

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**BAZI BİBER (*Capsicum annuum* L.) GENOTİPLERİNİN FARKLI
ANDROGENESİS YÖNTEMLERİNE VERDİĞİ TEPKİLER ÜZERİNE BİR
ARAŞTIRMA**

Yağmur BENLİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

TEMMUZ 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI BİBER (*Capsicum annuum* L.) GENOTİPLERİNİN FARKLI
ANDROGENESİS YÖNTEMLERİNE VERDİĞİ TEPKİLER ÜZERİNE BİR
ARAŞTIRMA**

Yağmur BENLİ
BAHÇE BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 25/07/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüsnü ÜNLÜ



ÖZET

BAZI BİBER (*Capsicum annuum* L.) GENOTİPLERİNİN FARKLI ANDROGENESİS YÖNTEMLERİNE VERDİĞİ TEPKİLER ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Yağmur BENLİ

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Temmuz 2019; 47 sayfa

Bu araştırmada sivri (Lumbard RZ F₁) ve üç burun (Üç burun F₁) olmak üzere 2 tane ticari biber çeşidinden haploid ve DH bitki elde edebilmek için anter kültürü ve shed mikrospor kültür yöntemi kullanılmıştır. Biber çeşitlerinde uygun anter gelişim aşamasını belirlemek amacıyla tomurcuklar kendi aralarında morfolojik görüntüsü dikkate alınarak sınıflandırma işlemi yapılmıştır. Daha sonra uygun mikrospor aşamasının belirlenmesi amacıyla sınıflandırılan tomurcuklar ethidium bromid (EtBr) boyama tekniği kullanılarak boyama işlemi yapılmış ve floresan mikroskobunda gözlemlenmiştir. Uygun aşamadaki anterler biber tomurcuğundan ayrılarak anter kültürü tekniği için içerisine +0,1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA +15 mg/l AgNO₃ +2,5 g/l aktif kömür ilave edilmiş ve pH 5,7-5,8'e ayarlanmış MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan anterler önce +35 °C karanlıkta 48 saat inkübatörde tutulmuş ve sonra +25 °C olan büyüme odasında 33 gün karanlıkta bekletilmiştir Biber tomurcukları kültüre alındıktan 35 gün sonra hormonsuz MS ortamına transfer edilmiş ve +25 °C'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olacak şekilde 3000 lüks aydınlatmaya sahip olan büyüme odasında kültüre alınmıştır.

Araştırmada kullanılan diğer bir yöntem ise shed mikrospor yöntemidir. Bu yöntemde uygun aşamadaki biber tomurcukları toplandıktan sonra + 4 °C'de 24 saat ön uygulama yapılmıştır. Ön uygulama yapılan tomurcuklardan ayrılan anterler NN ortamına ilave edilen +%2 maltoz +2,5 µM zeatin +5 µM IAA+ %1 Aktif kömür ve 6 g/l agar'la oluşturulan besin ortamına yerleştirilmiştir. Daha sonra anterlerin üzerine NN ortamına +%2 maltoz eklenerek oluşturulan sıvı katmanla kapatılmıştır. Kültür ortamında kullanılan yarı katı-yarı sıvı olan besin ortamının da pH' sı 5, 7- 5,8 olarak ayarlanmıştır. Shed mikrospor kültürüne alınan anterler +4 °C'de karanlıkta bir hafta muhafaza edilerek soğuk ön uygulamasına maruz bırakılmıştır. Soğuk ön uygulamasından sonra ise anterler +27 °C'de mikrosporlardan kallus, embriyo veya embriyo benzeri yapılar oluşuncaya kadar bekletilmiştir. Oluşan bu yapılar hormonsuz MS ortamına transfer edilerek +25 °C'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks aydınlatmaya sahip olan büyüme odasında tutulmuştur.

Araştırma sonucu değerlendirildiğinde anter kültürü çalışmasında Lumbard RZ F₁ çeşidinden %8,94 oranında embriyo gelişimi gözlenmiş ve gelişen embriyoların %23,63 'ü bitkiye dönüşmüştür. Bu çalışmada kullanılan diğer Üçburun F₁ çeşidinden ise embriyo oluşum oranı %22,18'ken bunların bitkiye dönüşüm oranı %22,22 olarak saptanmıştır.

Lumbard RZ F₁ ve Üçburun F₁ çeşitlerinin her ikisinden de anter kültürü çalışmasında yanıt alınmışken, shed mikrospor yönteminde sadece Lumbard RZ F₁ çeşidinden embriyo oluşumu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte Lumbard RZ F₁ çeşitinin embriyo oluşturma oranı %11,11 iken, bu embriyoların bitkiye dönüşme oranı %7,87 olarak gerçekleşmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Anter kültürü, Biber, *Capsicum annuum* L., Haplidi, Shed mikrospor kültürü

JÜRİ: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüsnü ÜNLÜ



ABSTRACT

A RESEARCH ON THE REACTIONS OF SOME PEPPER (*Capsicum annuum* L.) GENOTYPES ON DIFFERENT ANDROGENESIS METHODS

Yağmur BENLİ

MSc Thesis in Department of Horticulture Science

Supervisor: Prof. Dr. A. Naci ONUS

July 2019; 47 pages

In this study, anther culture and shed microspore culture methods were used to obtain haploid and DH plants from 2 commercial pepper cultivars, Lumbard RZ F₁ and Uç burun F₁. In order to determine the appropriate anther development stage of the pepper varieties, the classification process was made considering the morphological appearance of the buds among themselves. Then, in order to determine the appropriate microspore stage, the buds classified were stained using ethidium bromide (EtBr) staining technique and observed under fluorescence microscope. Anthers of the appropriate stage were separated from the pepper bud and transferred to MS nutrient media, supplemented with 0,1 mg / l BAP + 4 mg / l NAA + 15 mg / l AgNO₃ and 2,5 g / l activated charcoal with pH 5,7-5,8 for the anther culture technique. Cultured anthers were first kept in incubator for 48 hours in the dark at +35 °C and then kept in the dark for 33 days in the growth chamber of +25 °C. 33 days after cultivation of pepper buds were transferred to hormone-free MS medium and taken to growth room with 3000 lux illumination at +25 °C for 16 hours light and 8 hours dark. Pepper buds were transferred to hormone-free MS medium 33 days after culturing and kept in growth chamber having 3000 lux illumination at 25 °C with 16 hours light and 8 hours dark

Another method used in the research is the shed microspore method. In this method, pepper buds were collected at the appropriate stage and subjected to pretreatment at 4 °C for 24 hours. Anthers separated from pre-treated buds were placed in nutrient medium which consisted of NN medium + %2 maltose + 2,5 µM zeatin, 5 µM IAA + %1 activated charcoal and 6 g / l agar. The anther was then covered with liquid layer formed by adding + %2 maltose to NN medium. The pH of semi-solid and semi-liquid nutrient medium used in the culture medium was adjusted to pH 5, 7 – 5,8. Cultured anthers were kept in darkness at +4 °C during one week for cold pretreatment. After cold pre-treatment, anthers were kept at +27 °C until microspores callus, embryo or embryo-like structures were formed. The resulting structures were transferred to hormone-free MS medium and kept in a growth chamber with 16 hours light, 8 hours dark photoperiod conditions under 3000 lux illumination at +25 °C.

As evaluation of results, embryo development was observed as %8,94 of Lumbard RZ F₁ cultivars and %23,63 of the developing embryos were transformed into plants. The embryo formation rate of the Uç burun F₁ cultivar used in this study was found to be %22,18, while their conversion rate to plants was %22,22. While both Lumbard RZ F₁ and Uçburun F₁ varieties responded to anther culture studies, in the shed microspore

method, embryo formation was observed only from Lumbard RZ F₁. Embryo formation rate of Lumbard RZ F₁ was %11,11, while the rate of transformation of these embryos into plants was %7,87.

KEYWORDS: Anter culture, *Capsicum annuum* L., Haploidy, Pepper, Shed Microspor Culture

COMMITTEE: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüsnü ÜNLÜ



ÖNSÖZ

Bitki ıslahı bugün olduğu gibi tarih boyunca insanların besin gereksinimlerini karşılaya bilmeleri için büyük bir öneme sahip olmuştur. İlk ıslahçılar üstün özelliklere sahip bitkileri seçebilmek için kendi yetenek ve değerlendirme kabiliyeti ile seleksiyon yöntemi kullanmışlardır. Daha sonraları ise sistematik ve bilinçli tozlama çalışmaları ile özel gen kombinasyonları oluşturulmuş ve bu kombinasyonları bazı çeşitlerde toplayarak melezleme tekniği geliştirilmiştir. Geliştirilen bu melezleme tekniği ile klasik ıslah, bitki ıslahının temel yöntemi haline gelmiştir. Uzun zamandan beri kullanılan klasik ıslah yöntemi ile hastalık ve zararlılara dayanıklı, yüksek kalite ve miktarda ürün verebilecek yeni çeşitler geliştirilmiş olunmasına rağmen ıslah çalışmalarının uzun yıllar alması, hibrit üretiminin zorluğu ve yavaşlığı, yurt dışından tohum girişi nedeniyle biyoteknolojik yöntemlere başvurulmaktadır. Islah çalışmalarında kullanılan biyoteknolojik yöntemler, haploid bitki üretim yöntemlerinin başında gelir.

Bu çalışmanın amacı biber çeşitlerinde haploid ve DH bitki elde edebilmek için kullanılan anter kültürü ve shed mikrospor kültür yöntemlerinden hangisinin daha başarılı olduğunu belirlemektir. Çalışma konunun belirlenmesinde, çalışmamın her alanında tecrübe ve desteğini esirgemeyen ve bana bu konuda çalışma fırsatı sağladığı için danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Naci ONUS'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Tuğçe ÖZSAN, Araştırma Görevlisi F. Burcu ÇELİKLİ ve emeği geçen diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda kullandığım bitkilerin temininde yardımlarını esirgemeyen Ziraat Fakültesi Üretim Çiftliğinde çalışan Servet MUTLU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, Tez çalışmam boyunca anlayış, sabrı ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Evren Erkal BENLİ'ye, sevgi, mutluluk ve umut kaynağım olan biricik kızım Defne Atiye BENLİ'ye ve bu zamana kadar beni büyüten maddi ve manevi olarak her anlamda yanımda olan canım annem Nahile SÜMER'e, sevgili babam Mustafa SÜMER'e, çok değerli canım kardeşim Gözde SÜMER ve tüm aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	7
2.1. Anter Kültürü Yöntemi İle İlgili Önceki Çalışmalar	7
2.2. Shed Mikrospor Kültürü İle İlgili Önceki Çalışmalar.....	10
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Denemede kullanılan biber genotiplerinin özellikleri.....	15
3.2. Metot	17
3.2.1. Kültüre alınma işlemleri sırasında kullanılan malzemeler ve malzemelerin sterilizasyon işlemleri.....	17
3.2.2. Kültürlerde kullanılan besin ortamlarının hazırlanması.....	18
3.2.2.1. Anter kültüründe kullanılan besin ortamının hazırlanması	18
3.2.2.2. Shed mikrospor kültüründe kullanılan besin ortamlarının hazırlanması.....	20
3.2.3. Bitki yetiştirme.....	22
3.2.4. Anter kültürü ve shed mikrospor kültürü için çiçek tomurcuğunun alınma evresi.....	22
3.2.5. Anter kültürü yöntemi için ön uygulamalar	23
3.2.6. Anter kültürü yönteminde çiçek tomurcuklarının dezenfeksiyonu ve anterlerin ayrılması	23
3.2.7. Anter kültürü yöntemi için inkübasyon ve kültür koşulları	25
3.2.8. Shed mikrospor yönteminde mikrosporların gelişim aşamalarını belirlemek	25
3.2.9. Shed mikrospor yöntemi için ön uygulamalar	26
3.2.10. Shed mikrospor kültürü yönteminde çiçek tomurcuklarının dezenfeksiyonu ve anterlerin ayrılması	26

3.2.11. Shed mikrospor kültürü yönteminde anterlerin besin ortamına yerleştirilmesi.	27
3.2.12. Shed mikrospor yöntemi için inkübasyon ve kültür koşulları	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. Anter Kültürü Ve Shed Mikrospor Kültürü İçin Uygun Biber Tomurcuk Büyüklüğünün Belirlenmesi	28
4.2. Anter Kültürü Çalışmasından Elde Edilen Sonuçlar	32
4.3. Shed Mikrospor Kültüründen Elde Edilen Sonuçlar	37
5. SONUÇLAR	41
6. KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bazı Biber (*Capsicum annuum* L.) Genotiplerinin Farklı Androgenesis Yöntemlerine Verdiği Tepkiler Üzerine Bir Araştırma” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

25/07/2019

Yağmur BENLİ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
⁰ C	: Santigrad Derece
cm	: Santimetre
mm	: Minimetre
ml	: Mililitre
mg/l	: Miligram/Litre
g/l	: Gram/Litre
µl	: Mikrolitre
N	: Normal
L	: Litre
Dk	: Dakika

Kısaltmalar

NN	: Nitsch and Nitsch (1969)
MS	: Murashige ve Skoog (1962)
HR	: Yüksek Hastalık Dayanımı
IR	: Orta Hastalık Dayanımı
DAPI	: 4',6-Diamidino-2- Phenylindole, Dihydrochloride
DH	: Double haploid
F ₁	: Filial Generation 1
SSR	: Basit sekans tekrarı
Tm (TMV)	: Tobacco Mosaic Virus
TSWV	: Tomato Spotted Wilt Virus

AC	: Aktif kömür
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
BA	: Benzil adenin
BAP	: Benzil amino pürin
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum klorür dihidrat
CoCl ₂ .6H ₂ O	: Kobalt klorür heptahidrat
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır sülfat pentahidrat
FeSO ₄ .7H ₂ O	: Demir sülfat
EtBr	: Ethidium bromid
H ₃ BO ₃	: Borik asit
IAA	: Indol-3-asetik asit
KIN	: Kinetin
KH ₂ PO ₄	: Potasyum fosfat
KI	: Potasyum iyodür
KNO ₃	: Potasyum nitrat
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum sülfat hekzahidrat
MnSO ₄ .4H ₂ O	: Mangan sülfat tetrahidrat
NAA	: Naftalen asetik asit
NaClO	: Sodyum hipoklorid
Na ₂ EDTA	: Sodyum EDTA
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	: Disodyum molibdat hidrat
NH ₄ NO ₃	: Amonyum nitrat
NLN	: Nitsch ve Nitsch (1967) tarafından geliştirilen Lichter (1981,1982) tarafından modifiye edilen besin ortamı
ZnSO ₄ .7H ₂ O	: Çinko sülfat hekzahidrat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Anter kültürünün yapılışı (a) direkt in vitro androgenesis, (b) dolaylı in vitro androgenesis	5
Şekil 3.1. Serada yetiştirilen Lumbard RZ F ₁ (37-04) biber çeşidine ait bir görüntü.....	15
Şekil 3.2. Serada yetiştirilen Üçburun F ₁ biber çeşidine ait bir görüntü.....	16
Şekil 3.3. Sterilizasyon işleminde kullanılan otoklav makinesi	17
Şekil 3.4. Sterilizasyon işleminde kullanılan glass bead' ten bir görüntü	18
Şekil 3.5. Pensler ve bistüriler.....	18
Şekil 3.6. Besin ortamı hazırlığındaki bir görüntü.....	20
Şekil 3.7. Kültüre alınan biber tomurcuklarının yetiştiriciliği yapılan seradan bir görüntü	22
Şekil 3.8. Biber genotiplerinin dezenfeksiyon işlemi sırasındaki bir görüntü.....	23
Şekil 3.9. Biber tomurcuklarından anter elde edebilmek için yapılan ayırma işlemi.....	24
Şekil 3.10. Biber tomurcuğundan izole edilmiş anter görüntüsü.....	24
Şekil 3.11. Anter kültürü çalışmasında kullanılan inkubatör.....	25
Şekil 3.12. Görüntüleme sistemine ait bir görüntü.....	26
Şekil 4.1. Lumbard RZ F ₁ çeşidine ait tomurcuk gelişim aşamaları (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. gelişim aşaması, c ve c': 2. gelişim aşaması d ve d': 3. gelişim aşaması, e ve e': 4. gelişim aşaması, f ve f': gelişim aşamasındaki tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü).....	30
Şekil 4.2. Üçburun F ₁ çeşidine ait tomurcuk gelişim aşamaları (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. gelişim aşaması, c ve c': 2. gelişim aşaması d ve d': 3. gelişim aşaması, e ve e': 4. gelişim aşaması, f ve f': gelişim aşamasındaki tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü).....	31
Şekil 4.3. Lumbard RZ F ₁ çeşidinden elde edilen embriyonun görüntüsü.....	33
Şekil 4.4. Üçburun F ₁ çeşidinden elde edilen embriyonun görüntüsü.....	33

Şekil 4.5. Lumbard RZ F ₁ çeşidinden elde edilen kotiledonlu embriyonun görüntüsü.....	34
Şekil 4.6. Üçburun F ₁ çeşidinden elde edilen kotiledonlu embriyonun görüntüsü.....	34
Şekil 4.7. Tüp içerisine alınan bitkicikten bir görüntü.....	35
Şekil 4.8. Tüp içerisine alınan bitkiciklerden bir görüntü.....	35
Şekil 4.9. Strafor içerisine ekim yapılmış biber genotiplerinin bir görüntüsü	36
Şekil 4.10. Saksı içerisine aktarılmış Üçburun F ₁ bitkilerinden bir görüntü.....	36
Şekil 4.11. Mikrosporların gelişim aşamasındaki bir görüntü.....	38
Şekil 4.12. Mikrosporların gelişim aşamaları embriyo,torpedo embriyo ve kotiledon oluşturmuş embriyo.....	38
Şekil 4.13. Çift katmanlı kültür ortamında gelişen embriyoların MS ortamına transfer ettikten sonraki bir görüntü.....	39
Şekil 4.14. Embriyodan kotiledon ve kök oluşumuna ait bir görüntü.....	39
Şekil 4.15. Sera koşullarında adaptasyonu sağlanmış biber bitkilerinden bir görüntü.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Biber bitkisinin sistematığı ve botanik sınıflandırması.....	1
Çizelge 1.2. Yeşil ve kırmızıbiberlerin taze ve pişmiş olarak içerdikleri besin maddeleri, vitamin ve mineral maddeler (A vitamini IU birimiyle verilmiştir.).....	2
Çizelge 1.3. Dünya biber üretimi (1000 Ton).....	3
Çizelge 1.4. Ülkemizde biber üretimi (1000 Ton)	3
Çizelge 3.1. Anter kültüründe kullanılan besin ortamının bileşimi.....	19
Çizelge 3.2. Shed mikrospor kültüründe kullanılan besin ortamı bileşimi.....	21
Çizelge 4.1. Tomurcuk gelişim aşamalarının büyüklüğü ve anter tomurcuklarının morfolojik özellikleri olmak üzere 5 grupta incelenmiştir ($\pm$ standart hata anlamına gelir)	28
Çizelge 4.2. Biber çeşitlerinin anter kültürü besin ortamına verdiği yanıtlar	32
Çizelge 4.3. Biber çeşitlerinin shed mikrospor kültürü besin ortamına verdiği yanıtlar.....	37

1.GİRİŞ

Türkiye sebze kültüründe çok eski yeri olan biberin anavatanı Meksika ve Orta Amerika'dır. Amerika keşfedildiği zaman Kızılderililer'in Meksika, Şili ve Peru civarında biber yetiştiriciliği yaptığı bilinmektedir. Çeşitli biber tür ve formların orijin merkezi Güney Amerika ve özellikle Brezilya'dır. Amerika keşfedildikten sonra ilk olarak biber yetiştiriciliği 1493 yılında İspanya'ya daha sonra 1548 yılında İngiltere'ye, 1578 yılında Orta Avrupa ve diğer Avrupa ülkelerine girmiştir. 16. yüzyıl da Osmanlı imparatorluğu döneminde ise önce İstanbul'a sonra diğer bölgelerimize yayılmıştır (Özalp 2010). Başka bir araştırmaya göre ise biber, Portekizler vasıtasıyla Orta Amerikaya'dan Hindistan'a oradan sonra da Arap yarımadasına getirilmiştir. İstanbul'a ise Bağdat ve Antakya üzerinden gelmiş, İstanbul'dan sonra ise 1515-1662 yılları arasında Rusya, Venedik ve Orta Avrupa'ya yayıldığı düşünülmektedir (Doğantan 1987; Demiray ve Tülek 2012).

Biber ülkemizde ve dünyada ekonomik açıdan önemli bir yere sahip olan bir sebze türüdür. *Capsicum* cinsi yaklaşık 30 türü bulundurmasına rağmen günümüzde bunlardan sadece 5 tanesinin (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*) kültürü yapılmaktadır (Greenleaf 1986; Taşkın 2005).

Bunlardan *Capsicum* türü içerisinde en çok tüketimi yapılan *Capsicum annuum* L. dir. *Capsicum* türlerinin kromozom sayısı $n=12$ ve diploiddir ($2n=2x=24$) (Taşkın 2005).

Çizelge 1.1'de görüldüğü gibi biber bitkiler aleminde kapalı tohumlular bölümü, iki çenekliler sınıfı, *Solanales* takımı ve domates, patates, patlıcan, tütün gibi ekonomik öneme sahip bitki çeşitleriyle aynı *Solanaceae* familyasında bulunur.

Çizelge 1.1. Biber bitkisinin sistematigi ve botanik sınıflandırması (Krishna 2003)

Alem	<i>Plantae</i> - Bitkiler
Bölüm	<i>Magnoliophyta</i> -Kapalı Tohumlular
Sınıf	<i>Magnoliopsida</i> - İki çenekliler
Takım	<i>Solanales</i>
Familya	<i>Solanaceae</i> - Patlıcangiller
Cins	<i>Capsicum</i> L.

Dünyada ekonomik açıdan önemli bir yere sahip olan biber, ülkemizde hem örtüaltında hem de açıkta yetiştiriciliği yapılan bir bitki türüdür. Kültürü yapılan biber türleri ılıman iklim bölgelerinde tek yıllık iken; tropik iklim bölgelerinde çok yıllık bir kültür bitkisidir. Ülkemizde tek yıllık olarak üretimi yapılan biber çeşitlerinin meyve şekli, tadı, rengi ve kullanım amacına göre sınıflandırılır.

Biber çeşitlerinin şekli; ince, kalın, oval, uzun, kısa, yassı, yuvarlak, silindir, küre, meyve tadı; acı, tatlı olabileceği gibi renkleri koyu yeşil, yeşil, açık yeşil, kırmızı, koyu kırmızı, sarı ve turuncu renkli olarak da ayırt edilen biber çeşitleri meyvesi yenen sebzeler arasında ve çok farklı şekillerde tüketimi yapılan sebzelerden birisidir. Biberi taze olarak tüketiminin yanı sıra yemeklerde, kızartmada ve işlenerek değerlendirilen, ticari potansiyele sahip önemli türler arasında yer almaktadır. Gıda sanayinde kullanılan biber; salça, konserve, baharat, dondurulmuş ürünlerde, turşu, acı sos, ketçap, boya ve acılığı veren ‘capsaicin’ antioksidant maddesi nedeniyle ilaç sanayinde de kullanılmaktadır (Aybak 2002; Bozokalfa ve Eşiyok 2010). Farklı amaçla tüketimi yapılan biber meyvesinin Çizelge 1.2’de besin maddesi içeriği verilmektedir.

Çizelge 1.2. Yeşil ve kırmızıbiberlerin taze ve pişmiş olarak içerdikleri besin maddeleri, vitamin ve mineral maddeler (Şalk vd. 2008) (A vitamini IU birimiyle verilmiştir)

Besin Maddeleri (g/100g)

	Kuru Madde	Enerji (Cal)	Su	Protein	Yağ	Toplam Şeker	Karbonhidratlar
Yeşil (Taze)	7-8	22	92-93	0,90-1,20	0,20-0,30	3,80	4,40
Yeşil (Pişmiş)	-	-	-	-	-	-	-
Kırmızı (Taze)	9	29	1	0,80-1,20	0,60-0,90		5,30-5,90

Vitaminler (g/100g)

	A(IU*)	B1	B2	Niacin	C
Yeşil (Taze)	530	0,06-0,07	0,02-0,04	0,40	120-160
Yeşil (Pişmiş)	420	0,06	0,07	0,50	96
Kırmızı (Taze)	220-5700	0,05-0,11	0,08-0,46	0,50-0,70	165-220

Çizelge 1.2.'nin devamı

Mineraller (g/100g)							
	Ca	Fe	M g	P	K	Na	S
Yeşil (Taze)	7-11	0,40	2- 13	22-25	-	-	19
Yeşil (Pişmiş)	9	0,50	-	16	149	9	-
Kırmızı (Taze)	4-13	0,30- 0,60	4- 13	20-30	-	-	-

Biber besin değeri bakımından yüksek bir sebzedir. Ayrıca yüksek miktarda C vitamini (103mg/100g) ihtiva etmektedir (IBPGR, 1983). Aynı zamanda fosfor, potasyum, sodyum, kalsiyum, magnezyum, demir, bakır, çinko ve bor gibi mineral maddeler açısından da zengindir (Rubio vd. 2002).

Dünyada yaygın olarak çok farklı şekilde tüketimi yapılan bitkisel ürünlerden biri olan biber ekonomik açıdan da önemli bir yere sahiptir. Türkiye, Çin ve Meksika'dan sonra 3. büyük biber üreticisi bir ülkedir (Çömlekçioğlu ve Ellialtıoğlu 2018). Dünya biber üretim miktarları Çizelge 1.3'te yıllara göre gösterilmektedir. Dünyada ortalama olarak 31,2 milyon ton civarında biber üretimi yapılmaktadır. Ülkemiz verilerine bakılacak olunursa Şekil 1.4'te görüldüğü gibi her yıl biber üretimi artmaktadır (Anonim 1,2).

Çizelge 1.3. Dünya biber üretimi (1000 Ton) (Anonim 1)

Ürün	2010	2011	2012	2013	2014
Biber (0709.60)	30,018	30,492	31,273	31,614	32,787

Çizelge 1.4. Ülkemizde biber üretimi (1000 Ton) (Anonim 2)

Ürün	2012	2013	2014	2015	2016
Biber	2,042	2,159	2,232	2,307	2,458

Ülkemizde ve bölgemizde biber yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmaktadır. Yetiştiriciliği anlamında en çok tercih edilen biber türleri ise sivri, kapy, dolma, çarliston, kurutmalık biberler, turşuluk biber, yerel biberler ve süs biberleridir. Sivri, kapy, çarliston ve dolmalık gibi geleneksel olarak yetiştiriciliği yapılan biber türlerinin yanında son yıllarda Macar dolma, Macar çarlı, Jalapeno, Chili, California Wonder gibi ihracat türlerinde üretimi yaygınlaşmaya başlamıştır.

Dünya nüfusunun hızla artması nedeniyle bitki bilimcileri insanların besin, ilaç ve bitkisel gereksinimlerini karşılamak için önemli bir yere sahip olan biyoteknolojik uygulamalarda çalışmaya başlamıştır. Günümüzde Dünya üzerinde 800 milyon insan yeteri kadar besin alamamakta ve 2030 yılına kadar Dünya nüfusunun 8 milyar civarında olacağı tahmin edildiğinden dolayı daha fazla besine ihtiyaç duyulacaktır. Bu nedenle bitki biyoteknolojisi yöntemlerini kullanarak verim ve kaliteyi artırmak, üretimi engelleyen hastalık, zararlı ve çevre faktörlerini azaltmak ya da yok etmek amaçlanmıştır. Bitki biyoteknolojisinde; bitkileri moleküler düzeyde iyileştirmek için önemli araçlara sahip olan çeşitli doku kültürü ve genetik mühendisliği teknikleri kullanılmıştır (Onay vd. 2012).

Bitki doku kültürü çalışmaları 1902 yılında Haberlandt'ın ileri sürdüğü hücre totipotency (bitki hücrelerindeki her şeye dönüşebilecek olan zigot hücrelerinin uygun besin ortamı, ışık ve sıcaklıkta gibi çevre koşulları sağlandığında ana bitkiye benzer bir bitki elde edilebilmek) kavramı ile başlamıştır ama ne yazık ki bu kavramı açıklayamamıştır. Fakat embriyo kesesi sıvısının hücre bölünmesine teşvik etmek için Hindistan cevizi sütünün kullanılmasını tavsiye etmesiyle embriyo kültürü üzerine çalışma yapılmasının önünü açmıştır (Purohit 2013). Doku kültürü, bitkilerden elde edilen doku (eksplant) parçalarının yapay besin ortamında yaşatma tekniğidir. Hücre ve dokuların bölünerek kök, gövde, yaprak, embriyo veya bitki elde edilebilir. Bitki doku kültürü; bitkilerin vejetatif olarak çoğaltılmasında, geliştirilmesinde, virüsten ari bitki elde edilmesinde ve ıslahında kullanılır (Onay vd. 2012).

Türkiye' de biber yetiştiriciliği hem açıkta hem de örtüaltında yaygın bir şekilde yapılmaktadır. Biber üretiminde verim ve kaliteyi; düşük-yüksek sıcaklıklar, hastalık ve zararlı gibi sorunlar olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle birim alandan alınan verimi arttırabilmek ve dayanıklı yeni çeşit geliştirmek için kullanılan klasik ıslah yöntemlerinde çok fazla zamana ve emeğe ihtiyaç vardır. Günümüzde bu süreyi kısaltmak ve kalıcı çözümler bulmak için doku kültürü teknikleri kullanılmaktadır. Islah çalışmalarında önemli bir yere sahip olan haploid bitki üretimi ise bu tekniklerden birisidir (Ellialtıoğlu vd. 2014). Haploid yöntemi; Islah süresini kısalttığı için sebze ıslahında büyük bir öneme sahiptir. Haploid bitki üretimi ile kendisiyle uyumsuz türlerde bile homozigot double haploid hatlar kısa sürede elde edilebilir. Homozigot hatlar klasik ıslah yöntemiyle de elde edilebilir fakat bu işlem açık tozlanan bitkilerde 10 ila 12 yıl, kendine tozlanan bitkilerde ise 6 ila 7 yıl sürer. Bu nedenle haploid yöntemleri kullanarak bu süre 1 veya 2 yıla düşürülebilir. Anter kültürü yöntemiyle haploid bitkiler ve homozigot diploid bitkiler birkaç ay içinde elde edilebilir. Homozigot bitkiler yeni çeşit geliştirebilmek için homozigot hatlar elde edebilmek çok önemlidir. Diploid bitkiler normal mayoz bölünme geçirir ve bölünme sonucunda istenilen özelliklerini kaybetmezler (Reinert ve Bajaj, 1977). Bu yöntemle; buğday, arpa, mısır, kolza, çeltik,

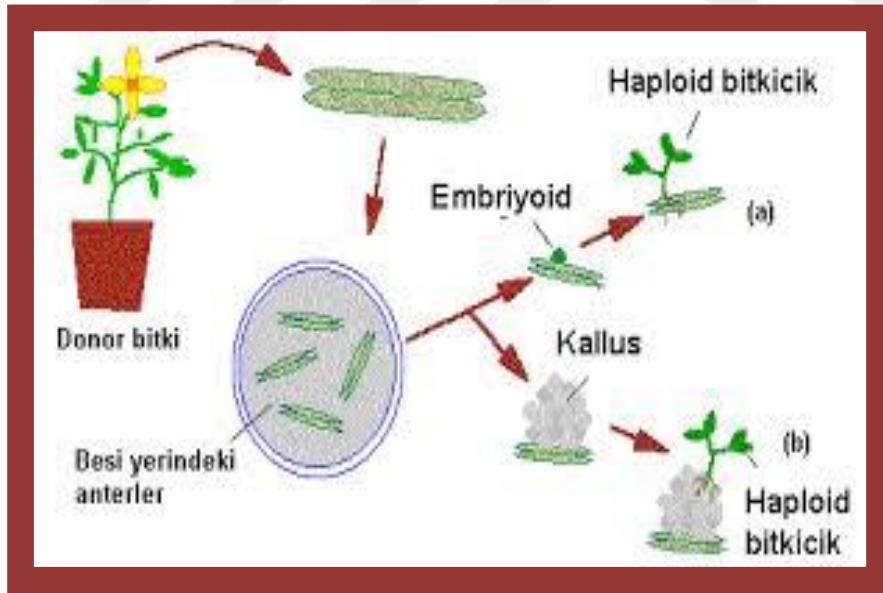
patlıcan, biber, gerbera, lahanagiller, kavun, karpuz, kabak, hıyar gibi birçok türde yaygın olarak kullanılır (Tuncer ve Yanmaz 2007).

Günümüzde haploid bitkilerin üretiminde

- 1) Anrogenik Yöntemler (Anter ve Mikrospor Kültürü)
- 2) Ginogenik Yöntemler (Yumurta (Ovül) ve Yumurtalık (Ovaryum))
- 3) Kromozom eliminizasyonu
- 4) Işınlanmış Polenle Tozlama yöntemleri kullanılmaktadır (Tuncer ve Yanmaz 2007).

Haploid bitki elde etmek için en çok tercih edilen ve kullanılan yöntem anter kültürü yöntemidir. Anter kültürü kullanmanın en önemli yanı anter içinde bulunan binlerce mikrospor sayesinde çok sayıda haploid bitki elde edilebilir (Çömlekçioğlu ve Ellialtıoğlu 2018). Anter kültürünün temeli erkek gamet hücresinin olgunlaşmasıyla elde edilen polen hücre gelişiminin engellenmesidir. Bu sebeple olgunlaşmamış polen hücreleri somatik hücrelere benzer embriyoları oluşturabilmek için uyartılır. Haploid bitkiler n kromozoma sahiptir bu nedenle verimli değildir. Haploid bitkiler bazen kendiliğinden bazen de kimyasal maddeler yardımıyla kromozom katlaması yapılarak kromozom sayısı iki katına çıkartılabilir (Taşkın vd. 2015).

Haploid elde etme yollarından biri olan androgenik yöntemler ise anter kültürü ve mikrospor kültürü olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Mikrospor yöntemi anter kültürüne alternatif olarak geliştirilmiş ve birçok türde başarılı olmuştur (Tuncer ve Yanmaz 2007).



Şekil 1.1. Anter kültürünün yapılışı (a) direkt *in vitro* androgenesis, (b) dolaylı *in vitro* androgenesis

Haploid bitki teknolojisinde, haploid veya double haploid (DH) bitki elde etmek için gamet hücrelerinin (erkek veya dişi) (androgenesis ve ginogenesis) kültürlenmesini içeren bir metod ya da döllendikten sonra bir ebeveyn genomunun

çıkarıldığı kromozomal eliminasyon yöntemlerinin kullanılmasıyla elde edilebilir. Haploidler, tek bir ebeveyinde kromozamlarını alır. Kromozom sayısını ikiye katlayarak, kendine uyumsuz türlerde bile aynı soydan melezleme ile çoğu generasyona aktarılır ve double haploide dönüşerek tamamen homozigot hatların hızlı şekilde üretilmesine neden olur (Çömlekçioğlu ve Ellialtıoğlu 2018).

Günümüze kadar androgenesis yöntemleriyle haploid bitki elde edilmesinde, donör bitkinin büyüme koşulları, donör bitkinin yaşı, genotip üzerine çalışmalar, biber tomurcuklarına ve anterlerine sıcaklık uygulamaları, polen tanesinin gelişme sahası, farkı kimyasallar ile besin ortamı bileşimi, büyüme odası koşulları, kültüre alınan anterlerin sayısal yoğunluğu, eksplantasyon ve anter duvarının aktivitesi üzerine araştırmalar yapılmıştır. Fakat bizim araştırmalarımıza göre farklı genotiplerin, farklı androgenesis yöntemlerine verdiği tepkiler üzerine yapılan çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır. Bu çalışmada ekonoimik açıdan öneme sahip biberde iki farklı çeşidin farklı iki androgenesis yöntemine verdiği tepki araştırılarak hangi androgenesis yönteminin hangi genotipte daha başarılı olacağı saptanılmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Anter Kültürü Yöntemi İle İlgili Önceki Çalışmalar

Anter kültürü yöntemi ile ilk *in vitro* haploid bitki 1964 yılında *Solanaceae* familyasında Guha ve Maheswary tarafından yapılan çalışma ile elde edilmiştir (Guha ve Maheswary 1964). Daha sonra bu yöntem birçok araştırmacı tarafından çeşitli ıslah çalışmalarını geliştirmek için kullanılmıştır (Kalloo 1986). Arpa, kolza, patlıcan türlerinde (Veilleux 1994) ve lahanagil, karpuz (Cao vd. 1995)'te double haploid bitki elde ederek yeni çeşit geliştirmek için çalışmalar yapılmıştır. Biber bitkisinden anter kültürü yöntemi ile ilk haploid bitki Wang ve vd. (1973) tarafından elde edilmiştir. Daha sonra (George ve Narayanswamy 1973; Kuo vd. 1973; Saccardo ve Devreux 1974; Novak 1974; Harn vd. 1975; Sibi vd. 1979; Dumas de Vaultx vd. 1981; Abak 1983; Morrison vd. 1986a; Mityko vd. 1995; Ochoa-Alejo ve Ramirez Malagon 2001) diğer araştırmacılar tarafından çalışmalar yürütülmüştür (Taşkın 2005; Taşkın vd. 2011).

In vitro koşullarda anrogenesisin başarısını etkileyen bazı faktörler çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bu faktörler; materyal alınan donör bitkilerin yaşı (Mityko vd. 1995), donör bitkinin yetiştirilme koşulları (Kristiansen ve Andersen, 1993), tomurcuk ve mikrosporların gelişim safhası (Saccardo ve Devreux 1974; Sibi vd. 1979; GonzalesMelendi vd 1995), besin ortamına alınan anterlere ön inkübasyon uygulaması (Dumas de Vaultx vd. 1981; Morrison vd. 1986b; Munyan vd. 1989), besin ortamlarının bileşimi (Novak 1974; Wang vd. 1981; Abak 1983; Vagera ve Havranek, 1985; Munyan vd. 1989; Dolcet-Sanjuan vd. 1997; Gyulai vd. 2000) ve genotipler (Wang vd. 1981; Abak 1983; Morrison vd. 1986b; Mityko vd. 1995; Dolcet-Sanjuan ve vd. 1997; Ochoa-Alejo ve Ramirez Malagon, 2001) olduğunu bildirmişlerdir (Çağlar vd. 2004).

Özkum Çiner ve Tıpırdamaz (2002) yaptıkları bir çalışmada *Capsicum annuum* L. tomurcuklarına soğuk ve aktif kömür uygulaması yaparak embriyo oluşturma üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Soğuk uygulamasında 48 ve 96 saat +4 °C' de ön uygulama yapılmıştır, anter kültürü besin ortamına ise % 0,25 aktif kömür ilave edilmiştir. Bu çalışmada temel besin ortamı olan MS (Murashige ve Skoog 1962)'in içine %0,8 agar +%3 sukroz +1 mg/l NAA ve 4 mg/l BA veya 4 mg/l NAA +1 mg/l BA, eklenerek oluşturulan besin ortamlarından en yüksek embriyo oluşumunu 4 mg/l NAA +1 mg/l BA eklenerek oluşturulan besin ortamından elde edilmiştir. Aktif kömür içeren fakat ön uygulama yapılmayan kontrol grubundan ise %12,5 androgenik embriyo elde edilmiştir. Besin ortamına eklenen büyüme düzenleyicilerin, soğuk ön uygulamalara göre daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada diğer bir araştırma ise biber genotiplerinin mikrospor gelişim aşamalarıdır. Asetokarmin ezme yöntemi ve parafin metodu kullanılarak sitolojik incelemeler yapılmış ve tomurcuk büyüklükleri, tomurcuk ve anter morfolojileri tanımlanmış ve mikrospor gelişim aşamaları belirlenmiştir. Korolla seviyesinin kaliks ile aynı veya biraz daha uzun olduğu gelişme döneminde, çapı 5 mm ve uzunluğu 7 mm olan biber çiçek tomurcuklarının tek çekirdekli ve 1. polen mitozu aşamasındaki mikrosporları içerdiğini saptanmıştır.

Çağlar vd. (2004)'nin çalışmalarında Kahramanmaraş kırmızı biberlerinde (*Capsicum annuum* L.) *in vitro* koşullarda haploid bitki elde etmek için MS besin ortamına 100 mg/l myo-inositol +30 g/l sakkaroz +8 g/l agar ve bitki büyüme düzenleyicilerden oksin NAA (2,0, 4,0, 6,0 mg/l) ve 2,4-D (1,0, 2,0, 3,0, 4,0 mg/l) sitokin

BAP (0,1, 1,0, 2,0, 3,0 mg/l) ve kinetin (0,1, 1,0, 5,0 mg/l) farklı miktarlarda eklenerek besin ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan bu besin ortamlarına tek çekirdekli polen aşamasındaki biber tomurcukları ekilerek farklı ön sıcaklık uygulaması ile + 4 °C, +29 °C ve +35 °C olmak üzere 7 gün karanlık ortamda bekletilmiş ve ön uygulama yapılmayanlarla birlikte 4 farklı sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Ayrıca besin ortamına AgNO₃ (10 mg/l) ve aktif kömür (% 0,25) eklenerek denemişlerdir. Bu çalışmada anterlerin ekildiği besin ortamlarına farklı miktarlarda oksin, sitokinin, kinetin, AgNO₃ ve aktif kömür eklenerek ve değişik ön sıcaklık uygulamalarıyla toplamda 37 uygulama yapılmıştır. Bu çalışmada toplam 9750 anter besin ortamına alınmış ve bazı besin ortamlarında sadece kallus gelişimi gözlenmiştir. MS + 0,1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + % 0,25 aktif kömür + 10 mg/l AgNO₃ bileşenli ortama ekilen anterlerden kallus gelişimi gözlenmeden %2,8 oranında embriyo gelişimi olduğu belirlenmiştir.

Büyükalaca vd. (2004)'nın yaptıkları çalışmada, biber anterlerinden haploid bitki üretebilmek için yerel bir kırmızı biber popülasyonundan seçilen iki genotip U-247 ve U-238 bitki materyalleri kullanılmıştır. Bu çalışmanın asıl amacı farklı oranlarda gümüş nitrat konsantrasyonunu belirlenmesi iken; donör ve genotipin bitki yetiştirme koşullarına bağlı olarak verdiği tepkilerde gözlemlenmiştir. Biber çiçek tomurcukları seradan ve açık tarlada yetiştirilen bitki materyallerinden toplanmıştır. Çiçek tomurcukları MS ortamı 30 g/l sukroz + %2,5 aktif kömür +4 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP ve farklı miktarlarda (5, 10, 15 ve 20 mg/l) AgNO₃ eklenerek oluşturulan 4 farklı ortama alınmıştır. Ortama alınan anterler +35 °C karanlık inkübasyon koşullarında 2 gün bekletilmiş ardından +28 °C'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık beyaz florasanlı büyüme odasına yerleştirilmiştir. İlk embriyolar ekim işlemi yapıldıktan 5 hafta sonra elde edilmiş ama 6. ve 7. haftalarda ise yoğun embriyo oluşumu gözlemlenmiştir. Oluşan embriyolar hormonsuz MS ortamına transfer edilmiş ve 4 hafta sonra olgun embriyolarda bitki gelişimi gözlemlenmiştir. Haploid embriyolar ise farklı üretim miktarlarıyla tüm besin ortamlarından elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda donör bitkinin yetiştirme koşulları ve genotipi anter kültürünün başarısını önemli derecede etkilediğini ortaya koyulmuştur. En yüksek üretim miktarı ise 15 mg/l gümüş nitrat içeren besin ortamından 100 anter başına %45,7 embriyo oranıyla U-247 genotipinden elde edilmiştir.

Sayılır ve Özzambak (2005) yaptıkları bir çalışmada Ege acı sivrisi, Demre acı sivrisi, Kandil dolma, Çarliston bağcı, Tatlı sivri kıl ve Acı sivri ılıca-256 olmak üzere altı tane biber çeşidi kullanılmıştır. Bu çeşitlerden elde edilen biber çiçek tomurcukları üç farklı boyda sınıflandırılmıştır. En uygun anterler ise 5-6 mm'deki çiçek tomurcuklarından alınmıştır. Biber tomurcuklarından ayrılan anterler temel besin ortamı MS (Murashige ve Skoog 1962) and NN (Nitsch and Nitsch 1969) besin ortamı içerisine ilave edilen 4 mg/L NAA+ 0,1 mg/L BA, aktif kömür ve havuç ekstratının farklı kombinasyonlarıyla oluşturulan altı besin ortamı içerisine yerleştirilmiştir. En iyi sonuç temel besin ortamı MS + 4 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA eklenerek oluşturulan Çarliston Bağcı çeşidinden elde edilmişken NN + 4 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA + %0,1 aktif kömür + 200 ml havuç ekstraktı içeren besin ortamı da iyi sonuç vermiştir.

Taşkın vd. (2011)'nin yaptıkları çalışmada beş biber genotipi (A71, A269, A313, A109 ve A74) ile 4 farklı besin ortamında denemişlerdir. Anterler farklı dönemlerde kültüre alınarak en iyi embriyo üretim zamanı belirlemişlerdir. Deneme yapılan kültür ortamında gelişimini tamamlayamayan embriyolar 0,5 mg/l-1 absisik asit

içeren bir ortam içerisinde 10 gün boyunca bekletilmiş fakat olgun embriyolar üzerinde olumlu bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Denemeye alınan embriyoların çoğu üçüncü ortamda (MS, +4 mg/l NAA +1 mg/l BAP + %0,25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 30 g/l sukroz) gelişmesine rağmen; en iyi sonuç ise 2700 anterden elde edilen 60 adet embriyo ile 4.besin ortamından (MS + %0,25 aktif kömür +15 mg/l AgNO₃ +4 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP ve 0,5 mg/l ABA) elde edilmiştir. Biber genotiplerinden düşük sıcaklığa toleranslı A 269'dan en yüksek embriyo verimi elde edilmiştir. Nisan-mayıs arası kültür ortamına alınan anterler, diğer dönemlerle kıyaslandığında en yüksek embriyo oluşumu gözlenmiştir fakat soğuk toleranslı biber genotipi A313 ise kasım- aralık aylarında diğer genotiplere oranla daha yüksek embriyo elde edilmiştir. Genotip, anter ekim dönemi, besin ortamının ve donör bitkinin büyüme koşulları embriyo gelişimini etkilediği bu çalışmanın sonucunda tespit edilmiştir.

Ercan ve Şensoy (2011) anter kültürü yöntemini kullanarak 11 farklı biber türünde (4 longy, 2 dolmalık biber, 2 kapyra biber, 2 uzun yeşilbiber, 1 kırmızıbiber) genotipinlerin verdiği tepkiler üzerine bir çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada biber çiçek tomurcukları taç yaprak (corolla) ve çanak yaprak (kaliks) aynı uzunlukta veya taç yaprak biraz daha uzun olacak şekilde toplanmıştır. Toplanan biber çiçek tomurcukları +4 °C'de 24 saat karanlık ortamda tutulduktan sonra 8 g/l agar ve 30 g/l sukroz ilave edilerek hazırlanan MS kültür ortamına yerleştirilmiştir. Kültür ortamına ekim işlemi yapılan anterler daha sonra +35 °C'de 8 gün kuluçka koşullarında bekletilmiş ardından 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ve +25 °C 3000 lux ışık yoğunluğu olan büyüme odasına transfer edilmiştir. *In vitro* koşullarda 11 genotipten 2398 anter ekilmiş ve toplamda 44 embriyo elde edilmiştir. Elde edilen embriyoların 12 tanesi gelişim göstermiş ve toprağa ekim işlemi yapılmıştır. İki tane çeşitten Yalova Charleston (uzun yeşil tip) ve Kandil (çan tip) embriyo elde edilememiştir. Genotip olarak en iyi androjenik tepkiyi veren ise Sera Demre 8 (longy tipi) ve Odesa (çan tipi) çeşitlerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda biber genotipinin androjenetik tepki üzerinde güçlü bir etkisi olduğu belirlenmiştir.

Ellialtıoğlu vd. (2014) yaptıkları bir araştırmada 1 adet Suriye'de yetiştiriciliği yapılan biber çeşidi (Alfajer) ve 3 farklı biber genotipinin (B, 151 ve 171 no'lu ıslah hatları) farklı besin ortamlarında genotipe etkisi incelenmiştir. Bu amaçla Dumas de Vaulx vd. (1981) tarafından önerilen MS besin ortamı kullanılarak oluşturulan 8 farklı C serisi (C1-C8) kombinasyonu ve 8 farklı B serisi (B1-B8) kombinasyonu olmak üzere 16 farklı besin ortamı kombinasyonunda genotipler incelenmiştir. Genotip bazında değerlendirme incelenirken; ortama alınan anter sayısı, gelişerek transfer ortamına aktarılan anter sayısı, embriyogenik anter sayısı, embriyo sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları belirlenmiştir. C serisinde 2,4-D ve kinetin içeren besin ortamlarında Alfajer ve B hattı biber genotiplerinin daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir. MS ortamına eklenen NAA +BAP içeren B serisi besin ortamlarında ise 151 ve 171 no'lu yerel genotiplerden de başarılı sonuçlar alınmıştır. Besin ortamına eklenen %0,25 oranında aktif kömür ise genotipe bağlı olarak embriyo oluşumunu artırmıştır. En yüksek embriyo oluşumu gümüş nitrat içermeyen B5 ortamından elde edilmiştir. B5 ortamından sonra embriyo oluşumunu C6, B3, B2, B7 besin ortamları takip etmiştir. B3 ortamı hariç elde edilen embriyoların hepsi bitkiye dönüşmüştür. 151 ve 171 no'lu yerel genotiplere göre Alfajer ve B hattı biber genotiplerinde daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmada

anterin gelişme oranlarının yüksek olduğu tespit edilmiş bu nedenle anterlerin alınma zamanlarının doğru olduğu düşünülmüştür. Biber çiçek tomurcuklarında taç ve çanak yaprakların eşit veya taç yaprakların çanak yapracıklarından biraz daha uzun olduğu ve anterlerde yaklaşık yarısına kadar antosiyan görüldüğü dönemin I. mitoz aşamasında olduğu belirlenmiştir (Chambonnet 1988). Embriyolardan gelişen bitkilerin ploidi seviyesine bakıldığında %94'dü haploid kromozom yapısına sahip olduğu saptanmıştır.

Taşkın vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada biber genotipi olarak altı dolma, yedi çarliston, yedi yeşilbiber ve sekiz kapy a biber kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan besin ortamı, MS ortamı içerisine +4 mg/l naftalenasetik asit (NAA) +0,5 mg/l 6-benzilaminopurin (BAP) +15 mg/l gümüş nitrat (AgNO_3) + %0,25 g/l aktif kömür ve 30 g/l sükröz ilave edilerek hazırlanmıştır. Anter kültürü yöntemiyle elde edilen bitkilerin ploidi seviyeleri flow sitometri ve basit sekans tekrarı (SSR) markörlerinin her ikisine birden bakılarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda farklı biber çeşitlerinden elde edilen bitkilerde kendiliğinden oluşan double haploid bitki oranları farklılık göstermiştir. Kendiliğinden kromozom katlanmasıyla oluşan double haploid bitkiler ortalama %53,4 oranıyla en fazla dolmalık biber genotiplerinde elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer genotiplerde kendiliğinden oluşan kromozom katlanması çarliston biber çeşitlerinde ortalama %31,9'ken kapy a biber çeşitlerinde ortalama % 30,4 oranında olduğu belirlenmiştir. En düşük kendiliğinden oluşan double haploid bitki ise %22,2 oranıyla yeşilbiberlerden elde edilmiştir. Kendiliğinden double haploid oluşturmamayan haploid bitkilere kolhisin uygulaması yapılarak double haploid bitkiler elde edilmiştir.

2.2. Shed Mikrospor Kültürü İle İlgili Önceki Çalışmalar

Double haploid bitki elde edebilmek için anter kültürü ve mikrospor kültür yöntemleri 1973 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Kim vd. (2013) tarafından geliştirilen iki aşamalı mikrospor kültür yönteminde, anterlerden mekanik olarak ayrılan mikrosporların iyi gelişim gösterdiği belirlenmiştir. İki aşamalı mikrospor kültürünün dezavantajları ise; iş gücü ve hassasiyetin artması, karmaşık laboratuvar malzemeleri ve hastalık bulaşma riskinin yüksek olması laboratuvar çalışmalarının kolay yürütülmesini sınırlamaktadır. Bu sebeple; mikrospor yöntemi ile daha kolay DH bitki elde edebilmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları, tütün (Sunderland ve Roberts 1979), kolza (Lichter 1981), patates (Uhrig 1985) ve arpa (Ziauddin vd. 1990) tarafından yürütülmüştür. Anter ve mikrospor kültürü arasında bir alt kültür olarak kabul edilen shed mikrospor kültürü son yıllarda önem kazanmıştır. Shed mikrospor yöntemi Ziauddin vd. (1990) tarafından arpa bitkisi üzerinde bir çalışma yapılmış, daha sonra ise Supena (2006a,b) tarafından yapılan biber çalışması ile bu yöntem değiştirilmiştir. Shed mikrospor yöntemi kolay uygulanabilir olması ve double haploid bitki verimliliğini artırması nedeniyle androgenesis teknikleri arasına girmiştir. Shed mikrospor kültürü alt katmanı katı, üst katmanı ise sıvı olan iki katmanlı anter kültürü yöntemidir. Bu yöntemde anter loblarının çatlaması ile mikrosporlar kültür ortamı içerisinde dağılır ve mikrospor kültüründe olduğu gibi shed mikrospor kültüründe de mikrosporlar sıvı katman içinde geliştiği belirlenmiştir (Arı 2016a; Çömlekçioğlu 2018).

Ziauddin vd. (1990) tarafından mikrospor yöntemi kullanılarak Igri arpa çeşidinden elde edilen yeşil bitkilerin hızlı bir şekilde yenilenmesi üzerine bir çalışma

yapılmıştır. 0,3 M mannitol kullanılarak (Arpa çeşitlerinde mekanik olarak izole edilen mikrosporlardan cevap alabilmek için ıslatılıp yumuşatmak ve izalasyon yapma işlemi) Igri arpa çeşidi yetiştirilebilir. Bu çalışmada donör bitkiden alınan materyaller 25 gün gibi kısa sürede shed mikrospor kültür yöntemi kullanılarak yeni bitkiler elde edilmiştir. Arpa başaklarına 3-4 gün mannitolde ön uygulama yapmak yerine 28 gün soğukta ön uygulama yapılabilir. Shed mikrospor yöntemi ile 100 anterden %91 ortalama ile 292 yeşil bitki üretilmiş ve elde edilen bitkilerin yaklaşık %80'ni kendiliğinden double haploid bitkiye dönüşmüştür.

Gawel ve Robacker (1990) yaptıkları bir araştırmada embriyo çoğalma ortamlarını karşılaştırmak için iki pamuk genotipi Coker 312 ve T 25 incelenmiştir. İncelemeye alınan genenotiplerde kallus gelişimi sağlanabilmesi için yarı katı ve sıvı iki tane kültür ortamı kullanılmıştır. Kullanılan kültür ortamlarından birinsici MS içerisine +4,0 mg/l NAA +1,0 mg/l kinetin, ikinci ortama ise MS içerisine + 0,1 mg/l 2,4 D +0,1 mg/l kinetin eklenerek oluşturulmuştur. Kültür ortamlarına ekim işlemi yapıldıktan altı hafta sonra her bir eksplantan oluşan kalluslar çıkartılarak ikiye ayrılmış. Ayırma işlemi yapılan kallusların bir bölümü yarı katı çoğaltım ortamı içerisine diğer bir bölümü ise sıvı çoğaltım ortamının içerisine (%0,2 Gelrite) yerleştirilmiştir. Ekim işlemi yapıldıktan 8 hafta sonra yapılan sayımda kallus oluşturan ekplantların sayısı genotip ve başlangıç ortamından etkilendiği gözlemlenmiştir. Varyans oluşturma analizine göre kallusun başladığı ortam, yarı katı ve sıvı çoğaltım ortamı ve başlangıç ortamında genotipin etkisi önemli değişkenlik göstermiştir. T-testleri eşleştirildiğinde sıvı çoğaltım ortamında 227,3 embriyo, yarı katı çoğaltım ortamında ise 134,6 embriyo elde edilmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda sıvı çoğaltım ortamında daha fazla embriyo elde edildiği saptanmıştır.

Supena vd. (2006a) araştırmalarında shed mikrospor kültürü ile double haploid bitki elde edebilmek için yedi adet Endonezya acı biber (*Capsicum annuum* L.) genotipi kullanılmıştır. Kullanılan genotiplerden başarılı sonuçlar alınabilmesi için üç farklı faktör incelenmiştir. İlk olarak kültür ortamına ilave edilen 200 mg/l antibiyotik timentin ve 10 mg/l rifampisin kombinasyonunun etkisi incelenmiş ve inceleme sonucunda donör bitkiden alınan eksplantlarda bakteriyel kontaminasyonu engellenmiş olduğu saptanmıştır. İncelenen ikinci faktörde; double haploid bitkilerin miktarını artırabilmek amaçlanmış bu nedenle *in vitro* koşullarda kültür ortamına alındıktan bir hafta sonra besin ortamı içerisine 100 µM kolhisin ilave edilmiştir. Besin ortamı içerisine ilave edilen kolhisinin DH bitki oluşumunda başarılığı olduğu saptanmıştır. İncelenen üçüncü bir faktörde; ilk prosedürden elde edilen bitkilerin yapraklarında nuklear DNA içeriği incelenmesi için yaprak stomalarına ve flow sitometri ölçüm yöntemleri kullanılmıştır. Kullanılan bu yöntemler ile kolay ve güvenilir bir şekilde ploidi seviyesi saptanılmıştır.

Supena vd. (2006b) yaptıkları bir araştırmada anter ve mikrospor kültür yöntemleri kullanılarak Endonezya acı biber (*Capsicum annuum* L.) genotipinden double haploid bitkiler elde edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmanın ilk denemesinde 4 farklı yöntemi denenmiştir. İlk denemede kullanılan Dumas de Vault (1981) yöntemi üzerinde çalışılan 7 genotipten sadece bir tanesinin duyarlı olduğu belirlenmiştir. Denemede kullanılan diğer kültür yöntemlerinden Touraev ve Heberle-Bors (1999) kültürü, Johansson (1982)'nin anter kültürü yöntemine göre daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Johansson (1982) yönteminde denen 4 genotipin hepsi Dolcet-Sanjuan (1997)

yöntemine daha duyarlı olduğu belirlenmiş bu nedenle Dolcet-Sanjuan (1997) yöntemi daha ayrıntılı olarak incelenmiştir. Dolcet-Sanjuan (1997) yönteminde 1 gün boyunca +4 °C’de ön uygulama yapılan tomurcuklar ile ön uygulama yapılmayan tomurcuklar üzerine etkisini araştırmıştır. Toplam embriyo ve normal görünümlü embriyo verimini arttırmak için değişik miktarlarda aktif kömür konsantrasyonu katı besin ortamına eklenerek deneme kurulmuştur. Başka bir uygulama ise değişik miktarlarda zeatin ve IAA uygulayarak etkisi gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda geliştirilen shed mikrospor yöntemi ile biber genomlarından elde edilen haploid bitkiler, önceki yapılan araştırmalara göre daha fazla miktarda elde edilmiştir. Bu araştırmada %50’den daha geç tek hücreli mikrospor içeren tomurcuklar seçilmiş ve 1 gün 4 °C ön uygulama işlemi yapıldıktan sonra çift katlı ortama alınarak karanlıkta 1 hafta 9 °C’de bekletilmiş, daha sonra ise 28 °C karanlık ortamda tutulmaya devam edilmiştir. Çift katlı besin ortamını yarısı katı ve yarısı sıvı ortamdaki oluşturulmuştur. Katı ortam Nitsch ortamının içrisine %2 maltoz ve %1 aktif kömür eklenerek oluşturulmuşken, sıvı ortam 2,5 µM zeatin ve 5 µM IAA eklenerek oluşturulmuştur. Test edilen on acı biber genotipinin tümü shed mikrospor kültürüne yanıt verdiği tespit edilmiştir. Bu araştırma sonucunda shed mikrospor yöntemi kullanılarak acı biber ıslahında DH bitki elde edilebileceği saptanmıştır.

Kim vd (2008) bu çalışmada acı biberde mikrospor kültürü kullanılarak embriyo üretimi ve bitki yenilenme sıklığı belirtilmiştir. Mikrospor yönteminde kullanılan NLN ortamı modifiye edilerek NLNS ortamı elde edilmiştir. NLNS ortamında kültüre alındıktan üç hafta sonra globüler ve kalp şeklinde embriyolar elde edilmiştir. Globüler ve kalp şeklindeki embriyoların çoğu kültüre alındıktan dört hafta sonra kotiledon aşamasına ulaşmıştır. Bu kotiledon aşamasına ulaşmış embriyolar ise B5 katı bazal ortama aktarıldıktan sonra küçük bitkiler geliştirilmiştir. Embriyo üretimi için ön uygulama ortamı, karbon kaynakları ve kültür yoğunlukları değiştirilerek koşullar optimize edilmiştir. B5 ortamına göre sükroz açlık ortamında sıcak şoku uygulamasının daha etkili olduğu belirlenmiştir. Karbon kaynağı olarak sükroz ve maltozun karşılaştırılmasında, sükrozun maltoza göre daha iyi olduğu ortaya çıkmış ve en yüksek embriyo üretim %9 ile sükrozdan elde edilmiştir. Mikrospor ekim yoğunluğunun embriyonik başlama ve gelişme yoğunluğu üzerine etkisinin kritik olduğu belirlenmiş ve optimal ekim yoğunluğu ise $8 \times 10^4 - 10 \times 10^4/\text{ml}$ olarak saptanmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar her bir petri kabına yerleştirilen 10×10^4 yoğunluğundaki mikrosporlar gelişim göstererek 54’ün üzerinde embriyo elde edilmiş ve %5,5 ‘inin kotiledon aşamasına ulaştığı belirlenmiştir.

Supena ve Custers (2011) yaptıkları çalışmada shed mikrospor yöntemi kullanılarak acı biberden elde edilen normal görünümlü embriyoların %20’sinin verimlilik problemi çözmeyi amaçlamışlardır. Bu problem sadece shed mikrospor yönteminde değil diğer androjenik yöntemlerde de etkilidir. Bu sebeple normal görünümlü embriyoların verimliliğini artırmak için bu protokol üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmaların neticesinde shed mikrospor yöntemindeki sıvı üst katmana ilave edilen 2,5 µM zeatin ve 5 µM IAA sayesinde %50’den daha fazla normal görünümlü embriyoların verimliliğini etkilemiştir. Verimliliği etkileyen diğer bir faktör ise kültüre alındıktan 3 hafta sonra inkübasyon sıcaklığını +28 °C’den +21 °C’ye düşürerek sağlanmıştır. Shed mikrospor yönteminde katı besin ortamına eklenen %1 oranındaki aktif kömür toplam embriyo üretimini olumlu yönde etkilerken, absisik asit

ve arttırılan ozmolalite embriyo üretimi olumsuz etkilemiştir. Donör bitkideki anterler gibi double hatların kullanılması değişkenliği azaltmış ve uygulanan işlem ise istatistiksel analiz verilerini arttırmıştır. Rafine protokolü ile normal görünümlü emriyolarından daha yüksek oranda elde edilmektedir.

Cheng vd. (2013) tek generasyon ile haploid hat üretebilmek için ıslahçılar tarafında androgenesis yöntemini kullanarak double haploid bitki elde etmişlerdir. Androgenesis yöntemiyle izole edilen mikrospor kültüründen de elde edilebilir ancak embriyogenesis oluşumunda verimin çok düşük olduğu gözlemlenmektedir. Biberde embriyogenesis yöntemini geliştirmek için bu çalışmada farklı biber genotiplerinde mikrospor embriyogenesisin farklılıklarını ve ön işlem ortamındaki büyüme düzenliyecilerin ve aktif kömürün embriyogenesisin başlangıcındaki etkisini gözlemlenmiştir. Bu çalışmada elli biber genotipi gözlemlenmiştir. Farklı genotiplerde en yüksek gelişen mikrospor %29,56 oranı ile 36. genotipte, en düşük gelişen mikrospor %3,11 oranıyla 26. genotipte olduğu belirlenmiştir. Ortalama gelişen mikrospor oranı ise %13,13'tür. $L_9 (3^3)$ orthogonal testinden elde edilen istatistiksel sonuca göre BA seviyesindeki değişiklik mikrospor gelişim oranını çok önemli oranda değiştirmiştir. Bu denemede en iyi besin ortamı 0 mg/l (BA) +0,2 mg/l (NAA) ve 0,5 mg/l (KİN) eklenerek oluşturulmuştur. Düşük embriyogenesis elde edilen farklı genotiplerin besin ortamına %0,05 oranında (AC) kullanıldığında mikrospor kültüründe embriyo oluşumunu önemli ölçüde etkilediği gözlemlenmiştir.

Kim vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada acı biberden ayrılan mikrosporların gelişim göstererek oluşturdukları embriyolardan kotiledon üretebilmek için etkili bir kültür sistemi geliştirilmiş ve elde edilen yeni bitkilerin ploidi seviyeleri incelenmiştir. Araştırmacılar sıvı, çift katmanlı ve iki aşamalı kültür sistemi olmak üzere üç protokol üzerinde çalışma yapmışlardır. Çift katmanlı kültürde aynı ortam bileşenleriyle oluşturulan sıvı katman üste, katı katman altta olarak oluşturulan kültürde ise kotiledonlu embriyolar daha verimli bir şekilde elde edilmiştir. İlk olarak sıvı ortam üzerinde gelişen mikrosporlar daha sonra çift katmanlı ortamda alt kültüre alınarak oluşturulan iki aşamalı sistemde kotiledonlu embriyoların üretilmesi en etkili yöntem olmuştur. Mikrosporlar izole edildikten sonra 60 x 15 mm petri içine $8-10 \times 10^4$ /ml yoğunluğunda olacak şekilde bir hafta boyunca sıvı ortam içinde kültüre alınmış ve iki sıvı kültür içerisindeki mikrospor süspansiyonları 100 x 20 mm'lik petri içerisinde birleştirilerek katı ortam içerisine yerleştirilmiştir. Katı ortam içerisinde 3 hafta muhafaza edildikten sonra daha verimli kotiledonlu embriyo elde edildiği gözlenmiştir. İki aşamalı kültür embriyolarından oluşan kotiledonlu embriyolar rejenerasyon ortamına transfer edildiğinde % 95'ten daha fazlası bitkiye dönüşmüştür. Bu çalışmada analiz edilen 190 bitkiden sadece %16,3'ü 31'i iki aşamalı kültür sistemi kullanılarak üretilmiştir. İki aşamalı kültür sistemi diğer protokollere göre en iyi performans göstermiştir.

Arı vd. (2016a) yürüttükleri çalışmada süs biberlerinin çok amaçlı ve peyzaj alanında kullanılması bu konu üzerine ıslah çalışmalarının artmasına neden olduğunu bildirmiştir. Fakat literatür taramasında haploidle ilgili bilgiler sınırlı sayıda olduğu gözlemlenmektedir. İlk olarak bu çalışmada antosiyanin bulunan ve bulunmayan iki süs biberi genotipinden haploid için uygun mikrospor içeren süs biberi tomurcuklarını çalışmayı hızlandırmak için morfolojik ve sitolojik olarak belirlenmiştir. İkinci olarak ise sonbahar döneminde shed mikrospor kültüründe 64 genotipin anrojenik tepkileri

belirlenmiştir. DAPI boyama sonuçlarına göre tam antosiyaninli genotiplerde (% 70-80) , yeşil görünümlü genotiplerde (% 70-85) olan kaliks / tomurcuk oranı uygun süs biberi tomurcuk seçimi için önemli bir morfolojik belirteç olarak kullanılabilir. Bu çalışmadaki 64 genotipten 48 tanesi shed mikrospor kültürü çalışmasına cevap vermiş ve bu genotiplerden farklı oranlarda embriyo elde edilmiş. Çiçek tomurcuğu başına toplam embriyoların en yüksek ortalama verim 12,7'ken normal görünümlü embriyonun en yüksek ortalama verimi 1,48 olarak gözlemlenmiştir. Ticari çeşitlerdeki genotiplerin, yerel genotiplere kıyasla tomurcuk başına daha fazla embriyo ürettiği ve üretilen toplam 2406 embriyonun 297 tanesi ortalama %12,34'lük oranıyla radikal, hipokotil ve iki kotiledondan oluşan normal görünümlü embriyolar oluşturmuştur. Fakat proembriyolar, globüler embriyolar veya üretilen embriyolar normal büyümelerine devam etmiş olsaydı bu oranın daha yüksek olacağı düşünülmektedir. 297 normal görünümlü embriyonun ise 263 tanesi çimlenme ortamına aktarılmış, bunlar arasından gerçek yaprak ve kök oluşturarak toplamda 132 embriyo çimlendirilmiştir. Çimlenen embriyoların büyümesi beklenildiği gibi gerçekleşmemiş sadece birkaç tanesi iklimlendirme aşamasına alınmış diğerleri ise büyümeyi durdurmuş ve kahverengiye dönüştüğü gözlemlenmiştir. Bu çalışmada shed mikrospor kültürü ile sonbaharda elde edilen embriyo sonuçları süs biberi genotiplerinde double haploid (DH) bitki üretimi için başarıyla kullanılabileceği belirlenmiştir.

Arı vd. (2016b)'nin bildirdiğine göre biber (*Capsicum annuum* L.) ıslahında yeni çeşitlerin geliştirilmesi için doubled haploid (DH) bitki üretimi önemli bir yere sahiptir. Fakat dekoratif amaçla kullanılan biber genotiplerinde DH bitki üretimi için yeterli bilgi yoktur. Bu çalışmanın amacı double haploid süs biberi hatları üretmektir. Üç androgenesis protokolünde en etkili yöntemi belirlemek için. F₂ veya F₃ üretimindeki 48 genotipin androjenik tepkileri iki yarı katı besin ortamı olarak MS, B5 ve shed mikrospor kültürü olmak üzere anterler üç protokolde karşılaştırılmıştır. Shed mikrospor kültürünün diğer iki yarı katı ortama göre daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Shed-mikrospor kültürü, normal görünümlü ve toplam embriyoların üretiminde diğer iki yarı katı ortamdan daha üstün olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen 18.578 embriyonun 5.587 tanesi normal görünümlü embriyo oluşturmuştur. Gelişim gösteren normal görünümlü embriyolardan 204 tanesi *in vitro* ortamda çimlendirilmiş ve iklimlendirme işlemi yapılmıştır. İklimlendirme işlemi yapıldıktan sonra % 59,8'lik oranla 63 double haploid, 52 haploid ve 7 mixoploid olmak üzere 16 genotipten toplamda 122 adet süs biberi bitkisi elde edilmiştir. Flow sitometri analizinde spontan double haploid oranı %51,6 olarak gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda shed mikrospor kültürünün süs biberi double haploid çalışmalarında etkili bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.

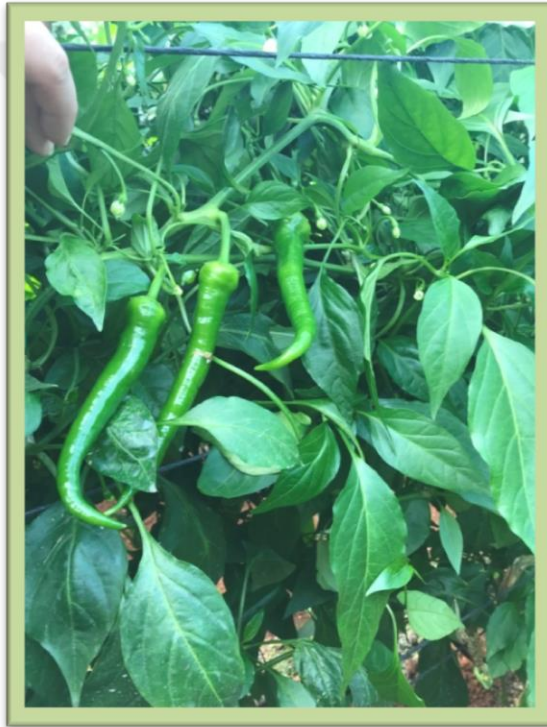
3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma 2018-2019 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Seraları ve Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Bitkisel materyal olarak aşağıda özellikleri verilen iki adet F₁ biber çeşidi kullanılmıştır.

3.1 Materyal

3.1.1. Denemede kullanılan biber genotiplerinin özellikleri

Bu araştırmada bitkisel materyal olarak 2 tane F₁ biber çeşidi Lumbard RZ F₁ (37-04) ve Üçburun F₁ kullanılmıştır. Denemede kullanılan biber F₁ çeşitleri Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Seralarında yetiştirilmiştir.



Şekil 3.1. Serada yetiştirilen Lumbard RZ F₁ (37-04) biber çeşidine ait bir görüntü

Lumbard RZ F₁ (37-04): Tatlı sivri biber, bitki yapısı orta güçlü, bitkinin boğum arası kısa, yandal oluşumu iyidir. Şekil 3.1’de görüldüğü gibi meyve rengi koyu renkli ve parlak, meyve yüzeyi pürüzsüz, meyve uzunluğu 23-25 cm, meyve tutumu yüksek ve erkenci, açık tarla, örtüaltı güz ve bahar dönemi yetiştiriciliğine uygun, dayanımları ise HR: Tm:0-2, IR: TSWV dir.



Şekil 3.2. Serada yetiştirilen Üçburun F₁ biber çeşidine ait bir görünüşü

Üçburun F₁: Türk tipi kahvaltılık biber olan üç burunun, bitki yapısı güçlü, bitkinin boğum arası kısa, yan dal oluşumu iyidir. Şekil 3.2’ de görüldüğü gibi meyve rengi yeşil ve parlak, meyve eti ve kabuğu ince, gevrek, meyve uzunluğu 12 cm çapı ise 2 cm dir. Meyve tutumu yüksek ve erkenci olan bu çeşit ilkbahar, tek ekim ve sonbaharda sera içinde yetiştiriciliği yapılabilir.

3.2 Metot

3.2.1. Kültüre alınma işlemleri sırasında kullanılan malzemeler ve malzemelerin sterilizasyon işlemleri

Anter kültürü ve shed mikrospor kültür çalışmalarında besin ortamlarının muhafaza edilebilmesi için değişik büyüklükteki steril plastik petri kapları kullanılmıştır. Kültür çalışmalarında kullanılan besin ortamları, saf su, kurutma kâğıdı, pensler, bistüriler, mikro pipet uçları, cam kavanoz ve beher gibi malzemelerin sterilizasyonu 121 °C sıcaklık ve 1,2 kg/cm² basınç altında 20 dakika süre ile otoklavlanarak yapılmıştır. Otoklav sterilizasyonu yapılamayan malzemeler asetat kalem, prafilm, bistüri uçları, havlu peçete, streç film ve biber tomurcuklarının bulunduğu cam kavanozlar %70 alkolle yüzey sterilizasyonu yapılarak steril kabin içine alınmıştır. Kültüre alma işlemi başlamadan önce steril kabin içerisi %70 alkol ile temizlenerek besin ortamları ve cam kavonoza alınan biber tomurcukları hariç diğer materyaller steril kabin içerisine bırakılarak UV ışığı 15 dk süre ile çalıştırılmıştır. Kültüre alma işlemleri sırasında pensler ve bistüriler de sterilizasyonu sağlamak amacıyla her kullanımdan önce glass bead sterilizasyon aletinde bekletilmiştir.



Şekil 3.3. Sterilizasyon işleminde kullanılan otoklav cihazı



Şekil 3.4. Sterilizasyon işleminde kullanılan glass bead'ten bir görüntü



Şekil 3.5. Pensler ve bistüriler

3.2.2. Kültürlerde kullanılan besin ortamlarının hazırlanması

3.2.2.1. Anter kültüründe kullanılan besin ortamının hazırlanması

Bu çalışmada anter kültürü için Büyükalaca vd. (2004) başarılı sonuç aldığı besin ortamı kullanılmıştır. Murashige ve Skoog (1962) hazır besin ortamından 4,4 g/l kullanılmış olup içerisine 0, 1 mg/l BAP +4 mg/l NAA +15 mg/l AgNO₃ + 2,5 g/l aktif kömür +30 g/l sükröz +7 g/l agar eklenmiş ve pH 5,7-5,8'e ayarlanmıştır.

Kimyasalları karıştırmak için magnetik karıştırıcı kullanılmıştır. Magnetik karıştırıcı üzerine 1 litrelik beher yerleştirilmiş ve içerisine bir miktar distile saf su eklendikten sonra 4,4 g/l MS temel besin ortamı ve 30 g/l sükröz ilave edilmiş ve çözülme işlemi gerçekleşinceye kadar bekletilmiştir. Kimyasalların çözülme işlemi gerçekleşikten sonra içerisine önceden hazırlanmış olan hormon stoklarından 4 mg/l NAA ve 0,1 mg/l BAP hormonları mikropipetler yardımıyla eklenmiştir. Çözeltinin içerisine 15 mg/l AgNO₃ ve 2,5 g/l aktif kömür de ilave edilerek daha önce beher içerisine koyulmuş olan distile saf su 1 L'ye tamamlanmıştır. Daha sonra magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak 1 N'lik HCl ve 1 N'lik KOH kullanılarak pH 5,7-5,8'e ayarlanılarak besin ortamının hazırlanma işlemi yapılmıştır. Besin ortamının sterilasyonu ise 121 °C sıcaklık ve 1,2 kg/cm² basınç altında 20 dakika süre ile otoklavlanarak yapılmıştır. Daha sonra hazırlanmış olan besin ortamı steril kabin içerisinde petrilere dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Soğutma işlemi tamamlandıktan sonra streç filmle sarılarak daha uzun süre muhafaza edilebilmesi için buzdolabına kaldırılmıştır.

Çizelge 3.1. Anter kültüründe kullanılan besin ortamının bileşimi

Makro Elementler	(Murashige ve Skoog, 1962) (mg/l)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	(Murashige ve Skoog, 1962) (mg/l)
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
Vitaminler	(Murashige ve Skoog, 1962) (mg/l)
Pyrodoxine HCl	0,5
Glycine	2,0
Nicotinic Acid	0,5
Thiamine-HCl	0,1
Myo-inositol	100
Büyüme, Düzenleyiciler	(Büyükalaca vd. 2004)
BAP	0,1 mg/l
NAA	4
AgNO ₃	15 g/l
Karbonhidratlar (g/l)	(Büyükalaca vd. 2004)
Sakkaroz	30 g/l
Diğer Maddeler (g/l)	(Büyükalaca vd. 2004)
Aktif Karbon	2,5 g/l
Agar	7 g/l



Şekil 3.6. Besin ortamı hazırlığından bir görüntü

3.2.2.2. Shed mikrospor kültüründe kullanılan besin ortamlarının hazırlanması

Shed mikrospor kültürü yarısı katı ve yarısı sıvı olmak üzere iki katmandan oluşmaktadır. Katı katmanı oluşturabilmek için NN (1969) besin ortamı içerisine +%2 maltoz +%1 aktif kömür +%0,6 agar +2,5 μM zeatin ve 5 μM IAA ilave edilerek hazırlanmıştır. Sıvı katman oluşturulması için ise NN (1969) ortamı içerisine %2 maltoz eklenmiştir. Katı ve sıvı ortamların pH 5,7-5,8'e ayarlanmıştır. Katı ve sıvı besin ortamlarının sterilasyonu ise 121 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 1,2 kg/cm^2 basınç altında 20 dakika süre ile otoklavlanarak yapılmıştır. Daha sonra hazırlanmış olan katı besin ortamı steril kabin içerisinde 3 cm kalınlığındaki steril petrilere 1,5 ml dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Soğutma işlemi tamamlandıktan sonra streç film ile sarılarak daha uzun süre muhafaza edilebilmesi için buzdolabına kaldırılmıştır. Hazırlanan sıvı ortam ise katı ortamın üzerine anterlerin ekim işlemi yapıldıktan sonra 1 ml olacak şekilde ilave edilmiştir (Supena vd 2006 a, b).

Çizelge 3.2. Shed mikrospor kültüründe kullanılan besin ortamının bileşimi

Makro Elementler	(Nitsch ve Nitsch 1969)
KNO ₃	950
NH ₄ NO ₃	720
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
CaCl ₂ .2H ₂ O	220
KH ₂ PO ₄	68
Mikro Elementler	(Nitsch ve Nitsch 1969)
MnSO ₄ .4H ₂ O	25
H ₃ BO ₃	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
Vitaminler	(Nitsch ve Nitsch 1969)
Nikotinik asit	5
Pridoksin-HCl	0,5
Thiamin-HCl	0,5
Biotin	0,05
Folik asit	0,5
Myo-inositol	100
Glisin	2,0
Büyüme, Düzenleyiciler	(Supena vd. 2006 a, b)
Zeatin	2,5 µM
IAA	5 µM
Karbonhidratlar	(Supena vd. 2006 a, b)
Maltoz	%2
Diğer Maddeler	(Supena vd. 2006 a, b)
Aktif Karbon	%1
Agar	6 g/l

3.2.3. Bitki yetiştirme

Anter kültüründe embriyo üretimi için bitkinin büyüme koşulları çok önemlidir. Bu konu üzerine yapılan çalışmalarda sera gibi kontrollü koşullarda yetiştiriciliği yapılan bitkilerinden alınan anterler açık alanda kontrolsüz çevre koşullarından yetiştiriciliği yapılan bitkilerden alınan anterlere göre çok daha fazla embriyo elde edilmiştir (Büyükalaca vd. 2004).

Bu çalışmada biber tomurcukları 2018 güz dönemi kasım –aralık ve 2019 bahar dönemi mart-nisan olmak üzere Akdeniz üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Seralarından toplanmıştır.



Şekil 3.7. Kültüre alınan biber tomurcuklarının yetiştiriciliği yapılan seradan bir görüntü

3.2.4. Anter kültürü ve shed mikrospor kültürü için çiçek tomurcuğunun alınma evresi

Anter kültürü yönteminde başarılı olmak için çiçek tomurcuklarının alınma evresi çok önemlidir. Yapılan çalışmalarda kültüre alınan anterlerin içerisindeki mikrosporların gelişim aşaması birçok bitki türünde tek çekirdekli mikrospor veya 1. polen mitozundan hemen sonraki döneminin en uygun dönem olduğu saptanmıştır (Ellialtıoğlu vd 1999). Çiçek tomurcukların alınma evresi yapılan çalışmalarda, çanak yaprak ve taç yaprak boylarının eşit veya taç yaprakların çanak yaprakların uzunluğundan biraz daha uzun olduğu durumlarda ve anterlerin başcık kısımlarının yaklaşık yarısına kadar antosiyan olduğu gelişim aşaması mikrosporların I.mitoz aşamasında olduğu belirlenmiştir (Chambonnet 1988).

Bu çalışmada biber çiçek tomurcukları morfolojik görünümüne göre taç yaprağın çanak yaprakları geçmeye başladığı dönemdeki tomurcuklar toplanmıştır. Toplanan tomurcukların sterilizasyon işlemi yapıldıktan sonra steril kabin içinde kurutma kağıdına konularak pens ve büstiri yardımıyla anterler ayırma işlemi yapılmıştır.1. mitoz

aşamasında olan anterlerin soluk yeşil ve uç kısımlarından kenarlarına doğru açık mavi veya mor renkli olanlarının petri içersine ekim işlemi yapılmıştır.

3.2.5. Anter kültürü yöntemi için ön uygulamalar

Bu çalışmada anter kültürü için herhangi bir ön uygulama yapılmamıştır. Sabah saatlerinde toplanan tomurcuklar aynı gün içerisinde sterilizasyonu yapılarak ekim işlemi yapılmıştır.

3.2.6. Anter kültürü yönteminde çiçek tomurcuklarının dezenfeksiyonu ve anterlerin ayrılması

Uygun dönemdeki biber çiçek tomurcuklarına %10' luk NaClO çözeltisi içinde 15 dakika süreyle dezenfekte edilmiş ve daha sonra 3 kez steril distile sudan geçirilmek suretiyle yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra otoklavda sterilizasyonu yapılan kurutma kâğıtlarının üzerine koyulan çiçek tomurcuklarının alt kısmını kesilerek taç yaprak, çanak yaprak ve dişicik üreme organı çıkartılarak yalnız bırakılan başcık ve sapcık kısımlarından oluşan anterlerin sapcık kısmı bistüri ve pens yardımıyla ayrılarak başcık kısmının ekim işlemi besin ortamına yapılmıştır.



Şekil 3.8. Biber genotiplerinin dezenfeksiyon işlemi sırasındaki bir görüntü



Şekil 3.9. Biber tomurcuklarından anter elde edebilmek için yapılan ayırma işlemi



Şekil 3.10. Biber tomurcuğundan izole edilmiş anter görüntüsü

3.2.7. Anter kültürü yöntemi için inkübasyon ve kültür koşulları

Anter kültürü yönteminde kültüre alınan anterlere +35 °C’de 48 saat inkübasyonda sıcak uygulama işlemi yapıldıktan sonra +25 °C olan büyüme odasında 33 gün karanlıkta bırakılmıştır. Bu uygulamalardan sonra gelişen anterleri 35. günde hormonsuz besin ortamına yerleştirilmiştir. Yerleştirme yapıldıktan sonra petriler +25 °C’de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks aydınlatmalı büyüme odasına alınmıştır. Büyüme odasına alınan petrilerin haftalık olarak gözlemleri yapılarak kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.11. Anter kültürü çalışmasında kullanılan inkubator

3.2.8. Shed mikrospor yönteminde mikrosporların gelişim aşamalarını belirlemek

Farklı büyüklükteki biber anterlerinin gelişim aşamalarını belirlemek amacıyla tomurcuklar kendi aralarında morfolojik görüntüsüne göre sınıflandırılmıştır. Şekline ve büyüklüğüne göre gruplandırılan biber tomurcularının içindeki anterlerin mikrosporogenesis aşamalarını belirlemek amacıyla Ethidium Bromide (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenanthridium bromide) (EtBr)’in saf suyla hazırlanan stok solüsyonu kullanılmıştır. Farklı büyüklükteki canlı tomurcuklardan alınan anterler lamalar üzerine yerleştirilerek mikrosporlar serbest hale getirildikten sonra üzerine bir iki damla EtBr çözeltisinden damlatılarak floresan mikroskopunda gözlemi yapılmıştır.



Şekil 3.12. Görüntüleme sistemine ait bir görüntü

3.2.9. Shed mikrospor yöntemi için ön uygulamalar

Shed mikrospor kültürü tekniğinde çiçek tomurcuklarına yapılan ön uygulamalar mikrosporların gelişimi üzerine etki yapmaktadır. Sterilizasyonu tamamlanan tomurcuklardan çıkartılan anterlere ve kültüre alınan mikrospora kültür süresinin ilk zamanlarında farklı sıcaklık ve karanlık uygulaması gibi ön uygulamalar yapılabilir. Bu amaçla tomurcuklara +4 °C'de 24 saat karanlıkta ön uygulaması yapıldıktan sonra tomurcuklar izole edilip kültüre alınmıştır (Supena 2006a,b).

3.2.10. Shed mikrospor kültürü yönteminde çiçek tomurcuklarının dezenfeksiyonu ve anterlerin ayrılması

Biber çiçek tomurcuklarına, 100 ml'sine 1-2 damla Tween-20 damlatılarak %10'luk sodyum hipoklorit içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra 3 kez 5'er dakika süre ile steril distile sudan geçirilmek suretiyle yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirdikten sonra otoklavda sterilizasyonu yapılan kurutma kâğıtlarının üzerine bırakılan çiçek tomurcuklarının alt kısmını kesilerek taç yaprak, çanak yaprak ve dişiçik üreme organı çıkartılarak yalnız bırakılan başcık ve sapçık kısımlarından oluşan anterlerin sapçık kısmı bistüri ve pens yardımıyla ayrılarak başcık kısmının ekim işlemi besin ortamına yapılmıştır.

3.2.11. Shed mikrospor kültürü yönteminde anterlerin besin ortamına yerleştirilmesi

Mikrospor kültüründe tomurcukların dezenfeksiyon işlemi yapıldıktan sonra anterlerin başcık kısmı pens ve bistüri yardımıyla ayrılmıştır. Daha sonra önceden hazırlanan steril plastik petrilerin içine koyulan besin ortamının ilk katmanı olan katı ortam üzerine anterlerin ekim işlemi yapılmış ve üzerine 1000 µl mikropipetle çekilen sıvı katman ikinci katman olarak eklenerek petrilerin kenarları parafilmle kapatılmıştır.

3.2.12. Shed mikrospor yöntemi için inkübasyon ve kültür koşulları

Shed mikrospor yönteminde kültüre alınan anterler +4 °C'de soğukta 1 hafta süreyle 24 saat karanlıkta bekletilmiştir (Supena 2006a,b). Soğuk uygulama yaptıktan sonra +27 °C'de inkübasyonda mikrosporların kallus, embriyo veya embriyo benzeri yapı oluşturuncaya kadar bekletilmektedir. Her hafta yapılan gözlemler sonucu kallus, embriyo ve embriyo benzeri yapılar hormonsuz besin ortamına yerleştirilmiştir. Yerleştirme yapıldıktan sonra petriler +25 °C'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks aydınlatmaya sahip olan büyüme odasına alınmıştır. Büyüme odasına alınan petrilerin haftalık olarak gözlemleri yapılarak kayıt altına alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Anter Kültürü Ve Shed Mikrospor Kültürü İçin Uygun Biber Tomurcuk Büyüklüğünün Belirlenmesi

Bu çalışmada bir tane sivri (Lumbard RZ F₁) diğeri ise üçburun (Üçburun F₁) olmak üzere 2 farklı biber çeşidi kullanılmıştır. Bu iki farklı biber çeşidinin tomurcuk sınıflandırılması Çizelge 4.1’de ki Özkum Çiner ve Tıpırdamaz (2002)’de yaptığı çalışma dikkate alınarak yapılmıştır. Bu çalışmaya göre tomurcuklarının taç yaprağı çanak yaprağına eşit veya taç yaprağın çanak yapraktan biraz daha uzun olduğu aşamadaki anterlerin renginin yeşilimsi, uç kısmının ise mor renkli olduğu ve yapılan diğer çalışmalarda ise başarı elde edebilmek için en önemli faktörlerden birisinin uygun tomurcuk seçimi olduğu (Reinert ve Bajaj 1977; Karakullukçu 1991; Karakullukçu ve Abak 1992; Chunling 1992; Çömlekçioğlu vd. 1999, 2001; Büyükalaca vd. 2004; Kim vd. 2004; Supena vd. 2006, 2011; Taşkın vd. 2011; Ata 2011; Ellialtıoğlu vd. 2014) tek çekirdekli ya da 1. polen mitoz aşamasından daha iyi sonuç alındığı bildirilmiştir.

Çizelge 4.1. Tomurcuk gelişim aşamalarının büyüklüğü ve anter tomurcuklarının morfolojik özellikleri olmak üzere 5 grupta incelenmiştir ($\pm$ standart hata anlamına gelir) (Özkum Çiner ve Tıpırdamaz 2002)

Tomurcukların gelişme aşaması	Tomurcukların uzunluğu (mm)	Tomurcukların çapı (mm)	Anter ve mikrospor tomurcuklarının özellikleri
1	5 $\pm$ 0,5	4 $\pm$ 0,2	Bu aşamadaki tomurcuklar küçüktür. Anterlerin rengi açık yeşil ve mikrospor ana hücreleri içerirler
2	6 $\pm$ 0,7	4.5 $\pm$ 0,5	Bu aşamadaki tomurcuklar açılmamıştır. Anterlerin rengi yeşil ve tetrad ve geç tetrad aşamalarında mikrosporlar içerirler.
3	7 $\pm$ 0,3	5 $\pm$ 0,2	Bu aşamadaki tomurcukların taç yaprak uzunluğu çanak yaprak uzunluğundan aynı veya biraz daha uzundur. Anterlerin rengi yeşil ve uç kısımları mor renklidir. Bu aşamadaki tomurcuklar tek çekirdekli ya da 1. Polen mitoz aşamalarında mikrospor içerir.
4	8 $\pm$ 0,4	7 $\pm$ 0,3	Taç yaprak, çanak yapraktan biraz daha uzundu, anter rengi yeşilimsi uç kısmı mor renkli ve mitoz aşamasında mikrosporları içeriyor

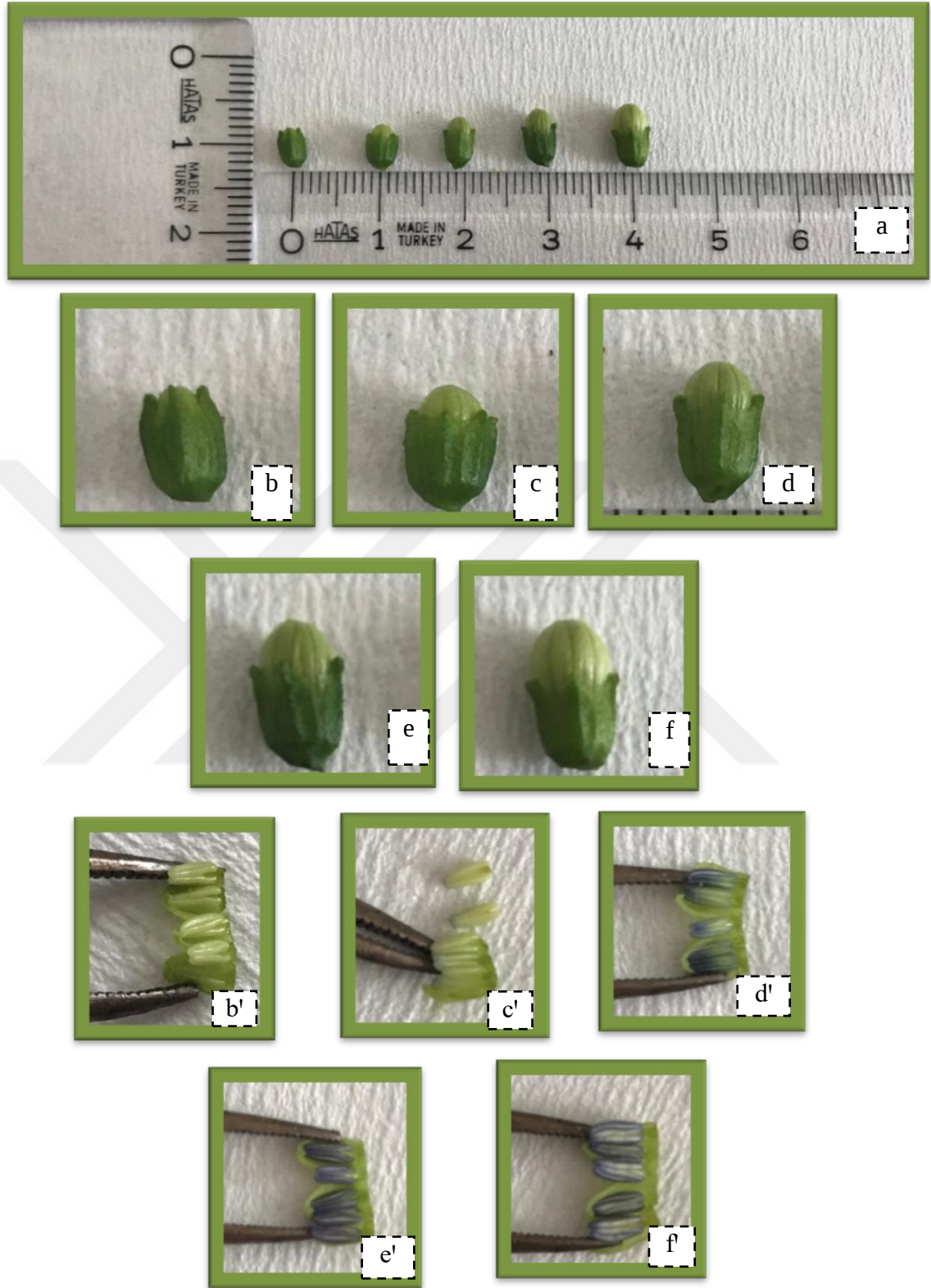
Çizelge 4.1.'in devamı

5	$10 \pm 0,9$	$7 \pm 0,6$	Tomurcuklar açık ve anterler koyu mor renklidir. Bu aşamadaki tomurcuklar erken iki çekirdekli ve polen taneleri içerirler.
---	--------------	-------------	---

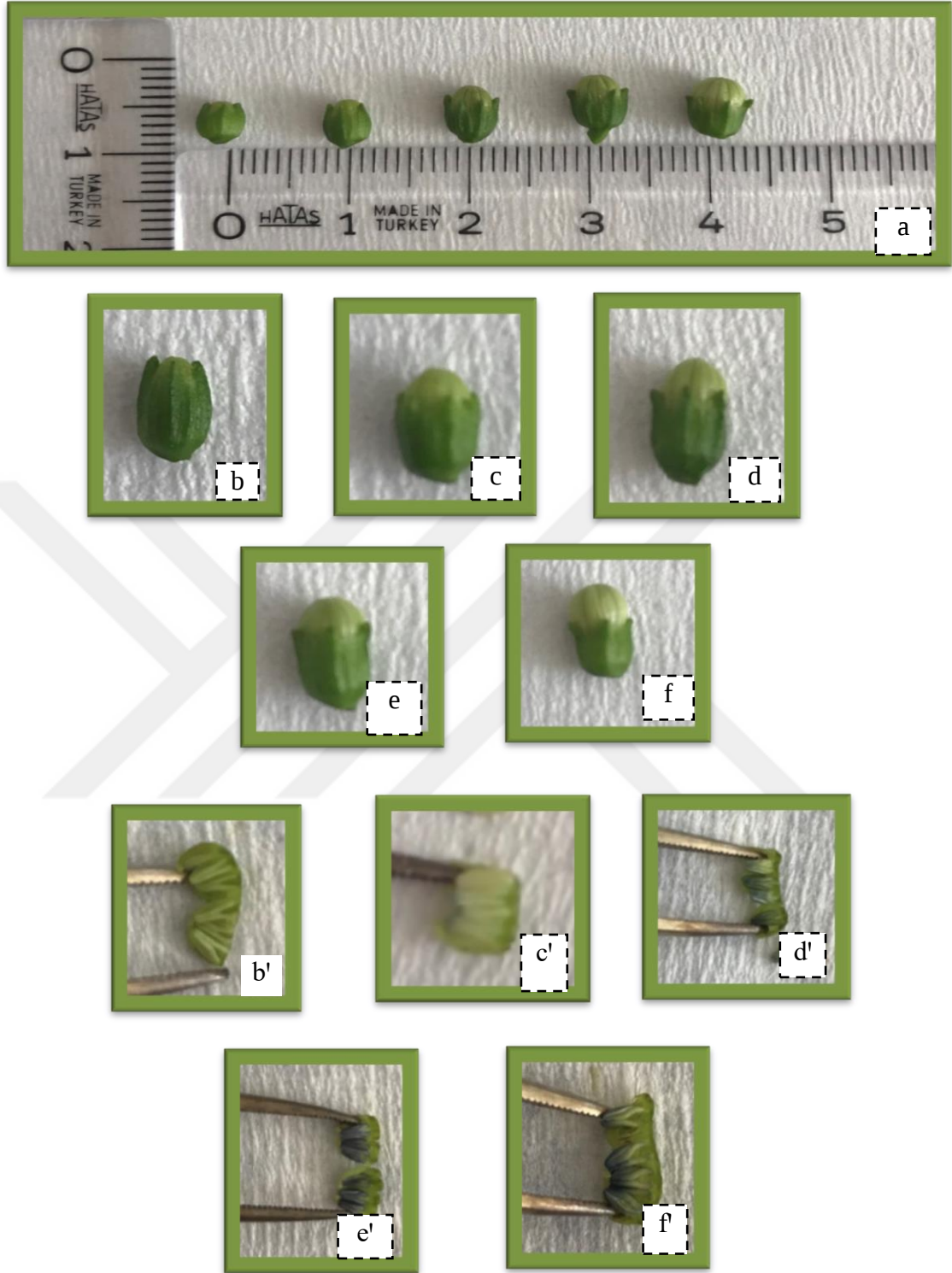
Yukarıdaki Çizelge 4.1' e göre tomurcuk sınıflandırmasında en iyi 3. aşamadaki tomurcuklardan elde edilmiştir. Yaptığımız çalışmada Lumbard RZ F₁ ve Üçburun F₁'in uzunluğu 6-7-8 mm olan tomurcuklar kullanılmış olup araştırmanın sonucunda 3.ve 4. gelişim aşamasındaki tomurcuklar anter ve shed mikrospor kültür yöntemlerine daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır.

Şekil 4.1'de Lumbard RZ F₁ çeşidinin tomurcuk gelişim aşamaları görülmektedir. Şekil 4.1a'da görülen biber tomurcukların toplu haldeki bir görüntüsü olup, anter kültürü çalışmasında 2. ve 3. gelişim aşamasında olan tomurcuklar kullanılmıştır. Lumbard RZ F₁ çeşidinin shed mikrospor çalışmasında ise 3. gelişim aşamasında bulunan tomurcuklar kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan diğer çeşit Üçburun F₁'in tomurcuk gelişim aşaması Şekil 4.2'de görülmektedir. Üçburun F₁ çeşidinin tomurcuklarının toplu halde görüntüsü Şekil 4.2a'da bulunmakta olup anter kültürü çalışmasında 2., 3. ve 4. Gelişim aşamasındaki tomurcuklar kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan shed mikrospor yönteminde ise 3. ve 4. gelişim aşamasındaki tomurcuklar kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Lumbard RZ F₁ çeşidine ait tomurcuk gelişim aşamaları (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. gelişim aşaması, c ve c': 2. gelişim aşaması d ve d': 3. gelişim aşaması, e ve e': 4. gelişim aşaması, f ve f': gelişim aşamasındaki tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü)



Şekil 4.2. Üçburun F₁ çeşidine ait tomurcuk gelişim aşamaları (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. gelişim aşaması, c ve c': 2. gelişim aşaması d ve d': 3. gelişim aşaması, e ve e': 4. gelişim aşaması, f ve f': gelişim aşamasındaki tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü)

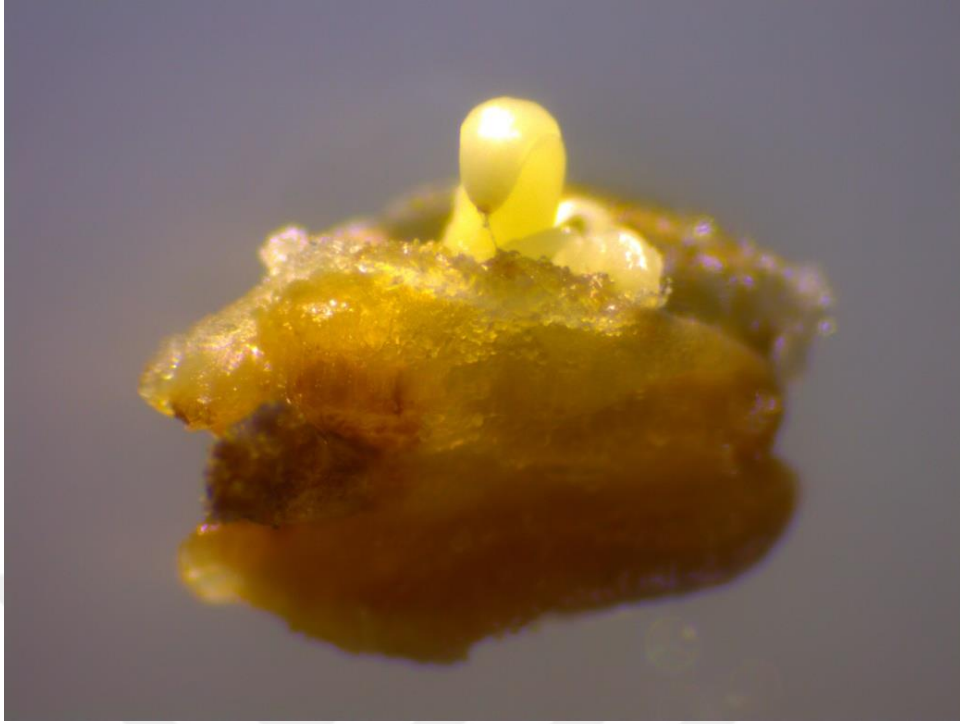
4.2. Anter Kültürü Çalışmasından Elde Edilen Sonuçlar

Anter kültürü çalışmasında kültür ortamı olarak Taşkın vd. (2011)' de yaptığı çalışmada kullanılan MS ortamının içerisine +4 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP +15 mg/l AgNO₃ ve 2,5 g/l aktif kömür ilave edilerek oluşturulan besin ortamında Lumbard F₁ ve Üçburun F₁ çeşidi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Haftalık olarak gözlemleri yapılan petrilerin kültüre alındıktan 5 hafta sonra embriyo oluşumu başladı ve ilk kotiladonlu embriyo ise 6. hafta da gözlemlenmiştir. Besin ortamına ekim işlemi yapıldıktan 40 gün sonra Üçburun F₁ çeşidinden ilk bitki gelişimi gözlemlenmiştir. Araştırma sonucunda anter kültürü çalışmasında ekim işlemi yapıldıktan sonra 1,5 ve 4 ay arasında yeni bitkicikler elde edildiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2. Biber çeşitlerinin anter kültürü besin ortamına verdiği yanıtlar

Genotip	Kültüre alınan anter sayısı (adet)	Gelişim gösteren anter sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı oranı (%)	Anormal embriyo oranı (%)	Bitkiye dönüşüm oranı (%)
Lumbard RZ F ₁ (37-04)	840	424	8,94	34,27	23,63
Üçburun F ₁	840	193	22,18	28,33	22,22

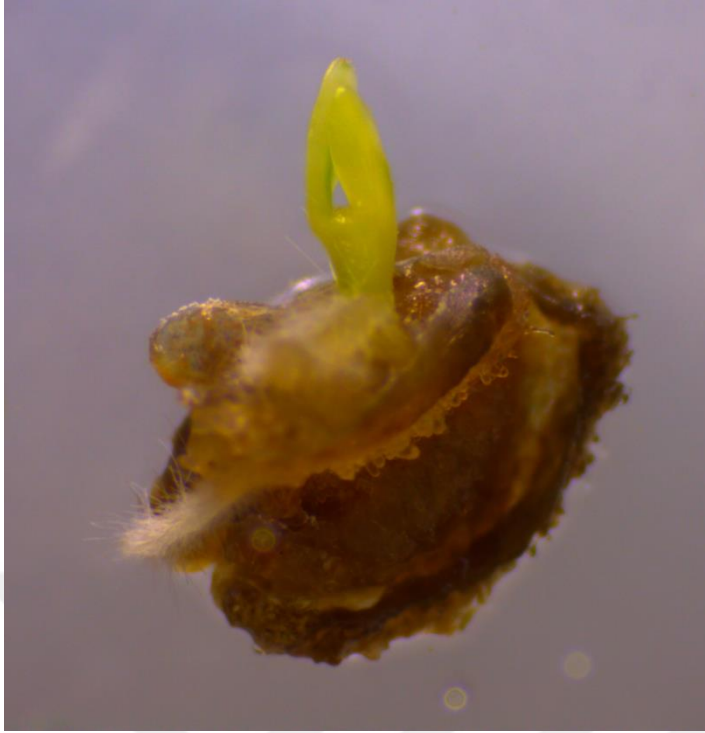
Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi anter kültürü çalışmasında her bir çeşit için 840 adet anter kültüre alınmıştır fakat gelişim gösteren anter sayısı hesaplanırken hastalıklı anterlerin sayısı dikkate alınmamıştır. Lumbard RZ F₁ sivri çeşidinde gelişim gösteren anter sayısı 424 tane olduğu belirlenmiştir. Gelişim gösteren anterlerden %8,94 oranında normal görünümlü embriyo oluşumu gözlemlenmişken, %34,27 oranında ise anormal görünümlü embriyo gözlenmiştir. Normal görünümlü embriyoların bitkiye dönüşüm oranı ise %23,63 olarak gerçekleşmiştir. Çalışmada kullanılan diğer Üçburun F₁ çeşidinden de 840 anter kültüre alınmıştır. Kültüre alınan anterlerin gelişim gösteren anter sayısı 193 olduğu belirlenmiştir. Gelişim gösteren anterlerin embriyo oluşturan anter sayısı oranı %22,18 iken, anormal görünümlü embriyo oranı ise %28,33 olarak bulunmuştur. Embriyo oluşturan anterlerin bitkiye dönüşüm oranı ise %22,22 olarak hesaplanmıştır.



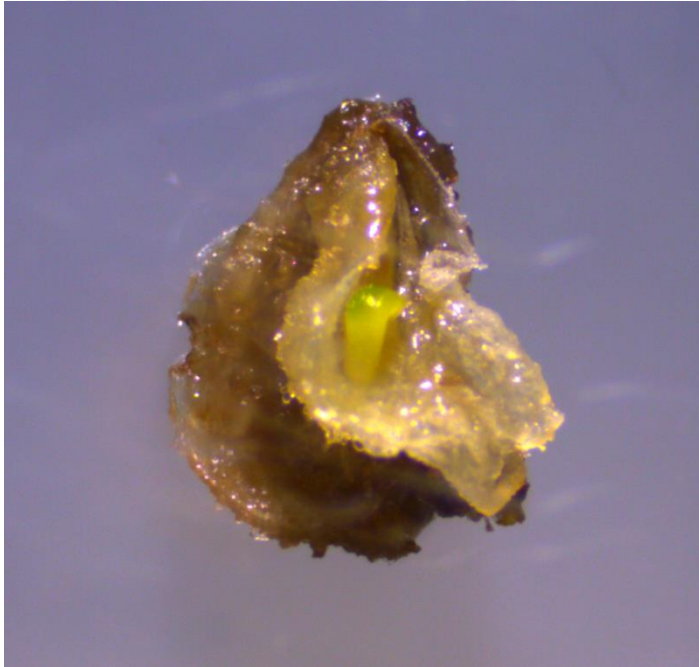
şekil 4.3. Lumbard Rz F₁ çeşidinden elde edilen embriyonun görüntüsü



şekil 4.4. burun F₁ çeşidinden elde edilen embriyonun görüntüsü



şekil 4.5. Lumbard RZ F₁ çeşidinden elde edilen kotiledonlu embriyonunun görüntüsü



şekil 4.6. burun F₁ çeşidinden elde edilen kotiledonlu embriyonunun görüntüsü



Şekil 4.7. Tüp içerisine alınan bitkiciklerden bir görüntü



0

Şekil 4.8. Tüp içerisine alınan bitkiciklerden bir görüntü



şekil 4.9. Strafor içerisine ekim yapılmış biber genotiplerinin bir görüntüsü



şekil 4.10. Saksı içerisine aktarılmış burun F₁ bitkilerinden bir görüntü

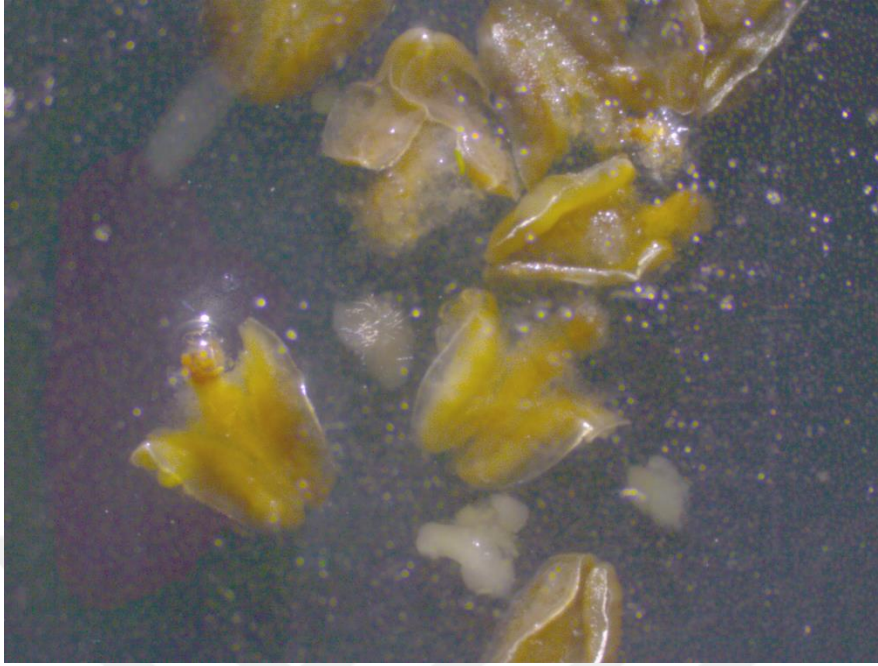
4.3. Shed Mikrospor Kültüründen Elde Edilen Sonuçlar

Anter kültürü çalışmasında kullanılan 2 adet biber çeşidi yarı sıvı, yarı katı olan Supena vd.(2006a,b)'nin başarılı olduğu belirtilen shed mikrospor yönteminde kültüre alınmıştır. Kültüre alındıktan dört hafta sonra yapılan gözlemde biber anterlerinde büyüme ve şişme olduğu tespit edilmiştir. Ekim işlemi yapıldıktan 5 – 6 hafta sonrada mikrospor salınması gözlemlenmiştir. Gelişim göstererek embriyo oluşturan mikrosporların ekim işlemi yapıldıktan 7 hafta sonraki durumu Şekil 4.11.'de görülmektedir. Şekil 4.12.'de de mikrosporların gelişim aşamaları embriyo, torpedo embriyo ve kotiledon oluşturmuş embriyo gözlemlenmektedir. Shed mikrospor kültüründe ekim işlemi yapıldıktan 10 hafta sonra ilk bitkicik elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. Biber çeşitlerinin shed mikrospor kültürü besin ortamına verdiği yanıtlar

Genotip	Kültüre alınan anter sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı oranı (%)	Anormal embriyo oranı(%)	Bitkiye dönüşüm oranı(%)
Lumbard RZ F ₁ (37-04)	180	11,11	16,89	7,87
Üçburun F ₁	180	0	0	0

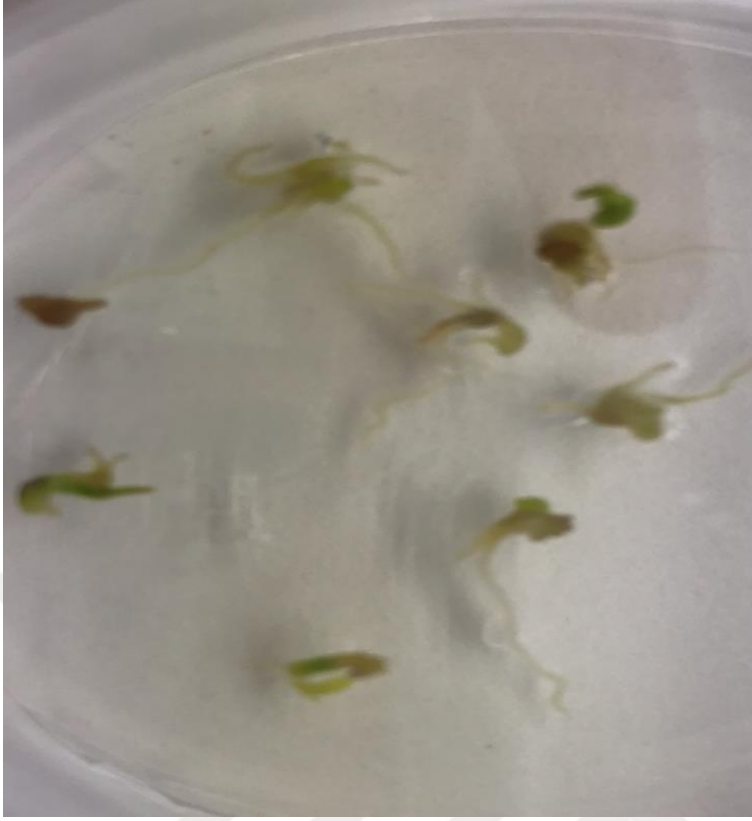
Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi shed mikrospor kültürü çalışmamızda her bir çeşit için 180 adet kültüre alınmıştır fakat gelişim gösteren anter sayısı hesaplanırken hastalıklı anterlerin sayısı dikkate alınmamıştır. Lumbard RZ F₁ sivri çeşidin de embriyo oluşturan anter sayısı oranı %11,11 iken anormal gelişim gösteren anterlerin oranı %16,89 dur. Normal görünümlü embriyo oluşturan anterlerin %7,87 si ise bitkiye dönüşmüştür. Fakat bu çalışmamızda Üçburun F₁ hazırlamış olduğumuz ortama yanıt vermemiştir.



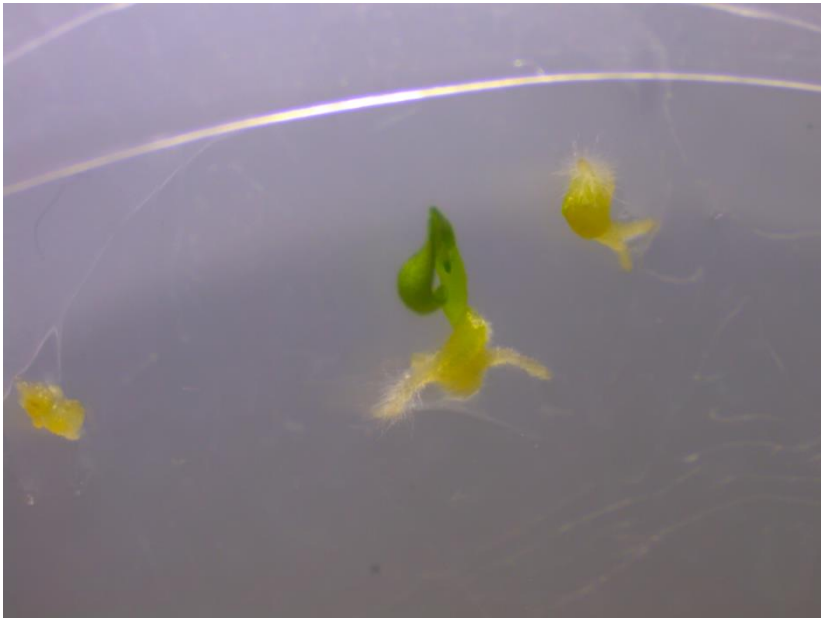
Şekil 4.11. Mikrosporların gelişim aşamasındaki bir görüntü



Şekil 4.12. Mikrosporların gelişim aşamaları embriyo, torpedo embriyo ve kotiledon oluşturmuş embriyo



şekil 4.13. Çift katmanlı kültür ortamında gelişen embriyoların MS ortamına transfer ettikten sonraki bir görüntü.



şekil 4.14. Embriyodan kotiledon ve kök oluşumuna ait bir görüntü



şekil 4.15. Sera koşullarına adaptasyonu sağlanmış biber bitkilerinden bir görüntü

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada sivri (Lumbard RZ F₁) ve üçburun (Üçburun F₁) olmak üzere iki tane biber çeşidi ve anter kültürü ile shed mikrospor kültür yöntemlerinden hangisinin haploid ve DH bitki elde edilmesinde daha etkili olduğu araştırılmıştır.

Anter kültürüne alınan anterlerin 840 tanesi sivri (Lumbard RZ F₁) ve 840 tanesi üçburun (Üçburun F₁) olmak üzere toplamda 1680 anter kültüre alınmıştır. Kültüre alınan anterlerden 5 hafta sonra embriyo oluşumu gözlemlenmeye başlanmış ve ilk kotiledonlu embriyo ise 6. hafta da elde edilmiştir. Ekim işlemi yapıldıktan sonra 1,5-4 ay arasında yeni bitkicikler elde edilmiştir.

Anter kültürüne alınan sivri çeşidi Lumbard RZ F₁'in 424 tanesi gelişim göstermiştir. Lumbard RZ F₁ çeşidinde gelişim gösteren anterlerin %8,94 oranında embriyo oluşumu gözlemlenmiş ve embriyo oluşturan anterlerden ise %23,63 oranında bitki elde edilmiştir. Çalışmada kullandığımız üçburun çeşidi Üçburun F₁'in 193 tanesi gelişim göstermiştir. Üçburun F₁'de gelişim gösteren anterlerin oranı %22,18 oranında embriyo oluşumu gözlenmişken, bu embriyoların %22,22 oranında bitki elde edilmiştir. Anter kültürü çalışmamızda en fazla bitki Lumbard RZ F₁ çeşidinden elde edilmiş fakat elde edilen bitki sayıları birbirine çok yakın olduğu belirlenmiştir.

Araştırmada kullanılan diğer bir yöntem ise shed mikrospor yöntemidir. Bu yöntemde de Lumbard RZ F₁ ve Üçburun F₁ çeşitleri kullanılmıştır. Shed mikrospor kültüründe mikrospor salınması 5. ve 6. haftalar arasında gözlenmeye başlanmıştır. İlk bitki ise kültüre alındıktan 10 hafta sonra Lumbard RZ F₁ çeşidinden elde edilmiştir.

Lumbard RZ F₁ çeşidinde embriyo oluşturan anter sayısı oranı %11,11 olarak elde edilmiş ve bu embriyoların %7,87 si bitkiye dönüşmüştür. Fakat yarı katı ve yarı sıvı ortama alınan Üçburun F₁ çeşidi shed mikrospor yöntemine yanıt vermemiştir. Shed mikrospor yönteminde sivri çeşidi (Lumbard RZ F₁) daha başarılı olmuştur.

Yaptığımız bu çalışmanın sonucunda üzerinde çalıştığımız çeşitlerde haploid embriyo oluşumu ve bitkiye dönüşümde anter kültürü yöntemi, shed mikrospor yöntemine göre daha başarılı olduğu saptanmıştır. Fakat shed mikrospor yönteminin başka çeşitlerde daha başarılı olabileceği düşünülmektedir. Shed mikrospor yöntemi üzerine araştırmalar son yıllarda artmakta olup yeni protokollere hala ihtiyaç duyulmaktadır. Gelecek vaadeden bu yöntem geliştirilerek ıslah programlarında yoğun ve güvenilir bir şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir.

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, Fasikül 1-2-3-4'den ayrı basım, 155-163.
- Anonim 1: <http://www.fao.com> [Son erişim tarihi: 01.05.2019].
- Anonim 2: <http://www.tuik.gov.tr> [Son erişim tarihi: 01.05.2019].
- Arı, E., Bedir, H., Yıldırım, S. and Yıldırım, T., 2016a. Androgenic responses of 64 ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to shed-microspore culture in the autumn season. *Turk J Biol* 40: 706-717
- Arı, E., Yıldırım, T., Mutlu, N., Büyükalaca, S., Gökmen, Ü. and Akman, E., 2016b. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk J Biol* 40: 944-954
- Ata, A., 2011. Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) anter kültüründe mevsim etkisi ve mikrospor gelişimi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 89s.
- Aybak, H.Ç., 2002. Biber yetiştiriciliği. Hasad Yayıncılık 155 s.
- Bozokalfa, M.K. ve Eşiyok, D., 2010. Biber (*Capsicum annuum* L.) aksesyonlarında genetik çeşitliliğin agronomik özellikler ile belirlenmesi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 47 (2): 123-134
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu, N., Abak, K., Ekbiç, E. and Kılıç, N. 2004. Effect of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. *Europ. J. Hort. Sci.*, 69 (5): 206-209.
- Cao, M.Q. Li, Y., Liu, E., Jiang, T., Liu, G.S., Nishio, T., and Dore, C., 1995. Application of anther culture and isolated microspore culture to vegetable crop improvement. *Acta Horticulturae*, 392:27-28.
- Chambonnet, D., 1988. Production of haploid pepper plants. Bulletin interne de la station d'Amelioration des Plantes Maraicheres d'Avignon-Montfavet, France, 1-10
- Cheng, Y., Li, R. Sheng Jiao, Y., Qiao, N., Ting Li, T., 2013. Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on of pepper (*Capsicum annuum* L.). *South African Journal of Botany* 88 306-309.
- Chunling, L., 1992. Successful development of new sweet (hot) pepper cultivars by anther culture, Asia- Pasific Conference on Agricultural Biotechnology (APAB), August 20-24 Beijing, China.
- Çağlar, G., Aras, V. ve Bayram, A. 2004. Kurutmalık kırmızı biberlerde androgenesis yoluyla *in vitro* haploid embriyo uyartımı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(1): 87-94.
- 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. ve Abak, K., 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum*). XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant, 2001, Antalya-Turkey.
- Çömlekçioğlu, N., ve Ellialtıoğlu, Ş.Ş., 2018. Review on the research carried out on in vitro androgenesis of peppers (*Capsicum annuum* L.) in Turkey . Vol. 13 (6) June (2018) *Res. J. Biotech*
- Demiray, E., ve Tülek, Y., 2012. Kurutma işleminin kırmızı biberdeki renk maddelerine etkisi. *Electronic Journal of Food Technologies* Vol: 7, No: 3, 2012 (1-10)
- Dolcet-Sanjuan, R., Clavera, E., Huerta, A. 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L. – effect of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122(4): 468-475
- Doğantan, S.Z., Tuncer, İ.K., Başçetinçelik, A. 1987. Use of solar energy for red pepper, third technical meeting of the FAO-CNRE on solar drying, 9-11 September 1987, Stuttgart F.R. of Germany. 5
- Dumas De Vaulx, R., Chambonnet, D., Porchard, E. 1981. Culture in vitro d'antheres de piment (*Capsicum Annuum*): Amelioration des taux d'obtention de plantes chez differents genotypes par traitements a +35 oc. *Agronomie*, 1:859-864
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarıkamış, G., Yanmaz, R., 1999. Lahanada çiçek tomurcuğu morfolojisi ile mikrospor gelişme dönemi arasındaki ilişkinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 06110 Ankara.
- Ellialtıoğlu, Ş., Büyükalaca, S., Sönmez, K., Taşkın, H., Alremi, F., 2014. Biber (*Capsicum annuum* L.)'de genotip ve besin ortamının anter kültürüne etkileri. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 1(2): 108–116
- Ercan, N., ve Şensoy, F.A., 2011. Androgenic responses of different pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 4 (2): 59-61
- Gawel, N.J. and Robacker C.D., 1990. Somatic embryogenesis in two gossypium hirsutum genotypes on semi-solid versus liquid proliferation media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23: 201-204, 1990.
- George, L., and Narayanaswamy, S. 1973. Haploid Capsicum through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 78: 467-470.
- Gonzales-Melendi P., Testillano P.S., Ahmadian P., Fadon B., Vicente O., Risueno M.C. 1995. *Protoplasma*, 187, 60-71.
- Greenleaf, W.H., 1986. Pepper breeding. *Breeding Vegetable Crops*. A.V.I., 67-127.
- Guha, S., and Maheswari, S.C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of datura. *Nature*, 204-497
- Gyulai, G., Gemesne, J. A., Sagi, Zs., Venezel, G., Pinter, P., Kristof, Z., Törjek, O., Heszky, L., Bottka, S., Kiss, J., Zatyko, L. 2000. Doubled haploid development and pcr-analysis of f1hybrid derived dh-r2 paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. *J. Plant Physiol.* 156:168174

- Harn, C., M.Z. Kim, K.T. Choi, and Y.I. Lee. 1975. Production of haploid callus and embryoid from the cultured anther of *Capsicum annuum*. *Sabrao J.* 7:71–77.
- IBPGR. 1983. Genetic resources of Capsicum. IBPGR Secretariat, Rome, 49.
- Johansson, L., Andersson, B., Eriksson, T. 1982. Improvement of anther culture technique: activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO₂ concentration. *Physiol Plant* 54:24–30
- Kalloo, 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, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 1-131.
- Karakullukçu, Ş. ve Abak, K., 1992. Patlıcanda anter kültürü üzerinde araştırmalar - I. elverişli tomurcuk döneminin belirlenmesi. *Doğa- Turkish Journal of Agricultural and Forestry*, 17: 801-810.
- Kim, M., Jang, I.C., Kim, J.A., Park, E.J., Yoon, M. and Lee, Y. 2008. Embriyogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep*, 27: 425-434.
- Kim, M., Joon, E., An, D. and Lee, Y. 2013. High-quality embryo production and plant regeneration using a two-step culture system in isolated microspore cultures of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2013) 112:191–201
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, DI and Lee, K.M. 2004, Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 77:63–72
- Krishna, DE, A. 2003. *Capsicum*, The genus *Capsicum*. Taylor & Francis 11 New Fetter Lane, London EC4P- 4EE, 296 pages.
- Kristiansen, K., Andersen, S.B. 1993. Effects of Donor Plants Temperature, Photoperiod, and Age on Anther Culture Response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 67:105-109.
- Kuo, J.S., Wang, Y.Y., Chien, N.F., Ku, S.J., Kung, M.L. and Hsu, H.C. 1973. Investigation on the anther culture in vitro of *nicotiana tabacum* l. and *Capsicum annuum* L. *Acta Bot Sinica*, 15:43-47
- Lichter., 1981. Anther culture of brassica napus in a liquid culture medium. *Z pflanzenphysiol* 103: 229-237.
- Novak, F.J. 1974. Induction of a haploid callus in anther cultures of capsicum spp. *Z.Pflanzenzüchtg*, 72:46-54.
- Ochoa-Alejo, N. And Ramirez-Malagon, R. 2001. In vitro chili pepper biotechnology. In *Vitro Cell. Dev. Biol.Plant*, 37(6):701-729.

- Onay, A., Çalar, N., Binici, M., Akdemir, Ö.F., Kılınç, F.M., vd 2012. Bitkilerin biyoteknolojik yöntemlerle ticari çoğaltımı; mevcut ve gelecekteki durum. *Journal of Life Sciences*, Volume 1, Number 2,
- Özalp, R., 2010. Ülkemizde biber üretimi ve örtüaltı biber yetiştiriciliği. *Tarım Türk Dergisi*, Temmuz-Ağustos 2010, Sayı:24, Yıl:5, (S: 29-32).
- Özkum Çiner, D. and Tıprıdamaz, R., 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk J. Bot.*, 26: 131-139
- Purohit, S.D., 2013. Introduction to plant cell,tissue and organ culture
- Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S., 1977. Anther Culture: Haploid production and its significance in: Bajaj (Ed) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture.
- Rubio, C., Hardisson, A., Martín, R.E., Báez, A., Martín, M.M. and Álvarez, R., 2002. Mineral composition of the red and green pepper (*Capsicum annuum* L.) from Tenerife Island. *Eur Food Res Technol*, 214: 501-504.
- Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G., and Farı, M., 1995. Anther culture response in different genotypes and F₁ hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding*, 114:78-80.
- Morrison, R.A., Koning, R.E., Evans, D.A. 1986a. Pepper. In: Evans, D.A., Sharp, W.R, Ammirato, P.E.(Eds)., *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol.4., New York Macmillan, 552-575.
- Morrison, R.A., Koning, R.E., Evans, D.A. 1986b. Anther culture of interspecific hybrid of capsicum. *J. Plant Physiol.* 126:1-9.
- Munyon, I.P., Hubstenberger, J.F., Phillips, G.C. 1989. Origin of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 25:293-296
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Arevised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473– 497
- Nitsch, J.P. and C. Nitsch, 1969. Haploids Plants from Pgrains. *Science* 163:85- 87.
- Ochoa-Alejo, N., Ramirez-Malagon, R. 2001. In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant*, 37(6):701-729.
- Sibi, M., Dumas De Vaulx, R. and Chambonnet, D. 1979. Obtention de plantes haploides par androgenese in vitro chez le piment (*Capsicum annuum* L.). *Ann Amelior. Plantes*, 29:583-606.
- Saccardo, F., Devreux, M. 1974. In vitro production of plantlets from anther culture of *Capsicum annuum* L. *Proc. of Eucarpia: Genetics and Breeding of Capsicum*, Budapest, 45-49
- Sayılır, A. ve Özzambak, E. 2005. Biber anter kültüründe uygun tomurcuk büyüklüğü ile besin ortamı içeriklerinin embriyo verimine etkileri üzerine bir araştırma. *Ege Üniv. Ziraat. Fak. Derg.*, 2005, 42(3):1-11 ISSN 1018-885

- Sunderland, N. and Roberts, M. 1979. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann Bot London* 43: 405-414
- Supena, E.D.J., Suharsono, S., Jacobsen, E., Custers, J.B.M. 2006a. Successful development of a shed-microspore culture protocol for double haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 25(1): pages1-10.
- Supena, E.D.J., Suharsono, S., Jacobsen, E., Custers, J.B.M. 2006b. Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae Volume* 107, Issue 3, 6, Pages 226-232
- Supena, E.D.J. and Custers, J.B.M. 2011. Refinement of shed-microspor culture protokol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae* 130(2011) 769-774
- Şalk, A., Arın, L., Deveci, M., Polat, S., 2008. Özel sebzecilik, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 448 s., Tekirdağ.
- Taşkın, H., 2005. Bazı biber genotiplerinde anter kültürü ile haploid embriyo uyartımında embriyo kalitesinin artırılmasına yönelik bazı uygulamalar.Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Taşkın, H., Büyükalaca, S., Keleş, D. and Ekbiç, E. 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(75), pp.17116-17121,28
- Taşkın, H., Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Yıldız, S., Büyükalaca, S., 2015. Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. *Hortscience* 50(11):1671–1676.
- Touraev, A., Heberle-Bors E. 1999. Microspore embryogenesis and in vitro pollen maturation in tobacco.In:HallRD(ed.)Methods in molecular biology, vol.111: Plant cell culture protocols. Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp 281–291
- Tuncer, B. ve Yanmaz, R., 2007. Haploid bitki elde etme yollarından biri: mikrospor kültürü. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 06110 Dışkapı-Ankara. Alatarım Cilt,6 Sayı,2.
- Uhrig, H. 1985. Genetic selection and liquid medium conditions improve the yield of androgenetic plants from diploid potatoes. *Theor Appl Genet* 71: 455-460.
- Vagera, J., Havranek, P. 1985. In vitro induction of androgenesis in *Capsicum annuum* L. and Its Genetic Aspects. *Biol Plant*, 27:10-21
- Veilleux, R.E., 1994. Development of new cultivars via anther culture. *Hortscience*, Vol 29 (11):1238-1241
- Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C. and Chien, N.J., 1973. The induction of polen plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. *Sci. Sin* 16: 147-151

- Wang, Y.Y., Kuo, J.S., Li, C.L., Chiang, C.R. A 1981. Preliminary Report on The Study of Pollen Plants of Sweet Peppers (*Capsicum annuum* L. var. *Grossum Bell.*) Proc. Symposium on Plant Tissue Culture. Boston., p 243.
- Ziauddin, A., Simion, E., and Kasha, K.J., 1990. Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley (*Hordeum vulgave* L.) cv. igri Plant Cell Reports 9:69-72.





ÖZGEÇMİŞ

YAĞMUR BENLİ
yagmur-sumer@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2016-2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2007-2012	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya

MESLEKİ ÇALIŞMALAR

Ziraat Mühendisi 2013-2018	Proto Tohum
Ziraat Mühendisi 2012-2013	Yüksel Tohum