Allen, G.J.,** 2001, Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410(6826), 327p.
- Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J. and Zhu, J.K.,** 2003, Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21, 81–85pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shivakumara, T.N., Sreevathsa, R., Dash, P.K., Sheshshayee, M.S., Papolu, P.K., Rao, U., Tuteja, N. and Udaya Kumar, M.,** 2017, Overexpression of Pea DNA Helicase 45 (PDH45) imparts tolerance to multiple abiotic stresses in chili (*Capsicum annuum* L.). Scientific Reports, 7(1), 2760p.
- Sobhakumari, V.P. and Lalithakumari, D.,** 2003, Direct plant regeneration from shoot tip cultures of *Capsicum annuum* L. cv. PLR-1. Phytomorphology, 53(3-4), 235-242pp.
- Sottosanto, J.B., Gelli, A., and Blumwald, E.,** 2004, DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar Na^+/H^+ antiporter: impact of *AtNHX1* on gene expression. The Plant Journal, 40(5), 752-771pp.
- Steinitz, B., Wolf, D., Matzevitch-Josef, T. and Zelcer, A.,** 1999, Regeneration *in vitro* and genetic transformation of pepper (*Capsicum* spp.). The current state of art. Capsicum Eggplant Newslett, 18:9–15pp.
- Steinitz, B., Kusek, M., Tabib, Y., Paran, I. and Zelcer, A.,** 2003, Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 39:296–303p.
- Subhash, K. and Christopher, T.,** 1997, Organogenesis and transformation in *Capsicum baccatum*. In Vitro, 33:54pp.
- Subramanyam, K., Sailaja, K.V., Subramanyam, K., Rao, D.M. and Lakshmidhevi, K.,** 2011, Ectopic expression of an osmotin gene leads to enhanced salt tolerance in transgenic chilli pepper (*Capsicum annum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 105(2), 181-192pp.
- Sujatha, M., Vijay, S., Vasavi, S., Reddy, P.V. and Rao, S.C.,** 2012, *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledons of mature seeds of multiple genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 110(2), 275-287pp.
- Supartana, P., Shimizu, T., Shioiri, H., Nogawa, M., Nozue, M. and Kojima, M.,** 2005, Development of simple and efficient in planta transformation

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of bioscience and bioengineering, 100(4), 391-397pp.

Supartana, P., Shimizu, T., Nogawa, M., Shioiri, H., Nakajima, T., Haramoto, N., Nozue, M. and Kojima, M., 2006, Development of simple and efficient in planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of bioscience and bioengineering, 102(3), 162-170pp.

Szasz, A., Nervo, G. and Fari, M., 1995, Screening for in vitro shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper. (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient regeneration using thidiazuron. Plant Cell Rep, 14:666–9p.

Thamidala, C. and Karampuri, S., 2006, *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration in four *Capsicum* species using thidiazuron. Scientia Horticulturae. 107(2): 117–122pp.

Thompson, A.J., Mulholland, B.J., Jackson, A.C., McKee, J.M., Hilton, H.W., Symonds, R.C. and Taylor, I.B., 2007, Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. Plant, cell & environment, 30(1), 67-78pp.

Tomaszewska-Sowa, M., Drozdowska, L. and Szota, M., 2002, Effect of cytokinins on *in vitro* morphogenesis and ploidy of pepper *Capsicum annuum* L. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, 5(1), 4p.

Trujillo-Moya, C. and Gisbert, C., 2012, The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 111(1), 41-48pp.

Tsuro, M., Koda, M. and Inoue, M., 1999, Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Scientia Horticulturae, 81(3): 331–336pp.

TÜİK, 2019, Türkiye istatistik kurumu biber üretimi (ton). http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001. (Erişim tarihi: 12.01.2019).

Tüzün, S., 2014., Biber yetiştiriciliği (*Capsicum annuum* L.). Tarımsal Eğitim ve Yayın Projesi, GAP-TEYAP Batman.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Valadez-Bustos, M.G., Aguado-Santacruz, G.A., Carrillo-Castañeda, G., Aguilar-Rincón, V.H., Espitia-Rangel, E., Montes-Hernández, S. and Robledo-Paz, A.,** 2009, *In vitro* propagation and agronomic performance of regenerated chili pepper (*Capsicum* spp.) plants from commercially important genotypes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(6), 650p.
- Valera-Montero, L.L. and Ochoa-Alejo, N.,** 1992, A novel approach for chili pepper (*Capsicum annum* L.) plant regeneration. Shoot induction in rooted hypocotyls. *Plant Sci.* 84: 214–219pp.
- Venema, K., Quintero, F.J., Pardo, J.M. and Donaire, J.P.,** 2002, The Arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.* 277, 2413–2418pp.
- Venkataiah, P. and Subhash, K.,** 2001, Genotype-explant and medium effects on adventitious shoot bud formation and plant regeneration in *Capsicum annum* L. *Journal of Genetics & Breeding*, 55(2), 143-149pp.
- Venkataiah, P., Christopher, T. and Subhash, K.,** 2003, Thiadiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annum* L. *J Plant Biotechnol*, 5:245–50p.
- Verma, S., Dhiman, K. and Srivastava, D.K.,** 2013a, Efficient *in vitro* regeneration from cotyledon explants in bell pepper (*Capsicum annum* L. cv. California wonder). *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 4(3), 391-396pp.
- Verma, S., Dhiman, K. And Srivastava, D.K.,** 2013b, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of bell pepper (*Capsicum annum* L. cv. California Wonder) with gus and nptII genes. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 4, 397-403pp.
- Winkelmann, T., Ratjens, S., Bartsch, M., Rode, C., Niehaus, K. and Bednarz, H.,** 2015, Metabolite profiling of somatic embryos of *Cyclamen persicum* in comparison to zygotic embryos, endosperm, and testa. *Frontiers in plant science*, 6, 597p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xiao, X.O., Zeng, Y.M., Cao, B. H., Lei, J.J., Chen, Q.H., Meng, C.M. and Cheng, Y.J.,** 2017, *PSAG12-IPT* overexpression in eggplant delays leaf senescence and induces abiotic stress tolerance. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92(4), 349-357pp.
- Yarra, R., He, S.J., Abbagani, S., Ma, B., Bulle, M. and Zhang, W.K.,** 2012, Overexpression of a wheat Na^+/H^+ antiporter gene (*TaNHX2*) enhances tolerance to salt stress in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 111(1), 49-57pp.
- Yıldızlı, A.,** 2014, *Capsicum annuum* L. (biber) bitkilerine dışsal uygulanan sentetik myo-inositol'ün kuraklık toleransı üzerine etkisinin araştırılması. Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 54s.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M. and Schell, J.,** 1974, Supercoiled Circular DNA in Crown Gall-Inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.*, 86: 109-127pp.
- Zemene, A. and Worku, A.,** 2018, Protocol optimization for micro-propagation of Green pepper (*Capsicum annum* L.) cultivated in Ethiopia. *Journal of Medicinal Plants*, 6(1), 229-234pp.
- Zhu, Y.X., Ou-Yang. W.J., Zhang, Y.F. and Chen, Z.L.,** 1996, Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep*, 16:71–5pp.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince beni her zaman destekleyen, sabırla dinleyen, yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hülya İLBİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans öğrenimimden bu yana geçen süreçte bana laboratuvarının kapılarını açan ve birçok alanda deneyim kazanmama olanak sağlayan eş danışman hocam Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye minnetlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince danışman hocalarımın sağladığı destekler sayesinde, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı tarafından yürütülen 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programını kazanarak, 2014-2015 dönemlerinde Kaliforniya Üniversitesi, Davis/ABD Bitki Bilimi Bölümün'de çalışma fırsatını buldum. Bu konuda beni destekleyen danışman hocalarım başta olmak üzere, Kaliforniya Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Eduardo BLUMWALD'a ve TÜBİTAK BİDEB başkanlığına tez çalışmama katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince düşünce ve fikirleri ile desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Doktora Tez İzleme Komitesi üyeleri hocalarım, Prof. Dr. Burçin ÇOKUYSAL ve Doç. Dr. Birsen ÇAKIR'a doktora tezime verdikleri destek, emek ve katkılarından dolayı teşekkür ederim. Lisansüstü öğrenim sürecinden bu yana beni destekleyen ayrıca Ç.Ü. Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinin tüm olanaklarını sağlayan doktora tez jüri üyelerimden Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR hocama çok teşekkür ederim. Beraber birçok araştırmada çalıştığımız manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez jüri üyelerinden Doç. Dr. İlknur SOLMAZ hocama, tezime verdiği katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bitkisel materyallerin teminini sağlayan AD-Rossen Tarım A.Ş.'ye ve Dr. Aydın ATASAYAR'a katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Pembe EVCI ÇÜRÜK'e, Dr. Öğretim Üyesi Özhan ŞİMŞEK'e, Dr. Öğretim Üyesi Başar SEVİNDİK'e, Dr. Dicle Dönmez'e, Arş. Gör. Mehmet TÜTÜNCÜ'ye, ve laboratuvarında görev alan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca tezimin düzenlenmesinde emeği olan Sinem BİLEKLİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım aileme, beni maddi ve manevi olarak destekleyen canım kardeşim M. Akın İZGÜ'ye, beni kollayan, yalnız bırakmayan değerli babam A. Aydın İZGÜ'ye, beni dualarıyla ayakta tutan sevgili annem Sevim İZGÜ'ye sonsuz şükranlarımı sunarım.

10/09/2019



Tolga İZGÜ

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Seyhan/Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 2002 yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesinde başladığı üniversite eğitimini 2006 yılında bitirdi. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Prof. Dr. Yeşim Yalçın Mendi danışmanlığında yüksek lisansa başladı ve 2010 yılında tamamladı. Aynı yıl içerisinde Ege Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda Prof. Dr. Hülya İLBİ danışmanlığında doktora eğitimine başladı ve 2019 yılında doktorasını tamamladı.



EKLER

Ek 1 pH7m24GW-35S:*AtNHX1* plazmid sekansı

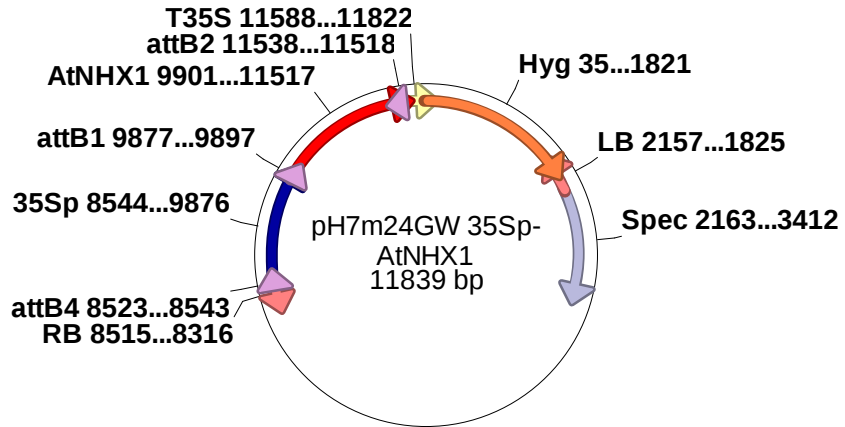
Ek 2 pCAMBIA-SARK:*IPT* plazmid sekansı

Ek 3 *NHX1* Primerler (Sarı: forward primer, Yeşil: reverse primer)

Ek 4 *IPT* primerler (Sarı: forward primer, Yeşil: reverse primer)



Ek 1 pH7m24GW-35S:AtNHX1 plazmid sekansı



GGCCCTCTAGAGGATCCCCGGGTACCCTCGAATTATCATACATGAGAATTAA
GGGAGTCACGTTATGACCCCGCCGATGACGCGGGACAAGCCGTTTACGTTT
GGAAGTACAGAACCGCAACGTTGAAGGAGCCACTGAGCCGCGGGTTTCTGG
AGTTTAATGAGCTAAGCACATACGTCAGAAACCATTATTGCGCGTTCAAAAG
TCGCCTAAGGTCAGTATCAGCTAGCAAATATTTCTTGTCAAAAATGCTCCACT
GACGTTCCATAAATTCCCCTCGGTATCCAATTAGAGTCTCATATTCAGTCTCA
ACTCGAATCCCCCTATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGCGAGA
AGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAG
GGCGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGATATGTCCT
GCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGC
ACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAGTTC
AGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGC
AAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCCGCTGTTCTTCAGCCGGTCGCGGAGGC
TATGGATGCTATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCA
TTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCG
CGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACGTGTGATGGACGACACCGTC
AGTGCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCGAGGACTG
CCCCGAAGTCCGGCACTCGTGACGCGGATTCCGGCTCCAACAATGTCCTGAC
GGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTTCGGG
GATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCGGTGGTTGGCTTG
TATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGA
TCGCCAAGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCA
GAGCTTGTTGACGGCAATTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGC
GACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTGCGGGCGTACACAAATCGCCC
GCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG
TGGAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATG
CCGACCGAACAAGAGCTGATTTTCGAGAACGCCTCAGCCAGCAACTCGCGCGA
GCCTAGCAAGGCAAATGCGAGAGAACGGCCTTACGCTTGGTGGCACAGTTCT
CGTCCACAGTTCGCTAAGCTCGCTCGGTGGGTGCGGGAGGGCCGGTCGCA
GTGATTGAGGAATTAATCCCTAGAGTCAAGCAGATCGTTCAAACATTTGGCA
ATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATAT
AATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACG
TTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATA
CGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCG
GTGTCATCTATGTTACTAGATCGACCGGCATGCAAGCTGATAAT

TCAATTCGG

CGTTAATTCAGTACATTA AAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGC
GTCAATTTGTTTACACCACAATATATCCTGCCACCAGCCAGCCAACAGCTCCC
CGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCACCTCGATACAGGCAGCCCATCAGTC
CGGGACGGCGTCAGCGGGAGAGCCGTTGTAAGGCGGCAGACTTTGCTCATGT
TACCGATGCTATTCGGAAGAACGGCAACTAAGCTGCCGGGTTTGAAACACGG
ATGATCTCGCGGAGGGTAGCATGTTGATTGTAACGATGACAGAGCGTTGCTG
CCTGTGATCAATTTCGGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTCGTTCGGTTCGT
AAGCTGTAATGCAAGTAGCGTAACCTGCCGTCACGCAACTGGTCCAGAACCTT
GACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTCTTGTT
ATGACATGTTTTTTTTGGGGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAAGC
GCGTTACGCCGTGGGTTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGC
AGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAAACATCATGGGGGAAGCGGTGA
TCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCA
TCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCG
GCCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTT
GATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGAAACTTCGGCTT
CCCTTGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCA
CGACGACATCATTCGTTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGA
GAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGCAAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCG
ACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTT
GGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACCTTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTA
TTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCCCGACTGGG
CTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCA
GTAACCGGCAAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGC
GCCTGCCGCCCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTT
GGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTG
TCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGGCAAATAATGTCTAGC
TAGAAATTCGTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCCGGCGTTAACTCAAGCGATTA
GATGCACTAAGCACATAATTGCTCACAGCCAACTATCAGGTCAAGTCTGCTT
TTATTATTTTAAAGCGTGCATAATAAGCCCTACACAAATTGGGAGATATATCA
TGCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCC
CGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCT
GCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGA
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAG
ATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAA
CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTG
CTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGA CTCAAGACGATAGTT
ACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
AGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTAT
GAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA
GCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACG
CCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGAT
TTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGC
GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCT
GCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGA
TACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGA
AGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTT
CACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTA
AGCCAGTATACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGA
CACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATC
CGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTT

CACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGGGTGCCTTGATGTGGGCGCCGGC
GGTCGAGTGGCGACGGCGCGGCTTGTCCGCGCCCTGGTAGATTGCCTGGCCG
TAGGCCAGCCATTTTTGAGCGGCCAGCGGCCGCGATAGGCCGACGCGAAGCG
GCGGGGCGTAGGGAGCGCAGCGACCGAAGGGTAGGCGCTTTTTGCAGCTCTT
CGGCTGTGCGCTGGCCAGACAGTTATGCACAGGCCAGGCGGGTTTTAAGAGT
TTTAATAAGTTTTAAAGAGTTTTAGGCGGAAAAATCGCCTTTTTTCTCTTTAT
ATCAGTCACTTACATGTGTGACCGGTTCCCAATGTACGGCTTTGGGTTCCCAA
TGTACGGGTTCCGGTTCCCAATGTACGGCTTTGGGTTCCCAATGTACGTGCTA
TCCACAGGAAAGAGACCTTTTCGACCTTTTTCCCTGCTAGGGCAATTTGCC
TAGCATCTGCTCCGTACATTAGGAACCGGCGGATGCTTCGCCCTCGATCAGGT
TGCGGTAGCGCATGACTAGGATCGGGCCAGCCTGCCCCGCCTCCTCCTTCAA
TCGTA TCCGGCAGGTCATTTGACCCGATCAGCTTGCGCACGGTGAAACAGA
ACTTCTTGA ACTCTCCGGCGCTGCCACTGCGTTCGTAGATCGTCTTGAACAAC
CATCTGGCTTCTGCCTTGCCTGCGGCGCGGCGTGCCAGGCGGTAGAGAAAAC
GGCCGATGCCGGGATCGATCAAAAAGTAATCGGGGTGAACCGTCAGCACGTC
CGGGTTCTTGCTTCTGTGATCTCGCGGTACATCCAATCAGCTAGCTCGATCT
CGATGTACTCCGGCCGCCCGGTTTCGCTCTTTACGATCTTGTAGCGGCTAATC
AAGGCTTCACCCTCGGATACCGTCACCAGGCGGCCGTTCTTGCCCTTCTTCGT
ACGCTGCATGGCAACGTGCGTGGTGTTTAACCGAATGCAGGTTTCTACCAGGT
CGTCTTTCTGCTTTCCGCCATCGGCTCGCCGGCAGAACTTGAGTACGTCCGCA
ACGTGTGGACGGAACACGCGGCCGGGCTTGTCTCCCTTCCCTTCCCGGTATCG
GTTTCATGGATTCCGGTTAGATGGGAAACCGCCATCAGTACCAGGTCGTAATCC
CACACACTGGCCATGCCGGCCGGCCCTGCGGAAACCTCTACGTGCCCGTCTG
GAAGCTCGTAGCGGATCACCTCGCCAGCTCGTCGGTCACGCTTCGACAGACG
GAAAACGGCCACGTCCATGATGCTGCGACTATCGCGGGTGCCACGTCATAG
AGCATCGGAACGAAAAAATCTGGTTGCTCGTCGCCCTTGGGCGGCTTCCTAAT
CGACGGCGCACCGGCTGCCGGCGGTTGCCGGGATTCTTTGCGGATTCGATCA
GCGGCCGCTTGCCACGATTCACCGGGGCGTGCTTCTGCCTCGATGCGTTGCCG
CTGGGCGGCCTGCGCGGCCTTCAACTTCTCCACCAGGTCATCACCCAGCGCCG
CGCCGATTTGTACCGGGCCGGATGGTTTGCGACCGTCACGCCGATTCCTCGGG
CTTGGGGGTTCCAGTGCCATTGCAGGGCCGGCAGACAACCCAGCCGCTTACG
CCTGGCCAACCGCCCGTTCTCTCCACACATGGGGCATTCCACGGCGTCGGTGCC
TGGTTGTTCTTGATTTTCCATGCCGCCTCCTTTAGCCGCTAAAATTTCATCTACT
CATTTATTCATTTGCTCATTTACTCTGGTAGCTGCGCGATGTATTCAGATAGCA
GCTCGGTAATGGTCTTGCTTGGCGTACCGCGTACATCTTCAGCTTGGTGTGA
TCCTCCGCCGGCAACTGAAAGTTGACCCGCTTCATGGCTGGCGTGTCTGCCAG
GCTGGCCAACGTTGCAGCCTTGCTGCTGCGTGCGCTCGGACGGCCGGCACTTA
GCGTGTTTGTGCTTTTGCTCATTTTCTCTTTACCTCATTAAC TCAAATGAGTTT
TGATTTAATTTAGCGGCCAGCGCCTGGACCTCGCGGGCAGCGTCGCCCTCGG
GTTCTGATTCAAGAACGGTTGTGCCGGCGGCGGCAGTGCTTGGGTAGCTCAC
GCGCTGCGTGATACGGGACTCAAGAATGGGCAGCTCGTACCCGGCCAGCGCC
TCGGCAACCTCACCGCCGATGCGCGTGCTTTGATCGCCCGCGACACGACAA
AGGCCGCTTG TAGCCTTCCATCCGTGACCTCAATGCGCTGCTTAACCAGCTCC
ACCAGGTCGGCGGTGGCCCATATGTCGTAAGGGCTTGGCTGCACCGGAATCA
GCACGAAGTCGGCTGCCTTGATCGCGGACACAGCCAAGTCCGCCGCCTGGGG
CGCTCCGTCGATCACTACGAAGTCGCGCCGGCCGATGGCCTTCACGTCGCGGT
CAATCGTCGGGCGGTGATGCCGACAACGGTTAGCGGTTGATCTTCCCGCAC
GGCCGCCCAATCGCGGGCACTGCCCTGGGGATCGGAATCGACTAACAGAA
TCGGCCCCGGCGAGTTGCAGGGCGCGGGCTAGATGGGTTGCGATGGTCGTCT
TGCTGACCCGCCTTTCTGGTTAAGTACAGCGATAACCTTCATGCGTTCCCT
TGCGTATTTGTTTATTTACTCATCGCATCATATACGCAGCGACCGCATGACGC

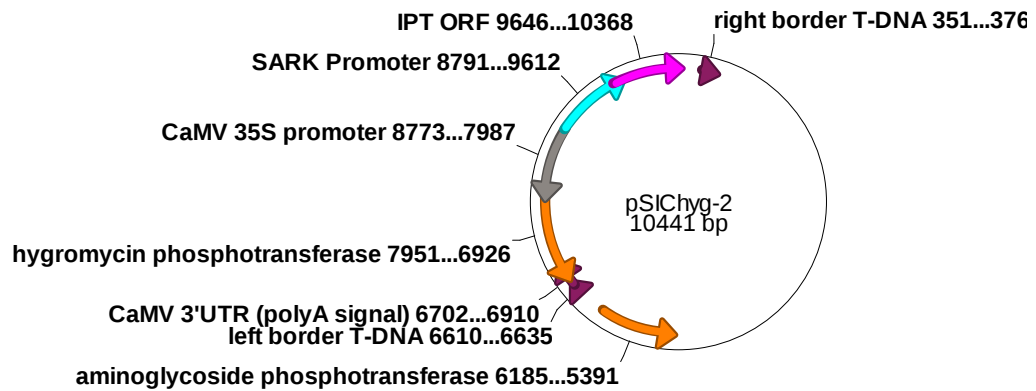
AAGCTGTTTTACTCAAATACACATCACCTTTTTAGACGGCGGGCGCTCGGTTTC
TTCAGCGGCCAAGCTGGCCGGCCAGGCCGCCAGCTTGGCATCAGACAAACCG
GCCAGGATTTTCATGCAGCCGCACGGTTGAGACGTGCGCGGGCGGCTCGAACA
CGTACCCGGCCGCGATCATCTCCGCCTCGATCTCTTCGGTAATGAAAAACGGT
TCGTCTTGGCCGTCTTGGTGCGGTTTCATGCTTGTTCCTCTTGGCGTTCATTCT
CGGCGGCCGCCAGGGCGTCGGCCTCGGTCAATGCGTCCTCACGGAAGGCACC
GCGCCGCCTGGCCTCGGTGGGCGTCACTTCCTCGCTGCGCTCAAGTGCGCGGT
ACAGGGTTCGAGCGATGCACGCCAAGCAGTGCAGCCGCCTCTTTCACGGTGCG
GCCTTCCTGGTCGATCAGCTCGCGGGCGTGCGCGATCTGTGCCGGGGTGAGG
GTAGGGCGGGGGCCAACTTCACGCCTCGGGCCTTGCGGGCCTCGCGCCCGC
TCCGGGTGCGGTGATGATTAGGGAACGCTCGAACTCGGCAATGCCGGCGAA
CACGGTCAACACCATGCGGCCGGCCGGCGTGGTGGTGTGCGCCACGGCTCT
GCCAGGCTACGCAGGCCCGCGCCGGCCTCCTGGATGCGCTCGGCAATGTCCA
GTAGGTGCGGGGTGCTGCGGGCCAGGCGGTCTAGCCTGGTCACTGTCACAAC
GTCGCCAGGGCGTAGGTGGTCAAGCATCCTGGCCAGTCCGGGCGGTGCGCG
CTGGTGCCGGTGATCTTCTCGGAAAACAGCTTGGTGACGCCGGCCGCGTGCA
GTTTCGGCCCGTTGGTTGGTCAAGTCCTGGTCGTGCGGTGCTGACGCGGGCATAG
CCCAGCAGGCCAGCGGCGGCGCTCTTGTTTCATGGCGTAATGTCTCCGGTTCTA
GTCGCAAGTATTCTACTTTATGCGACTAAAACACGCGACAAGAAAACGCCAG
GAAAAGGGCAGGGCGGCAGCCTGTGCGGTAACCTTAGGACTTGTGCGACATGT
CGTTTTCAGAAGACGGCTGCACTGAACGTCAGAAGCCGACTGCACTATAGCA
GCGGAGGGGTTGGATCAAAGTAC

TTTGATCCCGAGGGGAACCTGTGGTTGG
CATGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTTCACGCCCTTTTAAATAT
CCGTTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTG
TCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCCAAGC
TCAAGCTAAGCTTGAGCTCCAACCTTTGTATAGAAAAGTTGTCCAATCCCACAA
AAATCTGAGCTTAACAGCACAGTTGCTCCTCTCAGAGCAGAATCGGGTATTC
AACACCCCTCATATCAACTACTACGTTGTGTATAACGGTCCACATGCCGGTATA
TACGATGACTGGGGTTGTACAAAGGCGGCAACAAACGGCGTTCCCGGAGTGT
CACACAAGAAATTTGCCACTATTACAGAGGCAAGAGCAGCAGCTGACGCGTA
CACAACAAGTCAGCAAACAGACAGGTTGAACTTCATCCCCAAAGGAGAAGCT
CAACTCAAGCCCAAGAGCTTTGCTAAGGCCCTAACAAGCCCACCAAAGCAAA
AAGCCCACTGGCTCACGCTAGGAACCAAAAGGCCCAGCAGTGATCCAGCCCC
AAAAGAGATCTCCTTTGCCCGGAGATTACAATGGACGATTTCTCTATCTTT
ACGATCTAGGAAGGAAGTTTGAAGGTGAAGGTGACGACACTATGTTACCCAC
TGATAATGAGAAGGTTAGCCTCTTCAATTTTCAAGAAAGATGCTGACCCACAG
ATGGTTAGAGAGGCCTACGCAGCAGGTCTCATCAAGACGATCTACCCGAGTA
ACAATCTCCAGGAGATCAAATACCTTCCCAAGAAGGTTAAAGATGCAGTCAA
AAGATTCAGGACTAATTGCATCAAGAACACAGAGAAAGACATATTTCTCAAG
ATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCATAAACCAA
GGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAAGGTAGTTCTTACTGAATCTAA
GGCCATGCATGGAGTCTAAGATTCAAATCGAGGATCTAACAGAACTCGCCGT
GAAGACTGGCGAACAGTTTACATACAGAGTCTTTTACGACTCAATGACAAGAAG
AAAATCTTCGTCAACATGGTGGAGCACGACACTCTGGTCTACTCCAAAAATG
TCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAG
GATAATTTTCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTCA
TCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGA
TAAAGGAAAGGCTATCATTCAAGATCTCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGAT
GGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAAACCACGT
CTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACCG
ACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCAATTC

ATTGAGAGGACACCAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATGTTGGATTCT
CTAGTGTGCGAACTGCCTTCGTTATCGACATCTGATCACGCTTCTGTGGTTGC
GTTGAATCTCTTTGTTGCACTTCTTTGTGCTTGTATTGTTCTTGGTCATCTTTG
GAAGAGAATAGATGGATGAACGAATCCATCACCGCCTTGTTGATTGGGCTAG
GCACTGGTGTACCATTTTGTGATTAGTAAAGGAAAAAGCTCGCATCTTCTC
GTCTTTAGTGAAGATCTTTTCTTCATATATCTTTTGCCACCCATTATATTCAAT
GCAGGGTTTCAAGTAAAAAAGAAGCAGTTTTTCCGCAATTCGTGACTATTAT
GCTTTTTGGTGTCTTGGGACTATTATTTCTTGACAATCATATCTCTAGGTGT
AACACAGTTCTTTAAGAAGTTGGACATTGGAACCTTTGACTTGGGTGATTATC
TTGCTATTGGTGCCATATTTGCTGCAACAGATTCAGTATGTACACTGCAGGT
CTGAATCAAGACGAGACACCTTTGCTTTACAGTCTTGTATTCCGAGAGGGTGT
TGTGAATGATGCAACGTCAGTTGTGGTCTTCAACGCGATTCAGAGCTTTGATC
TCACTCACCTAAACCACGAAGCTGCTTTTCATCTTCTTGGAACCTTCTTGTATT
TGTTCTCCTAAGTACCTTGCTTGGTGCTGCAACCGGTCTGATAAGTGCGTAT
GTTATCAAGAAGCTATACTTTGGAAGGCACTCAACTGACCGAGAGGTTGCC
TTATGATGCTTATGGCGTATCTTTCTTATATGCTTGCTGAGCTTTTCGACTTGA
GCGGTATCCTCACTGTGTTTTTCTGTGGTATTGTGATGTCCCATACACATGGC
ACAATGTAACGGAGAGCTCAAGAATAACAACAAAGCATACTTTGCAACTTI
GTCATTTCTTGCGGAGACATTTATTTTCTTGTATGTTGGAATGGATGCCTTGA
CATTGACAAGTGGAGATCCGTGAGTGACACACCGGGAACATCGATCGCAGTG
AGCTCAATCCTAATGGGTCTGGTCATGGTTGGAAGAGCAGCGTTTCGTCTTTCC
GTTATCGTTTCTATCTAAGCTTAGCCAAGAAGAATCAAAGCGAGAAAAATCAAC
TTTAACATGCAGGTTGTGATTTGGTGGTCTGGTCTCATGAGAGGTGCTGTATC
TATGGCTCTTGATACACAAGTTTACAAGGGCCGGGCACACAGATGTACGC
GGGAATGCAATCATGATCACGAGTACGATAACTGTCTGTCTTTTTAGCACAGT
GGTGTGTTGGTATGCTGACCAAACCACTCATAAGCTACCTATTACCGCACCAGA
ACGCCACCACGAGCATGTTATCTGATGACAACACCCCAAATCCATACATAT
CCCTTTGTTGGACCAAGACTCGTTCATTGAGCCTTCAGGGAACCACAATGTGC
CTCGGCCTGACAGTATACGTGGCTTCTTGACACGGCCCACTCGAACCCTGCAT
TACTACTGGAGACAATTTGATGACTCCTTCATGCGACCCGTCTTTGGAGGTGC
TGGCTTTGTACCCCTTTGTCCAGGTTCTCCAAGTGAAGAGAAACCCTCCTGATC
TTAGTAAGGCTTGA

CAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGATATCCCGCGGCCATG
GCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGATCTAACTGACTAGCCGCGGCCATGCTAG
AGTCCGCAAAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATTTTCT
CCAGAATAATGTGTGAGTAGTCCCAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGG
GTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGT
AAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGTGACC
TGCAGGCATGCGACGTCG

Ek 2 pCAMBIA-SARK:IPT plazmid sekansı



CTAGCCACCACCACCACCACCACGTGTGAATTACAGGTGACCAGCTCGAATT
TCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTT
GCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGT
AATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTA
GAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGC
AACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGAA
TTAAACTATCAGTGTTTGACAGGATATATTGGCGG**GTAAACCTAAGAGAAAA**
GAGCGTTATTAGAATAACGGATATTTAAAAGGGCGTGAAAAGGTTTATCCG
TTCGTCCATTTGTATGTGCATGCCAACCACAGGGTTCCCCTCGGGATCAAAGT
ACTTTGATCCAACCCCTCCGCTGCTATAGTGCAGTCGGCTTCTGACGTTCACT
GCAGCCGTCTTCTGAAAACGACATGTCGCACAAGTCCTAAGTTACGCGACAG
GCTGCCGCCCTGCCCTTTTCCTGGCGTTTTCTTGTCGCGTGTTTTAGTCGCATA
AAGTAGAATACTTGCGACTAGAACCGGAGACATTACGCCATGAACAAGAGCG
CCGCCGCTGGCCTGCTGGGCTATGCCC GCGTCAGCACCGACGACCAGGACTT
GACCAACCAACGGGCCGAACCTGCACGCGCGCGGCTGCACCAAGCTGTTTTCC
GAGAAGATCACCGGCACCAGGCGCGACCGCCCGGAGCTGGCCAGGATGCTTG
ACCACCTACGCCCTGGCGACGTTGTGACAGTGACCAGGCTAGACCGCCTGGC
CCGCAGCACCCGCGACCTACTGGACATTGCCGAGCGCATCCAGGAGGCCGGC
GCGGGCCTGCGTAGCCTGGCAGAGCCGTGGGCCGACACCACCACGCCGGCCG
GCCGCATGGTGTGACCGTGTTTCGCCGGCATTGCCGAGTTCGAGCGTTCCCTA
ATCATCGACCGCACCCGGAGCGGGCGCGAGGCCGCCAAGGCCCGAGGCGTG
AAGTTTGGCCCCCGCCCTACCTCACCCGGCACAGATCGCGCACGCCCGCG
AGCTGATCGACCAGGAAGGCCGCACCGTGAAAAGAGGCGGCTGCACTGCTTGG
CGTGCATCGCTCGACCCTGTACCGCGCACTTGAGCGCAGCGAGGAAGTGACG
CCCACCGAGGCCAGGCGGCGCGGTGCCTTCCGTGAGGACGCATTGACCGAGG
CCGACGCCCTGGCGGCCGCGGAGAATGAACGCCAAGAGGAACAAGCATGAA
ACCGCACCAAGGACGGCCAGGACGAACCGTTTTTTCATTACCGAAGAGATCGAG
GCGGAGATGATCGCGGCCGGGTACGTGTTTCGAGCCGCCCGCGCACGTCTCAA
CCGTGCGGCTGCATGAAATCCTGGCCGGTTTGTCTGATGCCAAGCTGGCGGCC
TGGCCGGCCAGCTTGGCCGCTGAAGAAACCGAGCGCCGCCGTCTAAAAAGGT
GATGTGTATTTGAGTAAACAGCTTGCGTCATGCGGTGCGTGCATATGATG
CGATGAGTAAATAAACAATAACGCAAGGGGAACGCATGAAGGTTATCGCTGT
ACTTAACCAGAAAGGCGGGTCAGGCAAGACGACCATCGCAACCCATCTAGCC
CGCGCCCTGCAACTCGCCGGGGCCGATGTTCTGTTAGTCGATTCCGATCCCCA

GGGCAGTGCCCGCGATTGGGCGGCCGTGCGGGAAGATCAACCGCTAACCGTT
GTCGGCATCGACCGCCCGACGATTGACCGCGACGTGAAGGCCATCGGCCGGC
GCGACTTCGTAGTGATCGACGGAGCGCCCCAGGCGGCGGACTTGGCTGTGTC
CGCGATCAAGGCAGCCGACTTCGTGCTGATTCCGGTGCAGCCAAGCCCTTAC
GACATATGGGCCACCGCCGACCTGGTGGAGCTGGTTAAGCAGCGCATTGAGG
TCACGGATGGAAGGCTACAAGCGGCCTTTGTCTGTGCGGGGCGATCAAAGG
CACGCGCATCGGCGGTGAGGTTGCCGAGGCGCTGGCCGGGTACGAGCTGCCC
ATTCTTGAGTCCCGTATCACGCAGCGCGTGAGCTACCCAGGCACTGCCGCCGC
CGGCACAACCGTTCTTGAATCAGAACCCGAGGGCGACGCTGCCCGCGAGGTC
CAGGCGCTGGCCGCTGAAATTAATCAAACTCATTTGAGTTAATGAGGTAA
AGAGAAAATGAGCAAAAGCACAAACACGCTAAGTGCCGGCCGTCCGAGCGC
ACGCAGCAGCAAGGCTGCAACGTTGGCCAGCCTGGCAGACACGCCAGCCATG
AAGCGGGTCAACTTTCAGTTGCCGGCGGAGGATCACACCAAGCTGAAGATGT
ACGCGGTACGCCAAGGCAAGACCATTACCGAGCTGCTATCTGAATACATCGC
GCAGCTACCAGAGTAAATGAGCAAATGAATAAATGAGTAGATGAATTTTAGC
GGCTAAAGGAGGCGGCATGGAATAAAGCAACAACCAGGCACCGACGCCGT
GGAATGCCCCATGTGTGGAGGAACGGGCGGTTGGCCAGGCGTAAGCGGCTGG
GTTGTCTGCCGGCCCTGCAATGGCACTGGAACCCCCAAGCCCGAGGAATCGG
CGTGACGGTCGCAAACCATCCGGCCCCGGTACAAATCGGCGCGGCGCTGGGTG
ATGACCTGGTGGAGAAGTTGAAGGCCGCGCAGGCCGCCAGCGGCAACGCAT
CGAGGCAGAAGCACGCCCCGGTGAATCGTGGCAAGCGGCCGCTGATCGAATC
CGCAAAGAATCCCGGCAACCGCCGGCAGCCGGTGCGCCGTGATTAGGAAGC
CGCCCAAGGGCGACGAGCAACCAGATTTTTTCGTTCCGATGCTCTATGACGTG
GGCACCCGCGATAGTCGCAGCATCATGGACGTGGCCGTTTTCCGTCTGTGAA
GCGTGACCGACGAGCTGGCGAGGTGATCCGCTACGAGCTTCCAGACGGGCAC
GTAGAGGTTTTCCGCAGGGCCGGCCGGCATGGCCAGTGTGTGGGATTACGACC
TGGTACTGATGGCGGTTTTCCCATCTAACCGAATCCATGAACCGATAACGGGA
AGGGAAGGGAGACAAGCCCGGCCGCGTGTTCGTCCACACGTTGCGGACGTA
CTCAAGTTCTGCCGGCGAGCCGATGGCGGAAAGCAGAAAGACGACCTGGTAG
AAACCTGCATTCGGTTAAACACCACGCACGTTGCCATGCAGCGTACGAAGAA
GGCCAAGAACGGCCGCCTGGTGACGGTATCCGAGGGTGAAGCCTTGATTAGC
CGCTACAAGATCGTAAAGAGCGAAACCGGGCGGCCGGAGTACATCGAGATC
GAGCTAGCTGATTGGATGTACCGCGAGATCACAGAAGGCAAGAACCCGGAC
GTGCTGACGGTTCACCCCGATTACTTTTTGATCGATCCCGGCATCGGCCGTTT
TCTCTACCGCCTGGCACGCCGCGCCGAGGCAAGGCAGAAGCCAGATGGTTG
TTCAAGACGATCTACGAACGCAGTGGCAGCGCCGGAGAGTTCAAGAAGTTCT
GTTTCACCGTGCGCAAGCTGATCGGGTCAAATGACCTGCCGGAGTACGATTT
GAAGGAGGAGGCGGGGCGAGGCTGGCCCGATCCTAGTCATGCGCTACCGCAAC
CTGATCGAGGGCGAAGCATCCGCCGTTTCTAATGTACGGAGCAGATGCTAG
GGCAAATTGCCCTAGCAGGGGAAAAAGGTGCAAAAAGGTCTCTTTCTGTGGA
TAGCACGTACATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAACCGGAACCCGTAC
ATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAACCGGTCACACATGTAAGTGACTG
ATATAAAAGAGAAAAAAGGCGATTTTTCCGCCTAAAACTCTTTAAACTTATT
AAAACCTCTTAAACCCCGCCTGGCCTGTGCATAACTGTCTGGCCAGCGCACAG
CCGAAGAGCTGCAAAAAGCGCCTACCCTTCGGTCGCTGCGCTCCCTACGCCC
CGCCGCTTCGCGTCGGCCTATCGCGGCCGCTGGCCGCTCAAAAATGGCTGGC
CTACGGCCAGGCAATCTACCAGGGCGCGGACAAGCCGCGCCGTGCGCACTCG
ACCGCCGGCGCCACATCAAGGCACCCTGCCTCGCGCGTTTTCCGGTGATGACG
GTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTA
AGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGG
CGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTAT

ACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATAT
GCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCG
CTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGC
GAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG
GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA
CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG
AGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
TATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTT
CCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT
GGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTT
GCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGC
CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGC
CACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACA
GTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGG
TAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGT
GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGAT
CTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTT
TGGTCATGCATTCTAGGTACTAAAACAATTCATCCAGTAAAATATAATATTTT
ATTTTCTCCCAATCAGGCTTGATCCCCAGTAAGTCAAAAAATAGCTCGACATA
CTGTTCTTCCCGATATCCTCCCTGATCGACCGGACGCAGAAGGCAATGTCAT
ACCACTTGTCCGCCCTGCCGCTTCTCCCAAGATCAATAAAGCCACTTACTTTG
CCATCTTTCACAAAGATGTTGCTGTCTCCAGGTGCGCGTGGGAAAAGACAA
GTTCTCTTCGGGCTTTTCCGTCTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCGCGGATCTT
TAAATGGAGTGTCTTCTTCCAGTTTTTCGCAATCCACATCGGCCAGATCGTTA
TTCAGTAAGTAATCCAATTCGGCTAAGCGGCTGTCTAAGCTATTTCGTATAGGG
ACAATCCGATATGTCGATGGAGTGAAAGAGCCTGATGCACTCCGCATACAGC
TCGATAATCTTTTCAGGGCTTTGTTTATCTTTCATACTCTTCCGAGCAAAGGAC
GCCATCGGCCTCACTCATGAGCAGATTGCTCCAGCCATCATGCCGTTCAAAGT
GCAGGACCTTTGGAACAGGCAGCTTTCCTTCCAGCCATAGCATCATGTCTTT
TCCCGTTCCACATCATAGGTGGTCCCTTTATACCGGCTGTCCGTCATTTTTTAAA
TATAGGTTTTTCATTTTCTCCCAACAGCTTATATACCTTAGCAGGAGACATTCCT
TCCGTATCTTTTACGCAGCGGTATTTTTTCGATCAGTTTTTTCAATTCCGGTGAT
ATTCTCATTTTAGCCATTTATTATTTCTTCTCTTTTCTACAGTATTTAAAGAT
ACCCCAAGAAGCTAATTATAACAAGACGAACCTCCAATTCAGTTCCTTGCAT
TCTAAAACCTTAAATACCAGAAAACAGCTTTTTCAAAGTTGTTTTCAAAGTTG
GCGTATAACATAGTATCGACGGAGCCGATTTTGAAACCGCGGTGATCACAGG
CAGCAACGCTCTGTCATCGTTACAATCAACATGCTACCCTCCGCGAGATCATC
CGTGTTTTCAAACCCGGCAGCTTAGTTGCCGTTCTTCCGAATAGCATCGGTAAC
ATGAGCAAAGTCTGCCGCCTTACAACGGCTCTCCCGCTGACGCCGTCCCGGA
CTGATGGGCTGCCTGTATCGAGTGGTGATTTTGTGCCGAGCTGCCGGTCGGGG
AGCTGTTGGCTGGCTGGTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACA AATTGACGC
TTAGACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTAATGTACTGAATTAACGCC
GAATTAATTTCGGGGGATCTGGATTTTAGTACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTA
GAAATTTTATTGATAGAAGTATTTTACAAATACAAATACATACTAAGGGTTTC
TTATATGCTCAACACATGAGCGAAACCCTATAGGAACCCTAATTCCCTTATCT
GGGAACACTCACACATTATTATGGAGAAACTCGAGCTTGTGATCGACAGA
TCCGGTCCGCATCTACTCTATTTCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTGGGGCGTCG
GTTTCCACTATCGGCGAGTACTTCTACACAGCCATCGGTCCAGACGGCCGCGC
TTCTGCGGGCGATTTGTGTACGCCGACAGTCCCGGCTCCGGATCGGACGATT
GCGTCCGATCGACCTGCGCCCAAGCTGCATCATCGAAATTGCCGTCAACCA

AGCTCTGATAGAGTTGGTCAAGACCAATGCGGAGCATATACGCCCGGAGTCG
TGGCGATCCTGCAAGCTCCGGATGCCTCCGCTCGAAGTAGCGCGTCTGCTGCT
CCATACAAGCCAACACGGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGACCTCGTATTG
GGAATCCCCGAACATCGCCTCGCTCCAGTCAATGACCGCTGTTATGCGGCCAT
TGTCCGTCAGGACATTGTTGGAGCCGAAATCCGCGTGACGAGGTGCCGGAC
TTCGGGGCAGTCCTCGGCCCAAAGCATCAGCTCATCGAGAGCCTGCGCGACG
GACGCACTGACGGTGTCTCCATCACAGTTTGCCAGTGATACACATGGGGAT
CAGCAATCGCGCATATGAAATCACGCCATGTAGTGTATTGACCGATTCCCTTGC
GGTCCGAATGGGCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGATCGGCCGCAGCGATCG
CATCCATAGCCTCCGCGACCGGTTGTAGAACAGCGGGCAGTTCCGTTTTCAGG
CAGGTCTTGCAACGTGACACCCTGTGCACGGCGGGAGATGCAATAGGTCAGG
CTCTCGCTAAACTCCCCAATGTCAAGCACTTCCGGAATCGGGAGCGCGGCCG
ATGCAAAGTGCCGATAAACATAACGATCTTTGTAGAAAACCATCGGCGCAGCT
ATTTACCCGCAGGACATATCCACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAAGCACGA
GATTCTTCGCCCTCCGAGAGCTGCATCAGGTCCGAGACGCTGTCTGAACTTTTC
GATCAGAACTTCTCGACAGACGTCGCGGTGAGTTCAGGCTTTTTTCATATCTC
ATTGCCCCCGGGATCTGCGAAAGCTCGAGAGAGATAGATTTGTAGAGAGAG
ACTGGTGATTTTCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAG
GAAGGTCTTGCGAAGGATAGTGGGATTGTGCGTCATCCCTTACGTCAGTGGA
GATATCACATCAATCCACTTGCTTTGAAGACGTGGTTGGAACGTCTTCTTTTT
CCACGATGCTCCTCGTGGGTGGGGGTCCATCTTTGGGACCACTGTCTGGCAGA
GGCATCTTGAACGATAGCCTTTTCTTTATCGCAATGATGGCATTGTAGGTGC
CACCTTCTTTTTCTACTGTCTTTTGATGAAGTGACAGATAGCTGGGCAATGG
AATCCGAGGAGGTTTCCCGATATTACCCTTTGTTGAAAAGTCTCAATAGCCCT
TTGGTCTTCTGAGACTGTATCTTTGATATTCTTGGAGTAGACGAGAGTGTCTG
GCTCCACCATGTTATCACATCAATCCACTTGCTTTGAAGACGTGGTTGGAACG
TCTTCTTTTTCCACGATGCTCCTCGTGGGTGGGGGTCCATCTTTGGGACCACTG
TCGGCAGAGGCATCTTGAACGATAGCCTTTTCTTTATCGCAATGATGGCATT
GTAGGTGCCACCTTCTTTTTCTACTGTCTTTTGATGAAGTGACAGATAGCTG
GGCAATGGAATCCGAGGAGGTTTCCCGATATTACCCTTTGTTGAAAAGTCTCA
ATAGCCCTTTGGTCTTCTGAGACTGTATCTTTGATATTCTTGGAGTAGACGAG
AGTGTCTGTCTCCACCATGTTGGGCCCGGCGCGCCGAATTC**TTCTTCTTAGA**
TGCTGTCACAATCATTTTCATTATTTTTATATTTGGTTTTACTGCACAAGTGAC
ATAATGAGTGCTGAATTGTGGTATTGTGGGAACCTTAAGCAATAGTTTCATTA
GACCACTTGTGCAGGTTTTTGGGGTGGTAGAAGGAATGCTCGTTGTCTCTGAA
TGAGTTCTATTTTCATCTTTAGAACTAGTAATTTAGTTAGTTTGGGTCTCGT
GGTTCTACAGAGGGTTGAGATACTTTTGAAGTATCTCTCTTTTATTATATTATA
CTTTTTGCTGATAAAAAAAGGTAGGTAGTTTTTTTTTGAATATTTTGTAGGAT
TTTGTGGAGGTGTTTGGTATAAGGATTGAAATATTTCAAAAATATTTCCATTT
AATTTACTTTTTCTTATAAAAAAAATCCTCCATGAAACAAGATCATCTTCTAG
AAACAACAAGTAATATATTAGAATCTCTTTCTGAATTTTCTCATTTGTGAGTT
ATAGTACTTTTTTCCAATAATAATTATAAGTGGTAAGATGTGTGGTTGTGGA
AGTTGGAAGGAAAGAAGGAAAGAAAGGTTAGTTTTTGTTTGTATTTGAAAG
TAAGTCAAGGTCATTGGCTTAGGGTTCTACCACTGCAACTATTCCACATTGGC
TTCTACCACTGCAATTATTCCACATTGGCTTGACTGTAAGGACAAACCTTGG
CATGTCAAATACTTTTCATCACATATAACCATATTATAAACTACTTTCCATCTC
CATTATTCATCCACCAAAATCTAGAGTCACTGAGAGTGCAGATAACACAATT
CTCTAATATAAAAATCAGTTTGTATTCAATATACTGCAAAAAAATTATGGACC****
TGCATCTAATTTTCGGTCCAACCTTGACAGGAAAGACGACGACCGCGATAGC
TCTTGCCAGCAGACAGGGCTTCAGTCCTTTCGCTTGATCGGGTCCAATGCT
GTCTCAACTATCAACCGGAAGCGGACGACCAACAGTGGAAGAACTGAAAG

GAACGACGCGTCTCTACCTTGATGATCGGCCTCTGGTGGAGGGTATCATCGCA
GCCAAGCAAGCTCATCATAGGCTGATCGAGGAGGTGTATAATCATGAGGCCA
ACGGCGGGCTTATTCTTGAGGGAGGATCCACCTCGTTGCTCAACTGCATGGCG
CGAAACAGCTATTGGAGTGCAGATTTTCGTTGGCATATTATTGCCACAAGTT
ACCCGACCAAGAGACCTTCATGAAAGCGGCCAAGGCCAGAGTTAAGCAGAT
GTTGCACCCCGCTGCAGGCCATTCTATTATTCAAGAGTTGGTTTATCTTTGGA
ATGAACCTCGGCTGAGGCCCATTCGAAAGAGATCGATGGATATCGATATGC
CATGTTGTTTGCTAGCCAGAACCAGATCACGGCAGATATGCTATTGCAGCTTG
ACGCAAATATGGAAGGTAAGTTGATTAATGGGATCGCTCAGGAGTATTTTCAT
CCATGCGCGCCAACAGGAACAGAAATTCCCCCAAGTTAACGCAGCCGCTTTC
GACGGATTCTGAAGGTCATCCGTTCCGAATGTATTAGGTTACGCCAGCCCTGC
GTCGCACCTGTCTTCATCTGGATAAGATGTTTCAGATCAGATCTGACTAGTGTT
AACG



Ek 3 *NHX1* Primerler (Sarı: forward primer, Yeşil: reverse primer)

Forward Primer: Tm:57, %40 GC, Length:25

Reverse Primer: Tm:57, %36 GC, Length:28

ATGTTGGATTCTCT**AGTGTGCGAAACTGCCTTCGT**TATCGACATCTGATCACGC
TTCTGTGGTTGCGTTGAATCTCTTTGTTGCACTTCTTTGTGCTTGTATTGTTCTT
GGTCATCTTTTGAAGAGAATAGATGGATGAACGAATCCATCACCGCCTTGTT
GATTGGGCTAGGCACTGGTGTTACCATTTTGTGATTAGTAAAGGAAAAAGCT
CGCATCTTCTCGTCTTTAGTGAAGATCTTTTCTTCATATATCTTTTGCCACCCA
TTATATTCAATGCAGGGTTTCAAGTAAAAAAGAAGCAGTTTTTCCGCAATTC
GTGACTATTATGCTTTTTGGTGCTGTTGGGACTATTATTTCTTGACAATCATA
TCTCTAGGTGTAACACAGTTCTTTAAGAAGTTGGACATTGGAACCTTTGACTT
GGGTGATTATCTTGCTATTGGTGCCATATTTGCTGCAACAGATTCAGTATGTA
CACTGCAGGTTCTGAATCAAGACGAGACACCTTTGCTTTACAGTCTTGTATTC
GGAGAGGGTGTTGTGAATGATGCAACGTCAGTTGTGGTCTTCAACGCGATT
AGAGCTTTGATCTCACTCACCTAAACCACGAAGCTGCTTTTCATCTTCTTGGA
AACTTCTTGTATTGTTTCTCCTAAGTACCTTGCTTGGTGCTGCAACCGGTCTG
ATAAGTGCCTA**TGTTATCAAGAAGCTATACTTTGGAAGG**

Ek 4 IPT primerler (Sarı: forward primer, Yeşil: reverse primer)

Forward Primer: Tm:55, %41GC, length:22

Reverse Primer: Tm:56, %43 GC, length:23

ATGGACCTGCATCTAATTTTCGGTCCAACCTTGACAGGAAAGACGACGACCG
CGATAGCTCTTGCCCAGCAGACAGGGCTTCCAGTCCTTTCGCTTGATCGGGTC
CAATGCTGTCCTCAACTATCAACCGGAAGCGGACGACCAACAGTGGAAGAAC
TGAAAGGAACGACGCGTCTCTACCTTGATGATCGGCCTCTGGTGGAGGGTAT
CATCGCAGCCAAGCAAGCTCATCATAGGCTGATCGAGGAGGTGTATAATCAT
GAGGCCAACGGCGGGCTTATTCTTGAGGGAGGATCCACCTCGTTGCTCAACT
GCATGGCGCGAAACAGCTATTGGAGTGCAGATTTTCGTTGGCATATTATTCGC
CACAAGTTACCCGACCAAGAGACCTTCATGAAAGCGGCCAAGGCCAGAGTTA
AGCAGATGTTGCACCCCGCTGCAGGCCATTCTATTATTCAAGAGTTGGTTTAT
CTTTGGAATGAACCTCGGCTGAGGCCATTCTGAAAGAGATCGATGGATATC
GATATGCCATGTTGTTTGCTAGCCAGAACCAGATCACGGCAGATATGCTATTG
CAGCTTGACGCAAATATGGAAGGTAAGTTGATTAATGGGATCGCTCAGGAGT
ATTCATCCATGCGCGCCAACAGGAACAGAAATTCCCCAAGTTAACGCAGC
CGCTTTCGACGGATTCGAAGGT CATCCGTTTCGGAATGTATTAGGT