

Yarı Katı ve Çift Fazlı Besin Ortamlarında Biotin ve Askorbik Asit Uygulamalarının
Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yöntemiyle Haploid Embriyo Oluşumuna
Etkileri

Burcu Demirkaya

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Ekim 2020

Effects of Biotin and Ascorbic Acid Applications in Semisolid and Double Layer Nutrient Media on Haploid Embryo Induction by Anther Culture in Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Burcu Demirkaya

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Horticulture

October 2020

Yarı Katı ve Çift Fazlı Besin Ortamlarında Biotin ve Askorbik Asit Uygulamalarının
Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yöntemiyle Haploid Embriyo Oluşumuna
Etkileri

Burcu Demirkaya

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında
Sebze Yetiştirme ve Islahı Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Nuray Çömlekçioğlu

Ekim 2020

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Nuray Çömlekçioğlu danışmanlığında hazırlamış olduğum “Yarı Katı ve Çift Fazlı Besin Ortamlarında Biotin ve Askorbik Asit Uygulamalarının Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yöntemiyle Haploid Embriyo Oluşumuna Etkileri” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

30/10/2020

Burcu Demirkaya

İmza

ÖZET

Tarımsal alanların genişletilmesinin zor olduğu günümüzde, yüksek verimli, üretim maliyetleri düşük ve yüksek kaliteli yeni çeşitlerin ıslah edilmesi, insanların sağlıklı ve dengeli beslenmesi yönünden büyük önem taşımaktadır. Günümüzde doku kültürü tekniklerinden, bitki ıslah süresini kısaltmak ve daha kalıcı sonuçlar elde etmek için yararlanılmaktadır. Sebze ıslahında süreyi kısalttığı için haploidi tekniği geniş uygulama alanına sahiptir.

Bu çalışmada, biber de anter kültürü yönteminde kullanılan yarı katı ve çift fazlı besin ortamlarına biotin ve askorbik asit ilave edilmesinin haploid embriyo elde edilmesine etkileri çalışılmıştır. Bu araştırmada Diyar F₁ kapyra biber çeşidi kullanılmıştır. Her bir kültür kabına, iki çiçek tomurcuğundan elde edilen 10 anter dikilmiştir. 0,05 mg l⁻¹ biyotin ve 0,5 mg l⁻¹ askorbik asit yarı katı ve çift fazlı ortamlarda ayrı ayrı ve birlikte kullanılmıştır. Çalışma, 5 tekerrürlü ve her tekerrürde 5 kültür kabı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen veriler, varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yarı katı besin ortamına biyotin ve askorbik asitin birlikte ilave edilmesiyle en yüksek sayıda embriyo elde edilmiştir. Biotin ve askorbik asitin besin ortamına ayrı ayrı ilave edilmesi durumunda da, kontrole göre daha yüksek sayıda embriyo oluşumu belirlenmiştir. Elde edilen embriyo sayıları kontrol uygulamasına göre biyotin ve askorbik asitin birlikte kullanıldığı ortamlarda 7,8 kat, yalnız biyotinin kullanıldığı ortamda 0,44 kat, sadece askorbik asitin kullanıldığı ortamda 0,22 kat artış sağlamıştır. Yarı katı ortam çift fazlı ortamdaki daha başarılı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Capsicum annuum* L., anter kültürü, haploidi, androgenesis

SUMMARY

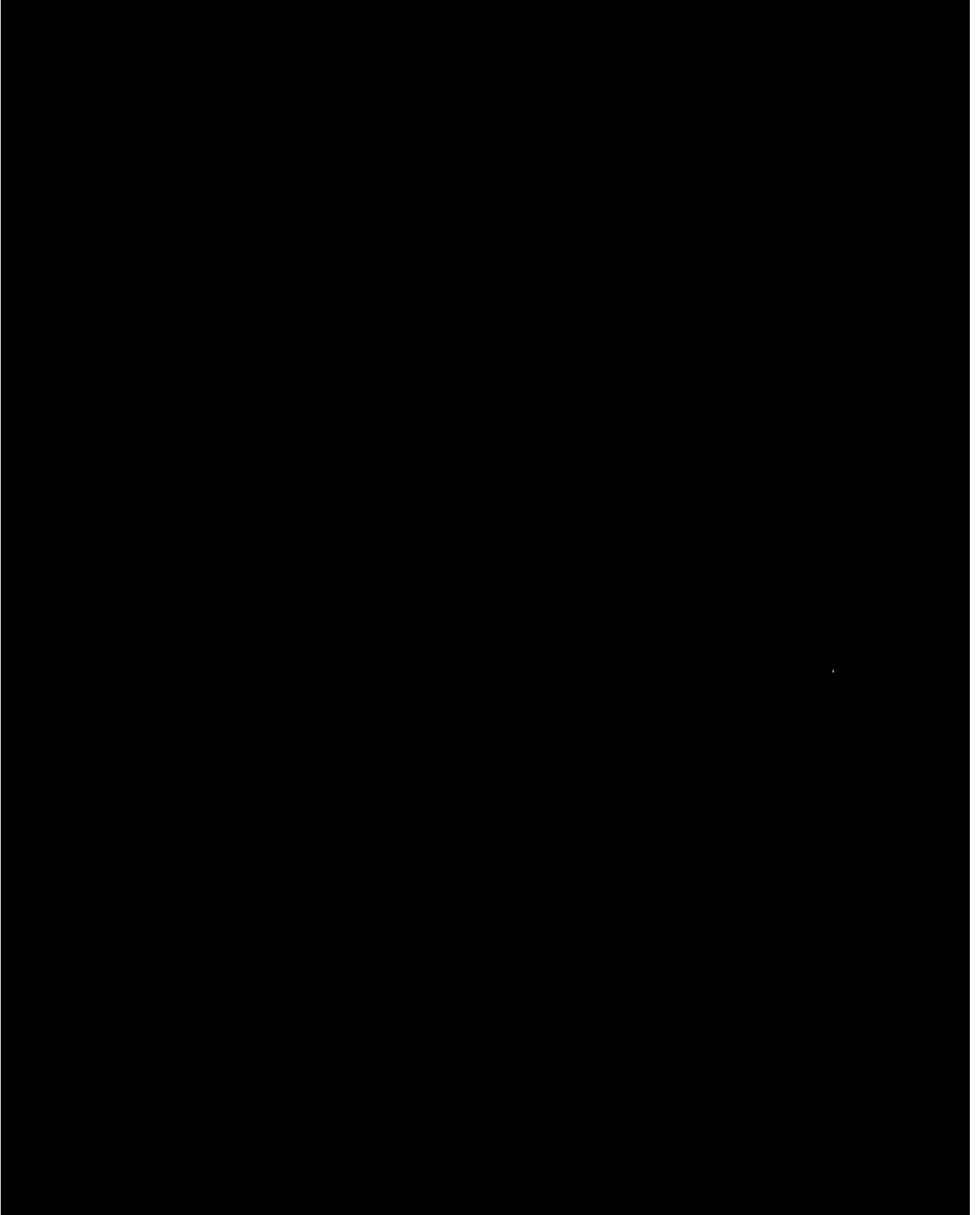
Since it is difficult to expand agricultural areas, breeding new varieties with high productivity, low production costs and high quality have great importance in terms of healthy and balanced diet of people. The development of new varieties is very labor-intensive and time-consuming. Haploid technique has wide application area in vegetable breeding because it shortens the breeding process.

In this study, the effects of addition of biotin and ascorbic acid in semi-solid and double-layer nutrient media on haploid embryo induction were investigated via anther culture of pepper. Diyar F₁ hybrid capia pepper variety was used as the plant material 0,05 mg l⁻¹ biotin and 0,5 mg l⁻¹ ascorbic acid were used separately and together in semi-solid and double-layer media. Ten anthers obtained from two flower buds were planted in each culture dish. The study was carried out using 5 repeating and 5 culture dishes per repeat.

Data were subjected to analysis of variance and means were separated by Duncan test. The highest number of embryo was obtained from semi solid medium containing biotin and ascorbic acid together. When biotin and ascorbic acid are added to the medium separately, a higher number of embryo formations were determined compared to the control. The number of embryos obtained increased 7,8 times in medium where biotin and ascorbic acid were used together, 0,44 times in the medium where only biotin was used, and 0,22 times in the medium where only ascorbic acid was used compared to control treatment. Semi-solid media was found to be more successful than double-layer media.

Keywords: *Capsicum annuum* L, anther culture, haploid, androgenesis

TEŞEKKÜR



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	6
2.1. Donör Bitki Genotipi	6
2.2. Donör Bitkinin Yetiştirilme Koşulları	10
2.3. Anterlerin Gelişme Dönemi	13
2.4. Anterlere Yapılan Ön Uygulamalar	15
2.5. Besin Ortamının Bileşimi ve Yapısı	19
2.6. İnkübasyon Koşulları	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal	29
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi.....	29
3.2.2. Çiçek tomurcuklarının toplanması	31
3.2.3. Çiçek tomurcuğunun dezenfeksiyonu	33
3.2.4. Besin ortamlarının hazırlanması.....	34
3.2.5. Besin ortamları	35
3.2.6. Besin ortamı sterilizasyonu ve anterlerin besin ortamına dikimi	36
3.2.7. Kültüre alınan anterlere stres uygulanması ve inkübasyonu.....	37
3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi	39

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1. Besin Ortamlarından Elde Edilen Haploid Embriyo Sayıları	40
4.2. Besin Ortamlarından Tomurcuk Başına Elde Edilen Embriyo Sayısı	45
4.3. Besin Ortamlarından 100 Anter Başına Düşen Embriyo Sayısı	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	54



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3. 1. Donör Bitki Fidelerinin Saksılara Dikilmesi.....	30
3. 2. Serada Yetiştirilen Donör Bitkiler.....	30
3. 3. Serada Yetiştirilen Bitkilerin Örtülmesi.....	31
3. 4. Anter Kültürü İçin Elverişli Olan Tomurcuk Görüntüsü.....	32
3. 5. Çiçek Tomurcuklarının Toplanması	32
3. 6. Bitkilerden Toplanan Tomurcuklar	33
3. 7. Çiçek Tomurcuğu Dezenfeksiyonu	33
3. 8. Besin Ortamının Hazırlanması ve Petri Kaplarına Aktarılması.....	34
3. 9. Çift Fazlı Ortam İçin Kavanozlara Aktarılmış Ortamlar.....	34
3. 10. Anterlerin Bistüri Yardımıyla Ayrılması.....	36
3. 11. Anterlerin Besin Ortamına Dikimi.....	37
3. 12. Anterlerin Petri Kabındaki Görüntüsü.....	37
3. 13. Anterlere Etüvde 35 °C ve Karanlık Koşullarda Sıcaklık Şoku Uygulaması.....	38
3. 14. İklim Odasında Fotoperiyodik Koşullarda Gelişmekte Olan Anterler.....	39
4. 1. Gelişim Gösteren M3 Ortamındaki Embriyo Görüntüleri.....	43
4. 2. Biotin ve Askorbik Asitin Birlikte Kullanıldığı Ortamlardan Elde Edilen Bazı Embriyolar.....	44
4. 3. Farklı Besin Ortamlarında Elde Edilen Gelişmekte Olan Embriyolar.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge

Sayfa

3. 1. Anter Kültürü Çalışmasında Kullanılan Besin Ortamları ve İçerikleri.....	35
4. 1. Ortamlardan Elde Edilen Embriyo Sayılarının Varyans Analiz Tablosu.....	40
4. 2. Ortamlara Göre Elde Edilen Toplam Embriyo Sayıları.....	42
4. 3. Tomurcuk Başına Embriyo Sayısı Varyans Analiz Tablosu	46
4. 4. Tomurcuk Başına Embriyo Sayısı.....	47
4. 5. Yüz Anterden Elde Edilen Embriyo Sayısı Varyans Analiz Tablosu	49
4. 6. Ortamdaki Anterlerden Elde Edilen Embriyo Sayıları	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler **Açıklama**

%	Yüzde
°C	Derece santigrat
mg l ⁻¹	Miligram/litre
g l ⁻¹	Gram/litre
dk	Dakika
ml	Mililitre
mg	Miligram
µM	Mikrometre

Kısaltmalar **Açıklama**

2,4 D	2,4-diklorafenoksiasetik asit
CP	Dumas de Valux vd.,(1981) ilk kültür ortamı
N	Nitch (1969) besin ortamı
NN	Nitsch ve Nitsch (1969) besin ortamı
IAA	Indole-3-asetik asit
NAA	Naftalin asetik asit
DH	Doubled haploid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
AgNO ₃	Gümüş nitrat
CO ₂	Karbondioksit
BAP	Benzil amino pürin
B5	Gamborg vd (1968) besin ortamı
KOH	Potasyum hidroksit
BA	Benzil adenine
HCl	Hidroklorik asit
MS	Murashige ve Skoog (1962) besin ortamı
NLN	Sıvı N ve N Ortamı
LS	Linsmaer ve Skoog (1965) besin ortamı
R	Dumas de Vaulx rejenerasyon ortam

1. GİRİŞ

Yaşamakta olduğumuz dünya nüfusu günümüzde yaklaşık 7,8 milyar (Anonim, 2020) olup 2030'lu yıllarda 9 milyara kadar çıkması beklenmektedir. Şu anda yapılan tarımsal üretimin bu kadar yüksek miktardaki nüfusu besleyebilmesi için iki katına çıkması gerekmektedir. Tarımsal üretimin arttırılması ise farklı yöntemlerin birarada kullanılmasını ile olmaktadır. Bu yöntemler; üretim yapılabilecek yeni araziler oluşturma ve değişik üretim metotları geliştirerek birim alanda tarımsal üretimin arttırılması şeklindedir (Babaoğlu vd., 2002).

Birim alandan verimi artırmanın en önemli yolu da yüksek verimli yeni çeşitlerin geliştirilmesidir. Klasik ıslah yöntemleri ile yeni çeşitlerin geliştirilmesi konusunda pek çok çalışma yapılmakla birlikte, yeni hibrit çeşitlerin geliştirilmesi oldukça uzun zaman almaktadır. Gerek klasik ıslah yöntemlerinde ıslah süresini kısaltmak, gerekse klasik ıslah yöntemlerine ıslah materyali sağlamak için çeşitli *in vitro* yöntemlerden yararlanılmaktadır (Taşkın, 2005). Günümüzde klasik ıslah yöntemleri için gerekli olan süreyi kısaltmak ve daha kalıcı sonuçlar elde etmek için doku kültürü tekniklerinden faydalanılmaktadır (Heiser, 1976; Andrews, 1985).

Schwann ve Schleiden 1800'lü yılların ikinci çeyreğinde yaptıkları çalışmalarıyla totipotens teorisini geliştirmiş ve bitki biyoteknolojisi açısından bu büyük bir ışık olmuştur. Bu teoriye göre, tek bir hücreden aynı özelliklere sahip yeni hücreler gelişebileceği ve bu sebeple de hücrelerin otonom üniteler oldukları belirtilmiştir. Dolayısıyla da yeni bitkilerin bu yöntemle geliştirilebileceği düşünülmüştür. Yapılan laboratuvar çalışmalarında, bu düşünce gerçekleştirilemediği için pek kabul görmemiştir. Bitki materyali ve/veya besi ortamının yanlış veya eksik seçilmesi, laboratuvar çalışmalarında ortaya çıkan başarısızlığın nedeni olarak kabul edilmiş ve bu eksiklikler ortadan kalkınca totipotens teorisi doğrulanabilmiştir (Babaoğlu vd., 2002).

Yapay besin ortamında, bitki hücre, doku ve organlarından, çeşitli yöntemler kullanarak steril koşullarda yeni hücre, doku, organ veya bitki üretilmesine doku kültürü adı verilmektedir. Yeni çeşit geliştirme veya var olan çeşitlerde genetik çeşitlilik sağlamak bitki

doku kültürünün temel amacıdır. Doku kültürlerinde çevre koşullarından etkilenilmediği için bitki çoğaltımı daha kolay ve kısa sürelidir. Genetik seleksiyonlar, bu şekilde daha kısa sürede yapılmaktadır. Mayoz bölünme geçirmiş gamet hücreleri kullanılarak, haploid hücre kültürüyle genetik iyileştirme de yapılabilir. Hastalıksız olarak yetiştirilemeyen bitkiler için bitkilerin meristemleri kullanılarak hastalıksız ve sağlam bitkiler elde edilir. Üstün özelliklere sahip bitki çeşitleri elde edilmesi ile birlikte kaybolmakta olan ve değerli türlerin korunmasında ve çoğaltılmasında da doku kültürü teknikleri kullanılmaktadır (Babaoğlu vd., 2002).

Bitki ıslahında haploid bitkiler önemli bir potansiyele sahiptir. Haploidler, her bir lokustaki allellerden sadece bir seriyi içerdikleri için ıslah çalışmalarında önemli yer tutmaktadır. Homolog kromozomlardan sadece bir takımını içerdiği için resesif mutasyonların açığa çıkartılmasını da haploid bitkiler sağlar. Haploid bitkiler elde edildikten sonra, kromozom sayılarının katlanması sayesinde %100 homozigot saf hatlar elde edilmektedir. Diploid hatların kullanılmasıyla ıslah çalışmaları ve genetik çalışmaları kolaylaşmakta, bu şekilde sonuca çabuk ulaşılabilir. Klasik ıslah yöntemlerini kısaltmak için doku kültürü teknikleri arasında haploidi tekniği, sebze ıslahında geniş uygulama alanı bulmuştur. Homozigot saf hatların daha kısa sürede elde edilmesinde ve yetiştiriciliği yapılan karışık çeşitlerin kısa sürede saflaştırılabilmesinde dihaploidizasyon tekniği önemli avantaj sağlayarak, ıslah çalışmalarında ve çeşit geliştirme çalışmalarında kullanılmıştır. Homozigot hatlar arasındaki üstün kombinasyon yeteneği verenlerin belirlenmesi yöntemi, F₁ hibrit çeşitlerinin geliştirilmesinde önemli olduğundan haploidinin bu konuda da önemi bulunmaktadır. F₁ hibrit çeşit ıslahında, ebeveyn olarak dihaploid teknolojisinden elde edilen bitkiler saf hatlar olarak kullanılmaktadır (Ellialtıoğlu vd., 2001; Kaplan, 2012).

Haploid bitkiler patojenlere karşı *in vitro* seviyede seçime olanak verdikleri için hastalıklara karşı dayanıklılık çalışmalarında da yer zaman ve maddi kazanç sağlamaktadırlar. Klasik ıslah yöntemlerini kısaltmak için doku kültürü teknikleri arasında haploidi tekniği, sebze ıslahında geniş uygulama alanı bulmuştur. Haploid bitkiler; diploidlere göre morfolojik olarak daha küçük yapıdadırlar. Normal bitkilerde bulunan tüm organlara sahip olmalarına rağmen, hücreleri daha küçük olduğu için yaprakları daha dar ve küçük, bitkilerin boyları daha kısadır. Haploidlerin çiçekleri de diploidlere oranla daha

küçüktür. Bu bitkiler gamet oluşturmamaları için kısırdırlar ve tohum oluşturmazlar. Hücreleri de taşıdıkları kromozom sayısı bakımından indirgenmiş gamet yapısı gösteren bitkilerdir (Reinert ve Bajaj, 2013).

F₁ kademesindeki melez bitkilerden haploid elde ederek farklı genotiplerde bulunan ve tek bir genotipte toplanmasını arzu ettiğimiz özelliklere sahip bitkiler kazanmamız kombinasyon ıslahında haploidi sayesinde mümkündür. Somatik hibridizasyon işleminin diploid protoplastlara göre daha kolay yapılabilmesine haploid bitkiler olanak sağlamaktadır. Protoplast kültürü yöntemiyle yapılan somatik hibridizasyon tekniğinin dezavantajları da iki haploid protoplastın birleşimi sonucunda ‘diploid’ olacağından ortadan kalkmış olacaktır (Kaplan, 2012).

Embriyonun yalnızca erkek gametten meydana gelmesine androgenesis adı verilir. *In vitro*’da androgenesis yöntemi ile haploid bitki elde edilmesinde anter ve mikrospor kültürü yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Erkek gameti oluşturacak olan polen hücresinin gelişimini belirli bir aşamada durdurarak polen hücresinin direkt olarak embriyo oluşturmaya zorlanmasıdır. Bir anter içerisinde binlerce mikrospor bulunur ve bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilebileceği için diğer *in vitro* haploid bitki elde etme yöntemlerine göre daha avantajlı bir tekniktir (Ellialtıoğlu vd., 2001).

Haploidi ile ilgili ilk önemli gelişme, Guha ve Maheshwari tarafından *Datura innoxia* bitkisinin anter kültürü çalışmalarında sağlanmıştır. Söz konusu çalışmadaki birçok kültürde embriyo gözlenmiş ve bu embriyoların haploid kromozom sayıları içerdikleri kanıtlanmıştır (Guha ve Maheshwari, 1966).

Capsicum cinsinde androgenik embriyogenesis ilk kez *Capsicum annuum*’da Wang vd. (1973) tarafından, daha sonra da *Capsicum frutescens*’de Novak (1974) tarafından rapor edilmiştir. Bu ilk sonuçlar da kültüre alınan anter sayısına oranla elde edilen haploid bitki sayısının çok düşük olduğu dikkati çekmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda, kültür koşullarının ve elde edilen haploid bitki oranının arttırılmasına çalışılmıştır.

Haploid bitkilerin elde edilmesinde anter kültürü tekniği, yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir. Normal olarak erkek gameti oluşturacak olan polen hücresinin

gelişimini durdurmak ve somatik hücrelerde de olduğu gibi polen hücresini direkt olarak embriyo oluşturmaya zorlamak anter kültürünün temel amacıdır (Taşkın, 2005). Anter kültürü tekniği hibrit çeşit üretiminde saf hatların elde edilmesinde klasik ıslah yöntemlerine göre daha hızlı sonuç vermekte ve önemli avantajlar sağlamaktadır (Tıpırdamaz ve Ellialtıoğlu, 1998; Germana, 2011; Başay ve Ellialtıoğlu, 2013).

Anter kültürü homozigot hatların elde edilmesinde, önemli bir metottur. Fakat haploid embriyoların bitkiye dönüşüm sıklığı çoğu türde düşüktür (Kristiansen ve Andersen, 1993; Çömlekçioğlu, 2001).

İlk kez ülkemizde Abak (1983), tarafından başlatılan anter kültürü çalışmaları, yerli biber (*Capsicum annuum* L.) genotipleri üzerinde halen sürdürülmektedir (Ercan vd., 2001; Tıpırdamaz ve Ellialtıoğlu, 2002; Ercan ve Biner, 2002; Çiner ve Tıpırdamaz, 2002). *Capsicum* cinsinde androgenik embriyogenesis çalışmalarının başlangıcında kültüre alınan anter sayısına oranla elde edilen haploid bitki sayısının çok düşük olduğu dikkati çekmiştir. Biberde dihaploid hatların elde edilmesinde anter kültürü yöntemi çok uzun zamandır kullanılmaktadır ve bu alanda başarı oranını artırılmaya yönelik araştırmalar geniş kapsamlı şekilde devam etmektedir. Anter kültürü için uygun başlangıç materyali, henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitoz aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterlerdir (Ellialtıoğlu vd., 2001).

Biberin anavatanı, Orta ve Güney Amerika olarak bilinmektedir. Biberin geniş bir çeşitlilik gösterdiği yer olan Meksika ve Orta Amerika, birincil gen merkezi olarak kabul edilmektedir. Afrika, Asya, Güney ve Orta Avrupa ile Latin Amerika'nın bazı kesimleri ise ikincil gen merkezi olarak bilinmektedir. 16. yy'a kadar biber, Avrupa'da bilinmemektedir. Biber 1493 yılında Amerika'nın keşfinden sonra Portekiz'e ve İspanya'ya getirilmiş, 16. yy'ın ortalarında da Orta ve Kuzey Avrupa'ya yayılmıştır (Greenleaf, 1986). Biber meyvelerinin yüksek miktarda kuru madde, C vitamini, B vitamini kompleksi, mineral, esans, karoten benzeri içeriklere sahip olması sebebiyle, dünyanın pek çok yerinde önemli ticari ve biyolojik değere sahip bir sebzedir (Irikova vd., 2011).

Bitki ıslahçıları verimi arttırmak, bitkinin kalite özelliklerini iyileştirmek, bitkinin adaptasyon yeteneklerini geliştirmek için haploid embriyolar elde ederek daha dayanıklı

bitkiler elde etmeyi amaçlamışlardır. Biberin geleneksel yöntemlerle zahmetli ve uzun sürelerde ıslah edilmesi sorununu *In vitro* yöntemlerle haploid bitkiler elde ederek, biber ıslahında karşılaşılan problemlerin üstesinden gelinebileceği düşünülmektedir (Irikova vd., 2011).

Bu çalışmanın amacı, biberde anter kültürü yöntemiyle haploid embriyoların elde edilmesinde besin ortamının yapısı ve bileşiminin etkilerini belirlemektir. Haploid embriyo elde etmek için anter kültürü yönteminde yarı katı ve çift fazlı besin ortamlarına biotin ve askorbik asit ilave edilmesinin etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Biberde ilk haploid bitki Asya orijinli çeşitlerde anter kültürü ile elde edilmiştir. Ancak, yapılan çalışmalarda haploid bitki sayısı çok düşük olmakla birlikte, bitkiler kallus safhasından rejenere olmuşlardır (George ve Narayanaswamy 1973; Kuo vd. 1973; Wang vd. 1973; Segui-Simarro vd. 2011). Sibi vd. (1979) iki aşamalı başarılı bir anter kültürü protokolü geliştirmiş ve bu protokol daha sonra Dumas de Vaulx vd. (1981) tarafından daha uygun hale getirilmiştir.

Anter kültüründe başarı: besin ortamı, genotip, donör bitkinin yetiştirme koşulları, büyüme düzenleyiciler, stres faktörleri, ön uygulamalar, inkübasyon koşulları ve anter alım zamanı gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Çömlekçioğlu ve Ellialtıoğlu, 2018).

2.1. Donör Bitki Genotipi

Anter kültüründe anter verici genotip, başarıda çok önemli bir yere sahiptir. Çalışılan tüm bitki türlerinde; aynı kültür koşulları altında, genotip farklılıklarından kaynaklı anter yanıtları bakımından büyük değişiklikler bulunmuştur.

Bajaj (1990), anter kültüründe başarının birçok şartlara bağlı olduğunu bildirmiş ve bu şartların genotip, donör bitkinin yetiştirme koşulları, anter ve çiçek tomurcuğuna yapılan ön uygulamalar, mikrospor gelişme safhası ve inkübasyon koşulları gibi şartlar olduğunu tespit etmiştir.

Herhangi bir genotipten yüksek oranda haploid embriyo elde etmek için kültür koşullarını her genotip için ayrı ayrı optimize etmeli ve anter kültüründe embriyo oluşturma başarısı yüksek olan genotiplerle embriyo oluşturma kapasitesi düşük olan genotipleri melezlemek gerekir. Nitsch ve Nitsch (1969), 12 tütün türünden 5 tanesinin; Gresshof ve Doy (1972) 18 farklı *Arabidopsis* hattından 3 tanesinin, Irikura (1975), 118 farklı *Solanum* genotipi içerisinde sadece 19'unun polen embriyogenesi meydana getirdiğini belirtmektedir.

Karakullukçu (1991), değişik patlıcan genotiplerinde haploid bitki elde etme üzerinde anter kültürü yöntemini kullanarak araştırmalar yapmıştır. Patlıcanda androgenesis olayının genotiple yakın bir ilişki içinde olduğunu görmüştür. Denemelerde yer alan çeşitler içerisinde Halep Karası ve Baluroi F₁ çeşitlerinden haploid bitki elde etmiş, Prelane F₁ ve Kemer çeşitlerinde de embriyolar oluştuğunu görmüş, ancak bitkiye dönüşümünün gerçekleşmediğini gözlemlemiştir. Diğer çeşitlerden (Dourga, Pala, Adana Topağı, Şeytan, Black Beauty, Marfa F₁, Fabina F₁, Galine F₁) haploid embriyo veya bitki elde edilemediğini bildirmiştir. Haploid bitkiler; ilkbahar veya yaz başlangıcında çiçeklenmenin ilk dönemlerinde alınan tomurcuklardan elde edilmiştir. Çalışmasının değişik aşamalarından toplam 22 adet embriyo ve 13 adet haploid bitki elde etmiştir.

Sakin (1994), tütün (*Nicotiana tabacum* L.) anter kültüründe genotipin haploid bitki oluşumuna etkisini saptamak amacıyla, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 20 genotipten alınan anterleri kültüre almıştır. Araştırma sonuçlarında, reaksiyon gösteren anter miktarının ve rejenerasyon miktarının büyük ölçüde genotipik etki altında olduğunu, reaksiyon gösteren anter miktarı açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığını tespit etmiştir.

Kaplan (2012), farklı bölgelerinden toplanan ve seleksiyon ıslahı yoluyla elde edilmiş 73 genotip ve 11 standart ticari biber genotipleri ile yaptığı anter kültüründen hiçbir genotipte embriyo veya bitki gelişimi olmadığını bildirmiştir. Sonuç olarak Türk biberlerinde androgenesis uyartım protokollerinin geliştirilmesi için çalışmalara devam edilmesi gerektiği bildirilmiştir.

Taşkın vd. (2011) 5 farklı biber genotipi ile anter kültürü çalışmışlardır. Embriyo oluşumu ve oluşan embriyoların bitkiye dönüşümünün genotiplere ve besin ortamlarına göre değiştiği belirtilmektedir. Genotipler arasından en yüksek embriyo oranını (%18 globular ve %9,0 olgun embriyo) 269 nolu genotipten elde etmişlerdir.

Koleva vd. (2008) biber de anter kültürü çalışmalarında androgenik bitki elde etmenin büyük ölçüde genotipe bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında 21 farklı biber genotipine anter kültürü çalışmışlardır. Anterler Dumas de Valux vd. (1981) tarafından geliştirilen yöntemle kültüre alınmıştır. Sonuç olarak çalışma da androgenesisteki başarıyı

genotipin ve bulunduğu ortam koşullarının etkilediğini bildirmiştir. Anter kültürü sonrasında büyüme odasına ve sera koşullarına alınan 4 genotipten (Piran, Kurtovska kopya SR, Zlaten medal SR ve Feherözön) biber bitkisi elde edilme işlemi başarı ile gerçekleşmiştir.

Ata (2011), düşük sıcaklığa tolerant/duyarlı (421 ve 195 nolu genotipler) ile yüksek sıcaklıklara tolerant/duyarlı (İnan 3363 ve 277A) genotiplerin kullanıldığı çalışmada, en fazla sayıda embriyo oranının İnan 3363 çeşidinden %20,95 olarak elde edildiği sonucuna varmıştır.

Al Remi (2013), biberde genotipin etkilerini araştırmak için 3 farklı genotiple yaptığı anter kültürü çalışmada bitkiye dönüşen embriyo oranı ile gelişen anter başına elde edilen embriyo sayısı oranlarının Alfajer çeşidi ve B ıslah hattında 151 ve 171 No'lu genotiplerinden daha başarılı sonuçlar verdiğini belirlemiştir.

Karakullukçu ve Abak (1993) tarafından 4 patlıcan türünde yapılan anter kültürü çalışmada, genotiplerin yanıt verme düzeyinin farklı olduğunu belirlemişlerdir. Her genotip için kültür koşullarını optimize etmenin gerekli olduğunu söyleyen Dunwell (1981)'in önerisine alternatif bir başka yol daha bulduklarını bildirmişlerdir. Alternatif yollardan birisinin de, anter kültürüne yanıt vermeyen genotiplerle çok iyi yanıt veren genotipleri melezleyerek, melez döllerden az veya çok yanıt alabilmeyi sağlayabilmek olduğunu bildirmişlerdir.

Nowaczyk vd. (2006 a) tarafından yapılan biberde anter kültürü çalışmada: ATZ1, PO ve (ATZ1 x PO) F genotipleri kullanılarak uygun tomurcuklardan seçilen anterlerle embriyo gelişimleri gözlemlenmiştir. Çalışılan ortamlarda her iki genotipte de elde edilen embriyo sayısının %5 i geçmediğini bildirilmiştir. ATZ1 genotipinde %4'le en fazla embriyo elde edilmiştir. Bu elde edilen embriyoların %1,7'sinde bitkiye dönüşüm gözlemlenmiştir.

Supena vd. (2006) çalışmada 10 farklı Endonezya biber genotipinde Dumas de Valux vd. (1981) ortamı kullanarak anter kültürü işlemi gerçekleştirmiştir. 7 genotipten sadece bir tanesinde tomurcuk başına 0,2 bitkiden daha az tepki olmuştur. Haploid bitki üretiminde, Endonezya biber genotiplerinin olumlu sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

Irikova vd. (2011) 19 farklı Bulgaristan biberi genotipini kullanarak biberde anter kültürü çalışması yapmıştır. Bunların 4 tanesi hibrit çeşitler, 7 tanesi farklı çeşitler ve 8 tanesi de birbirinden farklı biber hatlarından oluşmaktadır. Çalışma sonucunda: 6 farklı hat, 6 çeşit ve 3 hibrit çeşidinde 35-40 gün sonra anter kültüründe embriyo elde edildiğini tespit etmişlerdir. 4 hat, 6 çeşit ve 1 hibrit çeşitten de bitki elde edilmiştir.

Olszewska vd. (2014) tarafından yapılan biberde anter kültürü çalışmasında, 17 farklı biber genotipinde çalışılmıştır. 17 farklı genotipin 12 tanesinde embriyo gelişiminin başarıyla başlatıldığı bildirilmiştir. Kontrol denemesine göre diğer bütün genotipler arasında %3,85 ile en yüksek androgenetik tepki PO genotipinden alınmıştır.

Hegde vd. (2017) biber de denediği anter kültürü çalışmasında 2 farklı genotiple çalışmışlardır. Her iki genotipinde anter kültürüne verdiği tepkilerin farklı olduğunu bildirmiş Indra genotipinin Bharat genotipine göre daha yüksek seviyede anter kültürüne uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Özsan ve Onus (2017), 4 farklı biber çeşidinde farklı B vitaminlerinin kullanıldığı besin ortamlarında androgenesise tepkide çeşitlerin önemli farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kurt (2019), 4 farklı biber çeşidiyle (12-081(Kapya A), 10-714 (Kapya B),15-416 (Dolma 39), 12-013 (Dolma 47)) haploid bitki elde edebilmek için yaptığı anter kültürü çalışmasında, genotipin androgenesise etkisini incelemiştir. Çalışma sonuçları çeşitler bazında değerlendirildiğinde, her çeşitte kallus oluşumu gözlemlemiştir. Çeşit x ortam interaksyonu incelendiğinde ise kallus oluşumu açısından en başarılı sonuçlar, Kapya B ve Kapya A çeşitlerinde alınmıştır.

Shimira vd. (2019) tarafından yapılan biberde anter kültürü çalışmasında nematoda karşı dirençli olduğu bilinen 2 farklı (Alata 2095 ve Alata 2096) genotip kullanılmıştır. Araştırma sonucunda Alata 2095 genotipinin 100 anter için elde edilen en yüksek bitki sayısı ortalamasının 39 olduğu ve bu genotipin anter kültürü uygulamalarında kullanılmak için uygun olduğu tespit edilmiştir.

2.2. Donör Bitkinin Yetiştirilme Koşulları

Androgenik embriyo oluşum oranı ve bunların bitkiye dönüşüm oranı üzerinde donör bitkinin yetiştirme koşulları, bitki yaşı ve anter alma mevsiminin de etkili olduğu birçok araştırmada gösterilmiştir (Bajaj, 1990; Kristiansen ve Andersen, 1993; Ltifi ve Wenzel, 1994; Gonzalez-Garcia, 2002; Rodeva ve Cholakov, 2006).

Androgenesis çalışmalarında donör bitkinin genotipi son derece elverişli olsada, uygun safhadaki mikrosporları içeren materyaller kullanılsa da, mikrospordan *in vitro* koşullar altında haploid embriyo uyartımını başlatabilmek önemli bir ölçüde bu bitkilerin yetiştirildiği koşullara bağlıdır (Ellialtıoğlu vd., 2001).

Anter kültürü çalışmalarında kullanılacak donör bitkilerin üzerindeki ışık yoğunluğu, fotoperiyot, beslenme, sıcaklık ve CO₂ konsantrasyonu en fazla etkili olan kritik çevresel faktörlerdendir. Birçok bitki türünde açıkta ve normal yetiştirme döneminde yetiştirilen bitkiler, sera koşullarında yetiştirilen bitkilere göre anter kültüründe gösterdikleri performans bakımından daha başarılıdır. Heberle-Bors ve Reinert (1981), anterlerin içerisindeki embriyogenik polen tanelerinin sayısı üzerindeki etkiyi donör bitkilerin yetiştirildiği koşulların etkisi olarak yorumlamışlardır. Tütün bitkilerinin daha serin koşullarda yetiştirilmesi sonucunda, P-poleni diye adlandırılan embriyogenik polen tanelerinin sayısının çoğaldığı ve anterlerden elde edilen embriyo oranının da daha fazla olduğunu bildirilmektedir (Heberle-Bors ve Reinert 1981; Ellialtıoğlu vd., 2001).

Ayar (2003), çalışmasında kullandığı biber çeşitlerinde mevsimin etkisini yaz ve kış olarak iki farklı dönemi karşılaştırma şeklinde yaptığını belirtmektedir. Bitki yaşının etkisini de aylık olarak incelemiştir. Elde ettiği sonuçları, her mevsimi kendi içerisinde değerlendirilerek bitki yaşının etkisini ve iki mevsimi de kendi aralarında karşılaştırarak mevsimin etkisini değerlendirmiştir. Yaptığı istatistikî analizlerde, bitki yaşı bakımından dönem içerisindeki aylar arasında farklılıklar ve çeşit x dönem interaksyonu olduğunu saptamıştır. Sonuçlarına göre, yaz döneminde Kekova çeşidinin % 4,97'lik embriyo oluşum oranı ile Sera-Demre 8 çeşidinden (% 1,49) daha iyi sonuç verdiğini saptamıştır. Kış döneminde ise Sera-Demre 8 (%4,26) çeşidinin, Kekova (%2,69) çeşidinden daha yüksek

oranda embriyo oluşturduğu saptamıştır. Yaz döneminde Kekova eşidinde çiçeklenmenin 2. ayı olan Haziran ayı (%7,30), Sera-Demre 8 eşidinde ise çiçeklenmenin 3. ayı olan Ağustos ayı (%3,96) en yüksek embriyo oluşumunun sağlandığı ay olarak tespit ettiğini bildirmiştir. Kış döneminde Kekova (%7,70) ve Sera-Demre 8 (%8,75) eşidinde, çiçeklenmenin 4. ayı olan şubat ayında en fazla sayıda embriyo oluşum oranlarını elde etmiştir.

Büyükalaca vd. (2004) serada koşullarında yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerin, açık alanda yetiştirilen bitkilerden alınan anterlere göre daha fazla embriyo oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Ercan vd. (2006) Antalya koşullarında yaz döneminde açıkta ve kış döneminde ısıtmasız serada yetiştirilen iki biber çeşidinden alınan anterlerin mevsimsel etkilere karşı farklı embriyojenik yanıt verdiğini belirlemişlerdir.

Taşkın (2005), araştırmasında en yüksek embriyo elde etmek ve bitkiye dönüşümün belirlenmesi amacıyla, anterleri birbirinden farklı zamanlarda kültüre almıştır. Denemenin sonunda, embriyo oluşumu ve oluşan embriyoların bitkiye dönüşümü anter alma dönemlerine göre değişiklik göstermiştir. En başarılı sonuçları, Nisan ve Mayıs aylarında alınan anterlerden tespit etmiştir.

Araştırcılar optimum anter gelişim evresi seçildiğinde, yaşlı bitkilerden toplanan anterlerin yeterli embriyojenik tepkiye sahip olabileceğini bildirmiştir. Donör bitkinin yetiştirilme mevsimi, yaşı ve anter alma mevsiminin androgenik tepkiye etkileri konusunda yürütülen kapsamlı bir çalışmada, beş genotipe ait fideler Adana koşullarında serada, Kasım, Mart ve Ekim ayında olmak üzere 3 dönemde dikilmiştir. Kasım ayında dikilen fidelerden Ocak, şubat, Mart aylarında, 2. dönem dikimlerinden Nisan ayından Eylül ayına kadar her ayda ve 3. dönem dikilen fidelerden Kasım, Aralık ve Ocak aylarında tomurcuklar alınarak anter kültürü işlemini gerçekleştirmişlerdir. En başarılı sonuçlar, Nisan ve Mayıs aylarında kültüre alınan anterlerden elde edilmiştir. Nisan ve Mayıs aylarında çevresel faktörler optimum olduğu için bu aylarda alınan anterlerdeki embriyo veriminin yüksek olduğu düşünmüşlerdir. Temmuz ve Ağustos aylarında kültüre alınan anterlerden sonuç alınamamıştır (Taşkın 2005; Taşkın vd., 2011).

Farklı genotiplerle çalışan Ata (2011), Mersin koşullarında Ekim ayında seraya dikilen ve iklim koşullarına adaptasyon bakımından farklı biber genotiplerinden bir yıl boyunca alınan anterlerden embriyo oranları bakımından önemli farklılık tespit etmiştir. Kuvvetli sürgün gelişmesinin olduğu bahar ve yaz aylarında bitkinin içsel oksin seviyesinin yüksek olması nedeniyle yüksek seviyede sitokinin içeren besin ortamında, içsel oksin seviyesinin düştüğü kış aylarında ise daha düşük sitokinin içeren besin ortamında daha başarılı sonuçlar elde edildiğini bildirmiştir. Farklı zamanlarda yapılan anter kültürü çalışmalarında embriyo oranı bakımından en iyi sonuçların (%66,36) Ağustos ayından (11 ay yaşlı bitkilerden) alındığını belirtmektedir. Çevresel etkiler içerisinde donör bitkinin yetiştirildiği zamandaki ortam sıcaklığının etkili olduğu ve bitkinin yaşamış olduğu stres koşullarının embriyo oluşumunu pozitif yönde etkilediğini, haploid embriyo uyartımının daha iyi sağlanabilmesi için de genotiplerin iklim isteklerine uygun bir zamanda anter kültürü çalışmasının yapılması gerektiğini vurgulamıştır. Donör bitkinin yetiştirilme koşulları ve bitki yaşının anter kültüründe ki başarıya olan etkileri konusunda benzer sonuçlar Powell, (1990) ve Kristiansen ve Andersen, (1993) tarafından da bildirilmiştir. Rodeva ve Cholakov (2006), embriyo indüksiyonu ve verimi ile bitki yaşı arasında bir ilişki bulamadığını bildirmiştir.

Arı vd. (2016 a) Antalya koşullarında sonbaharda ısıtılmayan sera koşullarında yetiştirilen 64 süs biberi genotipinde, Kasım ve Aralık aylarında alınan tomurcuklarla shed-microspor kültürü çalışmışlardır. Çalışılan 64 genotipten 48'inde farklı oranlarda embriyolar üretilmiştir. Androgenik tepki veren 48 genotiple çalışmalarına devam eden araştırmacılar, ilkbaharda serada yetiştirilen bitkilerden (Arı vd. 2016 b) daha fazla sayıda haploid embriyo elde etmişlerdir. Donör bitkinin optimum koşullarda yetiştirilmesi, genç veya yaşlı olması, sağlıklı olması, vegetasyon süresince yaşamış olduğu stres faktörlerinin olması durumunda farklı deneysel koşullarda androgenik tepkide önemli bir genotipik varyasyon görülmektedir. Bununla birlikte, anter kültürü ve mikrospor kültürünün başarısı için donör bitkilerin büyümeleri sırasında herhangi bir stres koşulunun önlenmesinin kritik önem taşıdığını bildirmişlerdir.

2.3. Anterlerin Gelişme Dönemi

Mikrosporların gelişme dönemi, anterlerin donör bitkiden izole edildiği zamanda oldukça önemlidir. Anter kültüründe tek çekirdekli mikrospor döneminin, erken veya geç aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerden en iyi sonuçlar alınmaktadır. Mikrosporlar içerisinde eğer nişasta depolanmaya başlanmışsa, bu anterlere haploid embriyo elde etmek için yapılan uyarılar etkili olmayacaktır.

Sitolojik gözlemler, anterlerdeki mikrosporların hangi gelişme döneminde olduğunu belirlemek için yapılmaktadır. Asetokarmin ile hızlı boyama yapılarak, mikrospor gelişme aşaması saptanabilir. Ayrıca floresan mikroskobu ve preparat hazırlanmasında buna uygun merkürük asit, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) gibi boyalar kullanılarak daha kolay ve daha doğru bir şekilde mikrospor çekirdeklerinin görülebilmesi sağlanabilir.

Başka bir yöntem ise parafine gömerek kesit alınır ve bunun ardından preparatların hematoksilin ya da metilen mavisine boyanarak net ve güvenilir şekilde mikrospor çekirdekleri gözlemlenebilir. Ancak, bu yöntemin uzun süre alması büyük bir dezavantajdır (Ellialtıoğlu vd., 2001).

Abak (1983), anter kültürü için en uygun tomurcuk gelişme döneminin ince uzun meyveli yerli biber materyali için (mayoz bölünmeyi takip eden birinci mitoz başlangıcı), tomurcukların 3,5-4,0 mm büyüklüğüne ulaştıkları zamana rastladığını bildirmiştir.

Bajaj (1984), birinci mitoz bölünme öncesi veya sırasında çekirdeksiz aşamadaki polenin, mikrospor embriyogenesisini engelleyebilecek dış strese karşı duyarlı olduğunu ve stres koşullarında embriyo oluşumunun engellendiğini bildirmiştir. Farklı bitki tür ve çeşitlerinde uygun mikrospor safhasına sahip olan tomurcukların belirlenmesinde bazı araştırmacılar sitolojik çalışmalar yaparken bazıları da morfolojik belirteçlerden yararlanmıştır.

Karakullukçu (1991), yaptığı sitolojik incelemelerde patlıcan da anter kültürü için en verimli gelişme döneminin birinci polen mitozunun hemen öncesinde ki dönem olduğunu belirlemiş, bu dönemdeki tomurcuklarda bulunan taç yapraklarının seviyesinin çanak

yaprakların birleşme noktasında bulunduğunu, bununla birlikte anter renginin de yeşilimsi sarı renkte olduğunu gözlemlemiştir.

Biner vd. (2001) araştırmalarını 2 farklı biber çeşidinde yapmıştır. Tomurcuklar bitkiden toplanırken, taç yaprağı çanak yaprağını çok az geçmiş olan yani tek çekirdekli mikrospor dönemi olduğu kabul edilen tomurcukları seçmişlerdir. Sirena çeşidi için en yüksek % embriyo oranı (%6,18) ve Amazon çeşidi için ise en yüksek % embriyo oranı (%3,03) olarak elde edilmiştir.

Supena vd. (2006) shed mikrospor protokolünde tomurcuklarının %50'sinden daha fazlasında geç çekirdekli mikrospor içeren tomurcukların seçiminin daha önemli olduğunu bildirmişlerdir. Petal boyunun sepallere eşit ya da hafifçe daha uzun olduğu dönemdeki çiçek tomurcukları DAPI ile boyanmasından sonra %50'sinden daha fazlasının geç tek çekirdekli dönemde olduğunu çalışmasında kullandığı 10 çeşitte tespit etmiştir. Çiçek tomurcuklarının orta tek çekirdekli dönem ve çift çekirdekli dönemlerinin sırasıyla %20 ve %50'yi geçmeyecek şekilde olduğunu tespit etmişlerdir.

Türkiye'de yapılan ve çoğunlukla Türkiye orijinli çeşitlerle yapılan çalışmalarda en uygun mikrospor gelişme dönemi, mayoz bölünmeyi izleyen tek çekirdekli birinci mitoz başlangıcı, I. mitoz bölünmesine geçmiş profaz aşaması (Özkum vd. 2001; Ercan vd. 2001; Ercan ve Biner, 2002; Sayılır ve Özzambak, 2005), çoğunlukla geç ve orta tek çekirdekli mikrosporlar yanında genç çift çekirdekli dönemde polen içeren anterler (Arı vd. (2016 a, b)) olarak belirlenmiştir.

Barroso vd. (2015) çiçek tomurcuğu boyutunu mikrospor gelişimi aşamaları ve farklı süs biberi genotiplerinin anterlerinde embriyoların indüksiyonu ile ilişkilendirmiştir. Rasgele toplanan çiçek tomurcuklarını, görsel olarak iki petal ve sepal boyutuna göre üç sınıfa ayırmıştır. Tomurcuk en ve boyunun yanı sıra petal, sepal ve anter uzunluğu da ölçülmüştür. Tomurcukta ki her anter için mikrospor aşamasını belirleyerek ikinci sınıf anterlerin çoğunluğunda tek çekirdekli mikrosporlar varlığını tespit etmişlerdir. Tek çekirdekli mikrosporların sayısı ile tomurcuk büyüklüğü arasında korelasyon gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Hegde vd. (2017) biberde yaptığı anter külürü çalışmasında biber tomurcuklarını görünümüne, anter morfolojisine ve mikrosporların gelişim aşamalarına göre incelemişlerdir. Mikrospor gelişimi için anter renginin iyi bir gösterge olduğunu bildirmiştir. En iyi sonucun, mikrosporların geç tek çekirdekli aşamadaki anterlerinden elde edildiğini tespit edilmiştir.

Çiner (2000), biber genotipinde bulunan mikrospor gelişim aşamalarını araştırmıştır. Asetokarmin ezme yöntemi ve parafin metodunu kullanarak sitolojik çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Tomurcuk büyüklükleri, tomurcuk ve anter morfolojileri tanımlanmış ve mikrospor aşamaları belirlenmiştir. Tomurcuklarda korolla seviyesinin kaliks ile aynı veya biraz daha uzun olduğu, tomurcuk çapının 5 mm, uzunluğunun ise 7 mm olduğu gelişme dönemindekilerinin tek çekirdekli ve 1. polen mitozu aşamasındaki mikrosporları bulundurduğunu saptamıştır.

2.4. Anterlere Yapılan Ön Uygulamalar

Yapılan çalışmalarda kültüre almadan önce tomurcuklara veya kültürün başında anterlere uygulanan ön işlemler ve inkübasyon koşullarının, haploid embriyo oranına önemli etkilerde bulunduğu bildirilmiştir. Ön uygulamaların amacı, mikrosporların gametofitik gelişmelerini sporofitik gelişim yönüne değiştirmek için gerekli stresi yaratmaktır. Ön uygulamalar: düşük veya yüksek sıcaklık şokları, anterlerin mannitol kullanımıyla açlığı veya bunların kombinasyonu şeklindedir.

Sibi vd. (1980) anter ekiminin ilk 2 günü 35 °C yüksek sıcaklık uygulanmasının, çiçek tomurcuklarının 4 °C soğuk ön uygulamasına kıyasla embriyogenesi daha etkili bir şekilde uyardığını bildirmişlerdir. Dumas de Vault vd. (1981), embriyo indüksiyonu için son derece etkili bir yöntem geliştirmişlerdir. Anterlerin 8 gün boyunca 35 °C ve karanlık koşullara maruz bırakılmasıyla, bu koşullardan daha kısa süre inkübasyona oranla daha iyi sonuçlar alındığını bildirmişlerdir.

Bal vd. (2003) tomurcukları 7 gün boyunca 0,3 M mannitollu açlık ortamında 10°C'de ön uygulamaya almışlardır. Osmosik stres oluşturmaları nedeniyle, mannitol uygulamasının mikrospor kökenli kallus koloni oranını arttırdığı belirlenmiştir. Kullanılan

en yaygın ön uygulamalardan biri tomurcukların düşük sıcaklıkta tutulduğu soğuk uygulaması olmuştur.

Soğukta bekletme esnasında zayıf ve yaşama gücü olmayan mikrosporlar ve anterlerin hemen kahverengileşip öldüğü, böylece güçlü anterlerin seçilerek kültüre alınması durumunda yüksek oranda rejenere olabildiği bildirilmektedir. Anter kültüründe, mikrospor tanelerindeki nişasta birikimi oldukça önemlidir. Nişasta birikimi olan mikrosporlarda, haploid embriyo gelişimi görülememektedir. Düşük sıcaklık, nişasta üretimini azaltarak mikrosporlarda nişasta birikimini engeller (Kaplan, 2012).

Kültüre alınmadan önce çeşitli sürelerde tomurcuklara 4 °C soğuk uygulamasının embriyogenesi teşvik etmediği (Munyon vd. 1989; Çömlekçioğlu vd. 1999; Özkum vd. 2001; Özkum ve Tıprıdamaz, 2002; Kim vd. 2004; Özkum ve Tıprıdamaz, 2010; Arı vd. 2016 a), anterlere soğuk uygulamalarının genel olarak tomurcuklarda ABA (absisik asit) içeriğini azalttığı, kültürün başında ve kültürün 50. gününde 4 °C 'de 4 gün boyunca soğuk uygulanmış anterler hariç bu uygulamaların ABA içeriğindeki azalmaların önemsiz olduğu bildirilmiştir (Özkum vd., 2001). Biner vd. (2001) ise çeşitlere bağlı olarak 4 °C'de 1-2 gün tutulan anterlerden, daha yüksek embriyo oranı sağlandığını bildirmişlerdir.

Abak (1983), anter kültürü için anterlerin dikim öncesinde 25 °C ve 35 °C sıcaklıklarda ve nemce doymuş atmosferde tutulmasının herhangi bir olumlu etki meydana getirmediğini bildirmiştir.

Karakullukçu (1991), patlıcan anterlerine, kültüre alınmadan önce yapılan soğuk uygulamaları ve kültürün ilk devresinde yapılan sıcak uygulamaları ile donör bitkilerin yetiştirme koşullarının etkilerini araştırmıştır. Kültür öncesi tomurcuklara soğuk uygulamasının olumlu etkisi olmadığını bildirmiş; en iyi sonucu dikimi izleyen ilk 8 gün karanlıkta ve +35 °C sıcaklıkta tutulan anterlerden elde etmiştir. Donör bitkilerin kısa gün ve düşük sıcaklık koşullarında yetiştirilmesinin androgenesi uyarıcı bir etki yapmadığını gözlemlemiştir. Haploid bitkiler; ilkbahar veya yaz başlangıcında çiçeklenmenin ilk dönemlerinde alınan tomurcuklardan elde edilmiştir. Çalışmanın değişik aşamalarında, toplam 22 adet embriyo ve 13 adet haploid bitki elde etmiştir.

Dolcet-Sanjuan vd. (1997) anterleri ilk bir hafta süreyle 7 °C'de karanlıkta, Supena vd. (2006) ise 9 °C'de inkübasyonunun embriyojenik potansiyeli arttırdığını buna karşılık Koleva-Gudeva vd. (2007) benzer bir etki olmadığını bildirmişlerdir. Sonuçlar, farklı genotiplerde ve deneysel koşullarda anterlerin farklı tepkiler verdiği anlamına gelmektedir.

Biner vd. (2001) biber anter kültüründe bitki elde edilmesi üzerine farklı sıcaklık ve ışık uygulamalarının etkilerini araştırmıştır. Tomurcukların bir kısmı +4 °C'de 24 saat ve bir kısmı yine +4 °C'de 48 saat bekletilmiştir. Bu işlemin ardından, anterlere farklı aydınlık-karanlık ve sıcaklık uygulaması gibi ön uygulamalarda yapılmıştır. Bu ön uygulamalardan geçirilen anterler, 25 °C sıcaklık ve 16/8 saat aydınlık/karanlık periyoduna alınmıştır. Araştırmadan alınan sonuçlara göre, Sirena çeşidi için en yüksek embriyo oluşum oranının (%6,18) +4 °C'de 24 saat ön uygulamanın ardından 25 °C'de 1 hafta süreyle 24 saat karanlıkta tutulan anterlerden elde edildiği bildirilmiştir. Amazon çeşidi için ise en yüksek embriyo oluşum oranı (%3,03), + 4 °C'de 48 saat ön uygulaması yapıldıktan sonra 25 °C'de 1 hafta süreyle 24 saat karanlıkta bekletilen anterlerden elde edilmiştir.

Yıldırım (1999), ikisi hibrit, üçü standart olmak üzere 5 farklı biber çeşidi ile çalışmıştır. Bu çeşitlerden tek çekirdekli mikrospor safhasında alınan tomurcuklar, +4 °C'de 24 saat soğuklatılmıştır. Çalışmada Sirena ve Charleston çeşitlerinden *in vitro* bitki ve embriyo elde edilmesine rağmen, bunlarda bir gelişme gözlemlenememiş ve kültürün ilerleyen dönemlerinde canlılıklarını yitirdikleri saptanmıştır. Diğer üç çeşitte ise kallus oluşumu dışında, başka bir rejenerasyon gözlemlenemediği bildirilmiştir.

Anterlerde bulunan ve engelleyici bir hormon olan absisik asit miktarını azaltarak ve bu hormonun olumsuz etkisini soğuk uygulamaları ortadan kaldırır (Johansson ve Eriksson, 1977; Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz, 1997; Özkum vd., 2001). Tomurcukları santrifüj etme, tomurcuklara etilen uygulaması gibi ön uygulamalarda, soğuk şokları gibi embriyo gelişimine olumlu etki yapmaktadır (Nitsch, 1974).

Çiner (2000), biber tomurcuklarına soğuk şoku uygulamasını 4 °C de 48 ve 96 saat boyunca bekleterek yapmış ve etkilerini incelemiştir. Hiçbir ön uygulama yapılmayan kontrol grubu anterlerinden en yüksek embriyo oluşumu elde edilmiştir. Androgenik embriyo oluşumu ortalama %12,5 civarında bulunmuştur. Besin ortamına ilave edilen aktif

kömürün ve büyüme düzenleyicilerin anter kültüründe embriyo oluşturma başarısı üzerindeki etkisinin soğuk şoku uygulamalarına göre daha fazla olduğunu bildirilmiştir.

Çağlar vd. (2004) çalışmalarında, kültüre alınan anterlere yedi gün boyunca karanlık koşullar altında 4 °C, 29 °C ve 35 °C de 3 farklı ön sıcaklık uygulamışlardır. Anterlerde kallus gelişimi görülmeden, %2,8 oranında haploid embriyo gelişimi sağlandığını gözlemlemişlerdir.

Supena vd. (2006) çalışmasında biber tomurcuklarını +4 °C de sırasıyla 0, 1, 3, 7 gün olmak üzere ön soğuklama uygulamasına tabi tutmuşlardır. Daha sonra elde edilen kültürler sırasıyla 4, 9, 28, 32, 35 °C'de bekletilmiş olup en fazla sayıda embriyo gelişimi ve normal görünümlü embriyo oluşumunu 1 hafta 9 °C'de ardından da 28 °C'de devamlı karanlıkta bekletilen kültür ortamlarından elde edildiğini tespit etmişlerdir.

Yıldırım (2016), süs biberlerinde uygun safhadaki tomurcukları bir gün süreyle +4 °C'de ön soğuklatma uygulamasına tabi tuttukten sonra, anterleri çift fazlı shed-mikrospor ortamında kültüre almıştır. Kültürler bir hafta süreyle 9 °C'de inkübe edildikten sonra, yarısı çalkalayıcı ortamda, diğer yarısı ise kontrol grubu olarak durağan ortamda 28 °C'de 3 hafta ve ardından 3-5 hafta süreyle 21°C karanlık ortam koşullarında bekletilmiştir. Çalışmada, durağan ve çalkalanan kültür ortamlarından elde edilen toplam embriyo ve normal görünümlü çift kotiledonlu embriyo sayılarında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmazken, genotipler arasındaki fark ise oldukça önemli bulunmuştur. Toplam embriyo ve globular embriyo oluşturma yönüyle, çalkalanan ortamdaki kültürlerin daha başarılı oldukları saptanmıştır.

Kurt (2019), farklı biber çeşitlerinde yapılan anter kültürü çalışmalarında ön sıcaklık uygulamaları yaparak, bunun androgenesise etkisini incelemiştir. Anterler 2 farklı ön uygulamaya (25 ve 35° C karanlık) maruz bırakıldıktan sonra, besin ortamında kültüre alınmışlardır. Ön uygulama yapılarak kültüre alınan anterlerin, kallus oluşumları değerlendirmiştir. Sonuçlar ön uygulama açısından değerlendirildiğinde kallus oluşumu bakımından en iyi sonuçlar, 6 gün süresince 35 °C sıcaklık ön uygulamasından geçirilmiş Petri kaplarından elde edilmiştir. Sonuç olarak biberde anter kültürü çalışmasında ön

uygulama olarak anterleri 35 °C’de 6 gün bekletmenin kallus oluşumu üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir.

Shimira vd. (2019) nematoda karşı dirençli iki biber genotipinin çiçek tomurcuklarına soğuk ön işlem uygulamasının anter kültürü çalışmasındaki etkisini araştırmışlardır. Çiçek tomurcukları anter kültürü işlemine alınmadan önce, 24 saat boyunca +4 °C de buzdolabında tutulmuştur. Bu soğuk ön uygulamasının, embriyo elde edilmesi bakımından her iki genotip içinde olumlu etkisinin bulunduğu bildirilmiştir.

Arjun vd. (2020) kültür öncesi ve sonrasında düşük sıcaklık uygulamalarının bitki rejenerasyonuna olan etkisini ve anter kültüründe embriyo oluşumunu incelemiştir. On F₁ genotipi kullanmış ve 2 farklı sıcaklık uygulaması gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık uygulamaları, kültür öncesi (1 ve 2 gün) ve kültür sonrası (8 gün) 9 °C’de yapılmıştır. En yüksek embriyogenesis oranı, genotiplere göre değişim göstermiş ve en iyi sonuç 2 gün 9 °C’de tutulan anterlerden alınmıştır. Bu çalışmada kültür öncesi ve sonrasında soğuk uygulamalarının androgenesis sıklığı üzerine doğrudan etkisi olduğu bildirilmiştir.

2.5. Besin Ortamının Bileşimi ve Yapısı

Oksinlere anter kültüründe ki ilk aşamada gametofitik dokuları sporofitik gelişmeye dönüştürme yönünde uyarmak için gerek duyulurken; sitokininlere bitkiye dönüşme aşamasında ihtiyaç duyulur. Kinetin, BAP (benzil amino pürin) ve zeatin genellikle sitokinin kaynağı olarak çalışmalarda kullanılırken, 2,4 D (2,4-diklorofenoksi asetik asit), NAA (naftalin asetik asit) ve IAA (indole-3-asetik asit) oksin kaynağı olarak kullanılır. MS (Murashige ve Skoog), N (Nitch), LS (Linsmaer ve Skoog), NN (Nitch ve Nitch) ve CP (Dumas de Valux), NLN (sıvı N ve N Ortamı) ortamları anter kültüründe en fazla kullanılan temel besin ortamlarındandır. Bu yöntemde biber anterleri önce yüksek konsantrasyonda büyüme hormonu içeren ortamda inkübe edilmekte, daha sonra düşük konsantrasyonlu ortamlara aktarılmaktadır.

Anter kültürü çalışmalarında, çoğunlukla sakkaroz karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Özellikle biber (Dumas de Valux vd., 1981) ve patlıcan (Dumas de Valux

ve Chambonnet, 1982) türlerinde, besin ortamlarına kültürün ilk dönemlerinde ilave edilen yüksek şeker dozları (%6-12) haploid embriyo elde edilmesine katkı sağlamaktadır.

Abak (1983), biber bitkisinde anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etmeye elverişli en uygun besin ortamını belirlemek amacıyla ortama ilave edilen kinetin ve 2,4 D, sakkaroz ve demir bileşiklerinin farklı oranlarının etkilerini öğrenmeye yönelik denemeler yapmıştır. Besin ortamına 5 mg l⁻¹ kinetin, 5 mg l⁻¹ 2,4 D, 120 g l⁻¹ sakkaroz, 37,3 mg l⁻¹ Na₂EDTA + 27,8 mg l⁻¹ FeSO₄7H₂O (Demir sülfat heptahidrat) katılması ile en başarılı sonucu elde ettiğini bildirmiştir. Oluşan haploid bitkileri diploid hale getirilebilmek için kolhisin kullanılmış ve saf hatlar üretilebilmiştir.

Karakullukçu (1991) patlıcanda haploid bitki elde etmeyi amaçladığı çalışmasında, besin ortamına eklenen şeker, aktif karbon ve büyümeyi düzenleyicilerin etkilerini araştırmıştır. İlk dikim ortamı olarak %12 oranında sakkaroz, 5 mg l⁻¹ kinetin ve 5 mg l⁻¹ 2,4 D katılan ve bileşimi CP ortamına göre hazırlanan ortam en iyi sonucu vermiştir.

Karakullukçu ve Abak (1993), patlıcan bitkisinde anter kültürü yoluyla besin ortamına değişik oranlarda katılan bazı organik maddelerin (sakkaroz, glukoz), büyüme düzenleyicilerin ve aktif kömürün haploid bitki oluşumuna etkilerini araştırmışlardır. % 12 sakkaroz; % 3 glikoz veya % 6 sakkaroz + % 6,3 glukozun ilk 12 gün boyunca uygulandığında, daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Embriyo oluşumuna aktif kömürün olumlu bir etkisi gözlenmemiş olup, anterler “zeatin ve 2,4 D” veya “kinetin ve NAA” kombinasyonlarına göre “kinetin ve 2,4 D” kombinasyonlarında daha iyi sonuç vermişlerdir. Araştırmanın farklı aşamalarında 5 mg l⁻¹ kinetin + 5 mg l⁻¹ 2,4 D ve %12 sakkaroz kullanılan ortamlarda; Baluroi F₁, Kemer ve Halep Karası patlıcan çeşitlerinde sırasıyla %12,1, %1,5 ve %3,8 oranlarında embriyo edildiğini bildirmişlerdir.

Yıldırım (1999), ikisi hibrit, üçü standart olmak üzere 5 farklı biber çeşidinde anterleri 2,4 D, kinetin, BA (Benzil adenin), NAA ve aktif kömür içeren MS, N, CP ve R temel besin ortamlarında kültüre almıştır. Kültür boyunca sadece CP ortamındaki anterleri, kültürün 12. gününde R ortamına transfer etmiştir. Araştırmanın sonucunda, en yüksek anter canlılık oranının, aktif kömür içermeyen ortamlardan CP*R ve N, aktif kömür içeren CP*R besin ortamlarında bulunduğunu bildirmiştir. Kallus oluşumunun ise en fazla aktif kömür

içermeyen CP*R besin ortamında gerçekleştiğini, bununla birlikte sadece N besin ortamında oluşan kallustan farklılaşma meydana geldiğinin gözlemlendiğini bildirmiştir. Embriyo oluşumunun 35°C'de 8 gün karanlıkta bekletilen anterlerde olduğunu bildirmiştir. Besin ortamı olarakta aktif kömür + 4 mg l⁻¹ NAA + 0,1 BA içeren MS besin ortamında ve yine aktif kömür + 5 mg l⁻¹ 2,4 D + 5 mg l⁻¹ kinetin içeren MS, NN ve CP*R besin ortamlarında gözlemlemiştir. %4,4 oranı ile en fazla N besin ortamında embriyo oluşumu meydana geldiğini tespit etmiştir. Çalışmasında Sirena ve Charleston çeşitlerinden bitkicik ve embriyo elde edilmesine rağmen kültürün ilerleyen dönemlerinde canlılıklarını yitirdikleri saptanmıştır. Diğer üç çeşitte ise kallus oluşumu dışında başka bir rejenerasyonun gözlemlenmediği bildirilmiştir.

Çömlekçiöğlu vd. (1999) Şanlıurfa (U; 10 hat) ve Kahramanmaraş (KM; 5 hat) biber popülasyonlarından saf hatların oluşturulması amacıyla 4 farklı besi ortamında çalışma yapmışlardır. Oksin ve sitokinin miktarlarının eşit olduğu ve 2,4 D'nin kullanıldığı ortamlardan embriyo oluşumu sağlayamamışlardır. NAA'nın kinetin veya BAP ile kombinasyonunun daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Androgenik tepkide genotipin, besin ortamının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin başarıyı etkileyen önemli faktörler olduğu belirlenmiştir.

Terzioğlu (2000), ülkemizde yetiştirilen önemli biber popülasyonlardan biri olan Kahramanmaraş biberi popülasyonunda anter kültürü yapmıştır. Anter kültüründen elde edilen embriyo oranını artırmak amacıyla, besin ortamı içeriği bakımından değişik uygulamalar yapmıştır. MS veya DDV temel besin ortamının içerisine "1 mg l⁻¹ BA + 4 mg l⁻¹ NAA " veya bunun tam tersi olan "4 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ NAA " ilave etmiş; ayrıca tüm ortam kombinasyonlarının yarısına %0,25 dozunda aktif kömür katmıştır. Böylece 8 farklı besin ortamı kombinasyonunda kültüre alınan biber anterlerinin "MS ortamı" + "%0,25 aktif kömür" + "4 mg l⁻¹ NAA + 1 mg l⁻¹ BA" kombinasyonunun anter kültüründen embriyo oluşturmak için en yüksek başarıyı gösterdiğini bildirmiştir.

Çiner (2000), embriyo oluşumuna etkileri araştırmak için besin ortamına %0,25 oranında aktif kömür ilave ederek anter kültürü çalışmasını gerçekleştirmiştir. MS temel besin ortamına, 1 mg l⁻¹ BA ve 4 mg l⁻¹ NAA veya 1 mg l⁻¹ NAA ve 4 mg l⁻¹ BA, %0,8 agar ile birlikte %3 sakkaroz ilave etmiştir. En fazla sayıda embriyo oluşumunu, 4 mg l⁻¹ NAA ve

1 mg l⁻¹ BA ve aktif kömür içeren MS besin ortamında ki anterlerden elde etmiştir. Soğuk şoku uygulamalarına kıyasla, besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerin ve aktif kömürün biber anter kültüründe embriyo oluşturma frekansı üzerinde daha etkin olduğunu bildirmiştir.

Çömlekçioğlu (2001), Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber populasyonlarından, anter kültüründe haploid bitki elde etmek üzere 5 farklı besin ortamı denemiştir. En olumlu sonuçlar 4 mg l⁻¹ NAA, 0,1 mg l⁻¹ BAP, 10 mg l⁻¹ AgNO₃ ve 30 g l⁻¹ sakkaroz içeren MS besin ortamında geliştirilen anterlerden elde edilmiştir. Biber anter kültüründe besin ortamı bileşimi önemli olmuştur. Biber populasyonlarında anter kültürü konusundaki önceki çalışmalarda, düşük oranda androgenik embriyo ve bitkiyle sonuçlandığı bildirilmiştir. Embriyogenesis oranını arttırmak amacıyla besin ortamına gümüş nitrat eklenmiştir. Embriyogenesis genotipik farklılıklar gözlemlenmiş ve Kahramanmaraş ve Şanlıurfa populasyonlarında sırasıyla 7,5 ile 50 embriyo /100 tomurcuk arasında değişmiştir. Normal ve anormal embriyo oranları ise Şanlıurfa ve Kahramanmaraş için sırasıyla %51,6 ve %48,4 olmuştur.

Çağlar vd. (2004) çalışmalarında, Kahramanmaraş kırmızı biberlerinde *in vitro* koşullarda androgenesis yoluyla haploid embriyo oluşturmaya amaçlamışlardır. Besin ortamlarına oksinlerden NAA ve 2,4 D ile sitokininlerden BAP ve kinetin farklı miktarlarda ilave edilerek anterlerde doğrudan embriyogenesisin sağlanmasını amaçlamışlardır. Bunlarla birlikte, besin ortamlarına aktif kömür ve AgNO₃ ilave edildiği de bildirilmiştir. Bu araştırma boyunca, ortamlara toplam 9750 adet anter dikimi yapılmıştır. Bazı ortamlardaki anterlerde yalnızca kallus gelişimi olduğu bildirilirken MS + 0.1mg l⁻¹ BAP + 4 mg l⁻¹ NAA + %0,25 aktif kömür + 10 mg l⁻¹ AgNO₃ bileşimli besin ortamına dikilen anterlerde hiç kallus gelişimi olmadan %2,8 oranında haploid embriyo gelişimi sağlanmıştır.

Taşkın (2005), araştırmasında dört farklı kültür ortamı kullanmıştır. Gelişmesini kültüre alınan ortamda tamamlayamayan embriyoları 10 gün süresince 0,5 mg l⁻¹ ABA içeren besin ortamına aktararak, absisik asitin embriyo gelişmesine etkisini belirlemeye çalışmıştır. Araştırmanın sonunda, oluşan embriyoların bitkiye dönüşümü ve embriyo oluşumları besin ortamlarına göre değişmiştir. Besin ortamları arasında ise III nolu besin ortamı (MS + 30 g l⁻¹ sakkaroz + %0,25 aktif kömür + 15 mg l⁻¹ gümüş nitrat + 4 mg l⁻¹

naftalen asetik asit + 1 mg l⁻¹ benzil amino purin) ve IV nolu besin ortamından (modifiye edilmiş MS + 30 g l⁻¹ sakkaroz + %0,25 aktif kömür + 15 mg l⁻¹ gümüş nitrat + 4 mg l⁻¹ NAA+ 0,1mg l⁻¹ BAP) diğer ortamlara göre daha fazla sayıda embriyo elde edildiği saptanmıştır. Olgunlaşmamış embriyolara ABA uygulama çalışmasından, olumlu bir sonuç alınamamıştır. Bitkiye dönüşüm, hormonsuz MS ortamına alınan olgun embriyolardan sağlanmıştır.

Sayılr ve Özzambak (2005), altı farklı biber çeşidine ait tomurcuklardan alınan anterleri üç farklı gruba ayırarak kültüre almışlardır. Ortam olarak MS ve N temel besin ortamları kullanılmış ve ortamlara aktif kömür ile havuç ekstraktıyla yapılan 4 mg l⁻¹ NAA + 0,1 mg l⁻¹ BA kombinasyonu gibi eklemelerle 6 farklı ortamda çalışma yapılmıştır. MS + 4 mg l⁻¹ NAA + 0,1 mg l⁻¹ BA kombinasyonu en iyi sonucu Charleston Bağcı çeşidinde vermiştir. Ortamlara aktif kömürün tek başına ilave edilmesiyle herhangi bir olumlu etki saptanmamıştır. Besin ortamı olarak, N + 4 mg l⁻¹ NAA + 0,1 mg l⁻¹ BA + %0,1 aktif kömür + 200 ml havuç ekstraktı içeren ortamdan en olumlu sonuç alınmıştır.

Supena vd. (2006) biberde anter kültüründe besin ortamı olarak Zeatin + IAA'nın farklı iki dozunu kullanarak 5 farklı ortam denemiştir. En fazla embriyo 2,5 µM Zeatin + 5,0 µM IAA içeren ortamdan elde edilmiştir.

Nowaczyk ve Kisiala (2006 b) yapmış olduğu anter kültürü çalışmasında CP besin ortamını kullanmıştır. Bu ortama 5 mg l⁻¹ AgNO₃ ve 0,5 g l⁻¹ aktif kömür ilave ederek, farklı besin ortamı elde etmiştir. Bu besin ortamlarına anter dikimi gerçekleştirdikten 12 ve 14 gün sonra, anterleri R1 ortamına aktarmıştır. R1 (rejenerasyon ortamı) ortamlarının 0,1 ve 0,2 mg l⁻¹ kinetin içerdiği bildirilmiştir. Aktif kömür ilave edilen CP ortamından 12 gün sonrasında 0,2 mg l⁻¹ Kinetin olan R1 ortamına aktarılan anterlerden, en fazla sayıda (6) embriyo elde edilmiştir.

Irikova vd. (2011) kullandığı 19 farklı biber genotipinden aldığı anterleri 2 farklı besin ortamında (C ve Cm) sırasıyla 12 ile 40 gün tuttuktan sonra, R ve Rm ortamlarına alarak biberde anter kültürü çalışmışlardır. En yüksek sayıda embriyonun 12 gün Cm ortamında tutulduktan sonra elde edildiği ancak Rm ortamına aktarıldıktan sonra bu embriyolardan bitki elde edilemediği bildirilmiştir. Sonuç olarak, kullanılan genotiplerin

besin ortamı içeriğinden elde ettiği özel gereksinimleri olduğu ve bunun bitki elde edilmesi üzerinde de etkili olduğu tespit edilmiştir.

Lantos vd. (2012) biberde yaptığı mikrospor kültürü çalışmasını, 4 farklı besin ortamında (W14, B5, MS ve NLN) gerçekleştirmiştir. İlk deneme sonucunda, B5 ortamı en üstün ortam olarak tespit edilmiştir. İkinci denemeyi de B5 ortamına farklı oranlarda 2,4 D (0, 0,1, 0,2 ve 0,5 mg l⁻¹) ve farklı oranlarda kinetin (0, 0,2, 0,5 mg l⁻¹) eklenerek denediklerini bildirmişlerdir. En umut verici sonuçların 0,1 mg l⁻¹ 2,4 D ve 0,2 mg l⁻¹ kinetin ilave edilen ortamdan sağlandığını bildirmişlerdir.

Taşkın vd. (2011) 4 mg l⁻¹ NAA ile (0,1, 0,5 ve 1 mg l⁻¹) BAP kombinasyonları içeren MS ve 4 mg l⁻¹ NAA 1 mg l⁻¹ BAP içeren modifiye edilmiş MS ortamlarını kullanarak anter kültürü çalışmışlardır. Tüm ortamlara, 15 mg AgNO₃, 30 g l⁻¹ sakkaroz ve %0,25 aktif kömür ilave edilmiştir. Ortamlar arasında, 4 mg l⁻¹ NAA ve 1 mg l⁻¹ BA içeren MS ile 4 mg l⁻¹ NAA ve 0,1 mg l⁻¹ BA içeren modifiye edilmiş MS ortamlarından, diğer ortamlara göre daha fazla sayıda embriyo elde etmişlerdir. Gelişimini tamamlayamayan embriyoların 10 gün boyunca 0,5 mg l⁻¹ ABA ilave edilen besin ortamına kültüre alınmasından, olumlu sonuçlar tespit edilmediğini bildirmişlerdir.

Ata (2011), Büyükalaca vd. (2004) ve Taşkın (2005), biber anter kültürü çalışmalarında en iyi sonucun alındığı 2 farklı BAP içeriğine sahip MS ortamını kullanmıştır. En yüksek embriyo oranının 4 mg l⁻¹ NAA, 0,5 mg l⁻¹ BAP, % 0,25 aktif kömür ve 30 g l⁻¹ sakkaroz ile 15 mg l⁻¹ AgNO₃ içeren ortamda % 26,47 ve 4 mg l⁻¹ NAA, 0,1 mg l⁻¹ BAP, % 0,25 aktif kömür ve 30 g l⁻¹ sakkaroz ile 15 mg l⁻¹ AgNO₃ içeren ortamda %20,95 olduğunu tespit etmişlerdir.

Kaplan (2012), steril hale getirilmiş çiçek tomurcuklarından alınan anterleri farklı konsantrasyonlarda NAA, 2,4 D, BAP ve kinetin hormonları içeren MS ve CP ortamlarına dikmiştir. Bazı kültür ortamları normal inkübasyon koşullarına konulurken, bazı kültür ortamlarını inkübatör de 8 gün boyunca karanlıkta ve 35 °C' de ön uygulamaya tabi tutulmuştur. Kullanılan ortamlardan kallus oluşturan ortamlar, başlama aşamasından 1 ay sonra normal MS ortamına aktarılmıştır. CP ortamlarına dikilen anterler, 8 günlük ön uygulama ve 4 günlük normal ortam şartlarında tutulduktan sonra, rejenerasyon ortamına

transfer edilmişlerdir. Kùltürler her hafta düzenli olarak gözlemlenmiş ve gelişmeleri kayıt altına alınmıştır. Çalışmasında, 72 adet (% 0,98) androgenik kallus üretildiği gözlemlenmiştir. Oluşan kallusların büyümeye devam ettiğı ve embriyo oluşturmadağı tespit edilmiştir. Biberde yapılan anter kùltürlerinden embriyo veya sürgün gelişimi gözlenmeyerek çalışmalara devam edilmesini gerektiğini bildirilmiştir.

Al Remi (2013) çalışmasında Dumas de Vaulx vd. (1981) tarafından önerilen besin ortamının 8 farklı kombinasyonu ile birlikte MS temel besin ortamının 8 farklı kombinasyonunu kullanmıştır. En başarılı sonuçlar ise MS temelli ve NAA+BAP içeren ortamların verdiğini bildirmiştir. Aktif kömür embriyo oluşumunu arttırmış ve besin ortamına %0,25 oranında ilave edilmiştir. Embriyo oluşumu açısından gümüş nitrat içermeyen ortamın, en iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. B3 ortamından elde edilen embriyolar haricinde, diğer embriyoların tamamının bitkiye dönüştüğü tespit edilmiştir.

Olszewska vd. (2014) biberde anter kùltürü çalışmasında CP ortamını (12, 14 ve 16 gün) ve farklı oranlarda (0,1 ve 0,3 mg l⁻¹) kinetin bulunduran R1 rejenerasyon ortamını kullanmıştır. En yüksek embriyo 16 gün CP ortamında tutulan ve sonrasında 0,1 mg l⁻¹ kinetin içeren ortama alınan anterlerden elde edilmiştir. 12 ve 14 günlük CP ortamında bulunan anterlerin inkübasyonu ise 0,3 mg l⁻¹ kinetin içeren ortamlarda daha olumlu sonuç vermiştir.

Hegde vd. (2017) çalışmasında kullanacağı ortamlarını 2-4 D (0,2 mg l⁻¹) içeren MS ortamında BAP'ın kinetinin, zeatinin ve TDZ'nin farklı dozlarıyla (0,1, 0,5, 1 mg l⁻¹) oluşturduğu kombinasyonlarda AgNO₃'lı ve AgNO₃'sız olarak oluşturmuştur. İçeriğinde 0,2 mg l⁻¹ 2-4 D, 1 mg l⁻¹ zeatin ve 15 mg l⁻¹ AgNO₃ içeren besin ortamından en fazla embriyo (%60,5) elde edilmiştir. Ortamlara ilave edilen farklı dozlardaki oksin ve sitokininlerin, androgenesisi teşvik ederek embriyo gelişimini arttırdığını tespit etmişlerdir. Besin ortamlarına ilave edilen AgNO₃'ın, hem oksinli hem sitokininli ortamlarda ki kallus oluşumuna olumlu bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Kùltür ortamlarına eklenen oksinlerin ve sitokininlerin kallus ve embriyo oluşumu üzerindeki olumlu etkisi birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Nowaczyk vd., 2006 a; Supena ve Custers, 2011; Lantos vd., 2012; Luitel ve Kang, 2013; Olszewska vd., 2014).

Geboloğlu vd. (2017) patlıcanda anter kültüründe şeker yerine bal kullanılmasının etkisinin araştırıldığı çalışmada, farklı sakkaroz ve bal dozlarını karşılaştırmıştır. Büyüme düzenleyici olarak 2,4 D ve kinetinin farklı dozlarını kullanmıştır. En fazla sayıda embriyo oluşumu, bal ve şeker uygulamasında sırasıyla %18,35 ve %20,95 olarak bulunmuştur. Yamula patlıcan genotipinin, androgenesise daha olumlu cevap verdiği bildirilmiştir. En yüksek embriyo oluşumu 1,0 mg l⁻¹ kinetin + 3,0 mg l⁻¹ 2,4 D uygulamasından elde edilmiştir. Bal besin ortamında karbonhidrat kaynağı olarak sakkaroz yerine kullanılmış ve bu durum patlıcandaki anter kültürü çalışmasında, embriyo elde edilmesi üzerine olumlu etki göstermiştir. Besin ortamlarında bal kullanılmasının gerekliliğinin de ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Özsan ve Onus (2017), biberde anter kültüründe kullandığı ortamlara farklı konsantrasyonlarda (0,05 mg l⁻¹ biotin (B7), 0,05 mg l⁻¹ cobalamin (B12), 0,05 mg l⁻¹ folik asit (B9)) B vitamini ilave ederek farklı ortamlar elde etmişler ve farklı biber çeşitlerini kullanarak androgenesis üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışması sonucunda en fazla embriyo, 0,05 mg l⁻¹ biotin ve 0,05 mg l⁻¹ folik asitin MS ortamına ilave edildiği besin ortamlarından elde edilmiştir.

Kurt (2019), biberde ki anter kültürü çalışmalarında besin ortamında karbonhidrat kaynağı olarak maltoz ve sakkaroz kullanılmasının androgenesise etkisini incelemiştir. Çalışmada kullanılan anterler, 2 farklı şeker içerikli (maltoz ve sakkaroz) besin ortamı kombinasyonunda kültüre alınmışlardır. Çalışmada besin ortamı olarak, önceki çalışmalarda biber anter kültüründe olumlu sonuçların alındığı MS temel besin ortamı ve 0,1 mg l⁻¹ BAP + 4 mg l⁻¹ NAA + 2,5 mg l⁻¹ aktif karbon kullanılmıştır. Ortamlar değerlendirildiğinde, kallus oluşumu bakımından en olumlu sonuçların karbonhidrat kaynağı olarak maltoz ilavesi olan Petri'lerden elde edildiği bildirilmiştir. Karbonhidrat kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı besi ortamlarında ise çeşitlere bağlı olarak kısmen başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile biberde anter kültürü çalışmalarında karbonhidrat kaynağı olarak maltoz kullanımının kallus oluşumu üzerinde olumlu etkileri olduğu tespit edilmiştir.

2.6. İnkübasyon Koşulları

İnkübasyon esnasında ki çevresel koşullar arasında bulunan ışık, ya da sıcaklık gibi etkenler anter kültüründen sağlanacak olan başarıyı önemli derece de etkileyen faktörlerdendir.

Sibi vd. (1980) anter dikiminin ilk 2 günü 35 °C yüksek sıcaklık uygulanmasının, çiçek tomurcuklarının 4 °C soğuk ön uygulamasına kıyasla embriyogenesi daha etkili bir şekilde uyardığını bildirmişlerdir. Dumas de Vaultx vd. (1981) embriyo indüksiyonu için son derece etkili bir yöntem geliştirmişlerdir. Anterlerin 8 gün boyunca 35 °C ve karanlık koşullara maruz bırakılmasıyla, bu koşullarda daha kısa süre inkübasyona oranla daha iyi sonuçlar alındığını bildirmişlerdir.

Anterler ilk olarak karanlıkta, 20-30 °C arasında kültüre alınmaktadır. Daha sonra ki aşamalarda ışık yoğunluğu azaltılmakta ve değişik aydınlanma sürelerinde bekletilmektedir. Embriyo oluşumu gerçekleştikten sonra, rejenere olan bitkiler daha yüksek ışık yoğunluğuna alınır.

Anterlerde yüksek sıcaklık uygulamaları, birçok araştırmacı tarafından doğrulanmıştır (Çömlekçioğlu vd. 1999; Çömlekçioğlu, 2001; Ercan vd. 2001; Koleva-Gudeva vd., 2007; Büyükalaca vd., 2004; Ercan vd., 2006; Prayantini, 2006; Ercan ve Şensoy, 2011; Taşkın vd., 2011; Al Remi vd., 2014; Keleş vd., 2015; Arı vd., 2016 b). Kültürün ilk 8 günü 28,5 - 29 °C de ve sürekli ışık koşullarında geliştirilen anterlerden, 35 °C ve sürekli karanlık koşullara göre daha çok sayıda embriyo oluştuğu bildirilmiştir (Phillips vd., 1984; Terzioğlu, 2000; Başay vd., 2011).

Terzioğlu (2000), Kahramanmaraş biberi populasyonunda anter kültüründen elde edilen embriyo oranını artırmak amacıyla, inkübasyon koşulları bakımından değişik uygulamalar yapmıştır. Kültüre alınan biber anterleri, +35/25 °C sıcaklık ve karanlık/fotoperiyodik ışık rejimi, +29 °C'de ve sürekli 2000 lux ışık şiddetinde ışıklandırma rejimi olarak iki farklı inkübasyon koşulunda gelişmeye bırakılmıştır. +29 °C'de ve sürekli 2000 lux ışık şiddetinde ışıklandırma rejimi anter kültüründe embriyo oluşturmak için daha

olumlu bulunmuştur. Ancak bu rejimin, uygulama güçlüğü nedeniyle pratik olmadığını saptanmıştır.

Çömlekçioğlu (2001), Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber populasyonlarında kültürün ilk 2 günü anterlerin 35 °C sıcaklıkta ve karanlık koşullarda tutulduktan sonra, 28 °C de 16 saat fotoperiyodik koşullarda tutulmasıyla en olumlu sonuçların elde edildiğini bildirmiştir.

Hegde vd. (2017) çalışmasında farklı büyüme düzenleyiciler kullanarak elde ettiği ortamların kültür öncesi +35 °C de 7 gün sürekli karanlık koşullarda tutulduğunu bildirmiştir. Sıcaklık uygulamasının yapıldığı ortamlarda kallus oluşumunun daha fazla olduğunu tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada, Diyar F₁ Kapyra biber çeşidi bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

Proje kapsamında yarı katı ve çift fazlı besin ortamlarına biotin ve askorbik asit ilave edilerek 10 farklı besin ortamı bileşimi oluşturulmuştur. Söz konusu ortamların *in vitro* anter kültürü ile haploid embriyo oluşumuna etkileri üzerinde çalışılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

Diyar F₁ kapyra biber çeşidi donör bitki fideleri (3-4 gerçek yapraklı), torf içeren 15 litrelik saksılara 28.04.2019 tarihinde dikilmiştir (Şekil 3. 1).

Saksılar, ısıtılmayan polikarbon serada 60x60 cm aralıklarla seraya yerleştirilmiştir (Şekil 3. 2).

Bitkilerin gelişimi için gerekli gübreleme işlemleri ve bitkiler kontrol edilerek gerekli görüldüğünde (2-3 gün aralıklarla) sulama yapılmıştır.



Şekil 3. 1. Donör Bitki Fidelerinin Saksılara Dikilmesi



Şekil 3. 2. Serada Yetiştirilen Donör Bitkiler

Bitkilerin hastalık ve zararlılardan korunması, sağlıklı ve kimyasal ilaç kullanmadan yetiştirilmesine destek sağlamak amacıyla sık dokulu tül ile örtülmüş yüksek tünel kurulmuştur (Şekil 3. 3).



Şekil 3. 3. Serada Yetiştirilen Bitkilerin Örtülmesi

3.2.2. Çiçek tomurcuklarının toplanması

Bitkilerden çiçek tomurcuğu hasadına, 23.05.2019 tarihinde başlanmıştır. Önceki çalışmalarda biberde anter kültürü için en uygun tomurcuk gelişme dönemleri belirlenmiştir (Abak, 1983; Bajaj, 1984; Barroso vd., 2015). Yapılan çalışmalarda en uygun mikrospor gelişme dönemi, mayoz bölünmeyi izleyen tek çekirdekli birinci mitoz başlangıcı, I. mitoz bölünmesine geçmiş profaz aşaması, çoğunlukla geç tek çekirdekli mikrosporlar yanında erken çift çekirdekli dönemde mikrosporlar olarak belirlenmiştir. Anter kültürü için elverişli olan geç tek çekirdekli aşamadan erken çift çekirdekli aşamaya kadar olan mikrosporları bulunduran anterlerin kültüre alınması, başarı için ilk koşuldur. Tomurcuk toplanmasında yaklaşık 5 mm civarında ve korolla-kaliks boylarının eşit olduğu ya da korollanın kaliksten biraz büyük olduğu aşama esas alınmıştır.



Şekil 3. 4. Anter Kültürü İçin Elverişli Olan Tomurcuk Görüntüsü

Anter kültürü için elverişli olduğu bildirilen morfolojik gelişme dönemine sahip tomurcuklar, sabah saatlerinde toplanarak laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3. 4, Şekil 3. 5 ve Şekil 3. 6).



Şekil 3. 5. Çiçek Tomurcuklarının Toplanması

Embriyogenesinin başlatılması için en uygun mikrospor gelişim aşamasına sahip tomurcukların ve anterlerin morfolojik özellikleri, biber tür ve çeşitleri arasında farklılık göstermektedir. Bu durumda genellikle tomurcukların uzunluğu yaklaşık 5 mm civarında

olmakta, korolla ve kaliks boylarının eşit olduğu ya da korollanın kaliksten biraz daha büyük olduğu, aynı zamanda da anterlerin yaklaşık 1/3 veya en çok yarı boyuna kadar antosiyanin oluşumunun görüldüğü aşamada olduğu bilinmektedir.



Şekil 3. 6. Bitkilerden Toplanan Tomurcuklar

3.2.3. Çiçek tomurcuğunun dezenfeksiyonu

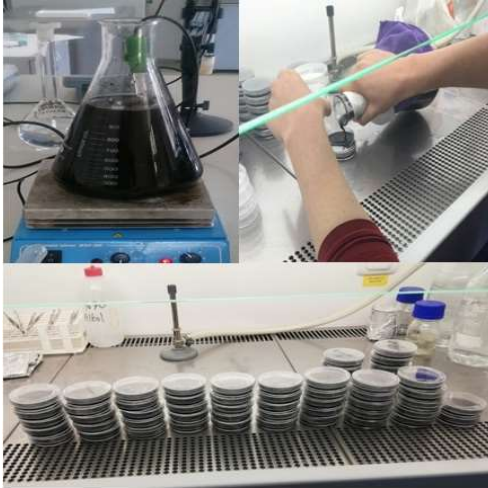
Laboratuvara getirilen tomurcuklar önce su ile daha sonra %70'lik etil alkol içinde 15-20 sn çalkalanmıştır. Daha sonra, çiçek tomurcukları sodyum hipoklorit içeren %10'luk ticari çamaşır suyu solusyonunda 15 dk tutulmuş ve ardından 3-4 kez steril saf su ile çalkalanarak dezenfekte edilmiştir (Şekil 3. 7).



Şekil 3. 7. Çiçek Tomurcuğu Dezenfeksiyonu

3.2.4. Besin ortamlarının hazırlanması

Doku kültürü uygulamalarının tümü, steril koşullar altında yapılmıştır. Dezenfekte edilen çiçek tomurcuklarından anterler steril kabin içinde izole edilmiştir. Temel besin ortamı olarak, 4 mg l⁻¹ NAA, 0,1 mg l⁻¹ BAP, % 0,25 aktif kömür, 30 g l⁻¹ sakkaroz ve 10 mg l⁻¹ AgNO₃ içeren MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır. Yarı katı ortam ve çift fazlı ortamın katı fazı için katılaştırma 7 g l⁻¹ agar ile sağlanmıştır. Denemelerde, 0,05 mg l⁻¹ biotin ve 0,5 mg l⁻¹ askorbik asidin ayrı ayrı ve birlikte kullanımıyla yarı katı ve çift fazlı ortamlar oluşturularak, toplamda 10 besin ortamı bileşiği çalışılmıştır. Katı besin ortamında ki agar, besin ortamının pH ölçümü yapılarak ve pH 5,6-5,8 olarak ayarlandıktan sonra ortama eklenmiştir (Şekil 3. 8, Şekil 3. 9).



Şekil 3. 8. Besin Ortamının Hazırlanması ve Petri Kaplarına Aktarılması



Şekil 3. 9. Kavanozlara Aktarılmış Çift Fazlı Ortamlar

3.2.5. Besin ortamları

Denemede kullanılan besin ortamları içerikleri ile birlikte Çizelge 3. 1’de verilmiştir.

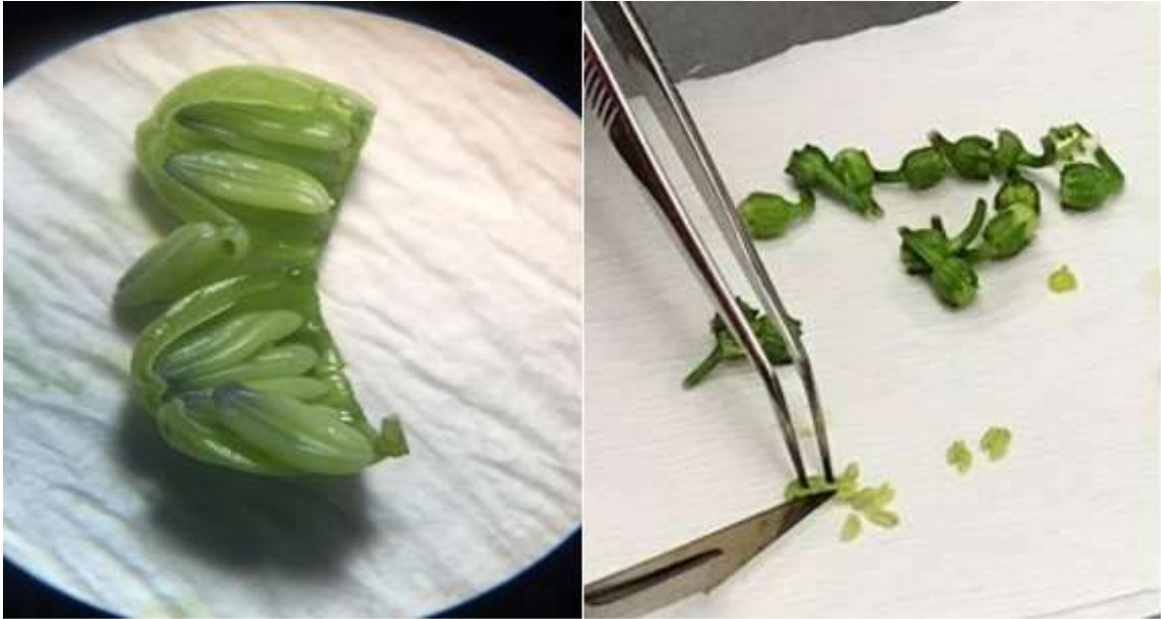
Çizelge 3. 1. Anter Kültürü Çalışmasında Kullanılan Besin Ortamları ve İçerikleri

Besin Ortamı	İçerik
M1 (KONTROL)	Yarı Katı MS + 4 mg l ⁻¹ NAA, 0,1 mg l ⁻¹ BAP, % 0,25 Aktif Kömür, 30 g l ⁻¹ Sakkaroz, 10 mg l ⁻¹ AgNO ₃ , 7 g l ⁻¹ Agar
M2	Yarı Katı M1 + 0,05 mg l ⁻¹ Biotin + 0,5 mg l ⁻¹ Askorbik Asit
M3	Yarı Katı M1 + 0,05 mg l ⁻¹ Biotin
M4	Yarı Katı M1 + 0,5 mg l ⁻¹ Askorbik Asit
M5	Yarı Katı MS + 4 mg l ⁻¹ NAA, 1 mg l ⁻¹ BAP, % 0,20 Aktif Kömür, 30 g l ⁻¹ Sakkaroz, 10 mg l ⁻¹ AgNO ₃ , 7 g l ⁻¹ Agar + 0,05 mg l ⁻¹ Biotin + 0,5 mg l ⁻¹ Askorbik Asit
M6	Çift Fazlı M1 + 4 mg l ⁻¹ NAA, 0,1 mg l ⁻¹ BAP, % 0,25 Aktif Kömür, 30 g l ⁻¹ Sakkaroz, 10 mg l ⁻¹ AgNO ₃
M7	Çift Fazlı M2 + 4 mg l ⁻¹ NAA, 0,1 mg l ⁻¹ BAP, % 0,25 Aktif Kömür, 30 g l ⁻¹ Sakkaroz, 10 mg l ⁻¹ AgNO ₃ , 0,05 mg l ⁻¹ Biotin + 0,5 mg l ⁻¹ Askorbik Asit
M8	Çift Fazlı M3 + 4 mg l ⁻¹ NAA, 0,1 mg l ⁻¹ BAP, % 0,25 Aktif Kömür, 30 g l ⁻¹ Sakkaroz, 10 mg l ⁻¹ AgNO ₃ + 0,05 mg l ⁻¹ Biotin
M9	Çift Fazlı M4 + 4 mg l ⁻¹ NAA, 0,1 mg l ⁻¹ BAP, % 0,25 Aktif Kömür, 30 g l ⁻¹ Sakkaroz, 10 mg l ⁻¹ AgNO ₃ + 0,5 mg l ⁻¹ Askorbik Asit
M10	Çift Fazlı M5 + 4 mg l ⁻¹ NAA, 1 mg l ⁻¹ BAP, % 0,20 Aktif Kömür, 30 g l ⁻¹ Sakkaroz, 10 mg l ⁻¹ AgNO ₃ + 0,05 mg l ⁻¹ Biotin + 0,5 mg l ⁻¹ Askorbik Asit

3.2.6. Besin ortamı sterilizasyonu ve anterlerin besin ortamına dikimi

Besin ortamının sterilizasyonu, 1,2 atmosfer basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika sürede otoklavda yapılmıştır.

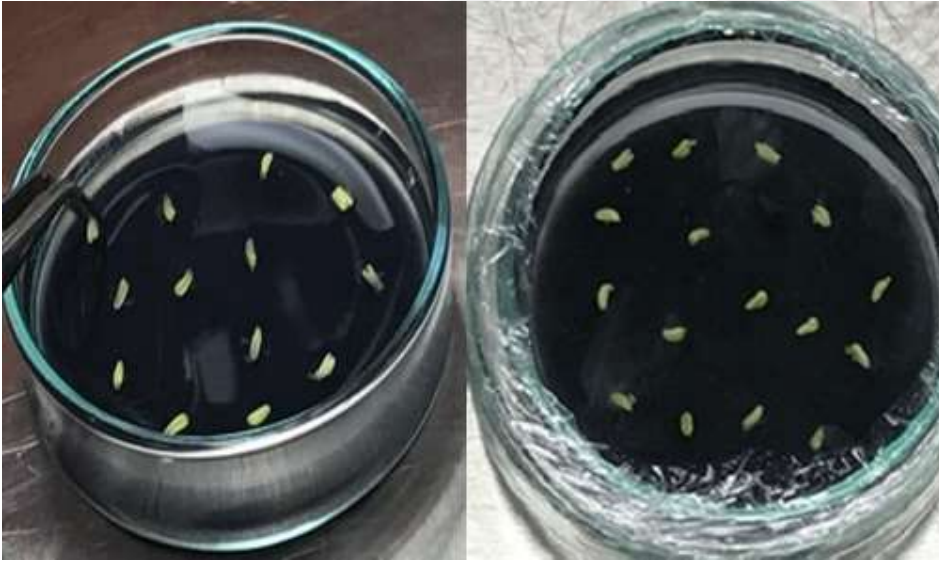
Bisturi ve bir pens yardımıyla filamentler dikkatlice kesilerek, tomurcuktan çıkarılmış anterler besin ortamı üzerine, dorsal yüzeyi ortamla temas edecek biçimde ve ortama batırılmaksızın besi ortamlarına yerleştirilmiştir (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11). Her Petri kabına, 2 tomurcuktan elde edilen 10 adet anter dikilmiştir. Dikim işlemi tamamlanan Petri kaplarının kenarları parafilm ile sarılarak, dış çevre koşullarıyla teması engellenmiştir. Tek fazlı yarı katı ortamlar için steril Petri kabı (7 cm), çift fazlı ortamlar için 100 ml'lik cam kavanoz kullanılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.10. Anterlerin Bistüri Yardımıyla Ayrılması



Şekil 3.11. Anterlerin Besin Ortamına Dikimi



Şekil 3.12. Anterlerin Petri Kabındaki Görüntüsü

3.2.7. Kültüre alınan anterlere stres uygulanması ve inkübasyonu

Anter dikimi tamamlanan Petri kutuları, 2 gün süreyle sürekli karanlık koşullarda, 35 °C de yüksek sıcaklık şoku uygulamasına tabi tutulmuştur. Daha sonra, 25 °C sıcaklık ve yaklaşık 1000 lux ışık şiddetinde (Testo 540 lüx metre; Germany) 16/8 saatlik

aydınlık/karanlık fotoperiyodik düzene ayarlanmış iklim odasına alınmış ve gözlem yapılmıştır (Şekil 3. 13 ve Şekil 3.14).



Şekil 3.13. Anterlere Etüvde 35 °C ve Karanlık Koşullarda Sıcaklık Şoku Uygulaması



Şekil 3.14. İklim Odasında Fotoperiyodik Koşullarda Gelişmekte Olan Anterler

3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi

Çalışma, 5 tekerrürlü ve her tekerrürde 5 kültür kabı (Petri veya cam kavanoz) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir kültür kabına, iki çiçek tomurcuğundan elde edilen 10 anter dikilmiştir. Her bir besiyerinde, 25 kültür kabı ve 250 anter kullanılmıştır.

Her besin ortamından elde edilen toplam embriyo sayıları belirlenmiştir. Bu değerlerden tomurcuk başına elde edilen embriyo sayıları ve 100 anter başına düşen embriyo sayılar hesaplanmıştır.

Denemelerden elde edilen veriler, Tarist İstatistik Programı (Açıkgöz vd., 2004) kullanılarak tesadüf blokları deneme deseninde varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farkların önemi, Duncan testi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Denemede 10 farklı besi ortamlarında oluşan toplam embriyo sayıları, tomurcuk başına elde edilen embriyo sayıları, 100 anter başına düşen embriyo sayısı hesaplanarak androgenesis tepkisi bakımından en uygun besi ortamının belirlenmesine çalışılmıştır.

4.1. Besin Ortamlarından Elde Edilen Haploid Embriyo Sayıları

Anter kültürü yöntemi kullanılarak haploid embriyo elde etme amacıyla, yarı katı ve çift fazlı olmak üzere hazırlanan ve 0,05 mg l⁻¹ biotin ve 0,5 mg l⁻¹ askorbik asitin ayrı ayrı veya birlikte ilave edilmesiyle oluşturulan 10 farklı MS besin ortamı denenmiştir.

Yapılan varyans analiz sonuçları incelendiğinde, çalışılan her besin ortamından elde edilen haploid embriyo sayılarının önemli farklılıklar ($P \leq 0,01$) gösterdiği belirlenmiştir. Çizelge 4. 1'de farklı ortamlara göre elde edilen embriyo sayılarına ait varyans analiz tablosu ve Çizelge 4. 2'de her besin ortamında rejenere olan toplam embriyo sayıları sunulmuştur.

Çizelge 4. 1. Ortamlardan Elde Edilen Embriyo Sayılarının Varyans Analiz Tablosu

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	Tablo Değeri %5	Tablo Değeri %1
Tekerrür	4	4,172	1,043	1,315 ns	2,740	4,140
Ortam	9	859,600	95,511	120,383**	2,278	3,208
Hata	26	20,628	0,793			
Genel	39	884,400	22,677			

ns = ÖTMnemsiz (not significant)

* = ÖTMnemli %5 alfa seviyesinde (significant at alfa level %5)

** = ÖTMnemli %1 alfa seviyesinde (significant at alfa level %1)

Denemede kontrol olarak çalışılan M1 ortamından, toplam 9 embriyo elde edilmiştir. Buna karşılık hem 0,05 mg l⁻¹ biotin hem de 0,5 mg l⁻¹ askorbik asit içeren M2 ortamından en yüksek sayıda embriyo (80) gelişmiştir. Besin ortamında biotin veya askorbik asitin sadece birinin bulunması durumunda da, kontrole göre artış sağlanmıştır. Bu artış, sadece biotin olması durumunda (M3) askorbik asit bulunması durumuna göre (M4) daha yüksek bulunmuştur. Yarı katı M3, M4 ve M5 ortamlarından sırasıyla 13, 11 ve 12 embriyo rejenere olmuştur.

B vitaminleri, başta bitki olmak üzere tüm canlı organizmaların metabolik aktiviteleri üzerinde olumlu etkilere sahiptir. B vitaminlerinin bilinen en önemli görevlerden birisi enzim katalizli reaksiyonlarda kofaktör olarak rol oynaması ve bitkilerde birçok metabolik aktiviteye katkıda bulunmasıdır. Bitkilerdeki ozmotik ve oksidatif streslere tolerans sağlarlar (Roje, 2007).

Özsan ve Onus (2017), MS ortamında 0.05 mg l⁻¹'lik aynı oranda farklı B vitamini türleri (biotin - B7 vitamini, folik asit - B9 vitamini, kobalamin - B12 vitamini) ilave edilen besin ortamlarında, en iyi androgenik sonuçlarının biotin ve folik asit içeren ortamlardan sağlandığını bildirmişlerdir. B vitaminlerinin, bitkilerdeki en popüler antioksidan vitaminler olan karotenoidler (A vitamini yanlısı), tokokromolanoller (E vitamini, tokoferoller ve tokotrienoller) ve askorbat (C vitamini) gibi antioksidanlar olarak önemli bir rol oynayabileceğini bildirmiştir.

Bitkilerde osmatik ve oksidatif streslere tolerans sağlayan askorbik asit bir antioksidan olduğu için ister endojen olarak bitkinin bünyesinde bulunsun isterse eksojen olarak uygulandığında, mikrospor canlılığını arttırarak embriyogenesi arttırdığı bildirilmiştir. Askorbik asit bitkide ki oksidatif streslerin azalmasına neden olmakta, bu durum mikrosporların ölümünü azaltarak elde edilen embriyoların artmasına etki etmektedir (Zeng vd., 2015).

M5 ortamı M2 ortamıyla aynı içeriğe sahip olup, farklı olarak 2,5 g l⁻¹ yerine 2,0 g l⁻¹ aktif kömür ve 0,1 mg l⁻¹ BAP yerine 1 mg l⁻¹ BAP içermektedir (Çizelge 4. 2). Aktif kömürdeki bu azalma ve BAP oranındaki artış embriyo sayısında önemli düşüşe neden

olmuştur. Buna göre besin ortamına ilave edilen aktif kömürün ve BAP oranındaki seviyesinin de embriyo oluşumunda etkili olduğu tespit edilmiştir.

Tıprıdamaz ve Ellialtıoğlu (2002), aktif kömürün çift fazlı sistemde besin ortamına eklenmesiyle, kullanılan çeşitlerde ve uygulama koşullarında embriyo oluşturma üzerine etki etmediğini tespit etmişlerdir. Aktif kömürün sadece anterlerde ki ABA miktarında azaltmaya neden olduğunu ve tek başına ABA miktarının anter kültüründeki başarı üzerinde önemli derecede etkili bir faktör olmadığını bildirmişlerdir. Terzioğlu (2000), Kahramanmaraş biber genotiplerinde besin ortamına aktif kömür ilavesinin embriyo oluşumu üzerinde olumlu etkileri olduğunu tespit etmiştir. Buna karşılık Al Remi (2013), farklı oranlarda hormon içeren besin ortamına aktif kömür ile birlikte gümüş nitrat ilavesi yapıldığında, bazı genotiplerde düşüşlerin yaşandığını, bazı durumlarda da artışların meydana geldiğini tespit etmiştir.

Sayılr ve Özzambak (2002), besin ortamına %0,1 aktif kömür eklenen ortamda Ege acı sivri genotipinde aktif kömür eklenmemiş ortama göre daha yüksek embriyo elde ettiklerini bildirmişlerdir.

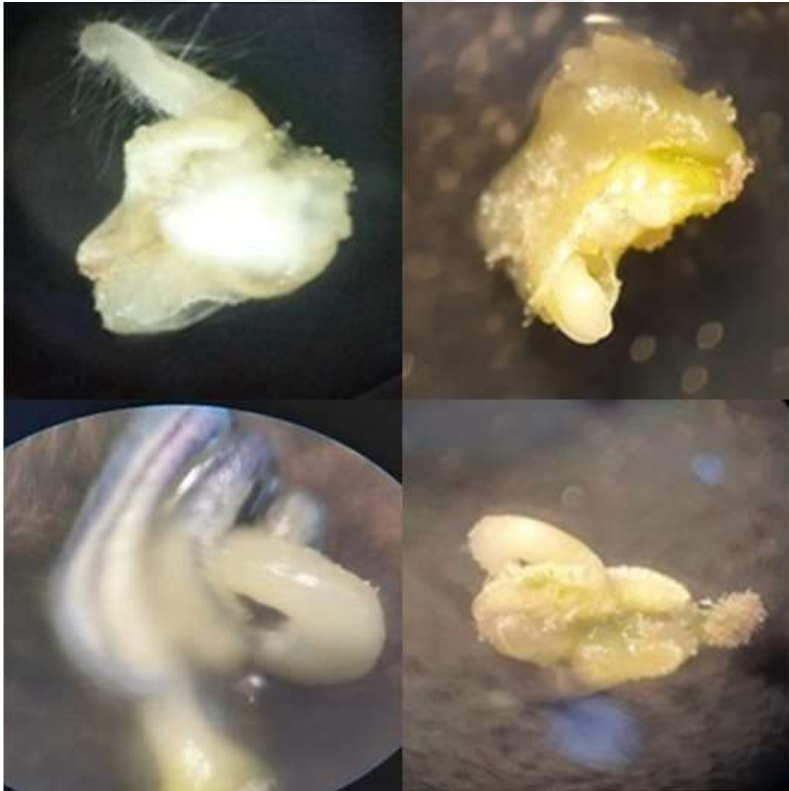
Çizelge 4. 2. Ortamlara Göre Elde Edilen Toplam Embriyo Sayıları

	Ortam	Ortamlardan Elde Edilen Toplam Embriyo Sayısı
Yarı Katı	M1	9 bc
	M2	80 a
	M3	13 b
	M4	11 bc
	M5	12 b
Çift Fazlı	M6	0 c
	M7	5 bc
	M8	11 bc
	M9	5 bc
	M10	10 bc

Yarı-katı ortamlardan toplam 125 embriyo ve çift fazlı ortamlardan toplam 31 embriyo oluşmuştur. Yarı katı ortamlardan gelişen embriyo sayısı, çift fazlı ortama göre dört kat artış göstermiştir. Katı ve sıvı fazın bir arada bulunduğu çift fazlı besin ortamının, hem alt tabakasını oluşturan katı hem de üst tabakasını oluşturan sıvı kısmı aynı bileşenleri içermektedir. Katı olan alt tabakadaki besin ortamı, üst fazdan farklı olarak sadece 7 g l⁻¹ agar içermektedir. Yarı katı besin ortamında çift fazlı besin ortamına göre, embriyo elde etme başarısının daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4. 1, Şekil 4. 2).

Yıldırım (2016), süs biberi bitkisinde 50 rpm/dk hızındaki orbital sallanan çalkalayıcı kullanılanılarak elde edilen ortam ile çalkalayıcı kullanılmayan durağan ortamı toplam ve globular embriyo oluşturma yönüyle karşılaştırmıştır. Çalkalayıcılı ortamdaki kültürlerde, daha yüksek sayıda toplam embriyo ve globular embriyo oluştuğunu saptamıştır.

Bu çalışmada ise çalkalayıcı kullanılmamış fakat çift fazlı ortam kullanılmıştır. Çift fazlı besin ortamına göre, yarı katı besin ortamlarından daha fazla embriyo elde edildiği tespit edilmiştir.



Şekil 4. 1. Gelişim Gösteren M3 Ortamındaki Embriyo Görüntüleri



Şekil 4. 2. Biotin ve Askorbik Asitin Birlikte Kullanıldığı Ortamlardan Elde Edilen Bazı Embriyolar

Çift fazlı ortamlardan M8 (11 embriyo) ve M10 (10 embriyo), diğerlerine göre daha başarılı bulunmuştur. M10 ortamı, M7 ortamından farklı olarak 2,5 g l⁻¹ yerine 2,0 g l⁻¹ aktif kömür ve 0,1 mg l⁻¹ BAP yerine 1 mg l⁻¹ BAP içermektedir. Aktif kömürde ve BAP oranında yapılan bu değişiklik, yarı katı ortamın aksine embriyo oluşumuna önemli oranda katkı sağlamıştır. M7 ortamında 5 olan embriyo sayısı 2 kat artış göstermiş ve M10'da 10 embriyo olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, M6 ortamında embriyo rejenerasyonu sağlanamamıştır. Yarı katı ortamlar genel olarak, çift fazlı ortamlardan daha başarılı olmuştur.

Buna karşılık bazı araştırmacılar (Arı vd., 2016 a; Erim 2019), çift katmanlı besin ortamının katı ortamı sayesinde gelişen mikrospor ve embriyoların şeker kaynağı ihtiyacının karşılanmış olduğunu ve aktif kömürün faydalarından yararlanıldığını, mikrosporların sıvı ortam içerisinde serbestçe ve daha rahat gelişerek embriyolar oluşturduklarını bildirmişlerdir. Embriyoların gözlemlenmesi ve çimlendirmeye alınmasının çok daha pratik olduğunu bununla birlikte kullanılan ortamlardan yarı katı kültür ortamının diğer ortama göre daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Buna rağmen biber yetiştiriciliğinde dihaploid hatların gelişimi için çift fazlı kültür ortamının da etkin bir şekilde kullanılabilirliği bildirilmiştir.

4.2. Besin Ortamlarından Tomurcuk Başına Elde Edilen Embriyo Sayısı

Çizelge 4. 3'de farklı ortamlara göre elde edilen tomurcuk başına embriyo sayılarına ait varyans analiz tablosu ve Çizelge 4. 4'de her besin ortamında rejenere olan tomurcuk başına embriyo sayıları sunulmuştur. Yapılan varyans analiz sonuçları incelendiğinde, çalışılan her besin ortamından elde edilen tomurcuk başına embriyo sayılarının önemli farklılıklar ($P \leq 0.01$) gösterdiği belirlenmiştir.

Denemede kullanılan çiçek tomurcukları korolla ve kaliks boylarının eşit olduğu veya korollanın kaliksten biraz daha büyük olduğu dönemde toplanmıştır. Bu tomurcuk büyüklüğünde bulunan anterler, aynı zamanda yaklaşık 1/3 kadar antosiyanin oluşumunun görüldüğü aşamadır. Her Petri kabına, 2 tomurcuktan izole edilen 10 anter olacak şekilde dikim işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4. 3. Tomurcuk Başına Embriyo Sayısı Varyans Analiz Tablosu

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	Tablo Değeri %5	Tablo Değeri %1
Tekerrür	4	1,718	0,429	2,197 ns	2,740	4,140
Ortam	9	213,475	23,719	121,350**	2,278	3,208
Hata	26	5,082	0,195			
Genel	39	220,275	5,648			

ns = ÖTMnemsiz (not significant)

* = ÖTMnemli %5 alfa seviyesinde (significant at alfa level %5)

** = ÖTMnemli %1 alfa seviyesinde (significant at alfa level %1)

Tomurcuk başına elde edilen ortalama embriyo sayılarına bakıldığında, en yüksek embriyo sayısı M2 ortamından (80 embriyo) elde edilmiştir. Diğer ortamlarla karşılaştırıldığında, yarı katı M2 ortamı içerisinde ilaveten biotin ve askorbik asit birlikte bulunmaktadır. Besin ortamına biotin ve askorbik asit ilave edilmesi, androgenesiste önemli pozitif etki yaratmıştır.

Arı vd. (2016 a) tomurcuk morfolojisi belirlemede, anter ucundaki antosiyaninleşme oranının yeşil bitki tomurcuklarında %10-40 olarak tespit ederken, antosiyaninli bitkilerde %70-90 olarak tespit etmiş ve dış görünüşü antosiyaninli genotipler için uygun bir markör olarak kullanılamayacağını ifade etmişlerdir.

Yarı katı M1 ve çift fazlı M7, M8, M9 ve M10 ortamlarından, tomurcuk başına sırasıyla 0,18, 0,10, 0,22, 0,10 ve 0,20 embriyo rejenere olmuştur. M1 ortamı M6 ortamı ile aynı içeriğe sahip olup, farklı olarak agar içermektedir. Tomurcuk başına M1 ortamından 0,18 embriyo elde edilirken, M6 ortamında embriyo gelişmemiştir (Çizelge 4. 4).

M7, M8, M9 ve M10 besin ortamlarının içerikleri M1 besi ortamına göre birbirinden farklı olmasına rağmen, elde edilen verilerde istatistiksel olarak önemli bir fark gözlemlenememiştir.

Çizelge 4. 4. Tomurcuk Başına Embriyo Sayısı

ORTAM	Tomurcuk Başına Embriyo Sayısı
M1	0,18 bc
M2	1,6 a
M3	0,26 b
M4	0,22 b
M5	0,24 b
M6	0,0 c
M7	0,1 bc
M8	0,22 bc
M9	0,1 bc
M10	0,2 bc

M3, M4 ve M5 besin ortamından sırasıyla 0,26, 0,22 ve 0,24 tomurcuk başına embriyo ve M1, M7, M8, M9 ve M10 besin ortamlarından da sırasıyla 0,18, 0,1, 0,22, 0,1 ve 0,2 tomurcuk başına embriyo oluşmuştur. Oluşan embriyolara ait bazı görüntüler Şekil 4. 3'de verilmiştir.



Şekil 4. 3. Farklı Besin Ortamlarında Elde Edilen Gelişmekte Olan Embriyolar

Yıldırım (2016)'a göre durağan ortamda kültüre alınan 29 genotipten 13 adedi bulundukları ortama tepki göstermiş olup, bu genotiplerden tomurcuk başına 0,14 ile 4,69 arasında embriyo elde edilmiştir. Performansı en yüksek olan genotipin, 4,7 embriyo ortalaması ile diğer genotiplerden farklı olduğunu tespit etmiştir.

Denemede kültüre alınan genotipte ise tomurcuk başına 0,0 ile 1,6 arasında embriyo elde edilmiş olup, en yüksek performans tomurcuk başına 1,6 embriyo sayısı ile M2 ortamında kaydedilmiştir.

4.3. Besin Ortamlarından 100 Anter Başına Düşen Embriyo Sayısı

Yapılan varyans analiz sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4. 5), çalışılan her besin ortamından elde edilen 100 anter başına embriyo sayılarının önemli farklılıklar ($P \leq 0.01$) gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4. 5. Yüz Anterden Elde Edilen Embriyo Sayısı Varyans Analiz Tablosu

Varyans Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	Tablo Değeri %5	Tablo Değeri %1
Tekerrür	4	19,687	4,922	1,562 ns	2,740	4,140
Ortam	9	3454,375	383,819	121,829**	2,278	3,208
Hata	26	81,913	3,150			
Genel	39	3555,975	91,179			

ns = ÖTMnemsiz (not significant)

* = ÖTMnemli %5 alfa seviyesinde (significant at alfa level %5)

** = ÖTMnemli %1 alfa seviyesinde (significant at alfa level %1)

M1 (Kontrol) ortamında 9 embriyo, M1 ortamına ilaveten 0,05 mg l⁻¹ biotin + 0,5 mg l⁻¹ askorbik asit eklenen M2 ortamından ise aynı genotip, aynı koşullar altında yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerden dikim yapılmasına rağmen 80 adet embriyo elde edilmiştir. M2 ortamında elde edilen embriyo verimi 32 embriyo/100 anter olarak hesaplanmış ve kontrole göre 7,88 kat artış sağlamıştır (Çizelge 4. 6).

Shimira vd. (2019) yaptıkları çalışmalarında, kullanılan genotip için 100 anter başına elde edilen en yüksek embriyo sayısının 55,37 olduğunu söylemiştir.

Besin ortamındaki biotin embriyogenesise etkileri konusunda yapılan çalışmada Al-Khayri (2001), hurmada biotin ve tiamin konsantrasyonlarının kallus büyümesi ve somatik embriyogenesis üzerindeki etkisinin, türlere ve dozlara göre değiştiğini bildirmiştir. Besin ortamı 0,1 mg l⁻¹ biotin içerdiğinde elde edilen kallus miktarında artışa, 1 mg l⁻¹ biotin içerdiğinde ise kallustaki rejenerasyon oranındaki artışa neden olduğunu bildirmiştir. Besin ortamı 2 mg l⁻¹ biotin içerdiğinde, oluşan kallus miktarında önemli bir artışa neden olmadığı tespit edilmiştir. En iyi kallus gelişimi ve embriyo oluşumu 0,5 mg l⁻¹ tiamin ve 2 mg l⁻¹ biotin kombinasyonlarından elde edilmiştir. Araştırmacı ortamlara ilave edilen tiamin konsantrasyonun, embriyo oluşumuna etkisinin biotin dozuna bağlı olduğunu bildirmiştir.

Biotin içeren M3 ortamı, M1 ortamına göre 0,44 kat önemli bir artış göstermiştir. Bu ortamdan, 5,20 embriyo/100 anter oranında embriyo elde edilmiştir.

Bu çalışmada kullanmış olduğumuz MS besin ortamı: nikotinik asit, pyridoksin, glicin, myo inositol yanında, 0,10 mg l⁻¹ tiamin içermektedir. MS temel besin ortamına ilave edilen biotin, embriyo oluşumuna etkisinin önemli olduğu tespit edilmiştir.

Mikrospor embriyogenesisini tetiklemek için tek başına yada kombinasyon halinde birkaç abiyotik stres kullanılır. Anterlere ön uygulama olarak yapılan yüksek sıcaklık, soğuk şokları gibi abiyotik stresler, mikrospordan embriyogenesisin teşvik edilmesi için gereklidir. Bu stres koşulları altında mikrospordan embriyoya dönüşümü sağlanmakta, ancak bu stres koşulları mikrospordan ölümüne de sebep olmaktadır. Bu mikrospordan ölüm sebebi olan strese karşı antioksidan olarak askorbik asit ilave edilmesi, mikrospor canlılığını korumuş ve embriyo elde edilmesindeki başarıda artış olduğu tespit edilmiştir.

Abrahamian ve Kantharajah (2011), vitaminlerin bitkilerde sentezlenen ve kullanılan gerekli bileşikler olduğunu, doku kültürü ortamında bitkilerin ihtiyaç duyduğu vitamin miktarının türlere göre değişiklik gösterdiğini ve tam olarak bu miktarların ne kadar olduğunu bilinmediğini bildirmişlerdir. Vitaminlerin ortamda bulunan diğer bileşenlerle kombinasyon halinde bulunması: kallus büyümesi, somatik büyüme ve köklenme üzerinde doğrudan yada dolaylı olarak bir etki göstermektedir. Antioksidatif özellikleriyle bilinen askorbik asit ortama ilave edildiğinde, büyüme ve köklenmenin yanında sürgün oluşumunu da arttırdığı da bildirilmiştir.

M4 ortamına M1 ortamından farklı olarak 0,5 mg l⁻¹ askorbik asit eklenmiş olup, M1 ortamına göre elde edilen embriyo sayısında 0,22 kat bir artış gözlemlenmiş olmasına rağmen, bu fark istatistiki anlamda önemli bulunmamıştır (Çizelge 4. 6).

M7 ve M9 çift fazlı ortamlarında da M1 yarı katı ortamına göre, embriyo elde edilmesinde 0,44 kat oranında önemli bir düşüş görülmüştür.

Çizelge 4. 6. Besin Ortamının Bileşimine Göre Anterlerden Elde Edilen Embriyo Sayıları

Ortam	250 Anterdeki Embriyo Sayısı	100 Anterdeki Embriyo Sayısı	M1 (Kontrol) Ortamına Göre Değişim Katları
M1	9	3,6 bc	---
M2	80	32 a	+7,88
M3	13	5,2 b	+0,44
M4	11	4,4 bc	+0,22
M5	12	4,6 b	+0,27
M6	0	0,0 c	-0
M7	5	2,0bc	-0,44
M8	11	4,4 bc	+0,22
M9	5	2,0 bc	-0,44
M10	10	4,0 bc	+0,11

M5 besin ortamına M1 besin ortamından farklı olarak, 0,1 mg l⁻¹ BAP ve % 0,25 aktif kömür yerine 1 mg l⁻¹ BAP ve % 0,20 aktif kömür 0,05 mg l⁻¹ biotin + 0,5 mg l⁻¹ askorbik asit ilave edilmiştir. Bu durumda elde edilen embriyo sayıları arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir.

MS ortamı bileşiminin biber anter kültüründe olumlu etkisi, birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Pundeva vd. 1986; Chunling 1992). Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz (1997), MS temel besin ortamına 4 mg l⁻¹ NAA ve 0,1 veya 1 mg l⁻¹ BA ilave edilmesinin, biber anter kültürü çalışmasında oldukça olumlu sonuçlar elde edilmesini sağladığını ifade etmişlerdir. Ata (2011), farklı besin ortamlarından en yüksek embriyo oranının 4 mg l⁻¹ NAA, 0,5 mg l⁻¹ BAP, %0,25 aktif kömür ve 30 g l⁻¹ sakaroz ile 15 mg l⁻¹ AgNO₃ içeren MS ortamında %26,47 olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda ise MS besin ortamına 0,05 mg l⁻¹ biotin ve 0,5 mg l⁻¹ askorbik asitin birlikte ilave edilmesiyle embriyo verimi 32 embriyo/100 antere yükselmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biber dünyada ve ülkemizde ekonomik olarak üretilen ve yaygın olarak tüketilen en önemli sebzelerden birisidir. Biberde tüketici isteklerine yönelik, yüksek verimli ve kaliteli aynı zamanda çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarına tolerant yeni çeşitlerin geliştirilmesi ıslahçıların önemli çalışma konuları arasındadır.

Doku kültürü yöntemlerinden anter kültürü ıslah yöntemlerinin hızlandırılması için kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Belirli bir gelişme aşamasındaki mikrosporlar gerek izole edilmiş olarak gerekse bu mikrosporları içeren anterlerin kültüre alınmasıyla kısa sürede stabil DH bitkileri oluşturmak için uyarılabilir. Yüksek verimli, hastalık direnci olan ve yüksek kalite özelliklerine sahip yeni çeşitlerin ıslah sürecini hızlandırmak için optimize edilmiş kültür değişkenlerine sahip tekrarlanabilir bir anter kültür tekniği geliştirmek başarının önemli bir basamağını oluşturmaktadır.

Son yıllarda anter kültürü yöntemi kullanılarak haploid ve DH bitki elde etme çalışmaları bitki ıslahçı firmaları tarafından rutin olarak kullanılmakla birlikte, androgenesis başarısını etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Bu nedenle kullanılan protokollerin gerek standart hale getirilmesi gerekse başarı oranı yüksek yeni protokollerin geliştirilmesine ihtiyaç devam etmektedir.

Biberde androgenesis konusunda yapılmış çok sayıda araştırma (Çömlekçioğlu ve Ellialtıoğlu, 2018) bulunmasına karşılık farklı genotipler için rutin olarak uygulanacak, başarı oranı yüksek bir metot bulunmamaktadır. Başarı oranının yükseltilmesi için mevcut yöntemlerin geliştirilmesi ve etkili metotlar haline getirilmesi çalışmaları devam etmelidir.

Bu çalışmada haploid embriyo verimini arttırmak amacıyla 10 farklı besin ortamı denenmiştir. Denemede askorbik asit ve biotinin birlikte ve ayrı ayrı uygulanmasıyla elde edilen embriyo sayılarında önemli artışlar tespit edilmiştir. Besin ortamına farklı olarak biotin ilave edilen ortamdan (M3) elde edilen embriyo sayısı farklı olarak sadece askorbik asit (M4) ilave edilen ortamdan elde edilen embriyo sayısından daha fazladır. Bu durumda da biotinin askorbik asite göre anter kültüründe embriyo elde etme konusunda daha başarılı

olduğu sonucuna varılmıştır. Biotin ve askorbik asitin birlikte kullanıldığı durumda ayrı ayrı kullanıldıklarından daha yüksek sayıda embriyo elde edilmiş olup sinerjik bir etki oluşturdukları tespit edilmiştir.

Aynı besin kompozisyonları çift fazlı ve yarı katı ortamlar olarak kullanılmıştır. Çift fazlı ve yarı katı olarak uygulanan ortamlardan yarı katı ortamdan elde edilen embriyo sayısı çift fazlı ortama göre daha başarılı bulunmuştur.

Vitaminler bitkilerde sentezlenen ve kullanılan gerekli bileşiklerdir. Sonuç olarak, bu çalışma kültür ortamındaki vitamin içeriğinin biber anter kültüründe embriyo oluşumunda önemli bir faktör olduğunu göstermiştir.

Bundan sonra yapılacak anter kültürü çalışmalarında, gerek farklı dozlarda B vitamini türleri (B7-biyotin, B2-riboflavin, B9-folat, B12-cobalamin gibi) denenmesi, bunlarla birlikte karotenoidler, E vitamini (tokoferol) gibi diğer vitaminlerin de antioksidan olarak değerlendirilmesinin embriyo veriminin arttırılmasına önemli bir katkı sağlayabileceği tavsiye edilmektedir.

Bunun ile birlikte farklı biber genotiplerinde yanıtlarının değerlendirilmesinin faydalı ve önemli olduğu ve embriyo veriminin arttırılmasına önemli bir fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abak, K., 1983, Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Etme Üzerinde Araştırma. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı. Cilt: 33, 155-163.
- Abrahamian, P., Kantharajah, A., 2011, "Effect of Vitamins On *In Vitro* Organogenesis of Plant" American Journal of Plant Sciences, Vol. 2 No. 5, 2011, Pp. 669-674.
- Açıkgöz, N., İlker, E., Gökçöl, A., 2004, Biyolojik Araştırmaların Bilgisayarda Değerlendirilmeleri, Ege Üniversitesi Tohum Teknolojisi Uyg. ve Araş. Merkezi Yayınları No:2, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi, Bornova-İzmir, 202 s.
- Al Remi, F., 2013, Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültüründe Genotip ve Besin Ortamının Etkisi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. s:15-47
- Al Remi, F., Taskın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S., Ellialtıoğlu, Ş., 2014, Effect of Genotype and Nutrient Medium on Anther Culture of Pepper (*Capsicum annuum* L.). Turkish J. Agr. Natural Sci. 1:108–116.
- Al-Khayri, J.M., 2001, Optimization of Biotin and Thiamine Requirements for Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 37(4): 453-456.
- Anonim, 2020, ‘Worldometer World Population’ <https://www.worldometers.info/world-population> Erişim Tarihi: 7 Nis 2020.
- Andrews, J., 1985, Peppers. the Domesticated Capsicum. University of Texas Pres, Box 7819 Austin, Texas 78713.
- Ari, E., Bedir, H., Yildirim, S., Yıldırım, T., (2016 a), Androgenic Responses of 64 Ornamental Pepper (*Capsicum annuum* L.) Genotypes to Shed-Microspore Culture in Autumn Season. Turkish Journal of Biology, 40 (3): 706-717. Doi: 10.3906/biy-1505-41.
- Ari, E., Yildirim, T., Mutlu, N., Büyükalaca, S., Gökmen, Ü., Akman, E. (2016 b), Comparison of Different Androgenesis Protocols for Doubled Haploid Plant Production in Ornamental Pepper (*Capsicum annuum* L.). Turkish Journal Of Biology, 40(4), 944–954. <https://doi.org/10.3906/biy-1509-36>
- Arjun, H. M., Rajesh, B., Vijay Goud, S., Lokesh, S., Sateesh Kumar, P., 2020, Effect of Pre and Post Culture Temperature Treatments on Direct Microspore Embryogenesis In Indian Chilli Pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology, 21(1-2), 49-58

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Ata, A., 2011, Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültüründe Mevsim Etkisi ve Mikrospor Gelişimi Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans tezi. s 89.
- Ayar, F., 2003, Bazı Biber (*Capsicum annuum* L.) Çeşitlerinde Anter Kültürü Yöntemiyle Haploid Bitki Elde Edilmesinde Mevsimin ve Bitki Yaşının Etkilerinin Araştırılması. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi s.82.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., Editörler; 2002, Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya.
- Bajaj YPS., 1984, *In Vitro* Production of Haploids. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y(Eds) Handbook of Plantcell Culture, Vol I. Macmillan, New York, p 228-287.
- Bajaj YPS.,1990, *In Vitro* Production of Haploids and Their Use İn Cell Genetics and Plant Breeding. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 12. Haploids in Crop Improvement I. Springer, Berlin, pp 3-44.
- Bal, U., Abak, K., Büyükalaca, S., Comlekcioglu N., 2003, Development of Callus Colonies From The Isolated Microspore Culture of *Capsicum annuum* L., Biotechnology and Biotechnological Equipment, 17:2, 38-43.
- Barroso, P. A., Rêgo, M. M., Rêgo, E. R., Soares, W. S., 2015, Embryogenesis in the Anthers of Different Ornamental Pepper (*Capsicum annuum* L.) Genotypes. Genetics and Molecular Research, 14(4), 13349–13363.
- Başay, S., Şeniz, V., Ellialtıoğlu, Ş., 2011, "Obtaining Dihaploid Lines by Using Anther Culture in The Different Eggplant Cultivars." Journal of Food, Agriculture and Environment 9.2 part 1: 188-190.
- Başay, S., Ellialtıoğlu, Ş., 2013, Effect of Genotypical Factors on The Effectiveness of Anther Culture in Eggplant (*Solanum melongena* L.). Turkish J. of Biology 37: 499-505.
- Biner, B., Ercan, N., Akıllı, M., 2001, Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine Farklı Sıcaklık ve Işık Uygulamalarının Etkileri. GAP II. Tarım Kongresi, 24-26 Ekim 2001, 47-54, Şanlıurfa.
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu, N., Abak, K., Ekbiç, E., Kiliç, N., 2004, Effect of Silver Nitrate and Donor Plant Growing Conditions on Production of Pepper (*Capsicum annuum* L.) Haploid Embryos Via Anther Culture. Europ. J. Hort. Sci., 69 (5):206-209.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Chunling, L., 1992, Successful Development of New Sweet (Hot) Pepper Cultivars By Anther Culture, Asia- Pasific Conference on Agricultural Biotechnology (Apab), August 20-24 Beijing, China.
- Çağlar, Ç., Aras, V., Bayram, A., 2004, Kurutmalık Kırmızı Biberlerde Androgenesis Yoluyla *in vitro* Haploid Embriyo Uyarımı Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2004, 17(1), 87-94
- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S., Abak, K., 1999, Şanlıurfa ve Kahramanmaraş Biber Populasyonlarında Anter Kültürü Yöntemiyle Haploid Bitki Elde Etme Olanakları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. Ankara, Türkiye, Eylül 14-17. p. 897-901
- Çömlekçioğlu, N., 2001, Güneydoğu Anadolu Biber Popülasyonlarının Dihaploidizasyon Yöntemi ile Islahı ve Geleneksel Yöntemlerle Karşılaştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Doktora tezi.s.370
- Çömlekçioğlu N., Ellialtıoğlu, Ş., 2018, Review on The Research Carried Out on *in vitro* Androgenesis of Peppers (*Capsicum annuum* L.) in Turkey. Review Paper: Research Journal of Biotechnology. Vol. 13 (6) June (2018).
- Çiner, D. Ö., 2000, Biberde (*Capsicum annuum* L.) *in vitro* Androgenesis ve Anterlerin İçsel ABA Miktarına Etki Eden Bazı Faktörlerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi. s.15
- Çiner, D. Ö., Tipirdamaz, R., 2002, The Effects of Cold Treatment and Charcoal on the *in vitro* Androgenesis of Pepper (*Capsicum annuum* L.). Turkish Journal of Botany, 26(3), 131-139.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Huerta, A., 1997, Androgenesis in *Capsicum annuum* L. Effects of Carbohydrate and Carbon Dioxide Enrichment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122(4): 468-475.
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D., Sibi, M., 1981, Culture *In Vitro* Antheres De Piment (*Capsicum annuum* L.) Amelioration Des Taux Dobtention De Plantes Chez Different Genotypes Par De Traitements 35 °C. Agronomie 11: 859.
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D., 1982, *In vitro* culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). Stimulation of plant production by means of treatments at 35°C combined with low concentrations of growth substances. Agronomie, 2, 983-988.
- Dunwell, J.M., 1981, Influence of Genotype and Environment on Growth of Barley Embryos *in vitro*. Ann. Bot, 48:535-542.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K., 2001, Haploid Bitki Üretimi (Bitki Biyoteknolojisi. Doku Kültürleri ve Uygulamaları Cilt I Ed: Babaoğlu, M. Gürel, E. ve Özcan, S.) s.40.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Ellialtıoğlu, Ş., Tıprıdamaz, R., 1997, Soğuk Uygulamaları ve Aktif Kömürün Patlıcan ve Biberde *In Vitro* Androgenesis Üzerine Etkileri, TOGTAG 87 Nolu Proje.
- Ercan, N., Boyacı, F., Ayar, F., 2001, Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine Farklı Besin Ortamlarının Etkisi. GAP II. Tarım Kongresi, 24-26 Ekim, Şanlıurfa, Cilt 1, 121-128.
- Ercan, N., Biner, Ş. B., 2002, Farklı İrilikteki Biber Tomurcuklarında Polen Gelişme Döneminin Belirlenmesi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15(1), 53-59.
- Ercan, N., Sensoy, F.A., Sensoy, A.S., 2006, Influence of Growing Season and Donor Plant Age on Anther Culture Response of Some Pepper Cultivars (*Capsicum annuum* L.). Sci. Hort. 110:16–20.
- Ercan, N., Şensoy, F.A., 2011, Androgenic Responses of Different Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 4 (2): 59-61.
- Erim, B.F., 2019, Farklı Biber (*Capsicum annuum* L.) Genotipleri Üzerinde Shedmikrospor Kültürü Tekniğinin Uygulanması ve Mikrospor Gelişim Aşamalarının Belirlenmesi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. s.48
- Geboloğlu, N., Doksöz Boncukçu, S., Durna, P., Bayram, M., 2017, Patlıcanda Şeker, Bal ve Büyüme Düzenleyicilerin Anter Kültüründe Embriyoid Oluşumuna Etkisi. Akademik Ziraat Dergisi 6, 275-280.
- Germana, M. A., 2011, Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 104(3), 283-300.
- Guha, S., Maheshwari, S.C., 1966, Cell Division and Differentiation of Embryos in the Pollen Grains of *Datura in vitro*. Nature, 212 (5057): 97-98.
- Greenleaf, W.H., 1986, Pepper Breeding. Breeding Vegetable Crops. A.V.I., 67-127.
- Gresshoff, P.M., Doy, C.H., 1972, Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107, 161–170
- George, L., Narayanaswamy, S., 1973, Haploid *Capsicum* Through Experimental Androgenesis. Protoplasma, 78 (4): 467-470.
- Gonzalez-Garcia, J., 2002, Plant Induction by Anther Culture of Jalapeno Pepper (*Capsicum annuum* L.). Yeast Genetics and Molecular Biology, University of Wisconsin, Madison, USA, July 30-August 4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Heberle-Bors, E., Reinert, J. 1981, Environmental control and evidence for predetermination of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* pollen. *Protoplasma*, 109(3-4), 249-255.
- Hegde, V., Partap, P.S., Yadav, R.C., Baswana, K.S., 2017, *In vitro* Androgenesis in *Capsicum* Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 6(5): 925-933.
- Heiser, C.B.J.R., 1976, Peppers, In: Evolution of Crop Plants. (Edited by N. W. Simmonds, 1986). Longman Sci. Tech. Report, 265- 268.
- Irikura, Y., 1975, Induction of haploid plants by anther culture in tuber-bearing species and interspecific hybrids of *Solanum* 18(1), 133-140
- Irikova, T., Grozeva, S., Popov, P., Rodeva, V., Todorovska, E., 2011, *In Vitro* Response of Pepper Anther Culture (*Capsicum annuum* L.) Depending on Genotype, Nutrient Medium and Duration of Cultivation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 25 (4): 2604-2609.
- Johansson, L., Eriksson, T., 1977, Induced embryo formation in anther cultures of several *Anemone* species. *Physiologia Plantarum*, 40(3), 172-174.
- Kaplan, F., 2012, Biberde (*Capsicum annuum* L.) Islah Materyallerinden Dihaploid Hatların Üretimi. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi S.77
- Karakullukçu, Ş., 1991, Değişik Patlıcan Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara, s.131.
- Karakullukçu, Ş., Abak, K., 1993, Patlıcanda Anter Kültürü Üzerinde Araştırmalar. Şeker ve Büyüme Düzenleyicilerin Etkileri. Doğa Turkish Journal of Agricultural and Forestry, 17:811-820.
- Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S., Büyükalaca, S., 2015, Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. *HortScience*, 50(11), 1671-1676.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D-I., Lee, K-M., 2004, Origin of Multicellular Pollen and Pollen Embryos in Cultured Anthers of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 77(1):63-72.
- Koleva-Gudeva, L.R., Spasenovski, M., Trajkova, F., 2007, Somatic Embryogenesis in Pepper Anther Culture: The Effect of Incubation Treatments and Different Media. *Scientia Horticulturae*, 111: 114–119.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Koleva-Gudeva, L.R., Trajkova, F., Dimeska, G., Spasenoski, M., (2008, September), Androgenesis Efficiency in Anther Culture of Pepper (*Capsicum annuum* L.). In IV Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes 830 (pp. 183-190).
- Kuo, J.S., Wang, Z.Z., Chien, N.F., Ku, S.J., Kung, M.L., Ve Hsu, H.C., 1973, Investigation on the Anther Culture *In Vitro* of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. Acta Botanica Sinica, 15 (1):43-47.
- Kurt, M., 2019, Biberde Anter Kültürü Çalışmalarında Farklı Besi Ortamlarının Etkilerinin Araştırılması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tohumluk Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı Çeşit Geliştirme Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi s.9
- Kristiansen, K., Andersen, B., 1993, Effect of Donor Plant Temperature, Photoperiod and Age on Anther Culture Response of *Capsicum annuum* L. Euphitica 67: 105-109. 1993.
- Lantos, C., Juhasz, A.G., Vagi, P., Mihaly, R., Kristof, Z, Pauk, J. 2012, Androgenesis Induction in Microspore Culture of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L). Plant Biotechnol. Reports, 6: 123-132.
- Luitel, B.P., Kang, W.H., 2013, *In Vitro* Androgenic Response of Minipaprika (*Capsicum annuum* L.) Genotypes in Different Culture Media. Hort. Environ. Biotechnol, 54(2): 162-171.
- Ltifi, A., Wenzel, G., 1994, Anther Culture of Hot and Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.) Influence of Genotype and Plant Growth Temperature. Capsicum Eggplant Newsl 13: 74-77.
- Munyon, IP., Hubstenberger, JF., Phillips, GC., 1989, Origin of Plantlets and Callus Obtained from Chile Pepper Anther Cultures. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology. 25: 3 I, 293-296.
- Nitsch, J.P., Nitsch, C., 1969, Haploid Plants From Pollen Grains. Science, 163 (3862): 85-87.
- Nitsch, C., 1974, Pollen culture-a new technique for mass production of haploid and homozygous plants. Haploids in Higher Plants: Advances and Potential, 123-135.
- Novak, F.C., 1974, Induction of a Haploid Callus in Anther Cultures of *Capsicum* sp. Z. Pflanzenzüchtg 72: 46-54.
- Nowaczyk, P., Kisiała, A., Olszewska, D., (2006 a.), Induced Androgenesis of *Capsicum frutescens* L. Acta Physiologiae Plantarum, 28 (1): 35-39.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Nowaczyk, P., Kisiala, A., (2006 b), Effect of Selected Factors on The Effectiveness of *Capsicum annuum* L. Anther Culture. J Appl Genet 47, 113–117
- Olszewska, D., Kisiala, A., Niklas, N.A., Nowaczyk, P., 2014, Study of *in vitro* Anther Culture in Selected Genotypes of Genus *Capsicum*. Turkish J. Biol., 38: 118-124.
- Özsan, T., Onus, A. N., 2017, *In vitro* Pepper (*Capsicum annuum* L.) Anther Culture: Can be Affected Via Vitamins B?. Biotechnology Journal International, 1-13.
- Özkum, D., Tipirdamaz, R., Ellialtioglu, S., 2001, The Relationship Between The Endogenous Absciscic Acid Content of Anthers and *In Vitro* Androgenesis İn Peppers (*Capsicum annuum* L.) Acta Hortic. 560, 327-329.
- Özkum, D., Tipirdamaz, R., 2002, The Effects of Cold Treatment and Charcoal on the *In Vitro* Androgenesis of Pepper (*Capsicum annuum* L.). Turkish Journal of Botany, 26(3), 131–139.
- Özkum D., Tipirdamaz, R., 2010, Effects of l-Proline and Cold Treatment on Pepper (*Capsicum annuum* L.) Anther Culture. In: Gökçekus H., Türker U., LaMoreaux J. (eds) Survival and Sustainability. Environmental Earth Sciences. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Phillips, G. C., Tanksley, S. D., Munyon, I., Hubstenberger, J. F. 1984, Influence of Incubation Environment and Genotype on Anther Culture of Chile Pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro*-Journal of The Tissue Culture Association (Vol. 20, No. 3, Pp. 277-277). 8815 Centre Park Dr, Ste 210, Columbia, Md 21045: Soc *In Vitro* Biology.
- Pundeva, R., Zagorska, N., Pundeva, R., 1986, Cytological Study Of Androgenesis in Anther Cultures of Some Red Pepper Varieties, Genetica Seleksiya, 19(5): 431-432.
- Powell, W., 1990, Enviromental and Genetical Aspects of Pollen Embriyogenesis. P. 45-65. Bajaj (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry 12. Haploids in Crop Improvement I. Springer Verlag. Berlin.
- Prayantini, D. C., 2006, Anther culture in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) (No. research). avrdc-The World Vegetable Center
- Rodeva, V., Cholakov, T., 2006, Influence of Some Climatic Factors in The Period of Donor Plants Growing on Responsiveness of Pepper Anthers to Embryogenesis. The İnternational Conference Haploids İn Higher Plants III, Vienna, Austria, 12-15 February 2006, p 42.
- Reinert, J., Bajaj, Y. S., 2013, Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer Science and Business Media.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Roje, S., 2007, Vitamin B Biosynthesis in Plants. *Phytochemistry*; 68:1904–1921.
- Sakin, M., 1994, Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Anter Kültüründe Genotip ve Besi Ortamının Haploid Bitki Oluşumuna Etkileri Üzerine Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. s.47.
- Sayılır, A., Özzambak, E., 2002, Biber Anter Kültüründe Uygun Tomurcuk Büyüklüğü Tespiti ile Besin Ortamları Karışımlarının ve Soğuk Uygulama Sürelerinin Embriyo Verimine Etkisi Üzerine Bir Araştırma. IV. Sebze Tarımı Sempozyumu, Bursa.
- Sayılır, A., Özzambak, E., 2005, Biber Anter Kültüründe Uygun Tomurcuk Büyüklüğü ile Besin Ortamı İçeriklerinin Embriyo Verimine Etkileri Üzerine Bir Araştırma. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 42 (3) , 1-11.
- Segui-Simarro, J.M., Corral-Martinez, P., Parra-Vega, V., González-Garcia, B., 2011, Androgenesis in Recalcitrant Solanaceous Crops. *Plant Cell Reports*, 30 (5):765-778.
- Shimira, F., Keleş, D., Taşkın, H., Abak, K., 2019, The Assessment of Androgenic Response of Two Nematode Resistant Pepper (*Capsicum annuum* L.) Genotypes. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(12), 2103-2110.
- Sibi, M., Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D., 1980, Androgenese *In Vitro* Chez Le Piment *Capsicum annuum* L., Impact Des Pretraitements Sur Le Taux De Plantes Regeneeres. Versailles, 16-18 April, pp 143-149.
- Sibi, M., Dumas De Vaulx, R., Chambonnet, D., 1979, Obtention De Plantes Haploides Par Androgenese *in vitro* Chez Le Piment (*Capsicum annuum* L.). *Ann Amelior Plantes*, 29:583-606.
- Supena, E.D.J., Suharsono, S., Jacobsen, E., 2006, Successful Development of A Shed-Microspore Culture Protocol for Doubled Haploid Production in Indonesian Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.).
- Supena, E.D.J., Custers, J.B.M., 2011, Refinement of Shed-Microspore Culture Protocol to Increase Normal Embryos Production in Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 130:769-774
- Taşkın, H., 2005, Bazı Biber Genotiplerinde Anter Kültürü ile Haploid Embriyo Uyarımında Embriyo Kalitesinin Arttırılmasına Yönelik Bazı Uygulamalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi s.79.
- Taskin, H., Buyukalaca, S., Keles, D., Ekbic, E., 2011, Induction of Microspore-Derived Embryos by Anther Culture in Selected Pepper Genotypes. *Afr. J. Biotechnol.* 10:17116–17121.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Terzioğlu, Ş., 2000, İnkübasyon Koşulları ve Besin Ortamı İçeriğinin Biberde Androjenetik Embriyo Oluşumu Üzerine Etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans tezi s.47.
- Tipirdamaz, R., Ellialtıoğlu, S., 1998, The Effects of Cold Treatments and Activated Charcoal on ABA Contents Of Anthers and *In Vitro* Androgenesis in Eggplant (*Solanum melongena* L.). in 1st Balkan Botanical Congress, Thessaloniki (Greece), 19-22 Sep 1997. Kluwer Academic Publishers.
- Tıpırdamaz, R., Elialtıoğlu, Ş., 2002, Soğuk Uygulamaları ve Aktif Kömürün Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Süresince Absisik Asit Miktarındaki Değişim Üzerine Etkisi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt:15, Sayı:1, 9-18.
- Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C., Chien, N.F., 1973, The Induction of the Pollen Plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* L. from Anther Culture. Science Sinica, 16: 147-151.
- Yıldırım, D.S., 2016, Süs Biberi Shed-Mikrospor Kültürlerinde Çalkalayıcı Kullanımının Embriyo Verimi Üzerine Etkisi Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi s.25-45.
- Yıldırım, H. F., 1999, Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Edilmesi Üzerine Farklı Besin Ortamlarının Etkisi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi s.81.
- Zeng, A., Yan, Y., Song, L., Gao, B., Li, J., 2015, Effects of Ascorbic Acid and Embryogenic Microspore Selection on Embryogenesis in White Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 90:6, 607-612