



**BAZI BİBER GENOTİPLERİNDE *IN VITRO*
ANDROGENESİS UYGULAMALARININ
DİHAPLOİD HAT GELİŞTİRMEYE ETKİSİ
VE DİHAPLOİD HATLARIN MORFOLOJİK
KARAKTERİZASYONU**

Perihan DURNA

Doktora Tezi

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Prof. Dr. Naif GEBOLOĞLU

2016

Her hakkı saklıdır

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**BAZI BİBER GENOTİPLERİNDE
IN VITRO ANDROGENESİS UYGULAMALARININ DİHAPLOİD HAT
GELİŞTİRMEYE ETKİSİ VE DİHAPLOİD HATLARIN MORFOLOJİK
KARAKTERİZASYONU**

PERİHAN DURNA

**TOKAT
2016**

Her Hakkı Saklıdır



Bu tez çalışması;

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
2013/76 nolu proje ile desteklenmiştir.**

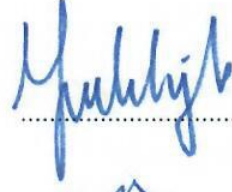
PERİHAN DURNA tarafından hazırlanan “**Bazı Biber Genotiplerinde *In Vitro* Androgenesis Uygulamalarının Dihaploid Hat Geliştirmeye Etkisi ve Dihaploid Hatların Morfolojik Karakterizasyonu**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 23 Aralık 2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği İle Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

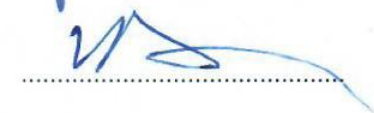
Danışman

PROF.DR. NAİF GEBOLOĞLU



Üye

PROF.DR. HAKAN AKTAŞ



Üye

PROF.DR. YUSUF YANAR



Üye

DOÇ.DR. ERTAN SAİT KURTAR



Üye

YRD.DOÇ.DR. YASİN BEDRETTİN KARAN



Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

ONAY

Prof. Dr. Ertan Saıt KURTAR
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

---/---/20--

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Perihan DURNA

Aralık, 2016

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI BİBER GENOTİPLERİNDE IN VITRO ANDROGENESİS UYGULAMALARININ DİHAPLOİD HAT GELİŞTİRMEYE ETKİSİ VE DİHAPLOİD HATLARIN MORFOLOJİK KARAKTERİZASYONU

Perihan DURNA

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Naif GEBOLOĞLU

Biber ıslahında önemli avantajlar sağlayan anter kültüründe başarı, birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörlerden en önemlileri genotip, ön uygulamalar, besin ortamları ve inkübasyon koşullarıdır. Bu çalışmada genotip, ön uygulamalar, besin ortamları ve inkübasyon koşullarının biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültüründe embriyo, bitkicik ve dihaploid bitki oluşumuna etkileri araştırılmıştır. Donör bitki olarak Belissa F₁, Belissa F₂, Ergenekon F₁, Ergenekon F₂, İstek F₁, İstek F₂, Şölen F₁, Şölen F₂, Bafra F₁ ve Bafra F₂ genotipleri kullanılmıştır. Çiçek tomurcukları +4 °C’de 0, 24 ve 48 saat bekletilmiştir. Anterler Dumas de Vaulx ve ark. (1981), tarafından önerilen (DDV) ve 0 (kontrol), 0.03 ve 0.05 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ ilave edilmiş besin ortamı ile Dolcet-Sanjuan ve ark. (1997), tarafından önerilen (çift faz) ve 0 (kontrol), %0.10 ve %0.20 aktif kömür ilave edilmiş besin ortamında kültüre alınmışlardır. Anterler 8 gün boyunca karanlıkta 9 °C ve 35 °C’de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra anterler 16 saat gündüz, 8 saat gece, 3000 lux ışık intensitesi ve 24±2 °C koşullara sahip iklim odasına transfer edilmiştir. Androgenik yanıt başta genotip olmak üzere uygulamalara bağlı olarak değişmiştir. Çiçek tomurcuklarının +4 °C’de 24 saat bekletilmeleri embriyoid oluşumunda en iyi ön uygulama olmuştur. DDV ortamı embriyoid oluşumunda daha etkili olurken, B₁₂ vitamini embriyoid oluşumu üzerine etkili olmamıştır. Anterlerin 35 °C’de inkübasyonu embriyoid oluşumunda daha etkili olmuştur. Sonuç olarak, genotip, ön uygulamalar, besin ortamı ve inkübasyon koşulları ayrı ayrı ve birlikte androgenik başarı üzerinde etkili olmuşlardır. Çalışmada toplamda 1109 embriyoid, 210 bitkicik ve 27 dihaploid bitki elde edilmiştir. En yüksek androgenik performans Belissa genotiplerinde elde edilmiştir. F₂ genotiplerinden elde edilen embriyoid sayısı F₁ genotiplerinden daha yüksek olmuştur.

2016, 123 sayfa

Anahtar kelimeler: Androgenesis, Dihaploidizasyon, Besin ortamı, DDV, Vitamin B₁₂, Aktif kömür, Sıcaklık stresi

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

EFFECT OF *IN VITRO* ANDROGENESIS ON PRODUCTION OF DOUBLE HAPLOID LINE IN SOME PEPPER AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISATION OF GENOTYPES DOUBLE HAPLOID LINES

Perihan DURNA

Gaziosmanpasa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Advisor : Prof. Dr. Naif GEBOLOĞLU

Success in anther culture, which provides important advantages in pepper breeding, depends on many factors. Genotypes, pretreatments, nutrient media and incubation conditions are the most important factors. In this study, the influence of genotypes, pretreatments, nutrient media and incubation conditions on induction of androgenic embryos, plantlets and double haploid plants in pepper (*Capsicum annum* L.) were investigated. Belissa F₁, Belissa F₂, Ergenekon F₁, Ergenekon F₂, İstek F₁, İstek F₂, Şölen F₁, Şölen F₂, Bafra F₁ and Bafra F₂ genotypes were used as donor plants. Flower buds were pretreated at +4 °C for 24 and 48 hours. Untreated buds were used as control. Anthers were cultured according to Dumas de Vault et al. (1981), supplemented with 0 (control), 0.03 and 0.05 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ (DDV) and Dolcet-Sanjuan et al. (1997), supplemented with 0 (control), 0.10% and 0.20% activated charcoal (double layer). Anthers were incubated for 8 days at 9 °C and 35 °C in darkness. After the incubation, anthers transferred to a growth chamber and maintained in 16 hours light/8 hours dark photoperiod, at a light intensity of 3000 lux, and at 24 °C±2 °C. Androgenic response was changed according to treatments, especially genotypes. Pretreatment of flower buds at +4 °C for 24 h resulted the highest embryo formation. DDV medium was more efficient in embryo formation than double layer medium. Vitamin B₁₂ was not effective in embryo formation. Incubation of anthers at 35 °C is more effective in embryo formation. As a result, genotypes, pretreatments, nutrient media and incubation conditions have been effective on androgenic success individually and together. In the study, 1109 embryos, 210 plants and 27 double haploid plants were derived from anthers. Belissa genotypes showed highest androgenic performance. Embryo inductions of F₂ genotypes were higher than F₁ genotypes.

2016, 123 pages

Keywords: Androgenesis, Dihaploidization, Nutrient media, DDV, Vitamin B₁₂, Activated charcoal, Stress pretreatment

ÖNSÖZ

Anter kültürü çalışmalarında başta bitki türü ve genotip olmak üzere birçok faktörün başarıyı etkilediği bilinmektedir. Özellikle genotipe bağlı olarak diğer faktörlerin etkisi de değişebilmektedir. Başta genotip olmak üzere değişik faktörlerin biberde anter kültüründe etkilerinin araştırıldığı doktora çalışmamın tüm dünyada anter kültürü çalışmalarına ve biber ıslahçılarına ışık tutacağı bir çalışma olmasını dilerim.

Doktora tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bana değerli bilgilerini aktaran, daima yol gösterici olan ve en zor zamanlarda manevi desteğini hissettiren saygı değer hocam Prof. Dr. Naif GEBOLOĞLU'na ve Doktora Tez İzleme Komitesi üyesi değerli hocalarım Doç. Dr. Ertan Sait KURTAR ve Yrd. Doç. Dr. Emin YILMAZ'a çalışmamın tüm aşamalarında yönlendirici fikirleri ve olumlu katkılarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Flow sitometri ile hatların kromozomlarının sayılmasında emeği geçen Sayın Prof. Dr. Metin TUNA (Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü) hocama ve çalışmalarım esnasında desteklerini her zaman gördüğüm, laboratuvar deneyimlerini benimle paylaşan ve tez çalışmalarımda emeği geçen sevgili arkadaşım Arş. Gör. Sevtap DOKSÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın maddi finansmanını sağlayan Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna ve 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı birimine teşekkür ederim.

Girdiğim her yolda maddi ve manevi açıdan yanımda olan aileme, sonsuz sabrı ile beni destekleyen, tezimin her aşamasında bir fiil yanımda olan, benimle yarı doktora yapan eşim Ziraat Yüksek Mühendisi Burak DURNA'ya ve biricik oğlum Toprak'a yürekten teşekkürler...

Perihan DURNA
Aralık, 2016.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Anter Kültüründe Genotipin Etkisi	5
2.2. Donör Bitkinin Yetiştirme Koşullarının Anter Kültüründe Başarıya Etkisi.....	8
2.3. Anter Kültüründe Mikrospor Geliştirme Döneminin Etkisi	10
2.4 Anter Kültüründe Çiçek Tomurcuklarına veya Anterlere Uygulanan Sıcaklık Stresi Uygulamaları.....	13
2.5 Anter Kültüründe Besin Ortamları ve Ortam Bileşenleri.....	18
2.5.1. Bitki Büyüme Düzenleyiciler	18
2.5.2. Besin Ortamının Tipi ve Yapısı	20
2.5.3. Karbonhidrat Kaynağı (Şekerler)	21
2.5.4. Aktif Kömür	23
2.5.5. Vitaminler.....	25
2.6. Anter Kültürü Çalışmalarında Kültür Koşulları	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1.Çalışmada Kullanılan Genotipler ve Özellikleri	27
3.1.2. Kültür Aşamasında Kullanılan Ekipmanlar	30
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	35
3.2.2. Mikrospor Geliştirme Aşamalarının Belirlenmesi	37
3.2.3. Çiçek Tomurcuklarına Stres Uygulanması	40

3.2.4. Çiçek Tomurcuklarının Yüzey Sterilizasyonu	40
3.2.5. Ortam ve Ekipman Sterilizasyonu.....	41
3.2.6. Besin Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanması	42
3.2.7. Anterlerin Çıkarılması ve Besin Ortamlarına Ekilmesi	45
3.2.8. Çimlendirme Çalışmaları	46
3.2.9. Haploid Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması.....	48
3.2.10. Ploidi Testleri	49
3.2.11. Kromozom Katlaması	53
3.2.12. Dihaploid Hatlarda Tohum Üretimi	55
3.2.13. Dihaploid Hatların Morfolojik Karakterizasyonu	55
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	57
4.1. Uygulamalara Bağlı Olarak Embriyoid, Bitkicik ve Dihaploid Bitki Oluşum Oranları	57
4.2. Genotiplerin Ortalama Embriyo ve Bitkicik Oluşum Oranları	72
4.3. Genotiplerin Uygulamalara Göre Embriyo ve Bitkicik Oluşum Oranları	74
4.3.1. DDV Ortamında Belissa.....	74
4.3.2. Çift Faz Ortamında Belissa	75
4.3.3. DDV Ortamında Şölen	76
4.3.4. Çift Faz Ortamında Şölen.....	77
4.3.5. DDV Ortamında Bafra	78
4.3.6. Çift Faz Ortamında Bafra	79
4.3.7. DDV Ortamında Ergenekon.....	80
4.3.8. Çift Faz Ortamında Ergenekon	81
4.3.9. DDV Ortamında İstek	82
4.3.10. Çift Faz Ortamında İstek	83
4.4. Genotiplerin F ₁ ve F ₂ Generasyonlarına Göre Başarı Düzeyleri	84
4.5. Tomurcuklara Düşük Sıcaklık Uygulamasının Embriyo ve Bitkicik Oluşumu Üzerine Etkisi.....	85
4.6. Vitamin B ₁₂ ve Aktif Kömür Uygulamalarının Embriyo ve Bitkicik Oluşumu Üzerine Etkisi	86

Sayfa

4.7. İnkübasyon Uygulamasının Embriyo ve Bitkicik Oluşumuna Etkisi	87
4.8. Dihaploid Hatların Bazı Morfolojik ve Agronomik Özellikleri.....	89
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	105
KAYNAKLAR.....	108
ÖZGEÇMİŞ.....	123



ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1. Belissa F1 biber bitkisi ve meyvesi.....	27
Şekil 3.2. Şölen F1 biber bitkisi ve meyvesi	28
Şekil 3.3. Ergenekon F1 biber bitkisi ve meyvesi	28
Şekil 3.4. Bafra F1 biber bitkisi ve meyvesi	29
Şekil 3.5. İstek F1 biber bitkisi ve meyvesi	29
Şekil 3.6. Doku kültürü laboratuvarının genel görünümü.....	30
Şekil 3.7. Büyütme odası raflarının görünümü	30
Şekil 3.8. Flow kabinin görünümü	31
Şekil 3.9. Büyütme dolabı (growth chamber) görünümü	31
Şekil 3.10. Otoklavın görünümü	32
Şekil 3.11. İnkübatörün görünümü	32
Şekil 3.12. Mikroskop, ısıtmalı manyetik karıştırıcı ve pH metrenin görünümü.....	33
Şekil 3.13. Tek kullanımlık steril petri kaplarının görünümü	33
Şekil 3.14. Tül seranın dış ve iç görünümü	34
Şekil 3.15. Yarı otomatik polikarbon seranın görünümü	35
Şekil 3.16. Donör bitkilerin yetiştirilmesinin görünümü.....	35
Şekil 3.17. Bitkilerde budama ve çiçek tomurcuğu hasadının görünümü.....	37
Şekil 3.18. Biber tomurcuklarının ve ait oldukları anterlerin gelişme aşamaları.....	37
Şekil 3.19. Mikrosporlarda boyama aşamasından görünüm	38
Şekil 3.20. A)Bitki üzerinde çiçek tomurcuklarının görünümü B)Farklı büyüklükte gruplandırılmış biber tomurcukları ve anterleri B1) 2.0-4.0 mm iriliğinde tomurcuklardan alınan anterlerde mikrospor hücresi B2) 4.0- 5.0 mm arasındaki tomurcuklarda mikrospor hücresi B3) 5.0-7.0 mm arasındaki tomurcuklarda mikrospor hücresi B4)7.0-9.0 mm arasındaki tomurcuklarda mikrospor hücresi	39
Şekil 3.21. Çiçek tomurcuklarının flow kabinde dezenfeksiyonu.....	41
Şekil 3.22. Flow kabinde sterilizasyon aşamasından bir görünüm	42
Şekil 3.23. Anterlerin çiçek tomurcuklarından çıkarılması ve besin ortamına ekimi ..	45

Sekil**Sayfa**

Şekil 3.24. Çalışmada kullanılan bütün uygulamaların şematik görünümü	47
Şekil 3.25. Rejenerasyon ortamında anterlerin gelişmesi	48
Şekil 3.26. Haploid bitkilerin dış koşullara alıştırılması	49
Şekil 3.27. Elde edilen bitkilerde fenotipik gözlemler	50
Şekil 3.28. Flow sitometri analiz sonuçları A) Diploid biber ve standartla (domates) hazırlanan örneklerin oluşturduğu histogramın görüntüsü B)Haploid biber ve standartla (domates) hazırlanan örneklerin oluşturduğu histogramın görüntüsü	52
Şekil 3.29. Stoma preparatlarının hazırlanması.....	53
Şekil 3.30. Stomalara ait görünüm A)Dihaploid biber bitkilerine ait stomalardan görünüm, B)Haploid biber bitkilerine ait stomalardan görünüm	54
Şekil 3.31. Haploid bitkilerde kromozom katlamasının görünümü	55
Şekil 3.32. Dihaploid hatların yetiştirildiği sera.....	56
Şekil 4.1. Anterlerden embriyoid çıkışı.....	57
Şekil 4.2. DDV ortamında genotiplerin embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	73
Şekil 4.3. Çift faz ortamında genotiplerin embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)...	73
Şekil 4.4. DDV ortamındaki Belissa genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	74
Şekil 4.5. Çift faz ortamındaki Belissa genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	75
Şekil 4.6. DDV ortamındaki Şölen genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	76
Şekil 4.7. Çift faz ortamındaki Şölen genotipinin uygulamalara göre embriyo oluşum ve bitkicik oluşum oranları (%)	77
Şekil 4.8. DDV ortamındaki Bafra genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	78
Şekil 4.9. Çift faz ortamındaki Bafra genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	79
Şekil 4.10. DDV ortamındaki Ergenekon genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	80

Sekil**Sayfa**

Şekil 4.11. Çift faz ortamındaki Ergenekon genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	81
Şekil 4.12. DDV ortamındaki İstek genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	82
Şekil 4.13. Çift faz ortamındaki İstek genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	83
Şekil 4.14. Ortamlara ve F ₁ -F ₂ genotiplerine göre ortalama embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)	84
Şekil 4.15. Tomurcuklara ön uygulama yapılmasının ortamlara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranlarına etkisi (%).....	85
Şekil 4.16. Vitamin B ₁₂ ve aktif kömür uygulamasının embriyo ve bitkicik oluşum oranlarına etkisi (%).....	86
Şekil 4.17. Tomurcuklara ön uygulama yapılmasının ortamlara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranlarına etkisi (%)	88
Şekil 4.18. Belissa genotipinden elde edilen B-01 hattının bitki ve meyvesi	91
Şekil 4.19. Belissa genotipinden elde edilen B-02 hattının bitki ve meyvesi	91
Şekil 4.20. Belissa genotipinden elde edilen B-03 hattının bitki ve meyvesi	92
Şekil 4.21. Belissa genotipinden elde edilen B-04 hattının bitki ve meyvesi	92
Şekil 4.22. Belissa genotipinden elde edilen B-05 hattının bitki ve meyvesi	93
Şekil 4.23. Belissa genotipinden elde edilen B-06 hattının bitki ve meyvesi	93
Şekil 4.24. Ergenekon genotipinden elde edilen E-01 hattının bitki ve meyvesi.....	94
Şekil 4.25. Ergenekon genotipinden elde edilen E-02 hattının bitki ve meyvesi.....	94
Şekil 4.26. Ergenekon genotipinden elde edilen E-03 hattının bitki ve meyvesi.....	95
Şekil 4.27. Ergenekon genotipinden elde edilen E-04 hattının bitki ve meyvesi.....	95
Şekil 4.28. Ergenekon genotipinden elde edilen E-05 hattının bitki ve meyvesi.....	96
Şekil 4.29. Ergenekon genotipinden elde edilen E-06 hattının bitki ve meyvesi.....	96
Şekil 4.30. Ergenekon genotipinden elde edilen E-07 hattının bitki ve meyvesi.....	97
Şekil 4.31. Ergenekon genotipinden elde edilen E-08 hattının bitki ve meyvesi.....	97
Şekil 4.32. Ergenekon genotipinden elde edilen E-09 hattının bitki ve meyvesi.....	98
Şekil 4.33. Ergenekon genotipinden elde edilen E-10 hattının bitki ve meyvesi.....	98

Şekil**Sayfa**

Şekil 4.34. Ergenekon genotipinden elde edilen E-11 hattının bitki ve meyvesi.....	99
Şekil 4.35. İstek genotipinden elde edilen İ-01 hattının bitki ve meyvesi	99
Şekil 4.36. İstek genotipinden elde edilen İ-02 hattının bitki ve meyvesi	100
Şekil 4.37. İstek genotipinden elde edilen İ-03 hattının bitki ve meyvesi	100
Şekil 4.38. İstek genotipinden elde edilen İ-04 hattının bitki ve meyvesi	101
Şekil 4.39. İstek genotipinden elde edilen İ-05 hattının bitki ve meyvesi	101
Şekil 4.40. İstek genotipinden elde edilen İ-06 hattının bitki ve meyvesi	102
Şekil 4.41. Şölen genotipinden elde edilen Ş-01 hattının bitki ve meyvesi	102
Şekil 4.42. Şölen genotipinden elde edilen Ş-02 hattının bitki ve meyvesi	103
Şekil 4.43. Şölen genotipinden elde edilen Ş-03 hattının bitki ve meyvesi	103
Şekil 4.44. Şölen genotipinden elde edilen Ş-04 hattının bitki ve meyvesi	104

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Hoagland besin çözeltisi içeriği.....	36
Çizelge 3.2. Denemede kullanılan DDV ortamının modifiye edilmiş şeklinin protokolü (Dumas de Vaulx ve ark., 1981)	43
Çizelge 3.3. Denemede kullanılan çift fazlı ortam protokolü (Dolcet- Sanjuan ve ark., 1997).....	44
Çizelge 4.1. Belissa F ₁ ve F ₂ genotiplerinin DDV ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%).....	62
Çizelge 4.2. Belissa F ₁ ve F ₂ genotiplerinin çift faz ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%).....	63
Çizelge 4.3. Şölen F ₁ ve F ₂ genotiplerinin DDV ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%).....	64
Çizelge 4.4. Şölen F ₁ ve F ₂ genotiplerinin çift faz ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%).....	65
Çizelge 4.5. Bafra F ₁ ve F ₂ genotiplerinin DDV ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%).....	66
Çizelge 4.6. Bafra F ₁ ve F ₂ genotiplerinin çift faz ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%).....	67
Çizelge 4.7. Ergenekon F ₁ ve F ₂ genotiplerinin DDV ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%).....	68
Çizelge 4.8. Ergenekon F ₁ ve F ₂ genotiplerinin çift faz ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%).....	69
Çizelge 4.9. İstek F ₁ ve F ₂ genotiplerinin DDV ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%).....	70
Çizelge 4.10. İstek F ₁ ve F ₂ genotiplerinin çift faz ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%).....	71
Çizelge 4.11. Elde edilen saf hatlarda yapılan gözlemler	90

SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ

SİMGELER AÇIKLAMA

%	yüzde
g	gram
°C	santigrat derece
ml	mililitre
m ²	metrekare
µl	mikrolitre
l	litre
mg	miligram
cm	santimetre
cm ²	santimetrekare
mm	milimetre
µm	mikrometre

KISALTMALAR AÇIKLAMA

KNO ₃	Potasyum nitrat
NH ₄ NO ₃	Amonyum nitrat
MgSO ₄ , 7H ₂ O	Magnezyum sülfat
CaCl ₂ , 2H ₂ O	Kalsiyum klorür
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	Kalsiyum nitrat
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	Mono sodyum fosfat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Mono potasyum fosfat
MnSO ₄ , H ₂ O	Mangan sülfat
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	Çinko sülfat
H ₃ BO ₃	Borik asit
KI	Potasyum iyodür
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	Sodyum molibdat
CuSO ₄ , 5H ₂ O	Bakır sülfat
CoCl ₂ , 6H ₂ O	Kobalt klorür
Na ₂ EDTA	Sodyum EDTA
FeSO ₄ , 7H ₂ O	Demir sülfat
IAA	İndol 3-asetik asit
NAA	Naftalin asetik asit
BAP / BA	Benzil aminopürin
2,4-D	Diklorofenoksiasetik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
ACC	Aminocyclopropane carboxylic asit
AgNO ₃	Gümüş nitrat
PEG	Polietilen glikol
UV	Ultraviyole
PE	Polietilen

KISALTMALAR**AÇIKLAMA**

atm	Atmosfer
ABA	Absisik asit
DNA	Deoxyribonücleic acid
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
HCl	Hidroklorik asit
MS	Murashige ve Skoog



1. GİRİŞ

Biber (*Capsicum annuum* L.) Solanaceae familyasının en önemli türlerinden biri olup anavatanı Orta ve Güney Amerikadır. Anavatanında ve tropikal bölgelerde çok yıllık, ılıman iklimlerde ise tek yıllıktır. Geniş bir tip ve tür zenginliğine sahip olan biber *Capsicum* cinsine dahildir ve bu cins içinde yaklaşık 30 tür bulunmaktadır. Bu türler içinde *C. annuum* (L.), *C. frutescens* (L.), *C. chinense* (Jacq.), *C. baccatum* (L.) ve *C. pubescens* (Ruiz&Pav.) en önemlileridir. Bu türlere ait yüzlerce çeşit bulunmaktadır. Bu türler içinde de *C. annum* bütün dünyada kabul görmüş kültür türüdür (IBPGR, 1983). Bütün doğal biber populasyonları diploid (2n) olup, kromozom sayıları 2n=24'dür (Pickersgill, 1997).

Biber dünya genelinde önemli sebze türlerinden biridir. Çok yönlü kullanılan biber açıkta ve örtüaltında yılın her döneminde yetiştirilebilmektedir. Çiğ, pişmiş, kurutulmuş, konserve edilmiş, toz ve pul biber halinde, salça ve sos gibi çok değişik şekillerde kullanılmaktadır. Dünyada 2014 yılında biber üretimi 1,94 milyon hektar alanda 32,32 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Verimlilik 16,68 ton/ha düzeyindedir. Önemli biber üreticisi ülkeler Çin (16,15 milyon ton), Meksika (2,73 milyon ton), Türkiye (2,13 milyon ton), Endonezya (1,88 milyon ton), Hindistan (1,49 milyon ton) ve İspanya (1,13 milyon ton) şeklinde sıralanmaktadır (FAO, 2014). Türkiye Dünya biber üretiminde üçüncü sırada yer almaktadır. 2015 yılı itibariyle 0,880 milyon ton salçalık ve kopya, 0,393 milyon ton dolmalık, 0,919 milyon ton sivri ve 0,116 milyon ton çarliston biber olmak üzere toplamda 2,308 milyon ton biber üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK, 2015).

Biberde ıslah çalışmaları çok uzun yıllardır sürmektedir. Islah çalışmalarının temelini doğal seleksiyonlar oluşturmaktadır. İlk kültüre alınan biber genotiplerinin ve yabani formların tohumları kuşlar ve diğer hayvanlar tarafından yayılmış ve daha sonra insanlar ihtiyaçlarına göre bitkileri seleksiyon yolu ile seçerek çoğaltmışlardır. Bu davranış şekli biber ıslahının başlangıcını oluşturmaktadır (Ata, 2011). Her ne kadar doğal yolla yapılan seleksiyonlar biber ıslahının başlangıcını oluştursa da gerçek anlamda ıslah çalışmaları 1960'lı yıllarda Yeşil Devrimin başlangıcı ile başlamıştır. 1980'li yıllarda ise hibrit çeşitlerin geliştirilmeye başlanması ile birlikte biberde ıslah çalışmalarında önemli gelişmeler sağlanmıştır. Biber ıslahında 1980'li yılların sonuna

kadar klasik yöntemler kullanılırken, 1990'lı yıllardan itibaren klasik ıslah metotları ile birlikte biyoteknolojik yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Her geçen gün gelişen biyoteknolojik yöntemler sayesinde biber ıslahında ıslah süresi kısalmış, % 100 homozigot hatlar elde edilmiş, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi daha kolay ve daha hızlı olmuştur.

Biyolojik bilimlerdeki gelişmelerin, teknolojideki gelişmeler yardımıyla uygulamaya ve ticari hedeflere yönelik kullanılması şeklinde tanımlanan bitki biyoteknolojisinin amacı, bitkisel üretimde bilinen klasik yöntemlerle çözülemeyen veya çözümü zor olan problemlere çözüm üreterek üretimi daha ekonomik hale getirmek; kalite ve kantite yönünden üstün genotipler geliştirmektir (Hatipoğlu, 1997; Kaya, 2001). Bitki ıslahında yaygın olarak kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden biri anter kültürüdür. Anter kültürü, içerisinde olgunlaşmamış polenleri bulunduran anterlerin tomurcuklardan izole edilerek *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden (mikrosporlar) haploid embriyolar elde edilmesidir. Anter kültürü, normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polen tanesinin gametik gelişme yönü, henüz tek çekirdekli (uninucleate) dönemde iken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmekte ve böylece mikrosporandrogenesi veya sadece androgenesis olarak adlandırılan olay gerçekleşmektedir. 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 (Ellialtıoğlu ve ark., 2000). Bitki doku kültürü teknikleri arasında önemli bir yere sahip olan anter kültürü, her canlı hücrenin tüm organizmayı yeniden üretebilme yeteneği olarak bilinen totipotensinin en çarpıcı örneklerinden birisidir (Pierik, 1987; Reynolds, 1997).

Androgenesis veya haploid bitki üretimi olarak ta bilinen anter kültürü, somatik hücrelerinde ait oldukları bitki türünün eşey hücrelerinde taşıdıkları kadar kromozom sayısına (n) sahip olan bitkiler elde edilmesidir (Khush ve Virmani, 1996). Haploid bitki üretimi, bitki ıslahında önemli bir yere sahiptir ve bitkilerde homozigot saf hatların elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Yöntem, iki aşamadan oluşmaktadır: Haploidizasyon ve diploidizasyon. Birinci aşamada, gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısına (n) sahip haploid bitkiler elde edilir. Sonraki aşamada, bu bitkilerin kromozom sayıları iki katına çıkartılarak (2n), dihaploid bitkiler elde edilir. Dihaploid bitkilerde kendileme

yapılarak tamamen homozigot bitkiler elde edilir. (Ellialtıoğlu ve ark., 2006). Haploidizasyon ve diploidizasyon yöntemi ıslah çalışmalarında değişik amaçlar için uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu durum ıslahçılar için önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajı, tam bir homozigot bitkiyi çok kısa bir sürede elde etme olanağını sunmasıdır. Klasik ıslah yöntemleri ile homozigot hatların elde edilmesi 6-7 yıl alırken, diploidizasyon yöntemi ile 1-1,5 yılda % 100 homozigot hatlar elde etmek mümkündür. Kaldı ki klasik ıslah yöntemleriyle %100 homozigotiye hiçbir zaman ulaşamamaktadır. Dihaploid bitkiler doğrudan çeşit olarak kullanılabilirler gibi esasen F₁ hibrit çeşit ıslahında yarıyol materyali olarak kullanılırlar (Veillux, 1994; Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Haploid bitki elde etmek amacıyla kullanılan ve özellikle bitki ıslahı yönünden önem taşıyan anter kültürü çalışmaları günümüzde dünyanın birçok ülkesinde sürdürülmektedir. İlk anter kültürü çalışmaları 1953 yılında Tulecke tarafından *Ginkgo biloba* (Mabet Ağacı) bitkisine ait olgun polenlerin haploid kallus oluşturmak üzere uyarılabileceğinden bahsetmektedir. İlk önemli gelişmeyi ise Guha ve Maheshwari 1964 yılında gerçekleştirmiş ve *Datura innoxia* (boru veya trompet çiçeği) bitkisinin kültüre alınan anterlerinde mikrosporelerden haploid embriyo oluşumu sağlamıştır (Guha ve Maheshwari, 1966). Daha sonra 1967 yılında Bourgin ve Nitsch, Solanaceae familyasında *Nicotiana sylvestris* (woodland tobacco) ve *Nicotiana tabacum* (tütün) türlerinde anter kültürü yoluyla tam bir haploid bitki elde etmeyi başarmışlardır. Bu aşamadan sonra birçok bitki türünde erkek gametten haploid bitki elde etme amacıyla çalışmalar yapılmış, günümüze kadar yaklaşık 250 farklı bitki türünde *in vitro* androgenesis tekniğinden başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Bajaj, 1983; George ve Sherrington, 1984; Pierik, 1987; Irikova ve ark., 2011a). Solanaceae (patlıcangiller), Brassicaceae (turpgiller), Gramineae (buğdaygiller) ve Ranunculaceae (dügün çiçeğigiller) familyalarına ait değişik türlerden haploid bitkiler elde edilebilmektedir (Bajaj, 1983; Rashid, 1983). Tek yıllık otsu bitkilerde anter kültürü çok yıllık odunsu bitkilere göre beklentilere az veya çok yanıt verdiği halde, odunsu bitkilerde elde edilen başarının çok düşük olduğu görülmüştür. Ağaoğlu ve ark. (1998), asmada, Kösalı (2000), ise elmada yaptıkları anter kültürü çalışmalarında kallus oluşumu ve benzeri farklılaşmalar elde ettikleri halde haploid bitki elde edememişleridir.

Anter kültürü tekniğinin, özellikle Solanaceae familyasının birçok türünde başarılı sonuçlar verdiği bilinmektedir. Solanaceae familyasında yer alan biberde ilk kez anter kültürü yöntemi ile dihaploid hat elde edilmesi Çin’de Wang ve ark. (1973), Hindistan’da George ve Narayanaswamy (1973) ve Polonya’da Novak (1974) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaları birçok faktörün etkisini inceleyen ve daha başarılı protokollerin geliştirildiği diğer çalışmalar izlemiştir (Sibi ve ark., 1979; Dumas de Vaulx ve ark., 1981; Dumas de Vaulx, 1990). Biberde androgenesis üzerine yürütülen çalışmalar yirminci yüzyılın sonlarında yoğunlaşmış ve günümüze kadar yoğun şekilde üzerinde çalışılmıştır (Kuo ve ark., 1973; Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Rodeva ve ark., 2006; Kim ve ark., 2008; Lantos ve ark., 2009; Irikova ve ark., 2011a; Teodora ve ark., 2011; Barroso ve ark., 2015).

Türkiyede biberde anter kültürü ile ilgili ilk çalışmalar 1983 yılında Abak (1983) tarafından yapılmış, Türkiye orijinli biber genotiplerinde uygun besin ortamında % 10,38’e kadar ulaşan haploid bitki elde edilmiştir. Daha sonra Türkiye’de biberde anter kültürü ile ilgili çok sayıda çalışma yürütülmüş ve oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır. (Çömlekçioğlu ve ark., 1999; Ellialtıoğlu ve ark., 2001; Çömlekçioğlu ve ark., 2001; Özkum ve Tıpırdamaz, 2002; Büyükalaca ve ark., 2004; Ata, 2011; Taşkın ve ark., 2011; Alremi ve ark., 2014; Arı ve ark., 2016).

Son yıllarda biberde anter kültüründe bir sorunun kalmadığı ve yeterli başarı düzeyinin yakalandığı gibi bazı yaklaşımlar olmasına rağmen bu düşünce doğru değildir. Yapılan çalışmaların sayısı fazla olmasına rağmen hala rapor edilmiş geçerliliği olan kurallar çok azdır (Irikova ve ark., 2011a). Hala birçok biber genotipinde ya cevap alınamamakta veya androgenesise alınan cevap çok düşük düzeylerde kalmaktadır. Ayrıca biber hibrit çeşit ıslahında dihaploid hatların kullanılması düşünülüyor ise mümkün olduğunca çok sayıda haploid hat elde edilmesi gerekir. Çünkü her haploid hat diğerinden farklı genetik yapıya sahip olacaktır. Ebeveynlerde istenen başarının yakalanabilmesi için çok sayıda hat gerekmektedir. Yukarda belirtilen nedenler dikkate alındığında günümüzde biberde anter kültüründe elde edilen başarı düzeyi yeterli kabul edilmemelidir. Bu yaklaşım ile yola çıkılan bu tez çalışmasında da farklı biber genotiplerinde androgenik başarı üzerine değişik faktörlerin etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitki ıslahına sağladığı avantajlar nedeniyle dünyanın birçok ülkesinde anter kültürü çalışmaları yürütülmektedir. Üzerinde çalışılan türlerin bir kısmında başarılı sonuçlar alınabilirken, bazı türler ise yeterince cevap alınamamaktadır. Hatta bazen aynı türde yapılan değişik çalışmalarda bile farklı sonuçlar alınabilmektedir. Bu farklı sonuçlar anter kültürünün başarısı üzerine birçok faktörün etkisi olduğunu kanıtlamaktadır. Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada androgenik tepkinin; genotip (Qin ve Rotino, 1993; Mityko ve ark., 1995), donör bitkinin yaşı ve yetiştirme koşulları (Ouyang ve ark., 1987; Ercan ve ark., 2006; Niklas-Nowak ve ark., 2012; Grozeva ve ark., 2013; Koleva-Gudeva ve ark., 2013; Alremi ve ark., 2014), anter içindeki mikrospor durumu (Nowaczyk ve Kisiala, 2006; Parra-Vega ve ark., 2013a; Barroso ve ark., 2015), besin ortamı ve ortam bileşenleri (Vagera, 1990; Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Irikova ve Rodeva, 2004; Lihao ve ark., 2004; George ve ark., 2008; Liu ve ark., 2009; Irikova ve ark., 2011a), bitki büyüme düzenleyiciler, organik ve inorganik katkı maddeleri (Büyükalaca ve ark., 2004; Thomas, 2008; Yang ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2010; Taşkın ve ark., 2011; Cheng ve ark., 2013; Roshany ve ark., 2013; Olszewska ve ark., 2014), çiçek tomurcuklarına veya anterlere uygulanan ön uygulamalar (Kim, 1999; Çiner ve Tıpırdamaz, 2002; Koleva-Gudeva ve ark., 2007; Özkum ve Tıpırdamaz, 2007; Parra-Vega ve ark., 2013b; Nowaczyk ve ark., 2015) gibi birçok faktöre bağlı olduğunu göstermektedir. Bu faktörler bağımsız olarak etkili olabildikleri gibi birbirleri ile de interaksiyonlar oluşturmaktadırlar. Örneğin androgenesise olumsuz veya düşük cevap veren bir genotipte besin ortamı bileşenleri veya stres uygulamaları etkili olabilmektedir. Nitekim biberde anter kültürü çalışmalarında faktörler bağımsız olarak denendikleri gibi birçok faktör bir arada da denenmektedir.

2.1. Anter Kültüründe Genotip Etkisi

Anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisi genotiptir. Birçok araştırmacı androgenik reaksiyonu sınırlandıran en önemli faktörün genotip olduğunu belirtmektedir (Çömlekçioğlu ve ark., 2001; Rodeva 2001; Wang and Zhang 2001; Rodeva ve ark., 2004; Ercan ve ark., 2006; Koleva- Gudeva ve ark., 2007; Liu ve ark.,

2007; Asakaviciute, 2008; Nowaczyk ve ark., 2009a, 2009b; Başay ve Ellialtıoğlu, 2013).

Genotip, anterden embriyo oluşumunu ve embriyonun bitkiye dönüşümünü etkilemektedir (Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Mityko ve Fari 1997). Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada tüm bitki gruplarında aynı kültür koşulları altında anter yapıları bakımından genotipler arasında büyük farklılıklar gözlemlenmiştir. Hatta Niklas-Nowak ve ark. (2012), aynı genotipin bile farklı androgenik tepki verdiğini ifade etmektedir. Nitsch 1969 yılında 12 farklı tütün çeşidinin 5 tanesinde, Gresshof ve Doy 1972 yılında Arabidopsis (Turpgiller) familyasının 18 farklı hattının 3 tanesinde ve *Vitis vinifera* (asma) türünün 3 çeşidinde, Irikura ise 1975 yılında 118 farklı Solanaceae familyasının sadece 19'unda polen embriyogenesi elde edebilmişlerdir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Rodeva ve ark. (2004), genotiplere bağlı olarak ortaya çıkan farklılığın asıl nedeninin embriyonun genetik potansiyel farklılığı olduğunu savunmaktadırlar. Anter kültüründe donör bitkiler başarılı haploid halden dihaploid hale getirilen hatlardan seçilirse embriyo oluşum kapasitesi o kadar yüksek olmaktadır. Fakat heterozigot olan başlangıç materyalinin tepkisini önceden tahmin etmek güçtür. (Venczel ve Gemesne Juhasz, 1998).

Düşük androgenik tepkiye sahip önemli genotiplerin anter kültürü çalışmalarında başarılı sonuçlar verecek duruma getirilmesi için, bu genotiplerin embriyo oluşturma kapasitesi yüksek genotiplerle melezlendikten sonra anter kültürü çalışmalarına alınması genotipin başarısını arttırmaktadır. Jacobsen ve Sopory (1978), mısır ve patatesten androgenik performansı düşük ve yüksek genotipleri belirleyerek bu genotipleri birbiri ile melezledikten sonra melez genotiplerin androgenik performansı düşük genotiplere göre daha fazla embriyo oluşturdıklarını belirlemişlerdir. Aynı çalışmayı Petolino ve ark. (1988), arpa ve patates üzerine yaptıkları çalışmada F₁ generasyonundaki bitkilerin haploid embriyo oluşturma yeteneklerinin ebeveynlerin ortalamasına yakın olduğunu ve dolayısıyla androgenik performansı düşük olan ebeveynlere göre melezlerin performansının arttığını bulmuşlardır. Tuberosa ve ark. (1987), değişik ülkelerden topladıkları 8 farklı patlıcan çeşidi ve bunların arasında yaptıkları melezlemelerden elde ettikleri 16 melez genotip çalışmalarında, ebeveynlerde en yüksek androgenik etkiyi %

17.3 embriyo olarak belirlerken, bazı melez genotiplerde bu oranı % 42'ye kadar yükselmiştir.

Biberde anter kültürü çalışması yürüten araştırmacıların çoğu başarının genotipe bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini, bazı biber genotiplerinde androgenik embriyo oluşumu ve embriyoların bitkiye dönüşme potansiyelinin çok düşük olduğunu, başarı düzeyinin genotiplere bağlı olarak % 0.5 ile % 75 arasında değiştiğini ve popülasyonlardan alınan anterlerde başarı düzeyinin daha yüksek olduğunu savunmaktadırlar (Qin ve Rotino 1993; Ltifi ve Wenzel 1994; Mityko ve ark., 1995; Koleva-Gudeva ve ark., 2007).

Mityko ve Fari (1997), genotipler arasında ebeveyn hatlar ve hibritlerin olduğu 500'den fazla genotiple yürüttükleri anter kültürü çalışmasında başarının genotipe bağlı olarak önemli düzeyde değiştiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar başarı oranının ayrıca biber tiplerine göre de farklılık gösterdiğini ve en yüksek embriyo oluşum oranının acı biber tipinde gerçekleştiğini, bunu sırayla domates biberi, koyu yeşil biber ve wax tipi biber genotiplerinin izlediğini bildirmektedirler. Nowaczyk ve ark. (2009a), hibrit genotipler ve hibritleri oluşturan ebeveyn hatlar üzerinde yürüttükleri anter kültürü çalışmasında da genotip farklılığının androgenesisin başarısında son derece etkili olduğunu belirtmektedirler.

Karakullukçu (1991), patlıcanda androgenesisde başarının genotiple yakın ilişkili olduğunu belirtirken, Kristiansen ve Andersen (1993), donör bitkilerin büyüme koşullarının optimum olmasının genotipin düşük yanıt verme etkisini ortadan kaldırmayacağını ifade etmektedirler.

Yukarıda bir kısmı ifade edilen farklı çalışmalar anter kültüründe başarı oranının genotipe bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Bu bilgiler anter kültürü çalışmalarında bitkinin genetik yatkınlığının başarı üzerine önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ancak anter kültüründe elde edilen farklılıkların sadece genotip etkisi ile açıklanması yeterli olmamaktadır. Genetik yatkınlığı tetikleyen faktörlerin neler olduğunun da ortaya konması gerekmektedir. Bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.2. Donör Bitkinin Yetiştirme Koşullarının Anter Kültüründe Başarıya Etkisi

Anter kültüründe bitkilerin yetiştirildiği dönem ve yetiştirildiği ortamın sıcaklığı, ışık yoğunluğu, günlük ışıklanma süresi, oransal nem, bitkinin beslenme koşulları ve diğer çevre faktörleri donör bitkiden alınan anterdeki embriyonun başarısını etkilemektedir (Dunwell, 1991; Alpsoy, 1999). Yapılan çalışmalarda aynı bitki türü ve hatta aynı çeşitlerde farklı sonuçlar alınması genotip aynı olsa da donör bitkilerin yetiştirme koşullarının farklı olmasının anter kültüründe elde edilecek başarıyı etkilediğini göstermiştir.

Bajaj (1990) ve Gonzalez-Garcia (2002), *in vitro* çalışmalarında donör bitkilerin yetiştirme koşullarının anter kültürünün başarısı üzerine bitkinin fizyolojik dönemi kadar etkili olduğunu belirtmektedirler. Kristiansen ve Andersen (1993) ise biberde anter kültüründe donör bitkinin yaşı, yetiştirme ortamının sıcaklığı ve fotoperiyodun embriyo oluşumu üzerine oldukça önemli etkiye sahip olduğunu belirtmektedirler. Rodeva ve Cholakov (2006), donör bitkilerin yetiştirildiği vejetasyon süresince güneşli gün sayısı, bulutlanma süresi ve aylık ortalama sıcaklıkların anter kültüründeki embriyo oluşumu üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu belirtmektedirler.

Genel olarak pek çok bitki türünde normal yetiştirme sezonunda ve açıkta yetiştirilen bitkilerin normal yetiştirme döneminin dışında sera veya iklim odası koşullarında yetiştirilen bitkilere göre androgenik performansları daha yüksek olmaktadır (Ellialtıoğlu, 2005). Wenzel ve Foroughi-Wehr (1994) buğdayda, Shtereva ve ark. (1998) domatestede, Büyükalaca ve ark. (2004) ise biberde yaptıkları anter kültürü çalışmalarında serada yetiştirilen bitkilerin embriyo uyartımının açıkta yetiştirilen bitkilere göre daha yüksek olduğunu belirtmektedirler.

Matsubara ve ark. (1998) ile Ercan ve ark. (2006), biberde genotiplerin yetiştirme sezonlarına bağlı olarak androgenesis tepkilerinin de farklı olduğunu belirtmektedirler. Dunwell ve Sunderland (1973), farklı mevsimlerde yetiştirdikleri patates bitkilerinden Haziran sonundan itibaren aldıkları anterlerin Nisan ve Mayıs ayında alınan anterlere göre daha yüksek oranda embriyo oluşturdıklarını belirtmektedirler.

Anter kültürü çalışmalarında çiçek tomurcuklarının çiçeklenme periyodunun başında toplanması tavsiye edilmektedir. Reinert ve Bajaj (1992), bitkinin ilk çiçeklerinden alınan anterlerden daha yüksek oranda embriyo elde edildiğini belirtmektedirler.

Smykal (2000), bitkilerde ilk dönemlerde oluşan çiçek tomurcuklarının taşıdığı mikrosporların androgenik kapasitelerinin daha yüksek olduğunu ve bu nedenle anter kültüründe ilk oluşan tomurcukların kullanılmasının daha yararlı olacağını belirtmektedir. Dunwell (1991), ise anter hasadına uzun bir periyod boyunca devam edilecekse kullanılmayan tomurcukların bitkiden koparılıp, olgunlaşmasına izin verilmemesi gerektiğini savunmaktadır. Pierik (1987), bitki yaşlandıkça rejenerasyon kapasitesinin çoğunlukla düştüğünü ve dolayısıyla yaşlı bitkilerden alınan anterden ziyade genç bitkilerden alınacak anterlerin tercih edilmesi gerektiğini belirtmektedir.

Anter kültüründe başarının yakalanması için bitkilerin iyi beslenmesi, ışık intensitesinin yüksek olması ve anter hasadından 3-4 hafta öncesinden itibaren ister sistemik isterse nonsistemik olsun her tür pestisit kullanımından kaçınılması gerektiği belirtilmektedir (Nitsch, 1981). Hatipoğlu (1997), polen gelişimi sırasında donör bitkilerin herhangi bir strese maruz kalmamaları ve anterlerin alınmasından 3-4 hafta öncesinden itibaren pestisit uygulamasından kaçınılması ve hatta donör bitkilerin anterlerinin alındığı döneme kadar optimum koşullarda yetiştirilmesini önermektedir.

Dumas de Vault ve Chambonnet (1982) tarafından anter kültürüne çok iyi cevap verdiği bildirilen Fransız patlıcan çeşidi “Dourga”yı farklı ekolojide yetiştirerek anter kültürüne tepkisini araştıran Tuberosa ve ark. (1987), yaptıkları çalışmada bu çeşidi androgenik yanıtı çok düşük bir çeşit olarak belirlemişlerdir. Nitekim Rotino ve ark. (1987) da aynı çeşidin androjenetik kapasitesini düşük bulmuşlardır. Karakullukçu (1991) ise Dourga patlıcan çeşidinden hiç cevap alamamıştır. Bu durum, genotip aynı olsa bile donör bitkinin yetiştirme koşullarının farklı olmasının anter kültüründe başarı üzerine önemli düzeyde etki ettiğini göstermektedir.

Buğday, arpa, çeltik ve çavdar gibi tarla bitkilerinde de donör bitkinin yetiştirme koşullarının anter kültüründeki başarıyı etkilediği bilinmektedir. Hatta anter kültürüne son derece yüksek yanıt veren Igri buğday çeşidi bile, yetiştirme koşulları olması gerekenden farklı olduğunda haploid bitki oluşturmamaktadır (Foroughi-Wehr ve Wenzel, 1993).

Bir grup araştırmacı, donör bitkilerin yetiştirildiği koşulların anter kültürü üzerindeki etkisini, anterlerin içerisinde oluşan embriyogenik polenlerin oranına bağlamaktadır. Ayrıca donör bitkinin yetiştirme koşullarının etkisi, yalnızca polen morfolojisi üzerine

değil, aynı zamanda bitkideki fizyolojik ve biyokimyasal olaylar üzerine de etkili olduğunu düşündürmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Literatürde aynı bitki türü ve hatta aynı çeşitlerle yapılan çalışmalardan değişik sonuçların alınması, genotip aynı olsa bile donör bitkinin yetiştirme koşullarının anter kültüründen elde edilecek başarı üzerinde önemli düzeyde etki ettiğini göstermektedir.

2.3. Anter Kültüründe Mikrospor Geliştirme Döneminin Etkisi

Anter kültürü çalışmalarında mikrospordan embriyoid elde edilmesinde veya başka bir deyişle androgenesisin başarıyla uyartılmasında en önemli faktörlerden birisi, hatta en önemlisi mikrospor hücresinin geliştirme aşamasıdır. Zira anterler uygun mikrospor aşamasında kültüre alınmazlarsa diğer faktörler ne kadar etkili olursa olsun başarı elde etme olanağı yoktur. (Kim ve ark., 2004; Nowaczyk ve Kisiala, 2006; Parra-Vega ve ark., 2013a; Barroso ve ark., 2015). Androgenesisin işleyiş prensibi; normal koşullarda erkek gameti oluşturacak olan mikrospor hücresinin gametofitik gelişmesinin durdurularak mikrospordan sporofitik yönde gelişmesini teşvik etmektir. Polen gelişimi iki aşamalı olarak gerçekleşir. Mikrosporogenesis ve mikrogametogenesis olarak adlandırılan olaylarda; Mikrospor ana hücresinin oluşumu ve bunu izleyen mayoz bölünme sonucunda haploid mikrospordan oluşmasına mikrosporogenesis, mikrospordan çekirdek ve hücre bölünmeleri ile sperm hücrelerinin oluşumuna da mikrogametogenesis adı verilmektedir (Emiroğlu, 1982). Mikrosporogenesis; anter lokusu içindeki diploid bir mikrospor ana hücresi, mikrospor tetradı oluşturmak üzere mayoza girer. Mikrospor ana hücresine ait kallos duvarının dağılmasıyla serbest hale geçen mikrospordan, vakuolleşme nedeniyle hızlı bir şekilde büyür ve duvarla çevrilir, çekirdek spor duvarına doğru itilir. Çekirdek bu pozisyonda iken DNA replikasyonuna girer ve irileşir. Çekirdek büyüdükçe RNA ve protein sentezi de gerçekleşir (Sunderland ve Dunwell, 1977). Androgenesise en iyi cevap veren mikrospor gelişim aşaması, ilk polen mitozundan hemen önceki aşamadan mitoz sonrasına kadar geçen aşamadır (Özkum ve ark., 2000). Benzer şekilde birçok araştırmacı değişik bitki genotiplerinde tek çekirdekli mikrospor dönemini içeren anterlerin androgenesis için uygun olduğunu bildirmektedirler (Dumas de Vault ve ark., 1981; Morrison ve ark., 1986; Vagera, 1990; Kristiansen ve Andersen, 1993; Qin ve Rotino, 1993; Kruleva ve Oanh, 1998).

Birçok bitki türünde mikrospor çekirdeğinin mitoz bölünmeye başlamasından hemen önceki dönem, mitoz bölünme aşaması veya hemen bu aşamayı izleyen bölünme sonrası dönem en iyi cevap veren dönemler olarak belirlenmiştir. Sunderland ve Dunwell (1977) *Nicotiana tabacum* (tütün), Reynolds (1984) *Hycscyamus niger* (Banotu), Karakullukçu (1991) *Solanum melongena* (patlıcan), Immonen ve Anttila (1998) *Secale cereale* (çavdar), Guo ve ark. (1999) *Phleum pratense* (çayır kelp kuyruğu), Kim ve ark. (2004) ve Abak (1983), *Capsicum annuum* (biber) gibi birçok bitkide mikrosporları ayrıntılı şekilde inceleyerek mikrosporları gelişim aşamalarına göre gruplandırmışlardır.

Tomurcukların hasat edildiği dönemde çiçek tozunun optimum gelişme aşamasında bulunması oldukça önemlidir ve bu aşama türlere göre değişmektedir (Dunwell, 1991). Karakullukçu (1991), 8 farklı büyüklük ve gelişme evresindeki patlıcan çeşitlerinde meyve gelişimine göre, tomurcuk büyüklükleri veya uzunlukları arasında farklılık olduğunu bulmuştur. Genel olarak taç yaprakların seviyesinin çanak yaprakların birleşme yerinde olduğu, çanak yaprakların hafifçe açılmaya başladığı ve taç yaprakların 1-2 mm'lik kısmının görüldüğü dönemi patlıcan anter kültürü çalışmalarında en uygun dönem olarak belirlemiştir. Anter renginin ise yeşilimsi-sarı renkte olduğunu saptamıştır. Bu devrede tomurcuk uzunluklarının çeşitlere bağlı olarak 22.4-24.7 mm, tomurcuk çaplarının ise 10.8- 12.5 mm olduğunu saptamıştır. Sitolojik incelemelerde ise bu devrenin polen mitozundan hemen önceki devreye karşılık geldiği araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır.

Karakullukçu (1991), ile Karakullukçu ve Abak (1992), patlıcanda yaptıkları çalışmalarda en yüksek haploid bitki frekansını, tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterlerin kültüründen elde etmişlerdir. Novak (1974), biber anter kültüründe 2.6-5.0 mm arasında büyüklüğe sahip ve açık yeşil renkli petalleri olan tomurcuklardan alınan anterlerin, olgunlaşmamış tek çekirdekli mikrosporları içerdiğini ve bu dönemdeki mikrospordan olumlu sonuç alındığını, Sibi ve ark. (1979), biberlerde sepal ve petal boylarının eşit olduğu ya da petallerin biraz daha uzun olduğu dönemin, I. polen mitozu ile aynı dönem olduğunu ve anter kültürüne iyi cevap verdiğini belirtmektedirler. Gonzalez-Melendi ve ark. (1995), biberde anter kültürü yoluyla embriyo eldesinde en uygun mikrospor döneminin geç tek çekirdekli mikrospor safhası olduğunu ve bu safhada çekirdeğin çok aktif olduğunu belirtmektedirler.

Abak (1983), Türkiye orijinli biber genotiplerinde anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etmek için yaptığı çalışmasında, en elverişli anter gelişme döneminin tomurcukların 3.5-4.0 mm iriliğe ulaştıkları zamana rastladığını, tomurcukların morfolojik yapısının çeşitlere göre farklılık gösterdiğini, Türkiye’de yetiştirilen uzun meyveli biber çeşitlerinde 3.6-4.0 mm çapındaki polen mitozundan hemen önce veya mitoz bölünmenin profaz aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerin tomurcuklarında yer aldığını ve taç yaprak seviyesinin çanak yaprak seviyesini geçtiği bu aşamanın anter kültürü için en uygun dönem olduğunu belirtmektedir.

Sayılır ve Özzambak (2002), biberde 4-6 mm uzunluğundaki tomurcuklarla yapılan anter kültüründe en iyi anter, kallus ve embriyo gelişimini sağladıklarını bildirmektedirler. Dolcet-Sanjuan ve ark. (1997), anter kültüründe başarı için, biber tomurcuklarının kaliks ve korollasının aynı boyda veya korollanın biraz daha uzun ve kenarları menekşe renkli yeşil olması gerektiğini söylemektedirler.

Mikrospor tanelerinde nişasta birikimi anter kültürü için çok önemlidir. Birinci polen mitozu evresinden sonra mikrosporda nişasta birikimi giderek artmaktadır. Bu aşamaya gelmiş olan mikrosporlar gametik gelişmeye doğru gitmektedir. Bu dönemdeki mikrosporların gelişmelerini sporofitik yöne kaydırmak ve haploid uyarımı için yapılan uygulamalar etkili olmamaktadır (Foroughi-Wehr ve Wenzel, 1993).

Çiçek tomurcuklarının kültür ortamına aktarılacakları, bir başka deyişle anterlerin hasat edilecekleri dönemin belirlenmesinde tomurcukların büyüklük ve morfolojilerine göre doğrudan karar vermek yeterli değildir (Sibi ve ark., 1979). Morfolojik gözlemlerin yanı sıra sitolojik testlerin de mutlaka yapılması gerekir. Morfolojik ölçümler tomurcuk büyüklüğü, anter-dişi organ boyu, taç yaprak uzunluğu dikkate alınarak yapılabilirse de her türde kesin sonuç vermeyebilir (Telmer ve ark., 1992). Sitolojik düzeydeki ölçümler daha sağlıklıdır. Sitolojik ölçümlerde en basit yöntem, ezme preparatların asetokarmin ile boyanması (Nitsch, 1981) yöntemidir. Bu yöntemin verimli olmaması durumunda ise feulgen yöntemi (Darlington ve La Cour, 1963), parafinle kesit alma yöntemi (Stösser ve ark., 1985; Eti, 1987) veya DNA çekirdek boyama yöntemleri olan DAPI (Vergne ve ark., 1987) veya Ethidium Bromid ile boyama (Samancı ve ark., 1998) yöntemlerinden herhangi birisi de denenebilir. Böylece sitolojik çalışmalarla elde edilen

sonuçlar morfolojik gözlemlere uyarlanabilmekte, üzerinde çalışılan genotipte uygun anter veya tomurcuk aşaması belirlenebilmektedir (Vergne ve ark., 1987).

Sunderland (1971), kültüre alınan tütün anterlerinin içerisinde sitolojik gözlemlerde daha açık renkte boyanan ve büyüklük bakımından da farklılık gösteren polenlerin varlığından bahsetmektedir. Daha sonra çavdar (Wenzel ve Thomas, 1974) ve arpada (Dale, 1975) aynı dönemde alınmış tomurcuklar içindeki polenlerin aralarında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Polen dimorfizmi olarak adlandırılan bu durumdaki polenlerin bir bölümü gametofitik yönde gelişmesini sürdürerek normal polenleri oluştururken, diğer bir bölümü ise sporofitik gelişme yönüne kayarak embriyo oluşturma yeteneği kazanmaktadır. Horner ve Mott (1979), tütün bitkisinde polen dimorfizminin olduğunu belirlemiş, embriyo oluşturma yeteneğine sahip olduğu düşünülen sporofitik polen tanelerinin oranı ile kültüre alınan anterlerden elde edilen embriyo sayılarını karşılaştırmışlardır. Polen tanelerinin sayısı ile oluşan haploid embriyo sayısı arasında oldukça yüksek korelasyondan söz etmektedirler.

2.4. Anter Kültüründe Çiçek Tomurcuklarına veya Anterlere Uygulanan Sıcaklık Stresi Uygulamaları

Birçok araştırmacı anter kültürü çalışmalarında stres uygulamasının gerekliliğini savunmaktadırlar (Ahmadian ve ark., 1998; Barany ve ark., 2005; Jacquard ve ark., 2006; Ellialtıoğlu ve ark., 2000). Stres uygulamaları arasında en yaygın uygulama sıcaklık şoklarıdır. Sıcaklık şokları düşük veya yüksek sıcaklık uygulamaları şeklinde yapılabilmektedir. Farklı sürelerde ve derecelerde sıcaklık uygulamalarının yapıldığı birçok araştırma vardır. Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982) ve Dumas de Vaulx ve ark. (1981), androgenesis uyartımı için yüksek sıcaklık uygulamalarını denemişler ve daha fazla embriyo oluşumu elde etmişlerdir. Daha sonra birçok araştırmacı bu uygulamayı geliştirmiştir (Bajaj, 1990; Mityko ve ark., 1995; Kim ve ark., 2008; Nowaczyk ve ark., 2009). Bazı bitkilerde 3 ile 7 °C arası düşük sıcaklık, bazı bitkilerde 28 ile 32 °C arası yüksek sıcaklık etkili olurken bazı bitkilerde ise hem sıcak hem de soğuk uygulaması sporofitik gelişmeyi teşvik etmektedir (Arı, 2006).

Embriyonun uyarımı amacıyla yapılan sıcaklık uygulamaları ana bitkiye, çiçek tomurcuklarına, anterlere veya izole edilen mikrosporlara yapılabilmektedir.

Araştırmacılar sıcaklık stresinin tomurcuklara mı yoksa anterlere mi uygulanması gerektiğinin ve bu uygulamaların yüksek sıcaklık mı yoksa düşük sıcaklık mı olması gerektiği konusunda hemfikir değillerdir. Türlerle, çeşitlere ve diğer faktörlere bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya koymaktadırlar.

Anter kültürü çalışmalarında tomurcuklara düşük sıcaklık uygulamaları arpa (Kasha ve ark., 2001, Sunderland ve ark., 1981), buğday (Indrianto ve ark., 1999, Lazar ve ark., 1985), patates (Wenzel ve Uhrig, 1981), mısır (Genovesi ve Collins, 1982), biber (Morrison ve ark., 1986) ve patlıcanda (Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz, 1997) olumlu sonuçlar vermiştir.

Morrison ve ark. (1986) ile Supena ve ark. (2006), çiçek tomurcuklarına 24-100 saat süreyle 4 °C'de soğuk uygulamasının anter çıkışını etkilediğini belirtirken, bazı araştırmacılar ise önemli derecede etkilemediğini vurgulamaktadırlar (Vagera ve Havranek, 1985; Munyon ve ark., 1989; Özkum ve ark., 2000; Kim ve ark., 2005).

Sibi ve ark. (1979), çiçek tomurcuklarının 4 °C'de 48 saat bekletilmesi ile 100 anterden 1-3 bitki elde edildiğini belirtirken; Sunderland ve Roberts (1979), 7-15 °C'de 7-14 gün sürede yapılan şoklamanın, daha düşük derecelerde ve kısa süreyle yapılan uygulamalara göre daha etkili olduğunu belirtmektedirler. Yine Morrison ve ark. (1986), 4-10 °C'ler arasında 3 günden 4 haftaya kadar tutulan tomurcukların polen rejenerasyonu bakımından olumlu cevap verdiğini bildirmektedirler.

Özkum ve Tıpırdamaz (2002), ön soğuk uygulamasının anterlerde kallus oluşumunu teşvik ettiğinden dolayı embriyonun başarısını etkilemediğini belirtmektedirler.

Tıpırdamaz ve Ellialtıoğlu (2002), tarafından patlıcanda anter kültürü üzerine yapılan çalışmada Kemer patlıcan çeşidine ait çiçek tomurcuklarına yapılan soğuk şoku uygulamalarının etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar 4 °C de 80 saat ve 9 °C de 9 gün uygulanan soğuk şoklarının embriyogenesise olumlu etki yapmadığını ve embriyoların sadece kontrol ortamlarından elde edildiğini rapor etmektedirler.

Anter kültüründe kallus ve embriyo oluşumuna soğuk uygulamalarının olumlu etki yapmasına neden olan mekanizma henüz açıklığa kavuşmamış olmakla birlikte; bu uygulamaların etkisini açıklamaya yönelik bazı görüşler bulunmaktadır. Düşük sıcaklıklarda birinci polen mitozu aşamasında tutulan mikrospor sayısında artış olmakta ve nişasta üretimi bloke edilmektedir. Nişasta içeriği düşük tek çekirdekli mikrosporlar,

kültür koşullarında embriyo oluşturmak üzere sporofitik gelişmeye doğru daha kolay yönlendirilebilmektedir. Soğukta bekletme sırasında zayıf ve yaşama gücü olmayan anter ve mikrosporlar hemen kahverengileşip ölmekte, böylece güçlü anterler kültüre alınmakta; bunlar da *in vitro* koşullarda yüksek oranda rejenere olabilmektedir. Kültürlerin inkübasyonu süresince kahverengiye dönüşen ve yaşlanarak toksik maddeler salgılayabilen anter duvarı, kültür öncesi uygulanan soğuk şokları sayesinde daha geç yaşlanmakta ve olumsuz etkileri önemli düzeyde engellenebilmektedir (Foroughi-Wehr ve Wenzel, 1993).

Biber ve patlıcanda soğuk uygulanan tomurcuklardan izole edilen anterlerin kültüre alınması halinde, anterlerin inokulasyon süresi boyunca soğuk uygulanmayan kontrol grubu anterlerinden daha açık renkte kaldıkları; kontrol anterleri koyu kahverengi-siyah renk alırken, özellikle patlıcanda soğuk uygulanan anterlerin sarımsı kahverengi görünümünü uzun süre korudukları bildirilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Johansson ve Eriksson (1977), tomurcuklara soğuk uygulayarak anterlerde bulunan ve embriyo oluşumunu engelleyici bir hormon olan absisik asitin bu olumsuz etkisinin ortadan kaldırılabilceğini ileri sürmektedir. Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz (1997) ile Özkum ve ark. (2000), ise soğuk uygulamalarının biber ve patlıcan anterlerindeki absisik asit miktarının azaltılmasında ve oluşan embriyo sayısının artmasında olumlu bir etkisinin bulunmadığını belirtmektedirler. Absisik asitin doku kültüründeki rolü tam olarak açıklığa kavuşturulmamış olmakla birlikte, somatik embriyoların olgunlaşmasında kullanıldığı ve ortama absisik asit ilavesinin anormal embriyo gelişimini engellediği belirtilmektedir (Özcan ve ark., 2001). Absisik asitin farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı bazı çalışmalarda ise denenen konsantrasyonların hiçbirinde absisik asitin etkisinin ortaya çıkmadığı görülmektedir (Vieitez, 1995; Xing ve ark., 1999; Robichaud ve ark., 2004).

Anter kültürü çalışmalarında tomurcuklardan alınan anterler besin ortamlarına yerleştirildikten sonra inkübasyon aşamasına geçilmektedir. İnkübasyonun süresi ve uygulanışı hakkında yapılmış çok sayıda araştırma mevcuttur. Sıcaklık şokları izole edilen mikrosporların kültüre alınmasından sonra uygulandığında daha etkili olduğu düşünülen birçok araştırma mevcuttur. Çalışmalarda sıcaklık derecesi ve süresi türlere göre farklılık göstermektedir. Bazı bitki türlerine ait anter kültürlerinde inkübasyonun

ilk günlerinde uygulanan yüksek sıcaklık uygulamaları embriyo oluşumu üzerine olumlu etki yapmaktadır (Dumas de Vault ve ark., 1981). Anterlere uygulanan yüksek sıcaklık şoku özellikle embriyo oluşumu zayıf olan genotiplerin embriyo oluşumunu teşvik ettiğinden biberde anter kültürü çalışmalarında diğer faktörler optimum düzeyde sağlanırsa embriyo oluşumunu arttırdığı bilinmektedir (Teodora ve ark., 2011). Yüksek sıcaklık şokları özellikle Brassica türlerinde etkili bir uygulama olmaktadır. Örneğin; brokolide 30 °C’de 2 gün (Duijs ve ark., 1992), karnabahar, baş lahanada ve kıvırcık yapraklı baş lahanada 32 °C’de 2 gün (Ferrie ve ark., 1999), çin lahanasında 33 °C’de 1 gün (Cao ve ark., 1994), *B. carinata*’da 32 °C’de 3 gün uygulamalarından daha başarılı sonuçlar alındığı belirtilmektedir (Barro ve Martin, 1999).

Tütün gibi anter kültürüne son derece olumlu yanıt veren bitkilerde 24-28 °C sıcaklıkta ve fotoperiyodik bir düzende aydınlatılan bir iklim dolabında yapılan inkübasyon yeterli olurken; patlıcan, biber, lahanada grubu sebzelerde kültürün ilk günlerinde yüksek sıcaklık şoklarına gereksinim duyulabilmektedir.

Karakullukçu ve Abak (1992), anterlere kültür öncesi veya kültüre alındıktan sonraki ilk günlerde uygulanan sıcaklık şoklarının (25, 30 ve 35 °C) anter kültüründe elde edilecek başarıyı etkileyen faktörler arasında olduğunu, sıcaklık derecesi ve süresi arttıkça anterlerde şişkinleşme oranının da arttığını saptamışlardır.

Dolcet-Sanjuan ve ark. (1997), anterlerin karanlıkta 7 °C’de 1 hafta boyunca bekletilmesinin embriyoyu teşvik ettiğini, Supena ve ark.(2006), anterler kültüre alındıktan sonraki 9 °C’de 1 hafta bekletilmesinin olumlu etki oluşturduğunu, bunun yanında Koleva-Gudeva ve ark. (2007), düşük sıcaklık uygulamasında benzer etkileri elde edemediklerini belirtmektedirler.

Chambonnet (1988), biber ve patlıcanda, ilk 8 gün boyunca karanlık ve +35 °C’lik sıcaklık şokunun gerekli olduğunu bildirmekte, biberde anter kültüründen önceki 24-48 saat boyunca çiçek tomurcuklarına 4 °C’lik düşük sıcaklık ve karanlık uygulamasının embriyonik gelişmeyi uyartacağını, ancak patlıcanda böyle bir uygulamanın şart olmadığını belirtmektedir. Karakullukçu (1991), kültürün ilk 8 gününde karanlık ve 35 °C sıcaklık uygulamasının, patlıcanda embriyonik gelişimi başlatmak için gerekli olduğunu bildirmektedir.

Biberde anter kültüründe besin ortamının bileşimi ve inkübasyon koşulları embriyo oluşumu üzerinde önemli etkiye sahiptir (Terzioğlu ve ark., 2000). Biber anter kültürlerinin ilk 8 gün 35 °C 'de karanlıkta bekletilmesi sonra 25 °C'ye alınması birçok araştırmada kullanılan inkübasyon koşuludur. Araştırmacılar sürekli ışıklandırılan ve 29 °C'de tutulan anterlerden oluşan embriyo sayısının, 25 °C ve 35 °C uygulamasından daha yüksek olduğunu açıklamışlardır.

Aynı besin ortamı kullanarak anterleri karanlıkta 35 °C de 8 gün bekletmek, daha kısa süreli bekletmeden daha iyi sonuç vermektedir. Genotiplere bağlı olarak değişmekle beraber iyi sonuç veren genotiplerde 100 anterden elde edilen bitki sayısını 50'ye kadar çıkmaktadır (Dumas de Vault ve ark. 1981). Koleva-Gudeva (2003) ve Prayantini (2006) 35 °C sıcaklık şokunun anterler üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ve bu uygulamanın Dumas de Vault ve ark., (1981), tarafından geliştirildiğini belirtmektedirler. Morrison ve ark. (1986), anterleri 35 °C de 12 gün bekletmenin embriyo oluşumunda daha etkili olduğunu ifade etmektedirler.

Dumas de Vault ve ark. (1981), tarafından geliştirilen 8 gün 35 °C sıcaklık uygulamasına göre daha kısa sürede 4gün 35 °C sıcaklık uygulamasının embriyo gelişimini arttırdığını ve karanlıkta kısa süreli inkubasyon uygulamasının biber anter kültürü için genel bir problem olan callus oluşumunu azalttığı belirtilmektedir (Parra-Vega ve ark., 2013b).

Hamaoka ve ark. (1991), 35 °C de 24 saat bekletilen *Brassica campestris* (şalgam) anterlerinde embriyo oluşum oranının kontrol ortamından 20 kat daha fazla olduğunu ortaya koymuşlardır.

Abak (1983), biber anterlerine uygulanan düşük sıcaklık uygulaması yerine anter kültürlerini 8 gün karanlıkta ve 35 °C'de bekletmenin embriyo ve bitki oluşumunu teşvik ettiğini bildirmektedir. Araştırmacı 100 anteri 8 gün karanlıkta ve 35 °C'de bekleterek yaptığı bir çalışmada, elde edilen bitki sayısının bazı genotiplerde 50'ye kadar çıktığını belirtmektedir.

Anterler kültür ortamına alındıktan sonra (inkübasyon döneminde) uygulanan sıcaklığın düşük sıcaklık mı yoksa yüksek sıcaklık mı olması gerekliliği hala günümüzde de tartışılmaktadır.

2.5. Anter Kùltüründe Besin Ortamları ve Ortam Bileşenleri

Besin ortamının bileşimi, kùltüre alınan anterlerin (mikrosporların) gelişimi için önemli rol oynamaktadır. Mikrosporların gametofitik gelişmeden sporofitik gelişmeye geçişini teşvik etmek için besin ortamına eklenen çok sayıdaki bileşen ve bunların miktarları büyük önem taşımaktadır.

Besin ortamındaki mikro besin elementleri, vitaminler, hormonlar, büyüme düzenleyiciler, karbon ve azot kaynakları, aminoasitler, katılaştırıcı maddeler, ortamlar (katı, sıvı veya çift fazlı) ve pH besin ortamlarının önemli bileşenleridir. Anter kùltüründe haploid embriyo eldesi için farklı kùltür ortamları, büyüme düzenleyiciler, aktif kömür ve gümüş nitrat kullanımı birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir (Kristiansen ve Andersen, 1993; Ercan ve ark., 2001; Çiner ve Tıpırdamaz, 2002). Paksoy ve ark. (1995)'e göre besin ortamlarına ilave edilen serin ve glutamin gibi aminoasitlerin gümüş nitratın etkisine benzer şekilde etilen sentezini inhibe ettiğini, Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz (1997)'e göre ise aktif kömür gibi ilave edilen maddelerin androgenik başarıyı artırdığını belirtmektedirler.

2.5.1. Bitki Büyüme Düzenleyiciler

Anter kùltürü çalışmalarında büyüme düzenleyici maddelerin katkısı, bu maddelerin cins ve dozları bakımından araştırmalar arasında bazı farklılıklar vardır. Genelde çalışmalarda oksin kaynağı olarak 2,4-D, NAA ve IAA kullanılırken; sitokinin kaynağı olarak kinetin, BA ve zeatin kullanılmaktadır.

Anter kùltüründe genel kanı ilk aşamada gametofitik dokuları sporofitik gelişmeye dönüştürme yönünde uyaracak oksinler gerekli iken; bitkiye dönüşme aşamasında sitokininlerin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır (Ellialtıoğlu ve ark., 2002). Bu yaklaşım son yıllarda birçok araştırmacı tarafından yürütölen çalışmalarda değişmiştir ve araştırmacıları oksinlerle beraber sitokininleri de kullanmaya yöneltmiştir (George, 1996; Çömlekçioğlu ve ark., 1999; Alpsoy, 1999). Oksinler, doku kùltürlerinde tek başlarına kullanıldıklarında kallus uyarımını, hızlı hücre çoğalması ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını, sitokininlerle birlikte kullanılırsa yine kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu ve somatik embriyo oluşumunun uyarımını sağlayabilirler. Birçok bitki

türünde yüksek etki gösteren 2,4-D, sitokininlerle kombine halde kullanıldığında embriyogenensisi teşvik etmektedir.

Biber anter kültüründe oksin olarak çoğunlukla 2,4-D ve NAA olumlu sonuçlar verirken, sitokinin olarak BA ve kinetin kullanılmaktadır. George (1996), embriyogenesis başlangıcı için oksinlere ilave olarak sitokininlerin de kullanılması gerektiğini belirtmektedir. Wang ve ark. (1973), Kinetin ve 2,4-D'nin 1 mg l⁻¹'lik dozlarının biberde anter kültürü çalışmalarında yeterli olduğunu, Dumas de Vaultx ve ark., (1981) ile Chambonnet (1985), biberde her iki hormonun da 5 mg l⁻¹'lik kombinasyonunu daha iyi sonuç verdiğini savunmaktadırlar.

Rotino ve ark. (1987), patlıcan anter kültüründe değişik dozlarda kullanılan NAA ve BAP kombinasyonlarının embriyo oluşturmada başarıyla kullanılabileceğini bildirmektedirler.

Çömlekçioğlu ve ark. (1999), bazı yerli biber populasyonlarında yaptığı anter kültürü çalışmalarında, bitki büyüme düzenleyicilerden NAA ve BAP'ın besin ortamlarında birlikte kullanılmasının olumlu sonuç verdiğini; Yoon ve ark. (1991), biberde anter kültüründe farklı büyüme düzenleyici kombinasyonları içinden embriyo oluşumu için en uygun bileşimin 0.1 mg l⁻¹ Kinetin ve 0.1 mg l⁻¹ 2,4-D olduğunu bildirmektedirler. Chunling (1992), MS temel besin ortamına 4 mg l⁻¹ NAA ve 0.1 veya 1 mg l⁻¹ BA ilave edilmesinin biberde anter kültüründe çok olumlu sonuçlar elde edilmesini sağladığını ifade etmektedir.

Alpsoy (1999), patlıcanda anterden haploid bitki eldesi için 5 mg l⁻¹ 2,4-D ve 5 mg l⁻¹ kinetin ilave edilmiş olan ortam ile, 4 mg l⁻¹ NAA ve 1 mg l⁻¹ kinetin ilave edilmiş olan ortamı uygun ortamlar olarak belirtmektedirler.

Qin ve Rotino (1993), bazı biber çeşitlerinde 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg l⁻¹ Kinetin veya 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg l⁻¹ BA katkılı modifiye edilmiş DDV ortamında kinetin'in, genel olarak benziladenin'e göre daha etkili olduğunu ve sadece iki genotipin benziladenin varlığında embriyo oluşturabildiğini belirtmektedirler.

Ercan ve ark. (2001), 5 adet biber çeşidinde kinetin, BA, NAA, 2,4-D ve aktif kömürün farklı dozlarını içeren 11 farklı besin ortamları üzerine yaptıkları çalışmada; % 1 aktif kömür, 5 mg l⁻¹ 2,4-D, 5 mg l⁻¹ kinetin içeren % 1 aktif kömür + 4 mg l⁻¹ NAA ve 0.1 mg l⁻¹ BA içeren MS ortamlarından en iyi sonuçlar elde edildiğini bildirmektedirler.

Besin ortamına değişik düzeylerde katılan büyümeyi düzenleyicilerin (kinetin, zeatin, 2,4-D, NAA) patlıcan anter kültüründe haploid bitki oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, anterler kinetin + 2,4-D kombinasyonlarında, zeatin + 2,4-D veya kinetin + NAA kombinasyonlarına göre daha iyi cevap vermişlerdir (Karakullukçu ve Abak 1992).

Rotino ve ark. (1987), 5 mg l⁻¹ NAA ve 5 mg l⁻¹ Kinetin kombinasyonunda farklı patlıcan genotiplerinden ortalama % 76.5 oranında embriyo elde ettiklerini belirtmektedirler.

2.5.2. Besin Ortamının Tipi ve Yapısı

Temel besin ortamları olarak anter kültüründe en fazla kullanılan ortamlar arasında anterlerin katılaştırılmış besin ortamı üzerine yerleştirilerek kültüre alındığı MS (Murashige ve Skoog, 1962), WH (White, 1963), NN (Nitsch ve Nitsch, 1969) ve DDV (Dumas de Valux ve ark., 1981) ortamları yer almaktadır. Anter kültüründe en fazla kullanılan katılaştırıcı ortam yapısı, agar ilave edilerek jel kıvamına getirilmiş yarı-katı nitelikte olanlarıdır.

Sıvı besin ortamında anterlerin yüzdürülmesi gibi çift katlı ortamlar da anter kültüründe kullanılmaktadır (Kohlenbach ve Wernicke, 1978; Morrison ve ark., 1986; Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997). Dolcet-Sanjuan ve ark. (1997), biberde yaptıkları bir çalışmada çift fazlı ortamı oldukça başarılı bulmuşlardır. Başlangıç ortamı olarak Nitsch and Nitsch'in NN ortamında yapılan bazı değişiklikler sonucu oluşturulan besin ortamı kompozisyonunu kullanan araştırmacılar çift fazlı ortamın alt kısmında agarlı ortam ve üst kısımda sıvı ortamın bulunduğu değişik bir ortamla yaptıkları çalışmada başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

Wernicke ve Kohlenbach (1976), androgenik embriyo oluşumunda aktif kömür ilave edilmiş agarlı ortam üzerine sıvı ortam katarak hazırlanan çift fazlı ortamın, jel halindeki agarlı ortamdan daha iyi sonuç verdiğini belirtmektedirler. Araştırmacılar bir başka çalışmalarında da sonuçlarını pekiştirmişler ve aktif kömürün ortamın içinde bulunan engelleyici ve toksik maddeleri absorbe ettiğini savunmaktadırlar (Kohlenbach ve Wernicke, 1978). Powell ve Uhrig (1987), çift fazlı ortamların patates anter kültürü çalışmalarında olumlu sonuçlar verdiğini bildirilmektedirler.

Biberde yapılmış olan anter kültürü çalışmalarında Dumas de Vault ve ark. (1981), tarafından geliştirilen ve DDV olarak bilinen temel besin ortamı en başarılı sonuç veren ortamlardandır. Birçok araştırmacı bu ortamı önerildiği şekilde veya modifiye ederek kullanmış ve biberde oldukça başarılı sonuçlar elde etmişlerdir (Abak, 1983; Chambonnet, 1985; Morrison ve ark., 1986; Rotino ve ark., 1987; Tuberosa ve ark., 1987; Karakullukçu ve Abak, 1992; Ltifi ve Wenzel, 1994).

2.5.3. Karbonhidrat Kaynağı (Şekerler)

Anter kültürü çalışmalarında besin ortamlarında karbonhidrat kaynağı olarak genelde sakkaroz kullanılmaktadır. Besin ortamlarında sakkarozdan başka galaktoz (Kyo ve Harada, 1985), mannitol (Cıstué ve ark., 1994), maltoz (Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Kiviharju ve Pehu, 1998; Guo ve ark., 1999; Holme ve ark., 1999), laktoz (Rihova ve Tupy, 1999), glukoz (Saji ve Sujatha, 1998; Guo ve Pulli, 2000) ve pikloram (Bishnoi ve ark., 2000) gibi maddeler de kullanılmaktadır.

Anter kültürü çalışmalarında besin ortamındaki şeker oranı önemli bir rol oynamaktadır. Besin ortamında karbonhidrat kaynağı olarak şeker kullanılması anter kültüründe başarı üzerine bitki büyüme düzenleyici maddeler ve genotip kadar etkilidir (Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997). Reinert ve Bajaj (1977), şekerin ortamda osmotik basıncı ayarlayıcı bir rol oynadığını belirtmektedirler. Bunun yanında yüksek düzeydeki şekerin, enerji kaynağı olarak solunumu ve metabolik aktiviteyi artırarak hücre bölünmesi ve embrioid oluşumunu arttırabileceği de ileri sürülmektedir (Kandeler, 1987). Şekerin *in vitro* koşullarda bitki hücrelerinde önemli embriyolojik farklılaşmalara neden olduğu çok sayıda çalışma ile ortaya konmuştur (Koch, 1996; Jain ve Babbar, 2003; Yadollahi ve ark., 2011; Yaseen ve ark., 2013). Buğdayda % 3 şeker polen kültürü için ideal kabul edilirken, anter kültürü için % 9 gibi yüksek oranlar da uygun bulunmakta, % 9'dan daha yüksek şeker konsantrasyonları polen bölünmesini inhibe etmektedir (Zhongheng, 2002).

In vitro androgenesis için besin ortamına eklenecek şekerin zorunlu olduğu, ilk kez Nitsch (1969)'in tütünde, daha sonra da Sunderland (1974)'in boru çiçeğinde yaptıkları çalışmalarla ortaya konmuştur. Normal olarak % 2-4 oranında kullanılan sakkaroz, birçok türde (patates, biber, patlıcan) daha yüksek oranlarda % 6-12 kullanılmaktadır.

Besin ortamlarına özellikle kültürün ilk dönemlerinde ilave edilen yüksek şeker dozları haploid embriyo elde edilmesini sağlamaktadır (Keller ve ark., 1975; Sopory ve ark., 1978; Dumas de Valux ve ark., 1981; Dumas de Valux ve Chambonnet, 1982). Yüksek şeker konsantrasyonunun mikrospor bölünmesinin ilk dönemlerinde etkili olduğu, bu etkinin sakkaroz yanında glukoz kullanılarak tamamlanabileceğini ve ilk dört günden sonra anterleri % 2 sakkaroz içeren ortamlara aktarmak gerektiği vurgulanmaktadır (Sopory, 1979).

Abak (1983), biberde anter kültürü ortamlarında şeker oranının yükseltilmesinin haploid embriyo ve bitki oluşum oranını artırdığını, 90 ve 120 g l şeker içeren ortamlarda hem embriyo hem de bitki oluşumunun daha yüksek oranlarda gerçekleştiğini belirtmektedir. Birçok araştırmacı ilk 12 gün anterleri % 12 oranında sakkaroz içeren ortamlarda tutup, sonraki günlerde ortamın sakkaroz seviyesini % 3'e indirmek gerektiğini bildirmektedirler (Isouard ve ark., 1981; Dumas de Vaulx ve ark., 1981; Dumas de Vaulx ve Chambonnet, 1982; Tuberosa ve ark., 1987; Abak, 1993).

Sopory ve ark. (1978), patatesde % 6 oranında sakkarozun kullanılması gerektiğini belirtirken, aynı araştırmacı başka bir çalışmasında patateste % 6 sakkaroz konsantrasyonunda anterlerin % 40'ından fazlasının olumlu cevap verdiğini belirtmektedir (Sopory, 1979). Patateste anter kültüründe sakkarozun etkisini araştıran Powell ve Uhrig (1987), sakkaroz oranının % 9 olması halinde en yüksek embriyoid oluşumu olduğunu, ancak % 15 gibi yüksek konsantrasyonda sakkaroz içeren ortamda da embriyoid elde edilebileceğini vurgulamaktadırlar.

Rotino ve ark. (1987), besin ortamına sakkarozun yanında aynı zamanda glikoz da kullandığı patlıcan anter kültürü çalışmasında, kontrol olarak alınan % 12 ve % 3 sakkaroz konsantrasyonuna göre % 6 oranında sakkaroz +% 6.3 oranında glikozun bazı genotiplerde 100 kat daha fazla embrioid ve bitki oluşturduğunu bildirmektedirler. Aynı çalışmanın etkilerini araştıran Karakullukçu ve Abak (1993), ilk 12 gün boyunca besin ortamında karbonhidrat kaynağı olarak % 3-6 ve 12 sakkaroz kullanmışlar ve en yüksek androgenik performansı % 12 sakkaroz uygulamasından etmişlerdir.

2.5.4. Aktif Kömür

Besin ortamına aktif kömür ilave edilmesi birçok bitki türünün anter kültüründe başarıyı artırmaktadır. Aktif kömürün etki mekanizması tam olarak açıklanmamıştır. Fakat aktif kömür kültür ortamını birçok yolla değiştirmekte, özellikle de hormonları, vitaminleri, demiri ve kültürdeki yaşlanan dokular tarafından salınan fenolik bileşikleri adsorbe etmektedir (Alpsoy, 1999). Weatherhead ve ark. (1978), tütün anter kültürü çalışmalarında aktif kömürün, besin ortamının otoklavda sterilizasyonu sırasında sakkaroz tarafından açığa çıkarılan 5-hydroxymethylfurfural (HMF) maddesini tuttuğunu; ancak bu engelleyici maddelerin yanında naftalin asetik asit veya bazı sitokinlerin de aktif kömür tarafından adsorbe edilebileceğini ifade etmektedirler. Fridborg ve ark. (1978), aktif kömürün fenolik bileşikleri absorbe ederek soğan ve maydanozda somatik dokulardan embriyogenesi artırdığını bildirmektedirler. Heberle-Bors (1980), şelat gibi bazı önemli bileşiklerin de aktif kömür tarafından tutulabileceğine dikkat çekmektedir. Aktif kömürün anter kültüründeki olumlu etkisinin bir nedeninin de anter duvarındaki fenolik bileşiklerin tutulması olduğu ifade edilmektedir (Genouesi ve Collins, 1982).

Johansson ve ark. (1982), aktif kömürün yalnızca anterlerdeki kahverengileşmeyle birlikte ortaya çıkan toksik maddeleri değil, aynı zamanda embriyogenesi engelleyen absisik asidi de adsorbe edebileceğini rapor etmişlerdir. Ortama aktif karbon ilave edilmesi durumunda absisik asitin etkisinin görülmesi için $10-40 \text{ mg l}^{-1}$ arasında absisik asit kullanılması gerektiği, fakat bu değer genotipe ve uygulama süresine bağlı olduğu bildirilmektedir (Capuana ve Debergh, 1997; Pullman ve ark., 2005). Yapılan bazı çalışmalarda absisik asidin etkisinin ortaya çıkabilmesi için osmotik ayarlayıcı olarak PEG (polietilen glikol) ile birlikte kullanılması gerektiği rapor edilmektedir (Robichoud ve ark., 2004).

Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz (2002), besin ortamına katılan aktif kömürün, anterlerdeki içsel absisik asit miktarı üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada; % 0.1, % 1 ve % 2 aktif kömürün, patlıcan anterlerindeki absisik asit miktarını azaltırken, embriyogenesise olumlu etki yapmadığını ve embriyoların sadece kontrol ortamlarından elde edildiğini rapor etmektedirler. Ayrıca, anterlerdeki absisik asit miktarının az veya çok olmasının anter kültüründeki başarı üzerinde tek başına etkili bir faktör olmadığı da ifade

edilmektedir. Aktif kömürlü ortamlarda sürgün ucu olmayan tüylü kök oluşumlarının ortaya çıktığını belirten araştırmacılar, aktif kömürün zararlı maddelerin yanı sıra ortamdaki büyüme düzenleyicilerini de adsorbe edebileceğine ve embriyo oluşumu için yeni kombinasyonlar denemek gerekebileceğine dikkat çekmektedirler.

Bajaj, 1983'e göre aktif kömür anter başına embriyo ve bitki sayısını artırır ve haploid bitkilerin rejenerasyonunu hızlandırır. Karakullukçu, 1991'e göre ise aktif kömürlü ortamdaki anterler kararıp canlılığını yitirir ve embriyo oluşumu olumsuz etkilenir.

Anagnostakis (1974), tütünde yaptığı anter kültürü çalışmasında besin ortamına % 1 oranında aktif kömür katıldığında haploid embriyo oluşum oranının % 15'ten % 48'e yükseldiğini rapor etmektedir.

Kösali (2000), elmada aktif kömürün androgenesis üzerine etkilerini belirlemek üzere yaptığı çalışmasında, aktif kömürün % 0.1, % 0.15, % 0.3 lük konsantrasyonları ile yaptığı çalışmanın sonucunda elde edilen 2 embriyoidden birinin aktif kömürsüz ortamda, diğerinin de % 0.1 dozunda elde edildiği, bununla birlikte % 0.3 gibi nispeten daha yüksek dozda ise embriyoid oluşmadığı ve kallus oluşturan anter oranının düşük olduğunu açıklamaktadır.

Morrison ve ark. (1986), biberde yaptıkları anter kültürü çalışmasında % 2 oranında aktif kömür katılan çift fazlı ortamda çok yüksek embriyo oluşum oranı elde etmişlerdir. Powell ve Uhrig (1987), hem anter duvarındaki engelleyici maddelerin aktif kömür tarafından absorbe edildiği, hem de serbest hale geçen mikrosporların sıvı ortamda rahatlıkla embriyoya dönüşebildiklerini ileri sürmektedirler.

Vagera ve Havranek (1985), biber anterlerini farklı ortamlarda kültüre aldıkları çalışmada, ortamlara katılan % 1 aktif kömürün embriyo oranını artırdığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ortamdaki aktif kömürün, kültürdeki canlılığı uzun süre koruduğunu ve bu ortamlarda aylar sonra bile yeni embriyoların oluşmasını sağladığını bildirmişlerdir.

Chunling (1992), aktif kömür katkılı MS ortamında kültüre alınan biber anterlerinde % 20.21 oranında embriyo oluşumu sağlandığını, embriyolardan tam bitki oluşum oranını ise % 48.15 olarak belirlediğini bildirmektedir.

Alremi ve ark. (2014), MS besin ortamına % 0.25 oranında ilave edilen aktif kömürün, embriyo oluşumunu genotipe bağlı olarak artırıcı yönde bir etki yaptığı bildirmektedirler.

2.5.5. Vitaminler

Vitaminler enzim reaksiyonlarında katalitik rol oynarlar. Hücre kültürlerinde en önemli en önemli vitamin thiamine (B₁)'dir. Nikotinik asit (B₃, niasin) ve pyridoxine (B₆) hücre kültürü çalışmalarında kullanılan diğer önemli vitaminlerdir. Myo-inositol ve d-biotin (H)'de hücre kültüründe öncelikli vitaminler içerisinde değerlendirilmektedir. Bunların dışında d-pantotenik asit (B₅), askorbik asit (C), α -tokoferol (E), folik asit (M), retinol (A), riboflamin (B₂) ve kolekalsiferol (D₃) vitaminleri zaman zaman özel uygulamalarda besin ortamlarına ilave edilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000; Smith, 2013)

2.6. Anter Kültürü Çalışmalarında Kültür Koşulları

Anter kültürü çalışmalarında çoğu anterler besin ortamına alındıktan sonra kültürün ilk günlerinde 25±5 °C aralığında tutulduğu görülmektedir. Anter kültüründe inkübasyon süresi genellikle 7-8 gün uygulanmaktadır. Daha sonraki günlerde farklı günlük ışıklanma sürelerinde bekletilen anterler embriyo oluşturduktan sonra, rejenere olan bitkicikler daha yüksek (3000-10000 lux) ışık yoğunluğuna sahip ortamlara aktarılmaktadır.

Tütün gibi anter kültürüne son derece olumlu yanıt veren bitkilerde 24-28 °C sıcaklıkta ve fotoperiyodik bir düzende aydınlatılan bir iklim dolabında yapılan inkübasyon yeterli olurken; patlıcan, biber, lahana grubu sebzelerde kültürün ilk günlerinde yüksek sıcaklık şoklarına gereksinim duyulabilmektedir.

Karakullukçu ve Abak (1992), anterlere kültür öncesi veya kültüre alındıktan sonraki ilk günlerde uygulanan 25, 30 ve 35 °C gibi yüksek sıcaklık şoklarının da anter kültüründe elde edilecek başarıyı etkileyen faktörler arasında olduğunu ve çalışma sonucunda kullanılan tüm çeşitlerde sıcaklık derecesi ve süresi arttıkça anterlerin şişkinleşme oranının da arttığını saptamışlardır.

Biberde anter kültürü çalışmalarında kültür koşulları olarak adlandırılan, fotoperyot, ışık intensitesi ve ortam sıcaklığı konusunda standart bir uygulama önerilmemektedir. Ayrıca bu koşulların anter kültüründe başarı üzerine etkileri ile ilgili detaylı bir çalışma da yapılmamıştır. Anter kültürü üzerinde çalışan araştırmacılar kendilerine göre en uygun buldukları koşulları kullanmaktadırlar. Bu durumda da farklı koşullar karşımıza çıkmaktadır. Nitekim biberde anter kültürü üzerinde çalışmalar yürüten araştırmacılar Barroso ve ark. (2015), ışık intensitesini $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, Özkum ve Tıpırdamaz (2010), $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ve Supena ve ark. (2006), ise 25°C sıcaklık 12 saat ışıklandırma süresi ve $25\text{--}30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ışık intensitesini kullanmışlardır. Benzer çalışmalar yürüten araştırmacılar Ercan ve ark. (2006), kültür ortamında 25°C sıcaklık, 16/8 saat karanlık-aydınlık ve 3000 lux-ışık intensitesini, Büyükalaca ve ark. (2004), anterleri 2 gün boyunca karanlıkta 35°C 'de beklettikten sonra 28°C sıcaklık, 16/8 saat gündüz/gece ve $15 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ışık intensitesini, Rodeva ve ark. (2013), $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, 4000 lux ışık intensitesi ve 16/8 saat gündüz/gece fotoperyot koşullarını, Shrestha ve Kang (2009) ise kültür koşullarında 25°C sıcaklık, 16 saat fotoperyot ve $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ışık intensitesini tercih etmişlerdir. Zhou ve ark. (2008), zencefil bitkisinde yaptıkları anter kültürü çalışmasında ışık intensitesini $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 'den $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 'ye yükselttiklerinde bitkicik oluşumunun da arttığını, ancak ışık intensitesini $180 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 'ye yükselttiklerinde bitkicik oluşumunun engellendiğini belirtmektedirler. Yürütülen çalışmalara bakıldığında inkübasyon uygulamasından sonraki kültür koşullarında özellikle ışık intensitesi konusunda kesinleşmiş bir uygulamaya rastlanmamaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

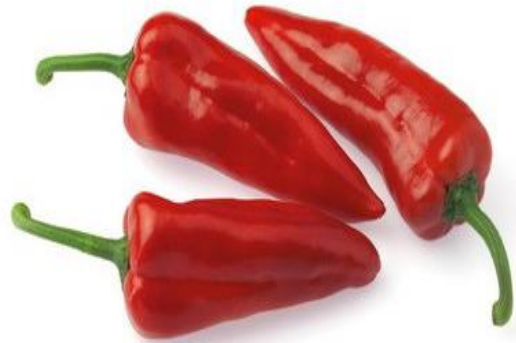
3.1. Materyal

Bu çalışma 2014-2016 yılları arasında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama alanında ve Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Genotipler ve Özellikleri

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak Belissa F₁ (Kapy), Şölen F₁ (Tatlı sivri), Bafra F₁ (Acı sivri), Ergenekon F₁ (Dolmalık) ve İstek F₁ (Üç burun) biber çeşitleri ve bu çeşitlerin F₂ popülasyonları kullanılmıştır. Denemede kullanılan genotiplerden Belissa F₁ Antalya'da diğer F₁ genotipler ise Tokat'ta tarafımızca kendilenerek F₂ bitkiler elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan genotiplerin bitkisel özellikleri aşağıda verilmiştir.

Belissa F₁: Uzun, güçlü bitkilere ve kapy tip meyve yapısına sahip olup, yüksek soğuk performansı ve yüksek meyve tutumu vardır. Meyveler uzun, düz ve kırmızı renkte olup, yeşil ve kırmızı meyve hasatına uygundur. Erkençi ve yüksek verimlidir. Çatlamaya ve çiçek burnu çürüklüğüne yüksek toleranslıdır. Her dönemde yüksek meyve kalitesi ve uzun raf ömrüne sahiptir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Belissa F₁ biber bitkisi ve meyvesi

Şölen F1: Güçlü bitki ve kök yapısına sahiptir. Parlak renkli, tatlı sivri tip meyve yapısına sahip olup, yüksek adaptasyon yeteneği vardır. Yan dal meyve tutumu yüksek, verimli, uzun meyveli, aromatik, lezzetli ve raf ömrü uzundur (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Şölen F1 biber bitkisi ve meyvesi

Ergenekon F1: Bitki yapısı ve kök yapısı çok güçlü, adaptasyon yeteneği oldukça yüksek bir çeşittir. Meyve bağlama oranı ve yan dal meyve tutum oranı yüksektir. Dolma tip meyve yapısına sahip, meyve şekli homojen, dört loplu şekle sahiptir. Meyve eti orta derecede kalınlığa sahiptir. Meyveler koyu yeşil ve parlak bir yapısı görünümündedir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Ergenekon F1 biber bitkisi ve meyvesi

Bafra F1: Güçlü bitki yapısına sahiptir. Çok erkenci ve yüksek verimlidir. Sıcağa ve kuraklığa dayanıklıdır. Acı, parlak koyu yeşil ve kaliteli acı sivri tip meyve yapısına sahiptir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Bafra F1 biber bitkisi ve meyvesi

İstek F1: Güçlü bitki yapısına sahiptir. Çok erkenci ve yüksek verimlidir. Meyve yapısı uzun dolma biber yapısına sahip olup meyve rengi yeşil, meyve eti incedir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. İstek F1 biber bitkisi ve meyvesi

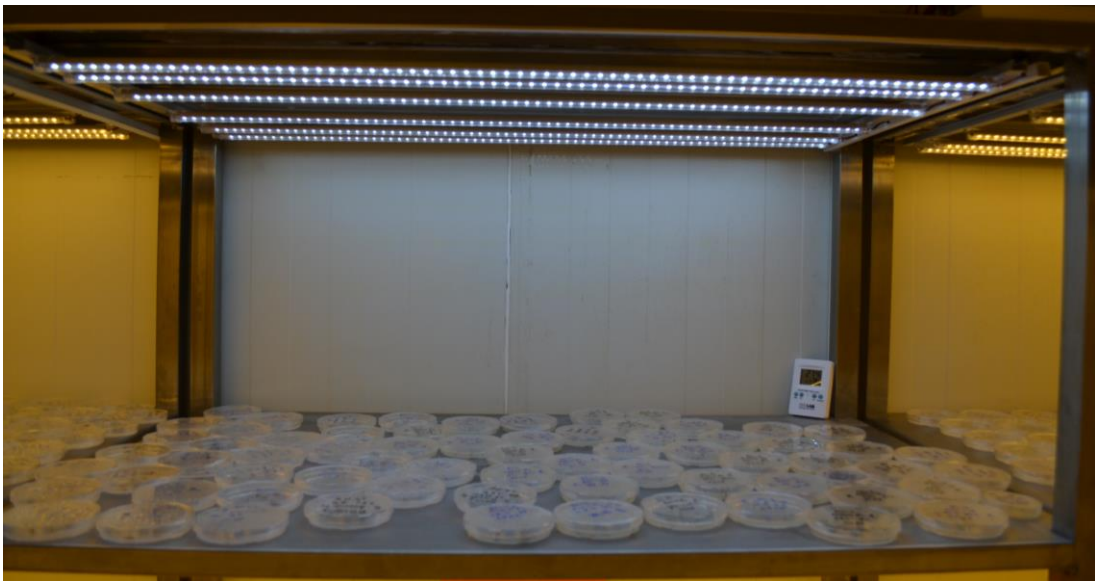
3.1.2. Kültür Aşamasında Kullanılan Ekipmanlar

Doku kültürü laboratuvarı: Dezenfeksiyon, stres ve inkübasyon uygulamaları, ortam hazırlama ve anterlerin kültüre alınması ve regenerasyon gibi alımalar Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (ekil 3.6.)



Şekil 3.6. Doku kültürü laboratuvarının genel görünümü

Büyütme odası: Anterlerin inkübasyon evrelerini tamamlamalarından dış koşullara alıtırılınca kadarki dönemi geçirmeleri için sıcaklık, ışık ve nem kontrollü büyütme odası kullanılmıştır. Büyütme odasında krom nikel malzemeden imal edilmiş raflar bulunmaktadır. Bu rafların aydınlatılması LED lambalarla yapılmaktadır (ekil 3.7).



Şekil 3.7. Büyütme odası raflarının görünümü

Flow kabin: Steril ortam çalışmalarının yürütülmesi için Telstar Bio II A marka vertikal flow kabin kullanılmıştır (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Flow kabinin görünümü

Büyütme dolabı (growth chamber): Anterleri 9 °C’de bekletmede sıcaklık, nem ve ışık kontrolünü sağlayan, 600 litre hacimli Nüve Test Kabini kullanılmıştır (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Büyütme dolabı (growth chamber) görünümü

Otoklav: Çalışma sırasında kullanılan malzemelerin (Besiyeri, erlenmayer, tüp, pens, büstüri vs.) dezenfeksiyonunda nemli hava (basınçla) sterilizasyonu sağlayan ALP CL-3258 L marka 54 lt kapasiteli otoklav kullanılmıştır (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Otoklavın görünümü

İnkübatör: Anterleri 35 °C'de karanlık koşullarda bekletmede Memmert 'TPP 400' inkübatör kullanılmıştır (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. İnkübatörün görünümü

Mikroskop, ısıtmalı manyetik karıştırıcı ve pH metre: Anter boyama işlemi için mikroskop, besin ortamları hazırlarken gerekli kimyasal maddelerin belirli bir sıcaklık ve devirde manyetik alan etkisiyle karıştırılmasını sağlayan karıştırıcı cihaz ve ortamların pH'sını ayarlamak için pH metre kullanılmıştır (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. Mikroskop, ısıtmalı manyetik karıştırıcı ve pH metrenin görünümü

Petri: Anter dikiminde tek kullanımlık 6cmlik steril plastik petriler kullanılmıştır (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. Tek kullanımlık steril petri kaplarının görünümü

Tül sera ve özellikleri: Donör bitkilerin yetiştirilmesi, daha sonrasında elde edilen haploid bitkilerin dış koşullara alıştırılması ve büyütülmesi, kolhisin uygulamaları, kromozom katlaması yapılan bitkilerin büyütülmesi, kendilenmesi ve tohum hasadı 400 m² yüzey alana sahip topraksız yetiştiriciliğe uygun tül serada yapılmıştır. Örtü materyali olarak 50 mesh böcek tülü kullanılmıştır. Ayrıca çatı kısmında böcek tülünün üzerine % 30 gölge etkisine sahip yeşil gölge tülü örtülmüştür (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Tül seranın dış ve iç görünümü

Polikarbon sera: Denemede elde edilen dihaploid hatların morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde polikarbon örtülü sera kullanılmıştır. Yanları polikarbon, çatı PE plastik ile örtülü, gölgeleme, havalandırma, hava sirkülasyonu gibi kısmi otomasyona sahiptir. Gübreleme ve sulama sistemi otomasyonla kontrol edilmektedir. (3.15.).



Şekil 3.15. Yarı otomatik polikarbon seranın görünümü

3.2. Yöntem

3.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi

Donör bitkilerin tohumları 14 Nisan 2014 tarihinde steril torf ortamına ekilmiştir. Fideler 19 Mayıs 2014 tarihinde 100*10*15cm ebatlarında 4 gözlü hazır hindistan cevizi lifi bloklarına her torbada dört bitki olacak şekilde dikilmişlerdir. Her genotip için 2 torba kullanılmıştır. Donör bitkiler tül serada yetiştirilmiştir (Şekil 3.16.).



Şekil 3.16. Donör bitkilerin yetiştirilmesinin görünümü

Bitkilerin sulanması ve gübrelenmesi fertigasyon yöntemine göre yapılmıştır. Deneme süresince modifiye edilmiş Hoagland besin çözeltisi solüsyonu kullanılmıştır (Hoagland ve Arnon 1950). Hoagland besin çözeltisinin içeriği Çizelge.3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.Hoagland besin çözeltisi içeriği

Gübre Kaynağı	mg l
Amonyum nitrat	210
MAP-Fosforik asit	31
Potasyum nitrat ve Potasyum Sülfat	234
Magnezyum nitrat ve Magnezyum sülfat	48
Kalsiyum nitrat	200
Sülfatlı gübrelerden gelen kükürt	64
Fe-EDTA	2,5
Mangan sülfat	0,5
Borik asit	0,5
Bakır sülfat	0,02
Çinko sülfat	0.05
Amonyum molibdat	0,01

Bitkiler düzenli şekilde budanarak vegetatif-generatif denge sağlanmış ve düzenli şekilde yeni çiçek tomurcuğu oluşumu teşvik edilmiştir (Şekil 3.17.). Donör bitkilerde stres oluşumunu önlemek maksadıyla hastalık ve zararlılara karşı mümkün olduğunca ilaçlı mücadeleden kaçınılmış, sarı ve mavi yapışkan tuzakların ve böcek tülü kullanılması, oransal nemin düzenli kontrol edilmesi gibi kültürel tedbirler uygulanmıştır. Fide dikiminden sonra bitkilerde dallanma noktasına kadar budama yapılmış, oluşan tomurcuklar kopartılmıştır.



Şekil 3.17. Bitkilerde budama ve çiçek tomurcuğu hasadının görünümü

3.2.2. Mikrospor Gelişim Aşamalarının Belirlenmesi

Genotipler arasında farklılıkların olma ihtimaline karşı anterlerin gelişme aşamalarını belirleyebilmek amacıyla, tomurcuklar önce kendi aralarında morfolojik özelliklerine göre gruplandırılmıştır (Şekil 3.18.).



Şekil 3.18. Biber tomurcuklarının ve ait oldukları anterlerin gelişme aşamaları

Morfolojik olarak belirlenen gruplardan alınan anterlerde mikrospor gelişim aşamalarının kontrol edilmesi için ezme preparat hazırlanarak hızlı ve pratik boyama yöntemi olan asetokarmin boyama yöntemi kullanılmıştır. Elçi (1982)'ye göre hazırlanan preparat için; 55 ml saf su içerisine 45 ml glasiyel asetik asit ilave edilerek kaynatılmış ve sonra bu karışıma 1g karmin eklenmiş ve filtre edilerek boya hazırlanmıştır. İlk önce anterler bir lam üzerine konarak pens yardımıyla mikrosporlar serbest hale getirilmiş ve % 1'lik asetokarminden bir damla asetokarmin boya damlatılarak karıştırılmıştır. Daha sonra lamel kapatıldıktan sonra preparatın üzerine bir kurutma kağıdı konarak bastırılmış ve hafif ezilmeleri sağlandıktan sonra 3-4 kez kaynatılmadan ispirto ocağında ısıtılmıştır. Boyama işleminden sonra Nikon Eclipse E600 40x100 büyütme mikroskop kullanılarak gelişim evreleri belirlenmiştir (Şekil 3.19.).



Şekil 3.19. Mikrosporlarda boyama aşamasından görünüm

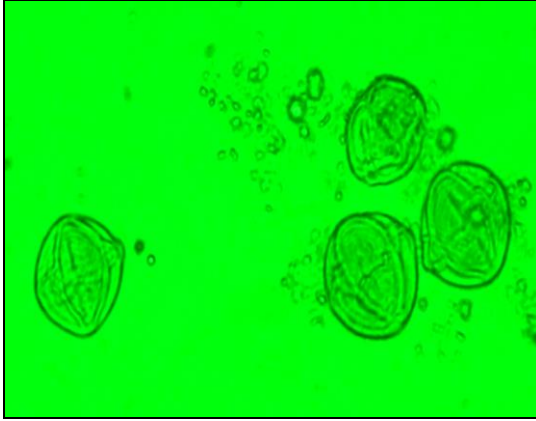
Uygun anter ve mikrospor evresini belirlemek için tomurcuk büyüklüğü, anter renklenmesi ve mikrospor çekirdek bölünme aşamaları birlikte değerlendirilmiştir. Şekil 3.20'de uygun tomurcuk büyüklüğü, anter renklenmesi ve çekirdek bölünme aşamaları incelendiğinde en uygun aşamanın B2 numaralı aşama olduğu kanaatine varılmış ve bu aşamadaki anterler kültüre alınmıştır.



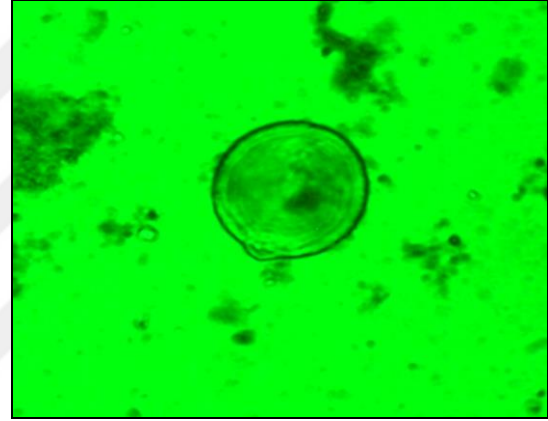
A



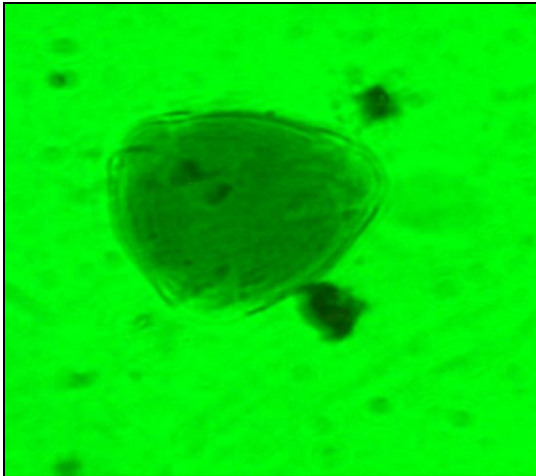
B



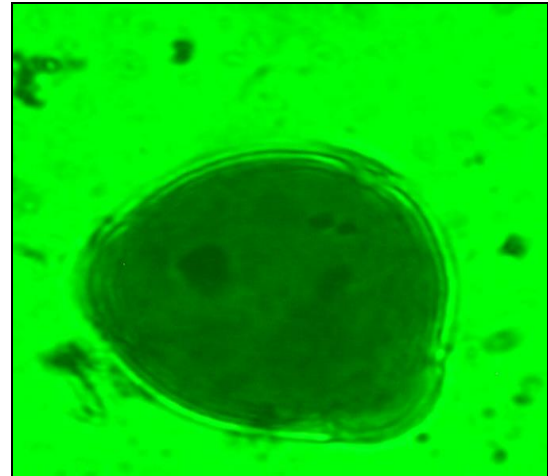
B1



B2



B3



B4

Şekil 3.20. A) Bitki üzerinde çiçek tomurcuklarının görünümü B) Farklı büyüklükte gruplandırılmış biber tomurcukları ve anterleri B1) 2.0-4.0 mm iriliğinde tomurcuklardan alınan anterlerde mikrospor hücresi B2) 4.0- 5.0 mm arasındaki tomurcuklarda mikrospor hücresi B3) 5.0-7.0 mm arasındaki tomurcuklarda mikrospor hücresi B4) 7.0-9.0 mm arasındaki tomurcuklarda mikrospor hücresi

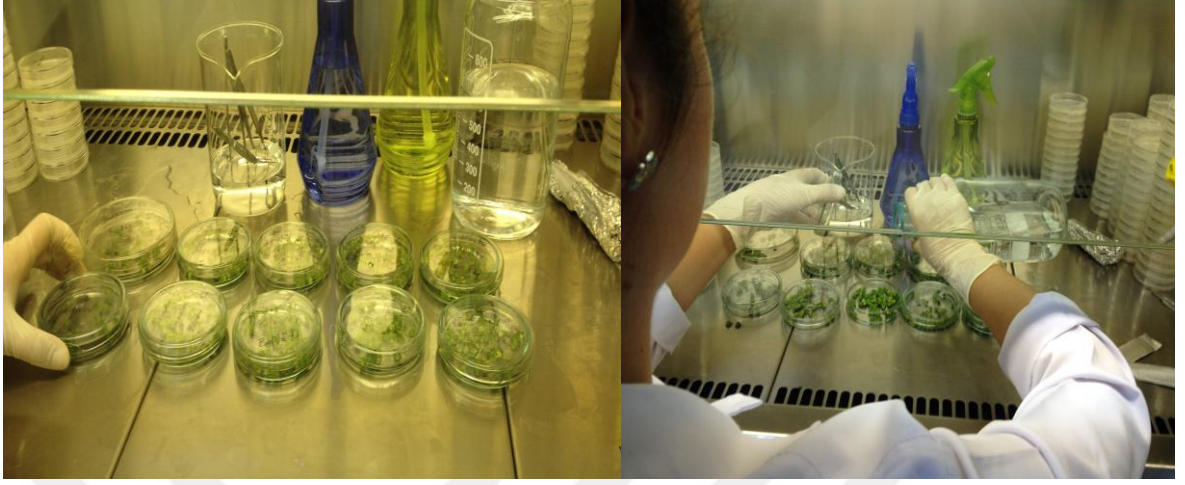
Daha önce yapılan çalışmalarda biber çiçek tomurcuklarında, çanak yaprak ve taç yaprak boylarının eşit olduğu veya taç yaprakların çanak yapraklardan biraz daha uzun olduğu, anterlerin yaklaşık yarı boyuna kadar antosiyan oluşumunun görüldüğü gelişme aşamasında mikrosporların I. mitoz aşamasında olduğu ve bu devre tek çekirdekli mikrospor gelişmesinin son evresi ile birinci polen mitozunun başlangıç evresini kapsadığı belirtilmektedir (Reinert ve Bajaj, 1977; Karakullukçu, 1991; Karakullukçu ve Abak, 1992; Chunling, 1992; Çömlekçioğlu ve ark., 1999, 2001; Büyükalaca ve ark., 2004; Taşkın ve ark., 2011, Ata, 2011). Literatür bilgileri de dikkate alınarak tomurcuklar korolla yapraklarının kaliksten hafifçe uzun oldukları dönemde hasat edilmiştir. Anterlerin yeşilden menekşe rengine dönüşmeye başladığı evre (yaklaşık %25'lik kısmı menekşe rengi oluşturmuş evre) anter hasadı için baz alınmıştır. Bu aşamada sitolojik çalışmamızda da teyit edilmiştir. Haziran ayının ortalarından itibaren çiçeklenmeye başlayan bitkilerden anter kültürü için I. mitoz bölünmenin başladığı, yani mikrosporların tek çekirdekli aşamanın sonunda veya iki çekirdekli aşamanın başında olduğu uygun safhadaki çiçek tomurcukları her gün sabah saat 07:00-09:00 saatleri arasında toplanmıştır.

3.2.3. Çiçek Tomurcuklarına Stres Uygulanması

Anter kültürü için uygun aşamaya gelen çiçek tomurcukları sabah erken saatlerde toplanmış ve zaman kaybetmeden +4 °C sıcaklığa ayarlanmış buzdolabına aktarılmıştır. Buzdolabında karanlık koşullarda 24 ve 48 saat bekletilen tomurcuklar dezenfeksiyon için steril ortama aktarılmış ve zaman kaybetmeden yüzey sterilizasyonuna başlanmıştır.

3.2.4. Çiçek Tomurcuklarının Sterilizasyonu

Polen embriyogenesi için en uygun mikrospor gelişme dönemine sahip olan anterleri içeren çiçek tomurcukları; yaklaşık 1 dakika çeşme suyundan geçirildikten sonra % 70'lik alkolde 1 dakika bekletilerek birkaç damla Tween-20 eklenmiş %20'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 15 dakika süreyle bekletilmiştir. Dezenfektan sık aralıklarla çalkalanmıştır. Çiçek tomurcukları steril kabin içinde dezenfektandan çıkarılarak steril saf suda 5 dakika bekletilmiştir. Burada 3 kez 5'er dakika steril saf su ile durulanan tomurcukların sterilizasyonu tamamlanmıştır (Şekil 3.21.).



Şekil 3.21. Çiçek tomurcuklarının flow kabinde sterilizasyonu

3.2.5. Ortam ve Ekipman Sterilizasyonu

Ortam sterilizasyonu için donör bitkilerin yetiştirildiği tül serada girişlerde el dezenfektanı ve formaldehitli paspas kullanılarak seraya eller ve ayaklar ile girebilecek mikroorganizmalara karşı önlem alınmıştır. Flow kabinde çalışmaya başlamadan önce UV (Ultraviyole) ışığı çalıştırılarak kabin 30 dakika boyunca steril edilmiştir. Ayrıca flow kabinin bulunduğu oda anter dikimine başlamadan önce 20 dakika süreyle odasının tavanında bulunan UV lamba ile sterilize edilmiştir. Laboratuarda çalışıldığı sürelerde zemin çamaşır suyu ile sık sık temizlenmiş, galoş, eldiven ve steril terlik giyilerek laboratuvar alanında aseptik koşullar sağlanmıştır. Besin ortamları 15 dakika süreyle 121°C’de 1.1 atm basınç altında otoklavda sterilize edilmiştir. Besin ortamlarının ağızları kapaklı şişe içerisinde otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Çalışma sırasında izolasyon ve dikim aletleri (pens, bistüri, kurutma kağıdı, cam petri, beher... gibi) sık sık önce %96’lık etil alkole batırılarak ve hemen ardından Bunsenbeki alevine tutularak sterilize edilmiştir. Ayrıca dikim işlemi sırasında da steril kabin içerisine sık sık %70’lik etil alkol spreyleneştir (Şekil 3.22.)



Şekil 3.22. Flow kabinde sterilizasyon aşamasından bir görünüm

3.2.6. Besin Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanması

Çalışmada 2 farklı temel besin ortamı kullanılmıştır. Bunlar;

1.DDV Ortamı: Dumas de Vaulx ve ark. (1981), tarafından önerilen protokolün modifiye edilmiş şekli DDV olarak bilinen besin ortamı kullanılmıştır. C ortamında vitamin B₁₂'nin 3 farklı dozu (Kontrol, 0.03 mg l⁻¹, 0.05 mg l⁻¹) uygulanmıştır. DDV ortamının kimyasal bileşimi Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

2.Çift Faz Ortam: Dolcet- Sanjuan ve ark. (1997), tarafından önerilen çift fazlı (çift kat ortam, Double Layer, DL) ortamdır. Birinci kat katı ortam Nitsch ortamına (Nitsch and Nitsch, 1969) 20 g l⁻¹ maltoz ilave edilmiştir. Çift fazlı ortamda 3 farklı aktif kömür dozu (Kontrol, % 0.10, % 0.20) ilave edilmiştir. Çift fazlı ortamın katı kısmına katılaştırıcı agar kullanılmıştır. Çift fazlı ortamın kimyasal bileşimi Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Denemede kullanılan DDV ortamının modifiye edilmiş şeklinin protokolü (Dumas de Vaulx ve ark., 1981)

Kimyasal Maddeler	Kimyasalın Kaynağı	C Ortamı (mg l)	R Ortamı (mg l)	V Ortamı (mg l)
Makro elementler				
KNO ₃	Merck	2150	2150	1900
NH ₄ NO ₃	Merck	1238	1238	1650
MgSO ₄ , 7H ₂ O	Merck	412	412	370
CaCl ₂ , 2H ₂ O	Merck	313	313	440
KH ₂ PO ₄	Merck	142	142	170
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	Merck	50	50	0
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	Merck	38	38	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck	34	34	0
KCl	Merck	7	7	0
Mikro elementler				
MnSO ₄ , H ₂ O	Merck	22,13	22,13	22,13
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	Merck	3,625	3,625	3,625
H ₃ BO ₃	Merck	3,150	3,150	3,150
KI	Merck	0,695	0,695	0,695
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	Merck	0,188	0,188	0,188
CuSO ₄ , 5H ₂ O	Prolabo	0,016	0,016	0,016
CoCl ₂ , 6H ₂ O	Prolabo	0,016	0,016	0,016
Fe-EDTA				
Na ₂ EDTA	Sigma	18,65	18,65	37,30
FeSO ₄ , 7H ₂ O	Prolabo	13,90	13,90	27,80
Vitaminler ve Aminoasitler				
Pyridoxin HCL	Sigma	5,500	5,500	1,0
Nicotinic acid	Sigma	0,700	0,700	1,0
Thiamine HCL	Sigma	0,600	0,600	1,0
Calcium panthotenate		0,500	0,500	1,0
Glycin	Sigma	0,100	0,100	0,1
Biotine	Sigma	0,005	0,005	0,01
Mio-inositol	Sigma	50,300	50,300	100
Vitamin B ₁₂	Sigma	*		
Karbonhidratlar				
Sucrose	Merck	30000	30000	30000
Büyüme düzenleyiciler				
Kinetin	Merck	0,01	0,1	
2,4-D	Merck	0,01		
İlaveler				
Bacto-agar	Merck	8000		
Agar-agar	Merck		8000	8000
pH		5,9	5,9	5,9

*: Vitamin B₁₂ dozları yöntemde belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Denemede kullanılan çift fazlı ortam protokolü (Dolcet- Sanjuan ve ark., 1997)

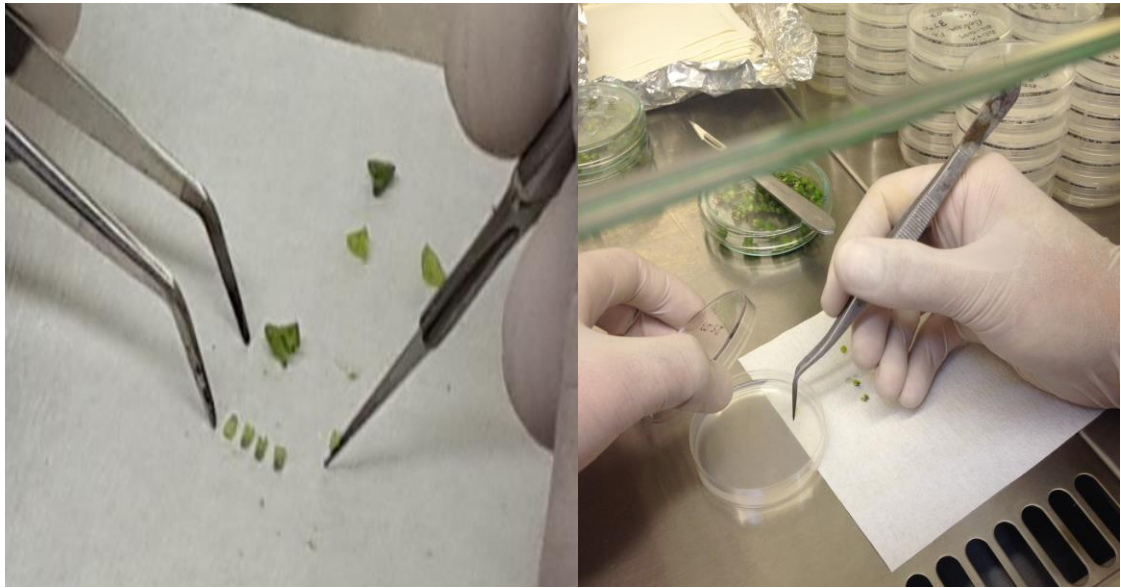
Kimyasal Maddeler	Kimyasalın Kaynağı	C Ortamı Katı (mg l)	C Ortamı Sıvı (mg l)	R Ortamı (mg l)	V Ortamı (mg l)
Makro elementler					
KNO ₃	Merck	950	950	950	1900
NH ₄ NO ₃	Merck	720	720	825	1650
MgSO ₄ , 7H ₂ O	Merck	285	285	285	370
CaCl ₂ , 2H ₂ O	Merck	219,9	219,9	220	440
KH ₂ PO ₄	Merck	68	68	85	170
Mikro elementler					
MnSO ₄ , H ₂ O	Merck	25	25	11,15	22,3
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	Merck	10	10	4,3	8,6
H ₃ BO ₃	Merck	10	10	3,1	6,2
KI	Merck	0	0	0,415	0,83
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	Merck	0,250	0,250	0,125	0,250
CuSO ₄ , 5H ₂ O	Prolab	0,025	0,025	0,0125	0,025
CoCl ₂ , 6H ₂ O	Merck	0,025	0,025	0,0125	0,025
Demir Şelatlar					
Na ₂ EDTA	Sigma	37,26	37,26	18,63	37,26
FeSO ₄ , 7H ₂ O	Prolab.	27,8	27,8	13,9	27,8
Vitaminler ve amino asitler					
Folic Acid	Duchefa	0,5	0,5	0	0
Pyridoxin HCL	Sigma	0,5	0,5	0,25	5,5
Nicotinic Acid	Sigma	5	5	0,25	0,7
Thiamine HCL	Sigma	0,5	0,5	0,1	0,6
Calcium panthotenate	Merck	0	0	0	0,5
Glycin	Sigma	2	2	1	0
Biotine	Sigma	0.05	0.05	0	0,005
Mio-inositol	Sigma	100	100	50	50
Büyümeyi Düzenleyiciler					
IAA	Sigma	0	0,88	0	0
BAP	Sigma	0	0	0,022	0
Zeatin	Sigma	0	0,55	0	0
Karbonhidratlar					
Sucrose	Merck	0	0	20000	45000
Maltos	Sigma	20000	20000	0	0
İlaveler					
Activated Charcoal	Duchefa	*			
Plant Agar	Duchefa	6000	0	6000	0
Agar-agar	Merck	0	0	0	8000
pH		5,8	5,8	5,8	5,9

*: Katı ortama ilave edilecek aktif kömür miktarları yöntem içinde belirtilmiştir.

Çalışmanın tümünde besin ortamlarının pH seviyeleri otoklavlanmadan önce ayarlanmış, ardından ortamlar 15 dakika süreyle 121°C’de 1.1 atm basınç altında otoklavda sterilize edilmiştir. Ağızları alüminyum folyo ile kapatılmış erlenmayerler içerisinde otoklavlanan besin ortamları, sterilizasyon işleminden sonra kabin içerisinde aseptik koşullarda, her petri kabına 10 ml besin ortamı düşecek şekilde pipet yardımı ile doldurulmuştur. Çift fazlı ortam doldurulurken katı ortam 7 ml sıvı ortam 3 ml olacak şekilde 10 ml besin ortamı petrilere doldurulmuştur.

3.2.7. Anterlerin Çıkartılması ve Besin Ortamlarına Ekilmesi

Anterler, çiçek tomurcukları içerisinde steril bistüri ve kıvrık uçlu bir pens yardımıyla çıkarılmıştır. Anterler tomurcuktan çıkarıldıktan sonra bekletilmeden besin ortamı üzerine, dorsal yüzeyi ortamla temas edecek biçimde ve ortama batırılmaksızın yerleştirilmiştir. Anter dikiminde tek kullanımlık 6 cm’lik steril plastik petri’ler kullanılmıştır ve her petriye 6 anter gelecek şekilde dikim yapılmıştır. Her uygulama için 5 petri ve toplamda 30 anter atılmıştır. Böylece her genotip için 1080 anter kullanılmıştır. Dikim işlemi tamamlandıktan sonra petri kutularının kenarları ince plastik streç film şeritlerle kapatılarak dış atmosferle ilişkileri kesilmiştir (Şekil 3.23.).



Şekil 3.23. Anterlerin çiçek tomurcuklarından çıkarılması ve besin ortamına ekimi

3.2.8. Çimlendirme Çalışmaları

Çalışmada 3 farklı ön uygulama ve 2 farklı inkübasyon uygulaması yapılmıştır. Bunlar;

1. Çiçek tomurcukları dezenfekte edildikten sonra anterler bekletilmeden C ortamına aktarılmış, sonra anterler 9 °C’de karanlık ortamda 8 gün inkübasyona tabi tutulmuştur.

2. Çiçek tomurcukları dezenfekte edildikten sonra anterler bekletilmeden C ortamına aktarılmış, sonra anterler 35 °C’de karanlık ortamda 8 gün inkübasyona tabi tutulmuştur.

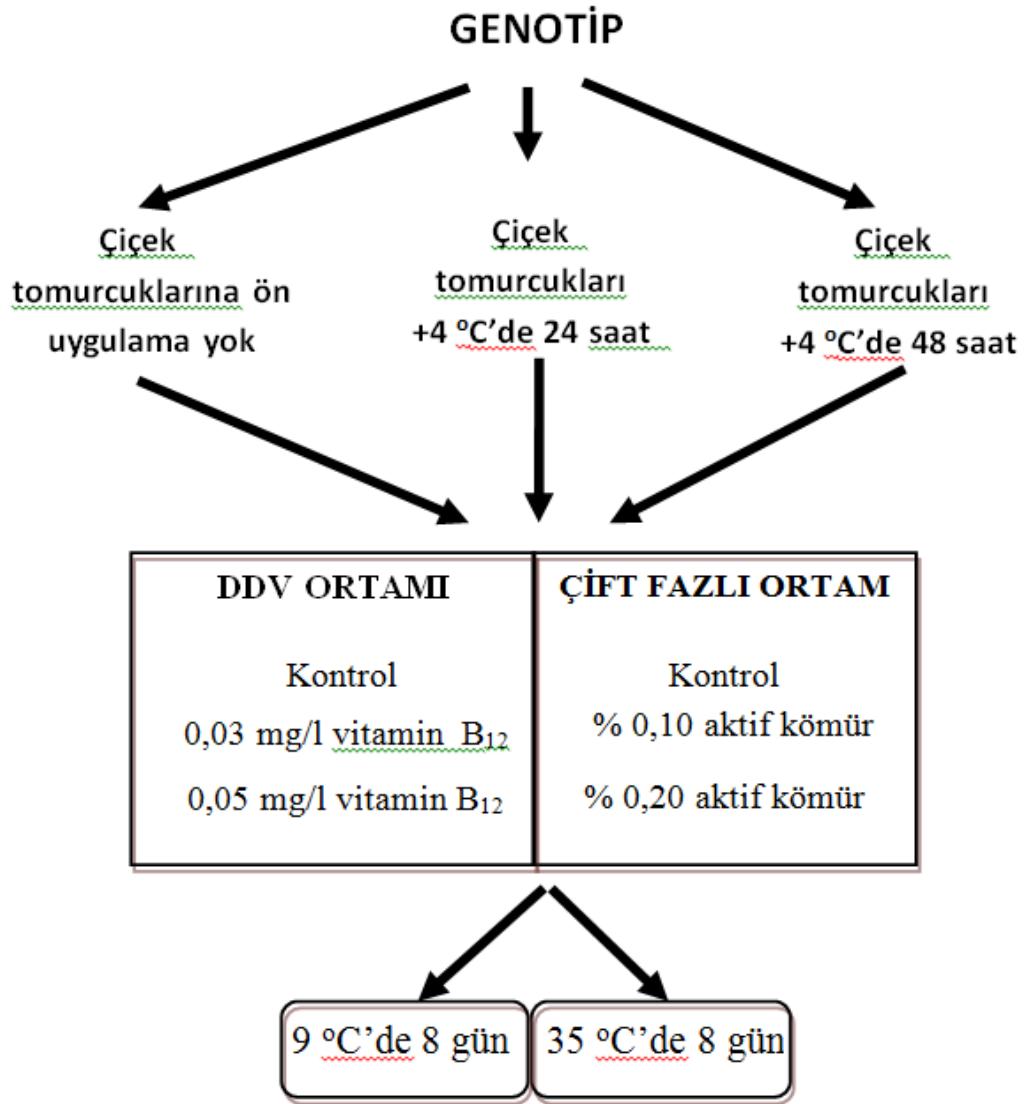
3. Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 24 saat (1gün) 4 °C’de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra anterler 9 °C’de karanlık ortamda 8 gün inkübasyona tabi tutulmuştur.

4. Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 24 saat (1gün) 4 °C’de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra, anterler 35 °C’de karanlık ortamda 8 gün inkübasyona tabi tutulmuştur.

5. Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 48 saat (2gün) 4 °C’de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra anterler 9 °C’de karanlık ortamda 8 gün inkübasyona tabi tutulmuştur.

6. Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 48 saat (2gün) 4 °C’de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra, anterler 35 °C’de karanlık ortamda 8 gün inkübasyona tabi tutulmuştur (Şekil 3.24.).

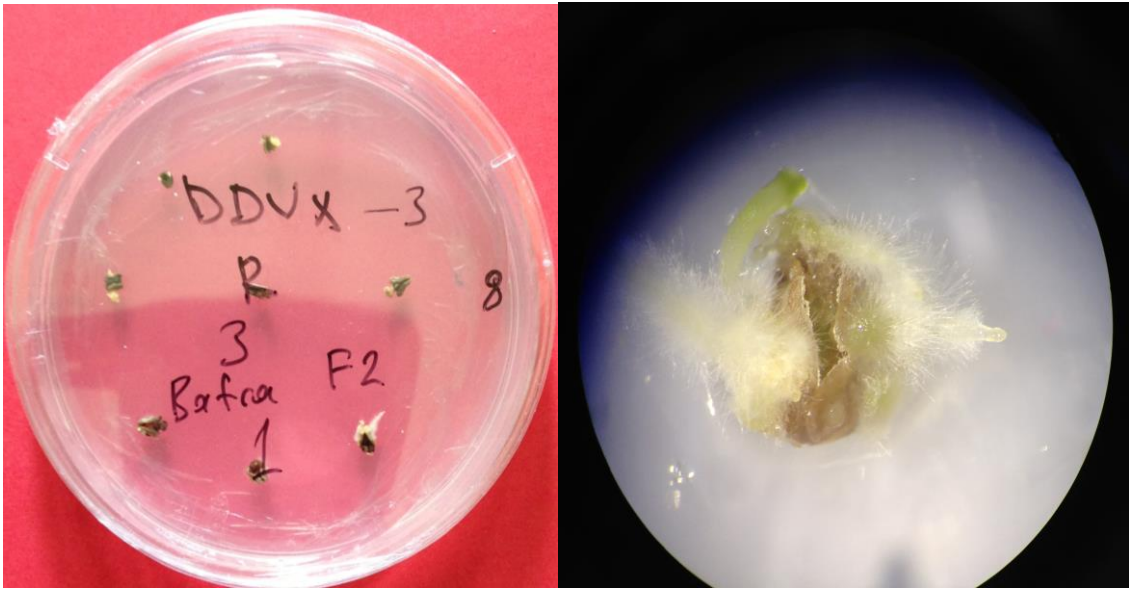
Anterler besin ortamına yerleştirildikten sonra 9 °C’de 8 gün ve 35 °C’de 8 gün karanlık koşullarda bekletilmiş ve daha sonra petriyer iklimlendirme odasına aktarılmıştır. Anterler iklim odasında 25 ±2 °C sıcaklık, 16 saat 3000 lux ışık intensitesi ve 8 saat karanlık koşullarda gelişmeye bırakılmıştır.



Şekil 3.24. Çalışmada kullanılan bütün uygulamaların şematik görünümü

İklimlendirme odasında 4 gün bekleyen anterler içinde R ortamı bulunan 9 cm'lik steril petrilere aktarılmıştır. Her 4 haftada bir anterler yeni bir R ortamına aktarılmıştır. R ortamında yaklaşık 5-6 hafta sonra anterlerin yüzeyinde embriyoidler görülmüştür (Şekil 3.25.). Anterler üzerinde embriyoidler görülünce bu embriyoidler bistüri yardımıyla steril koşullarda izole edilerek V ortamına aktarılmıştır. Steril petri kaplarına 10 ml çimlendirme ortamı konulmuş ve izole edilen bu embriyoidler ortama transfer edilmiştir. Embriyoidlerin yerleştirildiği petri kapları kontaminasyonları önlemek için streç film ile kapatılıp 12 saatlik fotoperiyoda sahip 3000 lux ışık intensitesinde ve 25

± 2 °C sıcaklık olan iklim koşullarında gelişmeye bırakılmıştır. Çimlendirme ortamında 8-10 gün kaldıktan sonra yaprak oluşumları başlayan bitkicikler, 25 mm çapında 100 mm uzunluğundaki cam tüplere 15 ml V ortamı dökülerek ortama dikilen bitkicikler sekonder kökleri gelişip 3-4 yapraklı evreye ulaşınca (alıştırma büyüklüğü) kadar iklimlendirme odası koşullarında bekletilmişlerdir.



Şekil 3.25. Rejenerasyon ortamında anterlerin gelişmesi

3.2.9. Haploid Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması

Cam tüplerde embriyoidlerden gelişen küçük bitkicikler 3-4 gerçek yapraklı döneme geldiklerinde dış koşullara alıştırılmak üzere içinde $\frac{1}{2}$ torf + $\frac{1}{2}$ perlit karışımı bulunan ortamlara dikilmiştir (Şekil 3.26.). Dikimi yapılan bitkiler ortam sıcaklığı 22 ± 2 °C, hava oransal nemi % 85 ± 5 , ışık intensitesi 5000 lux olan ve 12 saat gece 12 saat gündüz prensibi ile çalışan 600 litre hacimli büyütme dolabına (growth chamber) konulmuştur. Büyütme dolabında 7-10 gün bekleyen bitkiler daha sonra iklimlendirme odasına aktarılmıştır. İklimlendirme odasının koşulları 24 ± 2 °C sıcaklık, 3000 lux ışık, % 60 ± 5 hava oransal nemi ve 16/8 gündüz gece olarak ayarlanmıştır. Büyütme dolabından alınan bitkicikler 20 gün süreyle iklimlendirme odasında bekletilmiştir. Bu süreçte bitkiciklerde ploidi testleri yapılmıştır. Ploidi testinde farklı yöntemler kullanılmıştır.

Ploidi testi sonrasında haploid olduğu belirlenen bitkiler kromozom katlamasına alınmıştır.



Şekil 3.26. Haploid bitkilerin dış koşullara alıştırılması

3.2.10. Ploidi Testleri

Ploidi seviyesinin belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılmıştır. Bunlar;

Fenotipik gözlemler: Bitkilerde kromozom sayısı arttıkça tüm bitki organlarında irileşme meydana gelmektedir. Bu nedenle haploid bitkiler diploid bitkiler ile karşılaştırıldığında yaprakları ve çiçekleri daha küçük ve boyları daha kısa olmaktadır. Ayrıca polen meydana getiremediklerinden tohum oluşturmamaktadır. Bitkilerde yapılan fenotipik incelemeler sonucunda da haploid bitkilerin diploide göre daha küçük yaprak ve çiçek oluşturduğu, küçük meyveler oluştursa bile tohum bağlamadığı görülmüştür (Şekil 3.27.).



Şekil 3.27. Elde edilen bitkilerde fenotipik gözlemler

Kromozom sayımları: Bitkilerin genellikle kök uçlarında yapılan kromozom sayımları, güvenilirliği en fazla olan yöntem olduğundan, sağlıklı ve güçlü bir gelişme gösteren taze kök uçlarından alınan örneklerde kromozom sayımları yapılmıştır. Kromozom sayımında kullanılan protokol aşağıda verilmiştir.

Bitki kök uçlarından kromozom sayımı için preparat hazırlanması: Sabah saat 9-10 saatleri arasında bitkinin aktif büyümekte olan 1-2 cm uzunluğundaki kökleri (besin ortamından çıktıktan sonra kökleri budanıp küçük saksılara aktarıldıktan sonra yeni kök oluşturan bitkilerden alınan) ince uçlu makasla kesilip içinde doymuş α -monobromonaftalin çözeltisi (100 ml musluk suyuna 2-3 damla α -monobromonaftalin ekleyip çalkalanarak hazırlanan) bulunan küçük tüplere yerleştirildi. Oda sıcaklığında 4 saat bekletildi. α -monobromonaftalin ile muamele edilen kökler 3 kez saf su ile yıkandıktan sonra, tüplere glasiyel asetik asit eklendi ve bu asitte kökler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Tüplerin içindeki glasiyel asetik asit boşaltıldı ve kökler üç kez saf su ile yıkandı. Glasiyel asetik asitten saf su ile temizlenen köklerin bulunduğu tüplere 1N HCL asit (8,4 ml % 36'lık HCL + 91,6 ml saf su) ilave edildi. Tüplerin ağzı kapatıldı ve 60 °C'ye ısıtılmış su banyosuna yerleştirildi. Su banyosunda tüpler 10-12 dakika bekletildi. HCL muamelesinden sonra kökler 3 kez saf su ile yıkandı. Köklerin bulunduğu tüplere Feulgen boyası ilave edildi. Ağzı kapatıldı ve

karanlıkta 2 saat bekletildi. Uç kısımları pembe renk ile boyanmış olan kök uçlarının bulunduğu tüplerden boya boşaltıldı ve içerisine musluk suyu ilave edildi. 10-15 dakika bekletildi.

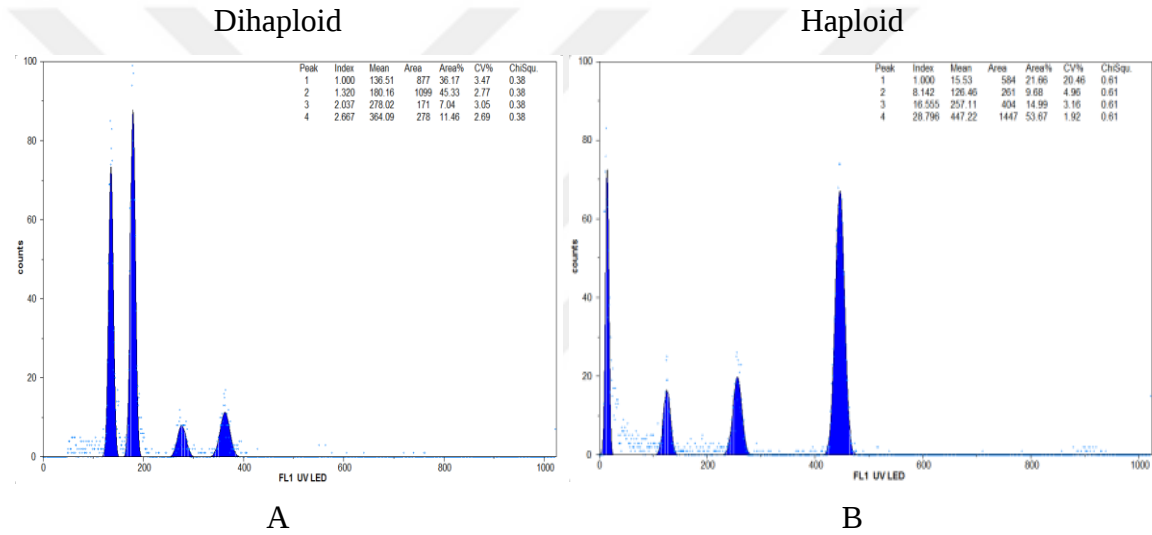
Bir pens yardımıyla uç kısmı pembe renkli boyanmış kök ucu alındı ve üzerine bir damla asetokarmin damlatılmış lam üzerine yerleştirildi. Bir jilet ile kökün yalnızca pembe boyanın 3-4mm'lik kısmı lam üzerinde bırakıldı. Geriye kalan kısmı lam üzerinden temizlendi. Lam üzerindeki kök parçası jilet ile küçük parçalara ayrıldı. Lam üzerine lamel kapatıldı ve lamelin bir kenarından tutularak bir kurşun kalemin arka kısmı ile lamel üzerine hafif hafif vuruldu ve böylece kök parçaları iyice ezildi. Lam bir kurutma kâğıdı arasına konuldu ve sağ başparmak ile lamelin bulunduğu kısma hafifçe bastırıldı. Preparat incelemeye hazır hale getirildi.

Feulgen boyası hazırlanması: 0.5 g fuksin bazik tartıldı. İçerisine 100ml saf su bulunan beher ısıtıcıda ısıtıldı ve su kaynarken üzerine fuksin bazik eklendi. Sonra beher soğuk bir karıştırıcıya alındı ve tekrar karıştırıldı. Çözeltinin sıcaklığı 50⁰C'ye düştüğünde üzerine 10 ml 1N HCL ilave edildi. Çözelti filitre kâğıdı ile koyu renkli 150 ml'lik bir şişe içerisine süzüldü. Çözeltiye 1 g potasyum metabisülfite ilave edildi ve şişenin kapağı sıkıca kapatılarak şişe buzdolabında 24 saat bekletildi. Vişneçürüğü rengini alan boyanın rengi 1 gün sonunda açık çay rengini almış oldu. Boya filtreden geçirildi ve su gibi şeffaf rengi almış oldu.

Asetokarmin boyası hazırlama: 45 ml glasiyel asetik asit ile 55 ml saf su karıştırılarak % 45'lik asetik asit çözeltisi hazırlandı. Çözelti bir ısıtıcıya yerleştirildi ve kaynatıldı. Kaynayan çözeltiye 1 g karmin eklendi. Çözelti iyice karıştırıldı. Çözeltinin bulunduğu kap soğuk bir karıştırıcıya alındı ve çözelti sıcaklığı oda sıcaklığına gelinceye kadar karıştırıldı. Çözelti koyu renkli bir şişeye boşaltıldı ve şişe buzdolabına yerleştirildi. 12 saat sonra çözelti filtreden geçirildi ve kullanıma hazır hale getirildi.

Flow sitometri yöntemi: Kromozom sayma yönteminin zahmetli, zaman alıcı ve genellikle istenen sonucu vermemesi nedeniyle kromozom sayımından vazgeçilmiş, bunun yerine flow sitometri ve stoma sayım yöntemi kullanılmıştır. Flow Sitometri analizi Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü Sitogenetik Laboratuvarında yapılmıştır. Flow sitometri ile analiz edilecek örneklerin hazırlanmasında 3-4 haftalık genç bitki yaprakları kullanılmıştır. Preparatların hazırlanmasında 0.5cm² büyüklüğünde

yaprak dokusu petri kabına yerleştirilip üzerine 500µl izolasyon buffer ilave edilmiştir. Yaprak dokusu keskin jilet ile 30-60 saniye süresince küçük parçalara ayrılıp örnek petri kabı içerisinde 10-15 saniye kadar çalkalanmıştır. Çalkalama işleminden sonra örnekler Partec marka 50 µm Cell Trics filtre ile süzülerek tüp içerisine aktarılmıştır. Ardından üzerine 2ml DAPI boyama solüsyonu ilave edilerek ışısız ortamda analiz edilene kadar 30-60 dakika bekletilmiştir. Örneklerin analizinde Partec marka flow sitometri cihazı kullanılmıştır. Sonuçların yorumlanmasında standart bitki DNA içeriği bibere yakın olan diploid domates kullanılmıştır (Şekil 3.28.).



Şekil 3.28.Flow sitometri analiz sonuçları. A) Diploid biber ve standartla (domates) hazırlanan örneklerin oluşturduğu histogramın görüntüsü B)Haploid biber ve standartla (domates) hazırlanan örneklerin oluşturduğu histogramın görüntüsü

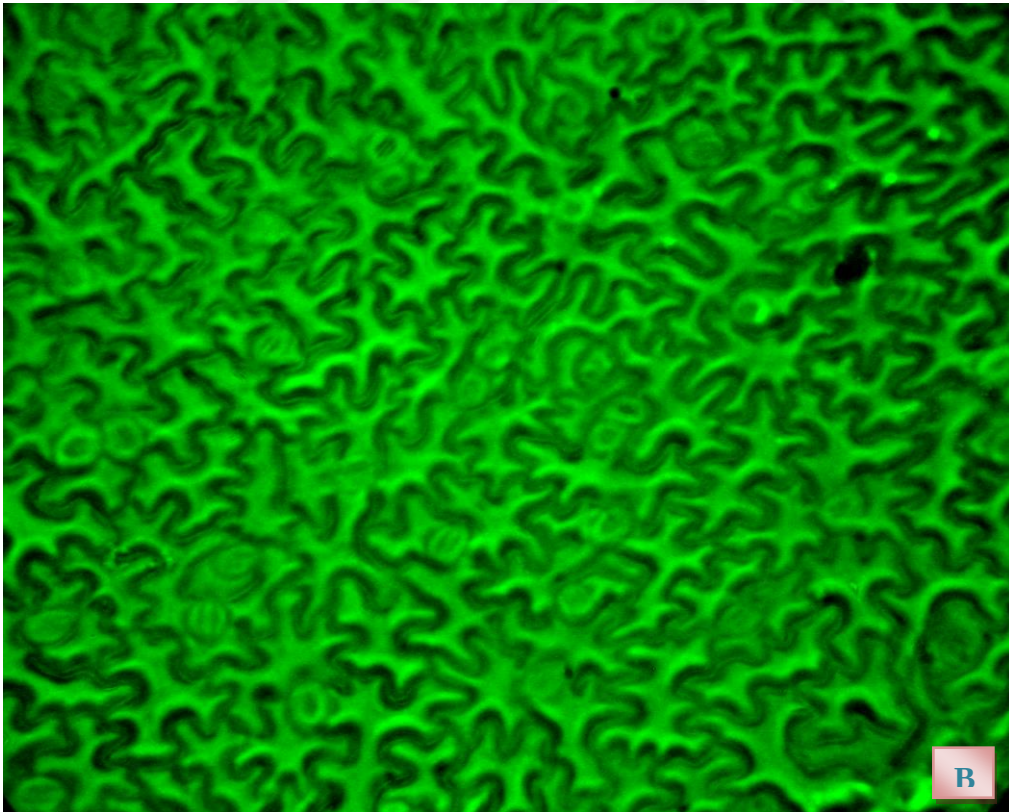
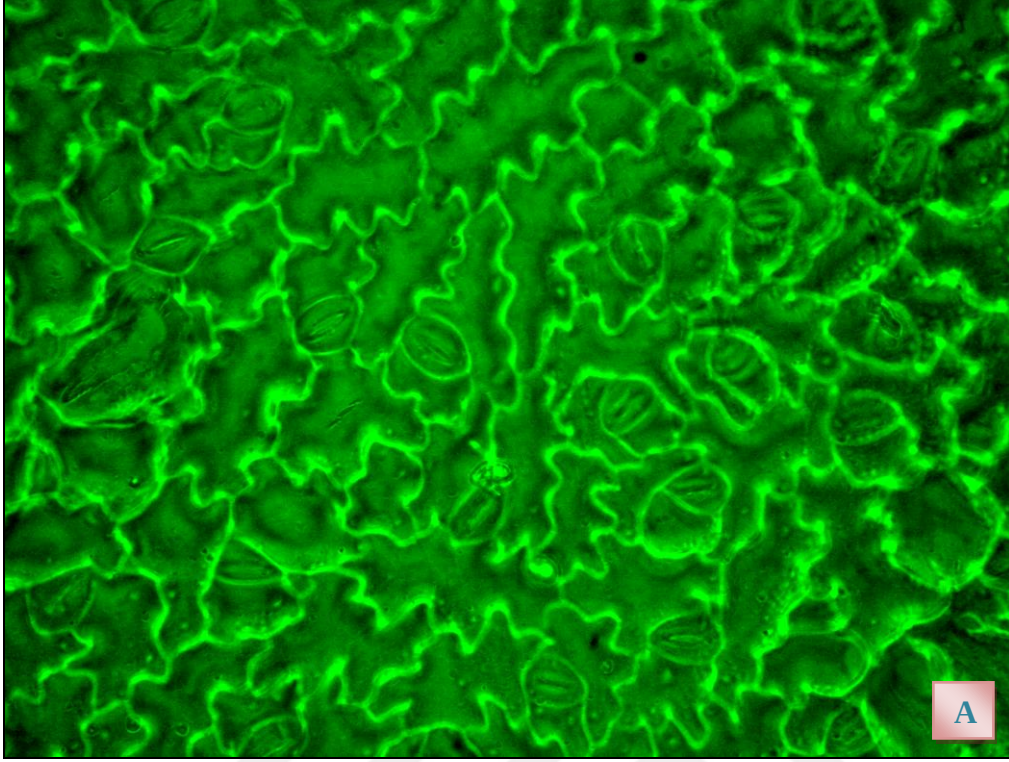
Stomal incelemeler: Flow sitometri sonuçlarından sonra haploid bitkilerden alınan yaprakta birim alandaki stoma sayısı ve büyüklükleri incelenmiştir. Bu amaçla yaprakların alt yüzeyine şeffaf tırnak cilası sürülmüştür. Kuruyan tırnak cilası soyularak şeffaf bir tabaka elde edilmiştir (Şekil 3.29.). Daha sonra bu elde edilen şeffaf tabaka üzerine bir damla saf su damlatılarak lam üzerinde NIKON Eclipse E 600 marka ışık mikroskopunda 40x100 büyütme olarak incelenmiştir. Haploid bitkilerde stomaların diploid bitkilere göre daha küçük olduğu ve birim alandaki stoma sayısının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.30.).



Şekil 3.29. Stoma preparatlarının hazırlanması

3.2.11. Kromozom Katlaması

Ploidi sayımları sonucunda haploid olduğu belirlenen bitkilerde kromozom katlaması yapılmıştır. Kromozom katlaması *in vivo* koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bunun için alıştırma ortamından alınan bitkiler saksılara dikilmiştir. Saksılar tül seraya aktarılmış ve burada 1 hafta sonra kromozom katlama işlemine geçilmiştir. Bunun için % 1'lik kolhisin çözeltisi hazırlanmıştır. % 1'lik kolhisin çözeltisi bir pamuk üzerine damlatıldıktan sonra pamuk haploid bitkilerin büyüme ucuna yerleştirilmiş ve kolhisinin buharlaşmasını önlemek için pamuk bantla kapatılarak etrafına alüminyum folyo çekilmiştir. Kolhisin burada 24 saat bekletilmiştir (Şekil 3.31.). Kolhisin uygulanan sürgünler gelişmiş ve gelişen sürgünler üzerinde oluşan çiçekler kendilenmiş ve izole edilmiştir Kendilemeden 1 hafta sonra döllenmenin gerçekleşmediği bitkilerde tekrar stoma incelenmesi yapılmış ve stoma gözlemi sonunda kromozom katlaması gerçekleşmeyen bitkilerde katlama işlemi tekrarlanmıştır. Bu işlem kromozom katlaması gerçekleşinceye kadar (bazı bitkilerde 3 defa) devam edilmiştir.



Şekil 3.30. Stomalara ait görünüm, A) Diploid biber bitkilerine ait stomalardan görünüm, B) Haploid biber bitkilerine ait stomalardan görünüm



Şekil 3.31. Haploid bitkilerde kromozom katlamasının görünümü

3.2.12. Dihaploid Hatlarda Tohum Üretimi

Kromozom katlamasından sonra tül serada dihaploid sürgünler üzerinde oluşan çiçeklerde kendilemeler yapılmıştır. Bu işlem sabahın erken saatlerinde (7:00-10:00) taç yaprakları açmak üzere olan çiçeklerin taç yaprakları steril pens yardımıyla açılmış, çiçek içinden bir anter çıkarılmış ve pens ile anterlerin içinden polenler çıkarılarak aynı çiçeğin stigmatı üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra çiçek taç yaprakları ile birlikte bir izola bant yardımıyla kapatılmıştır. Kendilenen ve izolasyonu yapılan çiçeklere etiket takılarak kendileme tamamlanmıştır. Her bitkide 6 veya 7 çiçek kendilenmiştir. Kendilenen bitkilerde meyveler olgunlaştığında meyveler hasat edilmiş ve karanlık ortamda oda sıcaklığında 3 gün bekletildikten sonra tohumları çıkarılarak kurumaya bırakılmıştır. Tohumlar % 12-14 neme sahip oluncaya kadar kurutulduktan sonra ticari tohum paketlerine konularak paketlenmiştir.

3.2.13. Dihaploid Hatların Morfolojik Karakterizasyonu

Kendilenen hatlardan alınan tohumlar 2016 yılında Nisan ayında içinde torf+perlit karışımı bulunan viyollere ekilmiştir. Viyollerde 35 gün sonra dikime hazır hale gelen fideler kokopit bloklarına dikilerek topraksız tarım koşullarında yetiştirilmişlerdir (Şekil

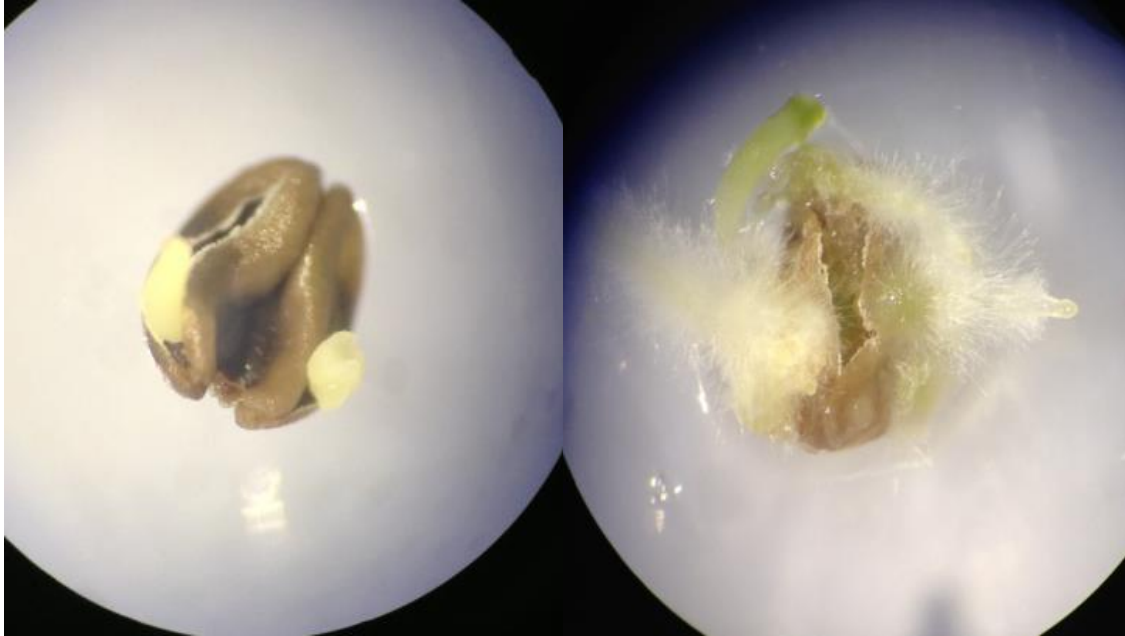
3.32.). Dihaploid hatlar yarı otomatik polikarbon serada yetiştirilmiştir. Her dihaploid hat için 8 bitki yetiştirilmiştir. Dihaploid hatlarda meyve sayısı, meyve ağırlığı, verim, meyve şekli, bitki büyüme gücü, hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilme durumu gibi özellikleri incelenmiştir.



Şekil 3.32. Dihaploid hatların yetiştirildiği sera

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan 10 biber genotipinden (Belissa F₁, Belissa F₂, Şölen F₁, Şölen F₂, Bafra F₁, Bafra F₂, Ergenekon F₁, Ergenekon F₂, İstek F₁ ve İstek F₂) toplam 10 800 adet anter ekimi yapılmıştır. İklim odasında ortalama 40 gün geçtikten sonra dikimi yapılan tüm çeşitlerin anterlerinde gelişmeler takip edilmiştir. Gelişme olarak kabul edilen olgu, anterlerin kültür ortamına alındıktan sonra şişerek farklılaşmaları veya bozulma, kuruma olmaksızın canlılıklarını sürdürmeleri olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Anterlerden embriyoid çıkışı

4.1. Uygulamalara Bağlı Olarak Embriyoid, Bitkicik ve Dihaploid Bitki Oluşum Oranları

Uygulamalara göre başarı oranları incelendiğinde DDV ortamında Belissa genotipinde 22 uygulamadan embriyoid elde edilirken 14 uygulamadan sonuç alınamamıştır. Toplamda 352 embriyoid, 62 haploid bitkicik ve 6 dihaploid bitki elde edilmiştir. En yüksek embriyoid 51 adet ve % 170 ile Belissa F₂, 4 °C’de 24 saat tomurcuk uygulaması, vitamin B₁₂ uygulanmayan kontrol ortamından ve 35 °C inkübasyon

uygulamasından elde edilmiştir. DDV ortamında Belissa genotipinde ağırlıklı olarak öne çıkan bir uygulama belirlenememiştir. Tomurcuklara yapılan ön uygulama, vitamin B₁₂ ve inkübasyon uygulamalarının tümü az ya da çok embriyo oluşumuna cevap vermiştir. Belissa F₁ ve Belissa F₂ genotiplerinin DDV ortamında uygulamalara göre embriyoid ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Belissa genotipinin çift faz ortamında 15 uygulamadan embriyoid elde edilirken, 21 uygulamadan embriyoid elde edilememiştir. Toplamda 132 embriyoid ve 24 haploid bitkicik elde edilirken, dihaploid bitki elde edilememiştir. En yüksek embriyoid 34 adet ve % 113.33 ile Belissa F₂, ön uygulamasız, % 0.20 aktif kömür ve 9 °C inkübasyon uygulamasından elde edilmiştir. Çift faz ortamında Belissa genotipinde genel olarak aktif kömür ve 9 °C inkübasyon uygulamaları daha başarılı sonuç vermiştir. Tomurcuklara ön uygulama konusunda kesin bir hüküme varılamamıştır. Belissa F₁ ve Belissa F₂ genotiplerinin çift faz ortamında uygulamalara göre embriyoid ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Şölen genotipinde DDV ortamında 12 uygulamadan embriyoid elde edilirken 24 uygulamadan sonuç alınamamıştır. Toplamda 39 embriyoid, 4 haploid bitkicikve 3 adet dihaploid bitki elde edilmiştir. En yüksek embriyoid 9 adet ve % 30 ile Şölen F₂, 24 saat 4 °C tomurcuk uygulaması, 0.05 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ ve 9 °C inkübasyon uygulamasından elde edilmiştir. DDV ortamında Şölen genotipinde tomurcuklara ön uygulama yapılması ve Vitamin B₁₂ uygulaması daha etkili olmuştur. İnkübasyon uygulamasında iki sıcaklık derecesi de sonuç vermiştir. Şölen F₁ ve Şölen F₂ genotiplerinin DDV ortamında uygulamalara göre embriyoid ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları Çizelge 4.3’de verilmiştir. Şölen F₁ ve Şölen F₂ genotiplerinin çift faz ortamında 7 uygulamadan embriyoid elde edilirken, 29 uygulamadan embriyoid elde edilememiştir. Toplamda 25 embriyoid ve 4 haploid bitkicik elde edilirken, 1 dihaploid bitki elde edilmiştir. En yüksek embriyoid 13 adet ve % 43.33 ile Şölen F₁, 24 saat 4 °C tomurcuk uygulaması, % 0.10 aktif kömür 9 °C inkübasyon uygulamasından elde edilmiştir. Çift faz ortamında Şölen genotipinde genel olarak 24 saat tomurcuklara sıcaklık uygulaması, aktif kömür ve 9°C inkübasyon uygulamaları daha başarılı sonuç vermiştir. Şölen F₁ ve Şölen F₂ genotiplerinin çift faz ortamında uygulamalara göre embriyoid ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

DDV ortamında Bafra genotipinde 21 uygulamadan embriyoid elde edilirken 15 uygulamadan sonuç alınamamıştır. Toplamda 163 embriyoid ve 28 haploid bitkicik elde edilirken, DDV ortamında Bafra genotipinde dihaploid bitki elde edilememiştir. En yüksek embriyoid 19 adet ve % 63.33 ile Bafra F₁, 24 saat 4 °C tomurcuk uygulaması, 0.05 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ ve 9 °C inkübasyon uygulaması ile Bafra F₁, 48 saat 4 °C tomurcuk uygulaması, 35 °C inkübasyon uygulamasından ve vitaminsiz kontrol ortamından elde edilmiştir. DDV ortamında Bafra genotipinde tomurcuklara ön uygulama ve Vitamin B₁₂'nin 0.03 ve 0.05 mg l⁻¹ uygulamaları embriyo oluşumu üzerine daha etkili olmuştur. Bafra F₁ ve Bafra F₂ genotiplerinin DDV ortamında uygulamalara göre embriyoid ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları Çizelge 4.5'de verilmiştir. Bafra genotipinin çift faz ortamında 10 uygulamadan embriyoid elde edilirken, 26 uygulamadan embriyoid elde edilememiştir. Toplamda 123 embriyoid ve 19 haploid bitkicik elde edilirken, dihaploid bitki elde edilememiştir. En yüksek embriyoid 32 adet ve % 106.67 ile Bafra F₂, 48 saat 4 °C tomurcuk uygulaması ve 9 °C inkübasyon uygulamasından ve Bafra F₁, % 0.10 aktif kömür ve 9 °C inkübasyon uygulamasından elde edilmiştir. Bafra F₁ ve Bafra F₂ genotiplerinin çift faz ortamında uygulamalara göre embriyoid ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Ergenekon genotipinde DDV ortamında 16 uygulamadan embriyoid elde edilirken 20 uygulamadan embriyoid alınamamıştır. Toplamda 81 embriyoid, 20 haploid bitkicik ve 6 dihaploid bitki elde edilmiştir. En yüksek embriyoid 17 adet ve % 56.67 ile Ergenekon F₂, 48 saat 4 °C tomurcuk uygulaması, 0.03 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ ve 9 °C inkübasyondan elde edilmiştir. DDV ortamında Ergenekon genotipinde tomurcukların 48 saat 4 °C'de bekletilmesi ve vitamin B₁₂'nin 0.03 ve 0.05 mg l⁻¹ uygulamaları embriyo oluşumu üzerine daha etkili olmuştur. Ergenekon F₁ ve Ergenekon F₂ genotiplerinin DDV ortamında uygulamalara göre embriyoid ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları Çizelge 4.7'de verilmiştir. Ergenekon genotipinin çift faz ortamında 7 uygulamadan embriyoid elde edilirken, 29 uygulamadan embriyoid elde edilememiştir. Toplamda 26 embriyoid, 11 haploid bitkicik ve 5 dihaploid bitki elde edilmiştir. En yüksek embriyoid 16 adet ve % 53.33 ile Ergenekon F₂, 48 saat 4 °C tomurcuk uygulaması, aktif kömürsüz ve 9 °C inkübasyon uygulamasından elde edilmiştir. Bu genotipte aktif kömür uygulaması embriyoid oluşturan uygulamalarda genelde etkili

olurken, en yüksek embriyoid elde edilen uygulama aktif kömür kullanılmayan ortam olmuştur. Ergenekon F₁ ve Ergenekon F₂ genotiplerinin çift faz ortamında uygulamalara göre embriyoid ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

İstek genotipinde DDV ortamında 21 uygulamadan embriyoid elde edilirken 15 uygulamadan sonuç alınamamıştır. Toplamda 187 embriyoid, 34 haploid bitkicik ve 6 dihaploid bitki elde edilmiştir. En yüksek embriyoid 35 adet ve % 116.67 ile İstek F₁, 24 saat 4 °C tomurcuk uygulaması, 35 °C inkübasyondan ve vitaminsiz ortamdan elde edilmiştir. DDV ortamında İstek genotipinde tomurcukların 24 ve 48 saat 4 °C’de bekletilmesi, vitamin B₁₂’nin 0.03 ve 0.05 mg l⁻¹ uygulamaları ve 35 °C inkübasyon sıcaklığı embriyo oluşumu üzerine daha etkili olmuştur. İstek F₁ ve İstek F₂ genotiplerinin DDV ortamında uygulamalara göre embriyoid ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları Çizelge 4.9’da verilmiştir. İstek genotipinin çift faz ortamında 5 uygulamadan embriyoid elde edilirken, 31 uygulamadan embriyoid elde edilememiştir. Toplamda 19 embriyoid ve 6 haploid bitkicik elde edilmiş, bu uygulamalarda dihaploid bitki elde edilememiştir. En yüksek embriyoid 8 adet ve % 26.67 ile İstek F₂, 24 saat 4 °C tomurcuk uygulaması, % 0.20 aktif kömür ve 9 °C inkübasyon uygulamasından elde edilmiştir. İstek genotipinde çift faz ortamında tomurcuklara ön uygulama ve ortama aktif kömür ilavesi embriyo oluşumunda etkili olmuştur. İstek F₁ ve İstek F₂ genotiplerinin çift faz ortamında uygulamalara göre embriyoid ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çalışmada kullanılan faktörlere bağlı olarak embriyo ve bitki oluşum oranları farklılıklar göstermiştir. Embriyoid başarısı yüksek genotiplerin yanında düşük başarı gösteren genotipler de olmuştur. Özellikle genotiplere göre değişen bazı uygulamalarda embriyo oluşumu yüksek olmasına rağmen bitkiye dönüşüm oranları düşük kalmıştır. Literatürde de anter kültürü çalışmalarında genotip, besin ortamı ve diğer faktörlere bağlı olarak embriyoid oluşum oranı ve bitkiye dönüşümünde farklılıkların olduğu belirtilmektedir (Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Parra-Vega ve ark., 2013b). Benzer çalışmalar yapan Özkum ve Tıprıdamaz (2002), biberde anter kültürü çalışmalarında embriyoid oluşum oranının % 0.5 ile % 12.5 arasında olduğunu, ancak embriyoidlerin bitkiye dönüşemediğini ve sadece % 12.5 embriyoid başarısı yakalanan uygulamada bitkiye dönüşüm oranının % 0.5 olduğunu belirtmektedirler. Nervo ve ark. (1995), değişik biber genotiplerinde yürüttükleri anter kültürü çalışmalarında kültüre aldıkları 8

169 anterden toplamda % 40.50 başarı ile 3 310 embriyoid ve % 6.3 başarı oranı ile 512 bitkicik elde ettiklerini belirtmektedirler. Ercan ve ark. (2006), biberde anter kültüründe mevsim ve tomurcuk yaşının etkisini araştırdıkları çalışmada embriyo oluşum frekansının % 0.77 ile % 7.70 ve embriyodan bitki oluşum frekansının ise % 16.67 ile % 100.00 arasında değiştiğini belirtmektedirler. Irikova ve ark. (2011b). biberde anter kültürü çalışmalarında başarı oranının uygulamalara bağlı olarak değiştiğini belirtmektedirler.



Çizelge 4.1. Belissa F₁ ve Belissa F₂ genotiplerinin DDV ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%)

Genotip	U1	U2	U3	A	E1	E2	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Belissa F ₁	0	0	9	30	36	120.00	6	20.00	16.67	1	3.33	2.78
Belissa F ₁	0	0	35	30								
Belissa F ₁	24	0	9	30								
Belissa F ₁	24	0	35	30	27	90.00	7	23.33	25.93			
Belissa F ₁	48	0	9	30								
Belissa F ₁	48	0	35	30								
Belissa F ₁	0	0.03	9	30								
Belissa F ₁	0	0.03	35	30								
Belissa F ₁	24	0.03	9	30	19	63.33	3	10.00	15.79			
Belissa F ₁	24	0.03	35	30	12	40.00	2	6.67	16.67			
Belissa F ₁	48	0.03	9	30	1	3.33	1	3.33	100.00			
Belissa F ₁	48	0.03	35	30	9	30.00	1	3.33	11.11			
Belissa F ₁	0	0.05	9	30	11	36.67	2	6.67	18.18			
Belissa F ₁	0	0.05	35	30	7	23.33	1	3.33	14.29			
Belissa F ₁	24	0.05	9	30	14	46.67	4	13.33	28.57			
Belissa F ₁	24	0.05	35	30	2	6.67						
Belissa F ₁	48	0.05	9	30	11	36.67	2	6.67	18.18			
Belissa F ₁	48	0.05	35	30								
Toplam					149		29			1		
Belissa F ₂	0	0	9	30	5	16.67	1	3.33	20.00			
Belissa F ₂	0	0	35	30	23	76.67	4	13.33	17.39			
Belissa F ₂	24	0	9	30	21	70.00	4	13.33	19.05	1	3.33	4.76
Belissa F ₂	24	0	35	30	51	170.00	5	16.67	9.80	1	3.33	1.96
Belissa F ₂	48	0	9	30	17	56.67	3	10.00	17.65			
Belissa F ₂	48	0	35	30	5	16.67						
Belissa F ₂	0	0.03	9	30								
Belissa F ₂	0	0.03	35	30								
Belissa F ₂	24	0.03	9	30	15	50.00	2	6.67	13.33	1	3.33	6.67
Belissa F ₂	24	0.03	35	30								
Belissa F ₂	48	0.03	9	30								
Belissa F ₂	48	0.03	35	30								
Belissa F ₂	0	0.05	9	30								
Belissa F ₂	0	0.05	35	30	11	36.67	2	6.67	18.18			
Belissa F ₂	24	0.05	9	30	26	86.67	5	16.67	19.23	1	3.33	3.85
Belissa F ₂	24	0.05	35	30								
Belissa F ₂	48	0.05	9	30	4	13.33	1	3.33	25.00	1	3.33	25.00
Belissa F ₂	48	0.05	35	30	25	83.33	6	20.00	24.00			
Toplam					203		33			5		
Genel												
Toplam					352		62			6		

U1: Ön Uygulama 4 °C'de (saat)
U2: Vitamin B₁₂ Uygulaması (mg l⁻¹)
U3: İnkübasyon Uygulaması (°C)
A: Atılan Anter Sayısı
E1: Embriyo Sayısı
E2: Embriyoid Oluşum Oranı (%)

B1: Embriyodan Oluşan Bitkicik Sayısı
B2: Anterden Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B3: Embriyodan Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B4: Dihaploid Bitki Sayısı
B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)
B6: Embriyoidden Gelişen Dihaploid Bitki Oranı (%)

Çizelge 4.2. BelissaF₁ ve BelissaF₂ Genotiplerinin çift faz ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%)

Genotip	U1	U2	U3	A	E1	E2	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Belissa F ₁	0	0	9	30								
Belissa F ₁	0	0	35	30								
Belissa F ₁	24	0	9	30								
Belissa F ₁	24	0	35	30								
Belissa F ₁	48	0	9	30								
Belissa F ₁	48	0	35	30								
Belissa F ₁	0	0.10	9	30	26	86.67	5	16.67	19.23			
Belissa F ₁	0	0.10	35	30								
Belissa F ₁	24	0.10	9	30	3	10.00	1	3.33	33.33			
Belissa F ₁	24	0.10	35	30								
Belissa F ₁	48	0.10	9	30								
Belissa F ₁	48	0.10	35	30								
Belissa F ₁	0	0.20	9	30	11	36.67	2	6.67	18.18			
Belissa F ₁	0	0.20	35	30								
Belissa F ₁	24	0.20	9	30								
Belissa F ₁	24	0.20	35	30	4	13.33	1	3.33	25.00			
Belissa F ₁	48	0.20	9	30								
Belissa F ₁	48	0.20	35	30								
Toplam					44		9					
Belissa F ₂	0	0	9	30	1	3.33						
Belissa F ₂	0	0	35	30	1	3.33						
Belissa F ₂	24	0	9	30								
Belissa F ₂	24	0	35	30								
Belissa F ₂	48	0	9	30								
Belissa F ₂	48	0	35	30								
Belissa F ₂	0	0.10	9	30	25	83.33	4	13.33	16.00			
Belissa F ₂	0	0.10	35	30	2	6.67						
Belissa F ₂	24	0.10	9	30	10	33.33	2	6.67	20.00			
Belissa F ₂	24	0.10	35	30	2	6.67	1	3.33	50.00			
Belissa F ₂	48	0.10	9	30	1	3.33						
Belissa F ₂	48	0.10	35	30	4	13.33	1	3.33	25.00			
Belissa F ₂	0	0.20	9	30	34	113.33	5	16.67	14.71			
Belissa F ₂	0	0.20	35	30								
Belissa F ₂	24	0.20	9	30	7	23.33	1	3.33	14.29			
Belissa F ₂	24	0.20	35	30								
Belissa F ₂	48	0.20	9	30	1	3.33	1	3.33	100.00			
Belissa F ₂	48	0.20	35	30								
Toplam					88		15					
Genel												
Toplam					132		24					

U1: Ön Uygulama 4 °C'de (saat)
U2: Aktif Kömür Uygulaması (%)
U3: İnkübasyon Uygulaması (°C)
A: Atılan Anter Sayısı
E1: Embriyo Sayısı
E2: Embriyoid Oluşum Oranı (%)

B1: Embriyodan Oluşan Bitkicik Sayısı
B2: Anterden Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B3: Embriyodan Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B4: Dihaploid Bitki Sayısı
B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)
B6: Embriyoidden Gelişen Dihaploid Bitki Oranı (%)

Çizelge 4.3. Şölen F₁ ve Şölen F₂ genotiplerinin DDV ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%)

Genotip	U1	U2	U3	A	E1	E2	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Şölen F ₁	0	0	9	30	3	10.00	2	6.67	66.67	1	3.33	33.33
Şölen F ₁	0	0	35	30								
Şölen F ₁	24	0	9	30								
Şölen F ₁	24	0	35	30								
Şölen F ₁	48	0	9	30	1	3.33	1	3.33	100.00	1	3.33	100.00
Şölen F ₁	48	0	35	30								
Şölen F ₁	0	0.03	9	30								
Şölen F ₁	0	0.03	35	30	1	3.33						
Şölen F ₁	24	0.03	9	30								
Şölen F ₁	24	0.03	35	30	5	16.67						
Şölen F ₁	48	0.03	9	30	1	3.33	1	3.33	100.00	1	3.33	100.00
Şölen F ₁	48	0.03	35	30								
Şölen F ₁	0	0.05	9	30								
Şölen F ₁	0	0.05	35	30	6	20.00						
Şölen F ₁	24	0.05	9	30								
Şölen F ₁	24	0.05	35	30								
Şölen F ₁	48	0.05	9	30								
Şölen F ₁	48	0.05	35	30								
Toplam					17		4			3		
Şölen F ₂	0	0	9	30								
Şölen F ₂	0	0	35	30								
Şölen F ₂	24	0	9	30	2	6.67						
Şölen F ₂	24	0	35	30	3	10.00						
Şölen F ₂	48	0	9	30								
Şölen F ₂	48	0	35	30	3	10.00						
Şölen F ₂	0	0.03	9	30								
Şölen F ₂	0	0.03	35	30								
Şölen F ₂	24	0.03	9	30	3	10.00						
Şölen F ₂	24	0.03	35	30								
Şölen F ₂	48	0.03	9	30								
Şölen F ₂	48	0.03	35	30								
Şölen F ₂	0	0.05	9	30								
Şölen F ₂	0	0.05	35	30								
Şölen F ₂	24	0.05	9	30	9	30.00						
Şölen F ₂	24	0.05	35	30	2	6.67						
Şölen F ₂	48	0.05	9	30								
Şölen F ₂	48	0.05	35	30								
Toplam					22							
Genel												
Toplam					39		4			3		

U1: Ön Uygulama 4 °C'de (saat)
U2: Vitamin B₁₂ Uygulaması (mg l⁻¹)
U3: İnkübasyon Uygulaması (°C)
A: Atılan Anter Sayısı
E1: Embriyo Sayısı
E2: Embriyoid Oluşum Oranı (%)

B1: Embriyodan Oluşan Bitkicik Sayısı
B2: Anterden Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B3: Embriyodan Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B4: Dihaploid Bitki Sayısı
B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)
B6: Embriyoidden Gelişen Dihaploid Bitki Oranı (%)

Çizelge 4.4. Şölen F₁ ve Şölen F₂ Genotiplerinin çift faz ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%)

Genotip	U1	U2	U3	A	E1	E2	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Şölen F ₁	0	0	9	30	1	3.33						
Şölen F ₁	0	0	35	30								
Şölen F ₁	24	0	9	30								
Şölen F ₁	24	0	35	30								
Şölen F ₁	48	0	9	30								
Şölen F ₁	48	0	35	30								
Şölen F ₁	0	0.10	9	30								
Şölen F ₁	0	0.10	35	30								
Şölen F ₁	24	0.10	9	30	13	43.33	2	6.67	15.38			
Şölen F ₁	24	0.10	35	30								
Şölen F ₁	48	0.10	9	30								
Şölen F ₁	48	0.10	35	30								
Şölen F ₁	0	0.20	9	30								
Şölen F ₁	0	0.20	35	30								
Şölen F ₁	24	0.20	9	30	2	6.67						
Şölen F ₁	24	0.20	35	30								
Şölen F ₁	48	0.20	9	30								
Şölen F ₁	48	0.20	35	30								
Toplam					16		2					
Şölen F ₂	0	0	9	30	2	6.67						
Şölen F ₂	0	0	35	30								
Şölen F ₂	24	0	9	30								
Şölen F ₂	24	0	35	30								
Şölen F ₂	48	0	9	30								
Şölen F ₂	48	0	35	30								
Şölen F ₂	0	0.10	9	30								
Şölen F ₂	0	0.10	35	30	2	6.67						
Şölen F ₂	24	0.10	9	30	4	13.33	1	3.33	25.00			
Şölen F ₂	24	0.10	35	30								
Şölen F ₂	48	0.10	9	30								
Şölen F ₂	48	0.10	35	30								
Şölen F ₂	0	0.20	9	30								
Şölen F ₂	0	0.20	35	30								
Şölen F ₂	24	0.20	9	30								
Şölen F ₂	24	0.20	35	30	1	3.33	1	3.33	100.00	1	3.33	100.00
Şölen F ₂	48	0.20	9	30								
Şölen F ₂	48	0.20	35	30								
Toplam					9		2			1		
Genel												
Toplam					25		4			1		

U1: Ön Uygulama 4 °C'de (saat)
U2: Aktif Kömür Uygulaması (%)
U3: İnkübasyon Uygulaması (°C)
A: Atılan Anter Sayısı
E1: Embriyo Sayısı
E2: Embriyoid Oluşum Oranı (%)

B1: Embriyodan Oluşan Bitkicik Sayısı
B2: Anterden Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B3: Embriyodan Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B4: Dihaploid Bitki Sayısı
B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)
B6: Embriyoidden Gelişen Dihaploid Bitki Oranı (%)

Çizelge 4.5. Bafra F₁ ve Bafra F₂ Genotiplerinin DDV ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%)

Genotip	U1	U2	U3	A	E1	E2	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Bafra F ₁	0	0	9	30								
Bafra F ₁	0	0	35	30								
Bafra F ₁	24	0	9	30	5	16.67	2		40.00			
Bafra F ₁	24	0	35	30								
Bafra F ₁	48	0	9	30								
Bafra F ₁	48	0	35	30	19	63.33	2		10.53			
Bafra F ₁	0	0.03	9	30								
Bafra F ₁	0	0.03	35	30								
Bafra F ₁	24	0.03	9	30	5	16.67	1		20.00			
Bafra F ₁	24	0.03	35	30	9	30.00	1		11.11			
Bafra F ₁	48	0.03	9	30								
Bafra F ₁	48	0.03	35	30								
Bafra F ₁	0	0.05	9	30	9	30.00	2		22.22			
Bafra F ₁	0	0.05	35	30								
Bafra F ₁	24	0.05	9	30	19	63.33	2		10.53			
Bafra F ₁	24	0.05	35	30	1	3.33	1		100.00			
Bafra F ₁	48	0.05	9	30								
Bafra F ₁	48	0.05	35	30	2	6.67						
Toplam					69		11					
Bafra F ₂	0	0	9	30								
Bafra F ₂	0	0	35	30	14	46.67	1		7.14			
Bafra F ₂	24	0	9	30								
Bafra F ₂	24	0	35	30	3	10.00						
Bafra F ₂	48	0	9	30								
Bafra F ₂	48	0	35	30	9	30.00	1		11.11			
Bafra F ₂	0	0.03	9	30	7	23.33	1		14.29			
Bafra F ₂	0	0.03	35	30	6	20.00	2		33.33			
Bafra F ₂	24	0.03	9	30	7	23.33	7		100.00			
Bafra F ₂	24	0.03	35	30	1	3.33	1		100.00			
Bafra F ₂	48	0.03	9	30	17	56.67	2		11.76			
Bafra F ₂	48	0.03	35	30	7	23.33						
Bafra F ₂	0	0.05	9	30								
Bafra F ₂	0	0.05	35	30	12	40.00	2		16.67			
Bafra F ₂	24	0.05	9	30								
Bafra F ₂	24	0.05	35	30	4	13.33						
Bafra F ₂	48	0.05	9	30	6	2						
Bafra F ₂	48	0.05	35	30	1	3.33						
Toplam					94		17					
Genel												
Toplam					163		28					

U1: Ön Uygulama 4 °C'de (saat)
U2: Vitamin B₁₂ Uygulaması (mg l⁻¹)
U3: İnkübasyon Uygulaması (°C)
A: Atılan Anter Sayısı
E1: Embriyo Sayısı
E2: Embriyoid Oluşum Oranı (%)

B1: Embriyodan Oluşan Bitkicik Sayısı
B2: Anterden Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B3: Embriyodan Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B4: Dihaploid Bitki Sayısı
B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)
B6: Embriyoidden Gelişen Dihaploid Bitki Oranı (%)

Çizelge 4.6. Bafra F₁ ve Bafra F₂ Genotiplerinin çift faz ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%)

Genotip	U1	U2	U3	A	E1	E2	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Bafra F ₁	0	0	9	30								
Bafra F ₁	0	0	35	30								
Bafra F ₁	24	0	9	30								
Bafra F ₁	24	0	35	30								
Bafra F ₁	48	0	9	30								
Bafra F ₁	48	0	35	30								
Bafra F ₁	0	0.10	9	30	32	106.67	4	13.33	12.50			
Bafra F ₁	0	0.10	35	30								
Bafra F ₁	24	0.10	9	30	7	23.33	1	3.33	14.29			
Bafra F ₁	24	0.10	35	30								
Bafra F ₁	48	0.10	9	30								
Bafra F ₁	48	0.10	35	30								
Bafra F ₁	0	0.20	9	30								
Bafra F ₁	0	0.20	35	30								
Bafra F ₁	24	0.20	9	30								
Bafra F ₁	24	0.20	35	30								
Bafra F ₁	48	0.20	9	30								
Bafra F ₁	48	0.20	35	30								
Toplam					39		5					
Bafra F ₂	0	0	9	30								
Bafra F ₂	0	0	35	30								
Bafra F ₂	24	0	9	30	9	30.00						
Bafra F ₂	24	0	35	30								
Bafra F ₂	48	0	9	30	32	106.67	4	13.33	12.50			
Bafra F ₂	48	0	35	30	3	10.00	1	3.33	33.33			
Bafra F ₂	0	0.10	9	30								
Bafra F ₂	0	0.10	35	30								
Bafra F ₂	24	0.10	9	30								
Bafra F ₂	24	0.10	35	30	3	10.00	1	3.33	33.33			
Bafra F ₂	48	0.10	9	30								
Bafra F ₂	48	0.10	35	30	4	13.33	1	3.33	25.00			
Bafra F ₂	0	0.20	9	30								
Bafra F ₂	0	0.20	35	30								
Bafra F ₂	24	0.20	9	30	21	70.00	4	13.33	19.05			
Bafra F ₂	24	0.20	35	30	8	26.67	2	6.67	25.00			
Bafra F ₂	48	0.20	9	30	4	13.33	1	3.33	25.00			
Bafra F ₂	48	0.20	35	30								
Toplam					84		14					
Genel												
Toplam					123		19					

U1: Ön Uygulama 4 °C'de (saat)
U2: Aktif Kömür Uygulaması (%)
U3: İnkübasyon Uygulaması (°C)
A: Atılan Anter Sayısı
E1: Embriyo Sayısı
E2: Embriyoid Oluşum Oranı (%)

B1: Embriyodan Oluşan Bitkicik Sayısı
B2: Anterden Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B3: Embriyodan Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B4: Dihaploid Bitki Sayısı
B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)
B6: Embriyoidden Gelişen Dihaploid Bitki Oranı (%)

Çizelge 4.7. Ergenekon F₁ ve Ergenekon F₂ Genotiplerinin DDV ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%)

Genotip	U1	U2	U3	A	E1	E2	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Ergenekon F ₁	0	0	9	30								
Ergenekon F ₁	0	0	35	30								
Ergenekon F ₁	24	0	9	30								
Ergenekon F ₁	24	0	35	30	11	36.67	2	6.67	18.18	1	3.33	5.88
Ergenekon F ₁	48	0	9	30	1	3.33	2	6.67	200.00			
Ergenekon F ₁	48	0	35	30	1	3.33						
Ergenekon F ₁	0	0.03	9	30								
Ergenekon F ₁	0	0.03	35	30								
Ergenekon F ₁	24	0.03	9	30								
Ergenekon F ₁	24	0.03	35	30	8	26.67	2	6.67	25.00			
Ergenekon F ₁	48	0.03	9	30	2	6.67						
Ergenekon F ₁	48	0.03	35	30	4	13.33	1	3.33	25.00			
Ergenekon F ₁	0	0.05	9	30								
Ergenekon F ₁	0	0.05	35	30								
Ergenekon F ₁	24	0.05	9	30								
Ergenekon F ₁	24	0.05	35	30								
Ergenekon F ₁	48	0.05	9	30	2	6.67						
Ergenekon F ₁	48	0.05	35	30	1	3.33						
Toplam					30		7			1		
Ergenekon F ₂	0	0	9	30								
Ergenekon F ₂	0	0	35	30								
Ergenekon F ₂	24	0	9	30								
Ergenekon F ₂	24	0	35	30	3	10.00	1	3.33	33.33			
Ergenekon F ₂	48	0	9	30	9	30.00	1	3.33	11.11	1	3.33	11.11
Ergenekon F ₂	48	0	35	30	7	23.33	1	3.33	14.29			
Ergenekon F ₂	0	0.03	9	30								
Ergenekon F ₂	0	0.03	35	30								
Ergenekon F ₂	24	0.03	9	30								
Ergenekon F ₂	24	0.03	35	30								
Ergenekon F ₂	48	0.03	9	30	17	56.67	2	6.67	11.76	1	3.33	5.88
Ergenekon F ₂	48	0.03	35	30	7	23.33	1	3.33	14.29			
Ergenekon F ₂	0	0.05	9	30								
Ergenekon F ₂	0	0.05	35	30								
Ergenekon F ₂	24	0.05	9	30								
Ergenekon F ₂	24	0.05	35	30	1	3.33	1	3.33	100.00			
Ergenekon F ₂	48	0.05	9	30	6	20.00	6	20.00	100.00	3	10.00	50.00
Ergenekon F ₂	48	0.05	35	30	1	3.33						
Toplam					51		13			5		
Genel												
Toplam					81		20			6		

U1: Ön Uygulama 4 °C'de (saat)
U2: Vitamin B₁₂ Uygulaması (mg l⁻¹)
U3: İnkübasyon Uygulaması (°C)
A: Atılan Anter Sayısı
E1: Embriyo Sayısı
E2: Embriyoid Oluşum Oranı (%)

B1: Embriyodan Oluşan Bitkicik Sayısı
B2: Anterden Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B3: Embriyodan Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B4: Dihaploid Bitki Sayısı
B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)
B6: Embriyoidden Gelişen Dihaploid Bitki Oranı (%)

Çizelge 4.8. Ergenekon F₁ ve Ergenekon F₂ Genotiplerinin çift faz ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%)

Genotip	U1	U2	U3	A	E1	E2	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Ergenekon F ₁	0	0	9	30								
Ergenekon F ₁	0	0	35	30								
Ergenekon F ₁	24	0	9	30								
Ergenekon F ₁	24	0	35	30								
Ergenekon F ₁	48	0	9	30								
Ergenekon F ₁	48	0	35	30								
Ergenekon F ₁	0	0.10	9	30	2	6.67	2	6.67	100.00	2	6.67	100.00
Ergenekon F ₁	0	0.10	35	30								
Ergenekon F ₁	24	0.10	9	30								
Ergenekon F ₁	24	0.10	35	30								
Ergenekon F ₁	48	0.10	9	30								
Ergenekon F ₁	48	0.10	35	30								
Ergenekon F ₁	0	0.20	9	30								
Ergenekon F ₁	0	0.20	35	30								
Ergenekon F ₁	24	0.20	9	30								
Ergenekon F ₁	24	0.20	35	30								
Ergenekon F ₁	48	0.20	9	30								
Ergenekon F ₁	48	0.20	35	30								
Toplam					2		2			2		
Ergenekon F ₂	0	0	9	30								
Ergenekon F ₂	0	0	35	30								
Ergenekon F ₂	24	0	9	30								
Ergenekon F ₂	24	0	35	30								
Ergenekon F ₂	48	0	9	30	16	53.33	5	16.67	12.50	2	6.67	12.50
Ergenekon F ₂	48	0	35	30	1	3.33	1	3.33	100.00			
Ergenekon F ₂	0	0.10	9	30								
Ergenekon F ₂	0	0.10	35	30								
Ergenekon F ₂	24	0.10	9	30								
Ergenekon F ₂	24	0.10	35	30	3	10.00	1	3.33	33.33			
Ergenekon F ₂	48	0.10	9	30								
Ergenekon F ₂	48	0.10	35	30								
Ergenekon F ₂	0	0.20	9	30								
Ergenekon F ₂	0	0.20	35	30								
Ergenekon F ₂	24	0.20	9	30								
Ergenekon F ₂	24	0.20	35	30	1	3.33	1	3.33	100.00	1	3.33	100.00
Ergenekon F ₂	48	0.20	9	30	1	3.33	1	3.33	100.00			
Ergenekon F ₂	48	0.20	35	30	2	6.67						
Toplam					24							
Genel Toplam					26		11			5		

U1: Ön Uygulama 4 °C'de (saat)
U2: Aktif Kömür Uygulaması (%)
U3: İnkübasyon Uygulaması (°C)
A: Atılan Anter Sayısı
E1: Embriyo Sayısı
E2: Embriyoid Oluşum Oranı (%)

B1: Embriyodan Oluşan Bitkicik Sayısı
B2: Anterden Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B3: Embriyodan Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B4: Dihaploid Bitki Sayısı
B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)
B6: Embriyoidden Gelişen Dihaploid Bitki Oranı (%)

Çizelge 4.9. İstek F₁ ve İstek F₂ Genotiplerinin DDV ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%)

Genotip	U1	U2	U3	A	E1	E2	B1	B2	B3	B4	B5	B6
İstek F ₁	0	0	9	30								
İstek F ₁	0	0	35	30	10	33.33	2	6.67	20.00	1	3.33	10.00
İstek F ₁	24	0	9	30	2	6.67						
İstek F ₁	24	0	35	30	35	116.67	4	13.33	11.43	1	3.33	2.86
İstek F ₁	48	0	9	30								
İstek F ₁	48	0	35	30	5	16.67	1	3.33	20.00			
İstek F ₁	0	0.03	9	30								
İstek F ₁	0	0.03	35	30								
İstek F ₁	24	0.03	9	30	7	23.33	1	3.33	14.29			
İstek F ₁	24	0.03	35	30	1	3.33	1	3.33	100.00			
İstek F ₁	48	0.03	9	30								
İstek F ₁	48	0.03	35	30	2	6.67						
İstek F ₁	0	0.05	9	30								
İstek F ₁	0	0.05	35	30	4	13.33	1	3.33	25.00			
İstek F ₁	24	0.05	9	30	4	13.33	1	3.33	25.00			
İstek F ₁	24	0.05	35	30	4	13.33	1	3.33	25.00			
İstek F ₁	48	0.05	9	30								
İstek F ₁	48	0.05	35	30	11	36.67	2	6.67	18.18			
Toplam					85		14			2		
İstek F ₂	0	0	9	30	1	3.33						
İstek F ₂	0	0	35	30								
İstek F ₂	24	0	9	30								
İstek F ₂	24	0	35	30								
İstek F ₂	48	0	9	30								
İstek F ₂	48	0	35	30	8	26.67	1	3.33	12.50			
İstek F ₂	0	0.03	9	30								
İstek F ₂	0	0.03	35	30	5	16.67	1	3.33	20.00			
İstek F ₂	24	0.03	9	30	2	6.67	1	3.33	50.00	1	3.33	50.00
İstek F ₂	24	0.03	35	30	20	66.67	2	6.67	10.00	1	3.33	5.00
İstek F ₂	48	0.03	9	30								
İstek F ₂	48	0.03	35	30								
İstek F ₂	0	0.05	9	30								
İstek F ₂	0	0.05	35	30	23	76.67	3	10.00	13.04	1	3.33	4.35
İstek F ₂	24	0.05	9	30	3	10.00	1	3.33	33.33	1	3.33	33.33
İstek F ₂	24	0.05	35	30	17	56.67	2	6.67	11.76			
İstek F ₂	48	0.05	9	30	7	23.33	6	20.00	85.71			
İstek F ₂	48	0.05	35	30	16	53.33	3	10.00	18.75			
Toplam					102		20			4		
Genel												
Toplam					187		34			6		

U1: Ön Uygulama 4 °C'de (saat)
U2: Vitamin B₁₂ Uygulaması (mg l⁻¹)
U3: İnkübasyon Uygulaması (°C)
A: Atılan Anter Sayısı
E1: Embriyo Sayısı
E2: Embriyoid Oluşum Oranı (%)

B1: Embriyodan Oluşan Bitkicik Sayısı
B2: Anterden Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B3: Embriyodan Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B4: Dihaploid Bitki Sayısı
B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)
B6: Embriyoidden Gelişen Dihaploid Bitki Oranı (%)

Çizelge 4.10. İstek F₁ ve İstek F₂ Genotiplerinin çift faz ortamında embriyoid, haploid bitkicik ve dihaploid bitki sayıları ve başarı oranları (%)

Genotip	U1	U2	U3	A	E1	E2	B1	B2	B3	B4	B5	B6
İstek F ₁	0	0	9	30								
İstek F ₁	0	0	35	30	2	6.67	1	3.33	50.00			
İstek F ₁	24	0	9	30								
İstek F ₁	24	0	35	30								
İstek F ₁	48	0	9	30								
İstek F ₁	48	0	35	30								
İstek F ₁	0	0.10	9	30	3	10.00	1	3.33	33.33			
İstek F ₁	0	0.10	35	30								
İstek F ₁	24	0.10	9	30								
İstek F ₁	24	0.10	35	30								
İstek F ₁	48	0.10	9	30								
İstek F ₁	48	0.10	35	30								
İstek F ₁	0	0.20	9	30								
İstek F ₁	0	0.20	35	30								
İstek F ₁	24	0.20	9	30								
İstek F ₁	24	0.20	35	30								
İstek F ₁	48	0.20	9	30	3	10.00	1	3.33	33.33			
İstek F ₁	48	0.20	35	30								
Toplam					8		3					
İstek F ₂	0	0	9	30								
İstek F ₂	0	0	35	30								
İstek F ₂	24	0	9	30								
İstek F ₂	24	0	35	30								
İstek F ₂	48	0	9	30								
İstek F ₂	48	0	35	30								
İstek F ₂	0	0.10	9	30								
İstek F ₂	0	0.10	35	30								
İstek F ₂	24	0.10	9	30								
İstek F ₂	24	0.10	35	30								
İstek F ₂	48	0.10	9	30								
İstek F ₂	48	0.10	35	30	3	10.00	1	3.33	33.33			
İstek F ₂	0	0.20	9	30								
İstek F ₂	0	0.20	35	30								
İstek F ₂	24	0.20	9	30	8	26.67	2	6.67	25.00			
İstek F ₂	24	0.20	35	30								
İstek F ₂	48	0.20	9	30								
İstek F ₂	48	0.20	35	30								
Toplam					11		3					
Genel												
Toplam					19		6					

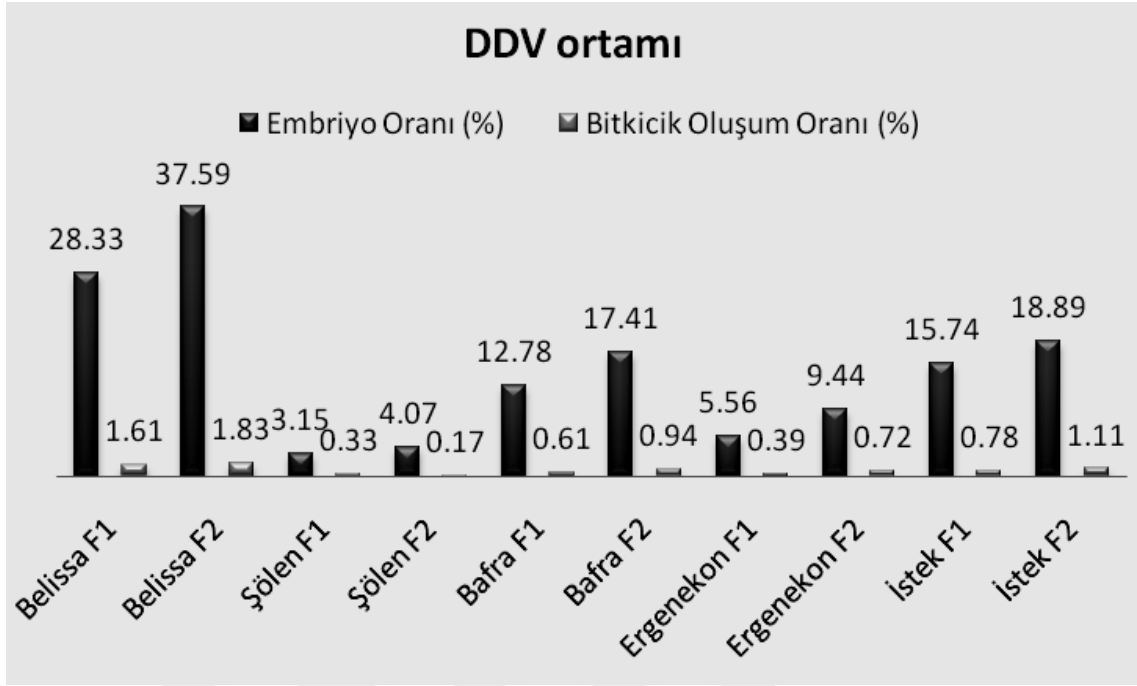
U1: Ön Uygulama 4 °C'de (saat)
U2: Aktif Kömür Uygulaması (%)
U3: İnkübasyon Uygulaması (°C)
A: Atılan Anter Sayısı
E1: Embriyo Sayısı
E2: Embriyoid Oluşum Oranı (%)

B1: Embriyodan Oluşan Bitkicik Sayısı
B2: Anterden Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B3: Embriyodan Oluşan Bitkicik Oranı (%)
B4: Dihaploid Bitki Sayısı
B5: Anterden Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)
B6: Embriyoidden Gelişen Dihaploid Bitki Oluşum Oranı (%)

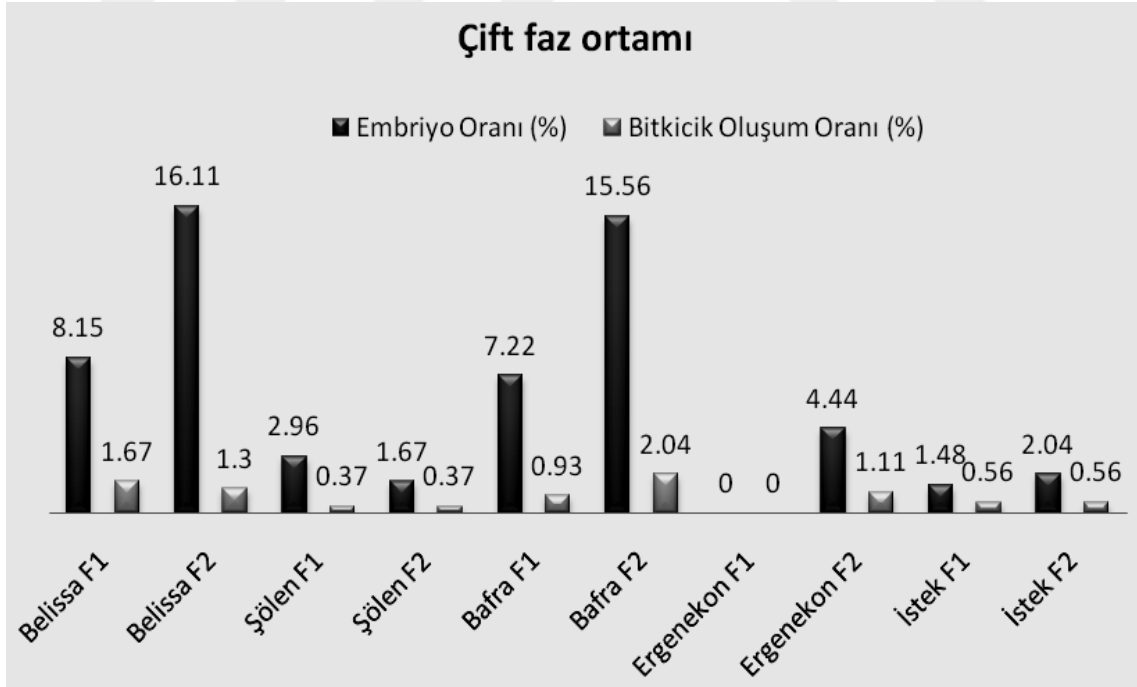
4.2. Genotiplerin Ortalama Embriyo ve Bitkicik Oluşum Oranları

Genotipler arasında embriyo oluşum oranı % 37.59 (Belissa F₂) ile % 1.48 (İstek F₁) arasında değişmiştir. Her genotipten embriyo elde edilirken sadece çift faz ortamda Ergenekon F₁ genotipinden embriyo elde edilememiştir. DDV ortamında sırasıyla Belissa, İstek ve Bafra genotipleri; çift faz ortamda Belissa ve Bafra genotipleri en yüksek embriyo oluşturan genotipler olmuşlardır. Embriyoidlerin bitkiciğe dönüşüm oranı bakımından en yüksek sonuç % 1.83 ile Belissa F₂ genotipinden elde edilmiştir. Çift faz ortamında Ergenekon F₁ genotipinde embriyoid elde edilememiştir. Çalışmada kullanılan bütün genotiplerde F₂ popülasyonlarının embriyo oluşum ve embriyodlerden bitkicik oluşum oranı F₁ popülasyonlarından daha yüksek gerçekleşmiştir. Genotiplerin embriyo ve bitkicik oluşum oranları Şekil 4.2’de DDV ortamına göre, Şekil 4.3’te çift faz ortamına göre verilmiştir.

Anter kültürü çalışmalarında donör bitkinin yetiştirme süresi, yetiştirme koşulu, besin ortamı, stres uygulamaları, genotip gibi birçok faktör başarıyı etkilemektedir. Bu faktörler arasında başarıyı etkileyen en önemli faktörün genotip olduğu birçok araştırmacı tarafından savunulmaktadır (Kristiansen ve Andersen, 1993; Qin ve Rotino, 1993; Mitykó ve ark., 1995; Rodeva ve ark., 2004; Gémes Juhász ve ark., 2009; Nowaczyk ve ark., 2009a; Seguí-Simarro ve ark., 2011; Arı ve ark., 2016). Biberde anter kültüründe genotipin etkisini araştıran Shrestha ve Kang (2009), 9 farklı biber genotipinde yürüttüğü anter kültürü çalışmasında direk ve indirek embriyo oluşumu bakımından bütün genotiplerin birbirinden farklı sonuçlar verdiğini, Taşkın ve ark. (2011), 5 biber genotipinde yürüttükleri çalışmada genotiplerin embriyo oluşturma kapasitelerinin farklı olduğunu ve aynı zamanda genotiplerin performansının kullanılan ortamlara göre de farklılıklar gösterdiğini ve yine Keles ve ark. (2015), biberde anter kültüründe başarının genotiplere bağlı olarak değiştiğini belirtmektedirler. Bu sonuçlar bizim çalışmamızda elde edilen genotiplere bağlı olarak başarıdaki değişimleri yeterince açıklamaktadır. Genotiplerin heterozigotluk düzeyleri de androgenik başarıyı doğrudan etkilemektedir. Nitekim Irikova ve ark. (2011b), biberde anter kültürü çalışmasında 8 hat ve bu hatların melezlenmesinden elde edilmiş 4 hibritin androgenik başarı düzeylerini ölçmüşler ve hibritlerin başarı düzeyinin ebeveyn hatlardan daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Benzer sonuçlar bizim çalışmamızda da görülmüştür.



Şekil 4.2. DDV ortamında genotiplerin embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

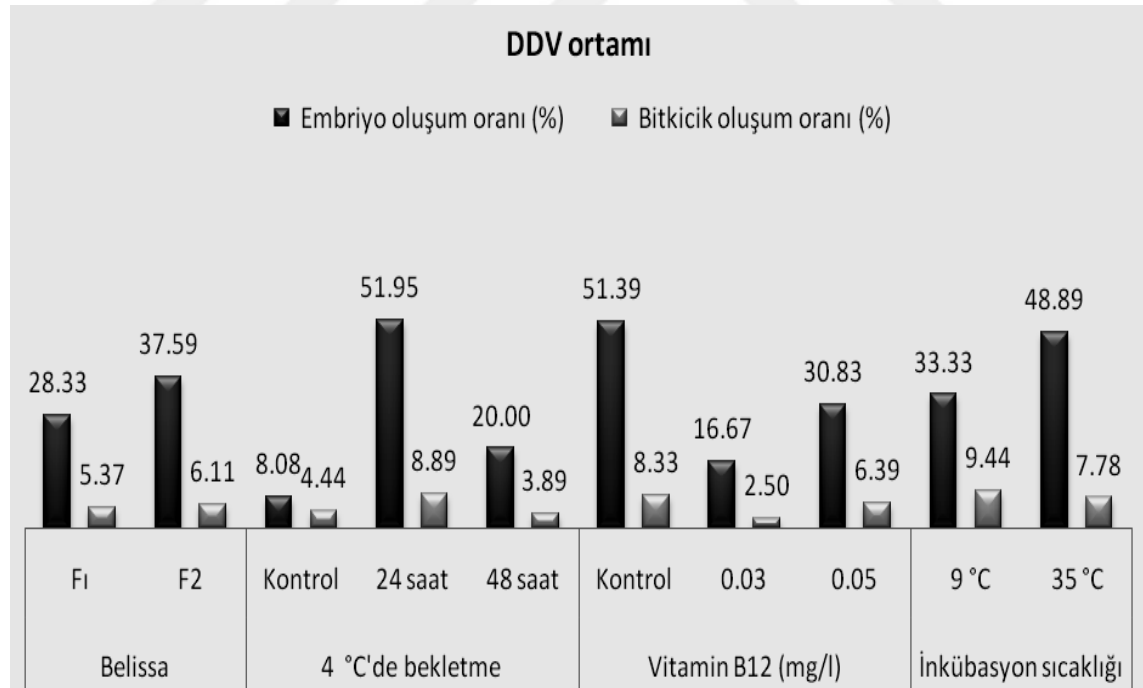


Şekil 4.3. Çift faz ortamında genotiplerin embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.3.Genotiplerin Uygulamalara Göre Embriyo ve Bitkicik Oluşum Oranları

4.3.1. DDV Ortamında Belissa

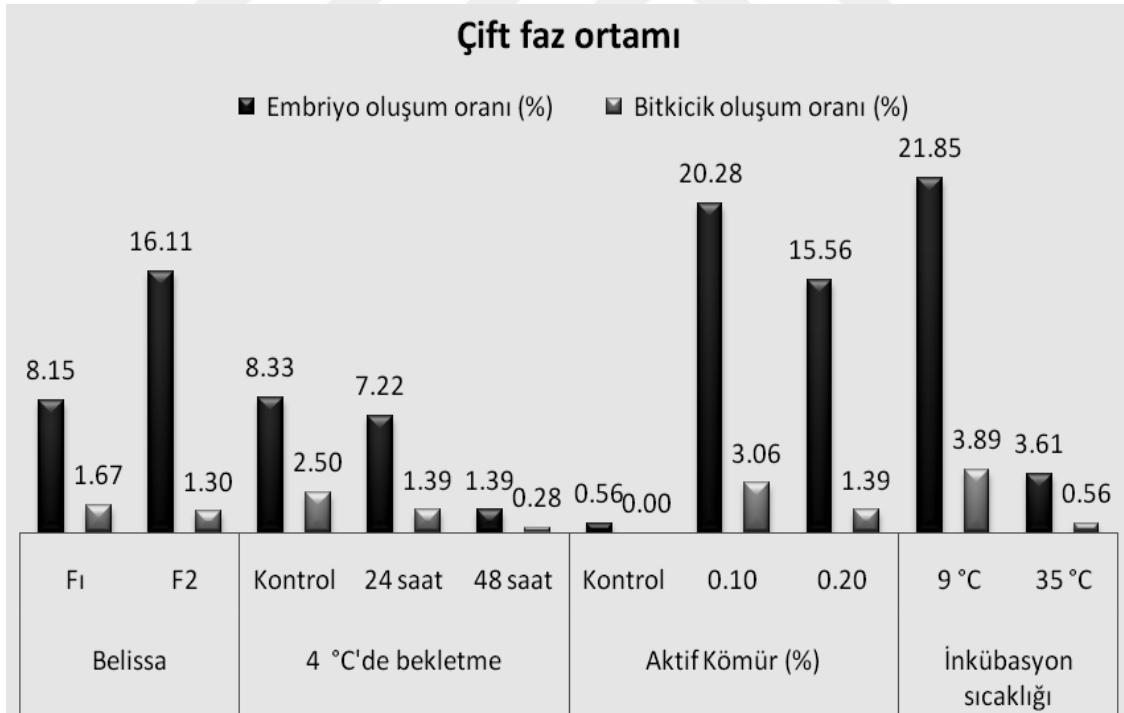
Belissa F₁ genotipinde ortalama embriyo oluşumu % 28.33, Belissa F₂'de % 37.59 olmuştur. Bitkicik oluşum oranı F₁ ve F₂ genotipinde sırayla % 5.37 ve % 6.11 olmuştur. Çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulamada ise en yüksek ortalama embriyo oluşum oranı % 51.95 ile +4 °C'de 24 saat bekletilen uygulamadan elde edilirken, bunu sırayla 48 saat ve kontrol uygulaması izlemiştir. Vitamin B₁₂ uygulaması Belissa genotipinde embriyo oluşumunu arttırmamıştır. İnkübasyon uygulamasında 35 °C'de 8 gün bekletme daha iyi sonuç vermiştir. Uygulamalara bağlı olarak bitkicik oluşum oranları embriyo oluşum oranları ile benzerlik gösterirken, 9 °C'de 8 gün bekletmede bitkiye dönüşüm oranı 35 °C'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Belissa genotipinde uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. DDV Ortamındaki Belissa genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.3.2. Çift Faz Ortamında Belissa

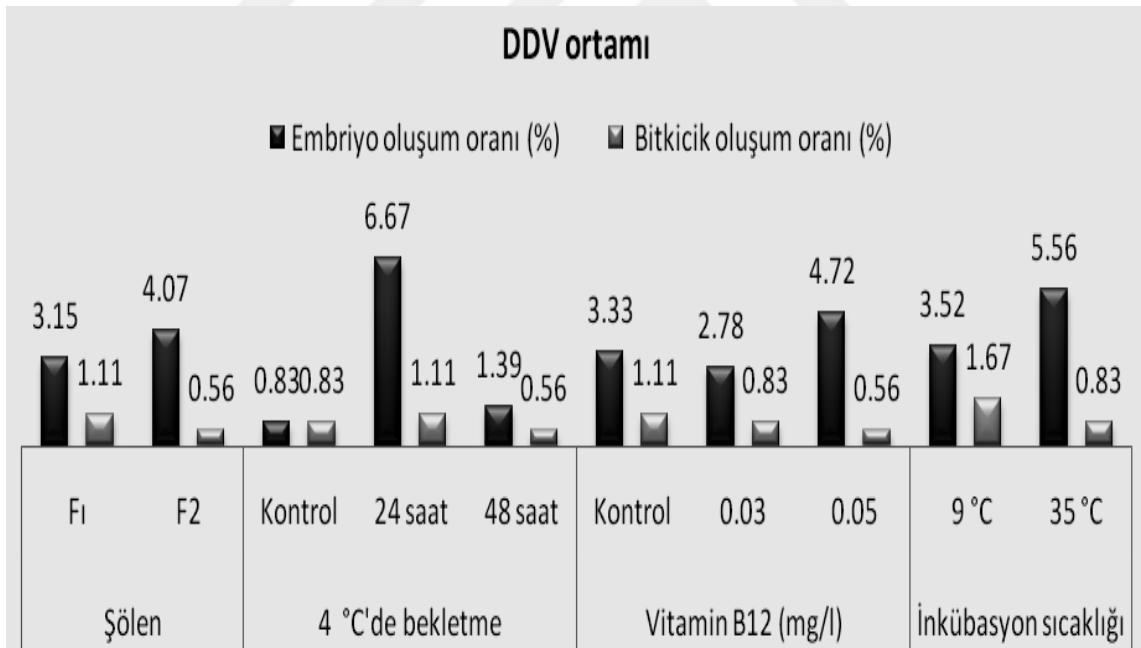
Belissa F_1 genotipinde ortalama embriyo oluşumu % 16.11, Belissa F_2 'de % 8.15 olmuştur. Bitkicik oluşum oranı F_1 ve F_2 genotipinde sırayla % 1.67 ve % 1.30 olmuştur. Çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulamada ise en yüksek ortalama embriyo oluşum oranı % 8.33 ile kontrol uygulamadan elde edilmiştir. Aktif kömür uygulaması Belissa genotipinde embriyo oluşumunu kontrole göre önemli derecede artış göstermiştir. En yüksek embriyo oluşum oranı % 20.28 ile % 0.10 aktif kömür uygulanan ortamda olmuştur. % 0.20 aktif kömür uygulanan ortamlarda ise % 15.56 embriyo oluşumu gözlenmiştir. İnkübasyon uygulamasında DDV ortamının aksine 9 °C'de 8 gün bekletme % 21.85 ile daha iyi sonuç vermiştir. Uygulamalara bağlı olarak bitkicik oluşum oranları embriyo oluşum oranları ile benzerlik göstermiştir. Çift faz ortamındaki Belissa genotipinde uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları şekil 4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Çift faz ortamındaki Belissa genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.3.3. DDV Ortamında Şölen

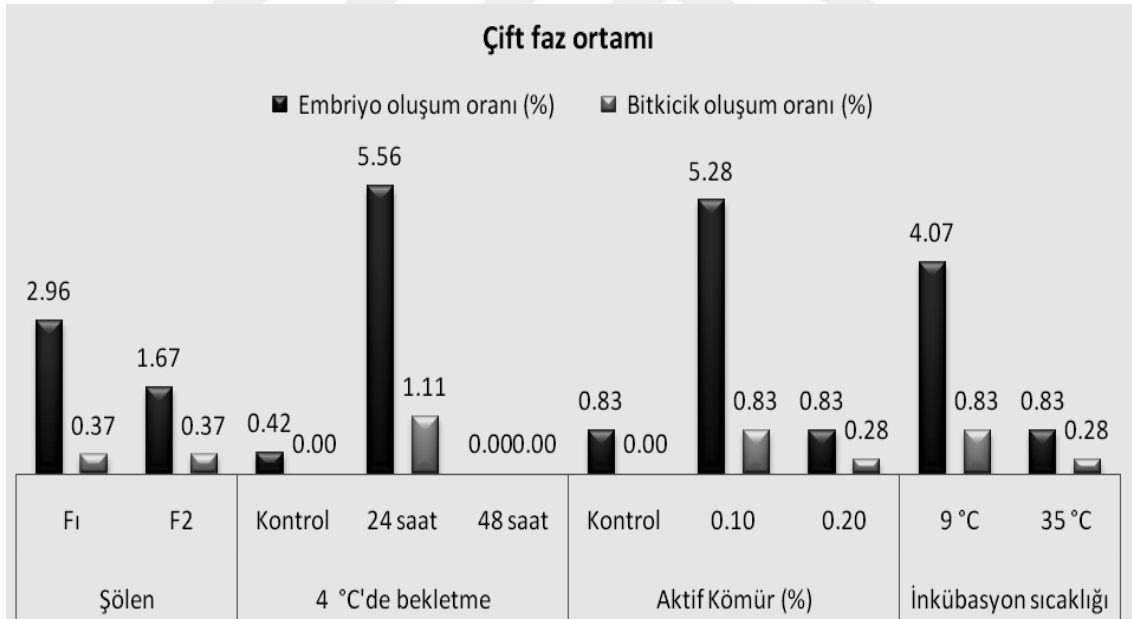
Şölen F₁ genotipinde ortalama embriyo oluşumu % 3.15, Şölen F₂'de % 4.07 olmuştur. Bitkicik oluşum oranı F₁ ve F₂ genotipinde sırayla % 1.11 ve % 0.56 olmuştur. Çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulamada ise en yüksek ortalama embriyo oluşum oranı % 6.67 ile +4 °C'de 24 saat bekletilen uygulamadan elde edilirken, bunu sırayla % 1.39 ile 48 saat ve % 0.83 ile kontrol uygulaması izlemiştir. Vitamin B₁₂ uygulaması Şölen genotipinde embriyo oluşumunu arttırmıştır. En yüksek embriyo oluşum oranı 0.05 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ uygulanan ortamda olmuştur. İnkübasyon uygulamasında 35 °C'de 8 gün bekletme daha iyi sonuç vermiştir. Uygulamalara bağlı olarak bitkicik oluşum oranları embriyo oluşum oranları ile benzerlik gösterirken, 9 °C'de 8 gün bekletmede bitkiye dönüşüm oranı 35 °C'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Şölen genotipinde uygulamalara göre embriyo oluşum ve bitkicik oluşum oranları şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. DDV ortamındaki Şölen genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.3.4. Çift Faz Ortamında Şölen

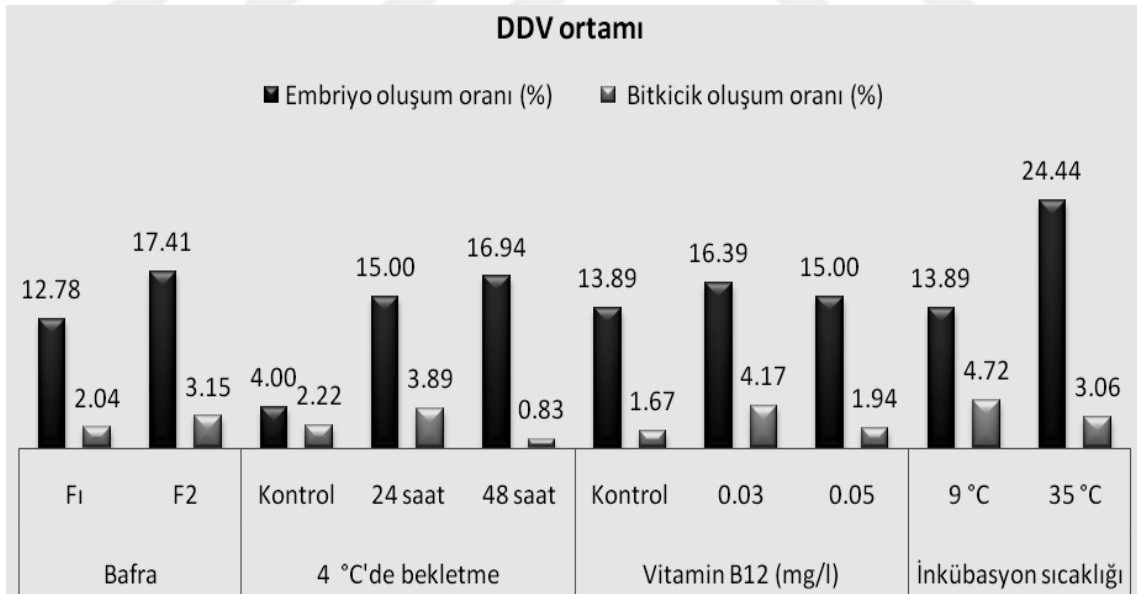
Şölen F₁ genotipinde ortalama embriyo oluşumu % 2.96, Şölen F₂'de % 1.67 olmuştur. Bitkicik oluşum oranı hem F₁'de hemde F₂'de % 0.37 olmuştur. Çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulamada ise en yüksek ortalama embriyo oluşum oranı % 5.56 ile 24 saat uygulamadan elde edilmiştir. Aktif kömür uygulaması Şölen genotipinde embriyo oluşumunu kontrole göre önemli derecede artmıştır. En yüksek embriyo oluşum oranı % 5.28 ile % 0.10 aktif kömür uygulanan ortamda olmuştur. % 0.20 aktif kömür uygulanan ortamlarda ise % 0.83 ile kontrol uygulaması ile aynı sonuç elde edilmiştir. İnkübasyon uygulamasında DDV ortamının aksine 9 °C'de 8 gün bekletme % 4.07 ile daha iyi sonuç vermiştir. Çift faz ortamındaki Şölen genotipinde uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Çift faz ortamındaki Şölen genotipinin uygulamalara göre embriyo oluşum ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.3.5. DDV Ortamında Bafra

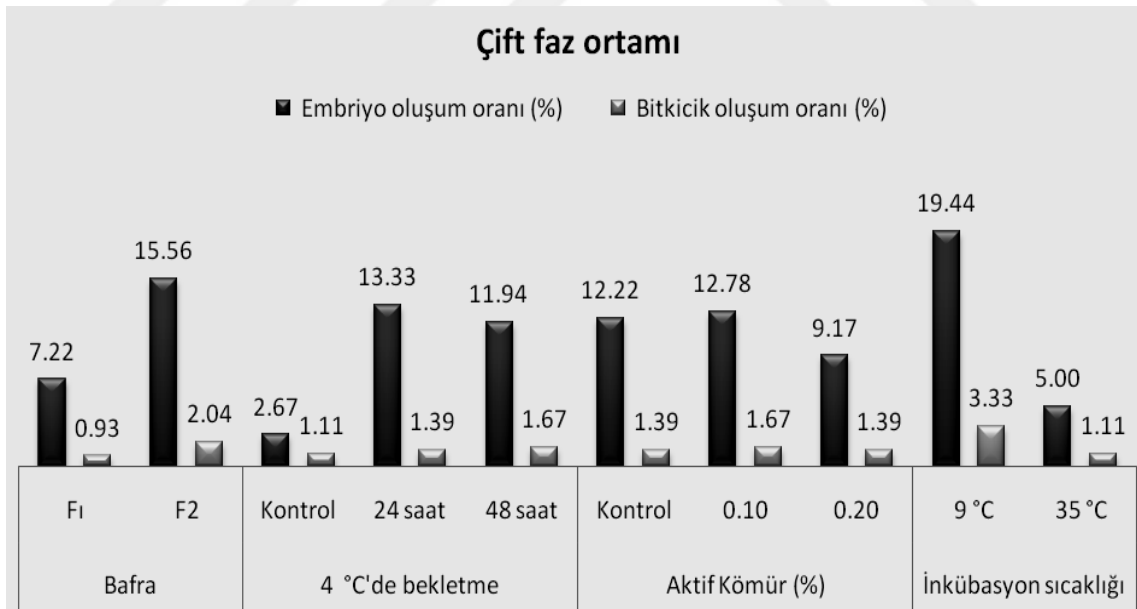
Bafra F₁'de ortalama embriyo oluşumu % 12.78, Bafra F₂'de % 17.41 olmuştur. Bitkicik oluşum oranı F₁ ve F₂'lerde sırayla % 2.04 ve % 3.15 olmuştur. Çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulamada ise en yüksek ortalama embriyo oluşum oranı % 16.94 ile +4 °C'de 48 saat bekletilen anterden elde edilirken, vitamin B₁₂ uygulaması Bafra genotipinde embriyo oluşumunu kontrole göre arttırmıştır. En yüksek embriyo oluşum oranı % 16.39 ile 0.03 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ uygulanan ortamda olmuştur. Bunu % 15.00 ile 0.05 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ ve % 13.89 ile kontrol uygulaması takip etmiştir. İnkübasyon uygulamasında 35 °C'de 8 gün bekletme daha iyi sonuç vermiştir. Uygulamalara bağlı olarak bitkicik oluşum oranları embriyo oluşum oranları ile benzerlik gösterirken, 9 °C'de 8 gün bekletmede bitkiye dönüşüm oranı 35 °C'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Bafra genotipinde uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. DDV ortamındaki Bafra genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.3.6. Çift Faz Ortamında Bafra

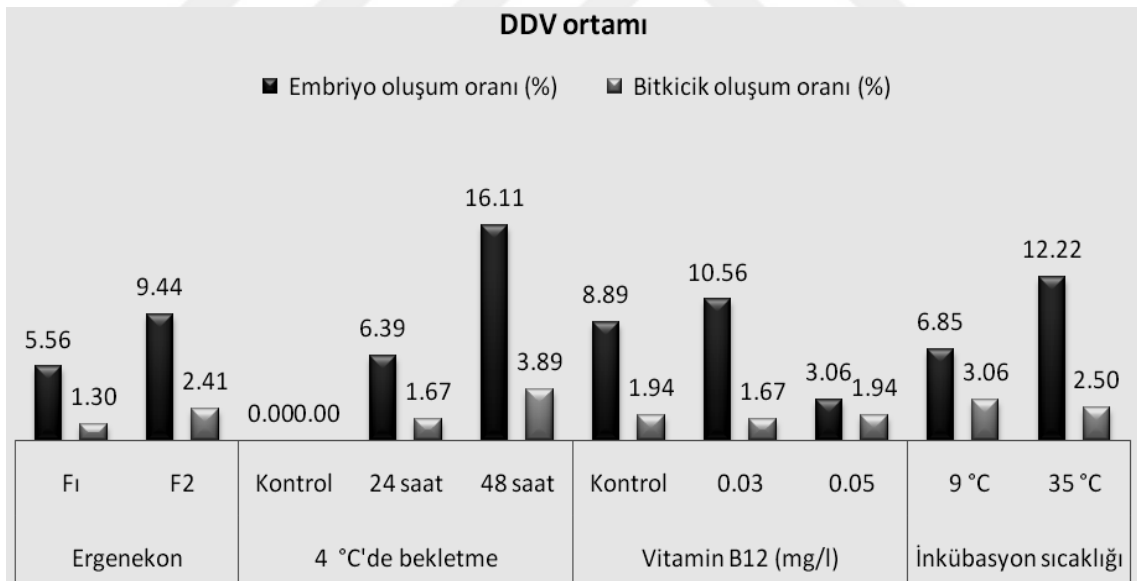
Bafra F₁'de ortalama embriyo oluşumu % 7.22, Bafra F₂'de % 15.56 olmuştur. Bitkicik oluşum oranı F₁ ve F₂ genotipinde sırayla % 0.93 ve % 2.04 olmuştur. Çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulamada ise en yüksek ortalama embriyo oluşum oranı % 13.33 ile 24 saat uygulamasından elde edilmiştir. Aktif kömürün etkisi Şölen genotipinde kontrolle göre çok az fark etmiştir. En yüksek embriyo oluşum oranı % 12.78 ile % 0.10 aktif kömür uygulanan ortamda olmuştur. Kontrol uygulaması ise % 12.22 embriyo elde edilirken bunu % 9.17 embriyo oluşumu ile % 0.20 aktif kömür uygulanan ortam takip etmiştir. İnkübasyon uygulamasında embriyo oluşum oranı DDV ortamının aksine 9 °C'de 8 gün bekletme % 19.44 ile daha iyi sonuç vermiştir. Uygulamalara bağlı olarak bitkicik oluşum oranları embriyo oluşum oranları ile benzerlik göstermiştir. Çift faz ortamındaki Bafra genotipinde uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları Şekil 4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Çift faz ortamındaki Bafra genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.3.7. DDV Ortamında Ergenekon

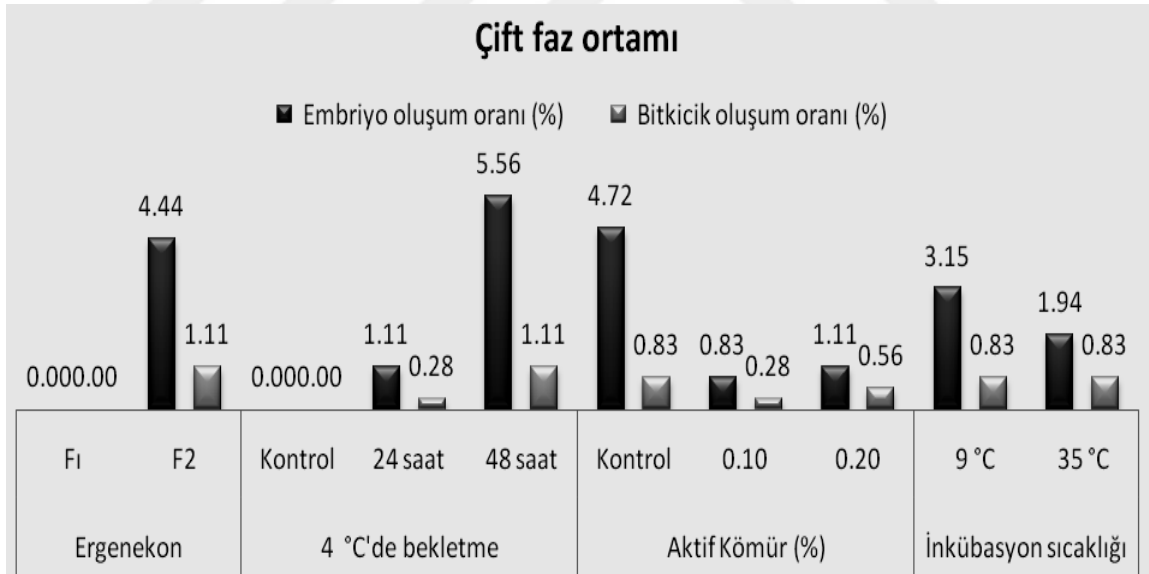
Ergenekon F₁'de ortalama embriyo oluşumu % 5.56, Ergenekon F₂'de % 9.44 olmuştur. Bitkicik oluşum oranı F₁ ve F₂ genotipinde sırayla % 1.30 ve % 2.41 olmuştur. Çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulamada ise en yüksek ortalama embriyo oluşum oranı % 16.11 ile +4 °C'de 48 saat bekletilen uygulamadan elde edilirken, kontrol uygulamasından embriyo ve bitkicik elde edilememiştir. Vitamin B₁₂ uygulaması Ergenekon genotipinde embriyo oluşumunu kontrole göre artırmıştır. En yüksek embriyo oluşum oranı % 10.56 ile 0.03 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ uygulanan ortamdan elde edilmiştir. İnkübasyon uygulamasında 35 °C'de 8 gün bekletme % 12.22 embriyo oluşumu ile daha iyi sonuç vermiştir. Uygulamalara bağlı olarak bitkicik oluşum oranları embriyo oluşum oranları ile benzerlik gösterirken, 9 °C'de 8 gün bekletmede bitkiye dönüşüm oranı 35 °C'ye göre daha yüksek bulunmuştur. Ergenekon genotipinde uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları Şekil 4.10.'da verilmiştir.



Şekil 4.10. DDV ortamındaki Ergenekon genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.3.8. Çift Faz Ortamında Ergenekon

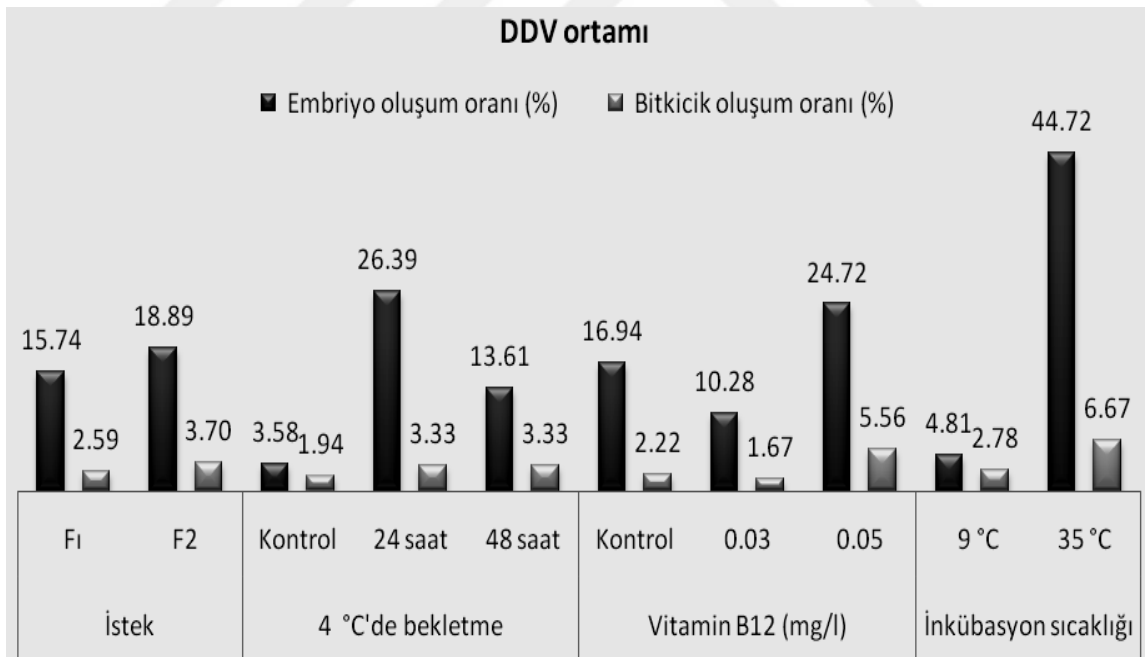
Ergenekon F₁'de ortalama embriyo oluşumu gerçekleşmezken, Ergenekon F₂'de embriyo oluşum oranı % 4.44 olmuştur. Bitkicik oluşum oranı Ergenekon F₂ genotipinde % 1.11 olmuştur. Çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulamada en yüksek ortalama embriyo oluşum oranı % 5.56 ile 48 saat uygulamasından elde edilmiştir. Ergenekon genotipinde ön uygulamada kontrol grubunda embriyo oluşmamıştır. Ergenekon genotipinde aktif kömür etkisi kontrole göre çok düşük kalmıştır. En yüksek embriyo oluşum oranı % 4.72 ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir. İnkübasyon uygulamasında embriyo oluşum oranı 9 °C'de 8 gün bekletme % 3.15 ile daha iyi sonuç vermiştir. Uygulamalara bağlı olarak bitkicik oluşum oranları embriyo oluşum oranları ile benzerlik göstermiştir. Çift faz ortamındaki Ergenekon genotipinde uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları Şekil 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Çift faz ortamındaki Ergenekon genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.3.9. DDV Ortamında İstek

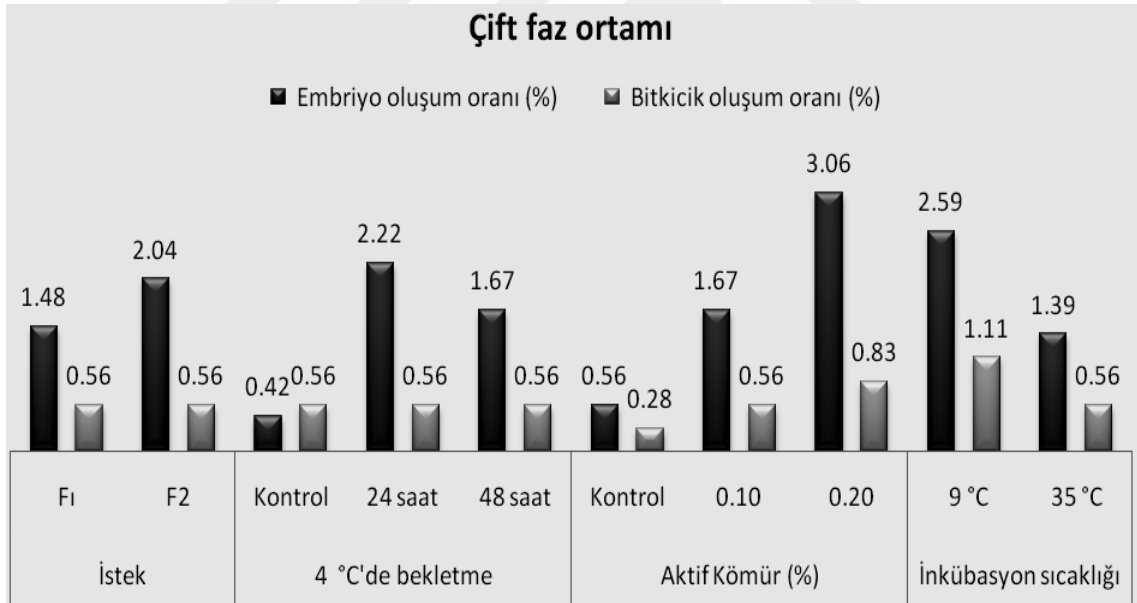
İstek F₁'de ortalama embriyo oluşumu % 15.74, İstek F₂'de % 18.89 olmuştur. Bitkicik oluşum oranı F₁ ve F₂ genotipinde sırayla % 2.59 ve % 3.70 olmuştur. Çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulamada en yüksek ortalama embriyo oluşum oranı % 26.39 ile +4 °C'de 24 saat bekletilen uygulamadan elde edilmiştir. Vitamin B₁₂ uygulaması İstek genotipinde embriyo oluşumunu kontrole göre arttırmıştır. En yüksek embriyo oluşum oranı % 24.72 ile 0.05 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ uygulanan ortamda elde edilmiştir. İnkübasyon uygulamasında 35 °C'de 8 gün bekletme % 44.72 ile daha iyi sonuç vermiştir. Uygulamalara bağlı olarak bitkicik oluşum oranları embriyo oluşum oranları ile benzerlik göstermiştir. İstek genotipinde uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları Şekil 4.12.'de verilmiştir.



Şekil 4.12. DDV ortamındaki İstek genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.3.10. Çift Faz Ortamında İstek

İstek F₁'de ortalama embriyo oluşumu % 1.48, İstek F₂'de % 2.04 olmuştur. Bitkicik oluşum oranı F₁ ve F₂ genotipinde % 0.56 olmuştur. Çiçek tomurcuklarına uygulanan ön uygulamada en yüksek embriyo oluşum oranı % 2.22 ile 24 saat uygulamasından elde edilmiştir. Aktif kömürün etkisi İstek genotipinde kontrole göre artış göstermiştir. En yüksek embriyo oluşum oranı % 3.06 ile % 0.20 aktif kömür uygulanan ortamda elde edilmiştir. İnkübasyon uygulamasında embriyo oluşum oranı DDV ortamının aksine 9 °C'de 8 gün bekletme % 2.59 ile daha iyi sonuç vermiştir. Uygulamalara bağlı olarak bitkicik oluşum oranları embriyo oluşum oranları ile benzerlik göstermiştir. Çift faz ortamındaki İstek genotipinde uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları Şekil 4.13.'de verilmiştir.

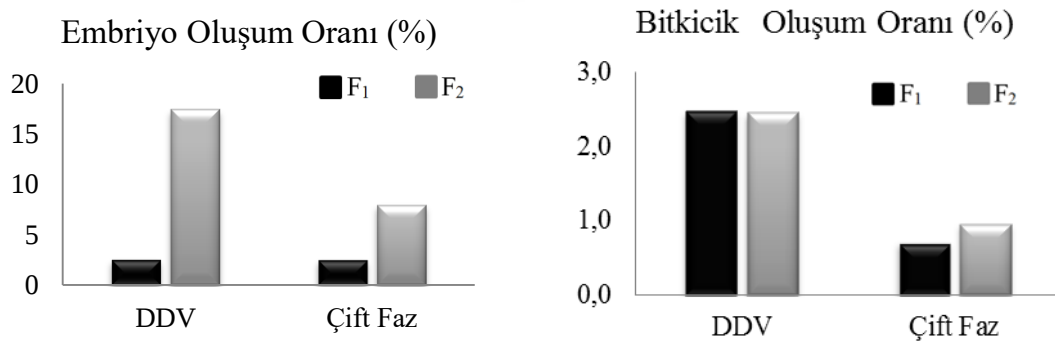


Şekil 4.13. Çift faz ortamındaki İstek genotipinin uygulamalara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

4.4. Genotiplerin F₁ ve F₂ Generasyonlarına Göre Başarı Düzeyleri

Genotiplerin F₁ ve F₂ generasyonlarının ortalama embriyo oluşturma performansları incelendiğinde, F₁ genotiplerinin embriyo oluşum oranları DDV ve çift faz ortamlarında sırasıyla % 2.48 ve 2.46 olurken. F₂ genotiplerinde embriyo oluşum oranları DDV ve çift fazlı ortamda sırasıyla % 17.48 ve 7.96 olmuştur. Aynı uygulamaların bitkicik oluşum oranlarına etkisi incelendiğinde F₁ genotiplerinde DDV ve çift fazlı ortamlarda bitkicik oluşum oranları sırasıyla % 2.48 ve 0.70; F₂ genotiplerinde DDV ve çift fazlı ortamlarda sırasıyla % 2.44 ve 1.07 olmuştur.

Çalışmada her iki ortamda da embriyoid oluşturmada F₂ genotipleri F₁ genotiplerine göre iki katından daha fazla başarılı sonuç vermiştir. Ancak bu başarı farkı bitkicik oluşum oranlarında görülmemiştir. Bu sonuç, embriyo oluşum oranı yüksek olan uygulamalarda bitkiciğe dönüşüm aşamasında kayıpların daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir. F₁ ve F₂ genotiplerinin ortamlara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranları Şekil 4.14.'de verilmiştir.



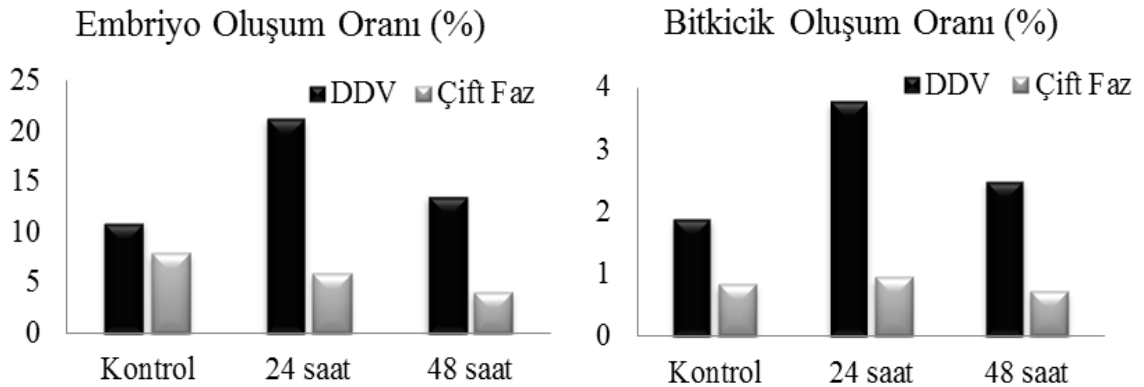
Şekil 4.14. Ortamlara ve F₁-F₂ genotiplerine göre ortalama embriyo ve bitkicik oluşum oranları (%)

Anter kültüründe genotip farklılığının yanında genotiplerin heterozigotluk düzeyleri de başarı oranını etkilemektedir. Heterozigotluk azaldıkça başarı artmaktadır. Çalışmada F₂ genotiplerinde embriyo oluşum oranının F₁ genotiplerine göre daha yüksek olması, F₂ genotiplerinde bir generasyonluk kendilemeye bağlı olarak heterozigotluk düzeyinin azalmasından kaynaklanmıştır. Başay ve Ellialtıoğlu (2013), patlıcanda standart genotiplerin F₁ genotiplere göre daha yüksek embriyoid oluşturduğunu; Mityko ve ark.

(1995), biberde standart çeşitlerin hibrit çeşitlere göre anter kültüründe daha yüksek embriyo oluşturdıklarını belirtmektedirler. Bulgar biber genotiplerinde çalışan Rodeva ve ark. (2014), benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Nowaczyk ve Kisiala (2006), melez biberlerde embriyo oluşum oranının ebeveynlere göre daha düşük olduğunu belirtmektedirler. Araştırmacıların sonuçları bizim çalışmamızda elde edilen sonuçları desteklemektedir.

4.5. Tomurcuklara Düşük Sıcaklık Uygulamasının Embriyo ve Bitkicik Oluşumu Üzerine Etkisi

Tomurcuklara yapılan ön uygulamaların ortamlara göre embriyo ve bitkicik oluşumuna etkileri incelendiğinde, en yüksek embriyo oluşumu % 21.28 ile tomurcukların 24 saat 4 °C'de bekletildiği DDV ortamında elde edilirken bunu % 13.61 ile 4 °C'de 48 saat bekletilen DDV ortamı izlemiştir. Çift faz ortamında ise kontrol uygulaması en yüksek sonucu vermiştir. Bitkicik oluşum oranları incelendiğinde tomurcukların 24 saat 4 °C'de bekletildiği DDV ortamında % 3.77 ile en yüksek sonuç alınırken, bunu % 2.50 bitkicik oluşumu ile 48 saat uygulaması izlemiştir. Çift faz uygulamasında kontrol ve 24 saat uygulaması birbirine çok yakın bulunurken (% 0.83-0.94), 48 saat uygulaması en düşük oranı vermiştir. Tomurcuklara ön uygulama yapılmasının ortamlara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranlarına etkisi Şekil 4.15.'de verilmiştir.

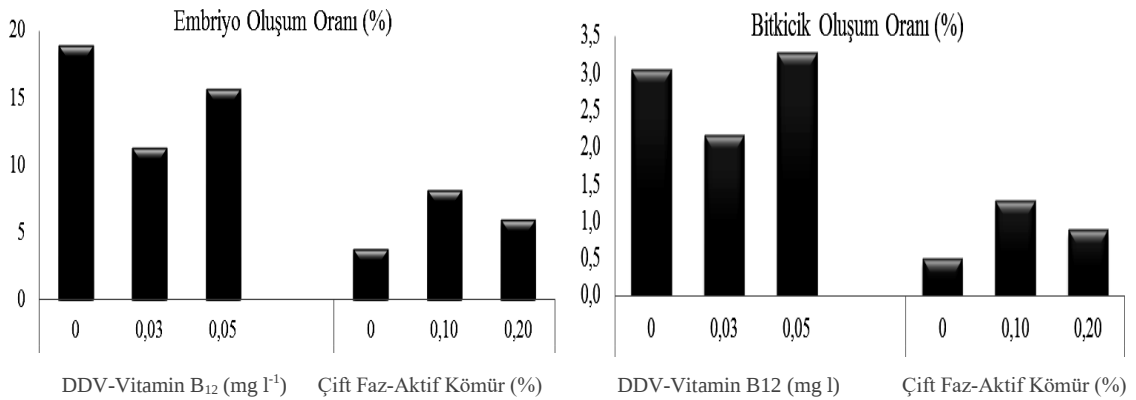


Şekil 4.15. Tomurcuklara ön uygulama yapılmasının ortamlara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranlarına etkisi (%)

4.6. Vitamin B₁₂ ve Aktif Kömür Uygulamalarının Embriyo ve Bitkicik Oluşumu Üzerine Etkisi

DDV ortamında vitamin B₁₂ uygulamasının embriyo oluşumuna etkisi incelendiğinde en yüksek embriyo oluşumu % 18.88 ile vitamin B₁₂ uygulanmayan kontrol uygulamasından elde edilirken 0.05 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ uygulaması % 15.66 embriyo oluşum oranı ile ikinci sırada yer almıştır. Vitamin B₁₂ uygulaması bitkicik oluşumu üzerine kontrole göre daha etkili olmuştur. Kontrol uygulamasında bitkicik oluşum oranı % 3.05 olurken, 0.05 mg l⁻¹ vitamin B₁₂ uygulamasında % 3.27 olmuştur. Vitamin B₁₂ uygulamasının embriyo ve bitkicik oluşum oranlarına etkisi Şekil 4.16.'da verilmiştir.

Çift faz ortamında aktif kömür kullanılması embriyo oluşumuna olumlu etki yapmıştır. En yüksek embriyo oluşumu % 8.16 ile % 0.10 aktif kömür kullanılan uygulamadan elde edilirken bunu % 0.20 aktif kömür ve kontrol uygulamaları izlemiştir. Aktif kömür uygulamasında bitkicik oluşum oranları da benzerlik göstermiştir. En yüksek bitkicik oluşumu % 1.28 ile % 0.10 aktif kömür uygulamasından elde edilirken bunu sırasıyla % 0.20 ve kontrol uygulamaları takip etmiştir. Aktif kömür uygulamasının embriyo ve bitkicik oluşum oranlarına etkisi Şekil 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.16. Vitamin B₁₂ ve aktif kömür uygulamasının embriyo ve bitkicik oluşum oranlarına etkisi (%)

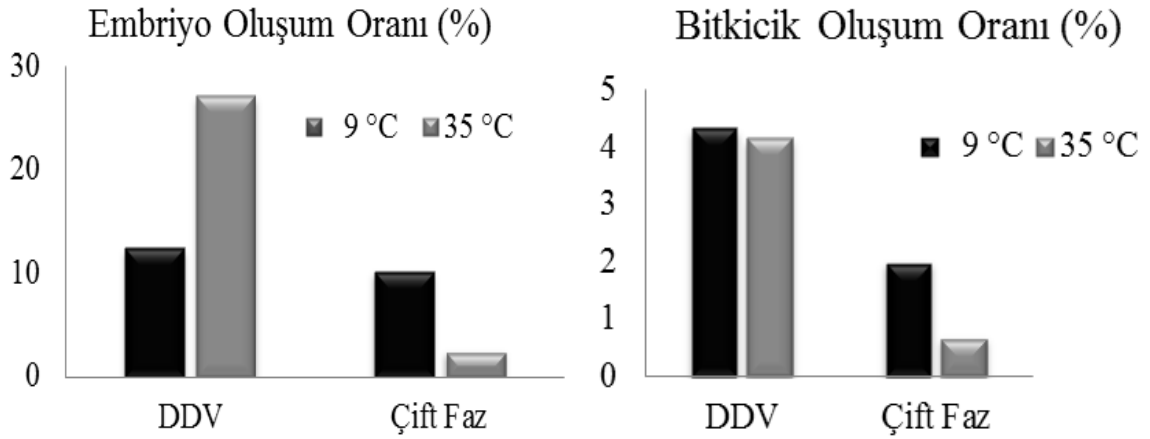
Çalışmada sadece C ortamında B₁₂ vitamininin farklı dozları kullanılmış, kontrole göre embriyo oluşumunda bir artış sağlamamıştır. Irikova ve ark. (2011a), biberde anter

kültüründe başarı oranının artmasında vitaminlerin önemli rol oynadığını, B₁₂ vitaminin de içinde yer aldığı besin ortamı vitaminlerinin hem C, hem de R ortamında bulunması gerektiğini önermektedirler. B₁₂ vitamin uygulamasının etkili olmaması dozların düşük kalmış olma olasılığından da kaynaklanabilir. Zira Ionescu ve Tudor (1994), biberde anter kültürü çalışmalarında en yüksek androgenik yanıtı 0.04 mg l⁻¹ B₁₂ vitamini uygulamasından aldıklarını belirtmektedirler. Başay ve Ellialtıoğlu, (2013), patlıcanda yürüttükleri anter kültürü çalışmasında bazı genotiplerden olumlu sonuç almışlardır. Araştırmacılar DDV kültür ortamında B₁₂ vitaminini 0.2 mg l⁻¹ olarak kullanmışlardır.

Aktif kömür genelde *in vitro* çalışmalarda, özelde anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. Etki mekanizması *in vitro* çalışmalarda ortamdaki veya explanttan kaynaklanan inhibitörlerin ve zararlı gazların etkilerini ortadan kaldırması şeklindedir (Pan ve Van Staden, 1998; Thomas, 2008). Bu çalışmada da % 0.10 mg l⁻¹ aktif kömür uygulanması en yüksek embriyo oluşumunu vermiştir. Yang ve ark. (2009), biberde anter kültürü çalışmalarında farklı bileşenlere sahip ortamları denemişler ve en yüksek embriyo oluşumunu 1.5 g l aktif kömür kullandıkları ortamdan elde etmişlerdir. Nowaczyk ve Kisiala (2006), biberde anter kültüründe 0.5 g l aktif kömür kullandığı ortamlarda aktif kömürün embriyo oluşumunu artırdığını, ancak bu etkinin ortamdaki diğer bileşenlere göre değişebileceğini belirtmektedirler.

4.7. İnkübasyon Uygulamasının Embriyo ve Bitkicik Oluşumuna Etkisi

Anterlere inkübasyon uygulamalarının ortamlara göre embriyo ve bitkicik oluşumu üzerine etkileri incelendiğinde en yüksek embriyo oluşum oranı % 27.16 ile DDV ortamında 35 °C’de elde edilirken bunu sırasıyla % 12.48 ve 10.22 ile DDV ortamı 9 °C ve çift faz ortamında 9 °C uygulamaları izlemiştir. DDV ortamında 35 °C uygulaması daha etkili olurken, çift faz ortamında 9 °C uygulaması daha etkili olmuştur. İnkübasyon uygulamalarının bitkicik oluşumuna etkisine bakıldığında en yüksek bitkicik oluşumu % 4.33 ve 4.16 ile DDV ortamında sırasıyla 9 ve 35 °C uygulamalarından elde edilmiştir. İnkübasyon uygulamalarının ortamlara göre embriyo ve bitkicik oluşumuna etkisi Şekil 4.17.’de verilmiştir.



Şekil 4.17. İnkübasyon uygulamasının ortamlara göre embriyo ve bitkicik oluşum oranlarına etkisi (%)

Anter kültürü çalışmalarında yüksek veya düşük sıcaklık şokları androgenik başarıyı veya kallogenesisini olumlu yönde tetiklemektedir (Sangwan ve Sangwan-Norreel, 1990). Her ne kadar inkübasyon veya şok uygulamalarının etki mekanizması tam olarak bilinmesede kültüre alınmış anterlerde ABA seviyesini azaltmasının etkili olacağı savunulmaktadır (Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997). Değişik bitki türlerinde farklı besin ortamlarında inkübasyon uygulamalarının kallus veya embriyo oluşumunu teşvik ettiği birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiş ve tartışılmıştır. (Dias ve Correia, 2002; Calleberg ve Johansson, 1993; Feng ve Wolyn, 1991; Xynias ve ark., 2001; Dunwell, 1985; Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Matsubara ve ark., 1998). Literatüre göre biberde yüksek sıcaklık stresi (35 °C) androgenik başarı üzerine düşük sıcaklık stresinden (7-9 °C) çok daha fazla etkili olmaktadır (Barany ve ark., 2005; Kim ve ark., 2004; Koleva-Gudeva ve ark., 2007). Bu sonuçlar bizim çalışmamızda DDV ortamında elde edilen bulguları desteklemektedir. İnkübasyon uygulaması anter kültürü çalışmalarında diğer uygulamalara göre de değişebilmektedir. Supena ve ark. (2006), çift fazlı anter kültürü ortamında inkübasyon sıcaklığının 35 °C den 9 °C'ye kadarki etkilerini incelemiş ve en yüksek embriyo gelişimini 8 gün süreyle 9 °C inkübasyon uygulamasından elde etmiştir. Bizim çalışmamızda da çift fazlı ortamda 9 °C inkübasyon uygulaması daha başarılı olmuştur.

4.8. Dihaploid Hatların Bazı Morfolojik ve Agronomik Özellikleri

Anter kültürü çalışması sonucunda 6 adet kapyra, 11 adet dolma, 6 adet üç burun ve 4 adet tatlı sivri biber olmak üzere toplamda 27 adet dihaploid hat elde edilmiştir. Denemede elde edilen hatların morfolojik karakterizasyonu için bitkiler klima kontrollü polikarbon örtülü sera koşullarında yetiştirilmiştir. Bu hatların bazı morfolojik özellikleri Çizelge 4.11’de verilmiştir. Çizelgede dihaploid hatların meyve şekli, meyve eni, meyve boyu, meyve sayısı, meyve eti kalınlığı ve hibrit çeşit ıslahında yarıyol materyali olarak kullanılıp kullanılamayacağı görsel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre kapyra biber tipinde 4 genotip, dolma biber tipinde 6 genotip, üç burun biber genotipinde 4 genotip ve tatlı sivri biber tipinde 3 genotip yarıyol materyali (hibrit çeşit ıslahı için ebeveyn) potansiyeli yüksek bulunmuştur. Morfolojik gözlemlerin yapıldığı dönem içinde bu hatlar arasında diallel melezlemeler de yapılmıştır. Böylece ileriki yıllarda bu hatların genel ve özel kombinasyon yetenekleri belirlenecektir. Çalışma sonunda elde edilen bu homozigot hatlar kullanılarak yerli hibrit biber çeşitlerinin geliştirilmesi mümkün olacaktır. Denemede elde edilen dihaploid hatların bitki ve meyve özellikleri Şekil 4.18’den 4.44’e kadar verilmiştir.

Çizelge 4.11 Elde edilen saf hatlarda yapılan gözlemler

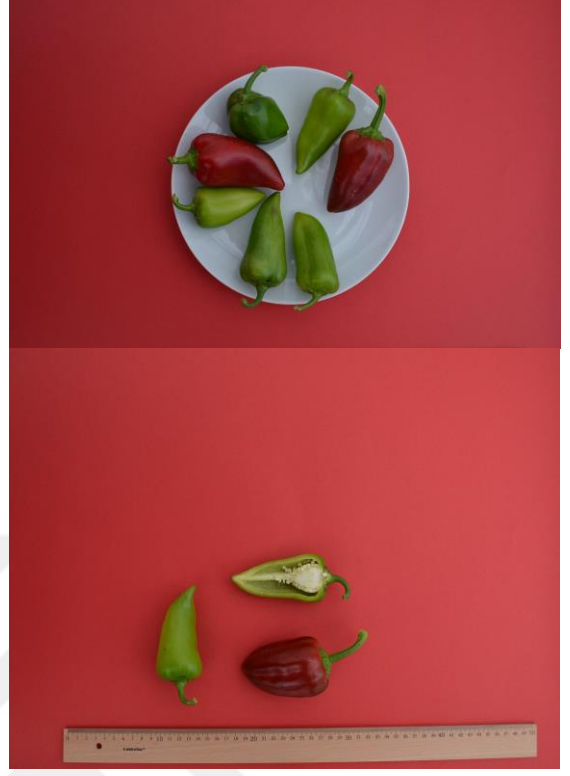
Hat	Meyve Tipi	Toplam meyve sayısı (adet/bitki)	Meyve eni (cm)	Meyve Boyu (cm)	Meyve eti kalınlığı (mm)	Toplam verim (kg/bitki)	Yarıyol materyali potansiyeli*
B-01	Kapya	32.00	56.48	21.41	6.18	2.72	İyi
B-02	Kapya	324.00	38.82	22.32	3.83	15.86	Orta
B-03	Kapya	12.00	00.00	00.00	0.00	1.83	İyi
B-04	Kapya	280.00	44.87	28.04	5.23	18.46	Kötü
B-05	Kapya	114.00	00.00	00.00	0.00	1.56	İyi
B-06	Kapya	78.00	54.00	21.26	6.97	6.28	İyi
E-01	Dolma	242.00	37.94	15.83	3.18	13.21	İyi
E-02	Dolma	334.00	40.41	14.60	3.36	18.30	İyi
E-03	Dolma	316.00	44.13	12.77	3.58	7.49	İyi
E-04	Dolma	114.00	50.88	12.45	4.24	4.14	Kötü
E-05	Dolma	222.00	31.72	9.66	1.88	4.18	İyi
E-06	Dolma	196.00	32.97	11.44	2.73	4.46	İyi
E-07	Dolma	196.00	38.97	10.93	2.65	5.78	Kötü
E-08	Dolma	176.00	36.81	11.66	2.76	4.88	Kötü
E-09	Dolma	240.00	38.34	12.23	2.64	6.38	Kötü
E-10	Dolma	186.00	37.76	6.64	2.41	5.31	Kötü
E-11	Dolma	198.00	37.04	13.07	2.55	16.06	İyi
İ-01	Üçburun	364.00	43.26	14.28	4.62	12.88	İyi
İ-02	Üçburun	246.00	44.56	16.26	2.89	11.90	İyi
İ-03	Üçburun	512.00	27.75	20.64	3.06	18.34	İyi
İ-04	Üçburun	84.00	33.79	8.90	2.76	1.22	Kötü
İ-05	Üçburun	290.00	28.50	18.11	3.69	11.11	İyi
İ-06	Üçburun	328.00	41.01	12.43	3.02	9.63	Kötü
Ş-01	Tatlı sivri	308.00	15.71	30.58	1.84	7.71	İyi
Ş-02	Tatlı sivri	614.00	21.65	31.80	2.70	17.92	İyi
Ş-03	Tatlı sivri	478.00	15.02	33.79	1.56	13.12	Orta
Ş-04	Tatlı sivri	652.00	16.28	32.37	2.14	19.51	İyi

* Morfolojik gözlemlerin yapıldığı aşamada bitkinin gelişme durumu, meyvenin bitkide duruşu ve dağılımı, dallanma durumu, yan dal sayısı, yaprakların duruşu, meyvede şekil bozukluğu, çiçek burnu çürüklüğüne hassaslığı, meyvede tohum miktarı, meyvenin kopma direnci, albenisi ve benzeri özellikler dikkate alınarak tez danışmanı, tez öğrencisi ve 1 doktora öğrencisi ile birlikte iyi, orta, kötü değerlendirmesi yapılmıştır. Bu gözlem tek başına kriter olarak esas alınmayacaktır. İlerde yapılacak kombinasyon testlerinde fikir vermesi bakımından yararlı olacağı düşünülmüştür.



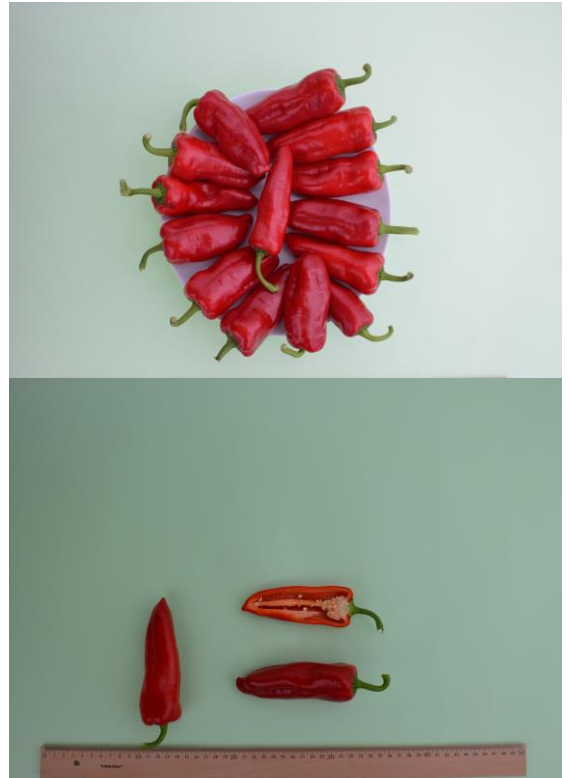
B-01

Şekil 4.18. Belissa genotipinden elde edilen B-01 hattının bitki ve meyvesi



B-02

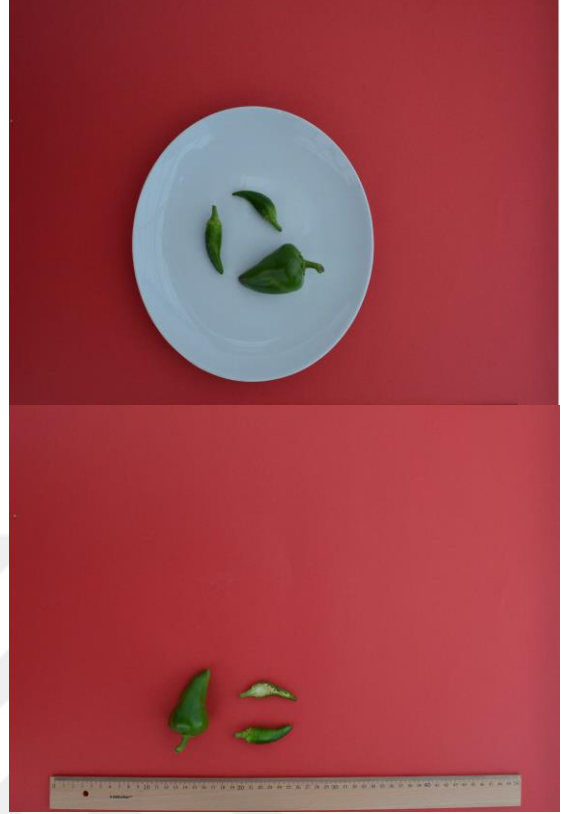
Şekil 4.19. Belissa genotipinden elde edilen B-02 hattının bitki ve meyvesi





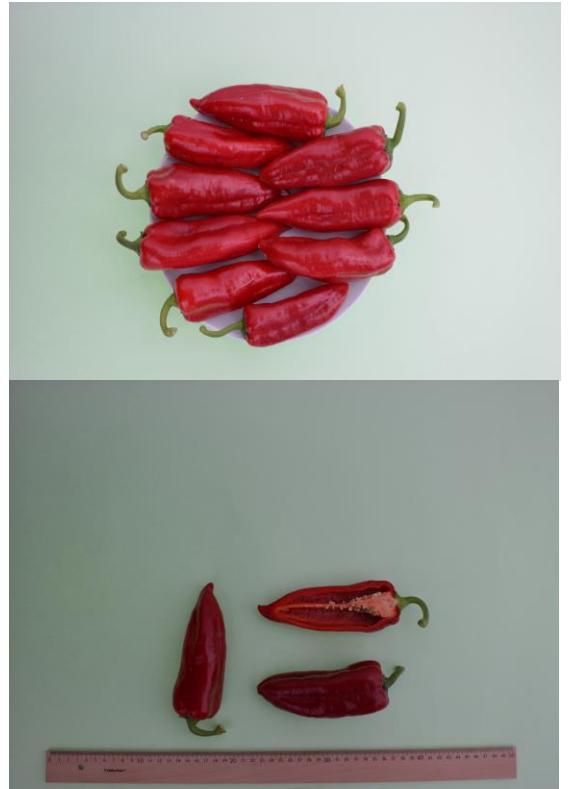
B-03

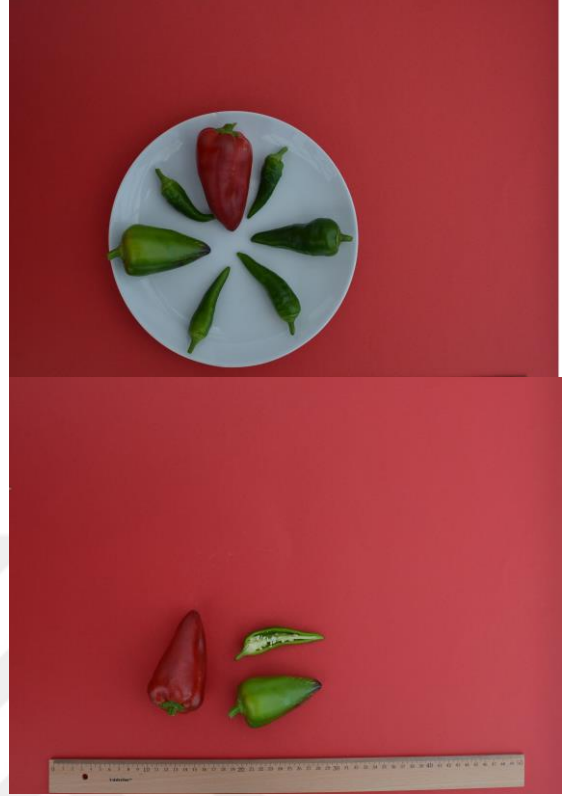
Şekil 4.20. Belissa genotipinden elde edilen B-03 hattının bitki ve meyvesi



B-04

Şekil 4.21. Belissa genotipinden elde edilen B-04 hattının bitki ve meyvesi





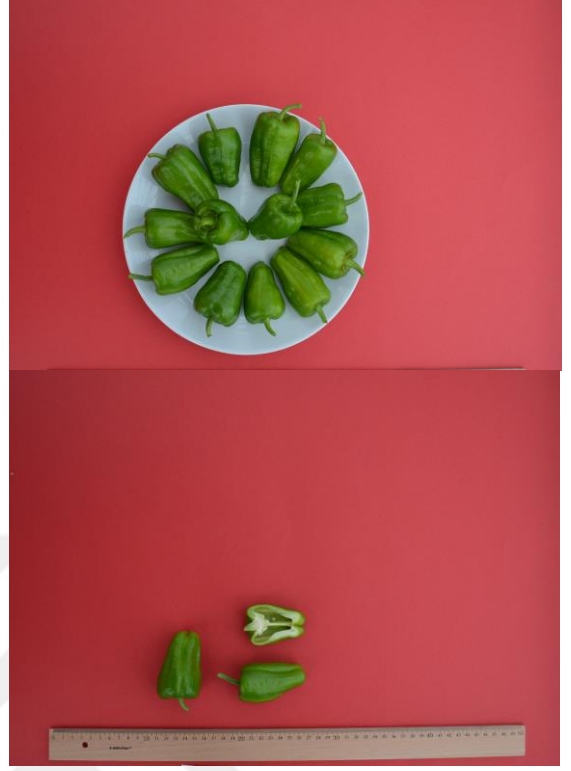
B-05

Şekil 4.22. Belissa genotipinden elde edilen B-05 hattının bitki ve meyvesi



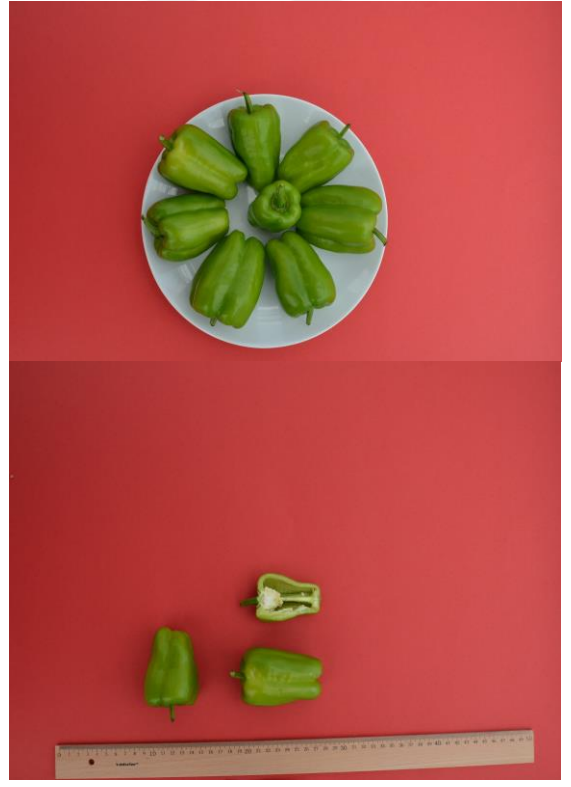
B-06

Şekil 4.23. Belissa genotipinden elde edilen B-06 hattının bitki ve meyvesi



E-01

Şekil 4.24. Ergenekon genotipinden elde edilen E-01 hattının bitki ve meyvesi



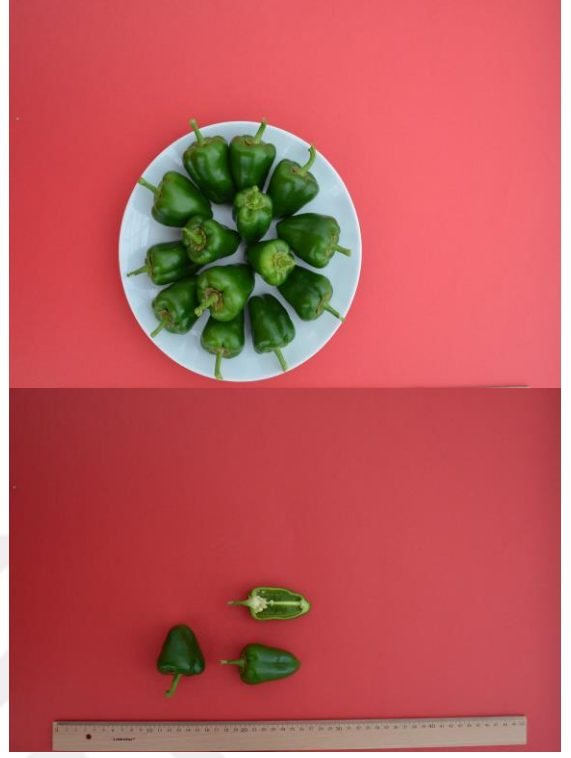
E-02

Şekil 4.25. Ergenekon genotipinden elde edilen E-02 hattının bitki ve meyvesi



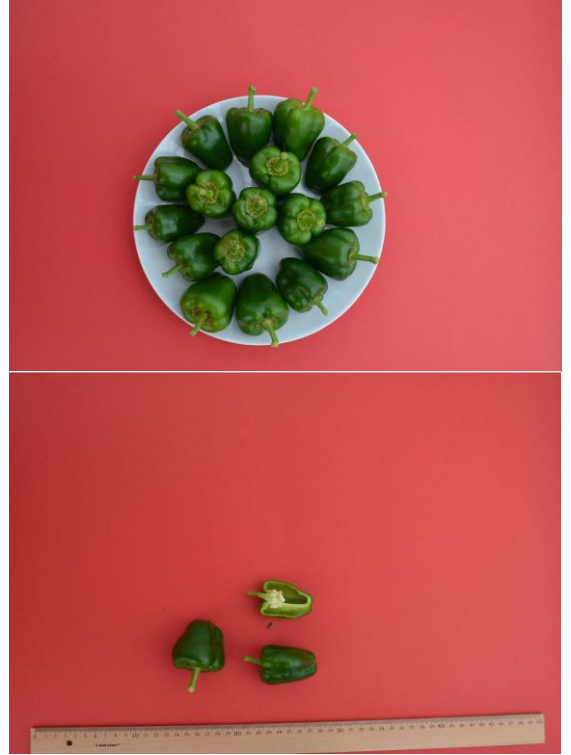
E-03

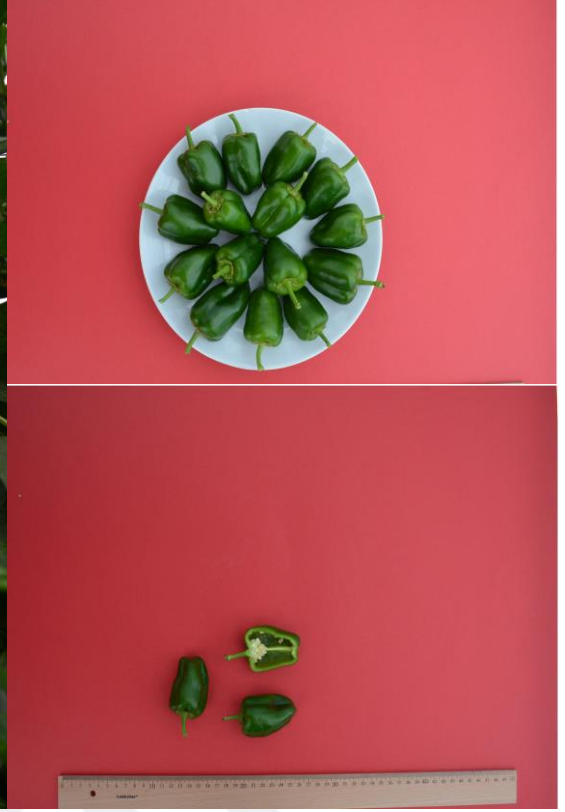
Şekil 4.26. Ergenekon genotipinden elde edilen E-03 hattının bitki ve meyvesi



E-04

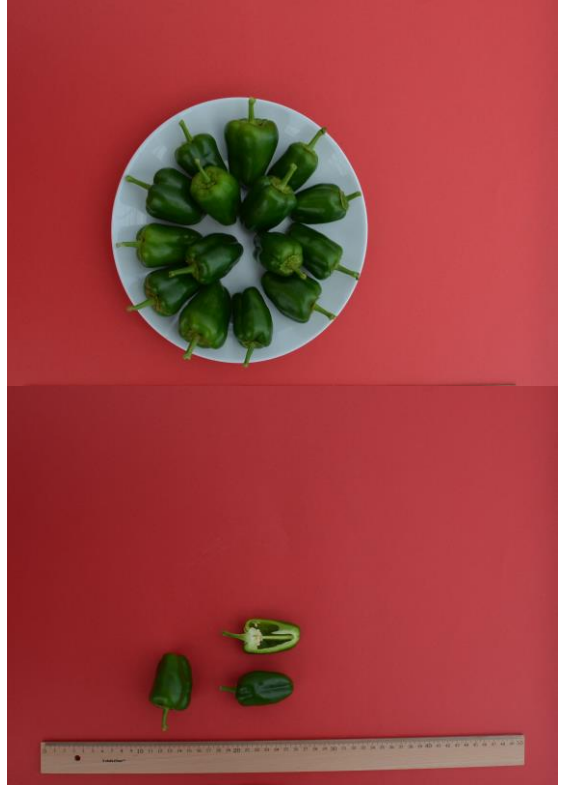
Şekil 4.27. Ergenekon genotipinden elde edilen E-04 hattının bitki ve meyvesi





E-05

Şekil 4.28. Ergenekon genotipinden elde edilen E-05 hattının bitki ve meyvesi



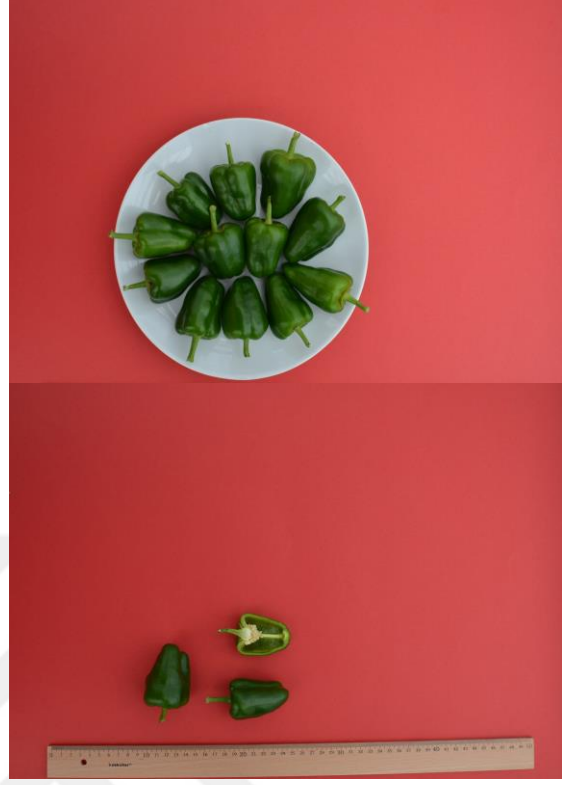
E-06

Şekil 4.29. Ergenekon genotipinden elde edilen E-06 hattının bitki ve meyvesi



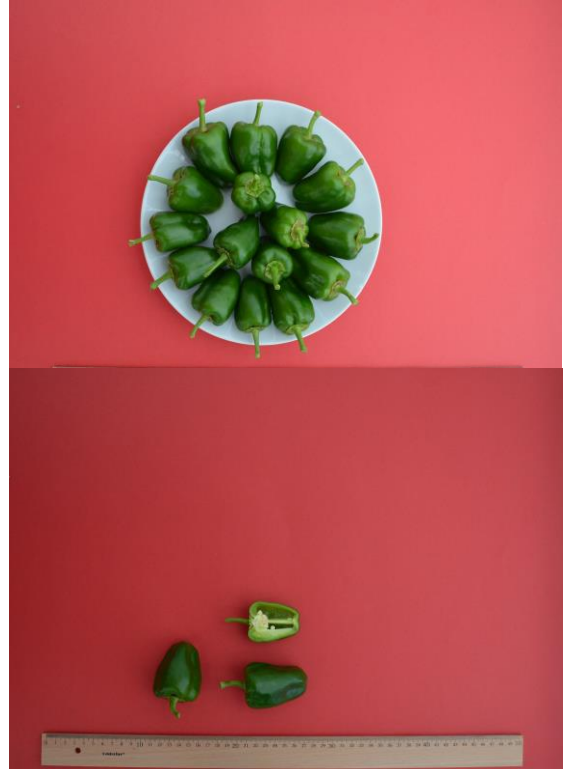
E-07

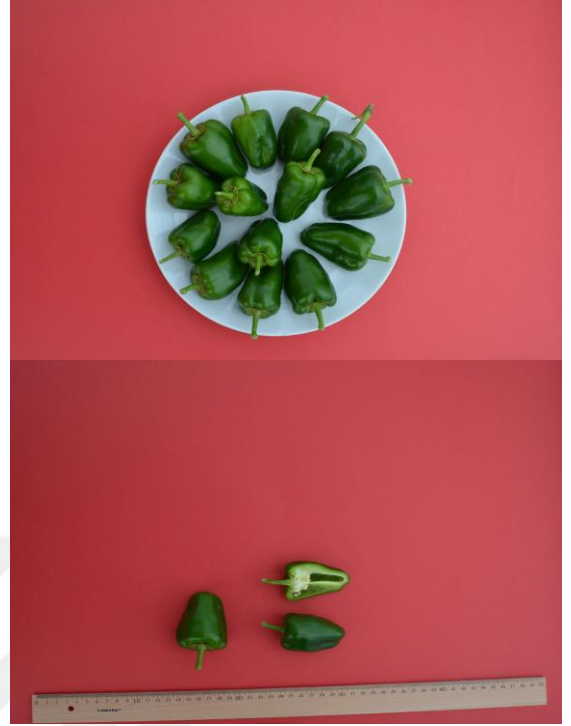
Şekil 4.30. Ergenekon genotipinden elde edilen E-07 hattının bitki ve meyvesi



E-08

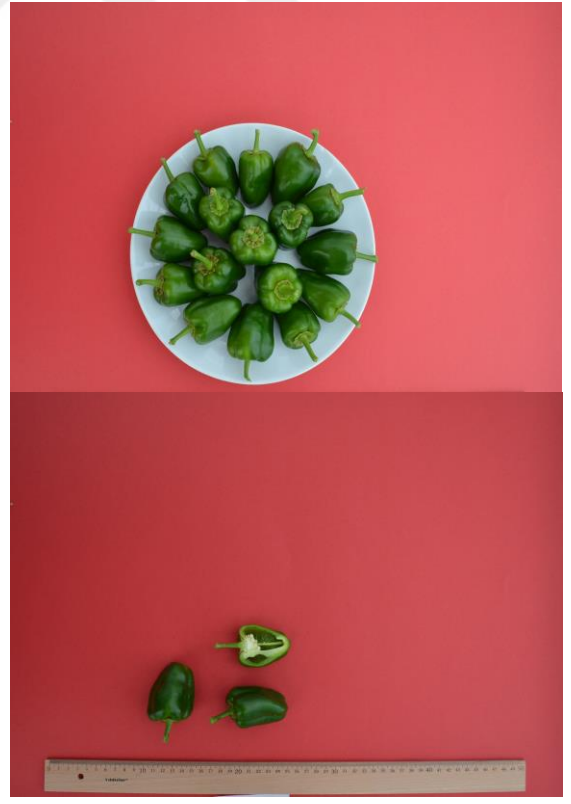
Şekil 4.31. Ergenekon genotipinden elde edilen E-08 hattının bitki ve meyvesi





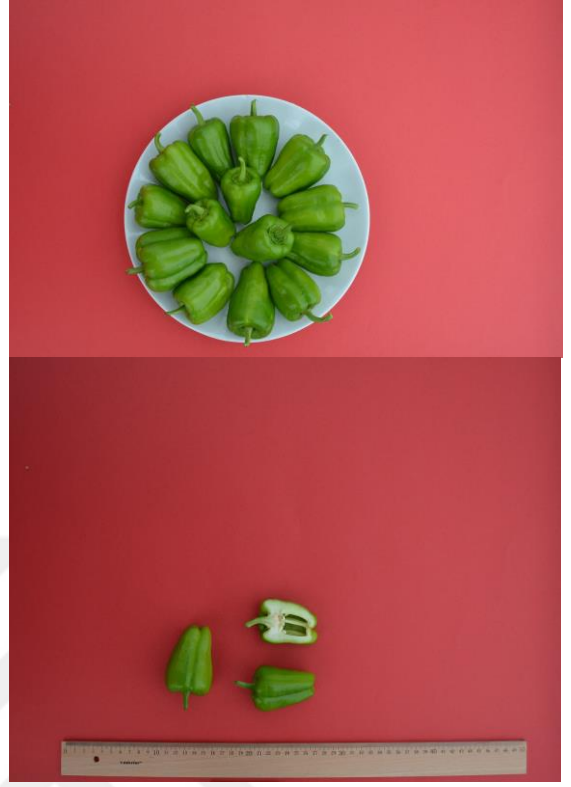
E-09

Şekil 4.32. Ergenekon genotipinden elde edilen E-09 hattının bitki ve meyvesi



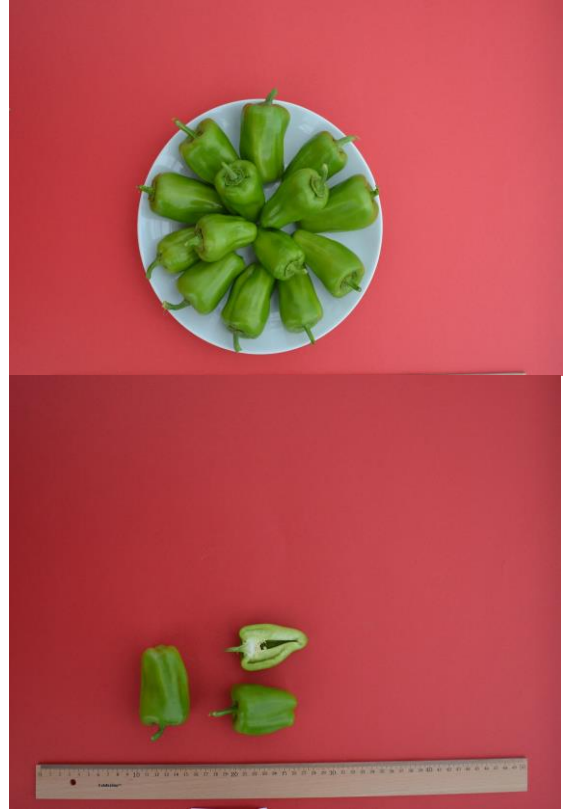
E-10

Şekil 4.33. Ergenekon genotipinden elde edilen E-10 hattının bitki ve meyvesi



E-11

Şekil 4.34. Ergenekon genotipinden elde edilen E-11 hattının bitki ve meyvesi



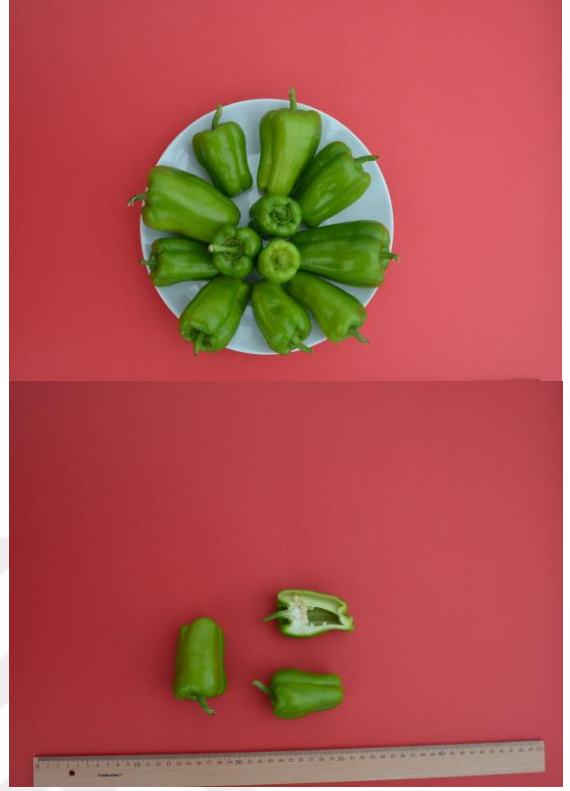
İ-01

Şekil 4.35. İstek genotipinden elde edilen İ-01 hattının bitki ve meyvesi



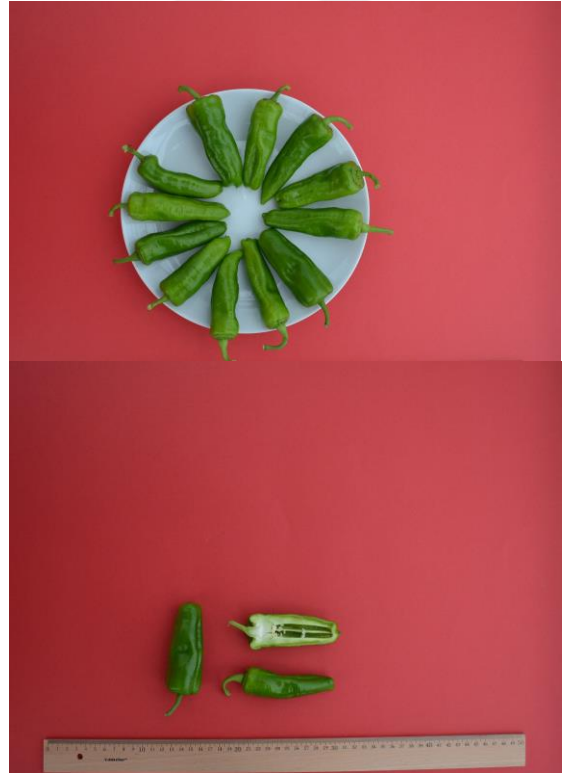
İ-02

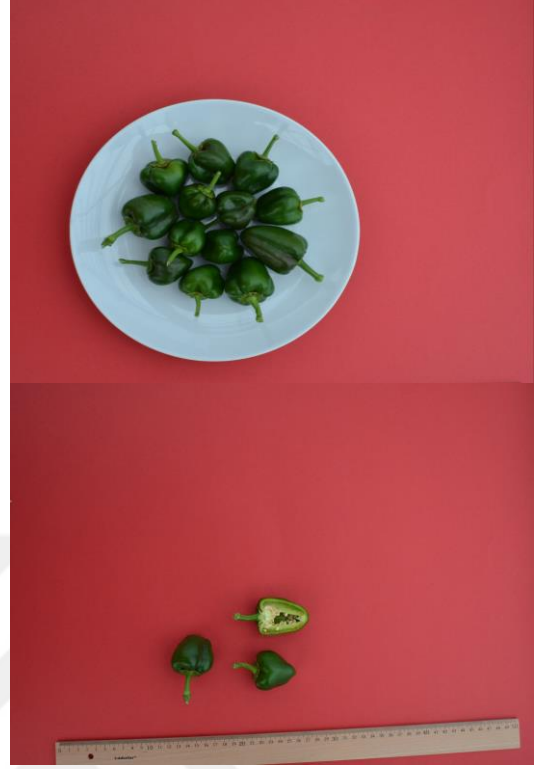
Şekil 4.36. İstek genotipinden elde edilen İ-02 hattının bitki ve meyvesi



İ-03

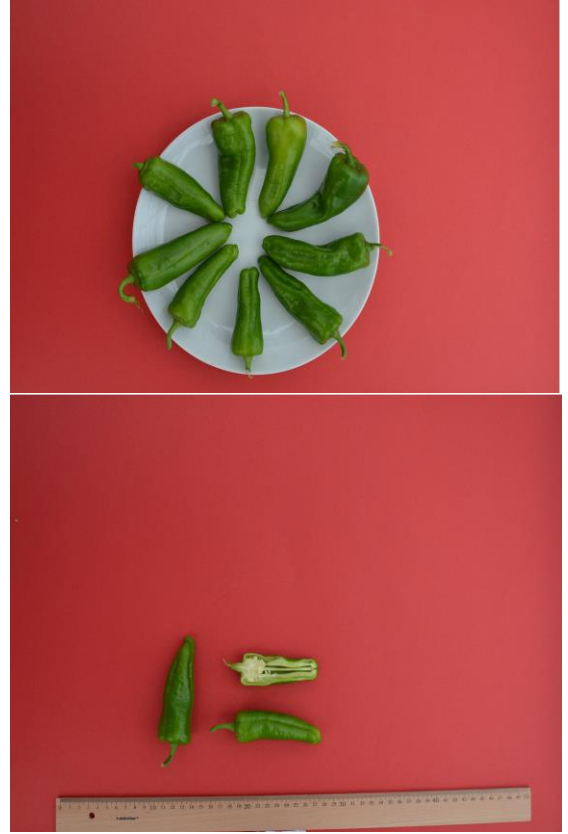
Şekil 4.37. İstek genotipinden elde edilen İ-03 hattının bitki ve meyvesi





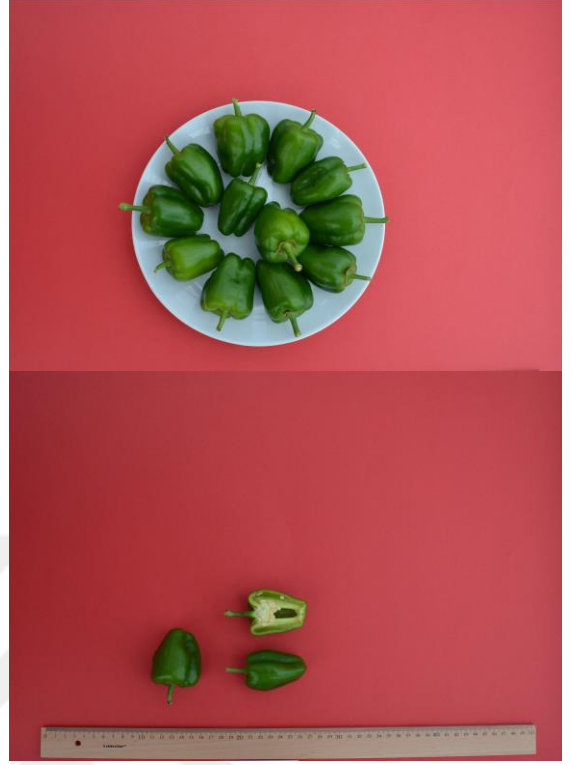
İ-04

Şekil 4.38. İstek genotipinden elde edilen İ-04 hattının bitki ve meyvesi



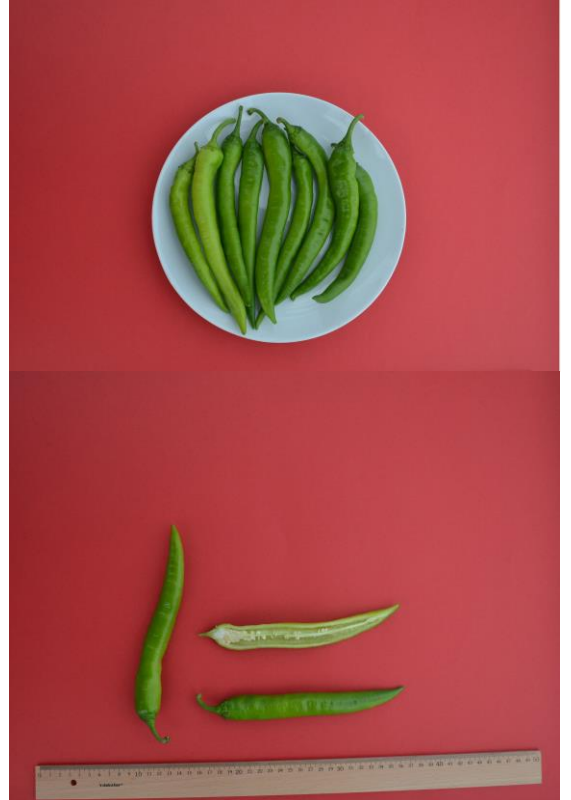
İ-05

Şekil 4.39. İstek genotipinden elde edilen İ-05 hattının bitki ve meyvesi



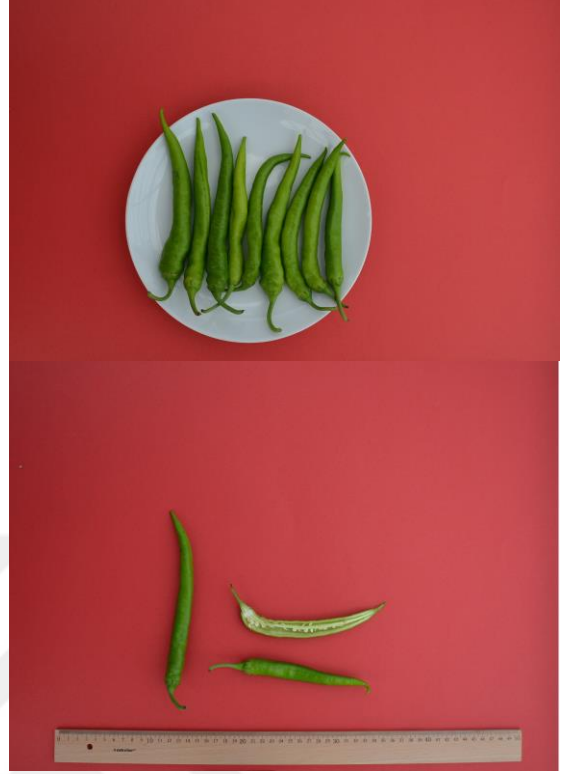
İ-06

Şekil 4.40. İstek genotipinden elde edilen İ-06 hattının bitki ve meyvesi



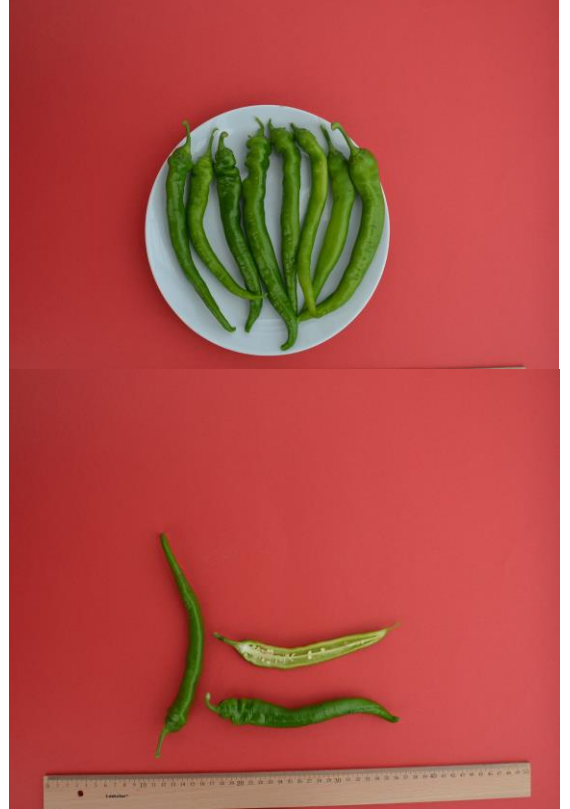
Ş-01

Şekil 4.41. Şölen genotipinden elde edilen Ş-01 hattının bitki ve meyvesi



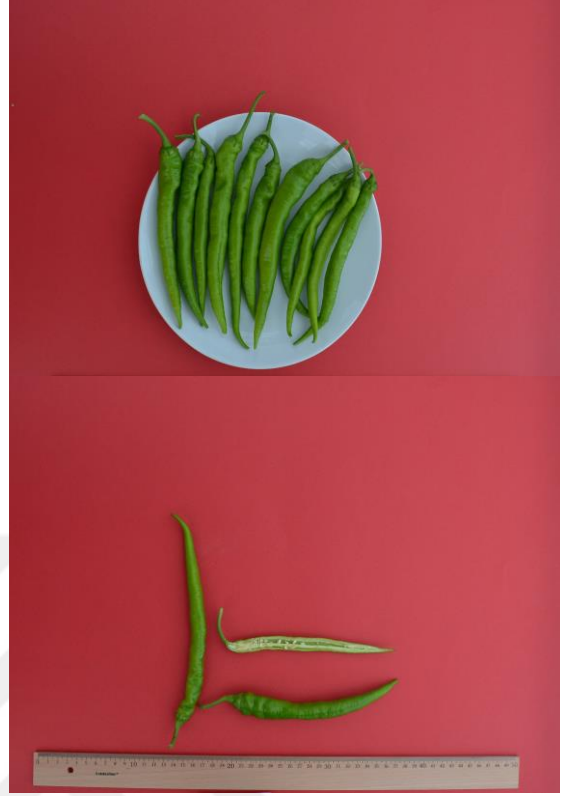
Ş-02

Şekil 4.42. Şölen genotipinden elde edilen Ş-02 hattının bitki ve meyvesi



Ş-03

Şekil 4.43. Şölen genotipinden elde edilen Ş-03 hattının bitki ve meyvesi



Ş-04

Şekil 4.44. Şölen genotipinden elde edilen Ş-04 hattının bitki ve meyvesi

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Biberde anter kültüründe genotip, ön uygulama, inkübasyon, besin ortamı ve ortam bileşenlerinin etkilerinin araştırıldığı çalışmada 5 adet hibrit biber çeşidi ve bu çeşitlerden elde edilmiş F₂ genotipleri donör bitki olarak kullanılmıştır. Uygulamalara bağlı olarak genotiplerde embriyoid, bitkicik, haploid bitki oluşum oranları ve dihaploid bitki sayıları incelenmiştir. En başarılı genotip Belissa F₂ olurken, F₂ generasyonları F₁ genotiplere göre daha başarılı olmuştur. F₂ genotiplerinin yüksek başarı oranları her iki ortamda öne çıkmıştır. Embriyo oluşumunda ortaya çıkan bu fark bitkicik oluşumunda görülmemiştir. Embriyoid oluşum oranı yüksek olan uygulamalarda bitkiciğe dönüşüm oranı düşük kalırken, embriyoid oluşum oranı düşük olan uygulamalarda daha yüksek oranlarda bitkicik elde edilmiştir.

Embriyoid oluşumu bakımından genotipler arasında belirgin farklılıklar ortaya çıkmıştır. Belissa genotipi ile beraber İstek ve Bafra çeşitlerinin F₁ ve F₂ generasyonları başarılı sonuçlar vermiştir. Hibrit genotiplerin kendilenmesi ile elde edilen F₂ genotiplerinin daha başarılı olması, androgenik yanıtın alınamadığı veya düşük düzeyde kaldığı genotiplerde kendilemeler yapılarak androgenik başarı oranının artırılabilceği ve ileriki kendileme generasyonlarında başarının daha da artacağı kanaatini oluşturmuştur. Genotiplerin uygulamalara göre tepkileri de farklı olmuştur. Genotipler arasında Şölen F₁ ve F₂ androgenik performansı en düşük genotipler olmuştur. Çalışmada bütün genotiplerden değişen oranlarda embriyoid elde edilmiştir. Ortamların androgenik yanıtları incelendiğinde özellikle F₂ genotiplerinde DDV ortamının çift fazlı ortama göre yaklaşık 2 kat daha fazla embriyoid oluşturduğu görülmüştür. DDV ortamı sadece embriyoid oluşumunda değil aynı zamanda bitkicik oluşumunda da çift faz ortama üstünlük sağlamıştır.

Çiçek tomurcuklarına ön uygulamalar yapılmıştır. Çiçek tomurcukları 24 ve 48 saat süreyle karanlıkta +4 °C'de bekletilmiştir. Kontrol bitkilerine ise ön uygulama yapılmamıştır. Ön uygulamalar embriyoid ve bitkicik oluşumunda benzer sonuçlar vermiştir. DDV ortamında 24 saat uygulaması daha iyi sonuç verirken, bunu 48 saat ve kontrol uygulamaları izlemiştir. Çift fazlı ortamda ise tomurcuklara ön uygulama yapılması embriyoid oluşumunu teşvik etmemiştir. En yüksek yanıt kontrol bitkilerinden elde edilmiş, bunu 24 ve 48 saat uygulamaları izlemiştir. Özet olarak

tomurcuklara ön uygulama yapılması DDV ortamında etkili olurken, çift fazlı ortamda tomurcuklara ön uygulama yapılmasının gereksiz olduğu sonucuna varılmıştır.

Besin ortamlarında ortamlara göre bazı ilaveler yapılmıştır. DDV ortamında vitamin B₁₂'nin 0.03 ve 0.05 mg l⁻¹ dozları, çift fazlı ortamda ise aktif kömürün % 0, % 0.10 ve % 0.20 dozları denenmiştir. DDV ortamında vitamin B₁₂ embriyoid oluşumunda etkili olmazken, bitkicik oluşumunda az da olsa olumlu yönde etkisi görülmüştür. Vitamin B₁₂ uygulamasında başarı oranı embriyoid oluşumunda sırasıyla kontrol, 0.05 ve 0.03 mg l⁻¹ şeklinde sıralanırken, bitkicik oluşumunda 0.05, kontrol ve 0.03 mg l⁻¹ şeklinde gerçekleşmiştir. Çift fazlı ortamda aktif kömürün etkisi embriyoid ve bitkicik oluşumlarında benzer etki göstermiş, başarı sıralaması % 0.10, % 0.20 ve kontrol uygulaması şeklinde gerçekleşmiştir. Anter kültürü çalışmalarında Vitamin B₁₂'nin olumlu ve olumsuz etkileri olduğuna dair sınırlı sayıda da olsa çalışma bulunmaktadır. B₁₂ vitamininin etkili olduğunu belirten araştırmacılar bu vitaminin besin ortamlarında ısrarla kullanılması gerektiğini belirtmektedirler. Çalışmamızda B₁₂ vitamininin sadece 0.03 ve 0.05 mg l⁻¹ dozları kullanılmış ve etkisiz kalmıştır. Anter kültürü çalışmalarında Vitamin B₁₂'nin 0.1 - 0.5 mg l⁻¹ gibi daha yüksek dozları denenmelidir.

Anterler besin ortamlarına aktarıldıktan sonra 8 gün süreyle 9 °C ve 35 °C'de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon uygulamasının etkileri ortamlara göre farklılık göstermiştir. Embriyoid oluşumunda DDV ortamında 35 °C uygulaması daha etkili olurken, çift fazlı ortamda 9 °C uygulaması daha iyi sonuç vermiştir. DDV ortamında bitkicik oluşumunda inkübasyon sıcaklıkları arasında fark oluşmazken, çift fazlı ortamda 9 °C inkübasyon uygulaması 35 °C uygulamasından daha etkili olmuştur. İnkübasyon uygulamasının, uygulama şekli ve uygulama süresinin ortamlara göre farklılıklar gösterip göstermediği farklı ortamlarla yürütülecek çalışmalarla teyit edilmesine ihtiyaç vardır.

Çalışmada uygulamaların bütünü dikkate alındığında 10 800 anterden 1 109 embriyoid, 210 bitkicik ve 27 haploid bitki elde edilmiştir. Başarı oranları incelenirken her genotipin kendi içinde incelenmesi daha doğru olacaktır. Zira anter kültürü çalışmalarında genotip en önemli faktör olarak öne çıkmaktadır. Denemede başarılı genotipler arasında yer alan Belissa F₂ ve İstek F₁ genotiplerinde en yüksek embriyoid oluşum oranları sırasıyla % 170 ve % 116.67 olurken, başarı düzeyi düşük olan

genotiplerden Şölen F₁ genotipinde en yüksek embriyoid oluşumu % 43.33 oranında gerçekleşmiştir.

Çalışmada uygulamaların androgenik başarı üzerine etkileri genotiplere göre farklılıklar göstermiştir. Anter kültürüne yanıtı yüksek olan genotiplerde uygulamaların çoğunda embriyonik yanıt alınırken, yanıtı düşük olan genotiplerde (Örnek: Tatlı sivri biber tip Şölen F₁ ve Şölen F₂ genotipleri) uygulamaların çoğunluğu embriyogenik yanıt vermemiştir. Bu genotiplerde yanıt alınabilen uygulamalarda embriyoidlerin bitkiye dönüşüm oranları da düşük düzeyde kalmıştır. Biberde anter kültürü çalışmalarında genotip etkisi dışında diğer faktörlerin de başarı üzerine etkisi dikkate alınmalıdır. Ancak burada sadece embriyoid oluşumu dikkate alınmamalı, embriyoidlerden bitkicik elde edilmesi ve hatta haploid bitkilerde kromozom katlamasının gerçekleşme düzeyi de dikkate alınmalıdır. Zira, çalışmada özellikle bazı uygulamalarda çok yüksek oranlarda embriyoid elde edilmesine rağmen bitkicik oluşumu ve dihaploid bitkiye dönüşümde önemli kayıplar yaşanmıştır. Denemede embriyoların gelişimini sürdürmesi için kullanılan “V” ortamı olarak alternatif ortamlar denenmemiştir. Kullanılan “V” ortamı literatürde geçerliliği olmasına rağmen denemede yetersiz kalmış ve yüksek oranlarda embriyo kayıpları yaşanmıştır. Benzer çalışmalarda alternatif “V” ortamlarının araştırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Eğer sadece embriyoid oluşum oranları dikkate alınacak ise çalışmada oldukça yüksek başarılar yakalanmıştır. Başarı oranı yüksek olan uygulamalar tekrar dikkate alınabilir.

Anter kültürü çalışan araştırmacılar embriyogenik başarı üzerine faktörlerin birlikte daha etkili olduklarını belirtmektedir. Bizim çalışmamızda da genotipik yanıtın diğer faktörlerden etkilendiği anlaşılmıştır. Bu nedenle anter kültürü çalışmalarında etkili olan faktörlerin tek tek denenmesinden ziyade, birlikte ve kapsamı genişleterek çalışılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abak, K., 1983. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Etme Üzerinde Araştırma. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı. Cilt 33. Fas. 1-2-3-4'den ayrı basım. 155-163.
- Abak, K., 1993. Biber ıslahında anter kültüründen yararlanma. Bitki Islahı Sempozyum Bildirimi. TÜBİTAK TOAG Yayınları 59-66.
- Ağaoğlu, YS., Ellialtıoğlu, Ş., Marasalı, B. ve Kalyon, D., 1998. Asmada (*Vitis vinifera* L.) androgenetik kallus oluşumu üzerine araştırmalar. II. Uluslararası Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi. s. 89-99. 20-22 Mayıs 1998. Kırıkkale.
- Ahmadian, P., Testillano, P. S., Gonzalez, P., Fadon, B., Prestamo, G., Jimenez-Duran, G. ve Risueno, M.C., 1998. Cell biology of the pollen developmental program and the induction of microspore embryogenesis in *Capsicum annuum* L. In: Xth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant. Avignon, France. pp 183–186.
- Alpsoy, HC., 1999. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Bursa.
- 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): 108–116. 2014.
- Anagnostakis, S.L., 1974. Haploid plants from anthers of tobacco-enhancement with charcoal. Planta. 115. 281-283.
- Arı, E., 2006. Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*’da Anter Kültürü Çalışmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. çukurova. 187s.
- Arı, E., Bedir, H., Yıldırım, S. ve Yıldırım, T., 2016. Androgenic responses of 64 ornamentalpepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to shed-microspore culture in the autumn season. *Turkish Journal of Biology*, 40(3).
- Asakaviciute, R., 2008. Androgenesis in anther culture of Lithuanian spring barley (*Hordeum vulgare* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *Turkish Journal of Biology*, 32: 155–160.
- Ata, A., 2011. Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültüründe Mevsim Etkisi ve Mikrospor Gelişimi Ziraat Fakültesi Yüksek Lisans. Sayfa Sayısı: 1.
- Bajaj, YPS., 1983. *In vitro* production of haploids. In: Evans DA. Sharp VR. Ammirato PV. Yamada Y (eds). Handbook of Plant Cell Culture. Mc Millan Publ. Co. Vol. I Chapter 6. pp. 228-287.
- Bajaj, YPS., 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: Biotechnology in agriculture and forestry. vol 12. Haploids in crop improvement I. Springer. Berlin. pp 3–44.
- Barany, I., Gonzalez-Melendi, P., Fadon, B., Mityko, J., Risueno, M. C. ve Testillano, P.S. 2005. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biol Cell* 9:709–722.

- Barro, F. ve Martin, A., 1999. Response of Different Genotype of *Brassica carinata* to Microspore Culture. *Plant Breeding*. 118: 79-81.
- Barroso, P. A., Rêgo, M. M., Rêgo, E. R. ve 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. ve Ellialtıoğlu, Ş. 2013. Effect of genotypical factors on the effectiveness of anther culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Turkish Journal of Biology*, 37: 499-505.
- Bishnoi, U.S., Jain, R.K., Gupta, K.R., Chowdhury, V.K. ve Chowdhury, J.B., 2000. High Frequency Androgenesis in Indica x Basmati Rice Hybrids Using Liquid Culture Media. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 61: 153-159.
- Bourgin, J. P. ve Nitsch, J. P., 1967. Obtention de *Nicotiana* haploides a partir d'etamines cultivees *in vitro*. *Ann.Pysiol. Veget.* 9:377-382.
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu, N., Abak, K., Ekbic, E. ve Kılıç, N., 2004. Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. *European Journal of Horticultural Science* 69:206-209.
- Calleberg, E.K. ve Johansson, L.B. 1993. The effect of starch and incubation temperature in anther culture of potato. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 27-34.
- Cao, M., Li, Y., Liu, F. ve Dore, C., 1994. Embryo Genesis and Plant Regeneration of Pakchoi (*B.rapa* L.ssp. *chinensis*) via *in vitro* Isolated Microspore Culture. *Plant Cell Reports*. 13: 447-450.
- Capuana, M. ve Debergh, P.C., 1997. Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 48:23-29.
- Chambonnet, D., 1985. These Docteur d'Universite. Universite des Sciences et Techniques du Languedoc – Montpellier 17-4-85. p. 184.
- Chambonnet, D., 1988. Obtention of Haploid Plants in Vegetables. Advantages in Breeding Programmes. I.Uluslararası Tarım ve Biyoteknoloji Sempozyumu. Çukurova Üniversitesi (1-3 Haziran 1988. Adana).
- Cheng, Y., Ma, R. L., Jiao, Y. S., Qiao, N. ve Li, T. T., 2013. Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *South African Journal of Botany*, 88, 306-309.
- Chunling, L., 1992. Successful development of new sweet (hot) pepper cultivars by anther culture. Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology (APAB). August 20-24. Beijing. China.
- Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A.M. ve Romagosa, I., 1994. Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Reports* 13:709-712.
- Çiner, D. ve Tıprıdamaz, 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.

- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S. ve Abak, K., 1999. Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber populasyonlarında anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etme olanakları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. Ankara. 897-900.
- Çömlekçioğlu, N., Buyukalaca, S. ve Abak, K., 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). In: XIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant. Antalya. Turkey. pp 133–136.
- Dale, P.J., 1975. Pollen dimorphism and anther culture in barley. *Planta* (Berlin). 127: 213-220.
- Darlington, C. D. ve La Cour, L. F., 1963. Methoden der Chromosomen Untersuchungen. Frankische Verlagshandlung. W. Kellerund Ca. Stutgard.
- Dias, J. S. ve Correia, M.C. 2002. Effect of medium renovation and incubation temperature regimes on trionchuda cabbage microspore culture embryogenesis. *Scientia Horticulturae* 93: 205–214.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveira, E. ve Huerta, A., 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L. effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122:468–475.
- Duijs, J. G., Voorrips, R. E., Visser, D. L. ve Custers, J. B. M., 1992. Microspore Culture is Successful In Most Crop Types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica*. 60: 45-55.
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D. ve Pochard, E., 1981. *In vitro* anther culture in red pepper (*Capsicum annuum* L.): improvement of the rate of plant production in different genotypes by treatments at 35 C. *Agronomie* 1:859–864.
- Dumas de Vault, R. ve Chambonnet, D., 1982. Culture in vitro d'antheres d'aubergine (*S. melongena* L.); Stimulation de la production de plantes qu moyen de traitements a +35 °C associes a de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie*. 2. 10: 983-988.
- Dumas de Vault, R., 1990. Haploid and pepper breeding: a review. *Capsicum Newsl* 8-9: 13-17.
- Dunwell, J. M. ve Sunderland, N., 1973. Anther culture of *Solanum tuberosum*. *Euphytica*. 22: 317-323.
- Dunwell, J. M., 1985. Haploid Cell Culture- A Practical Approach (ed: R.A. Dixon). IRL Pres Ltd., Chapter 2: 21-36.
- Dunwell, J.W., 1991. Haploid Cell Cultures. In “Plant Cell Culture: a Practical Approach”. (R.A.Dixon. ed.). IRC Pres. Oxford. Washington D.C. 21-36.
- Elçi, Ş., 1982. Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları. Biyoloji. 3. Elazığ. 165s.
- Ellialtıoğlu, Ş. ve Tıpırdamaz, R., 1997. Soğuk Uygulamalarının ve Aktif Kömürün Patlıcan ve Biberde *in vitro* Androgenesis Üzerine Etkileri. TÜBİTAK-TOGTAG 87 no'lu Proje Sonuç Raporu. 70 s. Ankara.

- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K., 2000. Haploid Bitki Üretimi (Bitki Biyoteknolojisi. Cilt I. Ed: Babaoğlu. M.. Gürel. E.. Özcan. S.). Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları. Konya. S.138-189.
- Ellialtıoğlu, Ş., Kaplan, F. ve 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.
- Ellialtıoğlu, Ş. ve Tıpırdamaz, R., 2002. Soğuk uygulamaları ve aktif kömürün biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Süresince Absisik Asit Miktarındaki Değişim Üzerine Etkisi. Akdeniz Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi; 15(1):9-18.
- Ellialtıoğlu, Ş., 2005. Domates ve Patlıcanda Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Oluşumunu Etkileyen Bazı Faktörler Üzerinde Araştırmalar. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu destekli Proje No: TOGTAG-2607 (Yayınlanmamış Proje).
- Ellialtıoğlu, Ş., Başay, S. ve Kuşvuran, Ş., 2006. Anter Kültüründen Elde Edilen Haploid Patlıcanların Katlanması Amacıyla Kullanılan *in vitro* ve *in vivo* Kolhisin Uygulamalarının Karşılaştırılması. VI. Sebze Tarımı Sempozyumu. 19-22 Eylül. Kahramanmaraş. Bildiriler. s:386-390.
- Emiroğlu, Ü., 1982. Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. Ege Ü. Z. F. Yayınları. Yardımcı Ders Kitabı. Yayın No: 450. Bornova. İzmir.38 Sayfa.
- Ercan, N., Boyacı, F. ve 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., Sensoy, F. ve Sensoy, A. S., 2006. Influence of Growing Season and Donor Plant Age on Anther Culture Response of Some Pepper Cultivars (*Capsicum annuum* L.) Scientia Horticulturae Scientia Horticulturae. 110 (1): 16-20.
- Eti, S., 1987. Über das Pollenschlauchwachstum und die Entwicklung der Samenanlagen in Beziehung zum Fruchtansatz und zur Fruchtqualitaet 156 bei der Mandarinensorte "Clemantine" (*Citrus reticulata* Blanco). Dissertation Univ. Hohenheim. 127 s.
- FAO, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Feng, X. R. ve Wolyn, D. J. 1991. High frequency production of haploid embryos in asparagus anther culture. Plant Cell Reports. 10:574-578.
- Ferrie, A. M. R., Taylor, D. C., Mackenzie, S. L. ve Keller, W. A., 1999. Microspore embryo genesis of high sn-2 erucic acid Brassica oleracea germplasm. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 57: 79-84.
- Foroughi-Wehr, B. ve Wenzel, G., 1993. Andro- and parthenogenesis. In: Hayvard MD. Bosemark NO. Ramagosa I (eds). Plant Breeding: Principles and Prospects. Chapman & Hall. London. pp. 261-277.
- Fridborg, G., Pedersen, M., Landström, L. E. ve Erikson, T., 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol. Plant.. 43: 104-106.

- Gémes-Juhász, A., Kristóf, Z., Vági, P., Lantos, C., ve Pauk, J., 2009. *In vitro* anther and isolated microspore culture as tools in sweet and spice pepper breeding. *Acta Horticulture* 829: 61-64.
- Genovesi, A. D. ve Collins, G. B. 1982. *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Science* 22:1137-1144.
- George, E., 1996. *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2: In Practice. 2. Edition.* Exegetics Limited.
- George, E. F. ve Sherrington, P.D., 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories.* Eastern Press. Reading. Berks. 314-324.
- George, E. F., Hall, M. A. ve De Klerk, G. J. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro-andmicro-nutrients (pp. 65-113). Springer Netherlands.
- George, L. ve Narayanaswamy, S., 1973. Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma* 78:467–480.
- Gonzalez-Garcia, J., 2002. Plant induction by anther culture of jalapeno pepper (*Capsicum annuum* L.). *Yeast genetics and molecular biology* 2002. University of Wisconsin. Madison.
- González-Melendi, P., Testillano, PS., Ahmadian, P., Fadón, B., Vicente, O. ve Risueño, MC., 1995. *In situ* characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in *Capsicum*. *Protoplasma* 187: 60-71.
- Grozeva, S., Todorova, V., Cholakov, T. ve Rodeva, V., 2013. Effect of temperature and growth period of donor plants on pepper anther culture. In: 3rd International Conference— Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences. Lozenec, Bulgaria, pp. 60-64.
- Guha, S. ve Maheshwari, S. C., 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* *in vitro*. *Nature (Lond.)*. 212: 97-98.
- Guo, Y. D., Sewon, P. ve Pulli, S., 1999. Improved Embriyogenesis from Anther Culture and Plant Regeneration in Timothy. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 57: 85-93.
- Guo, Y. D. ve Pulli, S., 2000. Isolated Microspore Culture and Plant Regeneration in Rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Reports*, 19: 875-880.
- Hamaoka, Y., Fujita, Y. ve Iwai, S., 1991. Effects of temperature on the mode of pollen development in anther culture of *Brassica campestris*. *Physiol. Plant*. 82. 67-72.
- Hatipoğlu, R., 1997. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190. Ders Kitapları Yayın No: A-58. Adana. 178 Sayfa.
- Heberle-Bors, E., 1980. Interaction of activated charcoal and iron chelates in anther cultures of *Nicotiana* and *Atropa belladonna*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 99(4), 339-347.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I., 1950. The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil. California Agricultural Experiment Station. Citro, 347: 1–32.

- Holme, I.B., Olesen, A., Hansen, N.J.P. ve Andersen, S.B., 1999. Anther and Microspore Culture Response of Wheat Lines from Northwestern and Eastern Europe. *Plant Breeding*, 118: 111-117.
- Horner, M. ve Mott, R.L., 1979. The frequency of embryogenic pollen grains is not increased by *in vitro* anther culture in *N. tabacum* L. *Planta*. 147: 156-158.
- IBPGR, 1983. Genetic resources of Capsicum, IBPGR Secretariat, Rome, 49.
- Immonen, S. ve Anttila, H., 1998. Impact of Microspore Developmental Stage on Induction and Plant Regeneration in Rye Anther Culture. *Plant Science*. 139: 213-222.
- Indrianto, A., Heberle-Bors, E. ve Touraev, A., 1999. Assessment of Various Stresses and Carbohydrates for Their Effect on the Induction of Embryo Genesis in Isolated Wheat Microspores. *Plant Science*. 143:71-79.
- Irikova, T. ve Rodeva, V., 2004. Antherculture of pepper (*Capsicum annuum* L.): the effects of nutrient media. *Capsicum and eggplant news letter*, 23, 101-104.
- Irikova, T., Grozeva, S. ve Rodeva, V., 2011a. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*. *Acta Physiol Plant*. 33:1559–1570.
- Irikova, T., Grozeva, S., Popov, P., Rodeva, V. ve Todorovska, E., 2011b. In vitro response of pepper anther culture (*Capsicum annuum* L.) depending on genotype. culture medium and duration of cultivation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 25: 2604-2609.
- Isouard, G., Raquin, C. ve Demarly, Y., 1979. Obtention de plantes haploides et diploides par culture *in vitro* d'anthères d'aubergine (*Solanum melongena* L.). *Comptes Rendus de l' Academie de Sciences de Paris* 288: 987-989.
- Jacobsen, E. ve Sopory, S.K., 1978. The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspore embryoids in anther cultures of *Solanum tuberosum* and dihaploid hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*. 52: 119-123.
- Jacquard, C., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Devaux, P., Baillieul, F. ve Clement, C., 2006. Plant defense mechanisms are triggered in the anther during the pre-treatment process. In: *The international conference haploids in higher plants III*. Vienna. Austria. 12–15 February 2006. p 29.
- Jain, N. ve Babbar, S. B. 2003. Effect of carbon source on the shoot proliferation potential of epicotyl explants of *Syzygium cumini*. *Biologia plantarum*, 47(1), 133-136.
- Johansson, L. ve Eriksson, T. 1977. Induced Embryo Formation in Anther Cultures of Several Anemone Species. *Physiol. Plant*. 40:172- 174.
- Johansson, L., Andersson, B. ve Erikson, T., 1982. Improvement of anther culture technique: Activated charcoal bound in agar medium in combination with liqued medium and elevated CO₂ concentration. *Physiol. Plant*.. 54. 24-30.
- Kandeler, R., 1987. Die Gewebekulturtechnik. Univ. Für Bodenkultur. Institut für Botanik. Wien-Österreich.

- Karakullukçu, Ş. 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Ankara. 131s.
- Karakullukçu, Ş. ve Abak, K., 1992. Bazı patlıcan çeşitlerinin anter kültürüne tepkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı. Cilt:42. Fasükül:1-2-3-4. s:7-12.
- Kasha, K. J., Hu, T. C., Oro, R., Simion, E. ve Shim, Y. S., 2001. Nuclear Fusion Leads to Chromosome Doubling During Mannitol Pretreatment of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Microspores. Journal of Experimental Botany. Vol. 52. No. 359. pp. 1227-1238.
- Kaya, Z., 2001. Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü Uygulamaları sayfa XIV.
- Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S. ve Büyükalaca, S., 2015. Effect of Pepper Types on Obtaining Spontaneous Doubled Haploid Plants via Anther Culture. *HortScience*, 50(11), 1671-1676.
- Keller, W., Rajhathy, T. ve Lacapra, J., 1975. *In vitro* Production of Plants from Pollen in *Brassica campestris*, Can. J. Genet. Cytol. 17, 655-666.
- Khush, G.S. ve Virmani, S.S., 1996. Haploids In Plant Breedings (S. Mohan Jain, Sopory S.K., Veilleux R.E.). *In Vitro* Haploid Production In Higher Plants Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1, 11-33.
- Kıvıharju, E. ve Pehu, E., 1998. The Effect of Cold and Heat Pretreatments on Anther Culture Response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 54 (2): 97-104.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D-I. ve Lee, K-M., 2004. Origin of Multicellular Pollen and Pollen Embryos in Cultured Anthers of Pepper (*Capsicum annuum*). Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 77: 63-72.
- Kim, M., Jang, I., Kim, J., Park, E., Yoon, M. ve Lee, Y., 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Reports 27:425-434.
- Kim, J. Y., Kim, Y. S., Yi, G. ve Kim, K. M., 2005. Anther culture of transgenic pepper (*Capsicum annuum* L.). Korean J Breed 37:241–246.
- Kim, M. Z., 1999. The influence of temperature pretreatment on the production of microspore embryos in anther culture of *Capsicum annuum* L. Korean Journal of Plant Tissue Culture.
- Koch, K. E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 509-540.
- Kohlenbach, H.W. ve Wernicke, W., 1978. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. Z. Pflanzenphysiol. 86:463-472.
- Koleva-Gudeva, L., 2003. The effect of incubation treatment on the pepper (*Capsicum annuum* L.) androgenesis. Institute of Southern Crops. Strumica. Yearbook 87-94.
- Koleva-Gudeva, L., Spasenovski, M. ve Trajkova, F., 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae* 111:114–119.

- Koleva-Gudeva, L., Gulaboski, R., Janevik-Ivanovska, E., Trajkova, F. ve Maksimova, V., 2013. Capsaicin—inhibitory factor for somatic embryogenesis in pepper anther culture. *Electron J Biol* 9: 29-36.
- Kösali, N., 2000. Stark Spur Golden Delicious Elma Çeşidinde Şeker. Aktif Kömür ve Işığın *in vitro* Androgenezis Üzerine Etkileri. A.Ü.Fen Bil. Enst. Yüksek Lisans Tezi. 47s.
- Kristiansen, K. ve Andersen, S. B., 1993. Effects of donor plant temperature. photoperiod. and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 67:105–109.
- Kruleva, MM. ve Oanh, H.K., 1998. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) II. Factors affecting induction of androgenesis. *Plant Cell Reports*. 18. 312-317.
- Kuo, J.S., Wang, Z. Z., Chein, N.F., Ku, S. J., Kung, M. L. ve Hsu, H.C. 1973. Investigation of the anther culture *in vitro* of *Nicotiana* and *Capsicum annuum* L. *Acta Botanica Sinica*. 15:43-47.
- Kyo, M. ve Harada, H., 1985. Studies on Conditions for Cell Division and Embryogenesis in Isolated Pollen Culture of *Nicotiana rustical*. *Plant Physiol.* 79, 90-94.
- Lantos, C., Juhasz, G.S., Somogyi, K.O., Vagi, P., Mihaly, R., Kristof, Z., Somogyi, N., ve Pank, J. 2009. Improvment of isolated microspore culture (*Capsicum annuum* L.) viaco-culture with ovary tissue culture of pepper or maze. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 97:285-293.
- Lazar, MD., Schaeffer, GW. ve Baenziger, PS., 1985. The physical environment in relation to high frequency callus and plantlet development in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. “Chris”. *J. Plant Physiol.* 121: 103-109.
- Lihao, W., Baoxi, Z., Jiazhen, G., Guimei, Y. ve Meizhen, D., 2004. Studies of Effects of Several Factors on Anther Culture of *Capsicum annuum* L. *Acta Horticulture Sinica*, 31(2), 199-204.
- Liu, F., Zhao, H., Chen, B. ve Zhang, YY., 2007. Embryogenesis of microspore derived multicells in *Capsicum annum* L. *Fen Zi Xi Bao Cheng Wu Xue Bao* 40:371-379. <http://www.lib.bioinfo.pl/pmid:18198578>.
- Liu, G. X., Zhang, X. W., Jiang, W. S., Yuan, Y. X. ve Yao, Q. J. 2009. Effects of Tempreature and Additives in Medium on Embryoid Induction in Anther Culture of Pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 5, 029.
- Ltifi, A. ve Wenzel, G., 1994. Anther culture of hot sweet pepper (*Capsicum annum* L.): influence of genotype and plant growth temperature. *Capsicum Eggplant Newsletter*, 13:74-77.
- Matsubara, S., Yamamoto, M., Man-Hyun, J., Murakami, K. ve Man, HJ., 1998. Embriyoid and callus formation from microspores by anther culture from July to November in pepper (*Capsicum annum* L.). *Sci Rep Fculty Agric Okayama Univ* 87:117-112.

- Mitykó, J., Andrásfalvy, A., Csilléry, G., ve Fári, M., 1995. Anther culture response in different genotypes and F₁ hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding* 114: 78-80.
- Mityko, J., ve Fari, M., 1997. Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther-and microspore culture. In *III International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding* 447 (pp. 281-288).
- Morrison, RA., Köning, RE. ve Evans, DA., 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *J. Plant Physiol.* 126. 1: 1-9.
- Munyon, IP., Hübstenberger, JF. ve Phillips, GC., 1989. Origin of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 25. 3: 293-296.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tabacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nervo, G., Carannante, G., Azzimonti, M.T., ve Rotino, G. L., 1995. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In *Curren tissues in plant molecular and cellular biology* (pp. 155-160). Springer Netherlands.
- Niklas-Nowak, A., Olszewska, D., Kisiała, A. ve Nowaczyk, P., 2012. Study of individual plant responsiveness in anther cultures of selected pepper (*Capsicum spp.*) genotypes. *Folia Horticulturae* 24: 141-146.
- Nitsch, C., 1981. Production of Isogenic Lines: Basic Technical Aspects of Androgenesis. In "Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture" (T.A.Thorpe ed.). 241-252.
- Nitsch, J. P. ve Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85–87.
- Nitsch, J. P., 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana* . *Phytomorphology*. 19: 389- 404.
- Novak, F., 1974. Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum sp.* *Z Pflanzenzucht* 72: 46-54.
- Nowaczyk, L., Nowaczyk, P., Olszewska, D. ve Niklas-Nowak, A., 2015. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pretreatment of *Capsicum spp.* donor plants on the anther culture efficiency of lines selected by capsaicinoid content. *BTa JBCBB* 96: 179-183.
- Nowaczyk, P. ve Kisiała, A., 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *Journal of Applied Genetics* 47: 113-117.
- Nowaczyk, P., Nowaczyk, L., Olszewska, D. ve Krupska, A., 2009a. Androgenic response of genotypes selected from *Capsicum annuum* L. × *Capsicum chinense* Jacq. hybrids. *Acta Physiol Plant* 31: 877–879.
- Nowaczyk, P., Olszewska, D. ve Kisiała, A., 2009b. Individual reaction of *Capsicum* F₂ hybrid genotypes in anther cultures. *Euphytica* 168: 225–233.

- Olszewska, D., Kisiała, A., Niklas-Nowak, A. ve Nowaczyk, P., 2014. Study of *in vitro* anther culture in selected genotypes of genus *Capsicum*. Turkish Journal of Biology 38: 118-124.
- Ouyang, J. W., He, D. G., Feng, G. H. ve Jia, S. E. 1987. The response of anther culture to culture temperature varies with growth conditions of anther-donor plants. Plant Science, 49(2), 145-148.
- Özcan, S., Babaoğlu, M. ve Sancak, C., 2001. Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Babaoğlu. M.. Gürel. E.. Özcan. S.. S.Ü. Vakfı Yayınları. Konya. 71-88.
- Özkum, D., Tıprıdamaz, R. ve Ellialtıoğlu, Ş., 2000. Relationship between endogenous abscisic acid content of anthers and *in vitro* androgenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.) 4 th Int. Symp. on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding. 2-7 July 2000. Tampere. Finland. Abstracts (Late arrivals): 8.
- Özkum, D. ve Tıprıdamaz, R., 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). Turkish Journal of Biology 26:131–139.
- Özkum, D. ve Tıprıdamaz, R., 2007. Effects of silver nitrate, activated charcoal and cold treatment on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). Acta Horticulturae 729: 133-136.
- Özkum, D. ve Tıprıdamaz, R. 2010. Effects of L-proline and cold treatment on pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture. In Survival and Sustainability. (pp. 137-143). Springer Berlin Heidelberg.
- Paksoy, M., Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K., 1995. Bazı Brassica spp. türlerinde anter kültürüne etki eden faktörler üzerinde araştırmalar. DOĞA T. Botanik. 19: 281-286.
- Parra-Vega, V., González-García, B. ve Seguí-Simarro, JM., 2013a. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). Acta Physiol Plant 35: 627- 633.
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A. ve Seguí-Simarro, JM., 2013b. Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Tiss Organ Culture 112: 353-360.
- Petolino, JF., Jones, AM. ve Thompson, SA., 1988. Selection for increased anther culture response in maize. Theoretical and Applied Genetics. 76: 157-159.
- Pickersgill, B., 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. Euphytica 96:129 -133.
- Pierik, R.L.M., 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Marthinus Nijhoff Publ. Dordrecht. Boston. Lanchaster. 344pp.
- Powell, W. ve Uhrig, H., 1987. Anther culture of Solanum genotypes. Plant Cell. Tissue Organ Culture 11. 13-24.

- Prayantini, D. C., 2006. Anther culture in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). http://libnts.avrdc.org.tw/scripts/minisa.dll/144/VAVLIB/VAVLIB_SDI_REPO_RT/S.
- Pullman, G.S., Mein, J., Johnson, S. ve Zhang, Y., 2005. Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Reports* 23:596–605.
- Qin, X. ve Rotino, G. L., 1993. Anther culture of several sweetand hot pepper genotypes. In *International Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops. Part 1: Vegetable Crops* 402 (pp. 313-316).
- Rashid, A., 1983. Pollen dimorphism in relation to pollen plant formation. *Physiol. Plant.* 58: 544-548.
- Reinert, J. ve Bajaj, YPS., 1977. Anther Culture: Haploid Production and Its Significance. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag. Berlin. pp. 251-267.
- Reinert, J. ve Bajaj, YPS., 1992. Haploids In *Plant cell. tissue and organ culture*. Narosa Publishing House. New Delhi. pp 251-331.
- Reynolds, T. L., 1984. An Ultra structural and Stereological Analysis of Pollen Grains of *Hyoscyamus niger* During Normal Ontogeny and Induced Embriyogenic Development. *American Journal of Botany*. 7(4):490-504.
- Reynolds, T.L., 1997. Pollen Embriyogenesis (Review). *Plant Molecular Biology*. 33: 1-10.
- Rihova, L. ve Tupy, J., 1999. Manipulation of Division Symmetry and Developmental Fate in Cultures of Potato Microspores. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59: 135-145.
- Robichaud, RL., Lessard, VC., ve Merkle, SA., 2004. Treatments affecting maturation and germination of American chestnut somatic embryos. *Journal of Plant Physiology* 161:957-969.
- Rodeva, V. N., Irikova, T. P. ve Todorova, V. J. 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): comparative study on effect of the genotype. *Biotechnology&Biotechnological Equipment*, 18(3), 34-38.
- Rodeva, V., 2001. *In vitro* regeneration in anther culture of pepper (*Capsicum annum* L). *Sci Works Agricult Univ. Plovdiv* 3:211-214.
- Rodeva, V. ve Cholakov, T., 2006. Influence of some climatic factors in the period of donor plants growing on responsiveness of pepper anthers to embryogenesis. In: *The international conference haploids in higher plants III*. Vienna. Austria. 12-15 February 2006. 42p.
- Rodeva, V., Grozeva, S. ve Todorova, V., 2006. *In vitro* answer of Bulgarian pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Genetica (Serbia)* 38(2):129–136.
- Rodeva, V., Gudeva, L. K., Grozeva, S., Trajkova, F. 2013. Obtaining haploids in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) and their inclusion in the breeding process. *Yearbook-Faculty of Agriculture*, 7(1), pp-7.
- Roshany, G., Kalantarai, S., Naderi, R. ve Hassani, ME., 2013. Callus formation via anther culture in *Capsicum annuum* L. with differences in genotypes. media and

- incubation temperature. Technical Journal of Engineering and Applied Sciences 3: 3847-3853.
- Rotino, G., Falavigna, A., Fiume, F., Nervo, G. ve Restaino, F., 1987. Possibility of eggplant (*Solanum melongena* L.) improvement through *in vitro* techniques. Genetica Agraria. Vol:XXI. N:3. 314-315. Roma.
- Sajı, K.V. ve Sujatha, M., 1998. Embriyogenesis and Plant Regeneration in Anther Culture of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Euphytica, 103: 1-7.
- Samancı, N., Kurum, R., Boyacı, F. ve Biner, B., 1998. Anter Kültürü Çalışmaları için Elverişli Tomurcuk Safhasının Saptanmasında Kullanılabilecek Boyama Yöntemi. 2. Sebze Tarımı Sempozyumu. 28-30 Eylül 1998. Tokat. 157-162.
- Sangwan, RS. ve Sangwan-Norrel, BS., 1990. Anther and pollen culture. In: Bhojwani SS (ed). Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. pp. 220.242. Elsevier Science Publ. Amsterdam.
- Sayılır, A. ve 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.
- Seguí-Simarro, J. M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V. ve González-García, B., 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. Plant Cell Reports, 30(5), 765-778.
- Shrestha, S. L. ve Kang, W. H. 2009. Effect of genotype of donor plants on the success of anther culture in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Korean Journal of Plant Resources, 22(6), 506-512.
- Shtereva, L., Zagorska, N., Dimitrov, B., Kruleva, M. ve Oanh, N., 1998. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis. Plant Cell Reports 18:312–317.
- Sibi, M., Dumas de Vaulx, R. ve Chambonnet, D., 1979. Obtention de plantes haploides par androgenese *in vitro* chez le piment (*Capsium annuum* L.). Ann. Amelior. Plant. 29(5): 583-606.
- Smith, R. H., 2013. Plant tissue culture: techniques and experiments. Academic Press. 3. Edition, p.36.
- Smykal, P., 2000. Pollen Embriyogenesis – The Stress Mediated Switch From Gametophytic to Sporophytic Development. Current Status and Future Prospects. Biologia Plantarum. 43 (4): 481-489.
- Sopory, S.K., Jakobson, E. ve Wenzel, G., 1978. Production of monoploids embrioids and plantlets in cultured anthers of *solanum tuberosum*. Plant. Sci. Lett. 12:47-54
- Sopory, S.K., 1979. Effect of sucrose, hormones, and metabolic inhibitors on the development of pollen embrioids in anther cultures of dihaploid *Solanum tuberosum*. Canadian Journal of Botany 57 : 2691-2694.
- Stösser, R., Kaşka, N., Anvarı, S.F. ve Eti, S., 1985. Bahçe Bitkilerinde Dölllenme Biyolojisi Uygulamalı Kurs Notları. 18-22 Mart 1985. Adana (Yayınlanmamış).
- Sunderland, N., 1971. Anther culture: a progress report. Sci. Prog. Oxf.. 59: 527-549.

- Sunderland, N., 1974. Anther culture as means of haploid induction. In: Kasha K (ed) Haploids in higher plants-advances and potential. University of Guelph Press, Guelph, pp 91–122.
- Sunderland, N. ve Dunwell, J.M., 1977. Anther and Pollen Culture (H.E. STREET editor). Botanical Monographs. Volume:11: Plant Tissue and Cell Culture. Second Edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford. P: 223-266.
- Sunderland, N. ve Roberts, M., 1979. Cold-Pretreatment of Excised Flower Buds in Float Culture of Tobacco Anthers. Annual Botany 43:405-414.
- Sunderland, N., Xu, ZH. ve Huang, B., 1981. Recent advances in barley anther culture. In: Barley Genetics IV. Proc. 4th Int. Barley Genetics Symp.. Edinburgh Univ. Press. Edinburgh. pp. 699-703.
- Supena, E. D., Suharsono, S., Jacobsen, E. ve Custers, J. B, 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep 25:1–10.
- 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.
- Telmer, C.A., Simmonds, D. H. ve Newcomb, W., 1992. Determination of Developmental Stage to Obtain High Frequencies of Embryogenic Microspores in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum. 84: 417-424.
- Teodora, I., Stanislava, G. ve Velichka, R., 2011. Anther Culture In Pepper (*Capsicum annuum* L.) *In Vitro*. Acta Physiol Plant 33:1559-1570.
- Terzioğlu, Ş., Ellialtıoğlu, Ş. ve Abak, K., 2000. İnkübasyon koşullarının biber anter kültüründe embriyo oluşumu üzerine etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu. 11-13 Eylül 2000. Isparta. s: 233-238.
- Thomas, T. D., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology advances, 26(6), 618-631.
- Tıprıdamaz, R. ve Ellialtıoğlu, Ş., 2002. Soğuk uygulamaları ve aktif kömürü biberde (*Capsicum annuum* L.) anter Kültürü Süresince Absizik Asit Miktarındaki Değişim Üzerine Etkisi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. Cilt: 15. Sayı:1. 9-18.
- Tuberosa, R., Sanguinetti, MC. ve Conti, S., 1987. Anther culture of Eggplant (*Solanum melongena* L.). Lines and Hybrids Genetica Agraria. 41: 267-274.
- TÜİK, 2015. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001
- Vagera, J., ve Havranek, P., 1985. In vitro induction of androgenesis in *Capsicum annuum* L. and its genetic aspects. Biologia plantarum, 27(1), 10-21.
- Vagera, J., 1990. Pepper (*Capsicum* spp.): *In vitro* induction of haploids. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry. vol 12. Haploids in crop improvement I. Springer. Verlag. New York. pp 374-392.
- Veilluex, R.C., 1994. Development of New Cultivars via Anther Culture. Hortscience, 29, 1238-1241.

- Venczel, G. ve Gemensne Juhasz, A., 1998. Pepper breeding methods and strategies related with *in vitro* haploid research. In: Xth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant. Avignon. France. pp 96-97
- Vergne, P., Delvallee, I. ve Dumas, C., 1987. Rapid Assessment of Microspore and Pollen Development Stage in Wheat and Maize Using DAPI and Membrane Permeabilization. *Stain Technology*. 62: 299-304.
- Vieitez, FJ., 1995. Somatic embryogenesis in chestnut. In: Jain MS. Gupta PK. Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants vol 2*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp 375-407.
- Wang, L. H. ve Zhang, BX., 2001. Advancement in the anther culture of *Capsicum annum* L. *China Veg* 3:52-53.
- Wang, Y. Y., Sun, C. S., Wang, C. C. ve Chien, N. J., 1973. The induction of pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annum* anther culture. *Scientia Sinica* 16:147-15.
- Wenzel, G. ve Thomas, E., 1974. Observations on growth in culture of anthers of *Secale cereale*. *Z. Pflanzenzücht.* 72: 89-94.
- Wenzel, G. ve Uhrig, H., 1981. Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 59: 333-340.
- Wenzel, G. ve Foroughi-Wehr, B., 1994. Production and use of isogenic lines, p. 153-172. In: I.K. Vasil and T.A. Thorpe (eds.). *Plant cell and tissue culture*. Kluwer, Dordrecht, Germany.
- Wernicke, W. ve Kohlenbach, HW., 1976. Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 79: 189-198.
- Wetherhead, M.A., Burdon, J. ve Henshaw, G.G., 1978. Some effect of activated charcoal as an additive to plant tissue culture in *Nicotiana*, *Z. Pflanzenphysiol.*, 141-147.
- White, P.R. 1963. *The cultivation of animal and plant cells*. Ronald Press Co, New York, 228.
- Xing, Z., Powell, WA. ve Maynard, CA., 1999. Development and germination of American chestnut somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 57:47-55.
- Xynias, I.N., Gouli-Vavdinoudi, E. ve Roupakias, D.G., 2001. Effect of Cold Pretreatment and Incubation Temperature on Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Anther Culture. *Cereal Research Communications*, 29 (3-4): 331-338.
- Yadollahi, A., Abdollahi, M. R., Moieni, A. ve Danaee, M. 2011. Effects of carbon source, polyethylene glycol and abscisic acid on secondary embryo induction and maturation in rapeseed (*Brassica napus* L.) microspore-derived embryos. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), 1905-1912.
- Yang, B. Z., Zhou, S. D., Zhang, Z. Q., Dai, X. Z., Li, L. H. Ve Xie, D. P. 2009. Effects of different medium and hormone on cultured anther of hot pepper [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 1, 018.

- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A. ve Hafiz, I. A. 2013. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular biology reports*, 40(4), 2837-2849.
- Yoon, YJ., Lee, KS. ve Chang, SK., 1991. Plant induction by anther culture of hot pepper (*Capsicum annum* L.). *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 32:8-16.
- Zhao, J., Zhou, X., Zhang, Z., Yang, B. ve Zhou, S., 2010. Effects of culture media on anther culture of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)* 36: 181-184.
- Zhongheng, Z. H. Z. 2002. An analytic study of the sucrose concentrations, the exogenous hormones and the low temperaturepretreatment influencing the initiation of cell division in wheat pollen culture *Natural Science Journal of Harbin Normal University*, 3, 021. Molan, P. C. (1999). Why honey is effective as a medicine. 1. Its use in modern medicine, 17, 79-92.
- Zhou, M., Guan, Q., Wei, Y., Zhang, Z. 2008. Effects of Sucrose Concentration and Light Intensity on Growth and Photosynthesis of Ginger Plantlets in vitro [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 3, 015.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Perihan DURNA
Doğum Yeri ve Yılı : Düzce-01/02/1985
Yabancı Dili : İngilizce
Medeni Hali : Evli
TC Kimlik No : 19538072892
Telefon : 5323163609
e-mail : perihan-cakmak@hotmail.com

Eğitim:

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lise	Afyon Lisesi Yabancı Dil Bölümü	2001
Ön Lisans	Sakarya Üniversitesi Akyazı MYO Seracılık ve Süs Bitkileri Bölümü	2005
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü	2008
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı	2011

İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl
Mühendis	Düzce İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü	2010-2014
Mühendis	Çorum İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü	2014-...