



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİBER GENOTİPLERİNDE FARKLI KARBONHİDRAT KAYNAKLARININ VE GÜMÜŞ NİTRATIN ANDROGENEZ PERFORMANSINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Damla IŞIK

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hülya İLBİ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 12.10.2015

**Bornova-İZMİR
2015**

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BİBER GENOTİPLERİNDE FARKLI
KARBONHİDRAT KAYNAKLARININ VE
GÜMÜŞ NİTRATIN ANDROGENEZ
PERFORMANSINA ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Damla IŞIK

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hülya İLBİ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : .12.10.2015

Bornova-İZMİR

2015

Damla IŞIK tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Biber Genotiplerinde Farklı Karbonhidrat Kaynaklarının ve Gümüş Nitratın Androgenez Performansına Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12.10.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

:Prof. Dr. Hülya İLBİ



Raportör Üye

: Prof. Dr. Aynur GÜREL



Üye

: Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Biber Genotiplerinde Farklı Karbonhidrat Kaynaklarının ve Gümüş Nitratın Androjen Performansına Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12 /10 / 2015

Damla IŞIK

ÖZET**BİBER GENOTİPLERİNDE FARKLI KARBONHİDRAT
KAYNAKLARININ VE GÜMÜŞ NİTRATIN ANDROGENEZ
PERFORMANSINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

IŞIK,Damla

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya İLBİ

Ekim 2015,48 sayfa

Yapılan bu çalışmada biberde androgenез için uygun besin ortamının belirlenmesi ve besin ortamında gümüş nitrat ve karbonhidrat kaynağı olarak maltoz ve sakkaroz kullanımının anter kültürüne etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 4 farklı biber çeşidinden (Asena, Athena, Naomi ve Rain Nil) alınan anterler, farklı şeker (maltoz ve sakkaroz) ve gümüş nitrat dozu (0-10-15 mg/l) olmak üzere 6 farklı besin ortamında kültüre alınmışlardır.

Çalışma sonuçları genotip bazında değerlendirildiğinde her genotipten kallus ve embriyo oluşumu bakımından olumlu sonuçlar elde edilmiştir, ancak sadece kypya tipi olan Asena ve demre tipi olan Rainnil çeşitlerinde bitkiye dönüşüm gözlenmiştir. Sonuçlar besin ortamları açısından incelendiğinde ise, kallus embriyo ve bitki oluşumları bakımından en başarılı sonuçlar karbonhidrat kaynağı olarak maltozun kullanıldığı ve 10 mg/l ve 15 mg/l dozlarında gümüş nitrat içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Maltoz içeren, ancak gümüş nitratın ilave edilmediği ortamda diğer maltoz kullanılan ortamlara göre düşük bir başarı elde edilmiştir. Karbonhidrat kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı ortamlarda ise genotiplere göre değişmekle birlikte kısmen başarılı sonuçlar alınsa da yüksek bir performans görülememiştir. Androgenез açısından en başarılı sonuçlar karbonhidrat kaynağı olarak maltozun kullanıldığı ve gümüş nitrat içeren (10 mg/l ve 15 mg/l) ortamlarında alınmıştır.

Çalışma sonuçları çeşit-ortam interaksiyonları açısından değerlendirildiğinde kallus rejenerasyonu Asena çeşidinin M15 (%74,2) ortamı ile M10 (%71,1) ortamında en yüksek oranda elde edilmiştir. Embriyo rejenerasyonu sonuçlarına bakıldığında en fazla embriyo oluşumu %60,1 oranı ile Asena çeşidinden elde edilirken en başarılı ortam ise bir genotip hariç her genotip için embriyo rejenerasyonu gözlenen M15 ortamı olmuştur. Bitki ve organ rejenerasyonu için sonuçlar değerlendirildiğinde ise en başarılı sonuçlar M15 ortamında Rain Nil genotipinden (%28,5) elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Anter kültürü, Biber, Maltoz, Sakkaroz, Genotip, Besin ortamı, AgNO₃,

ABSTRACT**INVESTIGATION OF CARBOHYDRATE SOURCE AND SILVER
NITRATE TO EFFECT OF ANDROGENEZ PERFORMANCE IN
PEPPER GENOTYPE**

IŞIK,Damla

MSc, Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Hülya İLBİ

October 2015,48 pages

The aim of this research is to determine the most appropriate nutrient media content in anther culture. Moreover, the effect of using maltose as carbohydrate source and silver nitrate in nutrient media was studied in this thesis. The anthers of four different pepper varieties (Asena, Athena, Naomi and Rain Nil) were cultured in six different nutrient culture media combination with different sugar and various concentration of AgNO_3 .

Callus and embryo in all the genotypes were obtained but plant regeneration was observed only in Asena (copia type) and Rain Nil (bell type) genotypes. M10 and M15 nutrient media which include maltose as a carbohydrate source gave the highest result for callus, embryo, and plant regeneration. However the M0 nutrient media without silver nitrate was not succesfull for adrogenesis compare to the other media that include maltose. The sucrose as a carbohydrate source in nutrient media also gave succesfull results depending on the genoytpes and AgNO_3 composition. As a result, Asena genotype gave the best adrogenesis performance in maltose media with silver nitrate (10mg/l 15mg/l).

Results are evaluated in terms of variety-nutration media the Asena genotype in M10 (71,1%) and M15 (74,2%) cultured media gave the best interaction for callus regeneration. In terms of the culture media for embryo regeneration, M15 (66,2 %) cultured media gave the most succesfull results and in genotypes the best

success was achieved from Asena (60,1) genotype. Plant regeneration were obtained from the Rain Nil and the Asena genotypes. M15 cultured media (12,7%) and the Rain Nil genotype (8,4%) showed success for obtained plants from the pepper anthers. However, the best interactions for plant regeneration was derived from M15 cultured media for Rain Nil genotype (28,5%).

Key Words: Pepper, Anther culture, Pepper, Maltose, Sucrose, Genotype, Nutrient media, AgNO₃

TEŞEKKÜR

Tez konumun oluşturulması aşamalarında bana yol gösteren, sadece tez çalışmamda değil gerek akademik gerekse kişisel hayatımda her anlamda değerli fikirlerini, yardımlarını ve anlayışını benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Hülya İLBİ'ye sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın her aşamasında bana değerli bilgileriyle ışık tutan sayın hocam Prof. Dr. Aynur GÜREL'e ve çalışmanın yürütülmesi sürecinde gerek bedenen gerekse fikren hiçbir zaman yardımını benden esirgemeyen Arş.Gör. Begüm AKYOL'a bana gösterdikleri sabırdan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezime bitkisel materyal temin etmemde bana yardımcı olan AD-Rossen firmasına ve sayın Dr. Aydın ATASAYAR'a ve çalışmalarımın en etkili şekilde yürütülmesi için bana bütün imkanlarını sunan Tohum Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi yönetimine ve tüm çalışanlarına, başta Ali KÜN ve Gülgün BAŞLAR olmak üzere bana her zaman yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Benden hiçbir zaman güvenini, anlayışını ve sabrını esirgemeyen ve bu süreçte bana sonsuz destek olan eşim Arş. Gör. Özgün IŞIK'a ve hayatım boyunca her zaman yanımda olan bana verdikleri emek, sevgi, ve destekten dolayı canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	6
2.1 Anter verici bitkiden kaynaklanan faktörler	7
2.2 Anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler.....	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1 Materyal.....	19
3.1.1 Denemede kullanılan genotipler ve özellikleri	19
3.2 Yöntem	20
3.2.1 Bitkilerin yetiştirilmesi	20
3.2.2 Uygun anterlerin seçimi ve gelişme safhalarının belirlenmesi	21

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.3. Kullanılan besin ortamları ve besin ortamlarının hazırlanması	23
3.2.4 Anterlerin alınması.....	24
3.2.6 Kültür koşulları ve ön uygulamalar	24
3.3 Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analiz	25
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	26
4.1.Anterlerden Elde Edilen Kallus Oluşumları	26
4.2 Anter Kalluslarından Elde Edilen Embriyo Oluşumları	29
4.3 Anter Kökenli Embriyolardan Organ ve Bitkicik Elde Edilmesi	32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR DİZİNİ	39
ÖZGEÇMİŞ	49
EKLER.....	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Capsicum cinsinde bulunan türler	1
1.2 Ülkeler göre Dünya’da biber üretim miktarı	2
3.1a Asena F1 genotipi.....	20
3.1b Naomi F1 genotipi.....	20
3.1c Rainnil F1 genotipi	20
3.1d Athena F1 genotipi	20
3.2 Denemede kullanılan ve iklim odasında yetiştirilen bitkiler	21
3.3a Uygun tomurcuk büyüklüğünün belirlenmesi.....	22
3.3b Kaliks ve korollaların ayrılması	22
3.3c Tetrat aşamasındaki mikrosporlar	22
4.1 Genotip ve besin ortamlarına göre anterlerde elde edilen kallus oranları (%).....	27
4.2 Kültüre alınan anterlerden gelişen kalluslar	29
4.3 Genotip ve besin ortamlarına göre anterlerden elde edilen embriyo oranları (%).....	30
4.4 Genotiplerde anter kalluslarından elde edilen embriyo görüntüleri	32

4.5	Genotip ve besin ortamlarına göre anterlerden elde edilen bitkicik oranları (%)	34
4.6	Asena ve Rain Nil genotiplerinde bitkicik oluşumu	35
4.7	Naomi ve Rain Nil genotiplerinden elde edilen anormal yapılı kök ve yaprak oluşumları.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

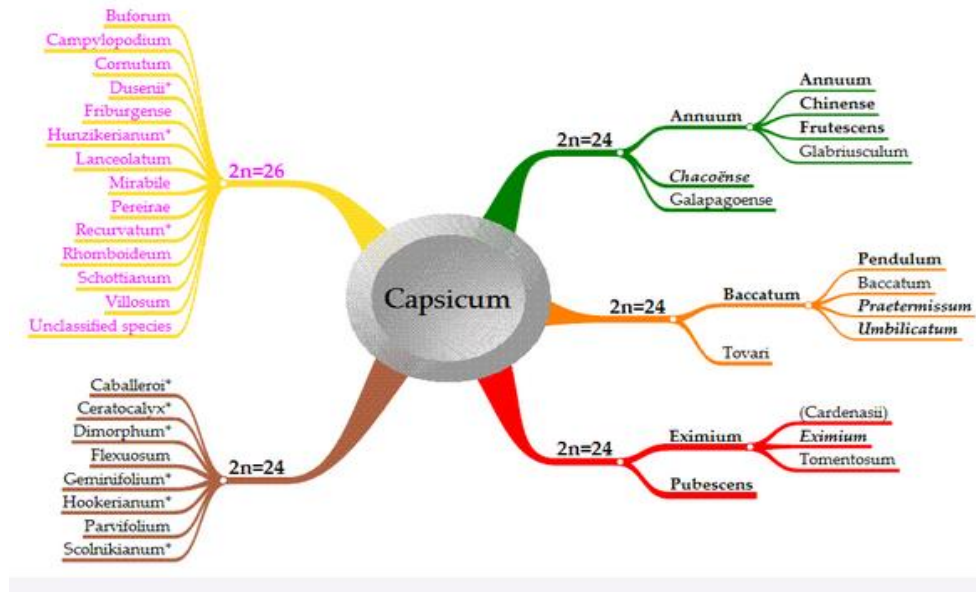
<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Anter kültürü çalışmasında kullanılan besin ortamları ve içerikleri.....	23
4.1 Genotip ve besin ortamlarına göre anterlerden elde edilen kallus oranları (%)	27
4.2 Genotip ve besin ortamlarına göre anterlerden elde edilen embriyo oranları (%)	30
4.3 Genotip ve besin ortamlarına göre anterlerden elde edilen bitkicik oranları (%)	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

M	Mol
N	Normalite
g/l	gram/litre
mg/l	miligram/litre
ml	mililitre
°C	Santigrad derece
cm	Santimetre
g	Gram
pH	Hidrojenin gücü (Power of hydrogen)
mm	Milimetre
%	Yüzde
MS	Murashige & Skoog (1962)
NAA	Naftelen Asetik Asit
BAP	Benzil Amino Purin
2,4-D	2,4–Dichlorofenoksi Asetik Asit
AgNO ₃	Gümüş nitrat
CP :	CLC/Ipomoea CP ortamı
FeSO ₄ 7H ₂ O :	Demir sülfat
HCl :	Hidrojen klorür
KOH :	Potasyum hidroksit
NN:	Nitsch / Nitsch ortamı

1.GİRİŞ

Solanaceae familyasının, *Capsicum* cinsi, yaklaşık 30 türü kapsamaktadır (Greenleaf, 1986) (Şekil 1.1.). Bunlardan beş tür (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. frutescens* ve *C. chinense*) ekonomik olarak kültüre alınmışlardır. En çok üretimi yapılan tür *Capsicum annuum* L. dir. Sıcak iklim sebzesi olan ve tropik kuşaklarda çok yıllık olarak da yetiştirilebilen *Capsicum annuum* L. $2n=24$ kromozom yapısına sahiptir ve yüksek oranda kendine tozlanan bir türdür (Rohami, 2010).

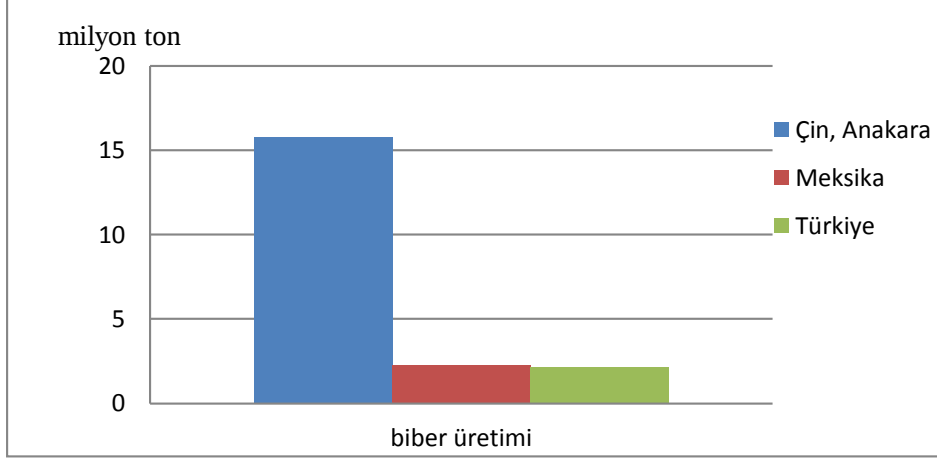


Şekil 1.1. *Capsicum* cinsinde bulunan türler (Anonim, 2015).

Solanaceae familyasında yer alan biber (*Capsicum annuum* L.) besin değeri bakımından insanların günlük diyetlerinde önemli bir yere sahip olan, meyvesi yenen bir sebze türüdür. FAO 2013 verilerine göre, Dünya’da toplam üretim alanı 1,933,010.36 ha olup üretimi 31,131,225.56 ton olarak gerçekleşmiştir.

En çok biber üretimi gerçekleştiren ülke, Şekil 1.2.’de de görüldüğü gibi 15,800,000.00 ton üretim ile Çin’dir. Meksika, 2,294,400.00 ton üretim ile ikinci sırada yer alırken, toplam 102,366 hektar alanda yaptığı 2,159,348.00 ton üretim miktarı ile Türkiye, Dünya biber üretiminde üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil

1.2). Biber üretimi ülkemizde domates (11,820,000.00 ton) ve karpuz (3,887,324.00 ton) üretiminden sonra 3. sırada yer almaktadır (FAOSTAT, 2013).



Şekil 1.2. Ülkelere göre Dünya’da biber üretim miktarları, 2013 (FAOSTAT, 2015).

Yeni biber çeşitlerin geliştirilmesinde yaygın olarak klasik ıslah yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak klasik ıslah tek başına uzun zaman alan ve emeğe ihtiyaç duyan bir yöntemdir. Bu nedenle günümüzde klasik ıslah yöntemlerinin yanısıra, biyoteknolojik yöntemlerden de yararlanılarak yeni çeşit geliştirmenin süresi kısaltılmaya çalışılmaktadır.

Kullanım alanı her geçen gün artmakta olan biyoteknoloji, diğer birçok alanda olduğu gibi bitkisel üretim alanında da önemli katkılar sağlamaya başlamıştır. Biyoteknolojik yöntemler, hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde ıslahçılara önemli ölçüde zaman kazandırmaya başlamıştır. Bitki biyoteknolojisinin amacı, bitkisel üretimde klasik yöntemlerle çözilemeyen veya çözümü güç olan problemlere çözüm getirerek, daha ekonomik, kalite ve kantite yönünden daha yüksek bitkisel üretimin gerçekleştirilmesine yardımcı olmaktır (Hatipoğlu, 1997).

Bitki hücre ve doku kültürü tekniklerinin kullanılması ile; ender rastlanan, tohumla çoğaltılması çok zor olan bitki genotiplerinin veya ticari öneme sahip türlerin kısa sürede klonal olarak çoğaltımları, hastalıklardan ari materyallerin

üretilmesi, ekonomik değeri yüksek sekonder metabolitlerin elde edilmesi ya da genetik modifikasyon ile bitkilere yeni özelliklerin aktarılması gibi çeşitli avantajlar sağlanabilmektedir.

Doku kültürü teknikleri içerisine giren haploit bitki üretimi bitki ıslahında önemli bir yere sahiptir (Andrews, 1985). Bitkilerin evrimleşme sürecinde ilkel durumdan ‘yüksek yapılı bitkiler’ konumuna geçerken genomlarını iki katına çıkartmaları kararlılıklarını korumalarını sağlamıştır. Ancak bu durum biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dirençlerini azaltmıştır. Bu sebeple, stres faktörlerine dirençli bitkiler geliştirmeye çalışan bitki ıslahçıları, ıslah programlarının bazı aşamalarında bitkilerin kromozom sayılarını yarıya indirmenin yollarını aramışlardır. Anter kültürü tekniği ile haploit bitkilerin elde edilmesi yöntemi ise bu kapsamda başarılı sonuçların alınabildiği bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Islah programının en sonunda ise yeni genotiplerin genetik kararlılıklarını korumak için, elde edilen haploit bireylerin diploidize edilmesi gerekmektedir. Böylece katlanmış dihaploit hatlar ortaya çıkmaktadır (Ellialtıoğlu, 1999).

Haploit bitki üretiminde başlangıç materyali, erkek ve dişi spor hücreleridir. Haploit bitkilerin elde edilmesi için iki yöntem kullanılmaktadır; ya embriyo kesesindeki haploit yumurta hücrelerinin uyartımı yoluyla dişi spordan (megaspor), ya da polen rejenerasyonu yolu ile erkek spor hücresinden (mikrospor) *in vitro* koşullarda bitki oluşumu sağlanmaktadır.

Anter kültürü tekniği haploit bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu tekniğin diğer *in vitro* haploit bitki elde etme tekniklerine göre avantajı; bir anter içerisinde binlerce mikrosporum bulunması ve bir anterden çok sayıda haploit bitki elde edilebilmesidir. Anter kültürünün temel prensibi; normal olarak erkek gameti oluşturacak olan polen hücresinin gelişimini durdurmak ve somatik hücrelerde olduğu gibi polen hücresini direkt olarak embriyo oluşturmaya zorlamaktır.

Haploit bitkilerin kullanılmasının en başta gelen avantajı, %100 homozigot hatların kısa sürede elde edilmesidir. F1 hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde

homozigot hatlar arasında üstün kombinasyon yeteneğine sahip hatların belirlenmesi gerekmektedir. Yabancı döllenmiş türlerde heterozigoti oranı çok yüksek olduğundan, bitkiler 10-12 generasyon kendilendikten sonra homozigot hale gelmektedir; kendine tozlanan türlerde ise bu süre 6-7 generasyon sürmektedir. Bitki ıslahında dihaploit hatların kullanılması üstün kombinasyon yeteneğine sahip hatlarda homozigotlaştırma için geçen süreyi kısaltacağından yeni çeşitlerin geliştirilmesinde kolaylık sağlamaktadır. Böylece kısa sürede biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı, nitelikli daha fazla çeşit geliştirilebilmektedir.

Biberde anter kültürü ile ilgili bugüne kadar yürütülen çalışmalar daha çok genotip, besin ortamı, bitki büyüme düzenleyicileri, besin ortamına ilave edilen farklı maddeler (aktif kömür, gümüş nitrat ve havuç ekstraktı), farklı ön uygulamalar, donör bitkilerin yetiştirme koşulları ve farklı anter alma zamanları üzerine yoğunlaşmıştır (Rodeva et al., 2004; Irikova et al. 2011; Parra-Vega et al., 2013; Dolcet-Sanjuan et al., 1997; Olszewska et al. 2013). Ülkemizde de bu tekniğin biberde uygulanmasında ortaya çıkan sorunların çözümüne yönelik oldukça başarılı sonuçlar ortaya konulmuştur (Abak, 1983; Çömlekçioğlu vd., 1999, 2001; Ellialtıoğlu vd., 2001; Büyükalaca vd., 2004; Ata, 2011; Taşkın vd., 2011).

Anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörleri anter verici bitkiden kaynaklanan faktörler (genotip ve donör bitkinin yetiştirme koşulları) ve anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler (anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı, inkübasyon koşulları) olarak iki grupta değerlendirmek mümkündür (Ellialtıoğlu vd., 2000). Bu faktörler içerisinde besin ortamı ve genotip büyük önem arz etmektedir. Anter kültüründe başarı, genotiplere göre değişmekte ve her genotipin tepki verdiği besin ortamları farklılaşabilmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada; bazı bakteriyel ve viral hastalıklara dayanıklılığı bilinen 4 hibrit biber çeşidinin (1 adet acı kapa, 1 adet tatlı kapa, 1 adet dolma ve 1 adet demre sivri) farklı ortamlarda kültüre alınmasıyla anter

kültürüne tepkilerinin değerlendirilmesi ve bu genotiplere uygun besin ortam içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hücre, doku ve organlardan *in vitro* bitki rejenerasyonu; bitki ıslahı, bitkisel üretim ve genetik ilerlemenin temelini oluşturan bitki biyoteknoloji uygulamalarıdır. Biber her ne kadar dünyada önemli üretim ve tüketim miktarına sahip bir sebze olsa da, *in vitro* bitki rejenerasyonu çalışmalarında tütün, domates ve patates gibi diğer *Solanaceae* türlerindeki başarıyı sağlayamamış ve hızlı bir ilerleme gösterememiştir. Acı biberler için bu durumun asıl sebebi Ochao-Alejo et al., (2001) ve Berljak, (1999) tarafından; doku kültürü çalışmalarına direnç gösteren genetik yapıya sahip olmaları şeklinde açıklanmıştır.

Biber de ıslah çalışmaları açısından büyük önem arz etmesi nedeniyle en fazla talep gören *in vitro* çalışma haploit bitki üretimi çalışmalarıdır. Bu sayede %100 saf ıslah materyalleri elde edilebilmesinden dolayı haploit bitki üretimi biber ıslahında önem kazanmaya başlamıştır.

Haploit bitki; basit olarak somatik hücrelerinde gamet hücrelerdeki kromozom sayısı kadar kromozom taşıyan bitki olarak tanımlanmaktadır. Haploit bitkiler homolog kromozomlarından sadece bir takımını içermelerinden dolayı resesif mutasyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır ve bu özellikleriyle bitki ıslahçıları için büyük önem taşımaktadırlar.

Haploit bitkiler tam bir homozigotiyi çok kısa bir sürede elde etme olanağı sunmaktadır. Bu bitkilerin diploit hale getirilerek ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte kendileme depresyonu nedeniyle homozigot hatların elde edilmesinin zor olduğu türlerde dihaploitizasyon tekniği problemin çözülmesini kolaylaşmaktadır. Bu teknik, bitki ıslahçıları açısından büyük kolaylık sağlayarak melezlemede üstün kombinasyon yeteneği veren bitkilerden homozigot hatların kısa sürede elde edilmesi imkanını sunmaktadır. Böylece F1 hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde ıslahçılara zaman kazandırmaktadır. Ayrıca haploit bitkilerde resesif genler dominant genler tarafından örtülemeyeceğinden resesif mutasyonların açığa çıkartılması sağlanmaktadır (Babaoğlu, 2002).

Haploit üretim teknikleri konusundaki ilk çalışma, 1922 yılında Blakeslee et al. tarafından *Datura stroamonium* bitkisinde yapılmıştır. Daha sonra, pek çok bitki türünde haploit bitki elde etmek amacıyla gerek dişi, gerekse erkek gamet hücreleri kullanılmıştır (Ata, 2011).

Androgenez tekniğinde ilk başarılı çalışma, Guha and Maheswari (1964)'nın "*Datura innoxia*"nın anter kültüründe embriyo benzeri yapılar elde etmeleridir. Bundan iki yıl sonra da bu embriyoidlerin polenlerden meydana geldiğini tespit etmişlerdir. İlk haploit bitki eldesi ise Nitsch and Bourgin (1967) tarafından *Nicotiana sylvestris* ve *N. tabacum* anterlerinde yapılan çalışma sonucunda elde edilmiştir (Arı, 2006).

Capsicum cinsinde anter kültürü ile ilgili çalışmalar, Wang et al. (1973), George and Narayanaswamy (1973), Saccardo and Devreux (1974), Novak (1974) ve Harn et al. (1975) tarafından başlatılmıştır. Daha sonra birçok araştırmacı bu konu üzerinde çalışmışlardır ve çalışmaları günümüze kadar gelmiştir.

Günümüze kadar uzanan bu süreçte yapılan çalışmalar, daha çok biber anter kültüründe genotipin, besin ortamının, büyüme düzenleyicilerinin, besin ortamına ilave edilen farklı maddelerin (aktif kömür, gümüş nitrat ve havuç ekstraktı gibi), farklı ön uygulamaların, donör bitkilerin yetiştirme koşullarının ve farklı anter alma zamanlarının etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu tür çalışmalarla anter kültürü ile elde edilen haploit embriyo sayısı ve biber ıslahında anter kültürü yönteminin kullanılabilirliği arttırılmaya çalışılmıştır.

2.1. Anter Verici Bitkiden Kaynaklanan Faktörler

Anter kültüründe anter verici bitkiden kaynaklanan faktörler incelenmek istendiğinde, genotip ve donör bitkinin yetiştirilme koşulları karşımıza çıkmaktadır.

Genotip:

Anter kültüründe alınacak sonuçları etkileyen en önemli faktör kuşkusuz genotiptir. Pek çok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalar genotipin anter kültüründeki başarıda majör etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Şimdiye dek çalışılmış olan tüm bitki türlerinde; aynı kültür koşulları altında, anterlerin verdiği tepkiler bakımından genotipler arasında büyük farklılıklar olduğu sonucuna varılmıştır.

Niklas-Nowak et al. (2012), biber anter kültüründe bireysel bitki reaksiyonunu araştırmışlardır. Bu amaçla hibrit *C. annuum* F2 (ATZ1×TG), türler arası melez F2 (*C. frutescens*×*C. chinense*), AT6 hattından elde edilen androgenik dihaploit hatları kullanmışlardır. Değerlendirmeler, her bitki için bireysel olarak ve elde edilen embriyo yüzdelerinin kültüre alınan toplam anter sayısı ile karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. En düşük androgenik tepki türler arası melez F2 generasyonu elde edilmiş ve değerlendirilen 19 adet bitkinin 5 tanesinden embriyo alınabilmiştir. Androgenez etkinliği % 2'yi aşmamıştır. Melez *C. annum* F2'de değerlendirilen 20 bitkinin 19'undan %0,5-%16,5 oranla embriyo elde edilebilmiştir. AT6 dihaploit bitkilerde 20 adet bitkinin 13'ünden olumlu sonuçlar alınmış ve androgenez etkinliği %3'ü aşmamıştır. Ploidi seviyelerinin belirlenmesi çalışmalarından elde edilen sonuçlar, kullanılan tüm genotiplerde hem haploit, hem de diploid bitkilerin olduğunu göstermiştir.

Ercan vd. (2011), tarafından yapılan farklı biber genotiplerinin androgenetik performanslarının incelendiği bir çalışmada; dördü demre tipi, biri paprika, ikisi dolma, ikisi kapy ve ikisi çarliston tipi olmak üzere onbir farklı biber genotipi denenmiştir. Çalışma sonucunda biber genotiplerinin farklı androgenetik potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur. 2398 anterin kültüre alındığı çalışmada 44 embriyo elde edilmiş ve 11 genotipten 12 bitki oluşmuştur. Yalova Çarliston ve dolma tipi olan kandil genotiplerinden hiç embriyo elde edilmezken; Sera Demre 8 ve dolma tipi olan Odesa genotipleri diğer genotiplerle karşılaştırıldığında en başarılı sonuçları vermişlerdir. Bu durum, anter kültüründe donör bitki genotipinin başarıyı etkileyen en önemli parametre olduğu sonucunu ortaya koymuştur.

Irikova et al. (2011), ise on dokuz adet Bulgaristan biber genotipinde (8 adet ıslah hattı, 7 adet çeşit, 4 adet melez) anter kültüründe besin ortamının etkisini araştırmışlardır. İndüksiyon ortamı olarak C (Dumas de Vault et al., 1981) ve Cm (Sibi et al., 1979), rejenerasyon ortamı olarak R (Dumas de Vault et al., 1981) ve Rm (Sibi et al., 1979) besin ortamlarını kullanmışlar ve ilk besin ortamlarından rejenerasyon ortamına aktarmada, 12 ve 40 gün aralıklarla aktarmanın etkisini denemişlerdir. Altı hat, 6 çeşit ve 3 melez genotipten kültürün 35-40 gününden sonra direkt embriyolar oluşmuştur. Rejenere olan bitkiler 4 adet hat, 6 adet çeşit ve 1 adet hibritten elde edilmiştir. C ortamında 12. günden sonra aktarma embriyo oluşumu için yeterli olmamış, 40. günden sonra aktarmada ise embriyo oluşumları gözlemlenmiştir. R ortamına aktarmadan sonra yüksek oranda (%50-100) bitkiye dönüşüm sağlanmıştır. Cm ortamında 12 gün bekletilip aktarmadan sonra daha yüksek oranda embriyo oluşumu görülmüş, ancak bu embriyoların Rm ortamına aktarılmasından sonra bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Çalışma ile kullanılan her bir genotipin anter kültürü ihtiyaçlarının farklı olduğu belirlenmiştir.

Rodeva et al. (2004), Bulgaristan'a ait 16 biber genotipinin anter kültürüne tepkisini araştırmışlardır. Bu genotiplerin 6 adedini hatlar, 6 adedini çeşitler ve 4 adedini hibritler oluşturmuştur. Çalışılan genotiplerden iki adedi indirekt organogenez, diğerleri direkt embriyogenez göstermişlerdir.

Biberde 4 adet ıslah hattı, 7 adet kültür çeşidi ve bunların melezlerini anter kültürüne tepki açısından inceleyen Mityko et al. (1995), 2 kültür çeşidi dışında tüm kültür çeşitleri, ıslah hatları ve melezlerden androgenes bakımından olumlu tepkiler almıştır. Standart çeşitlerle karşılaştırıldığında, 2 genotipten önemli derecede iyi sonuç ('Fehérözön' (%75,8) ve 'Szechuan 90716' (%21,0) alındığı bildirilmiştir. Anter kültürüne tepkisi düşük olan ve anter kültürüne hiç tepki vermemiş iki hattın melezlenmesiyle elde edilmiş F1 hibritlerin ise ebeveynleri ile karşılaştırıldığında, iyi bir androgenes performansı gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bitkilerin kromozom sayısını belirleyebilmek için flow sitometri yöntemini kullanmışlar ve bitkilerin haploit ve spontan dihaploit olduklarını belirlemişlerdir.

Tuberosa et al. (1987), değişik ülkelerden toplanan sekiz farklı patlıcan çeşidi ve bunların arasında yapılan melezlemelerden elde edilen 16 melez

genotipte anter kültürü yapmış ve embriyo oluşum oranlarını belirlemişlerdir. Ebeveynlerde en yüksek 17,3 embriyo/100 anter oranında başarı elde eden araştırmacılar, bazı melez genotiplerde 42 embriyo/100 anter sayısına ulaşmışlardır.

Buğdayda anter kültürü yoluyla embriyo oluşturma yeteneği bulunmayan bir seri çeşit üzerinde çalışan Bullock et al. (1982); iyi bir rejenerasyon kapasitesine sahip olan “Centurk” çeşidi ile mezelelendikten sonra; bu olumlu özelliğin F1 dölllerine aktarılabildiğini gösteren resiprokal mezelemelerden alınan sonuçlarda, kültüre alınan anterlerin embriyo oluşturma özelliğinin, sitoplazmik etkilerin kontrolü altında olduğunu göstermiştir.

Yetiştirme koşulları:

Donör yani anterlerin alınacağı bitkilerin yetiştirilme koşulları yapılacak olan anter kültürü çalışmasında başarılı bir sonuç alınmasını etkileyecek diğer bir faktördür.

Biberde dişi organ kültürlerinin kullanımıyla haploit embriyo oluşumunun oldukça düşük olduğunu, oranın genotiplere göre değişmekle beraber genellikle % 0.05 olup, bazı genotiplerde % 0,1'e kadar çıktığını bildiren Abak (1986), donör bitkilerin yetiştirme koşullarının da embriyo oluşumunu etkilediğini belirtmiştir. Anter kültürü yöntemiyle biberde haploit embriyo elde edilmesi oranının ise yüksek olduğu, her 100 adet anterden ortalama 5-10 adet haploit embriyo elde edilebildiğini rapor etmiştir.

Biberde anter kültüründe farklı anter alma dönemlerinin etkilerini araştıran Matsubara et al. (1998), bu amaçla 6 adet farklı genotip kullanmışlardır. Kasım ayından Temmuz ayına kadar tekrarlanan denemeler sonucunda en başarılı yanıtın sıcaklığın 15-25°C arasında olduğu Eylül-Ekim aylarından alındığını bildirmiştir. Denemede kullanılan Cheongyang ve Fushimi Amanaga genotiplerinde yüksek embriyo performansı görülürken, Shishtou ve California Wonder genotiplerinde ise yüksek oranda kallus oluşumu gözlenmiştir.

2.2. Anter Kùltürü Tekniğinden Kaynaklanan Faktörler

Genotip ve donör bitkinin yetiştirilme koşulları dışında anter kùltüründe kullanılan teknik farklılıklar da başarı oranını önemli ölçüde etkilemektedir. Anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı, inkübasyon koşulları gibi farklılıklar anter kùltürü uygulamalarındaki farklılıklar olarak sayılabilmektedir.

Anterlerin gelişme dönemi:

In vitro androgenezde başarıya ulaşılabilmesi için çiçek tomurcuklarının genotip ve büyüklüklerine göre ayrılarak mikrosporların içinde bulundukları gelişme aşamasının belirlenmesi gerekmektedir. Mikrosporların içerisinde nişasta depolanmaya başlamasından sonra, sporofitik yönde gelişmeyi sağlamak için yapılacak uygulamalar etkili olmamaktadır. Anterlerdeki polen aşaması asetokarmin ya da asetoorsein ile hızlı boyama yapılarak belirlenebileceği gibi, flouresan mikroskobu ve buna uygun DAPI gibi boyaların kullanılması ile de belirlenebilmektedir (Ellialtıoğlu, 1999).

Novak (1974), biber anter kùltüründe 2,6-5,0 mm arasında büyüklüğe sahip ve açık yeşil renkte petalleri olan tomurcuklardan alınan anterlerin, olgunlaşmamış tek çekirdekli mikrosporları içerdiğini ve bu dönemdeki mikrosporlardan anter kùltüründe başarılı sonuçlar alındığını bildirmiştir.

Sibi et al. (1979), ise biberde sepal ve petal boylarının eşit olduğu ya da biraz daha uzun olduğu dönemin polen mitozu ile aynı dönem olduğu ve anter kùltüründe olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Abak (1983), Türkiye orijinli biberlerde haploit bitki elde etmek amacıyla doku kùltürü yöntemlerinden anter kùltürü tekniğini kullanmıştır. Yaptığı çalışma kapsamında, en uygun anter safhasının tomurcukların 3,5-4 mm büyüklüğüne ulaştığı aşama olduğunu tespit etmiştir.

Gönülşen (1987), anter kültürünü etkileyen faktörler arasında anterlerin gelişme devresinin önemli bir rol oynadığını belirterek, polen ana hücresinden olgun polenin oluşumuna kadar geçen bütün aşamaları kapsayan mikrosporogenesizin başlıca üç ana devreye ayrılabilceğini bildirmiştir. Bunlar; mayoz bölünme ve tetratların oluşması, tetratların ayrılması ve mikrosporların gelişmesi, mikrosporların polen tanesi halinde olgunlaşmasıdır. Araştırmacı ikinci devrede polenin tek hücreli durumda olduğunu, ikinci devrenin sonu ile üçüncü devrenin başında birinci hücre bölünmesinin meydana geldiğini, üçüncü devrenin ise çok hücreli gametofitler veya polen taneleri olduğunu ifade etmiştir.

Parra-Vega et al. (2013), daha önceden *Solanaceae* familyasında yapılan çalışmalarda elde edilen gruplandırmalara göre biberde polen gelişim aşamalarını 7 grupta incelemiştir. Bunların; 1.Meicytes ve tetrad aşaması, 2.Genç mikrospor, 3.Orta mikrospor, 4.Boşluklu mikrospor, 5.Genç iki hücreli polen tanecikleri, 6.Orta biselüler polen tanecikleri ve 7.Gelişmiş biselüler polen tanecikleri olduğunu bildirmiştir. Yaptığı çalışmada genç ve orta biselüler polen taneciği içeren anterlerin renklerinin sarıdan mora döndüğünü, petallerin uzamaya başlamasına bağlı olarak tomurcuğun büyüdüğünü ve sepal ve petallerin yaklaşık olarak birbirlerine eşit olduğunu bildirmiştir. Anterlerin uzunluklarını kriter olarak genotiplerdeki farklı uzunluktaki anterlerin mikrosporogenesiz ve mikrogametogenesiz oranlarını belirlemiştir. Sonuç olarak anter büyümesi ve mikrospor gelişimin paralel olarak arttığını ve orta biselüler polen aşamasına kadar polen gelişiminin arttığını bildirmişlerdir.

Ön uygulama:

Anter kültüründe başarıyı arttırmak için sıklıkla düşük sıcaklık ya da yüksek sıcaklık uygulamaları gibi bazı stres faktörleri kullanılmaktadır. Bu stres uygulamaları ile güçlü olan anter ve mikrosporlar hayatta kalarak çalışma sonunda embriyo oluşum oranını arttırmaktadırlar. Bununla birlikte birçok araştırmacıya göre anter kültüründe sıcak uygulamaları soğuk uygulamalarından daha başarılı sonuçlar alınmasını sağladığı bildirilmektedir (Barany et al., 2005; Kim et al., 2004).

Sibi et al. (1980), kültürün ilk 2 günü 35 °C'de karanlıkta bekletilen anterlerden 4 °C'de soğukta bekletilenlere göre daha başarılı sonuçlar alındığını ortaya koymuşlardır.

Dumas de Vault et al. (1981), biberde anter kültürünün başlangıç döneminde uygulanacak olan 35°C gibi yüksek sıcaklık uygulamalarının embriyo oluşumunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Terzioğlu vd. (2000), Kahramanmaraş biber populasyonunda anter kültüründe farklı inkübasyon koşullarının ve ön uygulamanın etkisini incelemişlerdir. Kültürün ilk 8 günü 35°C'de sürekli karanlıkta bekletme ve kültür süresi boyunca 29°C'de sürekli ışıktaki bekletme uygulamalarını denedikleri çalışma sonucunda, 29°C ve 2000 lux şiddetinde sürekli aydınlık koşullarda yapılan inkübasyonun embriyo oluşturma özelliği bakımından 35°C'de 8 gün bekletme uygulamasından daha üstün olduğu sonucuna varmışlardır.

Biner vd. (2001), ise biberde anter kültüründe farklı sıcaklık ve ışık uygulamalarının etkilerini araştırmışlardır. Işık uygulamaları; 25°C'de 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık koşullarda bekletme, 25°C'de 1 hafta süre bekletme ve 35°C'de 1 hafta karanlık koşullarda bekletme şeklinde yapılmıştır. 25°C'de 1 hafta bekletme, diğer uygulamalara göre daha başarılı olmuştur. Sıcaklık uygulaması olarak 4°C'de 24 saat ve 48 saat bekletme uygulamaları yapılmıştır. Soğuk uygulaması denemelerinden de genotiplere göre değişmekle beraber olumlu yanıtlar alınmıştır. Besin ortamı olarak 5 mg/l kinetin, 5 mg/l 2,4-D, %30 sakkaroz ve %1 aktif kömür ilave edilmiş MS besin ortamı kullanılmıştır.

Besin ortamı:

Biberde anter kültürü çalışmalarında araştırmacıların sıklıkla kullandıkları temel besin ortamları Dumas de Vault et al. (1981) ve Murashige and Skoog (1969) ortamlarıdır. Araştırmacılar tarafından bu ortamların haploit bitki elde edilmesinde daha etkin olduğu düşünülmektedir (Ellialtıoğlu vd. 2001; Çiner ve Tipirdamaz 2002; Irikova and Rodeva 2004).

Abak (1983), farklı besin ortamı ve yöntemlerin etkisini araştırdığı çalışmasında, besin ortamına eklenen bazı maddelerin etkisini incelemek için denemeler yapmıştır. Besin ortamına ilave edilen 5 mg/l kinetin, 5 mg/l 2,4-D, 120 g/l sakkaroz ve 37,3 mg/l Na₂EDTA+27,8 mg/l FeSO₄7H₂O ilavesinin embriyo oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir.

Dolcet-Sanjuan et al. (1997), tarafından dolmalık biber genotiplerinde yapılan bir çalışmada besin ortamında farklı karbonhidrat kaynaklarının ve karbondioksit zenginleştirmesinin etkisi incelenmiştir. Çalışmada, Nitsch and Nitsch ortamının modifiye edilmiş halini kullanan araştırmacılar yarı katı ve sıvı olmak üzere çift faz uygulamasında karbonhidrat kaynağı olarak maltoz ve sakkarozun etkisini denemişlerdir. Çalışma sonucunda, en fazla embriyo oluşumu 40 g/l maltoz kullanımı ile elde edilirken, 10 g/l ve 20 g/l maltoz içeren ortamlarda embriyo gelişiminin daha başarılı olduğu bildirilmiştir. Genotiplere göre değişmekle birlikte, 3-750 arasında değişen embriyo oluşumu ve 0,25 ile 8 arasında değişen bitki oluşumu kaydedilmiştir. Bu çalışma ayrıca biber anter kültüründe karbonhidrat kaynağı olarak maltoz kullanımının denendiği ilk çalışma olmuştur.

Park et al. (2013), tarafından 6 farklı çeltik genotipinde yapılan çalışmada ise maltoz kullanımının genotiplere göre değişmekle birlikte kallus oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir. Maltoz konsantrasyonunun artması, çeltikte bitki oluşumunu arttırsa da, yüksek maltoz dozunun çeltikte albino bitki oluşumuna yol açtığı belirtilmiştir.

Çömlekçioğlu vd. (1999), Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber popülasyonlarında anter kültüründe uygun besin ortamı ve kültür koşullarını belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Denemelerinde, 4 farklı besin ortamı (I. Ortam: 5 mg/l kinetin, 5 mg/l 2,4-D, 120 g/l sakkaroz, 37,3 mg/l Na₂EDTA+27,8mg/l FeSO₄7H₂O içeren Abak (1983) ortamı; II. Ortam: 0,01 mg/l 2,4-D, 0,01 mg/l kinetin, 30 g/l sakkaroz içeren Dumas de Vault et al. (1981) besin ortamı; III. Ortam: 4 mg/l kinetin, 1 mg/l NAA, 30 g/l sakkaroz, %0.25 aktif kömür içeren LiChunling (1992) besin ortamı; IV. Ortam: 4 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP, 30 g/l sakkaroz içeren Li Chunling (1994) besin ortamı ve 2 ön sıcaklık

(4°C’de 2 gün bekletme ve 35°C’de 8 gün bekletme) uygulaması kullanmışlardır. 4 mg/l kinetin ve 1 mg/l NAA içeren Li Chunling (1992) ve 4 mg/l NAA ve 0,1 mg/l BAP içeren LiChunling (1994) besin ortamlarından ve 35°C’de 8 gün bekletme ön uygulamasından çok sayıda embriyo elde edilebilmiştir.

Ellialtıoğlu vd. (1999), Kahramanmaraş biber popülasyonunda anter kültüründe farklı besin ortamlarının etkisini araştırmışlardır. Besin ortamı olarak Dumas de Vault et al. (1981) tarafından tanımlanmış 5 mg/l 2,4-D, 5 mg/l kinetin ilave edilmiş C ortamı ve 4 mg/l NAA, 1 mg/l BA ilave edilmiş MS ortamı kullanılmıştır. Kontrol grubu dışında besin ortamlarına %1 aktif kömür yalnız olarak ve 20 ml/l havuç ekstraktı ile birlikte eklenmiştir. Çalışma kapsamında ilk inkübasyon uygulamasında petriler 35°C’de karanlıkta 8 gün süresince tutulmuş, sonrasında 25°C’ye alınmış ve 0,1 mg/l kinetin içeren R ortamına transfer edilmişlerdir. Diğer inkübasyon koşulu ise, 29°C’de sürekli aydınlık koşullarda bekletme olmuştur. En fazla embriyo oluşumu, 29°C’de sürekli aydınlık koşullarda bekletilen aktif kömür ile havuç ekstraktı içermeyen MS ortamında gözlemlenmiştir.

Çiner ve Tıprıdamaz (2002), Malatya isimli lokal bir biber genotipiyle yaptıkları çalışmada biberde anter kültüründe besin ortamına eklenen aktif kömürün ve soğuk uygulamasının etkisini araştırmışlardır. Soğuk uygulamaları 4°C’de, 48 ve 96 saat bekletme şeklinde yapılmıştır. Besin ortamı olarak ise %0,8 agar, %3 sakkaroz, %0.25 aktif kömür, 4 mg/l NAA, 1 mg/l BA içeren ve 1 mg/l NAA, 4 mg/l BA içeren MS besin ortamları kullanılmıştır. En başarılı sonuçlar hiçbir ön uygulamaya tabi tutulmayan ve aktif kömürlü 4 mg/l NAA, 1 mg/l BA içeren ortamdan alınmıştır. Ayrıca; anter kültürü çalışmaları için en uygun anter gelişim safhası olan tek çekirdekli veya 1. polen mitozu aşamasındaki tomurcukların 5 mm çap ve 7 mm uzunlukta olduğunu, bu irilikteki anterlerin yeşil renkli, uçlarında ise mor rengin görüldüğünü bildirmişlerdir.

Büyükalaca vd. (2004), tarafından yapılan anter kültüründe gümüş nitrat kullanımının ve bitkilerin yetiştirilme koşullarının etkisinin incelendiği bir çalışmada, 2 farklı yerel paprika biber genotiplerinde 4 farklı gümüş nitrat dozu (5, 10, 15, 20 mg/l) denenmiştir. Çalışma sonucunda serada yetiştirilen bitkilerde

açık tarlada yetiştirilenlere göre her gümüş nitrat dozunda 4 kat daha fazla embriyo oluşumu gözlenirken, en başarılı sonuç 45,7 embriyo/ 100 anter oranıyla 15 mg/l gümüş nitrat içeren ve serada yetiştirilen genotiplerden elde edilmiştir.

Sayılır ve Özzambak (2005), altı farklı biber çeşidinde yapılan anter kültürü çalışmalarında besin ortamı olarak 4 mg/l NAA, 0,1 mg/l BA, havuç ekstraktı, aktif kömürün farklı dozlarını içeren MS ve B5 ortamları kullanmışlar ve 6 farklı kombinasyon oluşturulmuştur. En başarılı sonuçlar, 4 mg/l NAA, 0,1 mg/l BA içeren MS besin ortamından alınmıştır. 5-6 mm uzunluğundaki tomurcuk büyüklüğünün anter kültürü için en uygun tomurcuk büyüklüğü olduğunu bildirmişlerdir.

Biberde anter kültürü çalışmalarında bazı araştırmacılar, anter verici bitkiden kaynaklanan faktörler ve anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörleri tek tek ele alsalar da, birçok araştırmacı bu faktörleri birlikte ele alarak çalışmalar yapmışlardır ve başarıya ulaşmada farklı faktörlerin birlikte etkili oldukları sonucuna varmışlardır.

Taşkın vd. (2011), biberde anter kültüründe farklı genotiplerin, besin ortamlarının ve anter alma dönemlerinin etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla 5 adet biber genotipi (düşük sıcaklığa tolerant A71, A269, A313; düşük sıcaklığa orta derecede tolerant A109 genotipi ve düşük sıcaklığa duyarlı A74 genotipi) ve 4 adet besin ortamı (I nolu besin ortamı: MS + 30 g/l sakkaroz + %0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP, II nolu besin ortamı: MS + 30 g/l sakkaroz + %0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP, III nolu besin ortamı: MS + 30 g/l sakkaroz + %0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l NAA + 1 mg/l BAP, IV nolu besin ortamı: modifiye edilmiş MS + 30 g/l sakkaroz + %0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l NAA + 0.1mg/l BAP) kullanmışlardır. Deneme her ay yeniden kurulmuştur. Ayrıca kültüre alınan ortamlarda gelişmesini tamamlayamayan embriyolar 10 gün süresince 0,5 mg/l absisik asit içeren besin ortamına alınarak absisik asitin embriyo olgunlaşmasına etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Genotipler arasında en yüksek embriyo verimi düşük sıcaklığa tolerant olarak belirlenmiş olan 269 nolu genotipten elde edilmiştir. Anter alma

dönemlerinden ise en başarılı sonuçlar Nisan ve Mayıs aylarından elde edilmiştir. Besin ortamları arasında ise III ve IV no' lu besin ortamlarından diğer ortamlara göre daha fazla sayıda embriyo elde edilmiştir. Olgunlaşmamış embriyolara absisik asit uygulamasından olumlu sonuçlar alınamamıştır.

Ata (2011), biberde yaptığı anter kültürü çalışmasında farklı genotiplerin (düşük sıcaklığa hassas 195 no' lu genotip, tolerant 421 no' lu genotip, yüksek sıcaklığa hassas 277 nolu genotip, tolerant İnan 3363 çeşidi), besin ortamına ilave edilen 2 farklı BAP dozunun ve farklı kültüre alma zamanlarının etkilerini araştırmıştır. Ekim, Şubat, Mayıs ve Ağustos aylarında anter kültürlerinin 0., 1., 2., 3., 4., 8. ve 14. günlerinde anterler alınarak fiksasyon çözeltisi ile sabitlenerek DAPI ve asetokarmen boyama yöntemleriyle mikrospor gelişimleri incelenmiştir. Genotipler arasında en yüksek embriyo verimi, İnan 3363 no' lu genotipten, anter alma dönemlerinden ise en olumlu sonuçlar Nisan ve Ağustos aylarından elde edilmiştir. Besin ortamları arasında ise Kasım, Aralık, Ocak, Nisan ve Eylül aylarında MS + 30 g/l sakkaroz + %0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 0.1mg/l BAP besin ortamı ve Ekim, Mart, Mayıs, Temmuz ve Ağustos aylarında MS + 30 g/l sakkaroz + %0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP besin ortamı daha başarılı bulunmuştur. Bitkiye dönüşüm açısından Nisan ayından daha olumlu sonuçlar alınmıştır.

Olszewska et al. (2013), Polonya'da 17 adet biber genotipinde anter kültüründe 3 farklı inkübasyon zamanı (12, 14 ve 16 gün) ve CP ortamında besin ortamına eklenen 2 farklı kinetin dozunun (0,1 ve 0,3 mg/l) kombine etkisini araştırmışlardır. Bitkisel materyal olarak ıslah hatları; *C. annuum*'un tür içi 4 adet hibriti, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* var. *pendulum* türleri, *C. frutescens* × *C. chinense*'nin türler arası F1 hibritleri, *C. frutescens* × *C. baccatum*'un türler arası F1 hibritleri ve hibritlerden elde edilen dihaploitler kullanılmıştır. Deneme sonuçları, daha önce tanımlanan standart protokolün (CP ortamında 12 gün inkübasyon, 0,1 mg/l kinetin içeren R1 ortamı) sonuçları ile karşılaştırma şeklinde değerlendirilmiştir. Kontrolde denenen genotiplerden sadece 3 adedinden tepki alınırken, denemelerle bu sayı 12'ye çıkarılmıştır. En başarılı uygulama olarak CP ortamında 16 gün bekletme ile 0,1 mg/l kinetin içeren R1 ortamının kombinasyonu olmuştur. 12 ve 14 gün bekletme uygulaması,

0,3 mg/l kinetin içeren ortamların kombinasyonu ile daha etkili olarak bulunmuştur.

Biberde anter kültüründe besin ortamı ve genotipin etkilerini araştırmak için Alremi et al. (2013)' nin yaptığı çalışmada, 3 farklı genotip (B, 151 ve 171 no'lu ıslah hatları) ve 1 adet Suriye'de kullanılan biber çeşidi (Alfajer) ile 16 farklı besin ortamı kombinasyonu test edilmiştir. Besin ortamı olarak Dumas de Vaulx ve ark. (1981) tarafından önerilen besin ortamının 8 farklı kombinasyonu (C serisi, C1-C8) ve Murashige ve Skoog (1962) temel besin ortamının 8 farklı kombinasyonu (B serisi, B1-B8) kullanılmıştır. Değerlendirmeler genotip bazında yapılmış; her uygulama için dikilen anter sayısı, gelişerek transfer ortamlarına alınan anter sayıları, embriyogenik anter sayısı, gelişen anter başına elde edilen embriyo sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları hesaplanmıştır. Alfajer ve B hattı biber genotiplerinde Kinetin + 2,4-D içeren C serisi ortamlarından daha olumlu sonuçlar alınmıştır. 151 ve 171 no'lu yerel genotiplerde ise en başarılı sonuçları MS temelli ve NAA+BAP içeren B serisi ortamları vermiştir. Besin ortamına % 0.25 oranında ilave edilen aktif kömür, embriyo oluşumunu genotipe bağlı olarak artırmıştır. Embriyo oluşumu bakımından gümüş nitrat içermeyen B5 ortamı en yüksek sonuçları vermiş ve bu ortamı C6, B3, B2, B7 besin ortamları izlemiştir. Elde edilen embriyoların tamamı (B3 ortamında elde edilenler hariç olmak üzere) bitkiye dönüşmüştür. Alfajer çeşidi ve B ıslah hattı, 151 ve 171 no'lu genotiplerden daha başarılı sonuçlar vermiştir. Ploidi düzeyine ilişkin bulgular değerlendirildiğinde, elde edilen embriyolardan gelişen bitkilerin %94'ünün haploit kromozom yapısına sahip oldukları bildirilmiştir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma 2013-2015 yılları arasında Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı ve Ege Üniversitesi Tohumculuk Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında yürütülmüştür. Araştırmada bitkisel materyal olarak AD-Rossen Tarım tarafından bazı hastalıklara dayanıklılığı belirlenmiş 4 hibrit (Asena, Athena, Naomi, Rain Nil) biber çeşidi kullanılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Denemede kullanılan genotipler ve özellikleri

Çalışmada bitkisel materyal olarak 2 adet kapa, 1 adet dolma ve 1 adet demre sivri tipi biber kullanılmıştır.

Asena F1:

Tütün mozaik virüsüne dayanıklılığı belirlenmiş kapa biber tipindedir. Açık tarla üretimine ve sanayiye uygun güçlü yapıda bir bitkidir. Meyveleri yeşil renktedir. Kolay meyve tutumu ve yüksek verim özelliklerine sahiptir (Şekil 3.1 a).

Naomi F1:

Örtü altı ve açık saha üretimine uygun dolmalık biber çeşididir. Bitki yapısı kuvvetlidir. Açık alanda yatma yapmaz. Meyveleri kapatan bitki yapısına sahiptir. Yan dal meyve tutumu yüksektir. Meyve şekli homojen olup dört lopludur. İhracata uygun meyve renk ve kalitesine sahiptir. Uzun raf ömrüne sahiptir (Şekil 3.1 b)

Rain Nil F1:

Demre tipi hibrit biber çeşididir. Meyve tutum oranı oldukça yüksektir. Yüksek verimli olan bu çeşidin meyve ağırlığı ortalama 50-55 g' dır. Bitki

habitusu kuvvetli ve orta yüksekliktedir. Hasat sonrası raf ömrü uzudur. Canlı ve parlak yeşil renkte meyvelere sahiptir (Şekil 3.1 c).

Athena F1:

Açık tarla ve sanayi üretimine uygun kapa biber çeşididir. Meyveler yassı, koyu kırmızı ve tadı acıdır. Erkeni grupta yer alır. Acı sos üretiminde tercih edilen bir çeşittir.



Şekil 3.1 a. Asena F1 genotipi b. Naomi F1 genotipi c. Rain Nil F1 genotipi. d. Athena F1 genotipi

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

AD-Rossen firmasından temin edilen ve 20.01.2014 tarihinde ekilen tohumlardan elde edilen fideler 03.03.2014 tarihinde uygun büyüklükteki saksılara her bir çeşitten 40 bitki olacak şekilde 20' şer adet saksıya

şıştırılmışlardır. Saksılar 25°C'deki led aydınlatma kullanılan iklim odasında yetiştirilmiştir (Şekil 3.2).

25°C' de yetiştirilen bitkilerden 09.05.2014 tarihinde ilk tomurcuklar alınmaya başlanmıştır.



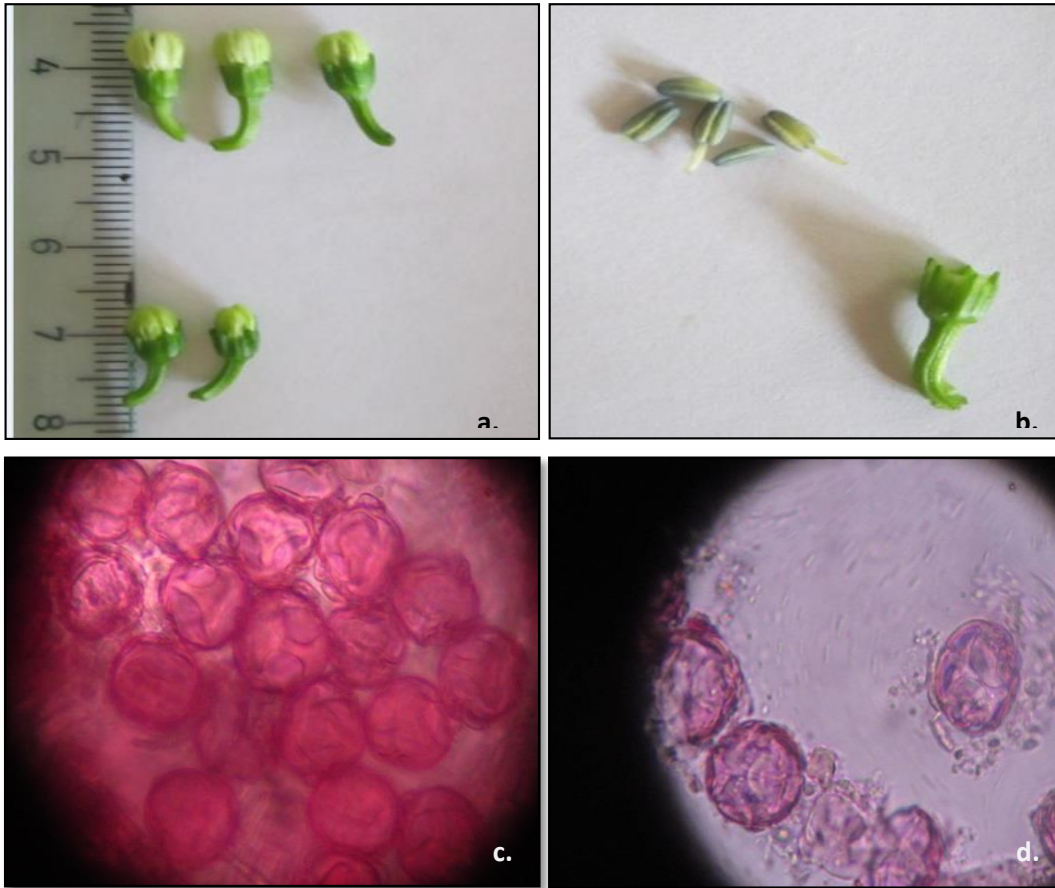
Şekil 3.2. Denemede kullanılan ve iklim odasında yetiştirilen bitkiler.

3.2.2. Uygun anterlerin seçimi ve gelişme safhasının belirlenmesi

İklim odasında yetiştirilen bitkilerden 3 mm ile 8 mm arasındaki tomurcuklar toplanmış (Şekil 3.3 a.), kaliks ve korolla kısımları dikkatli bir şekilde tomurcuklardan uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.3. b). Bir bisturi yardımı ile seçilen anterlerin filament kısımları ayrılmıştır. Mikrosporların içerisinde bulunduğu gelişme aşaması asetoorsein kullanıldığında hızlı boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Anterler lam üzerine alınarak asetoorsein yardımı ile ezme preparatlar hazırlanmıştır. Lam üzerine alınıp üzerine asetoorsein damlatılan anterlerin üzeri lamel ile dikkatlice kapatılarak anter keselerinin açılıp mikrosporların açığa çıkmasını sağlamak için preparata hafif kuvvetli bir biçimde sert bir cisim ile vurulmuştur.

Bu işlem ile mikrosporlar açığa çıkmış ve boyanmıştır. Hazırlanan preparat, mikroskop altında incelenmiştir. Tomurcukların boyutlarına göre elde edilen görüntüler incelenip tetrat aşamasından önceki yapılar gözleendiğinde daha büyük tomurcuklarla preperat hazırlamaya devam edilmiştir. Şekil 3.3 c' de görüldüğü gibi tetrat aşamasının belirlendiği tomurcuklarda ise preperat hazırlama işlemine son verilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda çalışmaya 4-5 mm arasındaki anterler ile devam edilmiştir. (Parre-Vega et al., 2013; Abak, 1983).

Çalışmaya devam edilen boyuttaki tomurcuklar aynı zamanda daha önceki çalışmalarda da uygun büyüklük olduğu belirlenen kaliks ve korolla kısımlarının birbirine eşit olduğu ve anterlerde yarıya kadar antosiyan oluşumu gözlenen tomurcuklardır (Sibi et al., 1979; Ellialtıoğlu, 1999; Taşkın 2005).



Şekil 3. 3. a.Uygun tomurcuk büyüklüğünün belirlenmesi **b.** Kaliks ve korollanın ayrılması **c ve d** tetrat aşamasındaki mikrosporlar.

3.2.3. Kullanılan besin ortamları ve besin ortamlarının hazırlanması

Çalışmada anter kültürü için literatürde denenmiş ve başarı elde edilmiş MS temel besin ortamına ek olarak farklı şekerlerin (sakkaroz ve maltoz) ve gümüş nitrat (AgNO_3) miktarının kallus ve embriyogenesiz oluşumuna etkisini incelemek için Çizelge 3.1’ de verilen 6 farklı besin ortam kullanılmıştır.

Çizelge 3.1’ de içerikleri belirtilen besin ortamları istenilen miktarda hazırlandıktan sonra pH bitki gelişimi için optimum değere (pH 5,8) getirilmiştir. Jelleştirici olarak ise % 0,7’lik agar kullanılmıştır. Uygun hacimdeki erlenmayerlerde hazırlanan ortamlar ağızları pamuk ile kapatılarak alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra 121°C ’de 1 atm basınçta 15 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkartılan erlenmayerlerin yüzeyi bolca alkollenerek steril kabin içerisine alınmıştır ve burada çalışmada kullanılacak olan steril petrilerin içerisine yaklaşık 10 ml oranında dökülmüşlerdir. İçerisine besin ortamı dökülen petriler donduktan sonra etiketlenerek streç film ile sarılıp kullanılabilece kadar uygun biçimde saklanmışlardır.

Çizelge 3.1. Anter kültürü çalışmasında kullanılan besin ortamları ve içerikleri.

Ortamlar	Şeker	AgNO ₃	Bitki Büyüme Düzenleyiciler	Aktif karbon (2,5 g/l)
S0	Sakkaroz (30g/l)	0 mg/l	NAA 4mg/l BAP 0,1 mg/l	
S10		10 mg/l		
S15		15 mg/l		
M0	Maltoz (30g/l)	0 mg/l		
M10		10 mg/l		
M15		15 mg/l		

Rejenerasyon görülen anterler için ise hormonsuz MS ortamı hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan besin ortam steril edilmeden önce kültür tüplerine yine 10 ml olarak şekilde dökülmüştür ve tüplerin ağzı pamuk ile kapatılarak alüminyum folyo ile sarılmış, otoklavlanarak steril edilmiştir. Steril edilen tüpler kullanılabilecek kadar uygun ortamda muhafaza edilmişlerdir.

3.2.4. Anterlerin alınması

Sterilizasyonu tamamlanan tomurcuklar, etüvde steril edilerek yüzeyleri bolca %70' lik alkol ile spreylenerek kabin içerisine alınmış pens ve bistüriler yardımı ile cam petri içerisinde dikkatli bir şekilde açılarak anterler çıkartılmıştır.

Kabinde çalışma esnasında eldiven, maske, bone ve önlük kullanılarak herhangi bir kontaminasyon riskine karşı önlem alınması amaçlanmıştır. Ayrıca kullanılan metal malzemeler sıklıkla %70'lik alkolle spreylenerek sterilizasyonun devamlılığı sağlanmaya çalışılmıştır.

Tomurcuklardan çıkartılan anterlerden anter sapçıklarının (flament) ayrılmış olmasına dikkat edilmiştir. Flamentlerinden ayrılan anterler besin ortamlarına aktarılmışlardır. Her petri kabına 3 tomurcuktan çıkan ortalama 15 anter dikilmiş ve kapakları kapatılıp streç film ile sarılmıştır.

3.2.5. Kültür koşulları ve ön uygulamalar

MS besin ortamına yerleştirilen anterler, 35 °C' de ve karanlık ortamda 2 gün süre ile ön uygulamaya tabi tutulmuşlardır (Sibi et al., 1979; Büyükalaca ve ark. 2004, Kim et al. 2008, Taşkın ve ark. 2011, Kim et al. 2013). Ön uygulamayı takiben petriler led aydınlatma kullanılan iklim odasında 25±1°C sıcaklıkta bekletilmişlerdir

3.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistikî Analiz

MS temel besin ortamı ile büyüme düzenleyici kombinasyonları kullanılan deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 2 faktörlü (4 genotip x 6 besin ortam) olarak kurulmuştur. Her uygulama, 3 tekrarlı ve her tekrarda ortalama 3 tomurcuk olacak şekilde kültüre alma işlemi tamamlanmıştır. Değerlendirme kültüre alınan anter başına elde edilen kallus, embriyo ve bitkiye dönüşüm olarak yapılmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen verilere karekök transformasyonu uygulandıktan sonra SPSS versiyon 16.0 for Windows programı kullanılarak değerlendirilmiş ve %5 güven aralığı için LSD değeri belirlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

AD-ROSSEN Tarım firmasının dört farklı F1 hibrit biber çeşidinde MS temel besin ortamında iki farklı disakkarit şeker (sakkaroz ve maltoz) ve üç farklı AgNO_3 dozu (0 mg/l, 10 mg/l, 15 mg/l) olmak üzere 6 farklı ortamın androgenes performansları incelenmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

4.1. Anterlerden Elde Edilen Kallus Oluşumları

Denemede elde edilen veriler çeşit-ortam interaksyonu, çeşit ve ortam parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Genotiplere ve ortamlara göre değişmekle birlikte, kültürün ilk haftasında şişmeye ve kararmaya başlayan anterlerden kültürün 2. haftasında ilk kallus oluşumları görülmeye başlanmıştır. Kültüre alınan anterlerden genel olarak beyaz ve yeşil renklerde ve kompakt yapılı kalluslar elde edilmiş, ancak bazı uygulamalarda ve bazı genotiplerde gevşek yapılı kallus oluşumlarına da rastlanmıştır.

Dört farklı F1 hibrit biber çeşidiyle yapılan çalışmada kallus oluşumları genotiplere ve kullanılan besin ortamına göre farklılık göstermiştir. Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de görüldüğü gibi yapılan istatistikî analiz sonucunda, Çeşit-Ortam interaksyonu, kallus oluşum oranı açısından istatistiki önemli bulunmuştur. En yüksek kallus oluşum oranı Asena çeşidinin M15 (%74,2) ortamı ile M10 (%71,1) ortamında kültüre alınması ile elde edilmiştir. Buna karşılık M0 ortamında Athena çeşidinde hiç kallus oluşumu elde edilmemiştir ve bu uygulama kallus oluşumu açısından istatistiki olarak son grupta yer almıştır.

Kullanılan 6 farklı ortamın hepsinde kallus oluşumu gözlenmiş olmasına karşılık, en fazla kallus Asena çeşidinden elde edilmiştir. Yapılan istatistik analiz sonucunda kallus oluşturma oranı bakımından Asena çeşidi (%41,0) ilk grupta yer alırken, onu Naomi (%18,8), Athena (%11,3) ve Rain Nil (%7,2) çeşitleri izlemiştir.

Besin ortamı bazında incelendiğinde ise en iyi kallus oluşumu M10 ortamında (%30,4) elde edilirken, onu istatistiki olarak aynı grupta yer alan M15 ortamı (%28,7) takip etmiştir. Kallus oluşturma bakımından en düşük sonuçlar ise %5,7 ile M0 ortamından elde edilmiştir.

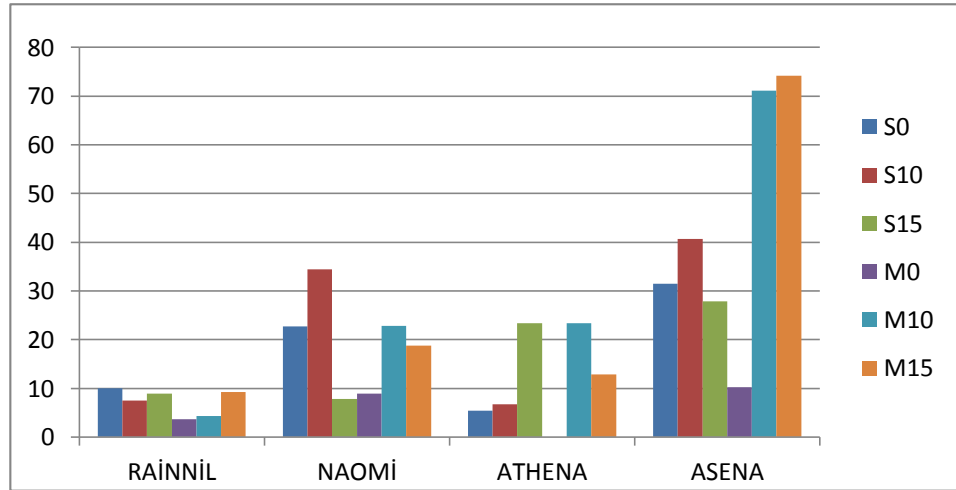
Çizelge 4.1. Genotip ve besin ortamlarına göre anterlerden elde edilen kallus oranları (%)

	RAİN NİL	NAOMİ	ATHENA	ASENA	ORT
S0	10,0	22,7	5,4	31,5	17,4 (3,958) c
S10	7,5	34,4	6,7	40,7	22,3 (4,242) bc
S15	8,9	7,8	23,4	27,9	17,0 (3,958) c
M0	3,7	8,9	0,0	10,2	5,7 (1,933) d
M10	4,3	22,8	23,4	71,1*	30,4 (4,933) a
M15	9,2	18,8	12,8	74,2*	28,8 (4,867) ab
ORT	7,2 (2,506) c	18,8 (4,239) b	11,3 (2,939) c	41,0 (6,224) a	
**LSD(%5)	Çeşit: 0,503 Ortam: 0,653 Çeşit x Ortam: 1,305				

** karekök transformasyonu sonucu elde edilen LSD (%5) değerleri

*çeşit x ortam interaksyionunda istatistiki olarak ilk grupta yer alanlar

() içerisindeki değerler karekök transformasyon değerleridir.

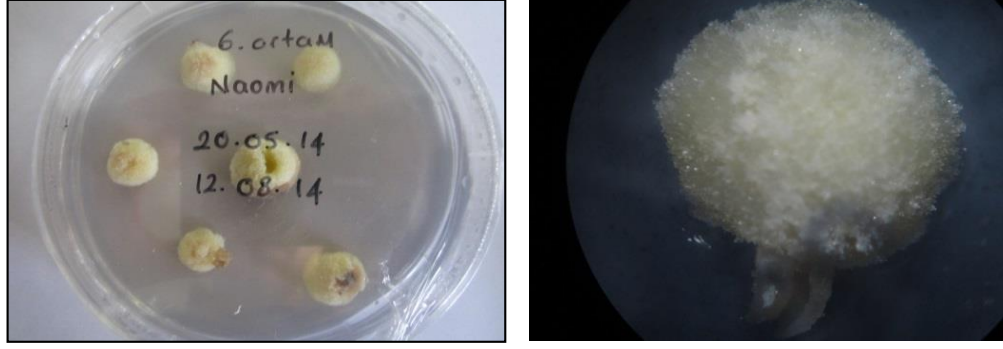


Şekil 4.1. Genotip ve besin ortamlarına göre anterlerden elde edilen kallus oranları (%).

Besin ortamları ve farklı genotiplere bağı olarak kallus oluşum oranlarının değiştiği, yapılan bu çalışma sonucunda görülmektedir. Bu bulgular genotipin anter kültürüne etkisini inceleyen Roshany et al.(2013), Mityko and Fari (1997), Ercan vd. (2011), tarafından yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermekte ve biber anter kültüründe genotipin çok büyük oranda etkisinin olduğunu genetik özelliklere göre kallus oluşum oranlarının ve androgenes başarısının değiştiği sonucunu ortaya koymaktadır. Çalışmada kullanılan dolma, demre, acı kapy (paprika) ve tatlı kapy tipi biberler içerisinde en başarılı sonuç tatlı kapy genotipinden alınmış ve diğer genotiplerde kallus oluşum oranları düşmüştür. Bu sonuç, Ercan vd. (2011) tarafından yapılan çalışma sonuçları ile büyük oranda benzerlik göstermektedir. Qin and Rotino (1993)' a atfen Roshany et al (2013), anter kültürü tekniğinde kallus oluşumunun yüksek oranda genotipe, düşük oranda ise kültür koşullarına bağı olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışma sonucunda çeşitlere bağı kalmaksızın her ortamdan kallus elde edilmesi, biber anter kültürü için MS temel besin ortamı ve 4 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP + 2,5 mg/l aktif karbon + 30 g/l şeker içeriğinin en uygun ortam kombinasyonu olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen kallus miktarındaki farkın ise besin ortamına ilave edilen gümüş nitrat oranlarından ve genotiplerin besin ortamında farklı tepkiler vermesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Kullanılan besin ortamına ilişkin bu sonuçlar Chunling, (1992), Çömlekçioğlu, (2001), Alremi, (2013) tarafından yapılan çalışma sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

Kullanılan ortamlar disakkarit şeker içeriklerine göre değerlendirildiğinde maltoz kullanılan besin ortamlarında kallus oluşumunun sakkaroz kullanılan besin ortamlarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Park et al. (2013), tarafından farklı çeltik çeşitlerinde yapılan çalışma ile de benzerlik göstermektedir. Maltoz kullanımı sakkaroz kullanımıyla karşılaştırıldığında, besin ortamının osmatik kararlılığını artırması nedeniyle anter kültüründe başarının artmasını sağladığını düşündürmektedir.



Şekil 4.2. Kültüre alınan anterlerden gelişen kalluslar.

4.2. Anter Kalluslarından Elde Edilen Embriyo Oluşumları

Ön uygulama gerçekleştirildikten sonra 6 farklı ortamda kültüre alınan 4 farklı çeşit için embriyo oluşumları çeşit-ortam interaksyonu, çeşit ve ortam açısından değerlendirilmiştir. Embriyo oluşumları çalışma başlangıcından yaklaşık 6 hafta sonra gözlenmeye başlanmıştır.

İstatistik analiz sonuçlarına göre Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3'te görüldüğü gibi, Çeşit-Ortam interaksyonu embriyo oluşumu açısından 0,05 güven aralığında önemli bulunmuştur. En fazla embriyo oluşumu % 358,7 ile S15 ortamında Athena çeşidinde elde edilmiştir. Rain Nil çeşidinde S0, S10, S15 ve M10 ortamlarında, Naomi çeşidinde S0, S10, S15, M0 ve M10 ortamlarında, Athena çeşidinde S0, S10, M0, M10 ve M15 ortamlarında ve Asena çeşidinde ise S0 ve S15 ortamlarında hiç embriyo oluşumu gözlenmemiştir ve bu uygulamalar istatistiki olarak son grupta yer almışlardır.

Çalışmada yer alan her çeşitten besin ortamlarına bağlı olarak embriyo elde edilebildiği kaydedilmiştir. Elde edilen değerler istatistikî olarak incelendiğinde en fazla embriyo %60,1 ile Asena çeşidinden elde edilirken, onu Athena (%55,8) çeşidi izlemiştir. Naomi (%19,1) ve Rain Nil (%17,5) çeşitleri ise embriyo oluşum oranlarına göre istatistikî olarak son grupta yer almışlardır.

Çalışma sonuçları ortamlar bazında incelendiğinde ise en başarılı sonuç bir genotip hariç her genotipten embriyo oluşumu gözlenen M15 ortamından elde edilmiştir. En az embriyo oluşumu gözlenen S10 (%6,1), M0 (%4,8), ve S0 (%0,0) ortamları ise istatistikî olarak son grupta yer almışlardır.

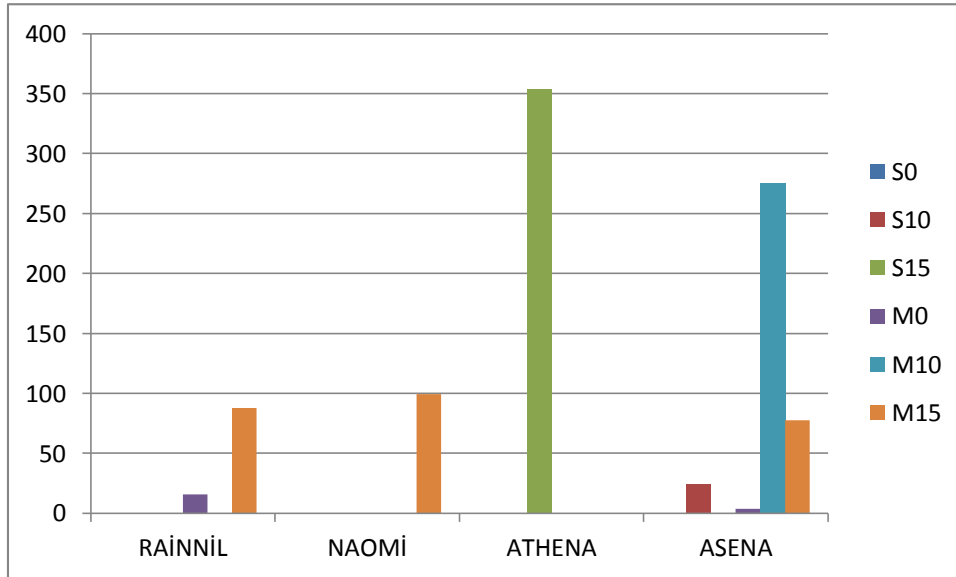
Çizelge 4.2. Genotip ve besin ortamlarına göre anter kalluslarından elde edilen embriyo oranları (%)

	RAİN NİL	NAOMİ	ATHENA	ASENA	ORT
S0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 (0,0) e
S10	0,0	0,0	0,0	24,3	6,1 (1,233) d
S15	0,0	0,0	358,7*	0,0	89,7 (4,725) b
M0	15,7	0,0	0,0	3,7	4,8 (1,383) d
M10	0,0	0,0	0,0	275,3*	68,8 (4,150) c
M15	87,8	99,4	0,0	77,6	66,2 (7,033) a
ORT	17,5 (2,22) c	19,1 (1,661) d	55,8 (3,150) b	60,1 (5,317) a	
**LSD (%5)	Çeşit: 0,290 Ortam: 0,355 Çeşit x Ortam: 0,711				

** karekök transformasyonu sonucu elde edilen LSD (%5) değerleri

*çeşit x ortam interaksyionunda istatistiki olarak ilk grupta yer alanlar.

() içerisindeki değerler karekök transformasyon değerleridir.



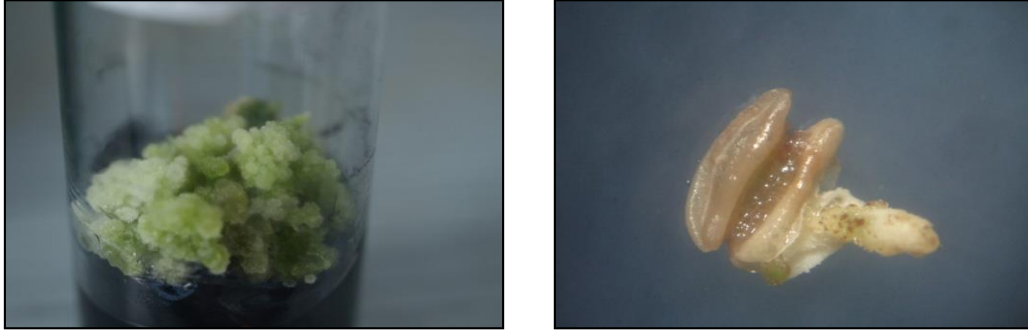
Şekil 4.3. Genotip ve besin ortamlarına göre anter kalluslarından elde edilen embriyo oranları (%)

Çalışma kapsamında kullanılan 4 farklı genotip ve 6 farklı besin ortamı kombinasyonundan elde edilen embriyo oluşum oranlarının farklılık göstermesi, biber anter kültüründe başarının genotip ve besin ortamı içeriğine bağlı olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur. S10 ve S15 ile M10 ve M15 ortamlarında yüksek embriyo oluşumunun görülmesi ve AgNO_3 kullanılmayan ortamlarda embriyo uyartımının zayıf olması, besin ortamına ilave edilen AgNO_3 'ün embriyo oluşumunu teşvik ettiğini göstermiştir. Elde edilen bu sonuçlar biber anter kültüründe en başarılı embriyo oluşumunun 10 mg/l ve 15 mg/l gümüş nitrat kullanımıyla elde edildiğini bildiren Büyükalaca vd. (2004), tarafından yapılan çalışma ile de uyum göstermektedir. Gümüş nitratın etilen biyosentezini bloke edici özelliğinin bulunması (Bois et al, 2000) ve bitki doku kültürü çalışmalarında bitkiler kesildikten sonra strese girerek etilen salgılaması nedeniyle besin ortamlarında gümüş nitrat kullanımının etilenin etkisini ortadan kaldırdığı ve böylece embriyo elde edilmesinde başarıyı arttırdığı yorumu yapılmıştır.

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar besin ortamlarında kullanılan farklı karbonhidrat kaynaklarına göre değerlendirildiğinde ise kullanılan genotiplere göre farklılık göstermekle birlikte biber anter kültüründe maltoz kullanımının sakkaroz kullanımına göre embriyo oluşumunda gözle görülür bir fark yarattığını gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç Park et al., (2013) ve Dolcet-Sanjuan et al., (1997) tarafından yapılan çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Nitekim sakkarozun besin ortamında fruktoz ve glikoza ayrışması ve mikrosporların fruktoz ve glikoza hassas olabileceği, maltozun daha yavaş bir biçimde glikoza dönüşümü ve diğer şekerlerin zararlı etkilerinin elemine edilmesi nedeniyle maltoz kullanımından daha başarılı sonuçlar alındığı yorumuna varılmıştır (Finnie et al, 1989).

Kullanılan farklı genotipler ve elde edilen embriyo oluşumu bakımından değerlendirme yapıldığında ise genotip ve morfolojik özellikler ile anter kültürü sonuçları arasında bir bağlantı olduğu belirlenmiştir. Tatlı kapyra tipi olan Asena genotipinde en başarılı sonuçlar alınırken, acı kapyra tipi olan Athena genotipinde tek bir ortam dışında başarı elde edilememiştir. Bu bulgu acı biber populasyonlarında androenez performansının düşük olabileceği sonucunu akla getirmektedir ve bu durum birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalar ile

benzerlik göstermektedir (Irikova and Rodeva, 2004; Koleva-Godeva, 2007; Ochoa-Alejo et al., 2001). Anter kültüründe başarının genotiplere göre büyük oranlarda değişmesi androgenez performansının genetik yatkınlık ile ilişkili olduğunu akla getirmekte ve bu durumun daha kapsamlı genetik tanımlamalar ile açıklanması gerektiği sonucunu doğurmaktadır.



Şekil 4.4. Genotiplerde anter kalluslarından elde edilen embriyo görüntüleri

4.3. Anter Kökenli Embriyolardan Organ ve Bitkicik Elde Edilmesi

4 farklı genotip için 6 farklı besin ortamı denenilen çalışma bitkicik oluşum oranları bakımından değerlendirilmiştir. Buna göre bazı ortamlarda ve bazı çeşitlerde bitki oluşumu bakımından başarı olsa da bazı genotip ve ortamlarda hiç başarı sağlanamamıştır.

Yapılan deneme sonucunda Ortam x Çeşit interaksyonu Çizelge 4,3'te de görüldüğü gibi, bitki oluşumu bakımından önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Buna göre en başarılı sonuçlar M15 ortamında Rain Nil genotipinden (%28,5) elde edilmiştir. Bunu M0 ortamında Rain Nil genotipi ve M15 ortamında Asena genotipi takip etmiştir. Athena genotipinde hiçbir ortamda bitki ya da organ oluşumuna rastlanmazken, Naomi genotipinde M10 ve M15 ortamlarında kültürün 9. haftasında kılcak tüylü kök oluşumları ve anormal yaprak oluşumlarına rastlanmıştır. Bu duruma ayrıca maltoz kullanılan ortamlarda kültüre alınan Rain Nil genotipinde de rastlanmıştır. Oluşan anormal yapıdaki organların yaklaşık 3 gün sonra karararak gelişimlerinin durduğu ve öldüğü gözlenmiştir. Kültüre alınan

anterlerden Naomi genotipinde %6,6 oranında anormal organ oluşumu görülürken, bu durumun Rain Nil genotipinde %4,16 oranında meydana geldiği saptanmıştır.

Sonuçlar ortamlar bazında incelendiğinde en başarılı sonuç alınan ortam istatistiki olarak ilk grupta yer alan M15 ortamı (%12,7) olmuştur. Bunu istatistiki olarak 2. grupta yer alan M0 ortamı (%6,1) takip etmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen veriler istatistiki olarak genotipler bakımından incelendiğinde ise en fazla bitki oluşumu %8,4 oranı ile Rain Nil çeşidinden elde edilmiş ve Rain Nil genotipi bitkicik oluşturma açısından istatistiki olarak 1. grupta yer almıştır. Bu genotipi Asena %1,9 değeri ile takip etmiştir.

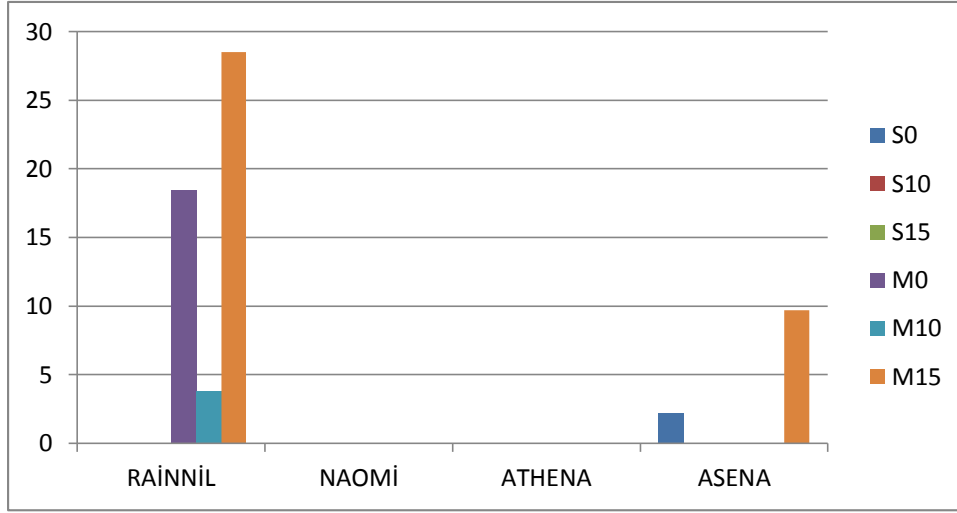
Çizelge 4.3. Genotip ve besin ortamlarına göre elde edilen bitkicik oranları (%)

	RAIN NİL	NAOMİ	ATHENA	ASENA	ORT
S0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,7 (0,25) c
S10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 (0,0) c
S15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 (0,0) c
M0	18,4	0,0	0,0	0,0	6,1 (1,00) b
M10	3,8	0,0	0,0	0,0	1,3 (0,50) bc
M15	28,5*	0,0	0,0	9,7	12,7 (1,833) a
ORT	8,4 (1,833) a	0,0 (0,00) c	0,0 (0,0) c	1,9 (0,556) b	
**LSD (%5)	Çeşit: 0,481 Ortam: 0,589 Çeşit x Ortam: 1,177				

** karekök transformasyonu sonucu elde edilen LSD (%5) değerleri

*çeşit x ortam interaksyionunda istatistiki olarak ilk grupta yer alanlar.

() içerisindeki değerler karekök transformasyon değerleridir.



Şekil 4.5. Genotip ve besin ortamlarına göre elde edilen bitkicik oranları (%)

Yapılan çalışmada sadece Asena ve Rain Nil genotiplerinde bitkicik oluşum başarısının sağlanmış olması, Athena ve Naomi genotiplerinde kallus ve embriyo oluşumu görülebilmemesine rağmen bitki rejenerasyonunun sağlanamamış olması biber anter kültüründe bitki elde edilmesinde genotipin etkinliğini açıkça göstermektedir. Bu durum demre tipi biber çeşitlerinden daha başarılı sonuç alındığını ayrıca kopya genotiplerinin androgenez açısından olumlu sonuçlar verdiğini bildiren Ercan vd., (2011) tarafından yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir. Ancak Mityko et al., (1995) tarafından yapılan çalışma sonucu ile uyuşmamaktadır. Bu sonuç androgenez performansının belirlenmesinde genotipik yatkınlığın büyük rol oynadığını ve denemede kullanılan ve başarılı sonuç alınamayan bu genotiplerin genetik olarak anter kültürü tekniğine yatkın olmadığını ortaya koymuştur.

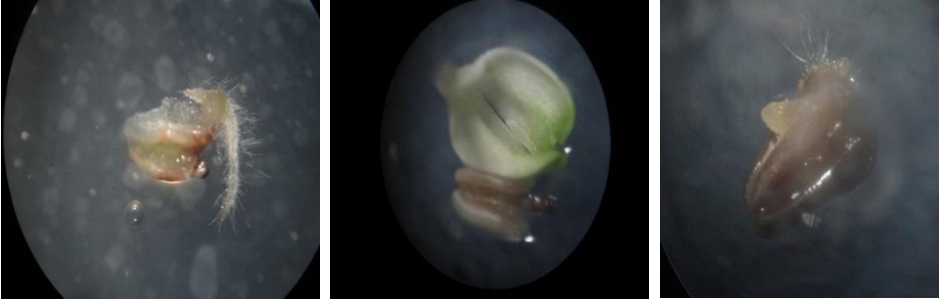
En fazla bitki rejenerasyonunun karbon kaynağı olarak maltoz kullanılan ortamlarda elde edilmesi Park et al. (2013) ve Dolcet-Sanjuan et al. (1997), Rahman et al.(2010) tarafından yapılan çalışmalar ile desteklenmekte. Rahman et al. (2010) patatestte yaptıkları çalışmada %3 oranında sakkaroz, glikoz ve maltoz kullandıkları farklı ortamlarda en başarılı bitki oluşumunun maltoz kullanılan ortamdan elde edildiğini bildirmişlerdir. Elde edilen bu sonuç aynı oranda maltoz kullanılan bu çalışma bulguları ile uyum göstermektedir. Bu durumda sadece

embriyogenez oluşumunda değil, organ ve bitkicik oluşumunda da maltozun genotiplere göre değişmekle birlikte başarıyı arttırdığı sonucunu ortaya koymaktadır. Her genotipin başarı sağlayacağı farklı karbonhidrat kaynakları olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca genotiplere göre farklılık gösterse de maltoz kullanılan ortamlarda anormal organ oluşumlarının görülmesi Park et al. (2013), tarafından yapılan ve çeltikte anter kültüründe maltoz kullanılan ortamlarda albino bitki oluşumuna sebep olduğu sonucunun elde edildiğinin bildirdiği çalışması ile benzerlik göstermektedir. Bu durum çalışmada elde edilen anormal organ oluşumlarının yüksek dozdaki maltoz miktarından kaynaklandığını düşündürmektedir. Biber anter kültüründe ilk kez karbon kaynağı olarak maltoz kullanan Dolcet-Sanjuan et al. (1997), 40 g/l maltoz kullandığı ortamlarda en yüksek başarıyı sağladığını bildirirken, en fazla normal embriyo oluşumlarına %2 oranında maltoz kullanılan ortamlarda rastlandığını belirtmiştir. Yapılan bu çalışma sonuçlarının önceki çalışmalar ile örtüştüğü ve maltoz dozunun biber anter kültüründe aktif olarak kullanılabilmesi için genotiplere göre uygun dozların belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Biber anter kültüründe pek çok farklı kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyici ve temel besin ortamı kullanılsa da 4 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP + 2,5 mg/l aktif karbon kullanılan ve AgNO_3 içeren MS temel besin ortamından en iyi başarının elde edileceği bu çalışma kapsamında bitki rejenerasyonu aşamasında da doğrulanmıştır. Elde edilen başarı, çalışmada birçok besin ortam kompozisyonunun yanında bu çalışma ile aynı ortam kombinasyonunu da kullanan Alremi, (2014) tarafından yapılan çalışma sonuçları ile benzerlik göstermekte ve farklı şekerlerin kullanımı ile de başarının artırıldığı görülmektedir.



Şekil 4.6. Asena ve Rain Nil genotipleri bitkicik oluşumu



Şekil 4.7. Naomi ve Rain Nil genotiplerinden elde edilen anormal yapılı kök ve yaprak oluşumları

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde büyük oranda yetiştiriciliği yapılan biberde ıslah çalışmalarına hız kazandırılması ve yeni çeşitlerin geliştirilmesi günümüzde büyük önem taşımaktadır. *In vitro* ortamda anter kültürü tekniğinden yararlanılarak dihaploit hatların elde edilmesi, genotiplerin homozigotlaştırılması işleminde büyük oranda zamanın kısaltılması nedeniyle ıslahta kolaylık sağlayacaktır. Bu tekniğin biberde uygulanabilirliğini arttırmak için, genotiplere özel ortam kombinasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmanın asıl temelini oluşturmuştur. Dört farklı biber genotipinin kullanıldığı bu çalışmada, farklı oranlarda gümüş nitrat ve karbonhidrat kaynağı olarak maltoz ve sakkarozun denendiği, aktif kömür ve farklı büyüme düzenleyici kombinasyonları içeren MS temel besin ortamı anter kültürü koşullarında karşılaştırılmıştır.

Kültüre alma işleminin takiben ilk hafta içerisinde anterler şişip kararmaya başlamış ve 2. hafta içerisinde kallus oluşumları gözlenmiştir. İlk embriyo oluşumlarının kültürün yaklaşık 6. haftasında görüldüğü bu çalışmada bitkiye dönüşümlerse 9. haftadan sonra meydana gelmiştir. Yapılan bu çalışmayla görülmüştür ki anter kültürü çalışmasında, donör bitkilerin yetiştirilmeye başlanmasından, bitkilerin elde edilmesine kadar geçen süre yaklaşık 1 yıl olmakla birlikte, embriyo oluşumlarının uzun süre devam etmesi ve bitki rejenerasyonlarının artması ile bu süre daha da uzamaktadır.

Farklı genotiplerdeki 4 biber hattına anter kültürü için en uygun besin ortamlarının belirlenmesi için gerçekleştirilen bu çalışmada literatürlerde de belirtildiği gibi genotipin androgenez performansını etkileyen en önemli parametre olduğu sonucuna varılmış ve her genotipin farklı androgenez aşamalarında iyi sonuç verdiği farklı ortamlar elde edilmiştir. Çeşit x Ortam interaksyonları sonucunda, 10 mg/l ve 15 mg/l AgNO₃ içeren ve maltoz kullanılmış ortamlarda Asena genotipinden her aşamada yüksek performans alınmıştır.

Çalışma ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde, biber anter kültüründe şimdiye kadar çift faz uygulamalarında tercih edilen karbonhidrat kaynağı olarak maltoz kullanımının bu ortamda da olumlu sonuçlar verdiği ve bundan sonra

yapılacak biber anter kültürü çalışmalarında başarının artırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Farklı dozlarda kullanılacak maltoz miktarı ile biber anter kültürü için gerekli olan optimum maltoz miktarının belirlenmesi çalışmalarının yapılması elde edilen bu başarının geliştirilmesine katkı sağlayacağı ve anormal organ oluşumunu azaltacağı düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen çalışmada tüm petriler ön uygulama olarak 2 gün +35 °C’de bekletilmişlerdir. Yüksek sıcaklıkta daha uzun süre bekletmek ya da soğuk uygulaması gibi farklı ön uygulamaların literatürlerde androenez performansını olumlu etkileyeceği bildirilmiştir. Farklı ön uygulamalar da bir parametre olarak incelenmelidir. Ayrıca sadece aydınlıkta yürütülen bu çalışmaya ek olarak, karanlık performansının da inceleneceği bir parametrenin çalışmaya dahil edilmesi yerinde olacaktır.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, genotipin biber anter kültürüne en büyük etkiye sahip parametre olduğu, bu nedenle biber ıslahında haploidi yönteminin kullanımını yaygınlaştırmak için ıslahta kullanılacak her genotipe uygun besin ortamının geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anter kültüründe elde edilecek başarının pek çok faktörle bağlantılı olduğu literatürlerde de belirtilmiştir. Bu kapsamda, bu çalışmadan elde edilen başarıyı arttırmak için her faktör kapsamlı bir şekilde incelenmeli ve sonuçlar değerlendirilmelidir.

Sonuç olarak bu çalışma ile elde edilen olumlu bulguların yeni çalışmalarla geliştirilmesi ve biber ıslahında anter kültürü yöntemi ile haploit bitki elde edilmesi çalışmalarına hız kazandırılması, gerek ülkemizde ve gerekse dünyada ıslah amacına uygun yeni biber çeşitlerin elde edilmesine yön verecektir.

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, Fasikül 1-2-3-4'den ayrı basım, 155-163s.
- Alremi, 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, Adana, 89s.
- Alremi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S., ve Ellialtıoğlu, Ş.**, 2014. Biber (*Capsicum annuum* L.)'de Genotip ve Besin Ortamının Anter Kültürüne Etkileri. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 1(2): 108–116s,
- Andrews, J.**, 1985. Peppers The Domesticated Capsicum. University of Texas Pres, Box 7819 Austin, Texas 78713.
- Anonim** (<http://infernochili.net/?page=villichilit>) (Erişim tarihi: 30 Haziran 2015)
- Anonim** (<https://www.uoguelph.ca/plant/research/biotech/haploid/anther.htm>) (Erişim tarihi: 30 Haziran 2015)
- Arı, E.**, 2006. Türkiye’de doğal olarak yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*’da anter kültürü çalışmaları. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi
- Ata, A.**, 2011. Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) anter kültüründe mevsim etkisi ve mikrospor gelişimi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 89s.
- Babaoğlu, M., Özcan, S.**, 2002. Haploid Bitki. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (Ed.) Bitki Biyoteknolojisi I. Selçuk Üniv. Vakfı Yay. ss. 89-136.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bais, H.P., Sudha, G., Suresh, B., and Ravishankar, G.A.,** 2000. AgNO₃ influences in vitro root formation in *Decalepis hamiltonii* Wight, Arn. Current Science, 2000, vol. 79, p. 894-898
- Barany, I., Gonzalez-Melendi, P., Fadon, B., Mityko, J., Risueno, M.C., Testillano, P.S.,** 2005. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. Biol. Cell 97, 709–722pp.
- Berljak, J.,** 1999. In vitro Plant Regeneration from Pepper (*Capsicum annuum* L. cv. 'Soroksari') Seedling Explants By Pierik, R.L.M., 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 344p.
- Biner, B., Ercan, N., ve 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, Şanlıurfa, Cilt 1: 47-54pp.
- Bullock, WP., Baenziger, PS., Schaffer, GW., and Bottino, PJ.,** 1982. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F₁'s and their reciprocal crosses. Theor. Appl. Genet, 62: 155-159pp.
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu, N., Abak, K., Ekbiç, E., And Kılıç 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): 206-209pp.
- Chunling, L.,** 1992. Successful development of new sweet (hot) pepper cultivars by anther culture, Asia-Pasific Conference on Agricultural Biotechnology (APAB), August 20- 24pp Beijing, China.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Çiner, D., ve Tıpırdamaz, R.,** 2002. The Effects Of Cold Treatment And Charcoal On The *In Vitro* Androgenesis Of Pepper (*Capsicum Annuum* L.). Turkish Journal Of Botany, 26: 131-139 pp.
- Çömlekçioğlu, N.,** 2001, Güneydoğu Anadolu biber popülasyonlarının dihaploidizasyon yöntemi ile ıslahı ve geleneksel yöntemlerle karşılaştırılması. Çukurove Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Bölümü, Doktora Tezi.
- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S., And Abak, K.,** 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum*). XIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* & Eggplant, 2001, Antalya-Turkey.
- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S., ve Abak, K.,** 1999. Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber popülasyonlarında anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etme olanakları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ankara, 897-900 pp.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveira, E., Huerta, A.,** 1997. Androgenes in *Capsicum annuum* L. Effects of carbohydrate and carbondioxide enrichment. J.Am. Soc Hort Sci 122:468–475 Dordrecht, Boston, Lanchaster, 344 p.
- Dumas De Vault, R., Chambonnet, D., and Sibi, M.,** 1981. Culture *in vitro* d'antheres de piment (*Capsicum annuum* L.): amelioration des tauxd'obtention de plantes chez differents genotypes par de traitements A+35°C.Agronomie, 11: 859 p.
- Ellialtınoğlu, Ş.** 1999. Androgenesis Yoluyla Haploid Bitki Rejenerasyonunda Başarıyı Etkileyen Faktörler. Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi, Cilt:24, Sayı:1, s:11-22.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ellialtıoğlu, Ş., Kaplan, F., and Abak, K.,** 2001. The effect of carrot extract and activated charcoal on the androgenesis of pepper. XIth EUCARPIA Meeting on Genetic and Breeding of Capsicum and Eggplant, Antalya-Turkey, 142-145 pp.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K.,** 2000. Haploid Bitki Üretimi. (Bitki Biyoteknolojisi Cilt:I, Ed: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.) s: 138-189., Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Ercan, N., ve Şensoy, F.,** 2011. Androgenik responses of different pepper cultivars. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 4 (2): 59-61pp.
- Finnie, S.J., Powell, W. and Dyer A.F.,** 1989. The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breed.*, 103: 110-118 pp.
- George, L., and Narayanaswamy, S.,** 1973. Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 78: 467–470 pp.
- Gönülşen, N.,** 1987. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enst. Müd. Yayın No:78, 116s.
- Guha, S., and Maheshwari, S. C.,** 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. - *Nature* 204: 497pp.
- Harn, C., Kim, M.Z., Choi, K.T, and Lee, Y.I.,** 1975. Production of haploid callus and embryoid from the cultured anther of *Capsicum annuum*. *Sabrao J*, 7: 71-77pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hatipoğlu, R.**, 1997. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190. Ders Kitapları Yayın No: A-58p.
- Horner, M., Mccomb, J.A., and Street, H.E.**, 1977. Ethylene production and plantlet formation by *Nicotiana* anthers cultured in the presence and absence of charcoal. *J Exp Bot* 28: 1365-1372pp.
- Irikova T., Grozeva S., Rodeva V.**, 2011. Anther Culture In Pepper (*Capsicum Annuum* L.) In Vitro. *Acta Physiol Plant* 33: 1559– 1570p
- Irikova, T., and Rodeva, V.**, 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): the effect of nutrient media. *Capsicum and Eggplant Newsl* 01/2004; 23:101-104pp.
- Irikova, T. and Rodeva, V.**, 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): The effect of nutrient media. *Capsicum Eggplant Newsl* 23:101–10pp.
- Kim, M., Jang, I.C., Kim, J.A., Park, E.J., Yoon, M., Lee, Y.**, 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 27:425–434pp
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D., Lee, K.**, 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 77, 63–72pp.
- Kim, M., Park, E. J., An, D., Lee, Y.**, 2013. High-quality embryo production and plant regeneration using a two-step culture system in isolated microspore cultures of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTO)*. Volume 112, Issue 2, pp 191-201

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Koleva-Godeva L.R., Spasenoski M., Trajkova F., 2007.** Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatment and different media. *Scientiahorticulturae* 111: 114-119 pp.
- Matsubara S., Yamamoto M., Man-HyunJo Murakami K., Man H.J., 1998.** Embryoid and callus formation from microspores by anther culture from July to November in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Sci Rep Faculty Agric Okayama Univ* 87:117–122 pp.
- Mityko J., Andrasfalvy A., Csillery G., Fari M., 1995.** Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding* 114: 78–80 pp.
- Morrison, R.A., Koning, E.R. and Evans, D.A., 1986.** Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *J Plant Physiol* 126:1–9pp
- Murashige, T., and Skoog, F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497pp.
- Niklas-Nowak, A., Olszewska, D., Kisiała, A., Nowaczyk, P., 2014.** Study of individual plant responsiveness in anther cultures of selected pepper (*Capsicum spp.*) genotypes. Department of Genetics and Plant Biotechnology University of Technology and Life Sciences Prof. S. Kaliskiego 785-789pp Bydgoszcz, Poland
- Novak, F.J., 1974.** Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp., *Z. Pflanzenphysiol*, 68: 97-114pp.
- Ochoa-Alejo, N., and Ramirez-Malagon, R., 2001.** In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*. 37:701-729pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olszewska D, Kisiala A, Niklas-Nowak A, Nowaczyk P.**, 2014. Study Of In Vitro Anther Culture In Selected Genotypes Of Genus Capsicum. Turk J Biol 38: 118–124pp.
- Park, S.G., Ubaidillah, M., Kim, K.M.**, 2013. Effect of Maltose Concentration on Plant Regeneration of Anther Culture with Different Genotypes in Rice (*Oryza sativa* L.) American Journal of Plant Sciences, 4, 2265-2270 pp.
- Parra-Vega, V., Gonzalez-Garcia, B., Segui-Simarro, J.** 2013. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annum* L.) Acta Physiol Plant 35:627-633 pp.
- Qin X., Rotino G.L.**, 1993. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. Capsicum and Eggplant Newsletter 12: 59-62 pp.
- Rahman, M.H., Islam, R., Hossain, M. and Islam, M.S.**, 2010. Role of sucrose, glucose and maltose on conventional potato micropropagation. Journal of Agricultural Technology 2010 Vol. 6(4): 733-739 pp.
- Reynolds, T.L.**,1997. Pollen Embryogenesis (Review). Plant Molecular Biology. 33: 1-10 pp.
- Rodeva V., T. Irikova, V. Todorova**, 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annum* L.) : Comparative study on effect of the genotype. Biotechnology and Biotech. Eq. 18.2004.3, 34-38 pp.
- Rohami, M., Mohammadi, A., Khosroshahhli, M.i Ahmadi, H., Darandeh, N.**, 2010, Karyotype Analysis of several Ecotypes of *Capsicum annum* L. in Iran, Not. Bot. Hort. Agrobot Cluj 38 (3)pp 177-180.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roshany G., Kalantarai S., Naderi R., Hassani E. M.,** 2013. Callus formation via anther culture in *Capsicum annum* L. with differences in genotypes, media and incubation temperature. Technical Journal of engineering and Applied Sciences 2013-3-S/3847-3853pp.
- Saccardo, F., and Devreux, M.,** 1974. *In vitro* production of plantlets from anther culture of *Capsicum annum* L. Proc. of Eucarpia: Genet. Breeding of Capsicum. Budapest, pp. 45-49 pp.
- Sayılır, A., ve Özzambak, E.,** 2002. Biber Anter Kültüründe Uygun Tomurcuk Büyüklüğü Tespiti İle Besin Ortamları Karışımlarının Ve Soğuk Uygulama Sürelerinin Embriyo Verimine Etkisi Üzerine Bir Araştırma. IV. Sebze Tarımı Sempozyumu, Bursa.
- Sibi, M., Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D.,** 1980 Androgenese in vitro chez le Piment *Capsicum annum* L.: Impact des pretraitements sur le taux de plantes regenerees. In: Reunion CR (ed) EUCARPIA application de la culture in vitro a l'Amelioration des Plantes Potageres, Versailles, 16–18 April, pp 143–149pp.
- Sibi, M., Vaulx, D.R., and Chambonnet, B.,** 1979. Obtention de plantes haploides par androgenése *in vitro* chez le Piment (*Capsicum anuum* L.). Ann Amel Plantes, 29: 583-606 pp.
- Taskın, H.,** 2005. Bazı biber genotiplerinde anter kültürü ile haploid embriyo uyartımında embriyo kalitesinin artırılmasına yönelik bazı uygulamalar. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 79 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Taşkın, H., Büyükalaca, S., Keleş, D., ve Ekbiç, E.,** 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. African Journal of Biotechnology. 10(75): 17116-17121 s.
- Terzioğlu, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., ve Abak, K.,** 2000. İnkübasyon Koşullarının Biber Anter Kültüründe Embriyo Oluşumu Üzerine Etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu, Isparta, 233-238 s.
- Tuberosa, R., Sanguinetti, MC., and Conti, S.,** 1987. Anther culture of Eggplant (*Solanum melongena* L.). Lines and Hybrids Genetica Agraria, 41: 267-274 pp.
- Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C., and Chien, N.J.,** 1973. The induction of polen plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. Sci. Sin 16: 147-151pp.

ÖZGEÇMİŞ

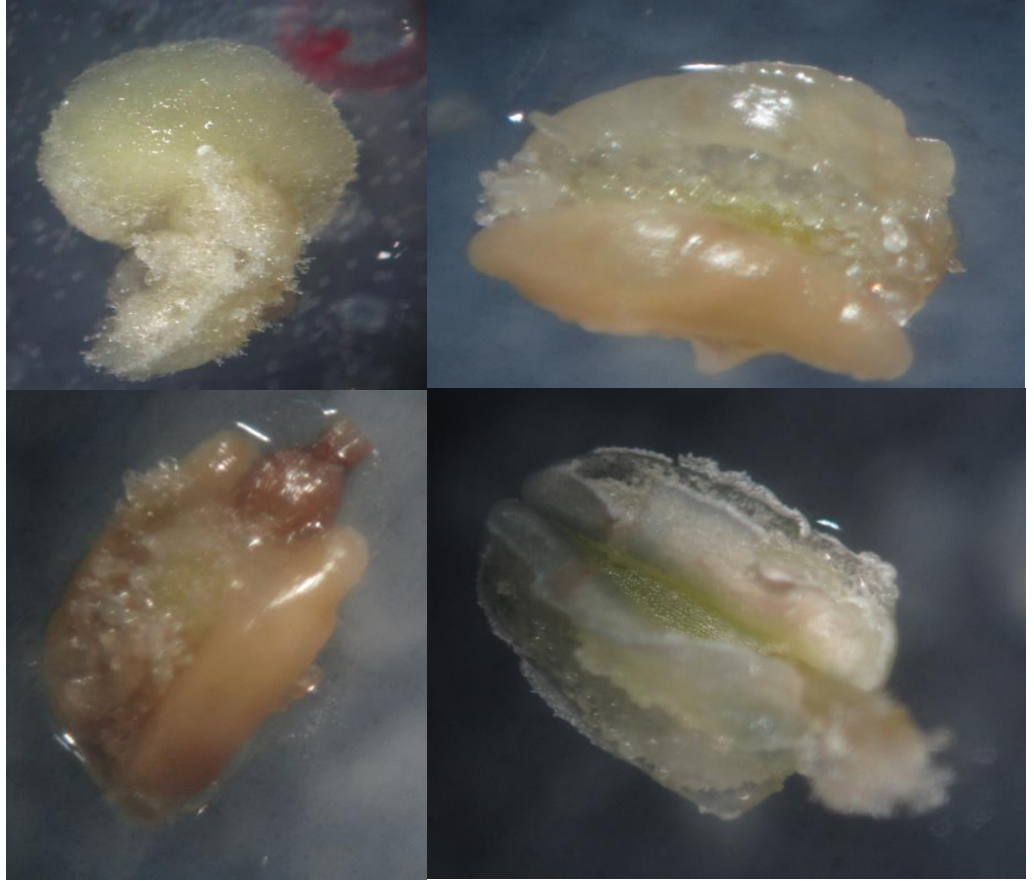
1989 yılında Bursa'nın Osmangazi ilçesinde doğdu. İlköğretimini Mehmet Aker İ.Ö.O'nda, lise eğitimin ise Bursa Cumhuriyet Lisesi Fen Bölümü'nde tamamladı. 2007 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2012'de Bahçe Bitkileri alt programından mezun oldu. Aynı yıl Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitimine başladı.

EKLER

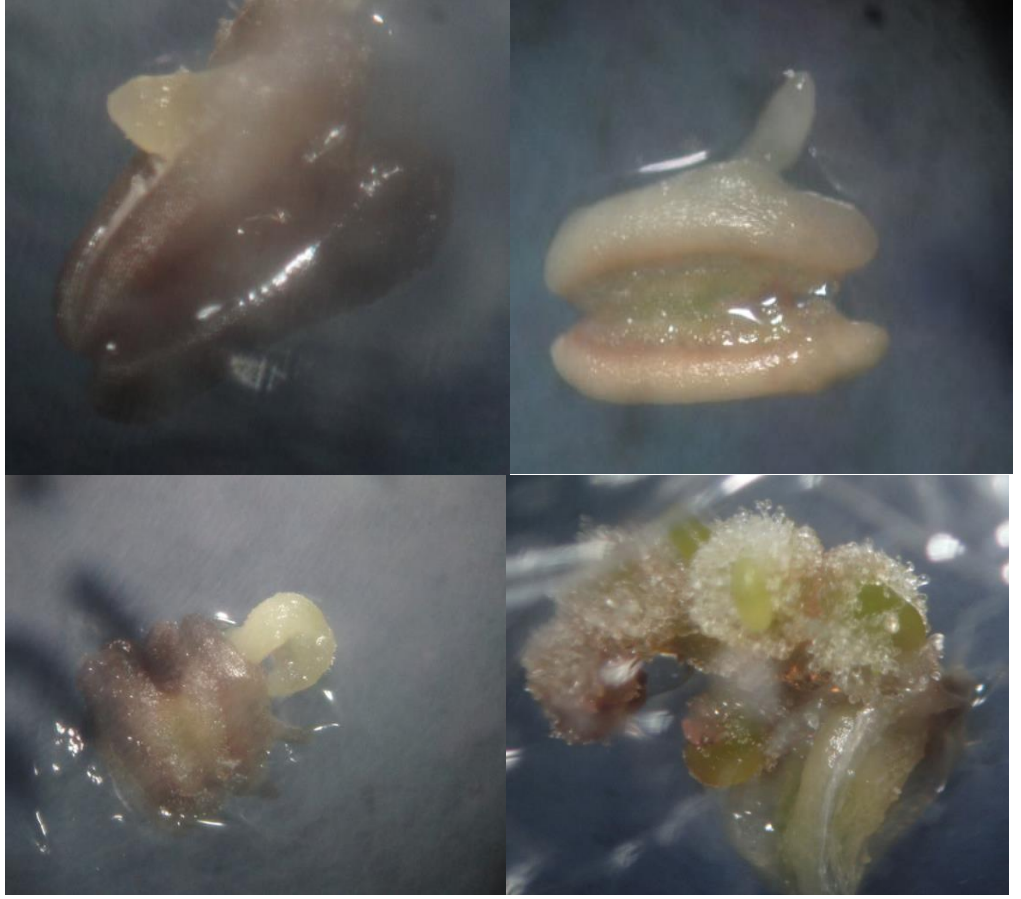
Ek 1- Biber anter kültüründe kallus oluşumundan bitkicik elde edilmesi aşamasına kadar genotiplerden elde edilen rejenerasyon görüntüleri.

Ek 1- Biber anter kültüründe kallus oluşumundan bitkicik elde edilmesi aşamasına kadar genotiplerden elde edilen rejenerasyon görüntüleri.

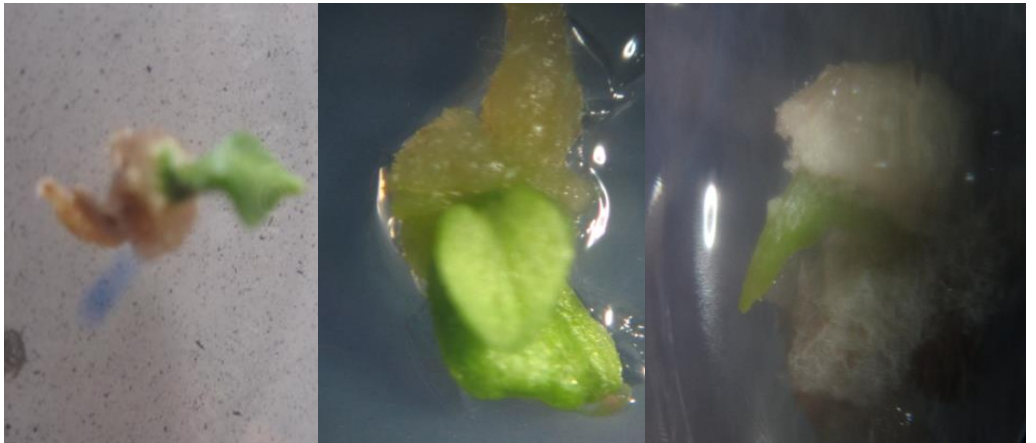
a. Kallus rejenerasyonu



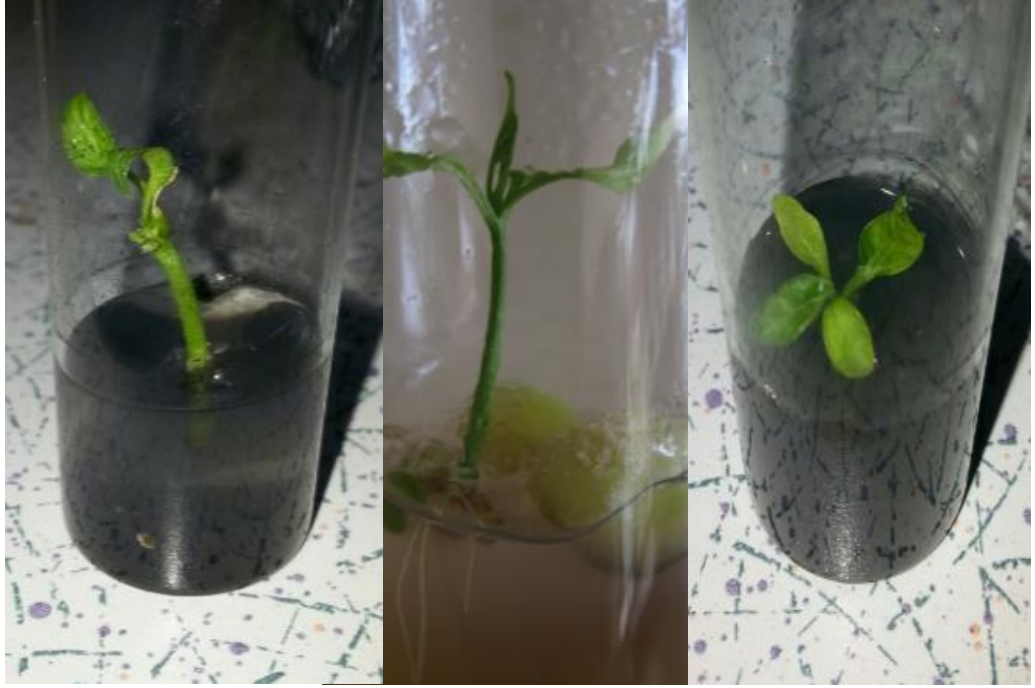
b. Globüler ve torpedo şeklinde embriyo rejenerasyonu



c. Kotiledon ve organ rejenerasyonu



d. Bitki rejenerasyonları



e. Anormal organ rejenerasyonları

