



**Üç Burun Biber Genotiplerinde
In vitro Androgenesis Yöntemi ile
Dihaploid Hatların Elde Edilmesi**

**MURAT EMRE ÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI
Prof. Dr. Naif GEBOLOĞLU**

**Temmuz - 2016
Her hakkı saklıdır**

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Üç Burun Biber Genotiplerinde In vitro Androgenesis
Yöntemi ile Dihaploid Hatların Elde Edilmesi**

MURAT EMRE ÇELİK

**TOKAT
Temmuz - 2016**

Her hakkı saklıdır.

MURAT EMRE ÇELİK tarafından hazırlanan “**Üç Burun Biber Genotiplerinde In vitro Androgenesis Yöntemi ile Dihaploid Hatların Elde Edilmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **29 Haziran 2016** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı**’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof.Dr. Naif GEBOLOĞLU
Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Atnan UĞUR
Ordu Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Necdettin SAĞLAM
Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mehmet Ali SAKIN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

19.07/2016

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.

Murat Emre ÇELİK

Temmuz 2016

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÜÇ BURUN BİBER GENOTİPLERİNDE IN VİTRO ANDROGENESİS YÖNTEMİ İLE DİHAPLOİD HATLARIN ELDE EDİLMESİ

MURAT EMRE ÇELİK

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. NAİF GEBOLOĞLU

Biber ıslahında anter kültürü önemli bir rol oynamaktadır. Anter kültüründe ise başarı oranı başta genotip olmak üzere besi ortamının bileşimi, donör bitkilerin yetiştirme koşulları, anter alım zamanı, ön uygulamalar, stres koşulları ve ekolojik faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada üç burun meyve yapısına sahip biber genotiplerinde haploid bitki oluşumuna; genotip, besi ortamı, stres ve inkübasyon uygulamalarının etkileri araştırılmıştır. Denemede donör bitki olarak İstek F₁, Köylüm F₁, Üçburun F₂ ve yerel genotip olan Tokat biberi kullanılmıştır. Dumas de Vault ve ark. (1981) tarafından önerilen ve DDV olarak bilinen ortam ve Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen ve MS olarak bilinen ortamlar besi ortamı olarak kullanılmıştır. Ortamlara 0,01 mg/l Kinetin + 0,01 mg/l 2,4D + 0,03 mg/l Vitamin B12 ilave edilmiştir. Çiçek tomurcukları 4 °C’de 24 saat bekletilmiştir. Kontrol bitkilerinin tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulaması yapılmamıştır. Anterler, besi ortamına ekildikten sonra 9 °C ve 35 °C’de 8 gün süreyle karanlık ortamda bekletilmiş ardından 16 saat gündüz/8 saat gece ve 25±2 °C sıcaklığa sahip ortama alınmıştır. Bu ortamda 4 gün bekleyen anterler daha sonra rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Denemede kullanılan genotiplerin hepsi az yada çok anter kültürüne cevap vermişlerdir. En yüksek embriyo oluşumu yerel Tokat genotipinde elde edilmiştir. Embriyo oluşum oranları %0.25 ile %31.00 arasında değişmiştir. MS besi ortamına ekilen anterlerden embriyo oluşum oranı %3.9 olurken, DDV ortamına ekilen anterlerden embriyo elde etme oranı %9.33 olmuştur. Tomurcuklara ön uygulama yapılması (4 °C’de 24 saat bekletme) embriyoid oluşumuna önemli bir katkı sağlamamıştır. Ön uygulamaya tabi tutulan anterlerde embriyo oluşum oranı %6.7 olurken, kontrol uygulamasında %6.4 olmuştur. Çalışmada 9 °C inkübasyon uygulamasında embriyo oluşum oranı %7.60 olurken, 35 °C’de inkübasyon uygulamasında embriyo oluşum oranı %5.50 olmuştur.

2016, 60 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Anter kültürü, genotip, stres, inkübasyon, DDV, MS

ABSTRACT

MASTER THESIS

DEVELOPMENT OF DIHAPLOID LINES IN SOME PEPPER GENOTYPES WITH IN VITRO ANDROGENESIS

MURAT EMRE ÇELİK

**GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF HORTICULTURE

SUPERVISOR: PROF.DR. NAİF GEBOLOGLU

Anther culture has an important role in pepper breeding. The success rate varies with genotype, nutrient media composition, growing conditions of donor plants, anther excision time, pre-treatments, stress conditions and ecological factors. In this study, it was researched that the effects of genotype, nutrient media, stress and , incubation treatments on haploid plant development of ‘Üç Burun’ pepper genotypes. İstek F₁, Köylüm F₁, Üçburun F₂ and Tokat pepper which is a native genotype in Tokat city, were used as donor plants in the experiment. DDV which was recommended by Dumas de Vault *et al.* (1981) and MS which was recommended by Murashige and Skoog (1962), were used as nutrient media. 0.01 mg/l Kinetin + 0.01 mg/l 2,4 D + 0.03 mg/l vitamin B12 were added to nutrient media. Flower buds were held 24 hours at 4 °C. Low temperature treatments were not made on buds of control plants. After sowing, anthers were held 8 days in the dark at 9 °C and 35 °C, afterwards they were moved to place which has 16 hours day/8 hours night and 25±2 °C temperature. After anthers were held in this place 4 days, they were transferred to regeneration media. All of the genotypes responded more or less to the anther culture. The highest embryo development was obtained from Tokat pepper genotype. Embryo development rates varied between 0.25 % and 31.00 %. While the rate of embryo development from anthers was 3.90% in MS media, it was 9.33% in DDV media. Pre-treatment on buds (24 hours at 4 °C) made a significant contribution to the embryo development. While the embryo development rate was 6.70% on anthers which were put into pre-treatment, it was %6.40 in the control treatment. In the study, while the embryo development rate was 7.60% in 9 °C incubation treatment, it was 5.50 % in 35 °C incubation treatment.

2016, 60 PAGE

KEYWORDS: Anther culture, genotype, stress, incubation,DDV,MS

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, yüksek lisans tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve yazım aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek fikirleriyle yetişme ve gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Naif GEBOLOĞLU' na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarımın her anında bana destek olup yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Sevtap DOKSÖZ BONCUKÇU ve laboratuvar çalışmalarında, yazım aşamasında bana destek olan çalışma arkadaşım Zir. Müh. Deniz Sena KARABEKİROĞLU'na, Bahçe Bitkileri Bölümü lisans öğrencilerine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her konuda maddi ve manevi olarak yanımda olan, çalışmalarım süresince birçok fedakarlık göstererek beni destekleyen annem Gülcan ÇELİK'e, bu mesleği seçmemde en büyük faktör olan ve meslek hayatımda hep izinden yürümeye çalıştığım babam Zir. Müh. Tuncer ÇELİK'e, tezimin yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen canım arkadaşım End. Müh. Hande SARAÇOĞLU'na sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

MURAT EMRE ÇELİK

Temmuz 2016

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÇİZELGE LİSTESİ	vi
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1. Haploid Bitkilerin Önemi ve Haploid Bitkilerin Oluşum Yolları.....	7
2.2. Anter Kültürü	9
2.2.1. Anter kültürünü etkileyen faktörler	10
2.2.1.1. Donör bitkiden kaynaklanan faktörler	10
2.2.1.2. Anter kültüründen kaynaklan faktörler.....	12
2.2.1.3 Besin ortamının bileşimi ve yapısı.....	14
2.2.1.4. İnkübasyon Koşulları	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1. Materyal	18
3.1.1.Bitkisel materyal:.....	20
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1.Donör bitkilerin yetiştirilmesi	22
3.2.2. Çiçek tomurcuklarının gruplandırılması ve toplanması	24
3.2.3.Çiçek tomurcuklarının dezenfeksiyonu, anterlerin çıkarılması ve dikimi.....	26
3.2.5.Çimlendirme çalışmaları	32
3.2.6.Haploid bitkilerin dış koşullara alıştırılması	32
3.2.7.Ploidi testi ve kromozom katlaması	32
4. BULGULAR	35
4.1. Uygulamalara Bağlı Olarak Başarı Oranları	35
4.2. Genotiplere göre başarı düzeyleri	39
4.4. Çiçek tomurcuklarına stres uygulamasının başarı düzeyine etkisi	40
4.3. Ortamlara göre başarı düzeyleri	41
4.5. İnkübasyon uygulamalarının başarı düzeyine etkisi	42
4.6. Sitolojik incelemeler	44
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	45
6. KAYNAKLAR	49

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1. Tül seradan görünüm	18
Şekil 3.2. Doku Kültürü Laboratuvarı ve ekipmanların genel görünümü	19
Şekil 3.3. İklimlendirme odasının iç görünümü	20
Şekil 3.4. Steril ortam çalışmalarının yürütüldüğü flow kabinden görünüm....	20
Şekil 3.5. Denemede kullanılan genotiplerin bitki ve meyve görüntüleri	21
Şekil 3.6. Donör bitkilerinin tohumlarının ekildiği viollerden görüntüler	22
Şekil 3.7. Donör bitkilerden görüntüler	23
Şekil 3.8. Açmış çiçeklerin ve meyvelerin bitkiden uzaklaştırılması.....	23
Şekil 3.9. Asetokarmin ile boyama yapılmış preparatların incelenmesi.....	24
Şekil 3.10. Genotiplere ait tomurcuk ve anterlerin görüntüleri	25
Şekil 3.11. Anterlere uygulanan sterilizasyon işlemleri	26
Şekil 3.12. Anterlerin tomurcuklardan alınması ve besin ortamına ekilmesi ...	27
Şekil 3.13. Anter ekimi tamamlanmış petrinin görüntüsü	27
Şekil 3.14. R1 ortamlarındaki anterlerinden görüntüler	31
Şekil 3.15. Flow sitometri analizi için preparatların hazırlanması	33
Şekil 4.1. Tokat biberinde embriyo oluşumu.....	37
Şekil 4.2. İstek F ₁ genotipinde embriyoid oluşumu.....	37
Şekil 4.3. İstek F ₁ genotipinin embriyoidlerinin bitkiye dönüşüm aşaması	38
Şekil 4.4. Köylüm F ₁ genotipinde embriyoidlerin bitkiye dönüşüm aşaması ..	39
Şekil 4.5. Genotiplere göre başarı düzeyi	40
Şekil 4.6. Çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulamasının başarı düzeyi.	41
Şekil 4.7. Ortamlara göre başarı düzeyi.....	42
Şekil 4.8. İnkübasyon uygulamalarının başarı düzeyi	43
Şekil 4.9. Diploid (A) ve haploid (B) biber meyvelerine ait görüntüler.....	44
Şekil 4.10. Stoma görüntüleri	44

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Anter kültüründe DDV ortamı için kullanılan kimyasallar ve dozları	29
Çizelge 3.2. Anter kültüründe MS ortamı için kullanılan kimyasallar ve dozları	30
Çizelge 4.1. Genotip, besi ortamı, stres ve inkubasyon koşullarına bağlı olarak embriyoid ve bitki oluşma oranları	36



1.GİRİŞ

Ana vatanı Peru, Şili ve Meksika'yı içine alan Orta ve Güney Amerika olan biber, *Solanaceae* familyasının önemli türlerinden biridir. Biber aynı zamanda Türkiye'de de majör sebzeler arasında yer almaktadır. Dünya biber üretimi 31 milyon 171 bin tondur. Türkiye, Dünya biber üreticisi ülkeleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Türkiye'nin biber üretimi 2013 yılında 2 milyon 159 bin ton iken, 2015 yılında 2 milyon 190 bin tonun üzerine çıkmıştır (Anonim, 2015).

Biberin geniş yayılım gösterdiği bölgelerden Meksika ve Orta Amerika'da geniş tip ve çeşit zenginliğine rastlanmaktadır. Güney ve Orta Avrupa, Afrika, Asya ve Latin Amerika ülkeleri de biberin ikincil gen merkezleri arasında yer almaktadır (Anonim, 1983). 1493 yılında Colombo'nun Amerika'yı keşfetmesiyle birlikte biber, İspanya ve Portekiz'den Avrupa'ya giriş yapmış, 16.yüzyılın ortalarında Orta ve Kuzey Avrupa'ya doğru yayılmaya devam etmiştir (Greenleaf, 1986). Biber ilk olarak Avrupalılar tarafından İstanbul'a getirilmiştir (Vural ve ark., 2000). Biber Türkler tarafından Kuzey Afrika ve Orta Doğu ülkelerine tanıtılmış ve taşınmıştır (Andrews, 1999).

Biberin kültüre alınan ilk tipleri çok tohumlu, küçük meyveli ve ince etliydi. Kuşlar ve insanlar gibi taşıyıcı etmenler yardımıyla bu tohumlar daha geniş alanlara yayılmışlardır. Daha sonra insanlar tarafından kendi talepleri doğrultusunda meyve kalitesi yüksek, lezzetli meyvelere sahip, verimli bitkiler seçilip, çoğaltılmıştır. Bu yolla amatör olarak başlayan biber ıslah çalışmaları, 20. yüzyıl başlangıcıyla büyük artış gösteren dünya nüfusunun ihtiyaçlarını karşılamaya yönelik; meyve kalitesi, erkencilik, verimlilik, hastalık ve stres faktörlerine karşı dayanım gibi özellikler üzerinde çalışmalar yapılarak profesyonel boyut kazanmıştır.

Günümüzde moleküler teknikler, bitki biyoteknolojisi gibi modern bilimsel metotlar sayesinde bitki ıslah çalışmaları büyük bir ivme yakalamıştır. Biber ıslahında da bitki biyoteknolojisi yerini almış ve vazgeçilmez tekniklerden biri olmuştur. Bu çalışmalar ile birçok bitki türünde üstün özellikli bireyler geliştirilmiş ve çeşit geliştirme çalışmalarında önemli gelişmeler sağlanmıştır.

Bitki biyoteknolojisinin amacı, daha ekonomik, kalite ve kantite yönünden daha zengin bitkisel materyalleri geliştirirken; çözümünü güç olan sorunlar karşısında klasik yöntemler haricinde modern teknikleri uygulayıp, yüksek ve kaliteli bitkisel üretimin gerçekleşmesine yardımcı olmaktır. Doku kültürü teknikleri de bu modern yöntemlerden birisidir (Hatipoğlu, 1997).

Doku kültürü çalışmalarının temel taşı olan haploid bitkiler, somatik hücrelerindeki kromozom sayıları ile eşey hücrelerindeki kromozom sayıları birbirine eşit olan bitkilerdir. Bu bitkileri elde etme tekniği ise haploidizasyon tekniğidir (Khush ve Virmani, 1996). Haploidizasyon tekniği, yıllar süren ve bir hayli zor olan kendilemeler yerine kullanılacak en iyi alternatiflerden biridir. Haploid bitkilerin tamamen homozigot yapıda olmalarından dolayı, haploidizasyon tekniğinin ise yıllar süren çalışmaları en aza indirmesinden dolayı haploid bitkilerin ve haploidizasyon tekniğinin bitki ıslahındaki yeri oldukça önemlidir (Heiser, 1976; Andrews, 1985).

Haploid bitkilerin en önemli özelliklerinden birisi de kendine uyumsuz türlerde homozigot dihaploid hatların çok kısa sürede üretilmesine yardımcı olmasıdır. Bu özellik ıslahçılar açısından oldukça önemli avantajlar sağlar. Dihaploid hatlar kullanılarak genetik ve ıslah çalışmaları kolaylaşır, sonuca daha kısa zamanda ulaşabilmeye olanak sağlar. Yabancı tozlanan türlerde heterozigotluk oranı çok yüksek olduğundan, homozigot hatlara ulaşmak için onlarca generasyon kendileme yapmak gerekir. Dihaploidizasyon yöntemi yardımıyla F_1 çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılan homozigot saf hatlara, bir generasyonda ulaşabilmektedir. Yabancı tozlanan türlerde 11-12 yıl, kendine tozlanan türlerde 6-7 yıl süren ıslah çalışmaları, haploidizasyon teknikleri ile 1-2 yıla kadar düşürülmektedir.

Haploidler ve dihaploidler aynı zamanda sitolojik, fizyolojik ve genetik açıdan önemli araştırma materyalleridir. Dominansinin kaldırılması, eklemeli gen etkisinin katlanmasında, homozigot dihaploid bitkilerin döllerinde açılım olmadığı için selekte çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilir ve ıslah etkinliğini fazlasıyla artırır. Ayrıca birçok gen tarafından kontrol edilen özelliklerin, yeni nesillere aktarılması haploidizasyon tekniğiyle daha kolay olmaktadır. Yüksek ve düşük sıcaklıklar, su stresi, toprak tuzluluğuna toleranslık gibi abiyotik çevre faktörlerine karşı dayanıklı

heterozigot bireylerin özelliklerini kaybetmeden saflaştırılması da haploidizasyon yöntemi ile daha kolay olmaktadır. Bu teknik, Haploid kromozom sayısına sahip bitkilerin elde edilmesinde, bu bitkilerin çeşitli yöntemlerle diploid hale çevrilmesinde ve ebeveyn birey olarak kullanılacak olan %100 saf hatların elde edilmesinde oldukça önemli rol oynamaktadır. Üstün özellikli F_1 düzeyindeki bireylerin elde edilme işlemlerinde ciddi emek ve zaman kazanımları sağlamaktadır. Kendine uyumsuzluk gösteren ve yabancı döllen türlerde çekilen zorluklar ve uzun süren çalışmalarda anter kültürü devreye girerek birçok kolaylık sağlamıştır (Ellialtıoğlu 2005).

Haploid bitki ve hücrelerde ortaya çıkan mutasyonlar sayesinde de farklı genetik yapıya sahip haploid bitkiler elde edilebilmektedir. Amfidiploidi yöntemiyle de kısa süre zarfında %100 homozigot ve diploid yeni genotipler geliştirilebilmektedir. Mutasyonların ve modifikasyonların incelendiği somatik hücre genetiği çalışmalarında, haploid hücre kültürü aktif olarak kullanıldığı ve ciddi avantajlar sağladığı belirtilmektedir (Reinert ve Bajaj 1977). Ayrıca diploid materyale uygulanan mutagenlerin resesif yönde yarattığı mutasyonlar, bu materyalden çekilen haploidler yardımıyla ilk generasyonda belirlenebilmektedir.

Haplodiploidizasyon ya da diğer bir ifade ile dihaploidizasyon, iki farklı aşamadan meydana gelmektedir. İlk aşama haploid bitkilerin elde edildiği aşama; haploidizasyon aşamasıdır. Bu aşama, erkek veya dişi gametten yola çıkılarak, somatik hücrelerinin kromozom sayılarıyla gamet hücrelerinin kromozom sayıları eşitlenmiş haploid bitkilerin elde edildiği aşamadır. İkinci aşama ise, elde edilen haploid bitkinin n kromozom sayısını $2n$ seviyesine katlama aşamasıdır. Ploidi seviyesi diploid olan bitkilerin çiçeklerinin kendilenmesinin ardından bu bitkilerden alınan tohumların oluşturacağı bireyler tamamen saf ve homozigot yapıda olmaktadır. Ellialtıoğlu ve ark.,(2006), bu yöntemin, uzun yıllar, büyük uğraşlar sonucu yapılan saflaştırma çalışmalarına göre çok daha avantajlı bir alternatif olduğunu ve dünyada ıslahçılar tarafından yoğun olarak uygulandığını bildirmektedirler.

Anter kültürü çalışmalarında haploid bitkilerin elde edilmesi üzerine birçok faktör etki etmektedir. Donör bitkinin yaşı ve yetiştirme koşulları, genotipin yatkınlığı, besi ortamının özelliği ve bileşenleri, stres ve inkübasyon koşulları ve anter alım dönemi bu faktörlerin en önemlileridir.

Aynı kültür ortamlarında, aynı şartlar altında, aynı uygulamalara tabi tutulan farklı genotipler her çalışmaya farklı tepkiler verebilmektedir. Donör bitkiler yetiştirilirken her evrede maruz kaldıkları çevresel etmenler, iklim şartları, yetiştirildiği ortamın koşulları anterlerde ve mikrosporlarda farklı sonuçlara sebep olur ve dolayısıyla da anter kültüründe elde edilecek başarı oranını etkilemektedir. Başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisi anterlerin içerisindeki mikrosporların bulunduğu dönemdir. Anterler; genotiplere göre farklılık gösterse de genellikle erken gelişme dönemlerinde kültüre alındığında başarılı sonuçlar vermektedir. Mikrosporlar için en uygun evre tek çekirdekli gelişim evresinin ilk aşamasıdır. Uygun evredeki anterleri bulunduran tomurcuklara yapılan ön uygulamalar da başarıyı artırmaktadır. Kültür öncesi yapılan tomurcukları düşük sıcaklıkta bekletme uygulamalarının anter kültüründe başarıyı etkilediği belirtilmektedir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen önemli faktörlerden birisi de besi ortamı ve içeriğidir. Türlerin hepsinde olumlu sonuç verecek tek bir besin ortamı belirlemek pek mümkün değildir. Fakat anterlerin gelişme dönemleri ihtiyaçlarına göre ortamların içeriklerine büyümeyi düzenleyici maddeler, farklı kimyasallar ya da bazı ekstratların ilavesiyle başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bütün kültür işlemlerinin ardından besi ortamına alınan anterlerin inkübe edildiği koşullar da embriyo çıkış oranını etkilemektedir. Yüksek sıcaklıktaki inkübasyon koşulları düşük sıcaklık uygulamalarına göre daha olumlu sonuç vermektedir.

Özetle, dihaploidizasyon tekniği; *In vitro* koşullarda belirli teknikler kullanılarak haploid bitkilerin elde edilmesi ve bunların çeşitli yöntemlerle kromozom sayılarının katlanmasıdır. Bu yöntem emek ve zaman açısından ıslahçılara geniş olanaklar sağlayıp, birçok amaca hizmet etmektedir. İlk melezlemelerden sonra homozigotlaştırma için gerekli olan 6-7 generasyonluk kendileme süresi haploidizasyonla 1 generasyona indirilmektedir. Bu tarz zaman ve işgücü kazanımlarıyla toplam ıslah süresi 12-13 yıldan, 5-6 yıla indirebileceği ispatlanmıştır (Abak,1986). Bu gibi avantajlarından dolayı haploidizasyon tekniği modern ıslah çalışmalarında büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmanın amacı, her yıl artış gösteren biber üretimi ve üretimde karşılaşılan sorunlar göz önünde bulundurularak *in vitro* teknikler ile dihaploid hatların elde edilmesidir. Araştırma da anter kültüründe başarıyı artırmaya yönelik bazı uygulamalar denenmiştir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen önemli faktörlerden olan genotip, besi ortamı, inkübasyon koşulları ve ön tomurcuk uygulamaların bazı teknik ve dozları uygulanarak başarı üzerine etkileri araştırılmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Solanaceae familyasında yer alan biberin yoğun olarak kullanılan türü *Capsicum annum* L. ($2n= 2x= 24$) olarak adlandırılmaktadır. *Capsicum* cinsi 50 adet türü kapsamaktadır. Bu 50 adet türden 5 tanesi (*C. annum*, *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. frutescens* ve *C. chinense*) ekonomik olarak kültüre alma çalışmalarında kullanılmıştır. Ülkemizde hem açıkta hem de örtü altında yetiştiriciliği yoğun olarak yapılan biber, düşük ve yüksek sıcaklıklar, hastalık ve zararlılar gibi sorunlardan verim ve kalite olarak olumsuz etkilenmektedir. Ülkemiz biber üretiminde birim alandan en yüksek verim ve kaliteyi yakalamanın yolu, bu gibi olumsuz etmenlere karşı dayanıklı/tolerant çeşitlerin geliştirilmesidir.

Dişi ve erkek organın beraber bulunduğu mor veya yeşil renkte olabilen hermafrodit yapıdaki biber çiçekleri; 5 çanak, 5 taç, 5 erkek organ taşır ve 3-5 karpelli bir adet dişi organa sahiptir. Biber bitkilerinin yaprak ve dal koltuklarında birden fazla çiçek bulunur ve dikotan dallanma gösterir. Dişi organların erkek organlardan önce reseptif hale geçmesiyle %3 ile %30 arasında değişen oranlarda yabancı dölleme oranı görülmektedir (Günay, 1981).

Biber türleri içerisinde en çok üretimi yapılan *C. annum*, Türkiye’de ve Dünya’da biber üretim miktarının en büyük payını oluşturmaktadır. Biber üretimi Türkiye’de her sene % 4-10 arasında sürekli bir artış göstermektedir. 1980 yılında 220.000 ton olan biber üretimi bu doğrultuda 2015 yılında 2.3 milyon ton seviyelerine yaklaşmıştır (Anonim, 2015)

Türkiye’de özellikle yeşil devrim sonrasında birçok bitki türünde olduğu gibi biberde de önemli gelişmeler yaşanmış, özellikle ıslah alanında çalışmalar büyük bir ivme kazanmıştır. Bu hareketlilik içinde biber ıslah çalışmaları çok yönlü gelişmiş ve günümüzde artık çok üstün biyoteknolojik yöntemler de kullanılarak önemli gelişmeler sağlanmıştır. Anter kültürü bu yöntemler arasında önemli bir yere sahiptir. İlk erkek üreme hücresi kökenli haploid bitkiye bodur bir pamuk bitkisinde 1920 yılında rastlanmıştır (Dunwell, 2010). *In vitro* koşullarda anter kültürü tekniğiyle haploid bitki elde etme çabalarına ise ilk olarak Wang ve ark. (1973) başlamıştır. İlk polen embriyogenesi çalışmaları ise George ve Narayanaswamy (1973) tarafından

yapılmıştır. Türkiye’de anter kültürü denildiğinde akla gelen ilk isimlerden biri olan Kazım Abak, 1983 yılında anter kültürü çalışmalarına öncülük etmiştir. Türkiye orjinli biber genotiplerinde yürütülen ilk çalışmalarda uygun besi ortamı kullanılarak %10,38 başarıya ulaşılmıştır (Abak,1983).

2.1. Haploid Bitkilerin Önemi ve Haploid Bitkilerin Oluşum Yolları

Haploid bitkilerin önemli özelliklerini sıralayacak olursak:

- Haploid bitkiler, her bir lokusundaki allelerden sadece bir seri içermektedirler.
- Haploid bitkilerin homolog kromozomları sadece bir takım içerdiği için resesif mutasyonların açığa çıkartılmasında büyük rol oynar.
- Haploid bitkilerden, kromozom katlanması işlemi ile %100 homozigot saf hatlara ulaşılabilir.
- Haploid bitkilerde homozigoti çok kısa bir sürede elde edilebilir.
- Dioik türlerdeki sıkıntılar veya homozigotiye ulaşmanın kendileme depresyonu nedeniyle zor olduğu türlerde(çilek ve lahana), dihaploidi yöntemiyle bu sorun bir generasyonda çözülebilir.
- Dihaploidizasyon yöntemiyle katlanıp %100 saf homozigot hale gelen haploid bitkiler, F₁ hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilir.
- F₁ seviyesinde melez bitkilerden haploidler çekilerek farklı genotiplerdeki özellikler tek bir genotipte toplanabilir.

Haploid bitkiler bazı türlerde, çeşitli doğal yollarla doğada kendiliğinden oluşabilmektedir. Doğal haploidlerin oluşum yolları beş farklı şekilde gözlenir:

1-) *Ginogenesis*: Yumurta hücresi döllenme olmadan zigot gibi bölünmeye başlar ve haploid yapıda embriyoyu oluşturur. Dişi ve erkek eşey hücreleri birleşmediği halde; polen generatif çekirdeğiyle ve embriyo kesesi sekonder çekirdekleri birleşerek embriyo için endospermi oluştururlar (Sauton, 1987).

2-) *Androgenesis*: Yumurta hücresi döllenmeden önce dişi eşey hücresinin çekirdeği kaybolur. Bu haploidlerin hücrelerinde sadece erkek gamet kromozom takımları vardır. (Goodsell, 1961).

3-) *Semigami*: Erkek eşey hücresi ve dişi eşey hücresi birleşerek embriyo oluşumuna katılmasıyla oluşur. Ana ve babaya ait sektörlerin bulunduğu kimeralı haploid bitkiler semigami ile oluşur (Turcotte ve Feaster, 1969).

4-) *Poliembriyoni*: Normal işleyiş sonucu döllenme olur ve zigot bölünmeye başlar. Ancak döllenmiş yumurta hücresinin yanındaki sinerjit hücrelerden biride bölünür ve gelişir. Sonuç olarak iki adet haploid embriyo oluşur (Lacadena, 1974). Poliembriyoni ile oluşan haploid biber ve şeftali bireylerine rastlanmıştır.

5-) *Kromozom eliminasyonu*: Yumurta hücresi ile polen generatif çekirdek birleşerek döllenme olur. Ancak embriyo gelişirken ilk evrelerde, ebeveynlerden birinde genellikle babaya ait kromozomlar elimine olur ve gelişen embriyo haploid (n) kromozom içerir (Subrahmanyam ve Kasha, 1973).

Haploid bitkiler %0.1 - 0.001 gibi çok düşük oranlarda doğada kendiliğinden ortaya çıkabilmektedir. Bu rastlantılar türlere ve türler içindeki genotiplere bağlı olarak değişmektedir. Birçok türde ise doğal haploid oluşumuna hiç rastlanmamıştır (Pochard ve Dumas de Valux, 1971). Spontan haploid oluşumundaki yetersiz ve düzensiz çıkışlar ıslah çalışmalarına yeterli materyali sağlamadığı için bu rastlantı yöntemi esas alınamamaktadır. Bu yöntem yerine, ıslah çalışmalarında kullanılabilecek sayıda ve düzenli olarak haploidlerin elde edilebildiği çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar türler arası melezlemeler, tozlaşmanın geciktirilmesi, sıcaklık şokları, ışınlanmış polenlerle tozlama, *In vitro* teknikler, X ve UV ışınları uygulamaları gibi yöntemlerdir. En çok kullanılan yöntemlerden biri olan *In vitro* teknikler, 2 farklı yöntem ile uygulanır. Erkek gamet hücresi uyarılarak yapılan yöntemler *Androgenesis* olarak, dişi gamet hücresi uyarılarak yapılan yöntemler *Gynogenesis* ve *Parthenogenesis* olarak adlandırılmaktadır. *Androgenesis* de anter kültürü ve mikrospor kültürü olarak ikiye ayrılır. Dişi gametten haploid uyarımı ise ovül ve ovaryum kültürleri, yetersiz polenle tozlama ve kromozom eliminasyonları ile yapılmaktadır. Çiçek tozlarına veya bitkilere toluidin mavisi, maleyik hidrazid, azotoksit, kolhisin, kloramfenikol ve paraflor fenilalanin gibi bazı kimyasallar ve bazı büyüme düzenleyicilerin (2-kloro etik fosfoik asit, 2,4-D) uygulamaları da yöntemler arasında yer almaktadır (Yeung ve Thrope, 1981; Bajaj, 1983; Pierik, 1989).

Haploid bitkiler eksik ya da kusurlu bir yapıya sahip olmamalarına rağmen diğer normal bitkilere göre küçük yapıya ve küçük organlara (daha kısa boy, daha dar yaprak, küçük çiçek) sahiptirler. Hücreleri de taşıdıkları kromozom sayıları bakımından gamet hücreleriyle aynıdır. Bu yüzden gamet oluşturamazlar. Dolayısıyla tohum bağlayamazlar ve kısırdırlar (Reinert ve Bajaj, 1977).

In vitro şartlarda uygulanan tekniklerle elde edilen haploid bitkiler, ıslah çalışmalarında kullanılabilmesi için verimli hale yani diploid yapıya dönüştürülmesi gerekmektedir. Haploid bitkiler kromozomlarının katlanmasıyla verimli (diploid) yapıya dönüşmektedir. Bu katlama işlemi belirli kimyasallar yardımıyla yapılmaktadır yada spontane olarak gelişmektedir. Haploid bitkilerin kromozomlarının katlanıp, kısa sürede durağanlaşmasını ve ıslah çalışmalarında kullanılmasını sağlayan bu yöntemlere dihaploidizasyon adı verilir. Günümüzde arpa, buğday, çeltik, mısır, kolza, patlıcan, biber, hıyar, kavun, gerbera gibi birçok bitki türünde dihaploidizasyon yöntemi ile başarıya ulaşılmıştır. (Kaloo, 1986).

2.2 Anter Kültürü

Anter kültürü; tomurcuklardan alınan, içerisinde olgunlaşmamış mikrosporları bulunduran anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak; yapay besi ortamlarına steril koşullarda yerleştirilip, polen hücrelerinden haploid bitkilerin elde edilmesi yöntemidir. Büyükalaca ve ark (2004), *androgenesis* veya *mikrospor androgenesis*'ini şu şekilde açıklamaktadır; doğası gereği iki çekirdekli yapıya dönüşme eğilimindeki polen tanesini, daha henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik hücre olarak gelişime yönlendirilmesidir. Anter kültüründe en yüksek başarılar *Solanaceae* (Patlıcangiller) familyasında elde edilmiştir. *Cruciferae* (Trupgiller), *Gramineae* (Buğdaygiller) ve *Ranunculaceae* (Düğünçiçeğigiller) familyalarının anter kültürüne verdiği tepkiler olumlu düzeyde sayılmaktadır (Bajaj ,1983 ; Rashid, 1983). Tsay ve ark. (1986), mısır ve çeltik bitkilerinde başarılı sonuçlara imza atmıştır. Yapılan çalışmalar otsu ve tek yıllık bitkilerde anter kültürünün çeşitli uygulamaların desteğiyle olumlu sonuçlar verdiğini göstermektedir. Ancak odunsu bitkilerde yapılan anter kültürü çalışmalarının başarı oranları diğerlerinin aksine bir hayli düşüktür.

Anter kültürü yapılırken, uygun aşamadaki tomurcuklar bitkilerden alınıp belirli protokoller çerçevesinde gerekli sterilizasyon işlemleri yapılır ve tomurcuklar olabildiğince streil hale getirilir. Ardından streil forsepe ve bistüri yardımı ile anterler tomurcuk içerisinden alınır. Anterler alınırken tomurcuk içerisinden çıkarılırken zarar görmemesine ve anter sapının veya anter sapı kalıntılarının anter üzerinde bulunmamasına oldukça dikkat edilmelidir. Steril koşullarda tomurcuklardan alınan anterler önceden hazırlanmış ve sterilize edilmiş ortamlara ekilir. Agar eklenmiş besin ortamlarına yerleştirilen anterler dikim işlemi gerçekleştikten sonra atmosferden kaynaklı kontaminasyonları engellemek için petri kutularının kenarları parafilm ile kapatılır. Ekimi yapılan anterlerden embriyo elde etme başarısını artırmak için inkübasyon koşullarına alınır.

Bu aşamadan sonra gelişmeler iki farklı doğrultuda seyreder;

- 1- Direkt Androgenesis: Bu aşamada, embriyo gelişimi direk mikrosporelerden olur ve yaklaşık 1 ay gibi bir süre zarfında toprağa aktarılacak boyuta gelir.
- 2- İndirekt Androgenesis: Anter içindeki mikrosporeler ilk olarak kallusu oluşturur. Embriyo, bitkinin kallustan rejenerasyona girmesiyle oluşur.

2.2.1. Anter kültürünü etkileyen faktörler

2.2.1.1. Donör bitkiden kaynaklanan faktörler

A-) Genotip

Anter kültüründeki başarının büyük bir kısmı anterlerin alındığı bitkinin genotipleriyle alakalıdır. Tüm bitki gruplarında aynı kültür koşulları altında, aynı uygulamalara tabi tutularak yürütülen tüm çalışmalarda genotiplerden farklı farklı tepkiler alınmaktadır. Yapılan çalışmalarda 12 tütün türünden 5 tanesinin, 18 farklı *Arabidopsis* türünden 3 tanesinin ve 118 *Solanum* genotipi içerisinden sadece 19'unun çalışmalara cevap verdiği belirtilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Morison ve ark (1986), *Capsicum annuum*'a ait farklı genotiplerle yürüttükleri çalışmada embriyo sayısının ve embriyodan bitkiye dönüşüm oranının genotiplere göre farklılık gösterdiğini bildirmektedirler.

Mityko ve ark (1995) ait, biberin 4 adet ıslah hattı, 7 adet kültür türü ve bunların melezlerinde uygulanan anter kültürü çalışmalarında 2 adet kültür çeşidi hariç diğer genotiplerden başarı elde edilmiştir.

Rodeva ve ark. (2004)'nın yürüttüğü çalışmada 20 adet Bulgaristan biber genotipi anter kültürüne alınmış ve sonuç olarak 2 genotip indirek organogenesis olurken diğer genotipler direk embriyogenesis olarak geliştiğini bildirmektedirler.

Taşkın (2005), 5 farklı biber genotipinde 4 farklı ortam uygulamasıyla anterlerin gelişimlerini incelediği araştırmada, genotipin başarı üzerindeki etkisinin oldukça önemli olduğunu aktarmaktadır.

Patlıcanda yapılan bir çalışmada, değişik ülkelerden toplanan 8 patlıcan çeşidi ve bunlar arasında yapılan 16 adet melez bitkiler kültüre alınmış ve gelişimleri incelenmiştir. Ebeveynlerde %17.3, melezlerde %42 başarı oranı elde edilmiştir (Tuberosa ve ark., 1987).

Suprunova ve Shmykova (2008), hıyarda *in vitro* ovül, anter ve mikrospor kültürleri başarısı üzerine genotip ve bazı etmenlerin etkilerini araştırmışlar ve sonuç olarak sadece “Gordion” isimli çeşitten cevap alabilmişlerdir.

Li ve ark (1988), 6 farklı Kanada orjinli yazlık buğday genotiplerinde anter kültürü çalışmış ve aynı koşullar altında genotiplerden farklı sonuçlar elde etmiştir. *Lycopersicon esculentum* Mill.'e ait 85 adet genotip ile yürütülen bir çalışmada genotiplerin androgenik kabiliyetleri test edilmiştir. 70 genotipten olumlu cevap alınırken 15 genotipten hiçbir şekilde tepki alınamamıştır (Zagorska ve ark, 1998).

Genotipin anter kültürü üzerindeki etkisini azaltmak için literatürde farklı yöntemlerin uygulanabilir olduğu yer almaktadır. Dunwell (1981)'in bildirdiğine göre, genotipin etkisini azlatmak için her genotip için ayrı ayrı kültür koşullarının optimize edilmesi gereklidir. Tuberosa ve ark. (1987) ise embriyo oluşturma oranı yüksek çeşitler ile embriyo oluşturma oranı düşük çeşitler arasında yapılan melezlemelerden oluşan bireyler kültüre alındığında değişen genotip sonucu embriyo oluşturma oranının yükseldiğini açıklamaktadır.

B-) Donör bitkinin yetiştirme koşulları

Anterlerden elde edilecek olan başarı, donör bitkilerin yetiştirildiği dönemdeki ve ortamdaki sıcaklık, ışık yoğunluğu, günlük ısınma süresi, CO₂ konsantrasyonu, bitkinin beslenme koşulları ve tüm çevresel faktörler tarafından etkilemektedir. Aynı bitki türü ve hatta aynı çeşitlerde yapılan çalışmalardan farklı sonuçların alınması, genotipi aynı olsa da donör bitkilerin yetiştirme koşullarının anter kültüründe elde edilecek başarıyı etkilediğini göstermiştir.

Dunwell ve Sunderland (1973), farklı mevsimlerde yetiştirilerek sürekli çiçek açması sağlanan patetes bitkilerinde, Haziran ayından başlayarak alınan anterlerden Nisan-Mayıs aylarında alınan anterlerin daha fazla embriyo oluşturma oranını verdiğini bildirmektedirler.

Aynı bitki türleriyle ve hatta aynı çeşitlerle yürütülen çalışmalarda birbirinden farklı sonuçların alınması, genotiplerin aynı olmasına rağmen donör bitkilerin yetiştirme koşullarının farklı olmasından kaynaklı olduğu kanıtlanmıştır (Ellialtıoğlu 2005).

2.2.1.2. Anter kültüründen kaynaklan faktörler

A-)Anterlerin gelişme dönemi

Tomurcukların donör bitkiden koparıldığı evrede polenlerin anter kültürü için en uygun gelişim seviyesinde olması büyük önem taşır ve bu aşama da türlere göre farklılık gösterir (Dunwell, 1981).

Çoğu bitki türünde anterlerin içerisindeki mikrosporların tek çekirdekli döneminin erken veya geç aşaması en uygun aşama olarak belirlenmiştir. Anterler içindeki mikrosporun gelişme aşamasını belirlemek için ezme preparasyon tekniği ve asetokarmin ile hızlı boyama en fazla kullanılan yöntemlerdendir (Ellialtıoğlu, 2000).

Abak (1983), en elverişli tomurcuk gelişme döneminin mayoz bölünmeyi izleyen birinci mitoz evresinin başlangıcı yani tomurcukların 3.5-4.0 mm boyutlarına ulaştıkları zamana rastladığını belirtmektedir.

Dunwell (1976), tütün bitkisinde anter kültürü çalıştığı bir araştırmasında polenlerin mitoz bölünme esnasında optimum tepki verdiğini, daha geç aşamada daha düşük tepki verdiğini belirtmektedir.

Çiner ve Tıprıdamaz (2002), biber tomurcuğunun kaliks ve korolla seviyelerinin aynı veya korollanın kaliksten biraz daha uzun olduğu dönemin en uygun dönem olduğunu bildirmektedir. Mityko ve ark (1995)'da aynı doğrultuda korolla ile kaliksin aynı uzunlukta olduğu ya da korollanın kaliksi bir parça geçtiği aşamanın anter kültürü için en uygun aşama olduğunu belirtmektedirler. Sayılır ve Özzambak (2000) ise biber tomurcukları uzunluk olarak 4-6 mm boyutuna ulaştığında en uygun mikrospor aşamasında olduklarını bildirmektedir. Çömlekçioğlu ve ark (2001), anterlerin yarısında antosiyan oluşumu olduğu aşamanın en uygun bir aşama olduğunu belirtmektedir. Chambonnet (1988), anter kültürü için en uygun anter aşamasının, mikrosporların I.mitoz aşaması olduğunu bildirilmiştir.

B-) Tomurcuklara yapılan ön uygulamalar

Kültüre alma işlemleri öncesinde tomurcuklara yapılan bazı ön uygulamalar anterler içerisindeki mikrosporların kültür aşamasındaki gelişimlerini olumlu yönde etkilemektedir. Anterlere yapılan ön uygulamalardan en etkili uygulama soğuk uygulamalarıdır. 4-10° C'ler arasında 72 saat ile 4 hafta arasında tutulan tomurcukların polen rejenerasyonu bakımından olumlu tepkiler verdiği bildirilmiştir (Arpa: Sunderland ve ark. 1981; patates: Wenzel ve Uhrig, 1981; mısır: Genovesi ve Collins, 1982; biber: Morrison ve ark, 1986).

Soğuk şoku uygulamasında sıcaklığın derecesinin ve süresinin önemli olduğunu vurgulanmakta; çok soğuk olmayan +7 ile +15° C gibi sıcaklıklarda ise 7-14 gün süreyle yapılan şoklamanın, daha düşük derecelerde kısa sürede yapılan uygulamalardan daha etkili olduğu aktarılmaktadır (Sunderland ve Roberts, 1979).

Sayılır ve Özzambak (2002), tomurcukları anter kültürü işlemlerine almadan önce +4 °C'de 25 saat bekletme işleminin olumlu sonuçlara yol açtığını ifade etmektedir.

Soğukta bekletme sırasında yaşama gücü olmayan anterler ve mikrosporlar kahverengileşip ölmesi, bir nevi eleme işlemi görevi görüp güçlü anterlerin seçilerek

kültüre alınmasını sağlamaktadır. Kültüre alınan güçlü anterler yüksek oranda rejenere olabilmektedir.

Mikrospor tanelerinde nişasta birikimi anter kültürü için çok önemlidir. Nişasta biriken mikrosporlarda haploid embriyo gelişimi olmamaktadır. Düşük sıcaklıklar aynı zamanda mikrosporlarda nişasta birikimini de engellemektedir.

Soğuk uygulamaları aynı zamanda anterlerde bulunan ve engelleyici bir hormon olan Absisik asit miktarını azaltarak olumsuz etkisini ortadan kaldırır (Johansson ve Eriksson, 1977; Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz, 1997; Özkum ve ark., 2000). Soğuk şokların yanı sıra; tomurcuklara etilen uygulaması, santrifüj etme gibi ön uygulamalarda embriyo gelişimine olumlu etki yapmaktadır (Nitsch, 1974).

2.2.1.3 Besin ortamının bileşimi ve yapısı

Tüm bitki türlerinde olumlu sonuçlar verebilecek tek bir besi ortamı belirlemek oldukça zordur. Aynı ortamlarda aynı türlere ait farklı genotiplerin başarı oranlarının farklılık gösterdiği bir durumda tek bir ortam önerisinde bulunmak olası görünmemektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Anter kültüründe genel olarak ilk aşamada gametofitik dokuları sporofitik gelişmeye teşvik etmek için uyaracak oksinler gerekli iken; bitkiye dönüşme aşamasında sitokininlere ihtiyaç duyulur. Belirli dönemlerde anterlerin ihtiyaç duydukları maddelerin ortamlara eklenmesi en uygun besin ortamının yakalanmasında faydalı olmaktadır.

Temel besin ortamları olarak anter kültüründe en fazla Murashige ve Skoog (MS), N (Nitsch, 1974), LS (Linsmaer ve Skoog, 1965), NN (Nitsch ve Nitsch, 1969) ve CP (Dumas de Valux ve ark., 1981), sıvı N ve N medyası (NLN), ortamları kullanılmaktadır.

Besin ortamlarına özellikle kültürün ilk dönemlerinde ilave edilen yüksek şeker dozları (%6-12) patates (Sopory ve ark., 1978), biber (Dumas de Valux ve ark., 1981) ve patlıcan (Dumas de Valux ve Chambonnet, 1982) türlerinde haploid embriyolar elde edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Besin ortamlarına katılan serin, glutamin gibi

aminoasitler, AgNO_3 gibi etilen biyosentezini inhibe edici maddeler (Paksoy ve ark., 1995) veya aktif kömür gibi maddeler elde edilecek başarıyı arttıran çeşitli kimyasal maddelerdir.

Anter kültüründe en fazla kullanılan ortamlar, agar eklenmiş yarı-katı ortamlardır. Genel olarak % 0.7 - % 0.8 agar kullanımı uygundur. Bunun dışında sıvı besin ortamları veya çift fazlı ortamlar da olumlu sonuçlar vermektedir. Biberde hibrit çeşitlerin geliştirilmesi için saf hatlar elde etmek üzere Dolcet-Sanjuan ve ark., (2000)'nın yaptığı bir çalışmada; çift fazlı ortamı, biber anter kültürü için en etkili ve en başarılı yöntem olarak saptamışlardır.

Sayılır ve Özzambak (2002), Murashige ve Skoog ve Nitsch'in 6 farklı besin ortamlarına NAA, BA, aktif kömür ve havuç ekstratı ekleyerek bunların etkilerini araştırmıştır. Aktif kömür ve havuç ekstratının herhangi bir olumlu etkisine rastlayamamıştır. En iyi sonucun NAA ve BA içeren MS besi medyalarından elde edildiğini aktarmaktadırlar.

Abak (1983), tarafından yapılan Türkiye orijinli biberlerin kullanıldığı bir çalışmada En başarılı sonuçlar, 5 mg/l kinetin, 5 mg/l 2.4-D, 120 g/l sakkaroz, 37.3 mg/l Na_2EDTA +27.8 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ katılan besin ortamlarından elde edilmiştir.

Lentini ve ark (1995), pirinç anter kültürü çalışmalarında; besin ortamına gümüş nitrat eklendiğinde ve sakkaroz yerine maltoz kullanıldığında anter başına kallus oluşumunun %14 civarında bir artış sergilediğini bildirmektedir.

Çömlekçioğlu ve ark (1999), tarafından biber popülasyonlarında denenen besi ortamları içerisinde en yüksek embriyo verimi 4 mg/l NAA ve 0.1 mg/l BAP içeren besin ortamından alınmıştır.

Sayılır ve Özzambak (2000), brokkolide yapmış oldukları araştırmada 0.1 mg/l NAA+0.5 mg/l 2.4-D kombinasyonu içeren modifiye besin ortamında diğer kombinasyonlara göre daha fazla embriyo elde edildiği bildirmektedir.

Ellialtıoğlu ve ark (2001), biberde yaptıkları bir araştırmada en yüksek embriyo oluşumunu % 1 aktif kömür ve havuç ekstraktı içeren MS ortamında kültüre alınan anterlerden elde etmiştir.

Ercan ve ark. (2001), 5 adet biber çeşidi ve 11 farklı besin ortamı (kinetin, BA, NAA, 2,4-D, aktif kömürün farklı dozlarını içeren) ile çalışmışlar ve en iyi sonuçları %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 almışlardır.

Alremi ve ark. (2013), biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültüründe besin ortamının etkisini incelediği bir çalışmada, 4 mg L-1 NAA + 0.1mg L-1 BAP katkılı MS ortamı, androgenik embriyo oluşumu üzerinde olumlu etki yapmıştır.

Abak (1983) ve Karakullukçu (1991)'in bildirdiğine göre; temel besin ortamı olarak MS ortamı N ortamına göre daha üstün sonuçlar vermiştir. Ancak aktif kömür ve havuç ekstraktı ile kombine edilen ortamda embriyoların oluşması da göz ardı edilememiştir.

Lone vd. (1987), tuz ilave edilmiş besin ortamlarında Arpa embriyolarını kültüre almışlar ve embriyo çimlenmelerinde artış ve sürgünlerinde uzaması sağlamışlardır.

2.2.1.4. İnkübasyon Koşulları

Anterlere uygulanan inkübasyon koşulları genellikle 20-30° C arasında olmaktadır. İlerleyen süreçte düşük ışık yoğunluğu ve değişik ışıklandırma sürelerinde bekletme işlemleri uygulanan anterlerden embriyolar oluşuktan sonra, rejenere olan bitkicikler ışık yoğunluğunun daha yüksek olduğu ortamlara alınır.

Bazı bitki türlerine ait anterlere, kültüre alındıktan sonra uygulanan yüksek sıcaklıktaki inkübasyon koşulları, embriyo oluşumlarını artırmaktadır (Dumas de Vaulx ve ark.,1981).

Ellialtıoğlu ve ark (2001), biberde yaptıkları bir çalışmada anterlerin kültürün ilk sekiz gününde 35°C ve sürekli karanlık koşullarda geliştirilmesinin embriyo oluşumunu teşvik ettiğini bulmuşlardır. Bunun yanı sıra, anterler 29°C ve sürekli aydınlık koşullarda da başarılı sonuçlar vermiştir.

Hassawi ve Liang (1990), buğday ve triticales de yaptıkları çalışmada; çeşit, inkübasyon sıcaklığı ve çiçek tozu gelişim döneminin anter kültürü üzerine etkilerini araştırmışlardır. İnkübasyon sıcaklığının kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu üzerine fazla etkisi olmadığını fakat çiçek tozu gelişim dönemi ile çeşit interaksyonunun kallus oluşumunu önemli derecede arttırdığını bulmuşlardır.

Terzioğlu ve ark. (2000), farklı inkübasyon koşullarının anter kültürü üzerine başarısını gözlemlediği çalışmada, 2000 lux 29°C ve 35 °C de iki farklı inkübasyon koşulunu incelemiştir. Çalışmanın sonucunda 29 °C inkübasyon koşulları daha etkin bulunmuştur.

Chuong ve ark. (1985), *Brassica napus*'un 6 ve *Brassica carinata*'nın 1 çeşidiyle yürüttükleri çalışmada araştırmacılar, 32°C'de 3 gün inkübasyon ardından 25°C'de devam eden inkübasyon koşullarının, hem yüksek embriyo verimi hem de yüksek normal embriyo yüzdesi sağladığını aktarmaktadır.

Tütün gibi anter kültürüne olumlu yanıt veren bitkilerde 24-28 °C sıcaklıkta ve belirli bir düzenle aydınlatılan koşullarda gerçekleştirilen inkübasyon yeterli olurken; patlıcan, biber, lahan a gibi sebzelerde inkübe işleminin ilk günlerinde yüksek sıcaklık şoklarına gereksinim duyulabilmektedir (Ellialtıoğlu, 2000).

Bitki tomurcuklarından alınan anterlerin direk besin ortamına dorsal kısmından temas etmesi inkübasyonun sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi için gereklidir. *Datura innoxia* bitkisinde yapılan bir çalışmada, ortam üzerine farklı pozisyonlarda yerleştirilen anterlerden dorsal biçimde ortam yüzeyine yerleştirilenlerden en yüksek oranda embrioid elde edildiği ve anterlerin dik veya yatay pozisyonda agar ortamına batırılmasının oksijen yetersizliğine neden olup gelişmeyi engellediği bildirilmiştir (Sopory ve ark., 1978).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Laboratuvar ve Araştırma Alanı'nda yürütülmüştür.

Donör bitkilerin ve elde edilecek bitkilerin yetiştirilmesi için 400 m² büyüklüğünde topraksız yetiştiriciliğe uygun tül sera (screenhouse) kullanılmıştır. Örtü materyali olarak 50 mesh özelliğinde böcek tülü kullanılmıştır. Tül seranın görünümü Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Tül seradan görünüm

Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü laboratuvarında dezenfeksiyon, stres ve inkübasyon uygulamaları, ortam hazırlama ve anter atımı gibi çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Laboratuara ait görünüm Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Doku Kültürü Laboratuvarı ve ekipmanların genel görünümü

Anterlerin, inkübasyon evresi ile dış koşullara alıştırılma evresi arasındaki dönemi geçirmeleri için sıcaklık, ışık ve nem kontrollü iklimlendirme odası kullanılmıştır. İklimlendirme odasında krom nikel malzemeden imal edilmiş rafların aydınlatılması LED lambalarla yapılmaktadır. İklimlendirme odasından görünüm Şekil 3.3. verilmiştir.



Şekil 3.3. İklimlendirme odasının iç görünümü

Steril ortam çalışmalarının yürütülmesi için Telstar Bio II A marka vertikal flow kabin kullanılmıştır. (Şekil 3.4.)

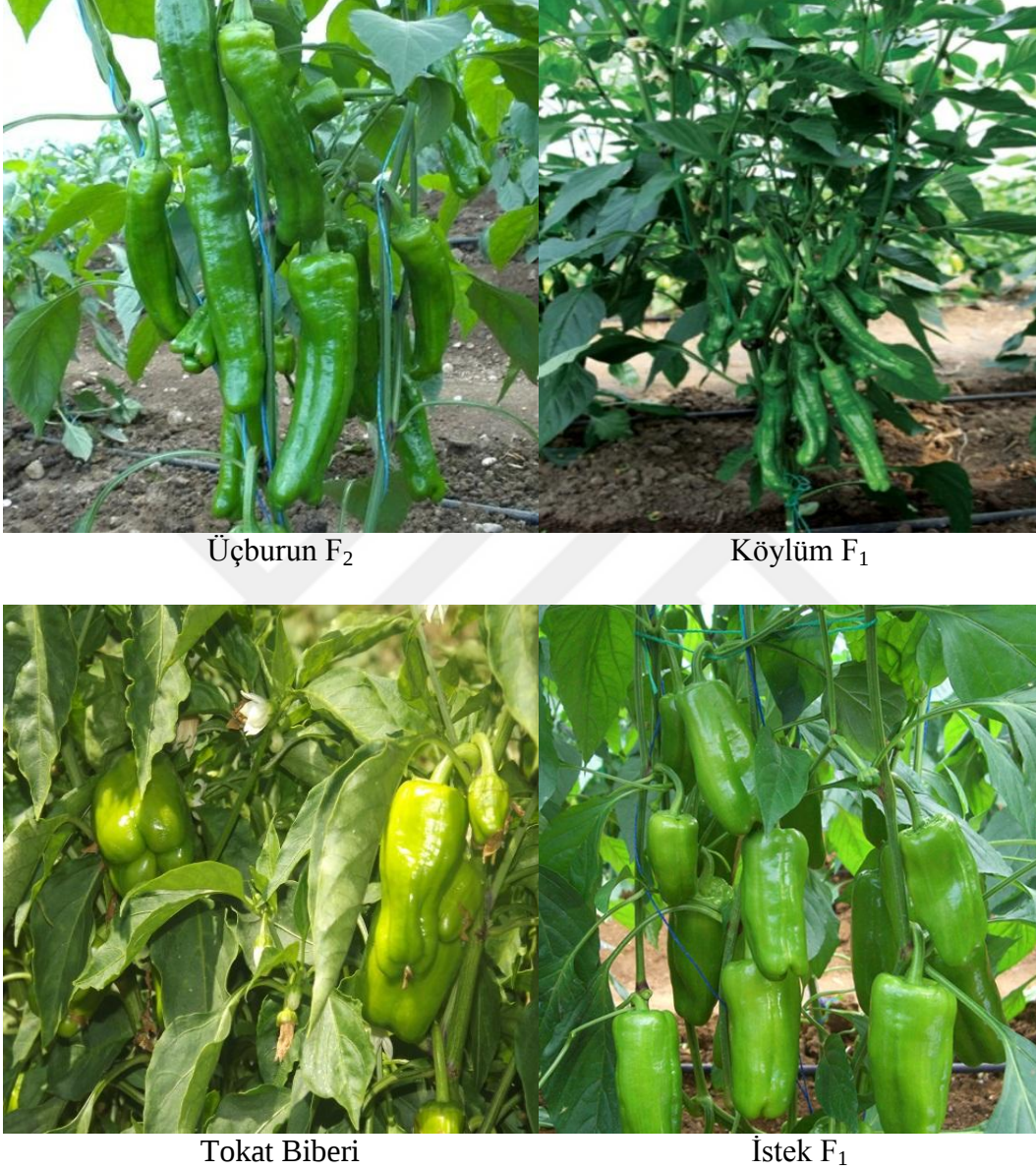


Şekil 3.4. Steril ortam çalışmalarının yürütüldüğü flow kabinden görünüm

3.1.1.Bitkisel materyal:

Çalışmada üç burun biber özelliğine sahip 2 adet hibrit (İstek F₁, Köylüm F₁), 1 adet F₂ düzeyinde genotip (Üçburun F₂) ve 1 adet üçburun özelliğine yakın populasyon yapısındaki yerel genotip (Tokat biberi) olmak üzere 4 genotip kullanılmıştır. Bu genotipler daha önce morfolojik özellikleri bakımından incelenmiş, üç burunlu, meyvenin boyu eninden uzun, sap kısmı uç kısma göre daha kalın, ince etli, ince dış zara sahip ve yeşil ile sarımtırak yeşil arasında renklere sahip bitkilerdir. Donör bitkiler

tül serada yetiştirilip, anter kültürü çalışmaları Bahçe Bitkileri Bölümü doku kültürü laboratuvarında devam etmiştir. (Şekil 3.5).

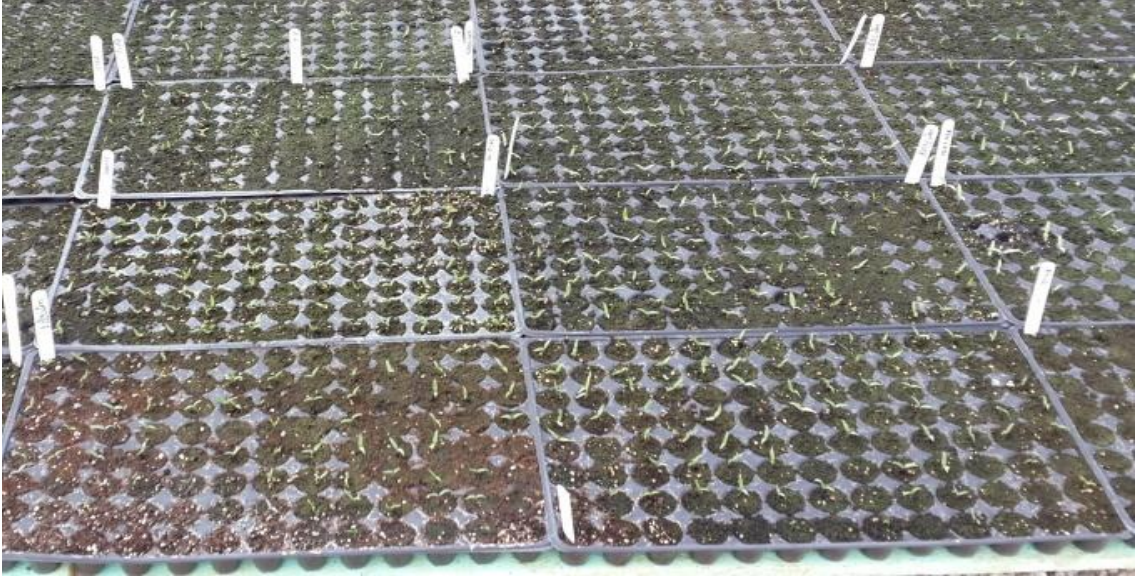


Şekil 3.5. Denemede kullanılan genotiplerin bitki ve meyve görünüşleri.

3.2. Yöntem

3.2.1. Donör bitkilerin yetiştirilmesi

Araştırmada kullanılan biber genotiplerine ait tohumlar 5-10 Nisan 2014 tarihlerinde viollerdeki torf ortamına ekilmiştir (Şekil 3.6.). 10 Mayıs 2014 tarihinde tohumlardan gelişen fideler tül sera (screenhouse) içerisinde topraksız tarım sisteminde coco-peat bloklara dikilmiştir. Denemede 4 genotip için 8'er bitki yetiştirilip, toplamda 32 donör bitki kullanılmıştır. (Şekil 3.7.) Tomurcuk alma işleminden önce açmış bütün çiçekler uzaklaştırılmıştır. Bitkilerdeki vejetatif-generatif dengeyi sağlamak için sürekli olarak meyve ve çiçekler koparılıp, bitkiler yeni tomurcuk oluşturmaya teşvik edilmiştir. (Şekil 3.8.) Donör bitkilere stres koşulu yaratmamak için hastalık ve zararlılarla karşı kimyasal mücadele yerine kültürel tedbirler alınmıştır. Bitkiler damlama sistemiyle sulanmış ve bitki besleme fertigasyon yöntemiyle yapılmıştır. Besin solüsyonu Hoagland (1938)'a göre hazırlanmıştır.



Şekil 3.6. Donör bitkilerinin tohumlarının ekildiği viollerden görüntüler



Şekil 3.7. Donör bitkilerden görüntüler



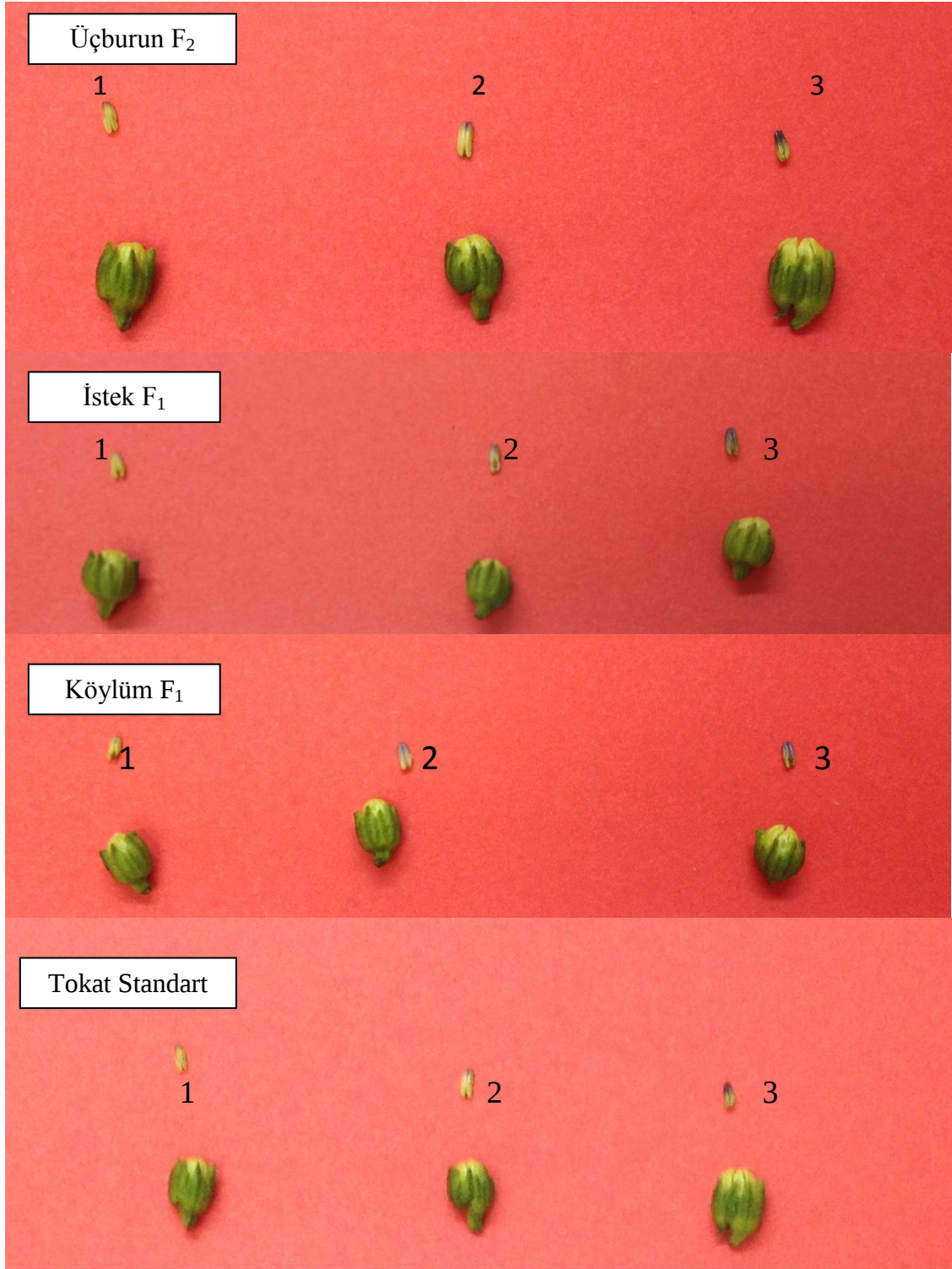
Şekil 3.8. Açmış çiçeklerin ve meyvelerin bitkiden uzaklaştırılması

3.2.2. Çiçek tomurcuklarının gruplandırılması ve toplanması

En uygun tomurcuk evresi genotiplere göre farklılık göstermektedir. Genel olarak tomurcuklar 3-4 mm. boyuna ulaşp, petal ve sepal yapıları aynı büyüklüğe ulaştığında çiçek tomurcukları için en uygun evre kabul edilmektedir. Bu evreye gelmiş tomurcuklar bitkilerden toplanır. Androgenesis için uygun mikrosporların bulunduğu anterler; fizyolojik olarak krem-açık sarı renklerde, uç kısmında antosiyanin oluşumunun başladığı, morlaşmanın %20-30 olduğu evredeki anterlerdir. Genotipler arasında farklılıkların olma ihtimaline karşı anterlerin gelişme aşamalarını belirleyebilmek amacıyla, tomurcuklar önce kendi aralarında morfolojik özelliklerine göre gruplandırılmış ve bu gruplardan alınan anterlerde mikrospor gelişim aşamalarının kontrol edilmesi için %2'lik asetokarmin ile boyama yapılmıştır. Boyanan preparatlar NİKON marka ışık mikroskobu altında incelenerek uygun evre tespit edilmiştir (Elçi,1982; Karakullukçu,1991). (Şekil3.9). Anterler sabahın erken saatlerinde alınmıştır. Anter ekiminde kullanılan en uygun tomurcuk büyüklüğü genotiplere göre değişmekle birlikte genellikle 2 nolu aşama uygun evre olarak belirlenmiştir. (Şekil3.10).



Şekil 3.9. Asetokarmin ile boyama yapılmış preparatların incelenmesi



Şekil 3.10. Genotiplere ait tomurcuk ve anterlerin görünüşleri

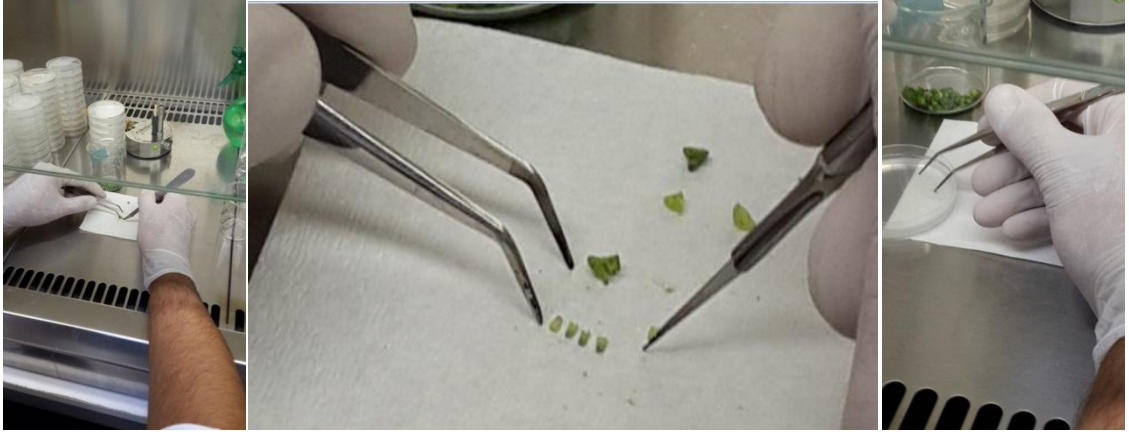
3.2.3.Çiçek tomurcuklarının dezenfeksiyonu, anterlerin çıkarılması ve dikimi

Kültür için en uygun mikrospor gelişme dönemine sahip olan anterleri içeren çiçek tomurcukları; birkaç damla Tween-20 eklenmiş %20'lik ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 15 dakika süreyle dezenfekte edilmiştir. Ardından saf su ile 3 kez durulanmıştır (Şekil 3.11).



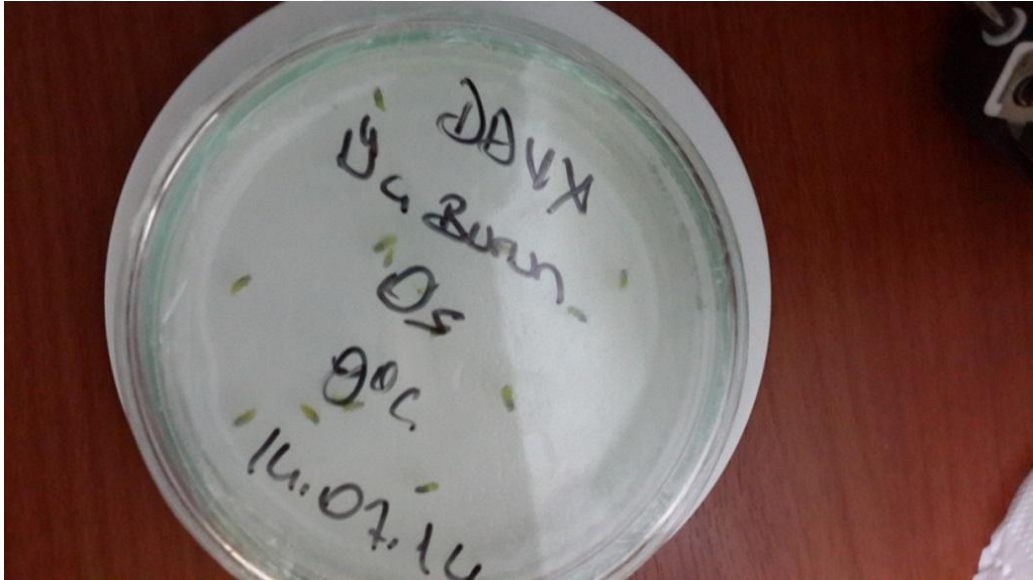
Şekil 3.11. Anterlere uygulanan sterilizasyon işlemleri

Anterler bistürü ve pens yardımıyla tomurcuklar içerisinde çıkarılmıştır. Anterler tomurcuktan çıkarılır çıkarılmaz bekletilmeden ince uçlu bir pens yardımıyla besin ortamı üzerine, ortama batırmadan dorsal yüzeyi ortamla temas edecek biçimde yerleştirilmiştir (Karakullukçu, 1991). Her petri kutusuna 3 ya da 4 adet tomurcuktan çıkan anterlerin tamamı dikilmiştir. (Şekil 3.12.)



Şekil 3.12. Anterlerin tomurcuklardan alınması ve besin ortamına ekilmesi

Dikim işleminin ardından petri kutularının kenarları ince plastik film şeridiyle kapatılarak dış atmosferle ilişkileri kesilmiştir (Şekil 3.13). Çalışma esnasında izolasyon ve dikim aletleri; sık sık önce %96'lık etil alkole batırılarak ve hemen ardından Bunsenbeki alevi yardımıyla sterilize edilmiştir. Ayrıca dikim işleminde, steril kabin içerisine sık sık ve belirli aralıklarla %70'lik etil alkol spreyleneştir.



Şekil 3.13. Anter ekimi tamamlanmış petrinin görüntüsü

3.2.4.Besin ortamlarının bileşimi ve hazırlanması

Çalışmada 2 farklı temel besin ortmı kullanılmıştır. Bunlar;

1. Dumas de Vaulx ve ark. (1981) tarafından önerilen ve DDV olarak bilinen ortam

2. Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen ve MS olarak bilinen ortamlardır.

Ortamların katılaştırılması için % 0.8 Agar-agar (SİGMA) kullanılmıştır. Ayrıca her ortama % 3 sucrose eklenmiştir. Ortamların kimyasal bileşimleri DDV ortamı için Çizelge 3.1.'de, MS ortamı için Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir. Denemelerde kullanılan tüm anterler C (kallus) ortamına dikilmiş; gelişme gösteren anterler 0.1 mg/l kinetin içeren R (rejenerasyon) ortamına transfer edilmişlerdir. Denemelerin tümünde otoklavlanmadan önce besin ortamlarının pH seviyeleri 5.8'e ayarlanmış, ardından ortamlar 15 dakika süreyle 121 °C'de 1 atm basınç altında otoklavda sterilize edilmiştir. Alüminyum folyo ile ağızları kapatılmış ve erlenmayerler içersinde otoklavlanmış besin ortamları, sterilizasyon işleminden ardından aseptik kabin koşullarında, her bir petriye yaklaşık 10 ml besin ortamı düşecek şekilde doldurulmuştur.

Araştırmada 4 farklı uygulama yapılmıştır.

1. Tomurcuklar dezenfekte edilmeden önce 24 saat 4°C'de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına alınır alınmaz anterler 9 °C'de karanlık ortamda 8 gün inkübasyona tabi tutulmuştur.
2. Tomurcuklar dezenfekte edilmeden önce 24 saat 4 °C'de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına alınır alınmaz anterler 35 °C'de karanlık ortamda 8 gün inkübasyona tabi tutulmuştur.
- 3.Çiçek tomurcukları dezenfekte edildikten sonra anterler bekletilmeden C ortamına aktarılmış, ardından anterler 9 °C'de karanlık ortamda 8 gün inkübasyona tabi tutulmuştur.
- 4.Çiçek tomurcukları dezenfekte edildikten sonra anterler bekletilmeden C ortamına aktarılmış, ardından anterler 35 °C'de karanlık ortamda 8 gün inkübasyona tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.1. Anter kültüründe DDV ortamı için kullanılan kimyasallar ve dozları

Kimyasal Maddeler	C	R1	R2	V
<u>Makro elementler (mg/l)</u>	<u>DDV</u>	<u>DDV</u>	<u>DDV</u>	<u>MS</u>
KNO ₃	2150	2150	2150	1900
NH ₄ NO ₃	1238	1238	1238	1650
MgSO ₄ , 7H ₂ O	412	412	412	370
CaCl ₂ , 2H ₂ O	313	313	313	440
KH ₂ PO ₄	142	142	142	170
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	50	50	50	
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	38	38	38	
(NH ₄) ₂ SO ₄	34	34	34	
KCl	7	7	7	
<u>Mikro elementler (mg/l)</u>	<u>DDV</u>	<u>DDV</u>	<u>DDV</u>	<u>DDV</u>
MnSO ₄ , H ₂ O	22.130	22.130	22.130	22.130
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	3.620	3.620	3.620	3.620
H ₃ BO ₃	3.150	3.150	3.150	3.150
KI	0.695	0.695	0.695	0.695
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.188	0.188	0.188	0.188
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.016	0.016	0.016	0.016
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.016	0.016	0.016	0.016
Fe-EDTA	<u>MS/2</u>	<u>MS/2</u>	<u>MS/2</u>	<u>MS</u>
Na ₂ EDTA (mg/l)	18.65	18.65	18.65	37.3
FeSO ₄ , 7H ₂ O (mg/l)	13.90	13.90	13.90	27.8
<u>Vitaminler (mg/l)</u>	<u>DDV</u>	<u>DDV</u>	<u>DDV</u>	<u>DDV</u>
Pyridoxin HCL	5.500	5.500	5.500	1.00
nicotinamic Acid	0.700	0.700	0.700	1.00
Thiamine HCL	0.600	0.600	0.600	1.00
Calcium panthotenate	0.500	0.500	0.500	1.00
Glycin	0.100	0.100	0.100	0.10
Biotine	0.005	0.005	0.005	0.01
MioInositol	50.300	50.300	50.300	100.00
Vit B12	0.03			
<u>Karbonhidratlar</u>				
Sucrose (mg/l)	30000	30000	30000	30000
Fructose (mg/l)				
Glucose (mg/l)				
<u>Büyümeyi düzenleyiciler</u>				
Kinetin (mg/l)	0.01	0.1	0.1	
2,4-D (mg/l)	0.01			
AgNO ₃ (mg/l)				
<u>Agar</u>				
Bacto-agar (mg/l)				
Agar-agar (mg/l)	8000	8000	8000	8000
pH	5.8	5.8	5.8	5.8

Çizelge 3.2. Anter kültüründe MS ortamı için kullanılan kimyasallar ve dozları

Kimyasal Maddeler	C	R1	R2	V
<u>Makro elementler (mg/l)</u>				
KNO ₃	1900	2150	2150	1900
NH ₄ NO ₃	1650	1238	1238	1650
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370	412	412	370
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440	313	313	440
KH ₂ PO ₄	170	142	142	170
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O		50	50	
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O		38	38	
(NH ₄) ₂ SO ₄		34	34	
KCl		7	7	
<u>Mikro elementler (mg/l)</u>				
MnSO ₄ , H ₂ O	16.9	22.130	22.130	22.130
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8.6	3.620	3.620	3.620
H ₃ BO ₃	6.20	3.150	3.150	3.150
KI	0.83	0.695	0.695	0.695
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.25	0.188	0.188	0.188
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025	0.016	0.016	0.016
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025	0.016	0.016	0.016
Fe-EDTA	MS	MS/2	MS/2	MS
Na ₂ EDTA (mg/l)	37.3	18.65	18.65	37.3
FeSO ₄ , 7H ₂ O (mg/l)	27.8	13.90	13.90	27.8
<u>Vitaminler (mg/l)</u>				
Pyridoxin HCL	0.5	5.500	5.500	1.00
nicotinamic Acid	0.5	0.700	0.700	1.00
Thiamine HCL	0.4	0.600	0.600	1.00
Calcium panthotenate		0.500	0.500	1.00
Glycin	2.0	0.100	0.100	0.10
Biotine		0.005	0.005	0.01
MioInositol	100.0	50.300	50.300	100.00
Vit B12	0.03			
<u>Karbonhidratlar</u>				
Sucrose (mg/l)	30000	30000	30000	30000
Fructose (mg/l)				
Glucose (mg/l)				
<u>Büyümeyi düzenleyiciler</u>				
Kinetin (mg/l)	0.01	0.1	0.1	
2,4-D (mg/l)	0.01			
AgNO ₃ (mg/l)				
<u>Agar</u>				
Bacto-agar (mg/l)				
Agar-agar (mg/l)	8000	8000	8000	8000
pH	5.8	5.8	5.8	5.8

Not: İnorganik bileşikler Merck, organik bileşikler (büyüme düzenleyiciler, Mio-inositol ve vitaminler) Sigma, Sucrose extrapure Merck (Ref. No. 1. 076 53) marka kullanılmıştır.

İnkübasyon uygulamasının sonunda petri kapları iklimlendirme odasına alınmıştır. İklim odasının koşulları 25 ± 2 °C sıcaklık, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık 3000 lux ışık koşullarına ayarlanmıştır. Bu koşullar altında 4 gün bekleyen anterler, içinde R1 ortamları bulunan petri kaplarına aktarılmıştır. (Şekil 3.14.). Her 4 haftada bir anterler yeni bir R1 ortamına aktarılmıştır. R1 ortamında, yaklaşık 5-6 hafta sonra anterlerin yüzeyinde embriyoidler görülmeye başlanmıştır.



Şekil 3.14. R1 ortamlarındaki anterlerinden görünüm.

3.2.5.Çimlendirme çalışmaları

Embrioidler anterler üzerinde görüldüğü anda bistüri yardımıyla steril koşullarda 10 ml çimlendirme ortamı bulunan rejenere ortamlarına aktarılmıştır. Kontaminasyonu önlemek için streç film ile kapatılan petri kapları 12 saatlik fotoperiyoda sahip 3000 lux ışık intensitesinde ve 25°C gece/gündüz sıcaklık koşullarındaki iklimlendirme odasına gelişmeye bırakılmıştır. 8-10 gün çimlenme ortamında kalan bitkicikler yaprak oluşumları başladığında V ortamına alınmıştır. 100 mm uzunluğunda 25 mm çapındaki cam tüplere 15 ml V ortamı dökülerek ortama dikilen bitkicikler sekonder kökleri gelişip 3-4 yapraklı evreye ulaşınca kadar 25°C gece/gündüz sıcaklık, 12 saat fotoperiyod ve 3000 lux ışık yoğunluğu koşullarında bekletilmişlerdir.

3.2.6.Haploid bitkilerin dış koşullara alıştıırılması

Anterlerden gelişen embrioidler steril şartlarda cam tüplere aktarılmıştır. Bu embrioidlerden gelişen bitkicikler 3-4 gerçek yapraklı döneme geldiğinde dış koşullara alıştıırılmak üzere ½ perlit + ½ torf karışımı bulunan ortamlara dikilmiştir. Dikilen bitkiler 600 litre hacimli büyüme dolabında (growth chamber) sıcaklığı 22±2 °C, ışık intensitesi 5000 lux, hava oransal nemi % 85±5 ve 12 saat ışık 12 saat karanlık koşullarında 7-10 gün muhafaza edilmiş, ardından iklimlendirme odasına aktarılmıştır. İklimlendirme odasının koşulları 25 ±5 °C sıcaklık, 5000 lux ışık, % 65±5 hava oransal nemi ve 16/8 gündüz gece olarak ayarlanmıştır. İklimlendirme odasında geçen 20 gün gelişme sürecinin ardından bitkiler ploidi testi ve kromozom katlaması işlemine alınmıştır.

3.2.7.Ploidi testi ve kromozom katlaması

Ploidi seviyesinin belirlenmesinde 3 farklı yöntemler kullanılmıştır.

1- Fenotipik gözlemler: Bitkilerde kromozom sayısının artması tüm bitki organlarında irileşmeyi meydana gelmektedir. Bu yüzden haploid bitkiler diploid bitkilere göre yaprakları ve çiçekleri daha küçük ve boyları kısa olmaktadır. Ayrıca döllenme kabiliyeti noksanlığından tohum oluşturmamaktadır.

2- Flow sitometri yöntemi: Ploidi seviyesinin belirlenmesinde kullanılan Flow Sitometri analizi, Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü Sitogenetik Laboratuvarında

yapılmıştır. Analiz örneklerin hazırlanmasında 3-4 haftalık genç bitki yaprakları kullanılmıştır. Preparatlar hazırlanırken 0.5 cm² büyüklüğünde yaprak dokusu petri kabına koyulup, üzerine 500 µl izolasyon buffer ilave edilmiştir. Yaprak dokusu keskin jilet ile 0.5-1 dk süresince küçük parçalara ayrılıp; örnek, petri kabı içerisinde 10-15 saniye kadar çalkalanmıştır. Çalkalama işleminin ardından örnekler Partec marka 50 µl Cell Trics filtre ile süzülüp tüp içerisine aktarılmıştır. Ardından üzerine 2 ml DAPI boyama solüsyonu ilave edilerek ışısız ortamda analiz edilene kadar 30-60 dakika bekletilmiştir. Örneklerin analizinde Partec marka flow sitometri cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.15).

Sonuçların yorumlanmasında standart bitki DNA içeriği bibere yakın olan diploid domates kullanılmıştır.



Şekil 3.15. Flow sitometri analizi için preperatların hazırlanması

3- Stomal incelemeler: Flow sitometri yöntemi ile ploidi seviyesi belirlenen bitkilerde ayrıca birim alandaki stoma sayısı ve büyüklükleri incelenmiştir. Bu amaçla yaprakların alt yüzeyine şeffaf tırnak cilası sürülmüştür. Kuruyan tırnak cilası, soyulup şeffaf bir tabaka elde edilmiştir. Daha sonra bu şeffaf tabaka üzerine bir damla saf su damlatılıp NIKON Eclipse E 600 marka ışık mikroskopunda 40x100 büyütme olarak incelenmiştir.

Kromozom Katlama: Haploid olduğu belirlenen bitkileri, dihaploid hale getirmek için kolhisin kullanılmıştır. Kolhisin uygulaması farklı şekillerde yapılmıştır.

Birinci uygulama olarak; % 1'lik kolhisin emdirilmiş pamuk parçaları 1 gün süreyle haploid bitkilerin sürgün uçlarında bekletilmiştir. İkinci uygulamada ise *in vitro* koşullarda haploid bitkilerden alınan mikro çelikler, % 1'lik kolhisin çözeltisinde 1 saat süreyle bekletilip tekrar besin ortamına aktarılmıştır. Bu iki uygulama ile sonuca ulaşamaması sebebiyle üçüncü ve farklı bir uygulamaya ihtiyaç duyulmuştur. %1'lik kolhisin çözeltisi haploid bitkilerin sürgün uçlarına spreylenerek en olumlu sonuca ulaşılmıştır.



4. BULGULAR

Denemede kullanılan 4 genotipten toplamda 4800 adet anter atımı gerçekleşmiştir. İlk olarak C ortamına ekimi yapılan anterler daha sonra R ve V ortamlarına alınıp gelişimleri incelenmiştir. Denemeye alınan bütün çeşitlerin anterlerinde gelişme ve büyüme gözlemlenmiştir. Çalışmada kültüre alınan toplam anter sayısı, anterden oluşan embriyo sayısı ve embriyoların oluşturduğu bitki sayıları sürekli olarak gözlemlerle kayıt altına alınmıştır.

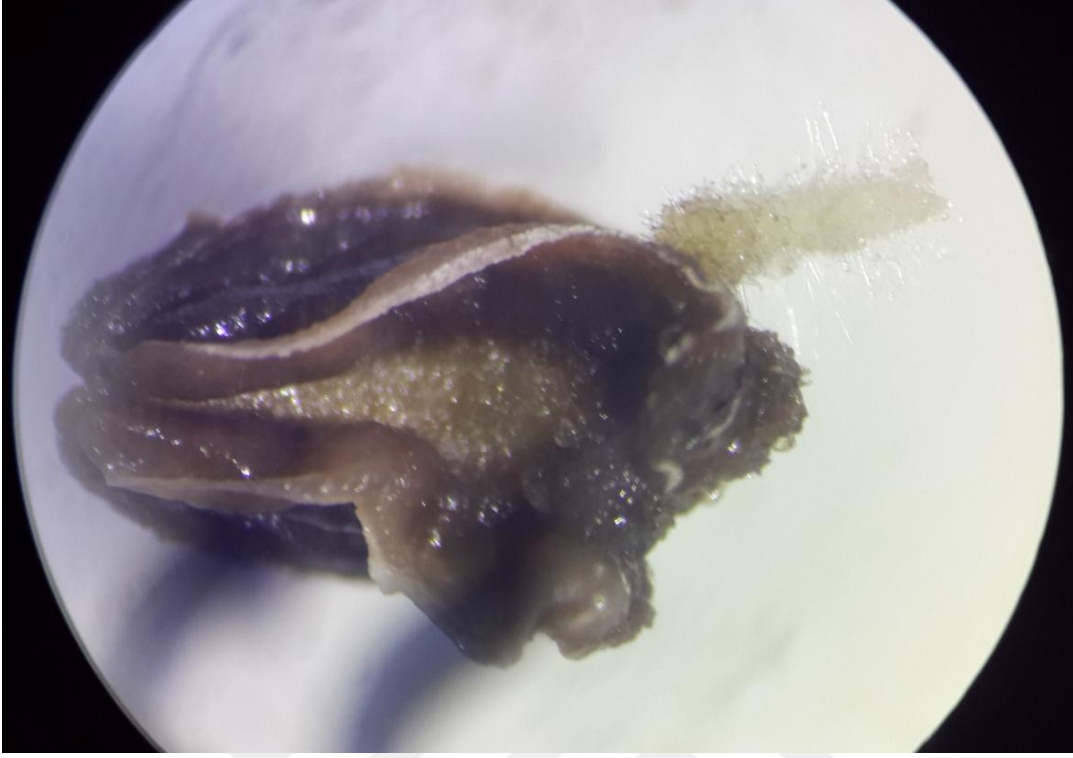
4.1. Uygulamalara Bağlı Olarak Başarı Oranları

Uygulamalara bağlı olarak embriyo oluşum oranları incelendiğinde %34 embriyo oluşum oranı ile en yüksek başarı, Tokat biberi genotipiyle stres uygulanmamış 9 °C inkübasyon koşulları altında MS ortamı ile sağlanmıştır. (Şekil 4.1.) İstek F₁ genotipinde 24 saat 4 °C' ön soğuk uygulamasına ve 9 °C inkübasyon uygulamasına maruz kalmış DDV ortamı uygulamasıyla ise %28 başarı oranı elde edilmiştir. (Şekil 4.2.) Bu uygulamayı %26 ile Tokat biberi genotipinde 24 saat 4 °C stres uygulanmış, 35 °C de inkübasyon koşuluna maruz kalmış DDV ortamında yapılan uygulama takip etmiştir. Çalışmada MS ortamına ekilen Köylüm F₁ ve Üçburun F₂ genotiplerine ait anterlerin hiç birinden androgenik yanıt alınamamıştır. Aynı şekilde Üçburun F₂ çeşidinin DDV ortamına ait 9 °C de inkübasyon uygulamalarında, İstek çeşidinin MS ortamına ait ön soğuk uygulaması yapılmamış 9 °C'de inkübe edilmiş ve ön soğuk uygulaması yapılmış 35 °C inkübasyon uygulamaları sonuç vermemiştir. Genotiplere, stres ve inkübasyon uygulamalarına ve besi ortamlarına göre embriyoid ve bitki oluşum oranları

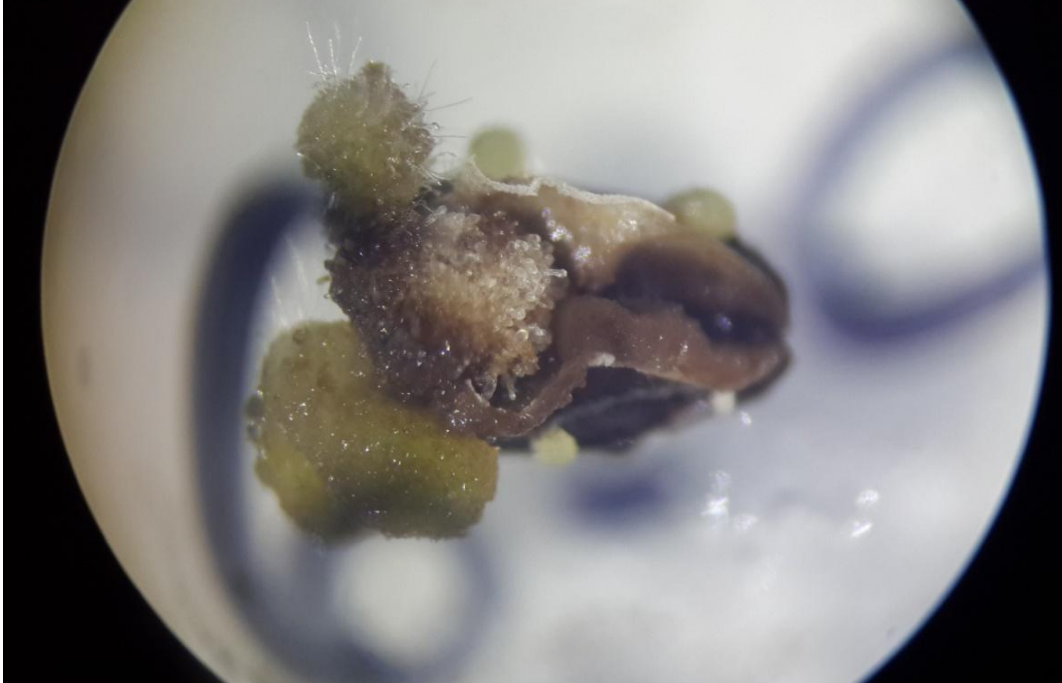
Çizelge	4.1	verilmiştir.
---------	-----	--------------

Ortam	Genotip	Stres Uygulaması (4 °C'de Bekletme)	İnkübasyon uygulamaları(oC)	Anter Sayısı	Embriyo Sayısı	Bitki Sayısı	Anterden Embriyo Oluşum Oranı(%)	Anterden Bitki Oluşum Oranı(%)	Embriyodan Bitki Oluşum Oranı(%)
DDV	İstek	0	9	150	6	5	4	3.33	83.33
	İstek	0	35	150	12	3	8	2	25
	İstek	24	9	150	42	8	28	5.33	19.04
	İstek	24	35	150	12	7	8	4.66	58.33
	Tokat biberi	0	9	150	39	4	26	2.66	10.25
	Tokat biberi	0	35	150	10	1	6.66	0.66	10
	Tokat biberi	24	9	150	18	7	12	4.66	38
	Tokat biberi	24	35	150	39	3	26	2	7.7
	Köylüm	0	9	150	3	0	2	0	0
	Köylüm	0	35	150	3	0	2	0	0
	Köylüm	24	9	150	3	1	2	0.66	33.33
	Köylüm	24	35	150	6	4	4	2.66	66.6
	Üçburun	0	9	150	0	0	0	0	0
	Üçburun	0	35	150	10	3	6.66	2	30
	Üçburun	24	9	150	0	0	0	0	0
	Üçburun	24	35	150	7	1	4.66	0.66	14.28
MS	İstek	0	9	150	0	0	0	0	0
	İstek	0	35	150	10	2	6.66	1.33	20
	İstek	24	9	150	4	1	2.66	0.66	25
	İstek	24	35	150	0	0	0	0	0
	Tokat biberi	0	9	150	51	4	34	2.66	7.84
	Tokat biberi	0	35	150	10	0	6.66	0	0
	Tokat biberi	24	9	150	6	2	4	1.33	33.3
	Tokat biberi	24	35	150	14	1	9.3	0.66	7.14
	Köylüm	0	9	150	0	0	0	0	0
	Köylüm	0	35	150	0	0	0	0	0
	Köylüm	24	9	150	0	0	0	0	0
	Köylüm	24	35	150	0	0	0	0	0
	Üçburun	0	9	150	0	0	0	0	0
	Üçburun	0	35	150	0	0	0	0	0
	Üçburun	24	9	150	0	0	0	0	0
	Üçburun	24	35	150	0	0	0	0	0

Çizelge 4.1. Genotip, besi ortamı, stres ve inkubasyon koşullarına bağlı olarak embriyoid ve bitki oluşma oranları



Şekil 4.1. Tokat biberinde embriyo oluşumu

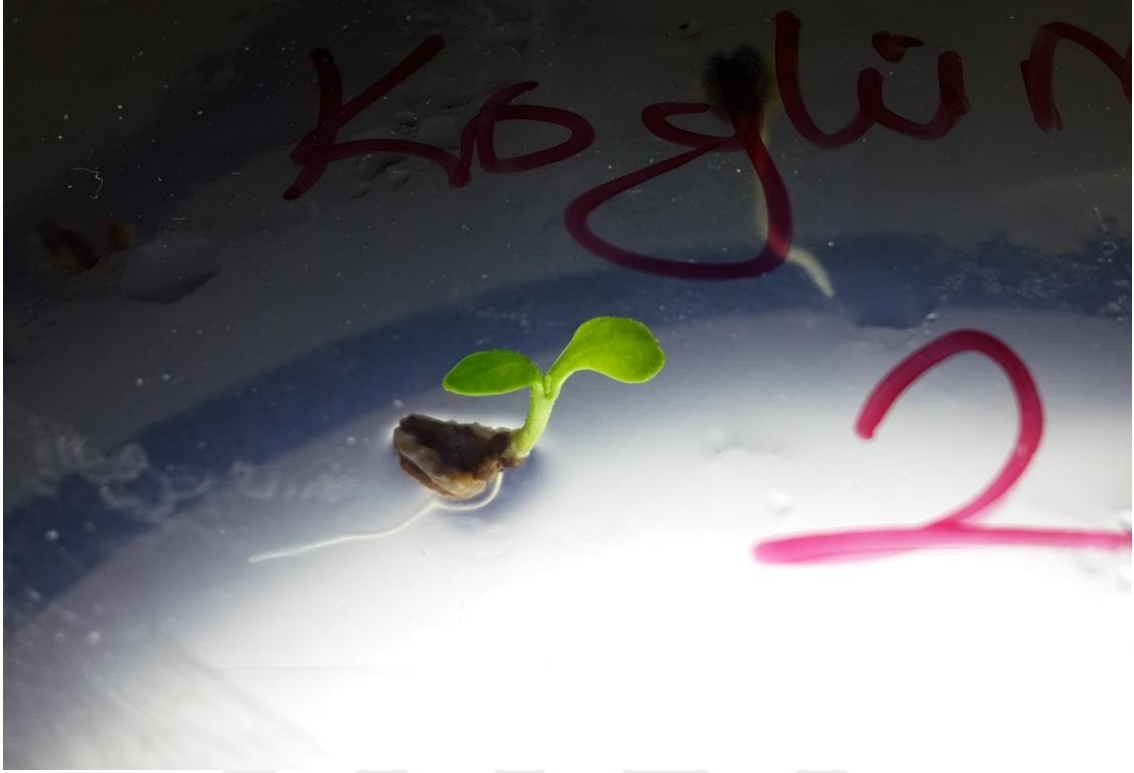


Şekil 4.2. İstek F₁ genotipinde embriyoid oluşumu

Anterlerden bitki oluşum oranları incelendiğinde en yüksek oran % 5.33 ile İstek F₁ çeşidinde 24 saat 4 °C ön soğuk uygulamasına maruz kalmış, 9 °C inkübasyon koşullarında DDV ortamı ile elde edilmiştir. (Şekil 4.3.) Tokat biberinde DDV ortamında 24 saat 4 °C ön soğuk uygulamasına maruz kalmış, 9 °C’de inkübe edilmiş uygulamada % 4.66 rakamlarına ulaşılmıştır. Embriyodan bitki oluşum oranlarında en yüksek başarı % 83.33 ile İstek F₁ genotipinde strese maruz kalmamış, anterlerin 9 °C inkübe edildiğı uygulamadan elde edilmiştir. Diğer yüksek başarı oranı ise %66.6 ile strese maruz kalmış, 35 °C inkübasyon koşulları uygulanmış Köylüm F₁ genotipi ile yakalanmıştır. (Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. İstek F₁ genotipinin embriyoidlerinin bitkiye dönüşüm aşaması

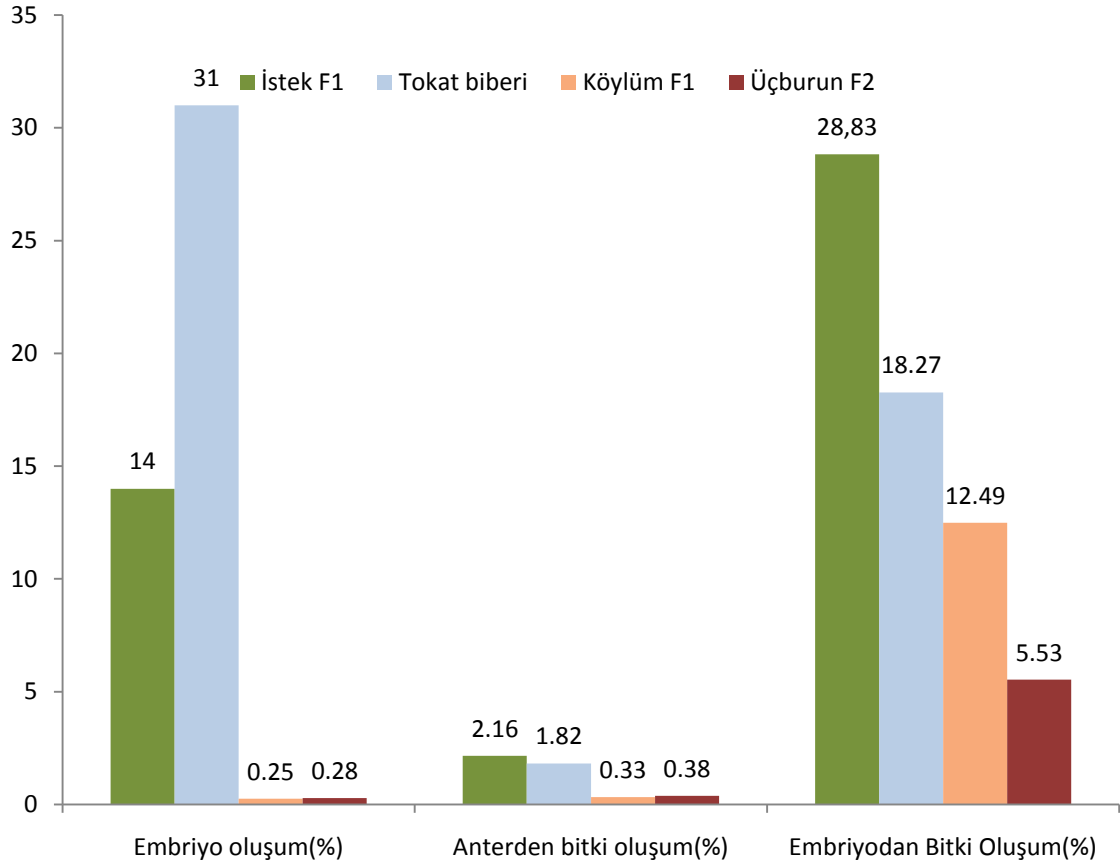


Şekil 4.4. Köylüm F₁ genotipinde embriyoidlerin bitkiye dönüşüm aşaması

4.2. Genotiplere göre başarı düzeyleri

Çalışmada uygulama ve ortam faktörüne bağlı olarak başarı oranlarında değişiklikler görülse de kullanılan bütün genotiplerden embriyo oluşumu gözlemlenmiştir. Embriyo oluşturma oranları açısından en yüksek başarı 187 embriyo eldesiyle Tokat biberi ile yakalanmıştır. İkinci olarak İstek F₁ çeşidi 86 embriyo oluşumu ile takip ederken, Üçburun F₂'den 17 embriyo, Köylüm F₁'den 15 embriyo elde edilmiştir. Anterden bitki oluşumuna en olumlu cevabı ise inkübasyon koşulu farklılığıyla %5.33 ve %4.66 değerleri ile İstek F₁ çeşidi vermiştir. Ardından uygulama faktörleri göz önünde bulundurularak sırayla Tokat biberi, Köylüm F₁, Üçburun F₂ genotipleri gelmektedir. Embriyodan bitki oluşum oranları incelendiğinde ise İstek F₁ çeşidinde oluşan 86 adet embriyo 26 adet bitkiye dönüşerek %30.23 başarıya ulaşmıştır. Tokat biberin de ise 187 adet embriyo 22 adet bitkiye dönüşerek %11 lik oranı yakalamıştır. Köylüm F₁ de bu oran 15 embriyodan 5 bitki oluşumuyla %33, Üçburun F₂ de ise 17 embriyodan 4 bitki oluşarak %23 olmuştur. Özet olarak anterden embriyo oluşumuna en olumlu cevabı sırasıyla Tokat biberi, İstek F₁, Üçburun F₂ ve Köylüm F₁ çeşidi vermiştir. Bu sıralama

anterden bitki oluşumuna verilen tepki olarak değerlendirildiğinde İstek F₁, Tokat biberi, Köylüm F₁, Üçburun F₂ olarak değişmektedir. Embriyodan bitkiye dönüşüm başarısı ise Köylüm F₁,İstek F₁,Üçburun F₂, Tokat biberi sıralaması şeklinde olmuştur. (Şekil 4.5.)

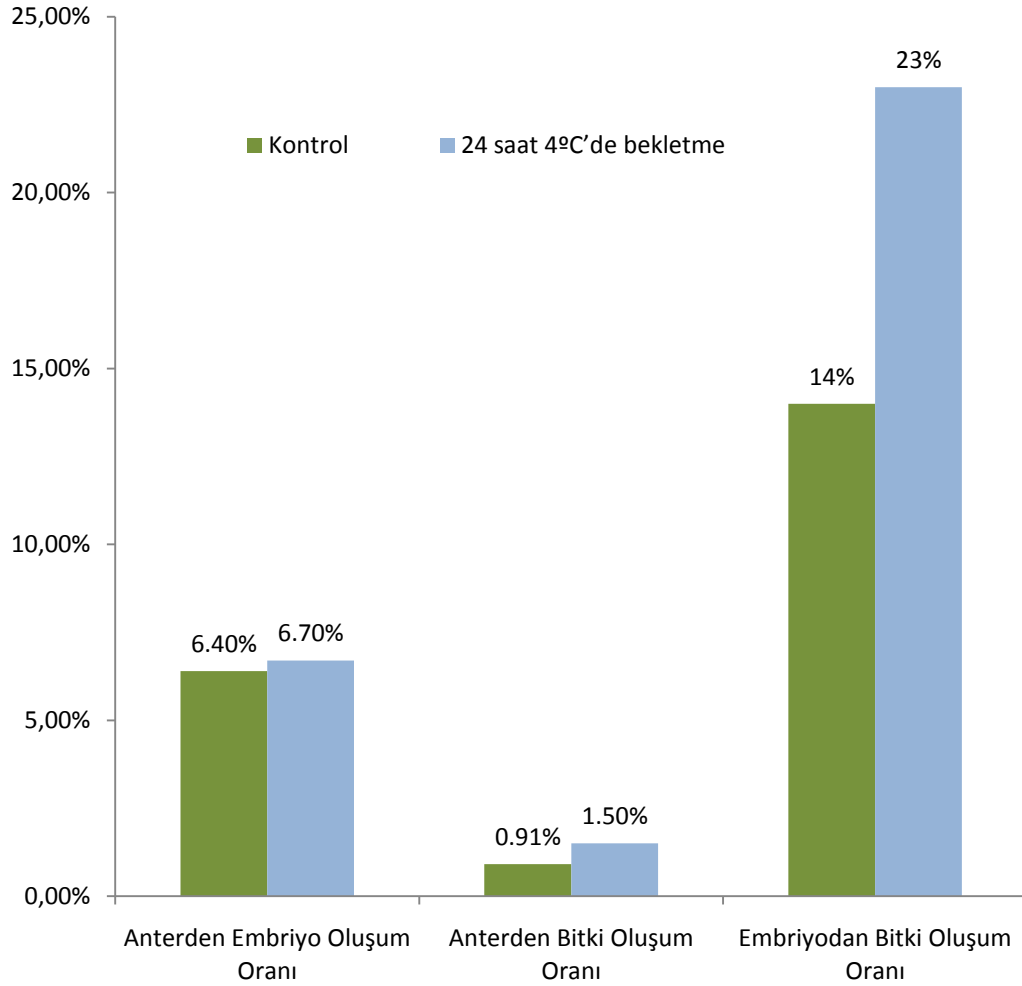


Şekil 4.5. Genotiplere göre başarı düzeyi

4.4. Çiçek tomurcuklarına stres uygulamasının başarı düzeyine etkisi

Araştırmamızda çiçek tomurcuklarına stres uygulanması (4 °C’de 24 saat bekletme) yapılan ve kontrol (tomurcuklara stres uygulaması yapılmamış) uygulamaları karşılaştırıldığında stres koşulu uygulanmış tomurcuklardan 151 adet embriyo oluşumuyla %6,7 oranına ulaşılmıştır. Stres koşulu uygulanmamış olan tomurcuklardan 154 adet embriyo sayısı ile %6.4 oranına ulaşılmıştır. Anterden bitki oluşum oranı incelendiğinde stres koşulu uygulaması yapılanlar % 1.5 iken uygulanmamışlar % 0.9 oranında kalmıştır. Embriyodan bitki oluşum oranları stres koşulu yaratılmamış grupta

%14 iken stres koşulu yaratılmış tekerrürlerde %23 olmuştur. Stres uygulamasının embriyoid ve bitki oluşumu üzerine etkisi Şekil 4.7.'da verilmiştir.



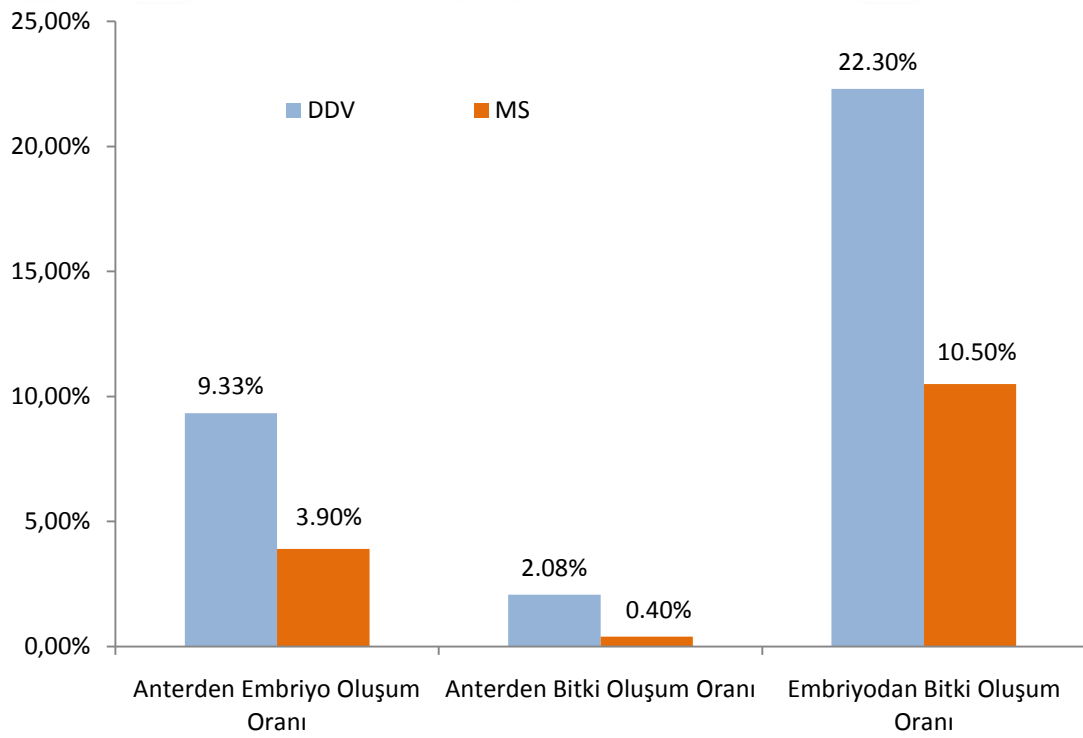
Şekil 4.6. Çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulamasının başarı düzeyi

4.3. Ortamlara göre başarı düzeyleri

Çalışmada kullanılan DDV (Dumas de Vaulux, 1982) ve MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamlarından ikisinde de embriyo oluşumu, embriyodan da bitki oluşumunda başarı elde edilmiştir. 4 genotipten DDV ve MS ortamına toplamda 4800 anter atımı gerçekleştirilmiştir.

DDV ortamında 210 adet embriyo elde edilmiş, bu embriyolardan 47 tanesi bitkiye dönüşmüştür. DDV ortamında yapılan çalışmalarda anterden embriyo oluşum oranı %9.33, anterden bitki oluşum oranı %2.08, embriyodan bitki oluşum oranı ise %22.30 olarak saptanmıştır.

MS ortamında 95 adet embriyo elde edilmiştir. 95 adet embriyodan 10 adet bitki elde edilmiştir. Bu verilere göre MS ortamında anterden embriyo oluşum oranı %3.9, anterden bitki oluşum oranı, %0.4, embriyodan bitki oluşum oranı ise %10.5 olarak bulunmuştur.



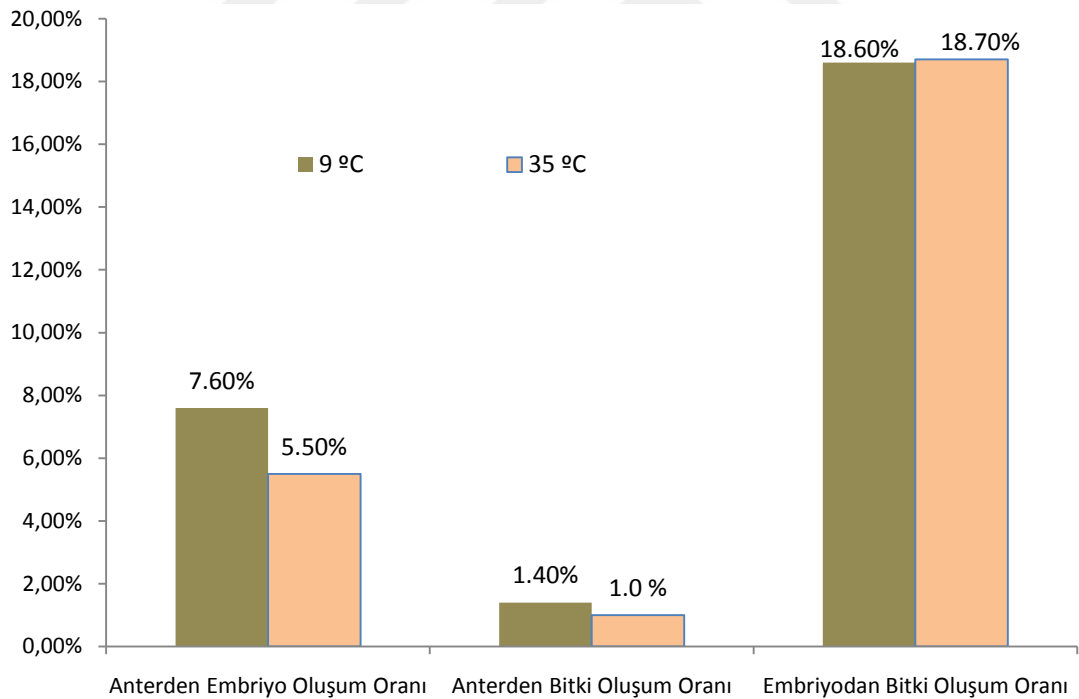
Şekil 4.7. Ortamlara göre başarı düzeyi

4.5. İnkübasyon uygulamalarının başarı düzeyine etkisi

Antelerin petri kaplarında kültüre alındıktan sonra 9 °C ve 35 °C’de 8 gün karanlıkta inkübasyon uygulamaları sonucunda elde edilen sonuçlar kıyaslanmıştır. 9 °C de inkübe edilen anterlerden embriyo oluşum sayısı 172 adet olup, embriyo oluşum oranı %7.6 olmuştur. 35 °C de inkübe edilen anterlerin başarı oranı ise 133 embriyo sayısı ile %5.5

olmuştur. Anterlerden bitki oluşum oranı incelendiğinde 9 °C uygulaması %1.4 olurken 35 °C uygulaması %1 olarak sonuçlanmıştır. Embriyodan bitki oluşum oranlarında ise %0.1 lik bir farkla 9 °C’de %18.6 oranı, 35 °C de %18.7 oranı elde edilmiştir. Sonuç olarak bakıldığında 9 °C de inkübe etme 35 °C de inkübe etmeye göre daha yüksek bir başarı sergilese de genotiplere ve uygulamalara göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, DDV ortamında İstek F₁ genotipinde stres koşuluna tabi tutulmamış örneklerde 35 °C inkübasyon koşulu, 9 °C inkübasyon koşulna göre daha üstün performans sergilemiştir. Aynı şekilde 24 saat 4 °C’de

bekletilip DDV ortamına ekilen Tokat biberi anterleri 35 °C inkübasyona alındığında 9 °C de inkübe edilenlere göre oldukça yüksek sonuçlar vermişlerdir. İnkübasyon koşullarının embriyoid ve haploid bitki oluşumu üzerine etkileri Şekil 4.8’ de verilmiştir.



Şekil 4.8. İnkübasyon uygulamalarının başarı düzeyi

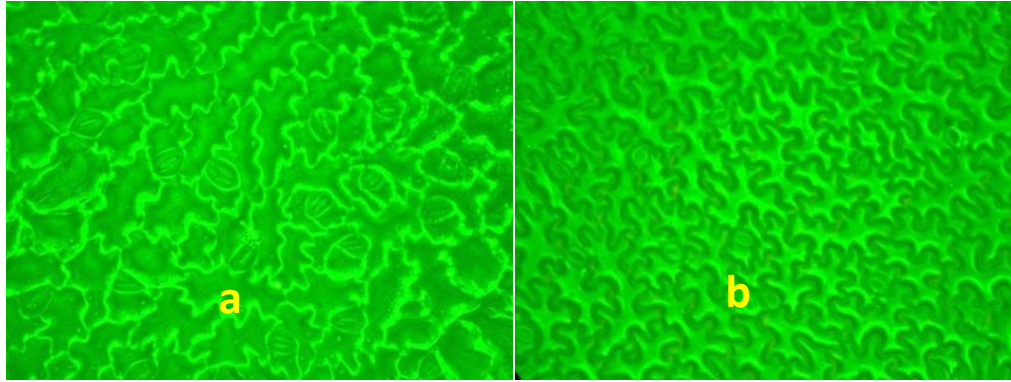
4.6. Sitolojik incelemeler

Flow sitomeri yöntemi sonuçlarına göre anter kültürü ile elde edilen 13 bitki haploid olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.9.)



Şekil 4.9. Diploid (A) ve haploid (B) biber meyvelerine ait görünüm

Flow sitometri yöntemiyle elde edilen sonuçlarından sonra haploid bitkilerden alınan yapraklarda stomalar incelenmiştir. Haploid bitkilerde stomaların diploid bitkilere göre daha küçük ve birim alandaki stoma sayısının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Stoma görünümü a) Diploid biber bitkilerine ait stomalardan görünüm

b) Haploid biber bitkilerine ait stomalardan görünüm

Fenotipik incelemeler sonucunda da haploidlerin diploide göre yaprak ve çiçek, meyveleri oldukça küçük olduğu görülmüştür. Küçük meyvelerin de tohum bağlamadığı saptanmıştır. (bkz. Şekil 4.8.)

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

4 farklı genotipte belirli faktörlerin anter kültürü üzerine olan etkisinin incelendiği çalışmamızda embriyoid oluşum oranları, cevap alınamayan uygulamalar dikkate alınmadığında %0.66-34.00 arasında değişmiştir. Anterlerden bitki oluşum oranı %0.66-5.33, embriyodan bitki oluşum oranı %7.70-83.33 arasında gerçekleşmiştir. Bu sonuçlarda uygulamaların etkileri belirgin şekilde görülmektedir. Çalışmada sonuç elde edilemeyen uygulamaların yanında, genotiplere ve diğer uygulamalara bağlı olarak olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmada androgenesis başarı oranı genotiplere göre önemli farklılıklar göstermiştir. Genotiplerin genel performanslarına bakıldığında Tokat biberi ve İstek F₁ genotipi en iyi sonucu vermişlerdir. Embriyo oluşumunda İstek F₁ ve Tokat biberi genotiplerinde başarı oranı sırasıyla %14 ve %31 olurken bu oran, Köylüm F₁ ve Üçburun F₁ genotiplerinde sırasıyla %0.25 ve %0.28 olarak gerçekleşmiştir. Literatürde şüana kadar çalışılmış olan bütün türlerde, aynı koşullarda genotipler arasında anter tepkileri bakımından önemli farklılıklar bulunmuştur. Anter kültürü çalışmalarının yoğun olarak yapıldığı tütün (Smith, 2013; Touraev ve Heberle-Bors, 2003), lahana (Achar, 2002; Zhang ve ark., 2005; Cardoza, ve Stewart, 2004) ve biber (Ochoa-Alejo ve Ramirez-Malagon, 2001; Kothari ve ark., 2010) türlerinde de genotip başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri olarak gösterilmiştir. Mityko ve Fari (1997), 500'den daha fazla F₁ ve biber hatlarında yaptıkları çalışmada; genotipin önemli derecede farklılıkları olduğunu belirtmişlerdir. Kristiansen ve Andersen (1993), donör bitkilerin büyüme koşullarının optimum olmasının genotipin etkisini ortadan kaldırmayacağını, Rodeva ve ark. (2006) ise genotipler arasında embriyogenik farklılıklar olduğunu ifade etmektedirler. Çalışmamızda da bütün çeşitler aynı koşullarda ve aynı uygulamalardan geçirilip aynı şartlar altında kültüre alınmasına rağmen bütün genotiplerden farklı sonuçlar elde edilerek genotiplerin başarıya etkisi bizim çalışmamızla da ön plana çıkmıştır.

Çalışmada tomurcuklara 24 saat süreyle 4° C soğuk uygulaması, kontrole göre %0.3 lük bir artış sağlamıştır. Soğuk uygulamasının belirgin bir fark oluşturmamasının genotiplerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda tomurcuklara düşük sıcaklık

uygulamasının genotipler dışında diğer uygulamalardan da etkilendiği, ancak genel olarak kontrole göre önemli bir artış sağlamadığı görülmektedir. Araştırmacılar anter kültürü çalışmalarında tomurcuklara yapılan ön uygulamalarının etkili olduğunu, soğuk uygulamasının başarıyı arttırdığını belirtmekte, soğuk uygulaması için 4-10 °C arasını önermektedirler (Morrison ve ark, 1986; ForoughiWehr ve Wanzel,1993; Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz, 1997). ForoughiWehr ve Wenzel (1993), kültür öncesi soğuk şoklarına maruz kalan anterlerin *in vitro* koşullarda olumlu yanıt verdiğini bildirmektedir. Çiner ve Tıpırdamaz (2002), *Capsicum annuum* L. tomurcuklarını 48 ve 96 saat sürelerde 4°C’de bekleterek yaptıkları soğuk şoku uygulamalarında, uygulama yapılanlara göre uygulama yapılmayan kontrol grubunda başarının daha yüksek olduğunu belirtmektedirler. Chlyah ve Taarji (1984), domates anterlerine 4°C’ de farklı sürelerde soğuk uygulaması yapmışlardır ancak soğuk uygulamasına tabi tutulan anterlerden embriyo oluşumu gerçekleşmemiştir. Malhotra ve Maheshwari (1977), *Petunia hybrida* bitkisiyle yaptıkları bir çalışmada, tomurcukları 6 °C’ de 48 saat süreyle tuttuklarında aynı besin ortamındaki kontrol anterlerine göre 2 kat daha fazla sayıda embriyoid elde etmişlerdir.

Anter kültüründe günümüzde birbirine az veya çok benzesede farklı besin ortamlarından söz edilmektedir. Çalışmada Duma De Vaulx (1981) (DDV) ve Murashige ve Skoog (1962) (MS) tarafından önerilen ortamlar denenmiştir. DDV ortamında başarı düzeyi daha yüksek çıkmıştır. Ortamların performansları aynı zamanda diğer faktörlere görede değişmektedir. Matsubara ve ark. (1992) MS ortamının farklı kombinasyonlarını kullanarak yaptıkları bir çalışmada % 8 oranında embriyo oluşum oranı elde etmişlerdir. Ellialtıoğlu ve ark. (2001) yapmış oldukları çalışmada MS ortamı ve 4 mg/L NAA ve 0.1 mg/L BAP konsantrasyonlarında bitki büyüme düzenleyicilerini kullanarak hazırladıkları ortamda Kahramanmaraş biberi üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada embriyo oluşum oranını % 2.28 olarak saptamışlardır. Yine aynı protokollerin uygulandığı Çömlekçioğlu ve ark. (2001) çalışmalarında embriyo elde edememişlerdir. Koleva-Gudeva (2007) biber anter kültürüne inkübasyon uygulamaları ve farklı ortamların etkisini araştırdıkları bir çalışmada, MS (Murashige ve Skoog, 1962), N (Nitsch, 1974), LS (Linsmaer ve Skoog, 1965), NN (Nitsch ve Nitsch, 1969) ve CP (Dumas de Valux ve ark., 1981) ortamlarını kullanmışlardır. Sonuç olarak MS ve CP ortamlarıyla diğerlerine göre daha yüksek başarı elde etmişlerdir.

Ellialtıoğlu ve ark. (2012) patlıcanda yaptıkları bir çalışmada DDV ortamında embrioid oluşum oranını % 6.6, bitki oluşum oranını ise % 5.5 olarak belirlemişlerdir. Yine Salas ve ark. (2011), DDV ortamı kullandıkları bir patlıcan araştırmasında embriyo oluşum oranını % 0.7 ile % 60.9, bitkiye dönüşüm oranını ise % 1.0 ile % 5.8 arasında bulmuşlardır.

Ellialtıoğlu ve ark. (2000), bitki türlerinin çoğuna cevap verebilecek bir ortamı bulmanın kolay olmadığını, anter tepkilerinin aynı türdeki farklı genotipler arasında bile farklılık gösterebildiğini belirtmişlerdir.

Anter kültürü çalışmalarında anterlerin besin ortamına alındıktan sonra belirli sürelerle inkübasyona tabi tutulması artık günümüzde zorunluluk gibi kabul edilmektedir. Buradan hareketle çalışmada anterler karanlık koşullarda 8 gün süreyle 9 °C ve 35 °C sıcaklıklarda bekletilmişlerdir. İnkübasyon uygulamasında embriyo oluşum oranı 9 °C de %7.60 olurken, 35 °C de %5.50 olarak gerçekleşmiştir. Anter kültürü çalışmalarında inkübasyon koşullarını belirlerken araştırmacılar genellikle 9 °C ve 35 °C sıcaklıklarını tercih etmekte, süreyi de karanlıkta 7 veya 8 gün almaktadırlar (Ellialtıoğlu ve ark.2001). Terzioğlu ve ark. (2000), anterlerin yüksek sıcaklıkta inkübe edilmesinin haploid bitki geliştirmede etkili olduğunu belirtmektedirler. Ellialtıoğlu ve ark. (2000) kültüre alma işleminin ardından ilk günler de uygulanan yüksek sıcaklık şokunun, biber ve patlıcan anter kültürü üzerinde olumlu etki yaptığını belirtmişlerdir. Koleva-Gudeva (2006), biber anter kültürüne inkübasyon uygulamalarının etkisini araştırdığı bir çalışmada, Dokuz farklı biber genotipden alınan anterlere 7° C, 25° C ve 35° C de farklı sıcaklıkta inkübasyonlar denemiştir. Bu çalışmasında 25°C de %30.6 başarı elde etmiş, 35°C de ise dokuz genotipten dördü uygulamaya hiçbir cevap vermemiştir. İnkübasyon çalışmalarında araştırmacıların çoğu yüksek inkübasyon sıcaklığını önermektedirler. Az sayıda araştırmacı yüksek sıcaklık uygulamasından cevap alınmadığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda her ne kadar 9 °C inkübasyon koşulları daha iyi sonuçlar verse de örneğin; İstek F₁ genotipinde ön uygulama yapılmamış anterlerde 35 °C inkübasyon koşullarında yüksek sonuçlar verirken, ön uygulama yapılan Tokat biber anterlerinde de 35 °C inkübasyon koşulları daha yüksek sonuçlar vermiştir. Dolayısıyla literatürde belirtilen yüksek başarı oranları bizim çalışmamızda da ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak denemede kullanılan genotipler arasında yerel popülasyon olan Tokat biberi en iyi androgenik performansı ortaya koyarken ikinci sıraya İstek F₁ genotipi gelmektedir. Ön tomurcuk uygulamalarından tomurcukların 4 °C de 24 saat bekletilmesi daha etkili olurken, İnkübasyon uygulamasının etkisi uygulamalara göre farklılık göstermektedir. Besin ortamı olarak DDV ortamı MS ortamından daha üstün çıkmıştır. Sonuçta üçburun biber genotiplerinde %100 homozigot hatlar elde edilmiştir.



6. KAYNAKLAR

- Abak, K., 1983. Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırma. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı. Cilt: 33, 155-163
- Abak, K., 1986. Biber ıslahında anter kültüründen yararlanma. Tubitak Bitki Islahı Sempozyumu Bildiri Özetleri, 15-17 Ekim, İzmir.
- Achar, P. N., 2002. A study of factors affecting embriyo yields from anther culture of cabbage. Plant cell, tissue and organ culture, 69(2), 183-188.
- Alremi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S., Ellialtıoğlu Ş., 2013. Biber (*Capsicum annuum* L.)’de Genotip ve Besin Ortamının Anter Kültürüne Etkileri
- Andrews, J., 1985. Peppers. The Domesticated Capsicum. University. of Texas Pres, Box 7819 Austin, Texas 78713.
- Andrews, J., 1999. The Pepper Trail, History and Recipes from Around the World, University of North Texas Pres, Denton, TX, USA.
- Anonim, 1983. Genetic resources of Capsicum, IBPGR Secretariat, Rome, 49.
- Anonim, 2015 <http://rapory.tuik.gov.tr/20-06-2016-22:11:58133105850912639438501191466595.html>
- Bajaj, Y. P. S., 1983. In vitro production of haploids. In: Evans D.A., Sharp V.R., Ammirato P.V., Yamada Y. (eds), Handbook of Plant Cell Culture, MC Millan Publ. Co. Vol.I Chapter 6, pp. 228-287.
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu, N., Abak, K., Ekbiç, E., and Kılınç, N., 2004. Effect of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. Europ. J. Hort. Sci., 69 (5):206-209.
- Cardoza, V., Stewart Jr, C. N., 2004. Brassica biotechnology: progress in cellular and molecular biology. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 40(6), 542-551.
- Chambonnet, D., 1988. Production of haploid pepper plants. Bulletin interne de la station d’Amelioration des Plantes Maraicheres d’Avignon-Montfavet, France, 1-10.
- Chuong, P. V., Beversdorf, W. D., Powell, A. D., Pauls, K. P., 1985. The use of haploid protoplast fusion to combine cytoplasmic atrazine resistance and cytoplasmic male sterility in *Brassica napus*
- Chlyah, A., Taarji H., 1984. Proc. Int. Symp. Plant tissue and cell culture application to crop improvement. 24–29 Sept.
- Çiner, D., ve Tıpırdamaz, R., 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turkish Journal of Botany*, 26:131-139.
- 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., Büyükalaca, S., And Abak, K., 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum*). XIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant, 2001, Antalya-Turkey.

- Dolcet-Sanjuan R, Claveria, E., 2000. Androgenesis in sweet bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and eggplant (*Solanum melongena* L.) used for the production of commercial hybrid varieties. 4th Int. Symp. on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 2-7 July 2000, Tampere, Finland, Abstracts: 58.
- Dumas De Vault, R., And Chambonnet, D., And Sibi, M., 1981. Culture in vitro d'antheres de piment (*Capsicum annuum* L.): amelioration des taux d'obtention de plantes chez differents genotypes par de traitements A+35°C. *Agronomie*, 11:859
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D., 1982. Culture in vitro d'antheres d'aubergine (*S. Melongena* L.); Stimulation de la production de plantes qu moyen de traitements a 8 +35oC associes a de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie* 2 (10): 983-988.
- Dunwell, J.M. and Sunderland, N., 1973. Anther culture of *Solanum tuberosum*. *Euphytica*, 22: 317-323
- Dunwell, J.M., 1976. A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana Tabacum*. p:109-118
- Dunwell, J.M., 1981. Influence of genotype and environment on growth of barley embryos in vitro. *Ann. Bot*, 48:535-542.
- Dunwell J.M., 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation *Plant Biotechnology Journal* (2010) 8, pp. 377–424
- Elçi, Ş., 1982. Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, Biyoloji:3 , Malatya,159 sayfa.
- Ellialtıoğlu, Ş., Tıprıdamaz, R., 1997. Soğuk uygulamaları 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., Abak, K., 2000. Haploid Bitki Üretimi. (Bitki Biyoteknolojisi Cilt:I, Ed: Babaoğlu, M., Özcan, S., Gürel, E.) 40 s
- Ellialtıoğlu,Ş., Sarı, N., Abak, K., 2001. Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S. Bitki Biyoteknolojisi I -Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi. Haploid Bitki Üretimi, s:
- 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., 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.
- 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.
- Foroughi-Wehr, B., Wenzel, G. 1993. Andro- and parthenogenesis. In: Plant Breeding. Principles and Prospects. Hayvard,M.D., Bosemark, N.O., Ramagosa, I. (eds.), Chapman & Hall, London, pp. 261-277
- Genovesi, A.D., Collins, G.B. 1982. In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.*, 22: 1137-1144.

- George L. and Narayanaswamy S. (1973): Haploid Capsicum through experimental androgenesis. *Protoplasma* 78: 467-470.
- Goodsell S.F., 1961. Male sterility in corn by androgenesis. *Crop. Sci.* 1:227–228.
- Greenleaf, W.H., 1986. Pepper Breeding. *Breeding Vegetable Crops. A.V.I.*, 67- 127
- Günay, A., 1981. Serler. Özel Sebze Yetiştiriciliği. Cilt II Çağ Matbaası, Ankara, 323s.
- Hassawi, D. S. and Liang, G. H., 1990. Effects of Growth Regulator and Genotype of Production of Wheat and Triticale Polyhaploids from Anther Culture. *Plant Breed.*, 104:40-45
- Hatipoğlu, R., 1997. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190. Ders Kitapları Yayın No: A-58.
- Heiser, C. B. Jr., 1976. Peppers, In *Evolution of Crop Plants*. (Edited by N.W. Simmonds, 1986). Longman Sci. & Tech. Report, 265-268.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Calif: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station.
- Johansson, L., Eriksson, T., 1977. Induced embryo formation in anther culture of several *Anemone* species. *Physiol. Plant.*, 40: 172-174.
- Kaloo, D., 1986. *Vegetable Breeding Volume III*. CRC Press. Inc. Boca raton, Florida, 136 140
- Karakullukçu, Ş., 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde in vitro Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi, Ankara, 131s.
- Khush, G.S., 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.
- Koleva-Gudeva, L.R., Spasenovski, M., And Trajkova, F., 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae*, 111 (2007) 114–119.
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., Ochoa-Alejo, N., 2010. Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology advances*, 28(1), 35-48.
- Kristiansen, K., Andersen, S. B., 1993. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 67:105–109.
- Lacadena, J.R., 1974. Spontaneous and induced parthenogenesis and androgenesis . In: Kasha KJ, *Haploids in higher plants advances and potential*. Proceeding of the 1st International Symposium, University of Guelph, 13-32
- Lentini, Z., Reyes, P., Martínez, C.P., And Roca, W.M., 1995. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Science*, Volume 110, I:127-128.
- Li, H., Qureshi, J.A., And Kartfia, K.K., 1988. The Influence of Different Temperature Treatments on Anther Culture Response of Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.*, 57: 55-61
- Linsmaier, E. M.; Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100±127.
- Lone, M.L., Kueh, S.H., Wyn Jones, R.G. and Bright, S.W.J., 1987. Influence of Proline and Glycinebetaine on Salt Tolerance of Cultured Barley Embryos. *J. Exp. Botany*, 38 (188): 479-490.

- Malhotra, K., Maheshwari S.C., 1977. Enhancement by Cold Treatment of Pollen Embryoid Development in *Petunia hybrida*
- Matsubara, S., Hu, K., and Murakami, K., 1992. Embryoid and callus formation from pollen grains of eggplant and pepper by anther culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 61: 69–77.
- Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G., And Fari, M., 1995. Anther culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding*, 114:78-80.
- Mityko, J., Fari, M., 1997. Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture. *Acta Hortic* 447:281-287.
- Morrison, R.A., Koning, R.E., Evans, D.A. 1986b. Anther Culture of Interspecific Hybrid of *Capsicum*. *J. Plant Physiol.* 126:1-9.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Nitsch, J.P., and Nitsch, C., 1969. Haploids Plants from Pgrains. *Science* 163:85-87.
- Nitsch, C., 1974. La culture de pollen isole sur milieu synthetique. *C. R. Acad. Sci.*, 278 D: 1031-1034.
- Ochoa-Alejo, N., Ramirez-Malagon, R., 2001. In vitro chili pepper biotechnology. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 701-729.
- Özkum, D., Tıprıdamaz, R., 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.
- Paksoy, M., Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K., 1995. Bazı Brassica sp. türlerinde anter kültürüne etki eden faktörler üzerinde araştırmalar. *DOĞA T. Botanik*, 19: 281-286.
- Pierik, R.L.M., 1989. In vitro culture of higher plants. *Martinus Nijhoff Publ.*, Dordrecht, 344 p.
- Rashid, A., 1983. Pollen dimorphism in relation to pollen plant formation. *Physiol Plant* 58:544-548
- Reinert, J. ve Bajaj, Y.P.S., 1977. Anther Culture: Haploid Production and Its Significance. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S, Eds) Springer-Verlag, Berlin, pp. 251-267.
- Rodeva, V.N., Irikova, T.P., And Todorova, V.J., 2004 Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) Comparative study on effect of the genotype Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 18/2004/3
- Rodeva, V., Grozeva, S., Todorova, V., 2006. In vitro answer of Bulgarian pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Genetica (Serbia)* 38(2):129–136.
- Salas-Marina M. A., Silva-Flores M. A., Uresti-Rivera E. E., Castro-Longoria E., Herrera-Estrella A., Casas-Flores S., 2011. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonate and salicylate pathways. *Eur. J. Plant Pathol.* 131 15–2610.1007/s10658-011-9782-6

- Sauton, A., 1987. Obtention of Embryo and Plants from In Vitro Culture of Fertilized Ovules of *Cucumis melo* 5 Days After Pollination. *Cucurbits Genetics Cooperative Rep.*,10: 62-63.
- Sayılır, A., Özzambak, E., 2000. Brokkolide anter kültürü denemeleri. III. Sebze Tarımı Sempozyumu, Isparta, 218-222.
- Sayılır, A., Özzambak, E., 2002. Biber anter kültüründe uygun tomurcuk büyüklüğü tespiti ile besin ortamları karışımlarının ve soğuk uygulama sürelerinin embriyo verimine etkisi üzerine bir araştırma. IV. Sebze Tarımı Sempozyumu, Bursa.
- Smith, R. H., 2013. Plant tissue culture: techniques and experiments. Academic Press.
- Sopory, S.K., Jakobson, E., Wenzel, G., 1978. Production of monoploid embryooids and plantlets in cultured anthers of *solanum tuberosum*, Plant. Sci. Lett. 12:47-54
- Subrahmanyam N.C., Kasha K.J., 1973. Feeding of detached tillers improves haploid production in barley. *Genet Newslett* 1:47.
- Sunderland, N., Roberts, M., 1979. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anther, *Ann. Bot.*, 43:405-414.
- Sunderland, N., Xu, Z.H., 1981. Glutamine, inositol and conditioning factor in the production of barley pollen callus in vitro. P: 161-168.
- Suprunova T., Shmykova N., 2008. In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. In: *Cucurbitaceae 2008*. M. Pitrat (ed.). Proc. IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae. 21-24 May, Avignon, France.
- Taşkın, H., 2005. Bazı biber genotiplerinde anter kültürü ile haploid embriyo uyartımında embriyo kalitesinin artırılmasına yönelik bazı uygulamalar. Ziraat Fakültesi Yüksek Lisans, Sayfa Sayısı: 79.
- Terzioğlu, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., ve Abak, K., 2000. İnkübasyon Koşullarının Biber Anter Kültüründe Embriyo Oluşumu üzerine Etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu. 11-13 Eylül, Isparta. s:233-238.
- Touraev, A., Heberle-Bors, E., 2003. Anther and microspore culture in tobacco. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 223-228). Springer Netherlands.
- Tsay, H.S., Miano S.H., Widholm J.M., 1986. Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture. *J. Plant Physiol.*, 126: 33-40.
- Tuberosa, R., Sanguinetti, M.C., Conti, S. 1987. Anther culture of eggplant (*Solanum melongena* L.) lines and hybrids, *Genetica Agraria*, 41, 267-274.
- Tüik, 2015. <http://rapory.tuik.gov.tr/20-06-2016-22:11:58-133105850912639438501191466595.html>
- Turcotte, E. L. and Feaster, C.V., 1969. Semigametic production of haploids in Pima cotton. *Crop Sci.* 9:653-655.
- Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bornova, İzmir, 440 s.
- Yeung, E.C., Thorpe, A.T., 1981. In vitro fertilization and embryo culture. In: *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture* (ed: Thorpe, A.T.),
- Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C. ve Chien, N.J., 1973. The induction of pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. *Sci. Sin.*, 16: 147-151.
- Wenzel, G., 1985. Strategies in unconventional breeding for disease resistance. *Ann. Rev. Phytopat.*, 23: 149-172.

- Wenzel, G., Uhrig, H., 1981. Breeding for virus and nematode resistance in potato via anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 59:333-340.
- Zagorska NA, Shtereva A, Dimitrov BD, Kruleva MM (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)—I. Influence of genotype on androgenetic ability. *Plant Cell Rep* 17:968–973
- Zhang, E., Ou, C., Xu, Z., Cheng, Y., 2005. Factors affecting embriyoid induction and formation of cabbage anthers in culture. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26(11), 2372-2377



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Murat Emre Çelik

Doğum Tarihi: 21.03.1991

Yabancı Dil: İngilizce

E-mail: muratemrecelik@gmail.com

İletişim Bilgileri: Yeşilırmak mah. Çağgölü 7.Sokak Dirlik Apt. A blok No: 17/7 Tokat
/ Merkez

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm	Üniversite	Yıl
Lise	Fen/Matematik	Tokat Anadolu Lisesi	2009
Lisans	Bahçe Bitkileri Bölümü	Ankara Üniversitesi	2013
Yüksek lisans	Bahçe Bitkileri Bölümü	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2016

İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl
Teknik ve Pazarlama Koordinatörü	Agro Dinamik Tarımsal Pazarlama Ltd. Şti.	2014-