

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI GENETİK İLERLEME SEVİYESİNDE BİTKİ KULLANIMININ
BİBER (*Capsicum annuum* L.) ANTER VE MİKROSPOR KÜLTÜRÜNDE
HAPLOİD BİTKİ ELDESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Tuğçe ÖZSAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI GENETİK İLERLEME SEVİYESİNDE BİTKİ KULLANIMININ
BİBER (*Capsicum annuum* L.) ANTER VE MİKROSPOR KÜLTÜRÜNDE
HAPLOİD BİTKİ ELDESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Tuğçe ÖZSAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2013.02.0121.021 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

2014

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI GENETİK İLERLEME SEVİYESİNDE BİTKİ KULLANIMININ
BİBER (*Capsicum annuum* L.) ANTER VE MİKROSPOR KÜLTÜRÜNDE
HAPLOİD BİTKİ ELDESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Tuğçe ÖZSAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Naci ONUS



Prof. Dr. Kenan TURGUT



Doç Dr. Ersin POLAT



ÖZET

FARKLI GENETİK İLERLEME SEVİYESİNDE BİTKİ KULLANIMININ BİBER (*Capsicum annuum* L.) ANTER VE MİKROSPOR KÜLTÜRÜNDE HAPLOİD BİTKİ ELDESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Tuğçe ÖZSAN

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. A. Naci ONUS
Ocak 2014, 63 sayfa

Bu çalışmada 4 farklı genetik ilerleme seviyesindeki biber genotipi kullanılarak, genetik ilerleme seviyelerinin birbirlerinden farklı olmasının anter ve mikrospor kültürlerinde haploid embriyo eldesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla çalışmada kullanılacak olan biber genotiplerine ait tomurcukların sınıflandırması yapılmıştır. Uygun mikrospor aşamasının belirlenmesi amacıyla gruplandırılan tomurcuklar ethidium bromid boyama tekniği kullanılarak boyanmıştır.

Çalışmada anter kültürü için MS, mikrospor kültürü için ise B5 besi ortamları kullanılmış olup, bu temel besi ortamlarına anter kültürü için 4 mg/l NAA + 1 mg/l BA hormon kombinasyonu ilave edilirken, mikrospor kültürü için ise 0.1 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l kinetin hormon kombinasyonu eklenen besi ortamları kullanılmıştır.

Çalışmanın anter kültürü kısmında anterlere 8 gün süreyle +35 °C sıcaklık ön uygulaması işlemi yapılmıştır. Mikrospor kültürü kısmında ise mikrosporlara haploid embriyo oluşumunu uyartmak amacıyla anterlerin kültüre alınmasından önce ilk 7 gün boyunca +32 °C sıcaklık ve 0.3 M mannitol içeren ortamda bekletilmesiyle ön uygulama işlemi yapılmıştır. Kültürü tamamlanan anter kültürüne ait petriyerler 25 °C, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks aydınlatmaya sahip olan büyüme odasına alınırken, mikrospor kültürüne ait petriyerlerin ise 25 °C'de karanlık koşullarda kültürlerinin devamlılığı sağlanmıştır.

Çalışmada sıcaklık ön uygulamalarının ve açlık ön uygulamasının herhangi bir etkisi gözlemlenmemiş olup, elde edilen sonuçlarda kallus, embriyo benzeri yapılar ve embriyoların oluştuğu saptanmıştır. Çalışılan genotipler arasında anter kültürüne gösterdikleri tepki bakımından F₄ hattına ait anterlerin %15.07 oranında torpedo embriyo oluşturması dolayısıyla en başarılı genetik ilerleme seviyesinde olduğu saptanmıştır. Mikrospor kültüründe yapılan değerlendirmelere göre ise çalışılan genotipler bazında bakıldığında yine F₄ hattının % 13.89 embriyo oluşum oranı ile mikrospor kültürüne en iyi tepkiyi veren genotip olduğu belirlenmiştir. Kullanılan diğer genotiplerde farklı oranlarda kallus oluşumu gözlemlenirken, embriyo oluşumu saptanmamıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Biber, haploidi, anter kültürü, mikrospor kültürü, farklı genetik ilerleme seviyesinde bitki

JÜRİ: Prof. Dr. A. Naci ONUS (Danışman)

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Doç Dr. Ersin POLAT

ABSTRACT

THE EFFECTS OF PLANT USE AT DIFFERENT GENETIC LEVELS ON HAPLOID PLANT PRODUCTION IN PEPPER (*Capsicum annuum* L.) ANTHER AND MICROSPORE CULTURE

Tuğçe ÖZSAN

MSc Thesis in Agriculture Engineering
Supervisor: Prof. Dr. A. Naci ONUS
January 2014, 63 pages

This study was conducted to reveal the effects using pepper lines at four different genetic levels on haploid embryo formation in anther and microspore culture.

For this purpose, pepper genotypes buds were classified by staining ethidium bromide dye technique in order to determinate the suitable anther and microspore development stage.

In this study, MS basic media, supplemented with 4 mg/l NAA + 1 mg/l BA, was used for anther culture whereas B5 basic media with the combination of 0.1 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l kinetin was used for microspore culture.

At anther culture of study, anthers were subjected to heat pretreatment during for 8 days at +35 °C temperature. At microspore culture of study, for first 7 days heat pretreatment and carbohydrate starvation treatment at 32 °C were applied to promote the haploid embryo formation by stimulating microspores. Petri dishes belong to anther culture were transferred to growth chamber having 25 °C, 16 h light/8 h dark photoperiod and 3000 lux illumination whereas petri dishes belong to microspore culture were maintained in 25 °C in dark conditions.

No positive effects of heat pretreatments and carbohydrate starvation treatment on embryo formation was observed in the study. On the other hand callus, embryo like structures and embryos were obtained and recorded. In terms of their response to anther culture among genotypes studied, anthers of F₄ plants gave theorpedo embryos at the rate of 15.07% and determined as the most suitable genetic level. According to the assessment made in the microspore culture, F₄ plants had the best results as in anther culture with 13.89% embryo formation.

KEYWORDS: Pepper, haploidy, anther culture, microspore culture, plants at different genetic level

COMMITTEE: Prof. Dr. A. Naci ONUS (Supervisor)

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Assoc. Prof. Dr. Ersin POLAT

ÖNSÖZ

Solanaceae familyasına ait bir sebze türü olan biber bitkisi, ülkemizde ve bölgemizde ekonomik açıdan çok büyük bir öneme sahiptir. Bölgemizde yaygın olarak yapılan sera yetiştiriciliğinin yanı sıra açıkta da üretimi yapılmaktadır.

Seradaki yetiştiriciliğinde hastalık, zararlı, şekil bozuklukları ve meyve tutum oranının düşük olması gibi birtakım problemlerle karşılaşabilmektedir. Biber yetiştiriciliğinde karşılaşılan bu sorunların üstesinden gelmek için klasik ıslah yöntemleri yoluyla dayanıklı, kalite ve verimi yüksek yeni çeşit eldesi yoluna gidilmektedir. Ayrıca diğer sebzelerin yetiştiriciliğinde olduğu gibi biber bitkisinin yetiştiriciliğinde de F₁ hibrit tohumların kullanımı söz konusu olduğundan sebze ıslahı dolayısıyla biber ıslahı ön plana çıkmıştır.

Biyoteknolojik yöntemlerin klasik ıslah yöntemlerine entegre edilmesi ile uzun süre alan yeni çeşitlerin ıslah süresi kısaltılabilir ve kolaylaştırılabilir. Bu amaçla kullanılacak olan en etkili biyoteknolojik yöntemlerin başında haploid bitki eldesinde kullanılan teknikler gelmektedir. Haploid bitki eldesi çalışmaları denildiği zaman ilk akla gelen yöntemler olan anter ve mikrospor kültürleri, ıslah süresini kısaltmaları bununla beraber klasik ıslah çalışmalarında görülmesi uzun zaman alan özelliklerin görülebilmesini sağlamalarının yanı sıra yeni çeşit geliştirmeye yönelik ıslah çalışmalarında yararlanılabilen önemli tekniklerdir.

Bu çalışmanın amacı genetik ilerleme seviyeleri bakımından farklılık gösteren bitkilerin kullanılmasıyla anter ve mikrospor kültürlerinde haploid embriyo ve bitki eldesi üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışma konumun belirlenmesinden başlayarak, çalışmanın her aşamasında tecrübe ve deneyimleri ile beni yönlendiren, bu konuda çalışmaya olanak sağlayan, çalışmalarım boyunca değerli fikirlerini, ilgi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Naci ONUS'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini paylaşmayı esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi hocam Sayın Prof. Dr. Kenan TURGUT'a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Esmanur ÇETİNKAYA'ya, Deniz ŞALCIOĞLU'na ve emeği geçen diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda kullandığım bitkilerin temini konusunda gösterdikleri çabalarından ötürü GENTO Tohumculuk Firması'na, Ziraat Yüksek Mühendisi Ahmet SEÇİM'e ve Hülya ÜNAL'a ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışmayı başarıyla gerçekleştirmem için gerekli malzemelerin alınmasını maddi yönde destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, tüm yaşamımda olduğu gibi çalışmam sırasında da sonsuz anlayış, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemedi, sabır ve özveri ile beni destekleyen annem Duygu ÖZSAN'a, babam Gürkan ÖZSAN'a ve mesleğimi seçmemde ve severek yapmamda en büyük etkiye sahip olan, benimle gurur duyduklarını bildiğim merhum dedelerim Ziraat Yüksek Mühendisi Bilal ÖZSAN'a ve Ziraat Yüksek Mühendisi Nurettin GİRĞİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	8
2.1. Anter Kültürü ile ilgili Kaynak Taramaları.....	8
2.2. Mikrospor Kültürü ile İlgili Kaynak Taramaları.....	16
3. MATERYAL ve METOT.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Denemede kullanılan genotipler ve özellikleri.....	22
3.2. Metot.....	24
3.2.1. Kültür sırasında kullanılan malzemeler.....	24
3.2.2. Kültürlerde kullanılan besi ortamları ve hazırlanışları.....	25
3.2.2.1. Anter kültürü için kullanılan besi ortamları.....	25
3.2.2.2. Mikrospor kültürü için kullanılan besi ortamları.....	26
3.2.3. Çiçek tomurcuklarının toplandığı aşama.....	27
3.2.4. Toplanan çiçek tomurcuklarının sınıflandırılması.....	27
3.2.5. Tomurcuk gelişim evresi ve mikrospor gelişme döneminin belirlenmesi.....	27
3.2.6. Çiçek tomurcuklarının yüzey sterilizasyonu.....	28
3.2.7. Anter kültürü aşamaları.....	28
3.2.7.1. Anterlerin kültüre alınması.....	28
3.2.7.2. Petrilere sıcak uygulaması.....	29
3.2.8. Kültür sonrası uygulamalar ve inkübasyon koşulları.....	30
3.2.9. Mikrospor kültürü aşamaları.....	31
3.2.9.1. Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi.....	31
3.2.9.2. Anterlere karbonhidrat açlığı ve ön sıcaklık uygulamaları.....	31
3.2.9.3. Mikrosporların izolasyonu ve kültüre alınması.....	31
3.2.10. Embriyoların ve kallusların rejenerasyon ortamına alınması.....	32
3.2.11. Sonuçların değerlendirilmesi.....	32
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	34
4.1. Uygun Tomurcuk Büyüklüğünün Saptanması.....	34
4.2. Anter Kültürü Uygulamasından Elde Edilen Sonuçlar.....	42
4.3. Mikrospor Kültürü Uygulamasından Elde Edilen Sonuçlar.....	49
5. SONUÇ.....	57
6. KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrad derece
cm	santimetre
cm ²	santimetre kare
g	gram
l	litre
mg	miligram
kg	kilogram
M	Molar
ml	mililitre
mm	milimetre
rpm	dakikadaki devir sayısı (revolution per minute)
µm	mikrometre
%	yüzde

Kısaltmalar

2,4-D	2,4 Diklorafenoksi Asetik Asit
ABA	Absisik asit
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
B5	Gamborg besi ortamı (1968)
BA	Benzil Adenin
BAP	Benzil Amino Pürin
C	Dumas de Vaulx başlangıç ortamı
CaCl ₂	Kalsiyum klorid
CoCl ₂ .6H ₂ O	Cobalt Klorid Hekzahidrat
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır (II) sülfat pentahidrat
CP	Dumas de Vaulx başlangıç ortamı
DAPI	4', 6-diaminido-2-phenylindole
DH	Double haploid
EtBr	Ethidium bromide
FeNaEDTA	Sodyum Ferrik Etilen-diamintetraasetat
H ₃ BO ₃	Borik asit
HCl	Hidroklorik Asit
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
KI	Potasyum iyodid
KNO ₃	Potasyum Nitrat
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MnSO ₄ .H ₂ O	Manganez Sülfat Monohidrat
MS	Murashige ve Skoog besi ortamı (1962)
NAA	Naftalen Asetik Asit

NaH ₂ PO ₄	Sodyum Dihidrojen Fosfat
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Sodyum Molibdat Dihidrat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NH ₄ NO ₃	Amonyum Nitrat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
NLN	Nitsch ve Nitsch (1967) tarafından geliştirilen Lichter (1981, 1982) tarafından modifiye edilen besi ortamı
R	Dumas de Vault rejenerasyon ortamı
RLFP	Restriction fragment length polymorphism
SW5	Spotted White (Biberlerde görülen bir virüs hastalığı)
UV	Ultraviyole
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Çinko Sülfat Heptahidrat
F ₁	Filial Generation 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Anterlerden haploid bitki oluşum yolları.....	6
Şekil 1.2. Mikrospor kültürü ve anter kültürünün şematik gösterimi (Reynolds 1997'den uyarlanmıştır).....	6
Şekil 3.1. Donör bitkilerin alındığı seradan bir görünüm.....	20
Şekil 3.2. Dikilen donör bitkilerin ilk haftalarından bir görünüm.....	21
Şekil 3.3. Donör bitkilerden tomurcukların toplanması.....	21
Şekil 3.4. F ₁ biber çeşidi.....	22
Şekil 3.5. Standart biber çeşidi.....	22
Şekil 3.6. F ₆ biber genotipi.....	23
Şekil 3.7. F ₄ biber genotipi.....	23
Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan steril kabin.....	24
Şekil 3.9. Pensler ve bistirüleri (a) ve glass bead (b).....	25
Şekil 3.10. Bilgisayarlı görüntüleme sistemi.....	28
Şekil 3.11. Kurutma kağıdına alınan tomurcuklar.....	29
Şekil 3.12. Anterlerin tomurcuğun diğer kısımlarından ayrılması.....	29
Şekil 3.13. Bir tomurcuğa ait anterler (a), (b).....	29
Şekil 3.14. Çalışmada kullanılan inkübatör.....	30
Şekil 3.15. İnkübatörde ön sıcaklık uygulamasına koyulan petripler.....	30
Şekil 3.16. Çalışmada kullanılan büyüme odası.....	30
Şekil 3.17. İzolasyon esnasında kullanılan elek.....	31
Şekil 3.18. Serbest hale geçen mikrosporlar (a), elekten geçirilen süspansiyon (b), santrifüjleme işleminden sonra santrifüj tüpüne çökelen mikrosporlar (c).....	32
Şekil 3.19. Santrifüj aleti.....	32
Şekil 3.20. Orbital çalkalayıcı.....	32

Şekil 4.1. Standart çeşide ait çiçek tomurcuklarının sınıflandırması (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. grup, c ve c': 2. grup, d ve d': 3. grup, e ve e': 4. grup, f ve f': 5. grup tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü).....	36
Şekil 4.2. F ₁ çeşide ait çiçek tomurcuklarının sınıflandırması (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. grup, c ve c': 2. grup, d ve d': 3. grup, e ve e': 4. grup, f ve f': 5. grup tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü).....	37
Şekil 4.3. F ₆ genotipine ait çiçek tomurcuklarının sınıflandırması (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. grup, c ve c': 2. grup, d ve d': 3. grup, e ve e': 4. grup, f ve f': 5. grup tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü).....	38
Şekil 4.4. F ₄ genotipine ait çiçek tomurcuklarının sınıflandırması (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. grup, c ve c': 2. grup, d ve d': 3. grup, e ve e': 4. grup, f ve f': 5. grup tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü).....	39
Şekil 4.5. Standart biber çeşidinde görüntülenen tek çekirdekli yapı (10x4).....	40
Şekil 4.6. F ₁ biber çeşidinde görüntülenen tek çekirdekli yapı (10x4)	41
Şekil 4.7. F ₆ biber genotipinde görüntülenen tek çekirdekli yapı (10x4)	41
Şekil 4.8. F ₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterden gözlemlenen embriyo benzeri oluşumlar ve torpedo embriyolar (a) ve bu oluşumların yakın görünümü (b) (T.E = torpedo embriyo; E.B.Y = embriyo benzeri yapı) (10x4).....	44
Şekil 4.9. F ₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterden gözlemlenen embriyo benzeri oluşumlar (E.B.Y = embriyo benzeri yapılar) (10x4).....	45
Şekil 4.10. F ₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde oluşan kallus (10x4).....	45
Şekil 4.11. F ₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde oluşan kallus ve embriyo benzeri yapılar (a), torpedo embriyolar ve embriyo benzeri yapılar (b) (10x4).....	46
Şekil 4.12. F ₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde oluşan kallus, embriyo benzeri yapılar ve torpedo embriyo oluşumları (a), embriyo benzeri yapılar ile torpedo embriyoların yakından görünümü (b) (10x4).....	47
Şekil 4.13. F ₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde oluşan	

kallus ve torpedo embriyo (a), torpedo embriyo oluşumunun yakın görünümü (b) (10x4).....	48
Şekil 4.14. F ₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde kallus oluşumu (10x4).....	49
Şekil 4.15. Hormonsuz besi ortamında mikrospordan embriyogenik kallus oluşumu (10x4)	52
Şekil 4.16. Yeni besi ortamına aktarıldıktan sonra yaşamayan embriyogenik kallus (10x4).....	52
Şekil 4.17. Hormon içeren besi ortamında embriyogenik kallus oluşumu (10x4).....	53
Şekil 4.18. Hormon içeren besi ortamında mikrospordan torpedo embriyo oluşumu (10x4).....	53
Şekil 4.19. Embriyogenik kallus ve torpedo embriyo yapısı (10x4)	54
Şekil 4.20. B5 temel besi ortamında gelişen embriyo (10x4).....	55
Şekil 4.21. B5 temel besi ortamında oluşan embriyolar (10x4)	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Biber bitkisinin sistematigi ve botanik sınıflandırması (Krishna 2003).....	2
Çizelge 3.1. Murashige ve Skoog temel besi ortamının içeriği (Murashige ve Skoog 1962).....	25
Çizelge 3.2. B5 temel besi ortamının içeriği (Gamborg vd 1968).....	26
Çizelge 4.1. Tomurcukların sınıflandırılması.....	35
Çizelge 4.2. Biber genotiplerine ait anterlerin anter kültürüne verdikleri yanıtlar.....	43
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan biber genotiplerine ait petrielerde genotiplerin mikrospor kültürüne verdikleri yanıtlar.....	50

1. GİRİŞ

İnsanlığın varoluşundan bu yana bitkiler, insan beslenmesinde çok önemli bir yere sahip olmuştur. Sebzelerin insan beslenmesindeki öneminin anlaşılmasından sonra bu konu üzerinde yapılan araştırmalarda artış yaşanmıştır. İnsanoğlunun yeterli ve dengeli bir şekilde beslenerek yeryüzündeki varlığını devam ettirebilmesi için, nüfus artış hızının kontrol altında tutulmasının yanı sıra özellikle bitkisel besin maddeleri üretiminin artırılması gerekmektedir.

Günümüzde bitki fizyolojisi, bitki biyokimyası ve moleküler biyoloji alanlarında yaşanan hızlı gelişmeler sayesinde birtakım sorunların önüne geçilmeye çalışılmakta ve bazı yeni tekniklerin kültürü yapılan bitkilere de uygulanabilmesiyle ıslah alanında önemli gelişmeler kaydedilmektedir.

Bitki organ, doku ve hücrelerinin steril suni besin ortamlarında kültüre alınması ve genetik olarak değiştirilme tekniklerinden oluşan teknikler bütünü olarak bilinen Bitki Biyoteknolojisi kavramı, bitkisel üretimde uygulanan klasik ıslah yöntemleriyle çözümü güç olan problemlerin çözümünde alternatif yaratan, daha ekonomik, kalite ve verim yönünden daha yüksek bitkisel üretimin gerçekleştirilmesini amaçlar.

Türkiye sebze üretim miktarı dünya bazında değerlendirilecek olursa; Çin, Hindistan ve ABD'den sonra yıllık 26 milyon ton sebze üretimi ile dördüncü sırada yer almaktadır (Abak vd 2010). Hem miktar hem de tür sayısı bakımından ülkemizde yetiştirilen sebzelerin büyük çoğunluğu *Solanaceae* familyasına aittir. Bu familya içerisinde ise biber (*Capsicum annuum* L.) domatesten sonra yetiştiriciliği en fazla yapılan üründür (Aktaş vd 2009).

Solanaceae familyasına ait bir sebze türü olan biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisi gerek içerdiği besin ve mineral maddeler bakımından gerekse ekonomik önemi bakımından ülkemizde ve yetiştiriliş alanları açısından bölgemizde oldukça önemli bir yere sahiptir.

2011 verilerine göre, dünya toplam biber üretim miktarı yaklaşık 29.6 milyon ton olup, Türkiye biber üreticisi ülkeler sıralamasında 15.5 milyon ton üretim miktarı ile Çin ve 2.1 milyon ton ile ikinci sırada yer alan Meksika'dan sonra 1.9 milyon ton üretim miktarı ile üçüncü büyük biber üreticisi ülke konumundadır (Anonim 2011).

Araştırmacılar ve botanikçiler biberin anavatanının tropikal Amerika olduğunu, buradan dünyaya yayıldığını kabul etmektedirler (Vural vd 2000). Ilıman iklim şartlarında tek yıllık olarak gelişen ve birinci yıl içinde büyüme ve gelişmesini tamamlayarak meyve ve tohumlarını meydana getiren bir sebzedir. Tropik iklim şartlarında ise çok yıllık kültür bitkisi olarak gelişmeye devam ederek birkaç yıl daha verimliliğini devam ettirmektedir (Şalk vd 2008).

Botanikçilerin yaptıkları çalışmalara göre *Capsicum* cinsine ait tüm türler tanımlanmamış olup, günümüze kadar ulaşan bu çalışmaların ışığında 25 - 30 *Capsicum* türü bulunduğu bilinmektedir. Bunlar arasında subtropikal ve ılıman iklim ülkelerindeen

yaygın olan 5 tür *C. annuum* L., *C. frutescens* Mill., *C. baccatum* L., *C. chinense* ve *C. pubescens* bulunmaktadır (Pickersgill 1997, Lantos vd 2012).

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

Âlem	Plantae (Bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım	Solanales
Familya	<i>Solanaceae</i> (Patlıcangiller)
Cins	<i>Capsicum</i> L.

Biber orta derinlikte kök sistemine sahiptir. Bitkinin kökü başlangıçta kazık kök şeklinde gelişme gösterir ve daha sonra kazık kök 10-15 cm büyüklüğüne ulaşınca kök sistemi saçak kök şeklinde gelişmesine devam eder. Gövdesi, bitkinin ilk gelişmesi esnasında otsu bir yapıya sahipken, bitki yaşlandıkça yarı odunsu bir yapı kazanır. Gövde üzeri parlak ve tüysüz olup, bazen üzerinde antosiyanin oluşumu görülebilir. Yaprak rengi çeşide göre değişmekle birlikte, açık ve koyu yeşil arasında değişim gösterir. Bazı çeşitlerde antosiyanin oluşumu sebebiyle yapraklar mor renge kadar dönüşebilir. Erselik yapıdaki çiçeklerinde, 5 adet çanak yaprak, 5 adet taç yaprak, 5 adet erkek organ ve 1 adet dişi organ bulunur. Erkek ve dişi organın olgun hale gelmeleri bakımından çeşitler arasında farklılık olmakla birlikte bu durum %7.6 - 36.8 arasında değişen miktarlarda yabancı dölllenme görülmesinin sebebidir. Meyvelerinde, acılık maddesi olan capsaicin ($C_{18}H_{28}NO_3$) alkaloidi bulunmaktadır ve aynı zamanda meyveleri C vitamini bakımından da oldukça zengindir (Şalk vd 2008).

Türkiye'de biber üretimi sera ve açık alanda olmak üzere birçok bölgede yapılmaktadır. Yüksek ve düşük sıcaklıklar ile hastalık ve zararlı etkileri biber üretiminde kalite ve verimi etkileyen problemler arasındadır. Kalite ve verimi arttırmak açısından böylesi çevresel faktörlere karşı dayanıklı türlerin geliştirilmesi çok büyük önem taşımaktadır. Birçok araştırmacı yeni hibrit tiplerinin geliştirilmesinde geleneksel ıslah metotlarını kullanmakta, ancak bu süreç uzun zaman gerektirmektedir (Taşkın vd 2011).

Biber bitkisi yüksek derecede yabancı tozlanma göstermekte ve buna bağlı olarak karakteristik özelliklerini hızla kaybettiği görülmektedir (Vural vd 2000). Bu problemin çözümünde rol alan uzun bir süreci gerektiren geleneksel ıslah metotlarından ziyade daha kısa sürede çözüme kavuşturulmasını sağladığından dolayı ıslahçılar F₁ hibrit ıslahı üzerine yoğunlaşmıştır.

Üretim alanı ve miktarı bakımından tarım potansiyelimizde önemli yeri olan biber çeşitlerinin, örtüaltında yetiştirilenlerinin tamamına yakını hibrit çeşitlerden oluşmaktadır. Son yıllarda verimin daha fazla olması sebebiyle, biber bitkisinin serada yetiştiriciliğinin popüler hale gelmesi ve yetiştiricilikte F₁ tohum kullanımının artması ile birlikte, biber ıslahı ön plana çıkmıştır. Ülkemizde ve özellikle de bölgemizde önemli düzeyde yetiştiriciliği yapılan biberin daha ekonomik, kalite ve kantite yönünden daha yüksek üretiminin sağlanması, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı

hale getirilmesi ve gelecekteki olası tüketim alışkanlıklarına uygun olarak ıslah edilmesi gerekmektedir. Buna bağılı olarak biber bitkisine yönelik ıslah programlarının en temel amaçlarından birisi de pazarlanabilir yeni çeşitlerin geliştirilmesi ve üstün nitelikli yeni çeşitlerin elde edilerek dışarıya bağımlı olunmaması olarak karşımıza çıkmaktadır. Hedeflenen bu ıslah amaçlarına ulaşmada ise ülkemizde klasik ıslah yöntemlerinin yanı sıra çeşitli biyoteknolojik yöntemler kullanılarak uzun süre alan yeni çeşitlerin ıslah süreci kısaltılabilmekte; daha kaliteli ve daha verimli bitkisel üretim gerçekleştirilebilmektedir.

Günümüzde biyolojik konularda geniş olanaklar sağlayan biyoteknolojinin önemli dallarından birisi olan bitki doku kültürü teknikleri bitki ıslahçalarına büyük kolaylıklar sağlamaktadır (Sayılır ve Özzambak 2005).

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları = eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir (Babaoğlu vd 2001).

Doku kültürü teknikleri içerisinde haploid bitki üretimini sağlayan anter ve mikrospor kültürleri bitki ıslah çalışmalarına hizmet etmesi yönünden önemli bir yere sahiptir. Haploidi tekniği ıslah sürecini kısalttığı için sebze ıslahında özellikle de biber ıslahında geniş uygulama alanı bulmuştur. Klasik yolla yapılacak bir ıslah çalışmasında istenilen amaca ulaşılabilmesi çok uzun süre almaktadır (Segui-Simarro vd 2011). Biberde *in vitro* anter veya mikrospor kültürleri kullanılarak androgenesis yoluyla haploid bitkiler elde edilmekte ve bazı kimyasallarla bu haploidler "doubled haploid" duruma getirilerek, 2-3 yıl gibi kısa bir sürede, ıslah programlarında yer alacak olan mutlak homozigot hatlar sağlanabilmektedir (Çağlar vd 2004). Böylece ıslah süresi kısaltmakta ve klasik ıslahta zaman alan veya görülmesi mümkün olmayan resesif genlerin kontrol ettiği özellikler ortaya çıkmaktadır.

Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler adı verilmektedir. Haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması sayesinde %100 homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir. Böylece uzun yıllara gereksinim duyan saflaştırma işlemi, birkaç ay gibi kısa bir sürede yapılabilmekte; kombinasyon ıslahı ve F₁ hibrit çeşit ıslahı programlarında zaman yönünden önemli düzeyde kazanç sağlanabilmektedir (Ellialtıoğlu vd 2001).

Pochard ve Dumas de Vaulx'un (1971) bildirdiğine göre haploid bitkiler; kök, gövde, dal, yaprak, çiçek ve hatta meyvelere de sahip olabilen, ancak hücrelerinde taşıdığı kromozom sayısı açısından indirgenmiş gamet yapısı gösteren bitkilerdir. Hücreleri diploidlere göre daha küçük olup bitkilerin boyları daha kısa, yaprakları daha dardır. Çiçekleri küçük ve polen oluşturmaması nedeniyle kısırdır (Biner 1998).

Haploid bitkilerin ıslah programlarında kullanılabilmesi için bunların yeniden verimli diploid bitkilere dönüştürülmeleri gerekmektedir. Haploid bir bitkinin kromozom sayısının bazı kimyasal maddelerle katlanması sonucu, türün normal kromozom sayısına yeniden kavuşturulması ve mutlak homozigot bitkilerin elde

edilmesine dihaploidizasyon, bu yolla geliştirilen hatlara da dihaploid hat denilmektedir. Dihaploidizasyon tekniği; arpa, buğday, mısır, çeltik, kolza, biber, patlıcan, *Brassica* türleri, gerbara, kavun, karpuz, kabakta yaygın olarak kullanılmaktadır (Ellialtıoğlu vd 2001).

Ellialtıoğlu vd (2001) haploid bitkilerin ıslah çalışmalarında araştırmacılara sağladığı avantajları şu şekilde gruplandırmışlardır:

- Haploidleri kullanmanın en başta gelen avantajı, tam bir homozigotiyi çok kısa bir sürede elde etme olanağını sunmasıdır. Dihaploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmalarını yapmak kolaylaşmakta ve sonuca daha çabuk ulaşılabilir. Haploidler kullanmanın en başta gelen avantajı, tam bir homozigotiyi çok kısa bir sürede elde etme olanağını sunmasıdır. Dihaploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmalarını yapmak kolaylaşmakta ve sonuca daha çabuk ulaşılabilir.
- Resesif genler, dominant genler tarafından maskelenemeyeceğinden, homozigot bireylerde genetik açılımı izlemek daha basit bir işlem haline gelmektedir.
- Homozigot bitkilerin üretimi özellikle dioik türlerde ve kendine uyumsuzluk sorunu bulunan bitkilerde zor olup anter kültürü, bu bakımdan büyük kolaylık sağlamaktadır.
- Yabancı döllenmiş türlerde heterozigot oranı çok yüksek olduğundan bunlarda homozigot hatların elde edilmesi için 10-12 generasyon boyunca kendilemeler yapmak gerekmektedir; kendine döllenmiş türlerde bile aynı amaçla 5-7 generasyon kendileme işlemine gereksinim duyulmaktadır.
- F₁ hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde homozigot hatlar arasında üstün kombinasyon yeteneği verenlerinin belirlenmesi yöntemi kullanıldığından, haploidinin hibrit çeşit ıslahında özel bir önemi bulunmaktadır.
- Yonca ve patates gibi tetraploidlerin bulunduğu türlerde haploidizasyon, diploid bitkilerin üretiminde kullanılabilir. Elde edilen diploidler ticari olarak ilginç olabileceği gibi; bu yolla bazı tetraploid ürünlerde; yabancı türler ile kültür çeşitleri arasında diploid seviyede melezleme yaparak kombinasyon yoluna gidilmektedir.
- Kombinasyon ıslahında da sonuca çok kısa sürede ulaşmayı sağlayan haploidi sayesinde, F₁ kademesindeki melez bitkilerden haploid çekerek; farklı genotiplerde bulunan ve tek bir genotipte toplanması arzu edilen özelliklere sahip bitkiler kazanmak mümkündür.
- Haploidi, resesif mutasyonların açığa çıkartılması ve bunlardan homozigot bireylerin elde edilmesini de sağlayabildiği gibi; somatik hibridizasyon işleminin diploid protoplastlara göre daha kolay yapılabilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca iki haploid protoplastın birleşmesinin sonucu "diploid" olacağından; protoplast kültürü kullanılarak yapılan somatik hibridizasyon tekniğinin bilinen dezavantajlarının büyük bir kısmı böylece ortadan kalkacaktır.

- DH hatların güncel uygulamalarından biri de gen haritalarının çıkartılmasında kullanımlarıdır. DH hatlardan oluşan bir populasyonda; heterozigoti nedeniyle ortaya çıkan intermediyer ekspresyonlara rastlanmaz. Bu nedenle de fenotipik işaretleyicilerin (marker) tanımlanması çok daha etkin olabilmektedir. DH hatlarda herhangi bir gen, ister bitki isterse marker seviyesinde olsun (genellikle RFLP ile belirlenmektedir); 1:1 oranında açılacaktır. Bu durum, özellikle poligenik olarak kontrol edilen bir karakterin haritası çıkartılıyorsa önem taşımakta ve kolaylık sağlamaktadır.

Haploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılan başlangıç materyalleri gametlerdir. Esas olarak, haploidlerin elde edilebilmesi için iki yöntem bulunmaktadır: ya embriyo kesesindeki haploid yapıdaki hücrelerin (çoğunlukla yumurta hücresinin) uyarılması sayesinde dişi gametten; ya da polen rejenerasyonu yoluyla erkek gametten *in vitro* koşullarda bitki oluşumunu sağlamaktır (Ellialtıoğlu 2000).

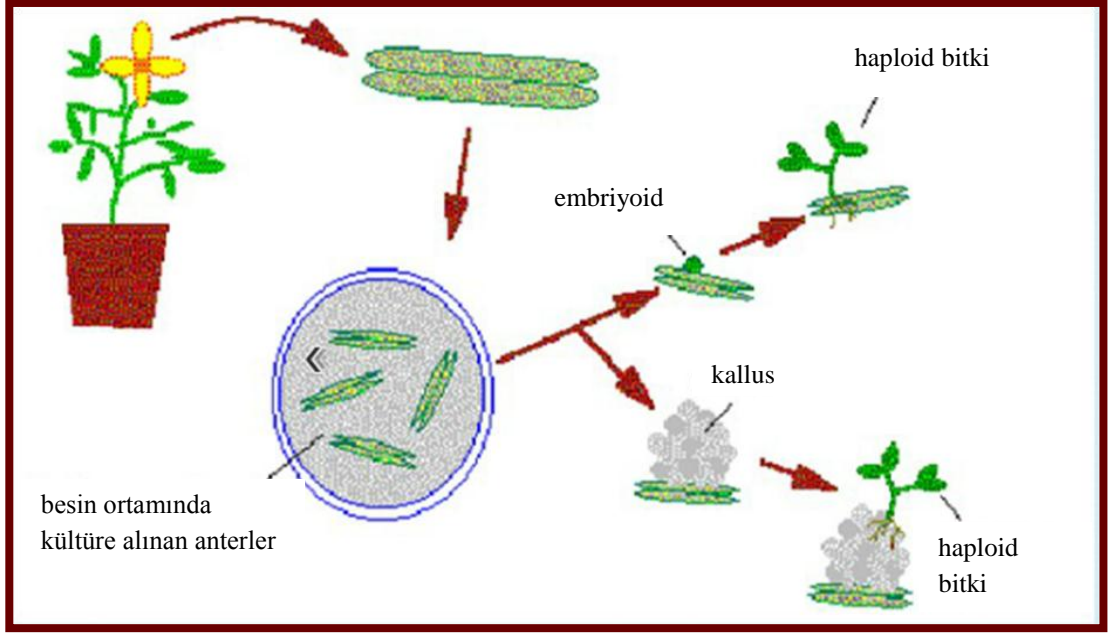
Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler, erkek gametten haploid bitki elde etme yöntemi (androgenesis) için uygun başlangıç materyalleridir. Bu anterlerin *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla anter kültürü veya bu anterlerdeki mikrosporların izole edilerek *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla mikrospor kültürü yapılabilmektedir.

Anter kültürü esas olarak; içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulunduran anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesi olayına verilen isimdir. Erkek gametten haploid embriyo elde etmek amacıyla anter kültürü kullanılabilirdiği gibi, anterlerin içerisinden çıkartılan (izole edilen) mikrosporların da kültürü yapılabilmektedir. Olgunlaşmamış mikrosporların, anter içerisinden izole edilerek *in vitro* koşullarda özel hazırlanmış besin ortamlarında geliştirilmesi ve bunlardan haploid embriyoların elde edilmesi işlemine 'mikrospor kültürü' adı verilmektedir (Ellialtıoğlu vd 2001).

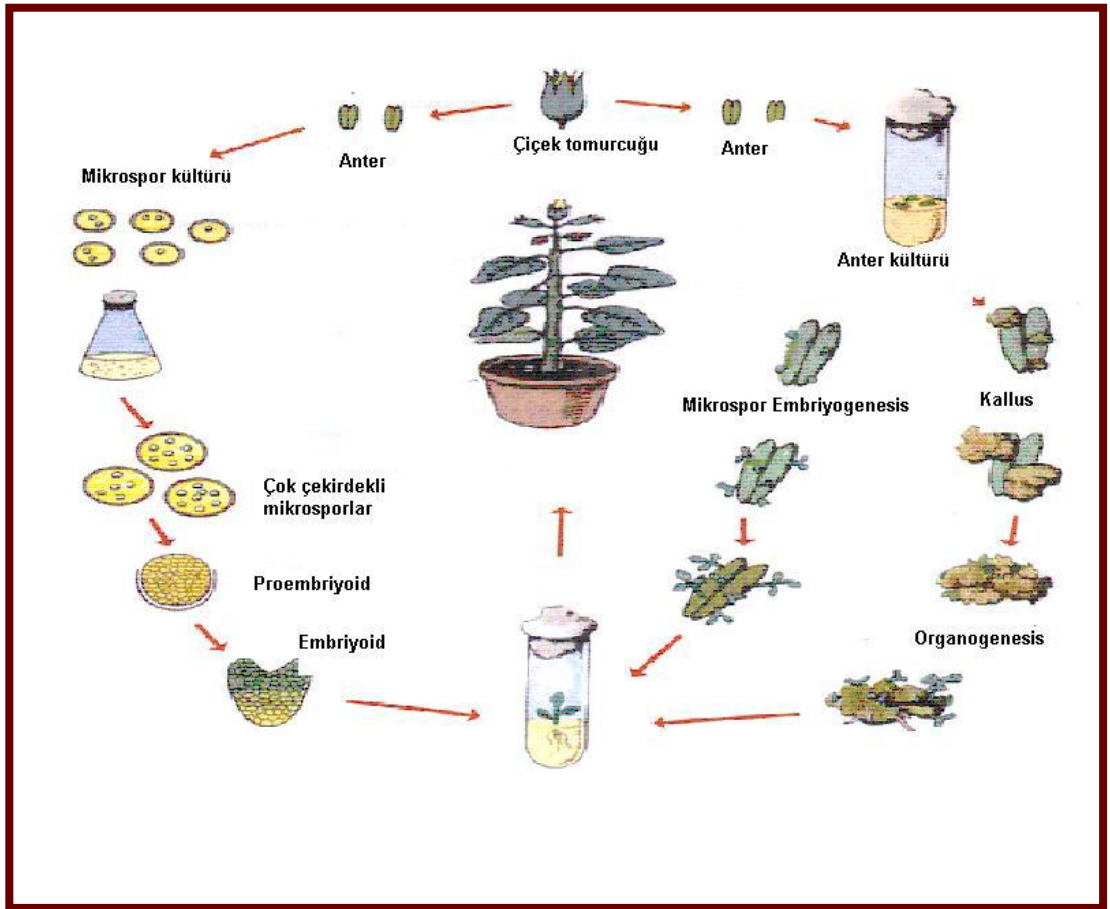
Anterlerden haploid bitki oluşumu başlıca iki yolla olmaktadır (Bajaj 1990a).

1. Direkt androgenesis: Polen tanesinden yani mikrospordan bir embriyo farklılaşması oluşmaktadır (embriyogenesis).

2. İndirekt androgenesis: Önce polen tanesinden bir kallus gelişimi olmakta ve daha sonra embriyo ya da sürgün rejenerasyonu gerçekleşmektedir (organogenesis).



Şekil1.1. Anterlerden haploid bitki oluşum yolları



Şekil1.2. Mikrospor kültürü ve anter kültürünün şematik gösterimi (Reynolds 1997'den uyarlanmıştır)

Mikrospor kültür tekniği anter kültürüne göre daha karmaşık olmasına rağmen birçok türde daha başarılı sonuçlar verebilmekte ve çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu avantajları şu şekilde sıralamak mümkündür:

- Anter duvarı uzaklaştırıldığı için oluşan embriyoların somatik dokulardan meydana gelme riski bulunmamakta (Ferrie ve Caswell 2011), bu teknikle oluşan tüm embriyo formlarının kesin olarak mikrospordan türemesi dolayısıyla rejenere olan bitkilerin tümü ya haploid ya da DH olmaktadır (Kim vd 2008).
- Anter dokularında bulunan mikrosporları olumsuz yönde engelleyici maddeler ortamdaki uzaklaştırıldığı için sorun olmaktan çıkar.
- Mikrosporlar ortamdaki besin maddeleri ile doğrudan temas halinde olduklarından besin maddelerini daha iyi bir şekilde alabilmektedir.
- Mikrospor kültürü mikrosporların olgunlaşması ve embriyo gelişiminin çalışılması ve izlenmesi için daha üstün bir metot sağlar (Ferrie ve Caswell 2011).

Sebzelerde anter kültürü ile ilgili birçok başarılı çalışma yapılmıştır. *Solanaceae* familyasında yer alan biber bitkisi de birçok anter kültürü ve mikrospor kültürü çalışmasına konu olmuştur. Bu çalışmalardan ortaya çıkan ortak görüş ise, anter ve mikrospor kültürlerinde başarıyı etkileyen birçok faktör olduğudur. Bu faktörlerin her koşul ve her bitki için araştırılması ve optimize edilmesi gerektiği de belirtilmektedir (Bajaj 1990b).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak F_1 veya değişik genetik ilerleme kademelerinde bulunan genotipler üzerinde anter ve mikrospor kültürü çalışmaları yapılmış olmakla beraber, farklı genetik ilerleme seviyesindeki bitkilerin aynı anda mikrospor ve anter kültürüne tepkileri detaylı olarak çalışılmamış ve ortaya konmamıştır. Bu çalışmada standart, F_1 , F_4 ve F_6 seviyesindeki ekonomik değeri yüksek olan biber bitkilerinin haploid bitki eldesi üzerine etkileri ortaya konularak bu konuda literatür alanındaki açık kapatılmaya çalışılmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Anter Kültürü ile İlgili Kaynak Taramaları

Bitki ıslahı kavramı, belirli bir bitkisel materyalden hareket ederek, üreme yeteneği olan ve daha üstün bazı özellikler taşıyan yeni bitki grupları yaratmak amacıyla yapılan tüm işlemleri içine alır. Genelde "doku kültürü" olarak adlandırılan "*in vitro*" yetiştirme teknikleri, geleneksel ıslah yöntemlerinde karşılaşılan sorunların bir kısmının çözümünde önemli kolaylıklar sağlamakta, uzun ıslah sürecini kısaltmakta ve zaman tasarrufu sağlamaktadır. Bitki doku kültürleri konusunda Dünya' daki ilk çalışmalar 19.yüzyılın sonunda başlamış, 20. yüzyılın yarısından itibaren de tarımda uygulanabilir hale gelmiştir (Abak 1988).

Bitkilerdeki doku kültürü çalışmalarının temeli, ilk olarak Schwann ve Schleiden' in 1838 yılında totipotensi teorisini öne sürmeleri ile atılmıştır (Pierik 1987).

Ellialtıoğlu vd'nin (2001) bildirdiğine göre, anterlerin *in vitro* çalışmalarda eksplant olarak kullanımı 1953 yılına dayanmakta olup, 1964 yılında Guha ve Maheshwari tarafından *Datura innoxia* bitkisinin kültüre alınan anterlerinden haploid embriyo oluşumu sağlanırken, 1967 yılında ise Bourgin ve Nitsch tarafından *Nicotiana tabacum* türünde anter kültürü yoluyla tam bir haploid bitki elde edilebilmiştir.

Biber anter kültüründe haploidi ile ilgili ilk çalışmalar 1973 yılında Wang vd, George ve Narayanaswamy, Kuo vd tarafından eş zamanlı olarak başlatılmış olup, 1979 yılında Sibi vd tarafından uygulamaya koyulan iki aşamalı anter kültür sistemi 1981 yılında Dumas de Vaultx vd tarafından geliştirilmiştir. Daha sonra bu metot yapılan birçok çalışma (Dolcet-Sanjuan vd 1997, Kim vd 2004, Bárány vd 2005) ile modifiye edilmiştir.

Anter kültürü esas olarak, içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulduran anterlerin, tomurcuklarından ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesi olayıdır. Anter kültürü yapılarak normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polen tanesinin gametik gelişme yönü, henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmekte ve böylece mikrospor androgenesis veya sadece androgenesis olarak adlandırılan oluşum gerçekleştirilmektedir (Ellialtıoğlu vd 2001).

Anter kültüründen elde edilen başarı, yani elde edilen haploid embriyo sayısı birçok faktörün etkisi altında bulunmaktadır. Bu faktörlerin bir bölümü, anterlerin alındığı donör bitkiden kaynaklanmakta olup diğer bir bölümü de anter kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki koşullarla ilişkilidir (Ellialtıoğlu vd 2001). Donör bitkiden kaynaklanan faktörler, genotip ve donör bitkinin yetiştirme koşulları iken; anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörleri ise anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı ile inkübasyon koşulları olarak özetlemek mümkündür.

Nitekim, doku kültürü çalışmalarında anter ve mikrospor kültürlerinin önemine vurgu yaparak, erkek gametten haploid bitki elde etmeyi amaçlayan Özkum Çiner ve Tıprıdamaz (2001) birçok bitki türünde anter kültürü yoluyla haploid bitki oluşum oranı düşük olduğundan dolayı bu tekniğin bitki ıslahında kullanımını sınırladığını belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerin donör bitkinin genotipi ve gelişimi, anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besi ortamı ve kültür koşulları olduğunu özetlemişlerdir.

Koleva Gudeva ve Trajkova (2012) biber bitkisinin *in vitro* anter kültüründe androgenesis etkinliğinin artırılmasını amaçlamış ve buna bağlı olarak da embriyogenesisin başarılması, oluşan embriyoların bitkiciklere dönüşmesi, bitkiciklerin steril koşullardan sera koşullarına başarılı adaptasyonu ve dış ortama alıştırılması ve plastik tünel koşullarında elde edilen androjenetik biber hatlarının ıslah süreçlerinde kullanılması bu çalışmanın hedefleri arasında olmuştur. Araştırmacıların kullandıkları 19 biber genotipinden, 12 tanesi anter kültüründe embriyo oluşumu için potansiyele sahip olup, oluşan bitkiciklerin dış çevreye alıştırılması ve adaptasyonundan sonra tohum materyalini 4 biber genotipinden toplamışlardır. Sonuçta anter kültürünün devam ettiği süreçte androgenesis etkinliğinin genotipe ve yetiştirme koşullarına bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Mikrosporogenesis ve mikrogametogenesis süresince belirli bir gelişme aşamasındaki polen ya da mikrospor tanesinin belirlenmesinin, farklı temel ve uygulanabilir amaçlar için önemli bir aşama olduğunu belirten Parra-Vega vd (2013a), androjenik double haploid tekniği ve diğer tekniklerde belirli aşamadaki mikrospor ya da polen taşıyan çiçek tomurcuklarını belirlemek için kesin, hızlı ve güvenilir kriterlerin esas alındığı görüşündedirler. Antosiyanin üreten biber tiplerinde, çiçek gelişim özellikleri potansiyel olarak yararlı olan böyle bir belirleme için kriter olarak birçok morfolojik markörün belirlenmesine izin verir. Araştırmacılar, yaptıkları bu çalışmada mikrosporogenesis ve mikrogametogenesisin bireysel aşamalarının her biri ile ilgili tomurcuk ve anter gelişiminin görülebilir ve ölçülebilir özelliklerini ilişkilendirebilmek için en basit ve daha kesin kriterler belirlemeyi hedeflemiştir. Bunun için 3 İspanyol biber F₁ hibridini kullanmışlardır. Aynı ayrı mikrospor/polen gelişim aşamalarının belirleyicileri olarak anter uzunluğunun, tomurcuk uzunluğunun, anter mor pigmentasyonunun ve kaliks uzunluğu ile tomurcuk uzunluğu arasındaki oranın (kaliks/tomurcuk oranı) kullanılmasının kesinliğini ve pratik olarak kullanılabilirliğini tartışmışlar ve analiz etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre kaliks/tomurcuk oranı ile anter pigmentasyonunun kombine edilerek kullanılmasının, antosiyanin üreten biber çeşitleri için özel markörleri belirlemek amacıyla potansiyel olarak uygulanabilir kolay, hızlı ve kesin bir kriter olarak önermektedirler.

Irikova ve Rodeva (2004) yapmış oldukları çalışmada, farklı besin ortamlarında kültüre alınan Bulgar biberlerine ait 4 hat, 5 varyete ve 2 F₁ hibritin anter kültürlerinin *in vitro* tepkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, *in vitro* biber anter kültürünün tepkisinin büyük oranda donör bitki genotipi, ortam kompozisyonu ile eklenenler ve büyüme düzenleyicilere dayandığını bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucuna göre ise en çok denenilen genotiplerin anter kültürlerinde, sitokininlere oranla daha düşük oksin konsantrasyonuna sahip C ve MS ortamları, direkt embriyogenesis için uygun bulunmuştur.

Çağlar vd (2004), Kahramanmaraş kırmızı biberlerinde (*Capsicum annuum* L.) androgenesis yoluyla *in vitro* haploid embriyo oluşturma üzerine farklı oksin ve sitokinin kombinasyonlarının etkisini araştırdıkları ve aktif kömür ve AgNO₃ içeren besi ortamları ile farklı ön sıcaklık uygulamalarından oluşan çalışmalarında, kaliks ve korollanın aynı seviyede ya da korollanın kaliksdan 1-2 mm uzun olduğu safhadaki tomurcukları kullanmışlardır. Eksplantların kültüre alınmasında 100 mg/l myo-inositol, 30 g/l sakkaroz ve 8 g/l agar ilave edilmiş MS temel besi ortamını kullanmışlardır. Kullandıkları bu ortama oksinlerden NAA (2.0, 4.0,6.0 mg/l) ve 2,4-D (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l), sitokininlerden BAP (0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mg/l)ve Kinetin (0.1, 1.0, 5.0 mg/l)' nin farklı miktarlardaki kombinasyonlarını ekleyerek uygulamalarını oluşturmuşlardır. Ayrıca ortamlarına aktif kömür (%0.25) ve AgNO₃ (10 mg/l) ekleyerek denemişlerdir. Kültüre aldıkları anterlere 1) ön uygulamasız, 2) 4 °C (karanlıkta), 3) 29 °C (karanlıkta), 4) 35 °C (karanlıkta) olmak üzere 4 farklı ön sıcaklık uygulaması da yapmışlardır. Bazı anterlerde yalnızca kallus gelişimi gördüklerini ifade eden araştırmacılar, MS + 0.1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + % 0.25 aktif kömür + 10 mg/l AgNO₃ bileşimli besi ortamına dikilen anterlerde hiç kallus gelişimi olmaksızın % 2.8 oranında haploid embriyo gelişimi sağladıklarını bildirmişlerdir.

Sivri, dolmalık ve çarliston gruplarından 6 biber çeşidine ait anterleri kültüre alarak yaptıkları çalışmada Sayılır ve Özzambak (2005), anter kültürü için en uygun devre olduğu bilinen tek çekirdekli mikrosporları içeren, 5-6 mm uzunluğundaki tomurcuklardan alınan anterleri, aktif karbon ve havuç ekstraktı ile zenginleştirilen 4 mg/l NAA + 0.1 mg/l BA ve bunlardan hiçbirinin eklenmediği MS ve N besi ortamlarını kullanmak suretiyle 6 farklı kültür ortamında çalışmalarını yürütmüşlerdir. En iyi sonucu MS + 4 mg/l NAA + 0.1 mg/l BA kombinasyonunun Çarliston Bağcı çeşidinde verdiğini, bunun yanı sıra N + 4 mg/l NAA+ 0.1 mg/l BA % 0.1 aktif kömür ve 200 ml havuç ekstraktı içeren besi ortamının da iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Parra-Vega vd (2013b) yaptıkları çalışmaya göre, ıslah amaçlarına uyan saf hatlar elde etmek için en güvenli aracın double haploidlerin üretimi olduğu, şimdiye kadar biber double haploidlerini elde etmek için en kolay ve en kullanışlı yaklaşımın ise anter kültürü olduğu görüşündedirler. Araştırmacılar çalışmada, Dumas de Vaultx vd (1981) ve Supena vd (2006) olmak üzere 2 protokol kullanarak 4 biber çeşidinde meydana gelen embriyo ve kallus gelişimlerini değerlendirmişlerdir. Bu protokollere göre tüm genotipler test edilmiş ve Dumas de Vaultx vd (1981)'nin protokolünden hem embriyo gelişimi hem de kallus büyümesi gözlemlenirken, Supena vd (2006)'nın protokolünden hiç kallus gelişmemiş fakat sadece embriyo oluşmuştur. Ancak, bu genotipler arasında, embriyo üretiminde farklılıklar gözlemlenmiştir. Anterleri 25 °C'de kültüre almadan önce, 35 °C'de 4, 8, 12 ve 16 gün süresince indükleyici bir sıcaklık şokuna maruz bırakmışlardır. Buna göre embriyo üretiminde ve aynı zamanda kallus üretiminde de uygulanan sıcaklık şokunun süresinin önemli etkileri olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, 35 °C'ye maruz kalma süresinin uzatılmasının kallus üretimini arttırdığını gözlemlenmiştir. Embriyo ve kallusların orijinlerini flow sitometri, ışık mikroskobu ve moleküler markırlar yardımıyla analiz etmişler ve yapılan analizler sonucunda test edilen embriyoların hepsinin gametofitik orijinli olduğunu, test edilen kallusların hepsinin ise sporofitik orijinli olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte araştırmacılar, elde ettikleri sonuçlardan sadece mikrospor türevli embriyoların

üretiminde değil aynı zamanda anter duvarından kallus oluşumu üzerine de kültür koşullarının çok önemli etkisinin olduğunu gözlemlemişlerdir.

Kristiansen ve Andersen (1993) biber anter kültüründe yapmış oldukları çalışmada donör bitki yaşı, sıcaklık ve fotoperiyodun embriyo oluşumu üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Denemede üç farklı fotoperiyod (11, 15 ve 19 saat), üç farklı sıcaklık (22°C, 26°C ve 30°C) ve üç farklı hibrid çeşit kullanmışlardır. Anterleri, donör bitkinin yaşının önemini test etmek için 5 ile 9 haftalık periyotlar arasında ayrı ayrı bitkilerden toplamışlardır. Embriyolar, 26.4 °C olarak hesaplanan optimum sıcaklıkta elde edilmiştir. Embriyo oluşumu fotoperiyod testlerinden etkilenmemiştir. Araştırmacılar, donör bitkilerin yetiştirilmesi sırasında farklı sıcaklık uygulamaları yapmış ve bunun sonucunda ise sıcaklığın artması ile embriyo gelişiminin arttığını gözlemlemişlerdir. Bitkiler için en uygun gelişme sıcaklığı olan 26°C'de yetiştirilen bitkilerden maksimum (%2 embriyo) embriyo gelişimi gözlemlendiği ifade edilirken, düşük sıcaklıkta (16 °C) yetiştirilen donör bitkilerden anterlerin kültüre alınması ile %0.2 embriyo elde edildiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, donör bitki yaşının embriyo oluşumuna etkisini belirlemek amacıyla anterlerin kültüre alınmasını haftalık olarak tekrar etmişlerdir. Çalışmada yapılan her üç deneyde de donör bitki yaşının artışıyla anter kültürüne olan tepkide önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Buna göre, genç bitkilerden alınan anterlerden %2-3 oranında embriyo oluşurken, 12-14 haftalık bitkilerden alınan anterlerde ise embriyo oluşumunun gözlemlenmediğini ifade etmişlerdir.

Biber anter kültüründe farklı aşamalarda anterlerin içerdiği mikrosporların gelişim aşamalarını araştıran Kim vd (2004) embriyo gelişimi için en uygun aşamayı belirlemişlerdir. Araştırmacılar, biber anterlerini 0.1 mg/l NAA ve 0.1 mg/l kinetin içeren MS ortamında kültüre almışlar, daha sonra 25 °C'de karanlık inkübe koşullarına almadan önce 3 gün 31 °C'de sıcaklık uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kültüre alındıktan 6 hafta sonra oluşan mikrospor embriyolarının ve kallusların sayımını yapmışlardır. Araştırmacılar, 1) 1/4'ümor renk olan anterler, 2) 2/4'ü mor renk olan anterler 3) 3/4'ü mor renk olan anterler, 4) tümü mor renk olan anterler olmak üzere anterleri mor pigmentasyonlarının derecesine göre 4 gruba ayırmışlardır. Her bir aşamadaki anter grubundan aldıkları yaklaşık 10 anteri, kültürün 0, 2, 4, 7, 9 ve 14. günlerinde fikse ettikten sonra, DAPI boyama yöntemini kullanarak boyamışlar ve mikrosporların gelişimlerini sitolojik olarak gözlemlemişlerdir. Buna dayanarak, anter kültürünün ikinci gününden itibaren ölü polen sayısında önemli bir artış gözlemlediklerini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada embriyo oluşturan anterleri yüzdeleri bakımından incelemişler ve buna göre 1., 2., 3., ve 4. aşamadaki gözlemler sırasıyla; %1.5, %11.5, %18.6 ve %6.0 olurken, 100 anter için embriyo oluşum oranı bakımından %3.0, %34.3, %57.8 ve %12.6 olmuştur. Araştırmacılar, en başarılı tepkileri çoğunlukla 3/4' ü mor renk olan (>%75) erken-çift çekirdekli aşamada polen içeren anterlerin verdiğini bildirmektedirler.

Kahramanmaraş biber populasyonunda anter kültüründe farklı inkübasyon koşulları ve besin ortamlarının embriyo oluşumuna etkilerini araştıran Terzioğlu vd (2000), tek çekirdekli mikrosporları içeren, 5-7 mm uzunluğundaki, petallerin sepaller içinden henüz çıkmadığı, hafifçe görülmeye başladığı tomurcukların anter kültürü için uygun aşamada olduklarını asetokarmin ile boyama yöntemi yoluyla belirlemişlerdir.

Çalışmada iki farklı inkübasyon koşulu denemişlerdir. Birinci inkübasyon uygulamasında anterler 35°C sıcaklıkta 16/8 saat fotoperiyodik koşullarda 8 gün tutulduktan sonra 25°C sıcaklıktaki iklim odasına aktarılmıştır. İkinci inkübasyon uygulamasında ise anterler sürekli 2000 lüks ışık şiddetinde aydınlatılan 29°C sıcaklıktaki büyütme dolabında 3 ay süreyle tutulmuştur. En yüksek embriyo oluşumunu (%4.8) 4 mg/l NAA ve 1 mg/l BA ilave edilen ve %0.25 oranında aktif kömür içeren MS besi ortamında kültüre alındıktan sonra 29 °C'de sürekli ışıklandırılan koşullarda kültüre alınan anterlerden elde etmişlerdir. Aynı hormon kombinasyonu ve inkübasyon koşullarında aktif kömür ilave edilmemiş ortamda kültüre alınan anterlerde ise %3.3 oranında embriyo oluşumu gözlemleyerek, besi ortamına aktif kömür ilave edilmesinin embriyo oluşumu üzerine olumlu etkide bulunduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar bulgularına göre, 4 mg/l NAA ve 1 mg/l BA hormon kombinasyonunun 1 mg/l NAA ve 4 mg/l BA kombinasyonuna oranla daha başarılı olduğunu, besi ortamına %0.25 dozunda aktif kömür ilavesinin embriyo oluşum oranını arttırdığını, 29 °C ve 2000 lux şiddetinde sürekli aydınlık koşullarda inkübasyonun, 35/25 °C' lik sıcaklık rejimini uygulamasından daha üstün olduğunu saptamışlardır.

Elliältioğlu ve Tıyrıdamaz (2002), 11 B 14 ve Demre Sivrisi biber çeşitlerine ait çiçek tomurcuklarına yaptıkları soğuk şoku uygulamalarının ve besi ortamına çift fazlı sistemde katılan aktif kömürün; anter kültüründe, anterlerdeki içsel absizik asit miktarı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında uyguladıkları farklı soğuk şoklarının ve besi ortamına ekledikleri aktif kömürün etkisini değerlendiren araştırmacılar, anterlerdeki ABA miktarını azaltırken; embriyo oluşturma yönünde olumlu bir etki yapmadığı bildirmişlerdir.

Ercan ve Şensoy (2011) yaptıkları çalışmaya göre genotip, donör bitki, tomurcuklara ya da anterlere ön uygulama yapılması, mikrospor gelişim aşaması ve inkübasyon koşulları gibi birçok faktörün androjenetik tepkiyi etkilediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar anter kültürüne olan genotipik cevabı açığa çıkarmak için 11 farklı biber tipini kullanmışlardır. Korolla ile kaliks eşit uzunlukta ya da korollanın kaliksi hafifçe geçtiği durumda çiçek tomurcuklarını toplamışlardır. Tomurcukları 24 saat boyunca soğukta (4 °C) bekleten araştırmacılar, 8 g/l agar ve 30 g/l sükröz eklenmiş Murashige-Skoog (MS) ortamını kullanmışlar, inkübasyon koşulu olarak ise 35 °C'de 8 gün boyunca karanlık koşulların ardından 25 °C'de 3000 luks ışık yoğunluğuna sahip 16/8 saat karanlık/aydınlık koşulları kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre biber genotiplerinin farklı androjenetik tepkileri olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, test ettikleri çeşitlerden ikisinde hiçbir şekilde embriyo üretimi olmadığını belirtirken, geri kalan diğer çeşitlerde genotipe bağlı olarak farklı oranlarda embriyolar üretildiğini hatta bu genotiplerdeki oluşumların direkt embriyogenesis olduklarını gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri embriyoların oluşum oranları %0.33 ile %7.69 arasında değişirken, tüm genotiplerdeki kallus oluşum frekansı ise %17.31 ile %44.15 arasında değişiklik göstermiştir. Fakat bu kalluslardan herhangi bir embriyo oluşumu gözlemlenmemiş olup, kalluslar kök oluşumu ya da anormal gelişim göstererek daha ileri bir gelişim olmamış ve gittikçe kahverengiye dönmüştür. Bu çalışmada araştırmacılar *in vitro*'da kültüre aldıkları 11 genotipten çıkarılan 2398 anterden toplamda 44 embriyo üretmiş ve 12 bitkicik elde etmiştir. Kullandıkları 2 genotipten (Yalova Çarliston ve Kandil) hiç embriyo oluşumu olmazken, diğer bir 2

genotipten (Sera Demre 8 ve Odesa) ise diğer biber genotipleri ile karşılaştırıldığında daha iyi androgenik cevap gözlemlemiştir.

Irikova vd (2011), yaptıkları çalışmada aralarında 8 hat, 7 varyete ve 4 hibritin bulunduğu 19 Bulgar biber genotipinin anter kültürüne olan *in vitro* tepkisini sırasıyla 12 ve 40 gün aralıklarla 2 kez olmak üzere 2 başlatma ortamı (*C* ve *Cm*) ve 2 rejenerasyon ortamı (*R* ve *Rm*) kullanarak denemiştir. *In vitro*'da inokulasyonundan 35-40 gün sonra kültüre alınan anterlerde 6 hat, 6 varyete ve 3 hibrit direkt embriyo üretmiştir. Rejenere olan bitkileri 4 hat, 6 varyete ve 1 hibritten gözlemlemiştir. Test edilen genotiplerde embriyo oluşumunu başlatmak için *C* ortamında 12 gün süreyle kültüre alınması etkili değilken, 40 gün süreyle kültür ortamında kalması direkt embriyogenesis açısından yeteneklerini açığa çıkarmıştır. *R* ortamına transfer edildikten sonra gelişen embriyoların bitki rejenerantlarına dönüşüm oranı oldukça çok olmuştur (%50-100). Embriyonik anterlerin en yüksek frekansı *Cm* başlatım ortamında 12 gün süreyle kültüre alındıktan sonra kaydedilmiştir fakat *Rm* ortamına transfer edildikten sonra embriyolar bitkiciklere dönüşmemiştir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara dayanarak donör genotiplerin besin ortamı ve kültür süresince özel gereksinimlere sahip olduğunu belirtmiştir.

Matsubara vd (1998) yapmış oldukları çalışmada Temmuz'dan Kasım'a kadar alınan anterlerin kültürü yoluyla 6 biber çeşidinin mikrosporlarından embriyoid ve kallus rejenere etmişlerdir. Tek çekirdekli aşamadaki mikrosporları içeren anterleri 0.004 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l kinetin, 30 g/l sükröz ve 2 g/l Gelrite ile desteklenen MS ortamına dikmişler ve 35 °C'de 24 saat tuttuktan sonra 25 °C'de 16 saat gün ışığı altında 40 gün süreyle inkübe etmişlerdir. Açılmış olan anterlerdeki mikrospordan embriyoidler rejenere olmuştur ve 40 gün sonra kalp şekilli ve torpedo embriyolara dönüşmüştür. Kallusların ise hem mikrospordan ya da filamentlerden hem de anter duvarından geliştiklerini, büyümelerinin daha yavaş, canlılıklarının daha az ve renklerinin ise beyazımsı olduğunu gözlemlemiştir. Embriyoid ve kallus oluşum sıklığı periyodun başlamasına ve çeşitlere göre değişiklik göstermiştir. Embriyoid oluşumu Eylül'den Ekim'e kadar olan sürede daha etkili olmuştur. Eylül ve Ekim aylarındaki 15 ile 25 °C olan sıcaklık daha yüksek embriyoid oluşumu için etkili olmuştur. Embriyoid ve kallus tüm çeşitlerde elde edilmesine rağmen, embriyoid ve kallus oluşum sıklıklarında çeşitlere göre farklılıklar gözlemlenmiştir. MS ortamına transfer edilen embriyoidler bitkiciklere dönüşmüş ve iklime alıştırmışlardır. Kök ucu hücrelerindeki kromozom sayıları 19 bitkide 12 (haploid), bir bitkide 24 (diploid) ve 3 bitkide 20 ile 23 (aneuploid) arasındadır.

2 biber ıslah hattının (ATZ1 ve PO) ve bu iki hattan elde edilen bir hibridin (ATZ1 x PO)_{F1} *in vitro* anter kültüründe androgenesis başlatımının etkinliğinin kurulmasını ilk hedef olarak belirleyen Nowaczyk ve Kisiala (2006), bu çalışmayı birkaç modifikasyonla birlikte Dumas de Vault vd (1981) tarafından geliştirilen metoda göre yürütmüşlerdir. Yapılan deneyler androgenesisin etkinliğinin ATZ1 hattı için %4'ten (ATZ1 x PO)_{F1} için %1.5'a kadar değişiklik gösterdiğini ve anter kültürünün devam ettirilmesi için gerekli koşulların yanı sıra çiçek tomurcuğunun gelişim aşamasına fazlasıyla dayandığını ortaya çıkarmıştır. Çalışmada, androgenik embriyoların gelişiminin sadece petallerin sepallerle eşit ya da petallerin sepallerden çok hafif uzun olduğu çiçek tomurcuklarından ileri gelen anterlerde başarılı bir şekilde oluştuğunu ve

CP ortamında anter başlatım periyodunun uzunluğu ile R1 rejenerasyon ortamında kinetinin seviyesi arasında açıkça bir ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır.

Luitel ve Kang (2013) yapmış oldukları çalışmada, haploid üretiminde androgenesisin etkinliğini belirlemek için Dumas de Vault (CP) ve Murashige and Skoog (MS) kültür ortamlarını kullanarak minipaprika F₁ hibridinin Vine sweet çeşidinin (kırmızı, sarı ve turuncu tipleri) *in vitro* androgenik tepkisini araştırmışlardır. Buldukları sonuçlara göre kullandıkları her iki ortamda da tüm minipaprika tiplerinin anter kültüründe kallus ve embriyo oluşum sıklıkları değişiklik göstermiştir. Her iki kültür ortamındaki anterler tüm paprika tiplerinde rejenerasyon olmaksızın kallus oluşturarak tepki vermiştir. Sarı tipe ait anterler CP ve MS ortamlarında sırasıyla %62.5 ve %46.7 normal embriyo oluşturmuştur. Her iki kültür ortamında da sarı tip kırmızı tipe göre yaklaşık 4 kat daha fazla normal görünümlü embriyo üretmiştir ve turuncu tip anter kültürüne karşı düşük androgenik tepki göstermiştir. Rejenerasyon için büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına transfer edilen toplamda 51 embriyo arasından 45 bitki rejenerasyon olmuştur. Flow sitometri analizi kırmızı, sarı ve turuncu tipler için sırasıyla %44.5, %42.4 ve %33.3 oranında bitkinin haploid; %55.5, %57.6 ve %66.7 oranında bitkinin ise spontane diploid olduğunu ortaya koymuştur. Haploid bitkilerin kromozom sayısı 12, diploidlerinki 24'tür. Ayrıca, yaprak stomatasının bekçi hücrelerindeki stomata karakterleri ve kloroplast sayıları, rejenerasyon olan bitkilerin ploidi seviyelerini analiz etmek için basit ve güvenilir bir metot olarak bulunmuştur. Kendine döllenmeyi takiben spontane diploidlerin double haploid (DH) oldukları doğrulanmıştır. Anter kültüründen elde edilen haploid ve DH bitkiler heterosis ıslahı için değerli ıslah materyalleri olabileceklerdir.

Rodeva vd (2004) yapmış oldukları çalışmada 16 Bulgar biber genotipinin (hatlar, varyeteler ve hibritler) anterlerinin *in vitro*'da kültüre alınmasının reaksiyonlarındaki genotipik farklılıklarını araştırmayı ve karşılaştırmayı amaçlamışlardır. Bunun için 6 hat, 6 çeşit ve 4 hibrid kullanmışlardır. Anterler direkt embriyogenesis ya da kallus oluşumu göstermiştir. Çalışılan genotiplerden sadece ikisinin (biri hat, diğeri çeşit) anterleri indirekt organogenesis göstermiştir. Genotip grupları tarafından ortaya konan veriler göstermiştir ki, hatların, çeşitlerin ve hibritlerin anterlerinin verdikleri tepkiler çok yakın değerlere sahiptir. Ancak en yüksek değerleri çeşitlerden elde etmişlerdir. Ayrıca diğer iki grup genotiple karşılaştırdıklarında direkt embriyogenesis de en yüksek değerleri çeşitlerden elde etmişlerdir. Kallus oluşumu açısından bu üç genotip grubunu değerlendirdiklerinde fazla bir farkın olmadığını gözlemlemişlerdir. İndirekt organogenesis ise hatlar ve çeşitler arasında anter kültürüne tepki bakımından eşitliğin söz konusu olduğunu belirtmektedirler.

5 biber genotipi ve 4 farklı kültür ortamı kullanarak yaptıkları çalışmada Taşkın vd (2011), embriyo üretiminin frekansını optimize etmek için anterleri farklı periyotlarda kültüre almışlardır. Daha sonra embriyolar gelişimlerini çalışılan kültür ortamında tamamlayamayacaklarından dolayı 0.5 mg/l absisik asit içeren ortamda 10 gün bekletilmiştir. Çalışmanın sonucunda, embriyo gelişiminin genotipe, anterin kültüre alınma periyoduna ve kültür ortamına göre değiştiğini belirlemişlerdir. En yüksek embriyo verimini düşük sıcaklığa tolerant olan genotipte elde etmişlerdir. Diğer periyotlardan alınan anterlere kıyasla nisandan mayısa kadar alınan anterlerden elde edilen embriyolardan en yüksek verim elde edilmiştir. En çok embriyo 3. (4 mg/l NAA,

1 mg/l BAP, %0.25 aktif kömür, 15 mg/l AgNO₃, 30 g/l sükröz içeren MS ortamı) ve 4. (%0.25 aktif kömür, 15 mg/l AgNO₃, 4 mg/l NAA, 0.1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l ABA içeren modifiye MS ortamı) ortamlardan elde edilmiştir. Araştırmacılar olgun embriyolar üzerine absisik asitin hiçbir pozitif etkisinin bulunmadığını belirtmişlerdir.

Koleva Gudeva vd (2007) yapmış oldukları çalışmada, elde edilen androgenik bitkilerin sıklığının büyük oranda genotipe dayandığını; dolayısıyla haploid eldesinin düşük oranının biber ıslahında anter kültürünün kullanımını sınırlamakta olduğu görüşünü belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada araştırmacılar 19 biber genotipinin *in vivo* anter kültüründe androgenesis başlatımının etkinliğini araştırmışlar ve kurmuşlardır. Araştırmacıların yaptıkları bu çalışmadaki hedefleri haploid ve diploid bitki rejenerantlarının çalışılması için etkili bir *in vitro* teknolojinin kurulması; biber anter kültüründe embriyogenesisin başlatılması; embriyoların rejenerantlara gelişimi ve başarılı bir şekilde rejenerantların steril koşullardan sera koşullara adaptasyonu ve alıştırılması olmuştur. Anterler Dumas de Vaultx vd (1981) tarafından geliştirilen metoda göre kültüre alınmış, 35 °C'de 8 gün boyunca karanlıkta sıcaklık ön uygulaması uygulanmıştır. Deneyler, androgenesis sürecinin etkinliğinde anter kültürünün sürdürülmesinin biber genotipine ve koşullara dayandığını göstermiştir. Test edilen 19 genotipten 12'si embriyo oluşumu için yetenek göstermiştir. Bununla birlikte, 2 genotip iyi, 4 genotip ortalama, 6 genotip zayıf androgenik potansiyele sahipken, 7 genotip ise androgenik potansiyele sahip değildir. Direkt embriyogenesis, bitkiciklere dönüşen embriyo oluşumu ile sonuçlanmıştır. Rejenerantların başarılı bir şekilde dış ortama alıştırılmasından sonra ilk olarak iklim koşullarında ve sonrasında sera koşullarında 4 genotipten tohum materyali toplanmıştır. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışma ile elde ettikleri sonuçlara dayanarak, toplanan tohum materyalinin daha sonraki ıslah süreçleri, sitogenetik ve diğer moleküler düzeyde araştırmalar için mükemmel bir imkan sağlayacağını bildirmişlerdir.

Biber F₂ hibrit generasyonunun (ATZ1 x PO ve ATZ1 x CDT) ve aynı zamanda iki türler arası hibridin (*C. frutescens* x *C. annuum* ATM1 ve *C. frutescens* x *C. chinense*) *in vitro* anter kültürlerinde androgenesis koşullarında ayrı ayrı bitki reaksiyonunu değerlendiren Nowaczyk vd (2009), Dumas de Vaultx vd (1981)'nin modifiye ettikleri metodu takiben bu çalışmayı yürütmüşlerdir. Araştırmacılara göre, hem biber hibrid formlarının hem de test edilen tüm genotiplerin bireysel (ayrı ayrı) bitkileri arasındaki androgenesis etkinliğinde oldukça açık farklılıklar vardır. Androgenik embriyo gelişiminin en yüksek etkinliğini *C. annuum*: (ATZ1 x PO)F₂ 'nin kültüre alınan tipi için gözlemlemişlerdir. Araştırmacıların belirttiklerine göre, ikinci *C. annuum* hibridi olan (ATZ1 x CDT)F₂ 'nin anter kültürlerinde neredeyse 3 kat daha az embriyo ve bitki üretilirken, bu hibridin bitkilerinin çoğunun anterleri %5'ten daha yüksek seviyede embriyo üretmiştir. Türler arası hibritlerin çiçek tomurcuklarından izole edilen anterler çok daha düşük sayıda embriyo oluşturmuştur. Yine araştırmacılar, gözlemlerine dayanarak, (*C. frutescens* x *C. chinense*)F₂ androgenik embriyoları 2 bitkinin anterlerinden elde edilirken, (*C. frutescens* x *C. annuum* ATM1)F₂ 'nin 5 hibrit bitkisi için pozitif bir reaksiyon kaydedildiğini belirtmişlerdir. Bu bitkilerden yalnızca bir tanesi androgenesisin etkinliği bakımından %5'i aşmıştır. Araştırmacılar rejenerantların ploidi seviyesini flow sitometri yöntemiyle belirlemiştir. Rejenerantlar arasında haploidlerle birlikte diploid kromozom sayısına sahip bitkiler de gözlemlenmiştir.

2.2.Mikrospor Kültürü İle İlgili Kaynak Taramaları

Erkek gametten haploid embriyo elde etmek amacıyla anter kültürü kullanılabilirdiği gibi, anterlerden izole edilen mikrosporların da kültürü yapılabilmektedir. Genel anlamda mikrospor kültürü, olgunlaşmamış mikrosporların anter içerisinden izole edilerek *in vitro* koşullarda özel hazırlanmış besin ortamlarında geliştirilmesi ve bunlardan haploid embriyolar elde edilmesi işlemidir (Ellialtıoğlu vd 2001).

Ellialtıoğlu vd'nin (2001) bildirdiğine göre, mikrospor kültürü yoluyla ilk haploid bitki 1974 yılında Nitsch tarafından elde edilirken, ilk mikrospor kültürü çalışmalarını ise 1989 yılında Pesticelli vd tütün (*Nicotiana tabacum*) ve mısır (*Zea mays*) bitkilerinde gerçekleştirmiştir.

Androgenesi etkileyen faktörlerin en önemlilerinden birisi mikrosporların gelişim safhasıdır. Çünkü uygun safhadaki mikrosporlar kültüre alınmadıkça, diğer kültür şartları mükemmel dahi olsa polen embriyogenesi gerçekleşmeyecektir (Arı 2006).

Androjenetik mikrospor sayısı ve mikrospor başına elde edilen embriyo sayısı, birçok faktörün etkisi altında bulunmaktadır. Mikrospor kültüründen elde edilecek başarıyı etkileyen faktörlerin bir bölümü genetik olup, mikrosporların alındığı donörbitkilerin genotipine bağlıdır. Diğer bir bölümü ise, mikrospor kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki çevre koşullarıyla ilişkilidir (Coşkun 2011).

Yin vd (2010), yaptıkları çalışmada biberin izole edilen mikrospor kültüründe embriyoid başlatımını ilerletmek için bir sistem geliştirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar düşük sıcaklık ön uygulaması, büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları, aktif karbon konsantrasyonları ve sıcaklık ön uygulamalarının *in vitro*'da izole edilen biber mikrosporlarının embriyoid oluşumunu etkileyen kritik faktörler olduğunu göstermiştir. Bir gün boyunca 4 °C'de tomurcukların ön uygulamasından sonra, farklılaşan ve embriyoya dönüşen anterleri bir hafta süresince 7 °C'de çift katmanlı ortam sisteminde kültüre almışlar ve daha sonra da 28 °C'de karanlıkta kültüre devam etmişlerdir. Bir hafta boyunca 28 °C'de karanlıkta kültüre alınan tek çekirdekli aşamadaki mikrosporların bazıları birkaç kez bölünmüş ve araştırmacılar 2 ya da 3 hafta sonra gelişmelerinin farklı aşamalarında olan embriyoidleri tespit etmişlerdir. Çalışmada kullanılan 7 genotipteki embriyoid oluşum oranının %9.44'ten % 81.11'e kadar değişim gösterdiği ortaya çıkmıştır. Kotiledon embriyoidleri seçerek katı ortama almışlar ve 4000-5000 lüks ışıkta birkaç gün süre ile kültüre almışlardır. Daha sonra bunların çoğu normal gelişim göstererek normal bitki formları oluşturmuştur. Çiçek tomurcuklarına 4 °C'de 1, 2, 3 ve 4 gün sürelerle ön uygulamayı denemişler ve daha sonra 28 °C'de kültüre devam etmişlerdir. Bu uygulama ile uygulama periyodunun gecikmesiyle mikrospor kültürü için embriyoid oluşum oranında düşüş yaşandığını, kontrolde %57 olan oranın 4. güne kadar %45.37'ye kadar gerilediğini görmüşlerdir. Buna dayanarak biber çiçek tomurcukları için 4 °C'deki uygulama periyodunun ilk 24 saat olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda mikrosporları sürekli 28 °C'de kültüre alınmasındansa, bir hafta boyunca yüksek ya da düşük sıcaklıkta inkübe etmenin daha yüksek oranda embriyoid oluşumunu teşvik ettiğini ve düşük sıcaklık uygulamalarının

yüksek sıcaklığa oranla genellikle daha iyi sonuç verdiğini, hatta yaptıkları bu çalışmada 7 °C'nin en yüksek embrioid oluşum oranını verdiğini belirtmişlerdir. Sonuçta test edilen 7 biber genotipi de bu protokole cevap vermiştir. En iyi tepki veren genotipin embrioid oluşumu %81.11'den %147.22'ye kadar artış göstermiştir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara dayanarak, geliştirdikleri bu protokolün biber ıslahı açısından double haploid bitkileri üretmek için potansiyel bir araç olarak kullanılabileceğini belirtmektedirler.

Lantos vd (2009), üç Macar ve üç İspanyol biber genotipinin izole edilen biber mikrospor kültüründe androgenesis başlatımının etkinliği üzerine mikrospor gelişim aşamasının etkisini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmaya göre, %80 tek çekirdekli ve %20 çift çekirdekli mikrosporları içeren donör anterler, başarılı bir mikrospor kültürünün en yüksek verimini vermiştir. Kültür ortamlarına biber ve buğday ovaryumlarını eklemişler ve buğday ovaryumu eklenerek yapılan ko-kültürde biber ovaryumuyla yapılanına oranla daha fazla embriyo elde etmişlerdir. Çalışmada, izole edilen mikrospor kültürlerinin başlatımı sırasında olan etkinliğindeki farklılıkları, farklı biber genotipleri arasında gözlemlemişlerdir. Yeşil bitkicikler mikrospor türevli embrioidlerden rejenere olmuşlardır, fakat bazıları yaprak rozetleşmesi gibi anormal büyüme alışkanlıkları göstermiştir. Sonuç olarak araştırmacılar altısı İspanyol, biri Macar genotipinden olmak üzere toplamda verimli yedi tane mikrospor türevli bitki elde etmişlerdir.

Lantos vd (2012), biber F1 hibrit genotiplerinde izole edilmiş mikrospor kültürü deneylerini uygulamışlardır. İlk deneylerinde, iki genotipte mikrospor türevli yapıların oluşumunu başlatmadaki etkinliğini test etmek amacıyla dört kültür ortamını (W14, B5, MS ve NLN) karşılaştırmışlardır. İkinci deneyde, iki genotiple B5 ortamında 2,4-D (0, 0.1, 0.2 ve 0.5 mg l⁻¹) ve kinetinin (0, 0.2 ve 0.5 mg l⁻¹) farklı oranlarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, mikrospor kültüründe mikrospor türevli kallus ve embriyo benzeri yapıların üretiminde büyüme düzenleyicilerinin etkisini araştırmışlardır. Yapılan histolojik deneyler mikrospor türevli embriyo benzeri yapılarla kalluslar arasındaki farklılığı ortaya çıkarmıştır. Çalışmada en umut vaat eden sonuçları, test edilen her iki genotipte de en yüksek bitkicik oluşumuyla 0.1 mg l⁻¹ 2,4-D ve 0.2 mg l⁻¹ kinetinin varlığında araştırılan parametrelerde elde etmişlerdir. En iyi temel besi ortamı ve büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonu kullanılarak test edilen her bir biber genotipinin tepkisi androgenesis başlatımı için başarılı olmuştur. Genotipe bağlı olarak yeşil bitkiciklerin sayısı her bir petrideki bitkicik sayısı olarak 0'dan 8'e kadar (ortalama 1.5 bitkicik/petri) değişiklik gösterirken, embriyo benzeri yapıların sayısı petri başına 20'den 100'e kadar değişiklik göstermektedir. Çalışmadan çıkan sonuca göre, yaptıkları ilk çalışmada denenen besi ortamlarından her iki genotipin mikrospor kültüründe de NLN ve MS ortamlarında üretilenden önemli derecede fazla sayıda mikrospor türevli yapılar üreten B5 ve W14 ortamlarında en iyi sonuçları elde etmişlerdir. Araştırmacılar ikinci deneylerinde ise iki biber hibrit genotipinde 2,4-D ve kinetinin farklı kombinasyonlarını denemişlerdir. Gözlemi yapılan 4 parametrenin (mikrospor türevli embriyo benzeri yapılar, kalluslar, kallusların ve embriyo benzeri yapıların oranı ve rejenere olan bitkicikler) verileri başlatım ortamında iki büyüme düzenleyicinin kombine edilmiş etkisini analiz etmek için toplanmıştır. Araştırmacılar, toplanan verilerin istatistiksel analizine dayanarak, büyüme düzenleyicilerinin mikrospor kültürünün etkinliği üzerinde ve mikrospor türevli yapıların kalite ve kantitesi

üzerinde tamamen bir etkiye sahip olmasına rağmen, androgenesisin başlatımı için gerekli değildir sonucuna varmışlardır. Bitki rejenerasyonunun istatistiksel analiz verileri en yüksek bitki rejenerasyon oranının 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l kinetin kombinasyonunu içeren ortamda başarıldığını ortaya koymuştur.

Kim vd (2008), biberin izole edilen mikrospor kültürü yoluyla embriyo üretiminin ve bitki rejenerasyonunun yüksek frekansını bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmaya göre, modifiye edilmiş NLN ortamında (NLNS) kültüre alınan mikrosporlar bölünmüş ve embriyolar gelişmiştir. Araştırmacılar, kültür başlangıcından 3 hafta sonra globular ve kalp şekilli embriyolar gözlemiş ve kültürün 4. haftasından sonra birçok embriyo kotiledon aşamasına ulaşmıştır. Oluşan bu kotiledon aşamasındaki embriyolar B5 katı temel besi ortamına transfer edildikten sonra bitkicikler gelişmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda ön uygulama ortamını, karbon kaynağını ve kültür yoğunluğunu değiştirerek embriyo üretimi için şartları optimize etmişler ve sükroz açlık ortamında sıcak şoku uygulamasının B5 ortamından daha etkili olduğu gözlemişlerdir. Karbon kaynağı olarak sükroz ve maltozun direkt karşılaştırması yapılmış ve maltoza kıyasla sükrozun üstünlüğü açıkça görülmüş olup, en yüksek embriyo oluşumu oranı %9 sükroz varlığında gözlemlenmiştir. Mikrospor ekim yoğunluğunun embriyonik başlatım ve gelişme etkinliği için kritik öneme sahip olduğunu ve optimal ekim yoğunluğunun ise 8×10^4 - 10×10^4 /ml olarak ayarlanmasının iyi olacağı görüşünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar kendi optimize ettikleri kültür koşulları altında, her bir petride 10×10^4 yoğunluğundaki mikrosporlar olgun hale geldiğinde 54'ün üzerinde embriyoyu ve ortalama 5.5 kotiledon aşamasında embriyoyu gözlemlediklerini rapor etmişlerdir.

Bal vd (2003) yaptıkları bu çalışmada izole mikrospor kültürü yardımıyla biberde androgenesis sınırlı bir kapsamda çalışmışlardır. Donör genotip olarak bir double haploidi seçmişlerdir. Erken tek çekirdekli deneme tek çekirdekliye kadar olan aşamalarda mikrosporları içeren açılmamış çiçek tomurcuklarını hem 10^0 C'de hem de 35^0 C'de 7 gün boyunca bir mannitol açlık ortamında ön uygulamaya tabi tutmuşlardır. Araştırmacılar çalışmalarında yüksek sıcaklık uygulamasını test etmişler, biber anter kültüründeki etkinliği dikkate alınmasına rağmen, yüksek sıcaklığın zararlı olduğuna karar verip böylece bu uygulamadan gelen çiçek tomurcuklarını kullanmamışlardır. 10^0 C'deki ön uygulamayı takiben mikrosporları izole edip büyüme düzenleyicisi içermeyen NLN ortamında kültüre almışlardır. Mikrospora 100, 130 ve 170 g/l sükrozla osmotikum ve karbon sağlamışlardır. Sadece 170 g/l sükroz içeren kültür devam etmiş, kültürlerin geri kalanı kontaminasyon olmuştur. Araştırmacılar 30. ve 60. günlerde sırasıyla %40.5 ve %67 oranlarında kallus kolonileri elde etmişlerdir. Elde ettikleri kallus kolonilerini 1 ve 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında alt kültüre almışlar, fakat daha ileri bir gelişme elde edememişlerdir.

Bal vd (2009), yapmış oldukları çalışmada bütün mikrospor embriyogenesisini başlatmak için için kullanılan bir protokolün bir modifikasyonunu patlıcanda denemişlerdir. Tütünde, tek çekirdekli mikrosporlar mannitol içeren "B" ortamına 33^0 C'de 6 gün boyunca kültüre alınarak strese tabi tutulmaktadır. Mikrosporlar daha sonraki gelişmeleri için maltoz içeren AT3 ortamına transfer edilmiştir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada, Bambino patlıcan çeşidinin geç tek çekirdekli ve iki çekirdekli mikrosporlarını B ortamında ön kültüre almışlar ve sonra 2 gün boyunca sırasıyla 4^0 C,

25 °C ve 33 °C'de inkübe etmişlerdir. Ön uygulamadan sonra, mikrospor kültürlerini 0.25 M maltoz içeren AT3 ortamına transfer etmişler ve 25 °C'de karanlıkta kültürün devamlılığını sağlamışlardır. Simetrik bölünmenin varlığı ve çok çekirdekli yapılar 1 ve 2 hafta sonra çekirdeğin DAPI boyaması ile kontrol edilmiştir. Çekirdeğin simetrik bölünmesi ve çok çekirdekli yapılar sadece iki gün süre ile 33 °C'de ön uygulama yapılan tek çekirdekli mikrosporlarda gözlemlenmiştir. Bu koşullar altında tek çekirdekli yapıların frekansı %19.4 olmuştur. Araştırmacılar, simetrik olarak bölünme ve çok çekirdekli yapıların üretiminde modifiye edilmiş tütün protokolü için patlıcanın tepki verebildiğini göstermişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

Araştırma için gerekli bitki materyali Gento Tohumculuk firması tarafından yetiştirilen biber bitkilerinden sağlanmış olup, doku kültürü çalışmaları ise Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü doku kültürü laboratuvarında 2011-2013 yılları arasında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Haploid embriyo oluşum oranı, türlere ve tür içinde de genotiplere göre değişiklik gösterir. Şimdiye dek çalışılmış olan tüm bitki türlerinde; aynı kültür koşulları altında, anter yanıtları bakımından genotipler arasında büyük farklılıklar bulunmuştur. Araştırmada bitkisel materyal olarak farklı genetik kademedeki biber bitkisi için; çeşit olarak ilkbahar ve sonbaharda serada yetiştirilen 1 standart çeşit, 1 F₆ kademesinde hat, 1 F₄ kademesinde hat ve 1 ticari F₁ çeşit olmak üzere sivri biber grubu dört farklı genotip kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Donör bitkilerin alındığı seradan bir görünüm



Şekil 3.2. Dikilen donör bitkilerin ilk haftalarından bir görünüm



Şekil 3.3. Donör bitkilerden tomurcukların toplanması

3.1.1. Denemede kullanılan genotipler ve özellikleri

F₁: Piyasanın en önemli çeşidi sayılan bu çeşit çok verimlidir. Tek ekim çeşidi olup, SW5 dayanımlıdır. Meyve eti kalınlığı 0.3 cm, meyve uzunluğu ise 25 cm'dir. Meyveleri orta yeşil renkte ve acıdır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. F₁ biber çeşidi

Standart: Güzlük ve baharlık olarak yetiştirilen sera çeşididir. Çok verimlidir. Herhangi bir hastalığa dayanımı yoktur. Meyve uzunluğu 20 cm'dir. Meyveleri koyu yeşil renkli olup, acılığı orta düzeydedir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Standart biber çeşidi

F₆: Oldukça verimli olan bu genotip tek ekim olarak yetiştirilir. SW5 dayanımlıdır. Meyve eti kalınlığı 0.4 cm, meyve uzunluğu ise 25cm'dir. Meyveleri orta yeşil renkte olup, meyvesi tatlıdır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. F₆ biber genotipi

F₄: Tek ekim olarak yetiştirilmekte olup, çok verimlidir. Meyve eti kalınlığı 0.3 cm, meyve uzunluğu ise 22 cm'dir. Meyveleri koyu yeşil renkte olup, meyve tadı tatlıdır (Şekil 3.7).



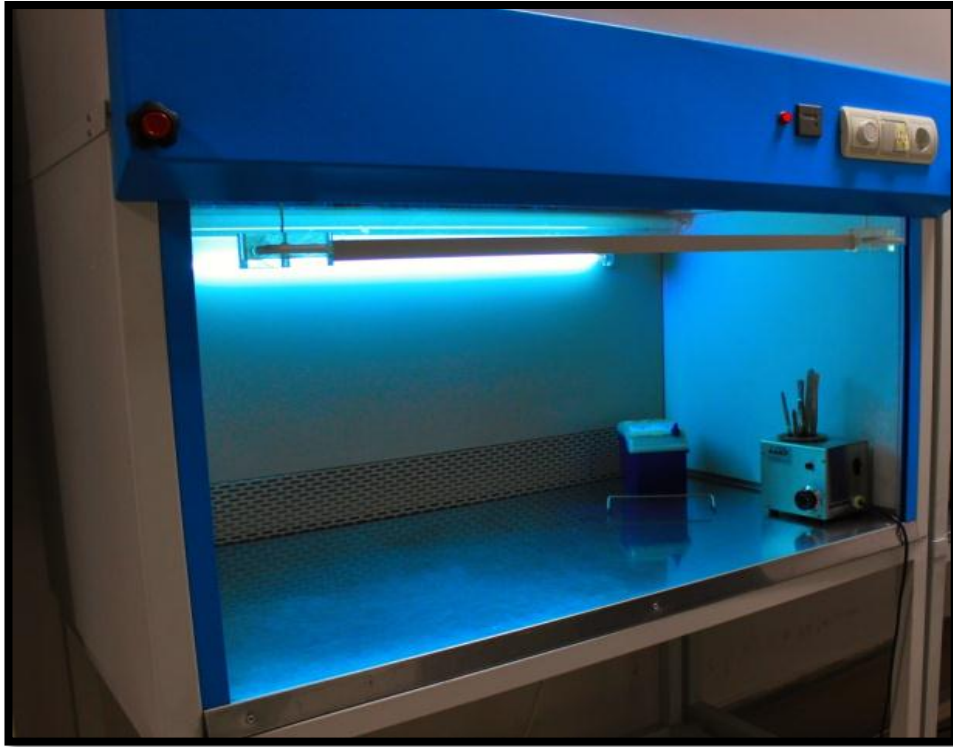
Şekil 3.7. F₄ biber genotipi

3.2. Metot

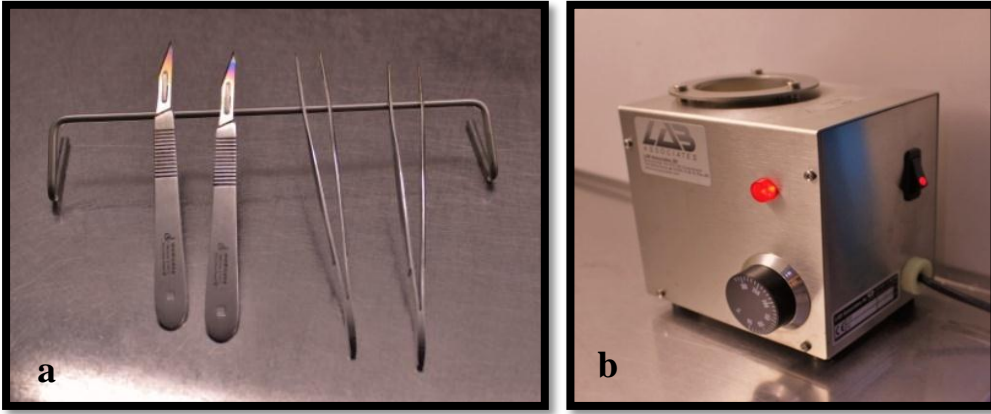
3.2.1. Kültür sırasında kullanılan malzemeler

Anter ve mikrospor kültürlerinin yapılışı esnasında değişik kültür kapları kullanılmıştır. Anter kültüründe anterler 9 cm çapındaki cam petrilere konulmuş, mikrospor kültüründe ise 3 cm çapındaki steril plastik petrilere tercih edilmiştir. Kültür sırasında kullanılan besi ortamları, cam petrilere, pensler, bistüriler, saf su, kurutma kağıdı, havlu peçete, cam kavanozlar ve beherler gibi malzemelerin sterilizasyonu 121 °C sıcaklık ve 1.2 kg/cm² basınç altında 20 dakika süre ile otoklavlanarak yapılmıştır. Streç film, asetat kalemi, parafilm, bistüri uçları ve tomurcukların bulunduğu kavanozlar gibi kültür sırasında sterilen kabin içerisinde kullanılması gerekli olan fakat otoklav sterilizasyonu yapılmayan malzemelere de %70'lik alkol ile yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Ayrıca otoklav sterilizasyonu tamamlanan malzemeleri çalışmaların yapılacağı steril kabine almadan önce yine %70'lik alkol ile yüzey sterilizasyonları yapılmıştır. Kültür alışmaları esnasında steril kabin (şekil 3.8) kullanılmış olup, otoklavlanan malzemeler steril kabine konmadan önce kabinde 15 dakika süre ile UV ışığı çalıştırılmıştır. Aynı şekilde UV ışığı uygulama işlemi, otoklavdan çıkarılıp yüzey sterilizasyonları yapıldıktan sonra besi ortamları hariç diğer malzemeler için de uygulanmıştır.

Anterleri tomurcuklardan çıkarma işlemi için, 3 ve 4 numaralı bistüriler ve 15 cm uzunluğundaki pensler (şekil 3.9.a) kullanılmıştır. Pens ve bistüriler kültüre alma işlemleri esnasında sterilizasyonu sağlamak amacıyla her kullanımdan önce glass bead sterilizasyon aletinde (şekil 3.9.b) bekletilmiştir.



şekil 3.8. Çalışmada kullanılan steril kabin



Şekil 3.9. Pensler ve bistirüler (a) ve glass bead (b)

3.2.2. Kültürlerde kullanılan besi ortamları ve hazırlanışları

3.2.2.1. Anter kültürü için kullanılan besi ortamları

Çalışmada anter kültürü için Ayar'ın (2011) başarılı olduğu saptanan besi ortamı 4mg/l NAA ve 1 mg/l BA hormonları ilave edilmiş Murashige ve Skoog (1962) hazırbesi ortamı kullanılmış olup, % 3 sukroz, % 0.8 agar eklenmiş ve pH 5.7-5.8'e ayarlanmıştır.

1 litre steril distile saf suya, 4.4 g/l MS temel besi ortamı ve 30 g/l sükroz tartılarak eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda karışmaları sağlanmıştır. Daha sonra hazırlanan hormon stoklarından 4mg/l NAA ve 1 mg/l BA hormonları mikropipetler yardımıyla eklenmiştir. Ortama eklenecek olan agar payı da hesaba katılarak besi ortamı steril distile saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 1 N HCl ve 1 N NaOH ile pH 5.7-5.8'e ayarlandıktan sonra 8 g/l agar ilave edilip çalışmada kullanılacak olan diğer malzemelerle birlikte otoklavlanmıştır.

Besi ortamı ve petrilerin otoklavda sterilizasyonu tamamlandıktan sonra, steril kabin içerisinde besi ortamı petrilere dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

Çizelge 3.1. Murashige ve Skoog temel besi ortamının içeriği (Murashige ve Skoog, 1962)

D) Makro Elementler	mg/l
KNO ₃	1900.00
NH ₄ NO ₃	1650.00
CaCl ₂	332.02
MgSO ₄	180.54
KH ₂ PO ₄	170.00

Çizelge 3.1'in Devamı

II) Mikro Elementler	mg/l
MnSO₄.H₂O	16.90
H₃BO₃	6.20
ZnSO₄.7H₂O	8.60
KI	0.83
Na₂MoO₄.2H₂O	0.25
CuSO₄.5H₂O	0.025
CoCl₂.6H₂O	0.025
FeNaEDTA	36.70

III) Organik Bileşikler	mg/l
Myo-inositol	100.00
Tiamin-HCl	0.10
Nikotinik asit	0.50
Pridoksin-HCl	0.50
Glisin	2.00

3.2.2.2. Mikrospor kültürü için kullanılan besi ortamları

Mikrosporların anterlerden izole edilmesi ve kültüre alınmasında kültür ortamı olarak Lantos vd (2012)' nin yaptıkları çalışmalarda kullandıkları ve başarılı buldukları 0.1 mg l⁻¹ 2,4-D ve 0.2 mg l⁻¹ kinetin içeren Gamborg vd (1968) tarafından geliştirilen B5 ortamı kullanılmıştır.

1 litre steril distile saf suya, 3.2 g/l B5 temel besi ortamı ve 30 g/l sükröz tartılarak eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda karışmaları sağlanmıştır. Daha sonra hazırlanan hormon stoklarından 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l kinetin hormonları mikropipetler yardımıyla eklenmiştir. Daha sonra besi ortamı steril distile saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 1 N HCl ve 1 N NaOH ile pH 5.7-5.8'e ayarlandıktan sonra çalışmada kullanılacak olan diğer malzemelerle birlikte otoklavlanmıştır.

Çizelge 3.2. B5 temel besi ortamının içeriği (Gamborg vd 1968)

I) Makro Elementler	mg/l
NaH₂PO₄	130.44
CaCl₂	113.23
(NH₄)₂SO₄	134.00
MgSO₄	121.56
KNO₃	2500.00

Çizelge 3.2'nin Devamı

II) Mikro Elementler	mg/l
FeNaEDTA	36.70
KI	0.75
MnSO₄.H₂O	10.00
H₃BO₃	3.00
ZnSO₄.7 H₂O	2.00
Na₂MoO₄.2 H₂O	0.25
CuSO₄.5 H₂O	0.025
CoCl₂.6H₂O	0.025
III) Vitaminler	mg/l
Nikotinik asit	1.00
Tiamin hidroklorid	10.00
Pridoksal hidroklorid	1.00
Myo-inositol	100.00

3.2.3. Çiçek tomurcuklarının toplandığı aşama

Çalışmada kullanılacak olan çiçek tomurcuklarının alınacağı bitkiler ısıtmalı seralarda yetiştirilmiştir. Çiçek tomurcukları çiçeklenme başlangıcından itibaren alınmaya başlanmış olup, güz dönemi için ekim ayı başından aralık ayı ortasına kadar olan sürede, bahar dönemi için ise mart ayından haziran ayı ortasına kadar olan sürede toplanmıştır.

Başarılı bir anter ve mikrospor kültürü için en belirleyici faktörlerden biri tomurcukların uygun aşamadayken toplanmasıdır. Anter ve mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki elde etmede yapılması gereken ilk aşama, tek çekirdekli mikrosporları bulduran tomurcukları (Kim vd 2004, 2008; Lantos vd 2009; Supena vd 2006, 2011) seçebilmektir. Bu aşamadaki tomurcuklarda petallerin sepaller içinden henüz çıkmadığı, ancak hafifçe görülmeye başladığı (Özkum ve Tıprıdamaz 2002, Nowaczyk ve Kisiala 2006); bu dönemdeki anterlerin soluk yeşil, kenarlarının açık mavi ya da mor renkte olduğu (Kim vd 2004) belirlenmiştir.

3.2.4. Toplanan çiçek tomurcuklarının sınıflandırılması

Tek çekirdekli mikrosporları içeren uygun aşamadaki tomurcukları seçebilmek için, birbirlerinden farklı büyüklükte olan tomurcuklar her bir genotip için çiçeklenme başlangıcından itibaren alınarak, tomurcuk uzunluğu ve tomurcuk özellikleri (taç ve çanak yaprakların gelişim aşamaları ve anter rengi) göz önünde bulundurularak sınıflandırmaları yapılmıştır.

3.2.5. Tomurcuk gelişim evresi ve mikrospor gelişme döneminin belirlenmesi

Mikrospor kültürünün başarıyla uygulanabilmesi için en önemli konulardan birisi; anterlerin alındığı zamanda mikrosporların içinde buldukları gelişme

dönemidir. Birçok bitki türünde androgenesis için en elverişli mikrospor gelişim aşamasının, mitoz bölünmeye başlamadan önceki dönem, mitoz bölünme aşaması veya hemen bu aşamayı izleyen dönem olduğu belirtilmektedir (Sarıkamış vd 2000). Bu amaçla morfolojik şekillerine ve büyüklüklerine göre sınıflandırılan tomurcukların anterlerdeki mikrospor oluşum aşamalarını belirlemek amacıyla sitolojik gözlemler yapılmış ve bu amaçla Ethidium Bromide (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenanthridium bromide) (EtBr)'in saf suyla hazırlanmış olan stok solüsyonu kullanılmıştır. Farklı büyüklükteki canlı tomurcuklardan alınan anterler lamlar üzerine yerleştirilerek mikrosporları serbest hale getirildikten sonra üzerine bir iki damla EtBr çözeltisinden damlatılarak floresan mikroskopunda gözlem yapılmış ve bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Bilgisayarlı görüntüleme sistemi

3.2.6. Çiçek tomurcuklarının yüzey sterilizasyonu

Tomurcuklar, 100 ml'sine bir iki damla Tween-20 damlatılan %10 ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 15 dakika bekletilerek ve 3 kez ve her seferinde beşer dakika olmak üzere steril distil su ile yıkanmıştır. Daha sonra steril kabinde daha önceden sterilizasyonu yapılmış olan petrilerin içlerinde bulunan kurutma kağıtlarına bu tomurcuklar konulmuş ve böylece fazla sularının süzülmesi sağlanmıştır (Ayar 2011).

3.2.7. Anter kültürü aşamaları

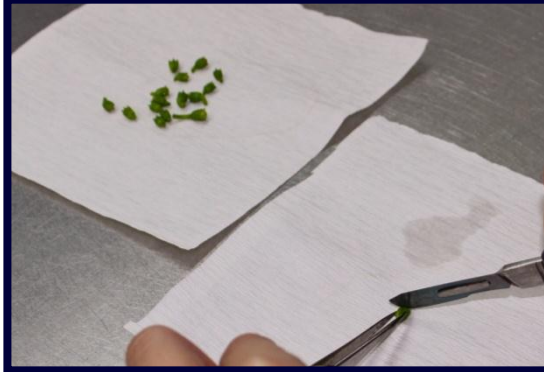
3.2.7.1. Anterlerin kültüre alınması

Kültüre alınacak olan çiçek tomurcuklarının sterilizasyonu yapılmış, fazla sularının süzülmesi için steril kabin içerisinde kurutma kağıtları üzerine alınmıştır (Şekil 3.11). Her bir genotip tomurcukta farklı bir kurutma kağıdı kullanılmıştır. Anterler bistüri ve pens yardımıyla tomurcuğun diğer parçalarından ve filamentlerinden

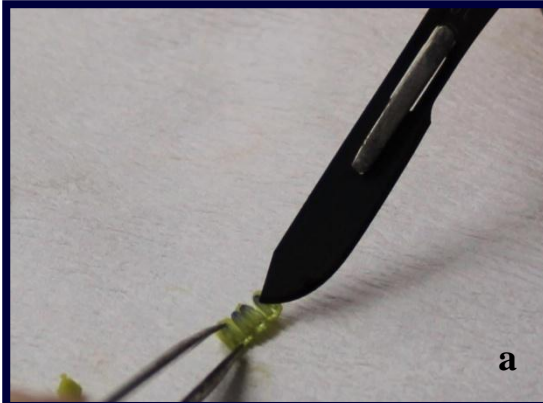
ayrılmıştır (Şekil 3.12). Bir çiçek tomurcuğundan çıkarılan anterlerin (Şekil 3.13) aynı besi ortamına yerleştirilmesine özen gösterilmiştir. Petrilerin çevresi olası bir kontaminasyonu önleyebilmek amacıyla parafilm ile sarılmıştır. İlerleyen aşamaların takibini kolaylaştırmak amacıyla petrilerin üzerlerine genotip ismi, tarih ve hangi ortam olduğu yazılmıştır.



Şekil 3.11. Kurutma kağıdına alınan anterler



Şekil 3.12. Anterlerin tomurcuğun diğer kısımlarından ayrılması



Şekil 3.13. Bir tomurcuğa ait anterler (a), (b)

3.2.7.2. Petrilere sıcak uygulaması

Parafilm ile sarılarak kültüre alma işlemi tamamlanan petriler, inkübatöre (Şekil 3.15) konularak 35 °C'de 8 gün boyunca karanlık ortam koşullarında bekletilmiştir (Dumas de Vaulx vd 1981).



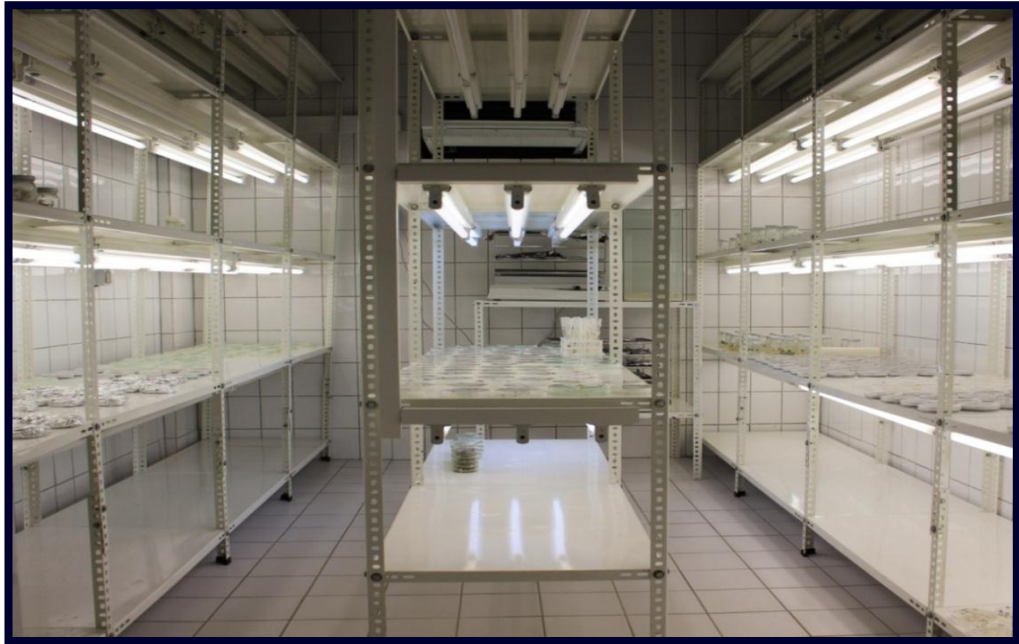
Şekil 3.14. Çalışmada kullanılan inkübatör



Şekil 3.15. İnkübatörde ön sıcaklık uygulamasına koyulan petriler

3.2.8. Kültür sonrası uygulamalar ve inkübasyon koşulları

İnkübatörde 8 gün boyunca 35 °C'de karanlık ortam koşullarında bekletilen petriler, 8. günün sonunda 25 °C'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks aydınlatmaya sahip olan büyüme odasına (Şekil 3.16) alınmıştır. Büyüme odasına alınan petrilerdeki anterler günlük olarak gözlemlenmiş, enfeksiyon olduğu tespit edilen petriler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kültüre alınan anterlerden oluşumu gözlemlenen kallus, embriyo benzeri yapılar ve embriyolar hormonsuz besi ortamına transfer edilmişlerdir. 1 ayın sonunda ayrı ayrı gözlemlenen anterlerden gelişen oluşumlar genotip ismi ve uygulama tarihleri dikkate alınarak kaydedilmiştir.



Şekil 3.16. Çalışmada kullanılan büyüme odası

3.2.9. Mikrospor kültürü aşamaları

3.2.9.1. Mikrospor yoğunluğunun belirlenmesi

Mikrospor kültüründe başarı elde edebilmek için, mikrosporların belirli bir yoğunlukta kültüre alınmaları gerekmektedir. Bu amaçla bir tomurcuktaki ortalama mikrospor yoğunluğunu belirlemek amacıyla thoma lamında sayım yapılmıştır.

3.2.9.2. Anterlere karbonhidrat açlığı ve ön sıcaklık uygulamaları

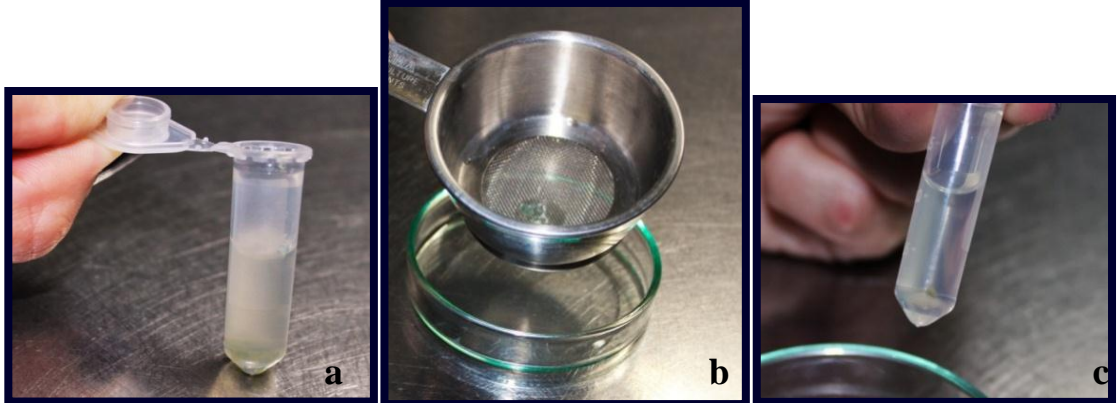
Solanaceae familyasına ait bitkilerde androgenesis üzerine yüksek sıcaklık şoklarının olumlu etkileri daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Biberde yapılan mikrospor kültürü çalışmalarında anterlerin ilk yedi günlük sürede 32°C'de karanlıkta tutulmasının kallus ve embriyo oluşumu için gerekli olduğu belirtilmiştir. Bu amaçla sterilizasyonu tamamlanan tomurcuklardan izole edilen anterler 5 ml 0.3 M mannitol solüsyonu içeren 60 mm çapındaki petri kaplarına aktarılmış ve yukarıda belirtildiği şekilde ön sıcaklık ve açlık uygulamalarına tabi tutulmuştur (Lantos vd 2009).

3.2.9.3. Mikrosporların izolasyonu ve kültüre alınması

Mikrosporların izolasyonu için Lantos vd (2009)'nin biberde mikrospor kültürü için kullandıkları protokollerden yararlanılmıştır. Sterilizasyonu ve ön uygulama işlemi tamamlanan anterler B5 ortamı içeren santrifüj tüplerine alınmış ve santrifüj tüpleri içinde ezilerek mikrosporların serbest hale geçmesi sağlanmıştır (Şekil 3.18.a). İzolasyon esnasında anterlerden kaynaklanan somatik dokuların uzaklaştırılması amacıyla, oluşan bu süspansiyonlar 40 µm'lik elekten geçirilmiştir (Şekil 3.18.b). Böylece mikrosporların büyük bir bölümünün izolasyon ortamı içerisinde süspansiyon oluşturacak şekilde alttaki petride toplanması sağlanmıştır. Mikrosporların çökmesini sağlamak üzere 900 rpm devir hızında 5 dakika süreyle santrifüjleme işlemine tabi tutulmuştur. Mikrosporların safiyetini yükseltmek amacıyla 3 yıkama işlemi daha gerçekleştirilmiştir. Üçüncü yıkama işleminden sonra Lantos vd' nin (2009) yaptıkları çalışmaya göre 3.10⁴ ml⁻¹ yoğunluğundaki mikrosporlar kültür ortamı içerisine alınarak petri kaplarına aktarılmıştır. Daha sonra kontaminasyonu önlemek amacıyla petrilerin etrafı parafilmle sarılmıştır. İlerleyen aşamaların takibini kolaylaştırmak amacıyla petrilerin üzerlerine genotip ismi, tarih ve hangi ortam olduğu yazıldıktan sonra kültürü tamamlanan petriler orbital çalkalayıcı üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 3.20).



Şekil 3.17. İzolasyon esnasında kullanılan elek



Şekil 3.18. Serbest hale geçen mikrosporlar (a), elekten geçirilen süspansiyon (b), santrifüleme işleminden sonra santrifüj tüpüne çökelen mikrosporlar (c)



Şekil 3.19. Santrifüj aleti



Şekil 3.20. Orbital çalkalayıcı

3.2.10. Embriyoların ve kallusların rejenerasyon ortamına alınması

Oluşan embriyoların ve kallusların gelişimleri izlenerek, belirli bir aşamaya geldiklerinde zedelenmeden farklı bir ortama aktarılmıştır. Denemede kullanılan rejenerasyon ortamları anter kültüründen elde edilen oluşumlar için hormon ilave edilmemiş, %0.8 agar ve %3 sükröz ile desteklenen MS temel besin ortamı olurken; mikrospor kültüründen elde edilen oluşumlar içinse yine hormon ilave edilmemiş, %0.8 agar ve %3 sükröz ile desteklenen B5 temel besin ortamı kullanılmıştır.

3.2.11. Sonuçların değerlendirilmesi

Gözlemler haftalık olarak yapılmış, daha sonra düzenlemeleri kaydedilmiştir. Gözlemler; kültüre alınan petri sayısı (adet), kültüre alınan anter sayısı (adet), oluşan kallus sayısı (adet), (%), oluşan embriyogenik kallus sayısı (adet) (%), embriyo

oluşumu (adet), (%), oluşan embriyo benzeri yapılar (adet), (%), oluşan torpedo embriyo sayısı (adet), (%) olarak kaydedilmiştir.

- ❖ Petri sayısı (adet): Anter kültürü için, anterlerin ekildiği petriler büyüme odasına alınmış, kontamine olan petriler var ise ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Mikrospor kültürü için ise, kültürleri yapılan petriler büyüme odasında bulunan orbital çalkalayıcı üzerine yerleştirilmiştir. Çalışmada kontamine olmamış petriler değerlendirmeye alınmışlardır.
- ❖ Anter sayısı (adet): Anter kültürü için, petriler büyüme odasına alındıktan sonra anterler sürekli gözlenmişlerdir. Kültüre alınan anter sayıları kaydedilmiştir. Mikrospor kültürü için ise, bir petriye 3 tomurcuğun anterlerinden izole edilmiş mikrosporlar aktarılmış ve değerlendirmede bu durum dikkate alınmıştır.
- ❖ Kallus oluşumu (adet), (%): Değerlendirmeye alınan petrilerde anter kültürü için kallus oluşturan anterler ve mikrospor kültürü için ise kallusların oluştuğu petriler saptanmış, adet ve % olarak kaydedilmiştir.
- ❖ Embriyogenik kallus oluşumu (adet), (%): Değerlendirmesi yapılan petrilerde saptanan anter kültürü için embriyogenik kallus oluşturan anterler ve mikrospor kültürü için ise kallusların oluştuğu petriler saptanmış olup adet ve % olarak kaydedilmiştir.
- ❖ Embriyo benzeri yapı oluşumu (adet), (%): Anterlerin kültüre alınmasından 1 ay sonra embriyo benzeri yapıların oluşması başlamıştır. Aylık değerlendirmelerin daha doğru olması için kültüre alınan anterler düzenli olarak her petri ve her çeşit için haftalar bazında izlenmiş ve daha sonra düzenlemede adet ve % olarak kaydedilmiştir.
- ❖ Embriyo oluşumu (adet), (%): Mikrosporların kültüre alınmasından yaklaşık 2 ay sonra embriyo oluşumları başlamış olup, değerlendirmeleri bu süre dikkate alınarak yapılmıştır.
- ❖ Torpedo embriyo oluşumu (adet), (%): Anter kültüründe anterlerin kültüre alınmasından yaklaşık 1 ay sonra torpedo embriyoların oluşumu gözlemlenirken, mikrospor kültüründe ise kültüre alma işleminden yaklaşık 2 ay sonra torpedo aşamasındaki embriyolar gözlemlenmiştir. Aylık değerlendirmelerin daha doğru olması için kültüre alınan anterler ile mikrospor kültürü yapılan petriler haftalık olarak genotipler bazında izlenmiş ve daha sonra aylık olarak adet ve % olarak kaydedilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Uygun Tomurcuk Büyüklüğünün Saptanması

Anter ve mikrospor kültürlerine en iyi cevap veren dönemler; mikrospor çekirdeğinin mitoz bölünmeye başlamasından hemen önceki dönem, mitoz bölünme aşaması veya hemen bu aşamayı izleyen bölünme sonrası dönem olarak belirlenmiş ve *Solanaceae* familyasındaki birçok bitki türünde bunun geçerli olduğu görülmüştür (Vagera 1990, Kristiansen Andersen 1993).

Başarılı bir anter ve mikrospor kültürü için en belirleyici faktörlerden birisi olarak kabul edilen faktör olan uygun aşamadaki tomurcukların toplanması hususunda bugüne kadar birçok araştırmacı tarafından çalışılmış olup, tek çekirdekli mikrosporları bulduran tomurcuklarda (Kim vd 2004, 2008; Lantos vd 2009; Supena vd 2006, 2011) petallerin sepaller içinden henüz çıkmadığı, ancak hafifçe görülmeye başladığı (Özkum ve Tıprıdamaz 2002, Nowaczyk ve Kisiala 2006) ve bu dönemdeki anterlerin soluk yeşil, kenarlarının açık mavi ya da mor renkte olduğu (Kim vd 2004) saptanmıştır.

Uygun aşamada olduğu belirlenen tek çekirdekli mikrosporları bulduran tomurcukları seçebilmek amacıyla, her genotipte çiçeklenmenin başlamasından itibaren farklı irilikteki tomurcuklardan örnekler alınarak tomurcuk uzunluğu ve tomurcuk özellikleri (taç ve çanak yaprakların gelişim aşamaları ve anter rengi) dikkate alınarak sınıflandırmaları yapılmıştır.

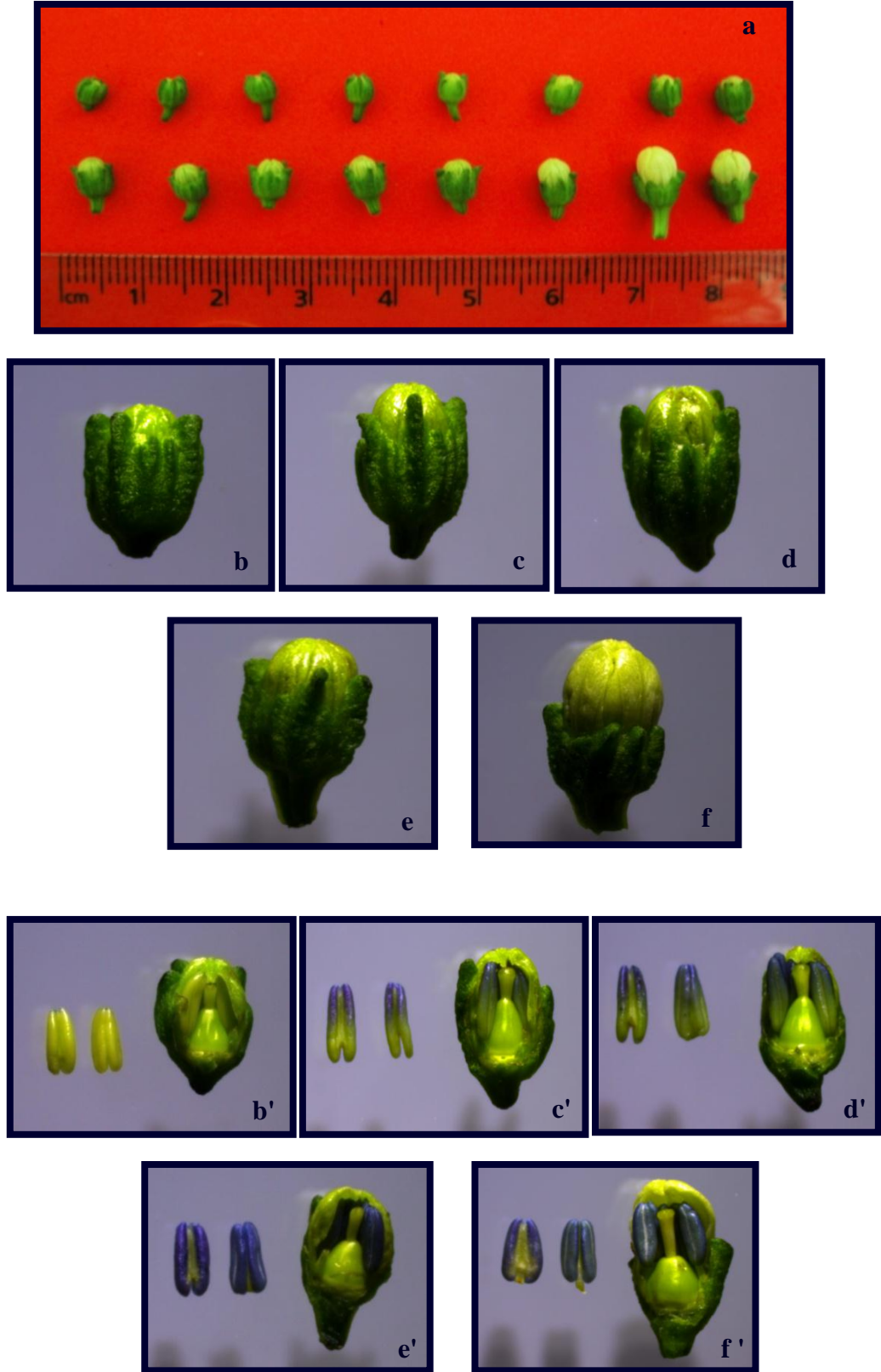
Buna göre genel anlamda çalışmada kullanılacak olan biber genotipleri 2-4 mm, 4-6 mm, 6-8 mm, 8-10 mm ve 10-12 mm olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır (Çizelge 4.1). Arzu edilen özelliklere sahip olan uygun aşamadaki mikrosporları içeren tomurcuklar standart ve F₆ genotipleri için 4-6 mm boyutlarında oldukları belirlenirken, F₁ ve F₄ seviyesindeki genotipler için ise tek çekirdekli mikrosporların yoğunlukta olduğu 6-8 mm boyutlarında oldukları saptanmıştır.

Yapılan gözlemlere dayanarak çalışmada kullanılan biber genotiplerinde 2. ve 3. grup tomurcukların tek ve çift çekirdekli, 4. grup tomurcukların çoğunlukla çift çekirdekli ve 5. grup tomurcukların ise çift çekirdekli mikrosporları içerdiği saptanmıştır. Anter ve mikrospor kültürüne verecekleri olumlu yanıt bakımından 2. ve 3. grup tomurcukların seçilmesinin daha uygun olacağı söylenebilir.

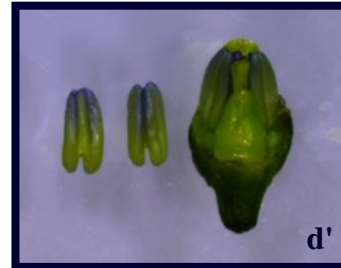
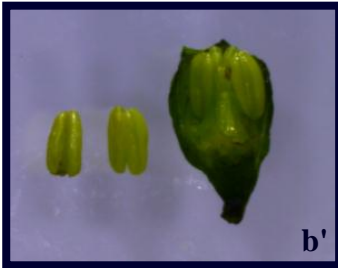
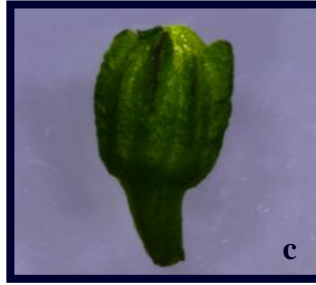
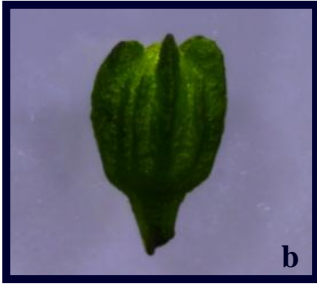
Çizelge 4.1. Tomurcukların sınıflandırılması

Tomurcuk Gelişme Dönemi (Gruplar)	Tomurcuk Boyu	Tomurcuk Özellikleri
1	2-4 mm	Petallerin sepaller içinden henüz çıkmadığı veya sepallerle eşit olduğu; anter renginin ise soluk yeşil olduğu tomurcuklardır.
2	4-6 mm	Petallerin sepallerden birazcık daha uzun olduğu; anter renginin ise kenarlardan açık mavi renkten menekşe rengine döndüğü tomurcuklardır.
3	6-8 mm	Petallerin sepallerden biraz daha uzun olduğu; anter renginin ise menekşe rengine doğru döndüğü tomurcuklardır.
4	8-10 mm	Petallerin sepallerden daha uzun olduğu; anter renginin ise menekşe rengi olduğu tomurcuklardır.
5	10-12 mm	Petallerin sepallerden çok daha uzun olduğu; anter renginin ise menekşe renginden biraz daha koyu olduğu tomurcuklardır.

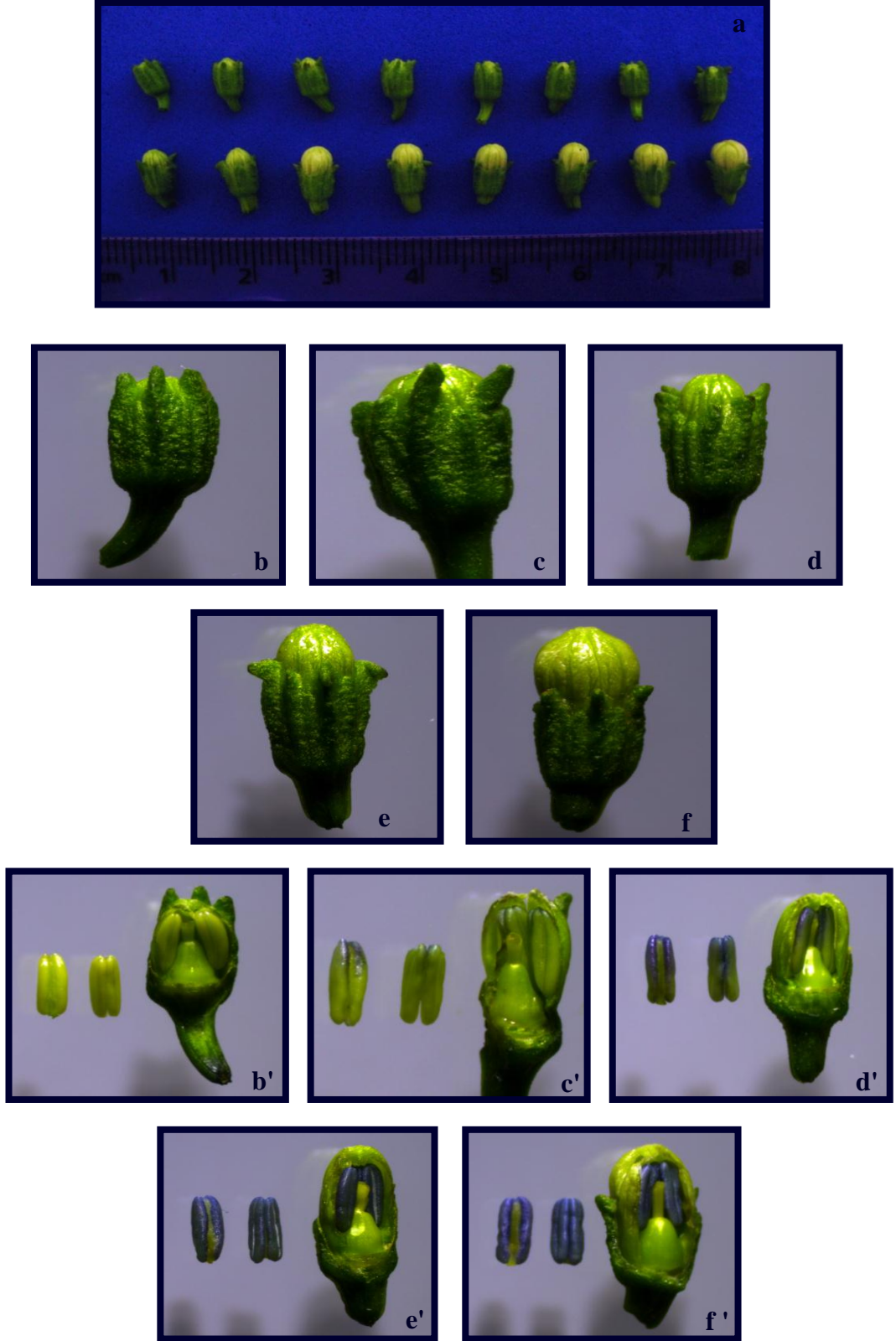
Yapılan bu sınıflandırmaya göre çalışmada standart ve F₆ kademesindeki genotiplerde 4-6 mm, F₁ ve F₄ kademesindeki genotiplerde ise 6-8 mm olan tomurcuklar kullanılmış olup, anter ve mikrospor kültürüne verecekleri olumlu yanıt bakımından 2. ve 3. grup tomurcukların seçilmesinin daha uygun olacağı saptanmıştır.



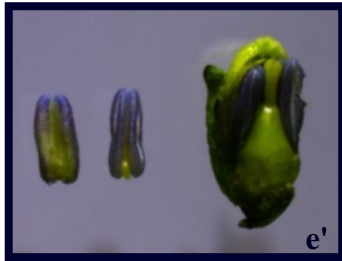
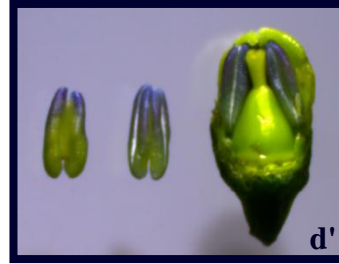
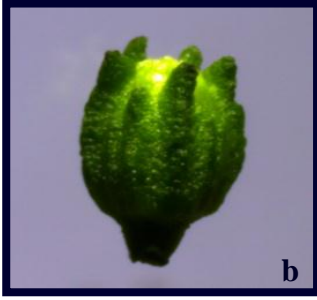
Şekil 4.1. Standart çeşide ait çiçek tomurcuklarının sınıflandırması (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. grup, c ve c': 2. grup, d ve d': 3. grup, e ve e': 4. grup, f ve f': 5. grup tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü)



Şekil 4.2. F₁ çeşide ait çiçek tomurcuklarının sınıflandırması (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. grup, c ve c': 2. grup, d ve d': 3. grup, e ve e': 4. grup, f ve f': 5. grup tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü)



Şekil 4.3. F₆ genotipine ait çiçek tomurcuklarının sınıflandırması (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. grup, c ve c': 2. grup, d ve d': 3. grup, e ve e': 4. grup, f ve f': 5. grup tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü)



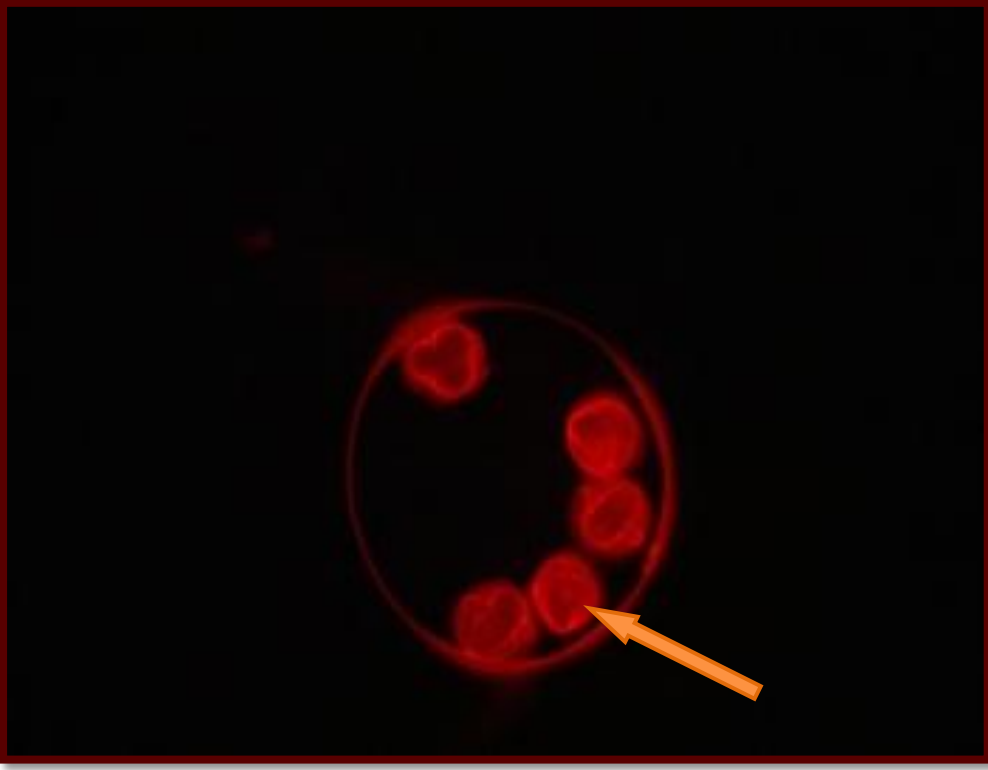
Şekil 4.4. F₄ genotipine ait çiçek tomurcuklarının sınıflandırması (a: tomurcukların toplu halde görünümü, b ve b': 1. grup, c ve c': 2. grup, d ve d': 3. grup, e ve e': 4. grup, f ve f': 5. grup tomurcuklar ve bu tomurcuklara ait anterlerin görünümü)

Anter ve mikrospor kültürü uygulamalarında uygun aşama olarak kabul edilen tek çekirdekli aşamayı tomurcuklar için belli ölçü kriterleri ile belirleme işlemini birçok araştırmada bulmak mümkündür. Ancak anter ve mikrospor kültürü çalışmalarında kullanılacak olan tomurcukların görsel olarak belli büyüklüklere göre seçilmesinin yanı sıra mikrosporların gelişim aşamalarını uygulamalardaki başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri olarak düşünenecek olursak, en uygun mikrospor gelişim aşamasını belirlenmesi amacıyla çekirdek boyaması yönteminin de kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla çekirdek boyamasında etkili bir teknik olan Ethidium Bromid ile boyama işlemi yapılarak, uygun aşamadaki mikrosporlar belirlenmiştir.

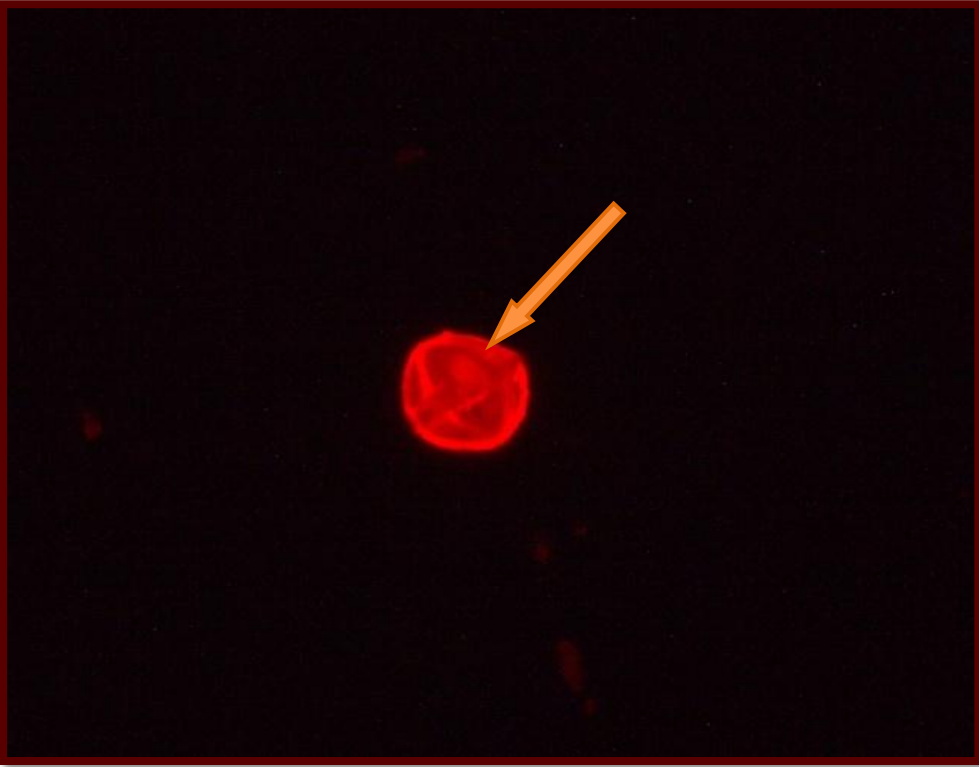
Morfolojik şekillerine ve büyüklüklerine göre sınıflandırılan tomurcukların anterlerdeki mikrospor oluşum aşamalarını belirlemek amacıyla yapılan sitolojik gözlemlerde EtBr çözeltisi kullanılarak floresan mikroskobunda gözlem yapılmış (Şekil 4.5, 4.6, 4.7) ve yapılan gözlemler bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır.



Şekil 4.5. Standart biber çeşidinde görüntülenen tek çekirdekli yapı (10x4)



Şekil 4.6. F₁ biber çeşidinde görüntülenen tek çekirdekli yapı (10x4)



Şekil 4.7. F₆ biber genotipinde görüntülenen tek çekirdekli yapı (10x4)

4.2. Anter Kültürü Uygulamasından Elde Edilen Sonuçlar

Çalışmada anter kültürü için Ayar'ın (2011) başarılı olduğu saptanan besi ortamı 4mg/l NAA ve 1 mg/l BA hormonları ilave edilmiş Murashige ve Skoog (1962) hazırbesi ortamı kullanılmış olup, % 3 sukroz, % 0.8 agar eklenmiş ve pH 5.7-5.8'e ayarlanmıştır.

Dumas de Vaulx vd' nin (1981) geliştirdikleri ve başarılı buldukları protokole uygun olarak, kültüre alınan petriler 35 °C'de 8 gün boyunca karanlık ortam koşullarında bekletilerek sıcaklık ön uygulaması işlemine tabi tutulmuş ve 8. günün sonunda 25 °C' de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks aydınlatmaya sahip olan büyüme odasına transfer edilmiştir.

Çalışmada genetik ilerleme seviyeleri farklı 4 biber genotipi kullanılmış olup, çeşitlerin anter kültürüne verdikleri tepkileri bakımından elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2' de sunulmuştur.

Yapılan gözlemler sonucunda, anter kültürüne gösterdikleri tepki bakımından en iyi sonuçları gösteren F₄ genetik ilerleme seviyesindeki genotip olmuştur. % 15.07 torpedo embriyo oluşum oranı ile F₄ genotipinin çalışılan genotipler arasında en iyisi olduğunu söylemek mümkünken (132 adet), diğer genotiplerde ise torpedo embriyo oluşumu gözlemlenmediği söylenebilir (Çizelge 4.2).

Oluşan embriyo benzeri yapılar açısından değerlendirildiğinde F₄ genotipi 36 adet embriyo benzeri yapı oluşturarak % 4.1 oran ile anter kültürüne en iyi tepkiyi verirken, yine F₄ genotipi 13 adet embriyogenik kallus oluşumu ve buna tekabül eden % 1.48 oranla anter kültürüne en iyi sonucu göstermiştir. Bu iki oluşum bakımından değerlendirildiğinde diğer genotiplerin anter kültürüne tepkisi olmamıştır (Çizelge 4.2).

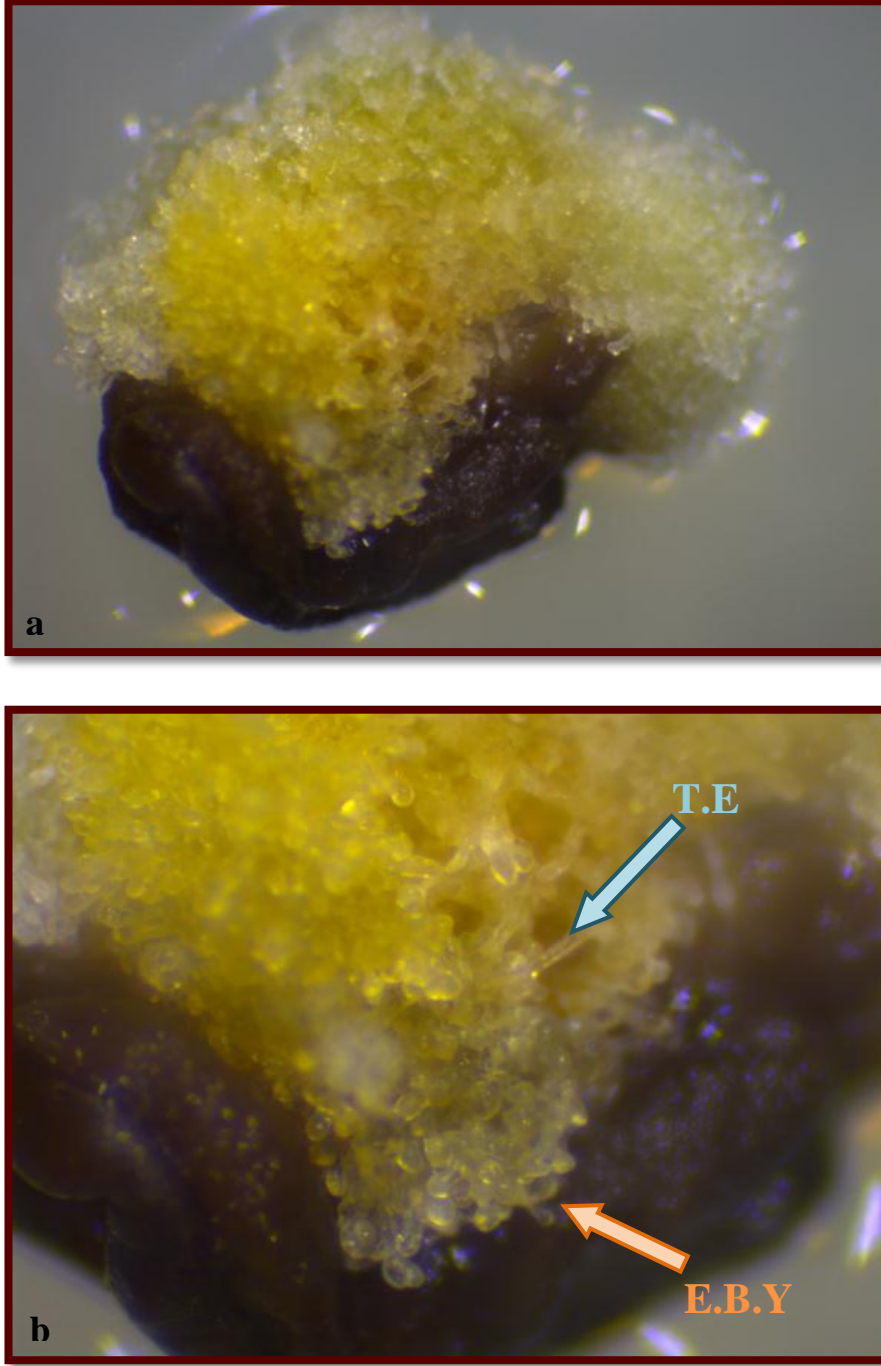
Çalışmada denenen genotipler bazında kallus oluşum oranları kıyaslandığında ise F₄ genotipi değerlendirmeye alınan diğer kriterlerde de gözlemlendiği gibi % 2.28 ile yine en iyi sonucu vermiş olup (20 adet), bunu % 0.47 kallus oluşum oranı ile standart çeşit (3 adet) ve % 0.08 oluşum oranı ile F₁ çeşidi (1 adet) takip etmiştir (Çizelge 4.2). Elde edilen diğer sonuçlarda olduğu gibi F₆ genotipi hiçbir şekilde anter kültürüne tepki göstermemiştir.

Çalışmanın başlangıcında uygun aşamada olduğu belirlenen tomurcukların kullanılarak anter kültürlerinin yapıldığı standart çeşit ile F₁ ve F₆ kademesindeki genotiplerden hiçbir şekilde embriyo ya da embriyo benzeri yapı elde edilememesi beklenmeyen bir durum olmuştur. Bu durumun sebebi olarak bitkilerin yetiştirilmesi esnasındaki bitki isteklerinden ya da kültürel uygulamalarında farklılık isteyebileceklerinden veyahut da çalışmada kullanılan bu genotiplerin yine çalışmada kullanılan besi ortamı ve hormon kombinasyonuna tepki verememesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Buna benzer bir durumla Ercan ve Şensoy (2011) da yaptıkları çalışmada karşılaşmış olup, kullandıkları biber tiplerinden birkaçından yüksek tepki alırken diğerlerinden ise hiçbir şey elde edemediklerini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.2. Biber genotiplerine ait anterlerin anter kültürüne verdikleri yanıtlar

Genotipler	Anter Sayısı (adet)	Oluşan Kallus Sayısı (adet)	Oluşan Embriyogenik Kallus Sayısı (adet)	Oluşan Embriyo Benzeri Yapı Sayısı (adet)	Oluşan Torpedo Embriyo Sayısı (adet)	Oluşan Kallus Oranı (%)	Oluşan Embriyogenik Kallus Oranı (%)	Oluşan Embriyo Benzeri Yapı Oranı (%)	Oluşan Torpedo Embriyo Oranı (%)
F ₁	1197	1	—	—	—	0.08	—	—	—
F ₆	555	—	—	—	—	—	—	—	—
Standart	642	3	—	—	—	0.47	—	—	—
F ₄	876	20	13	36	132	2.28	1.48	4.1	15.07

Şekil 4.8'de çalışmada kullanılan hormon kombinasyonu eklenerek hazırlanan MS ortamında F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterden gözlemlenen embriyo benzeri oluşumlar ve torpedo embriyolar görülmektedir.



Şekil 4.8. F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterden gözlemlenen embriyo benzeri oluşumlar ve torpedo embriyolar (a) ve bu oluşumların yakın görünümü (b) (T.E = torpedo embriyo; E.B.Y = embriyo benzeri yapı) (10x4)

Şekil 4.9 'da 4 mg/l NAA ve 1 mg/l BA hormon kombinasyonu eklenerek hazırlanan MS ortamında F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterden gözlemlenen embriyo benzeri oluşumlar görülmektedir.



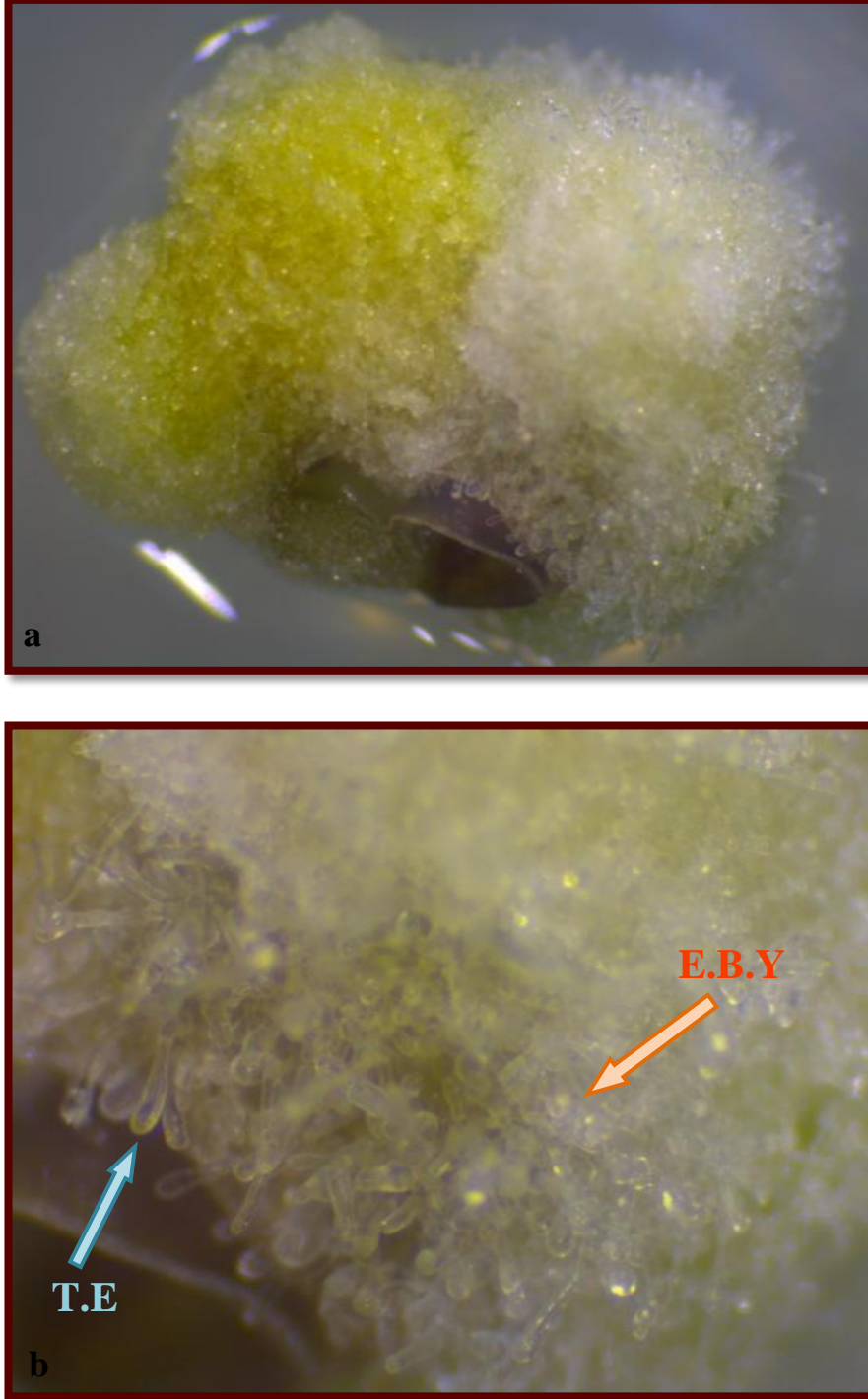
Şekil 4.9. F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterden gözlemlenen embriyo benzeri oluşumlar (E.B.Y = embriyo benzeri yapılar) (10x4)

Şekil 4.10 'da yine aynı ortamda F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde kallus oluşumu yer almaktadır.



Şekil 4.10. F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde oluşan kallus (10x4)

Şekil 4.11 'de daha önce bahsedilen hormon kombinasyonunu içeren MS temel besi ortamında F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde oluşan kallus ve embriyo benzeri yapılar (a) ile aynı uygulamada oluşan torpedo embriyolar ve embriyo benzeri yapılar (b) görülmektedir.



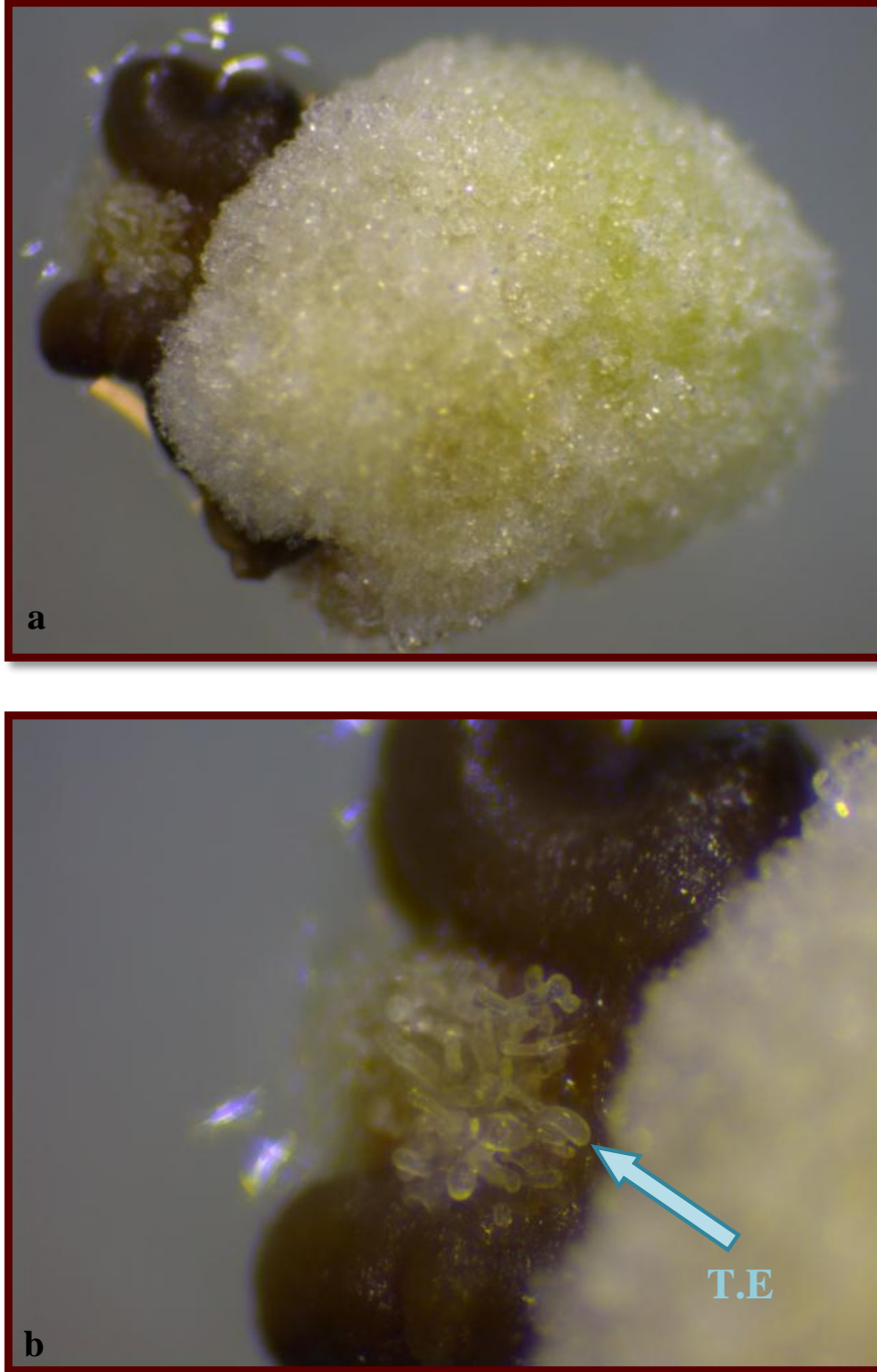
Şekil 4.11. F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde oluşan kallus ve embriyo benzeri yapılar (a), torpedo embriyolar ve embriyobenzeri yapılar (b) (10x4)

Şekil 4.12'te aynı temel besin ortamında F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde farklı uçlarda oluşan kallus, embriyo benzeri yapılar ve torpedo embriyo oluşumları (a) görülmekte olup, diğer görüntüde ise (b) oluşan bu embriyo benzeri yapılar ile torpedo embriyoların yakından görünümü sunulmuştur.



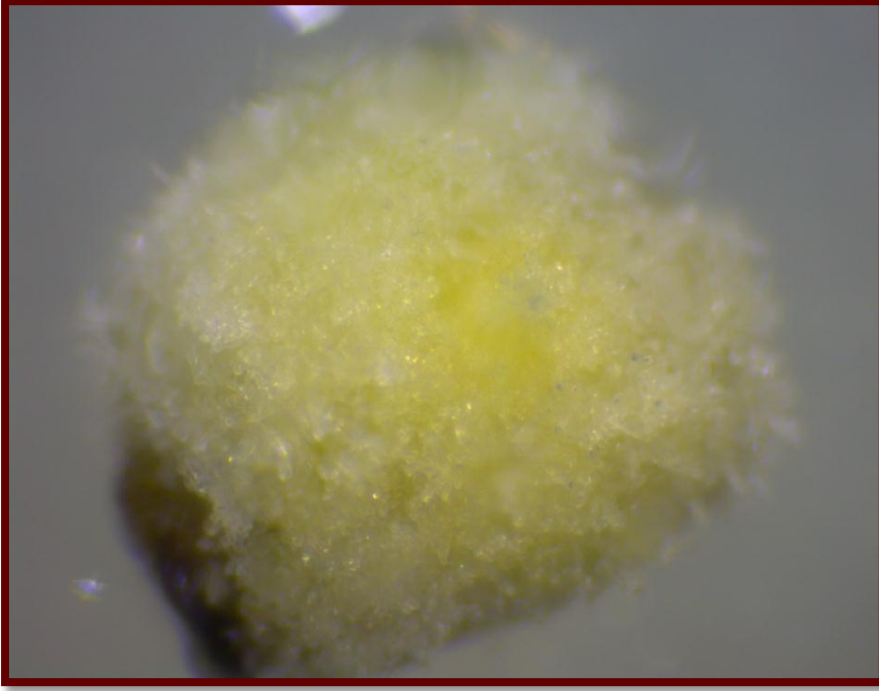
Şekil 4.12. F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde oluşan kallus, embriyo benzeri yapılar ve torpedo embriyo oluşumları (a), embriyo benzeri yapılar ile torpedo embriyoların yakından görünümü (b) (10x4)

Şekil 4.13 'te çalışmada bahsedilen hormon kombinasyonu ile desteklenen MS temel besi ortamında F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde farklı uçlarda oluşan farklı yapılar görülmektedir. İlk görüntüde kallus ve torpedo embriyo oluşumlarını görmek mümkünken (a), diğer görüntüde (b) ise torpedo embriyo oluşumlarının yakın görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4.13. F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde oluşan kallus ve torpedo embriyo (a), torpedo embriyo oluşumunun yakın görünümü (b) (10x4)

Şekil 4.14 'de MS temel besi ortamında hormon kombinasyonunun eklenmesiyle hazırlanan ortama dikilen anterden gelişen kallus oluşumu gösterilmektedir.



Şekil 4.14. F₄ genetik ilerleme seviyesindeki bitkiden alınan anterde kallus oluşumu (10x4)

4.3. Mikrospor Kültürü Uygulamasından Elde Edilen Sonuçlar

Mikrospor kültürü uygulamasında kültür ortamı olarak Lantos vd (2012)' nin yaptıkları çalışmada kullandıkları ve başarılı buldukları 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l kinetin içeren Gamborg vd (1968) tarafından geliştirilen B5 ortamı kullanılmıştır.

Başarılı bir mikrospor kültürü için, mikrosporlar belirli bir yoğunlukta kültüre alınmalıdır. Bu amaçla bir tomurcuktaki ortalama mikrospor yoğunluğunu belirlemek için thoma lamında sayım yapılmış ve Lantos vd'nin (2009) yaptıkları çalışmaya göre mikrospor yoğunluğu 3.10^4 ml^{-1} olarak ayarlanmıştır.

Biberde yapılan mikrospor kültürü çalışmalarında anterlerin ilk yedi günlük sürede 32°C 'de karanlıkta tutulmasının kallus ve embriyo oluşumu için gerekli olduğu belirtilmiş ve bu amaçla sterilizasyonu tamamlanan tomurcuklardan izole edilen anterler mannitol solüsyonu içeren petri kaplarına aktarılmış ve yukarıda belirtildiği şekilde ön sıcaklık ve açlık uygulamalarına tabi tutulmuştur (Lantos vd 2009).

Denemeden elde edilen bulgulara dayanarak, mikrospor kültürü uygulamasında kullanılan besi ortamları ve çeşitlerde hiçbir ön uygulamaya maruz bırakılmadan kültüre alma işlemi gerçekleştirilen petrielerde embriyogenik kallusların ve torpedo embriyo aşamasına gelmiş yapıların oluştuğu gözlemlenirken, sıcaklık ve açlık ön uygulamaları ile muamele edilen petrielerde hiçbir oluşum elde edilemediği söylenebilir.

Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan biber genotiplerine ait petrilerde genotiplerin mikroskop kültürüne verdikleri yanıtlar

Genotipler	Petri Sayısı (adet)	Oluşan Kallus Sayısı (adet)	Oluşan Embriyogenik Kallus Sayısı (adet)	Oluşan Embriyo Sayısı (adet)	Oluşan Torpedo Embriyo Sayısı (adet)	Oluşan Kallus Oranı (%)	Oluşan Embriyogenik Kallus Oranı (%)	Oluşan Embriyo Oranı (%)	Oluşan Torpedo Embriyo Oranı (%)
F ₁	67	-	-	-	-	-	-	-	-
F ₆	13	-	1	-	-	-	7.69	-	-
Standart	22	-	-	-	-	-	-	-	-
F ₄	36	5	2	5	1	13.89	5.56	13.89	2.78

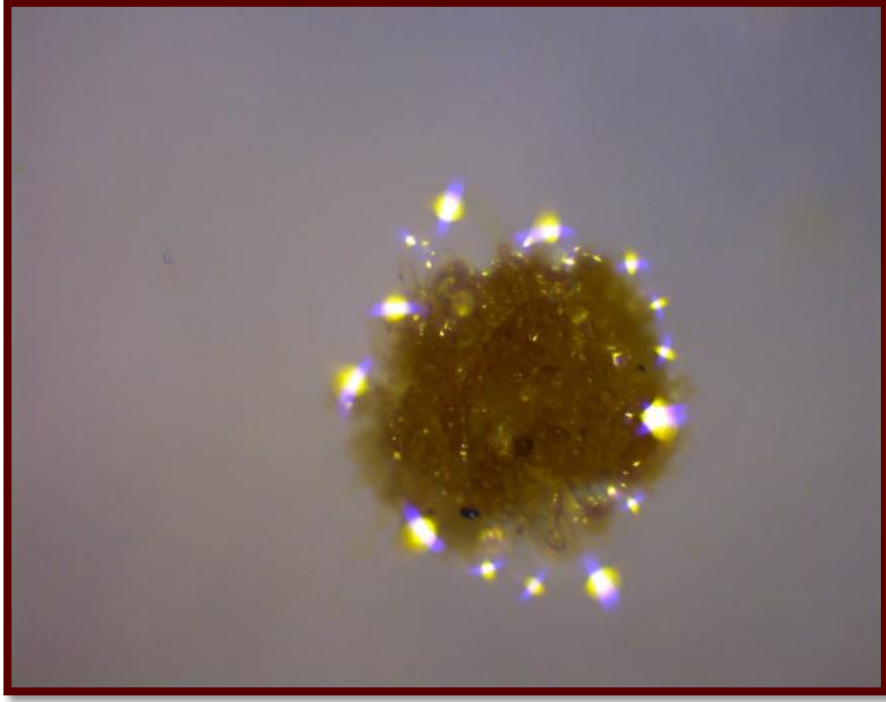
Yapılan gözlemler sonucunda, mikrospor kültürüne gösterdikleri tepkiler bakımından kallus, torpedo embriyo ve embriyo oluşumu bakımından en iyi sonuçları gösteren çeşit F₄ genetik ilerleme seviyesindeki genotip olmuştur. Çalışmada elde edilen 5 adet kallus (oranı % 13.89), 1 adet torpedo embriyo (oranı % 2.78) ve 5 adet embriyo (oranı % 13.89) ile çalışılan çeşitler arasında bu kıstaslarda en iyi tepkileri gösteren genotipin F₄ olduğunu söylemek mümkündür (Çizelge 4.3).

Çalışmada denenen genotipler bazında embriyogenik kallus oluşum oranları kıyaslandığında ise en iyi tepkiyi safhat genotipi gösterirken, bunu F₄ genotipi takip etmiştir. F₆ genotipinin embriyogenik kallus oluşturma oranı % 7.69 (1 adet) olup, bunu 2 adet embriyogenik kallus oluşumu ve buna denk gelen % 5.56 oluşum oranı ile F₄ genotipi takip etmiştir (Çizelge 4.3).

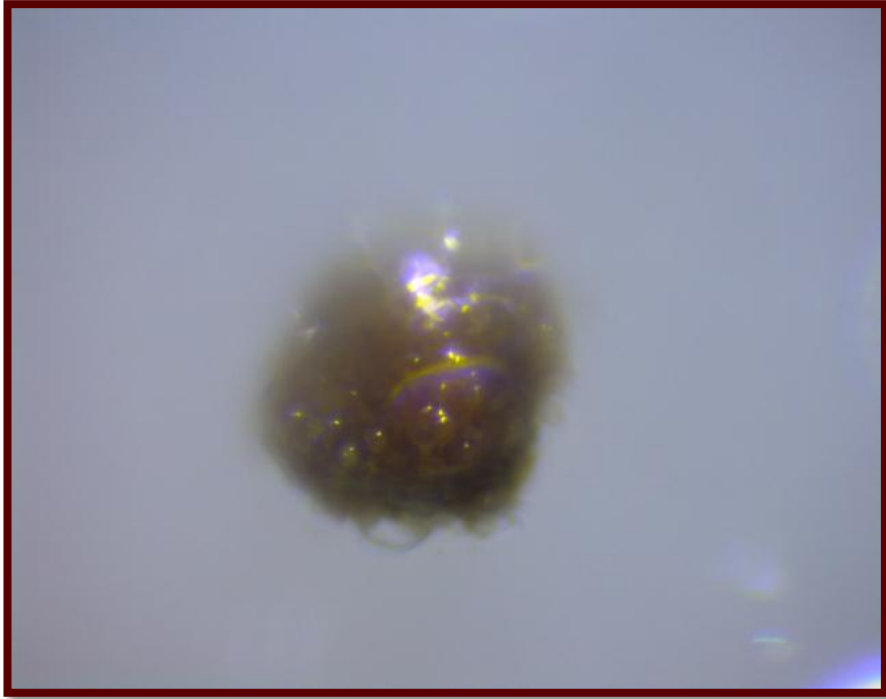
Yapılan değerlendirmeler sonucunda çalışmada denenen diğer genotiplerden elde edilen sonuçlara bakıldığında, bunların hiçbir gelişim göstermedikleri söylenebilir (Çizelge 4.3).

Denemeler kurulmadan önce tomurcukların sınıflandırılması aşamasında mikrospor kültürüne tepki vermesi beklenen uygun aşamadaki tomurcuklar seçilmiştir. Buna rağmen çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde sadece F₄ ve F₆ genotiplerinin kültüre alınan petrillerinde oluşumlar gözlemlenirken, diğer genotiplerin mikrospor kültürüne yanıt vermedikleri söylenebilir (Çizelge 4.3). Çalışmada kullanılan diğer genotiplerden hiçbir tepki alınamaması beklenmeyen bir durum olmuştur. Oluşumların gözlemlendiği bu iki farklı genetik ilerleme seviyesindeki genotip arasında bir değerlendirme yapıldığında ise F₄ genotipi dikkate alınan değerler bakımından hepsine farklı derecelerde tepki verirken, safhat genotipi ise sadece embriyogenik kallus oluşumu bakımından tepki meydana getirmiştir. Bu durumun sebebi olarak anter kültüründe de olduğu gibi bitkilerin yetiştirilmesi esnasındaki bitki isteklerinin farklılığından ya da kültürel uygulamalarında farklılık isteyebileceklerinden ya da çalışmada kullanılan bu farklı genetik ilerleme seviyelerindeki genotiplerin yine çalışmada kullanılan besi ortamı ve hormon kombinasyonuna tepki verememesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Şekil 4.15'te hormonla desteklenmeden hazırlanan B5 besi ortamında F₆ genotipinden alınan anterler kullanılarak uygulanan mikrospor kültüründe embriyogenik kallus oluşumu görüntülenmiştir. Daha sonra besi ortamında oluşan bu yapı %0.8 agar ve %3 sükrozla desteklenen B5 besi ortamına aktarılmış, ancak Şekil 4.16'da da görüldüğü gibi gelişmeden dumura uğramıştır.

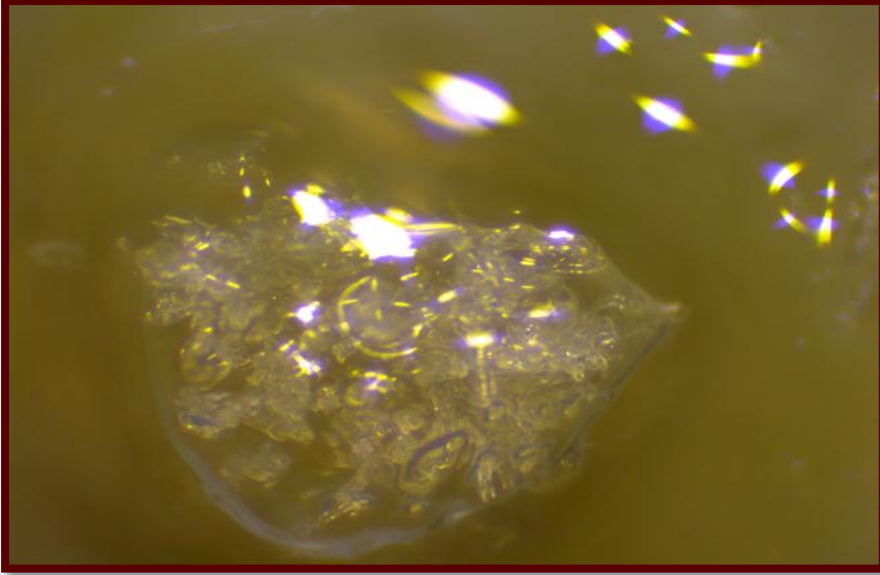


Şekil 4.15. Hormonsuz besi ortamında mikrospordan embriyogenik kallus oluşumu (10x4)



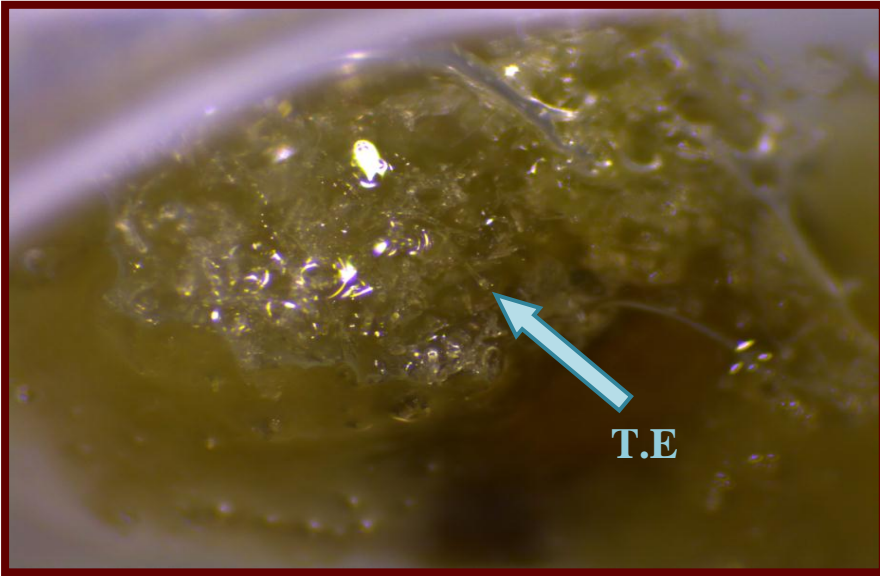
Şekil 4.16. Yeni besi ortamına aktarıldıktan sonra yaşamayan embriyogenik kallus (10x4)

Şekil 4.17'de 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l kinetinden oluşan hormon kombinasyonu eklenerek hazırlanan B5 besi ortamında kültüre alınan F₄ genotipinin mikrospor kültüründen elde edilen embriyogenik kallus oluşumunun görüntüsü sunulmuştur.



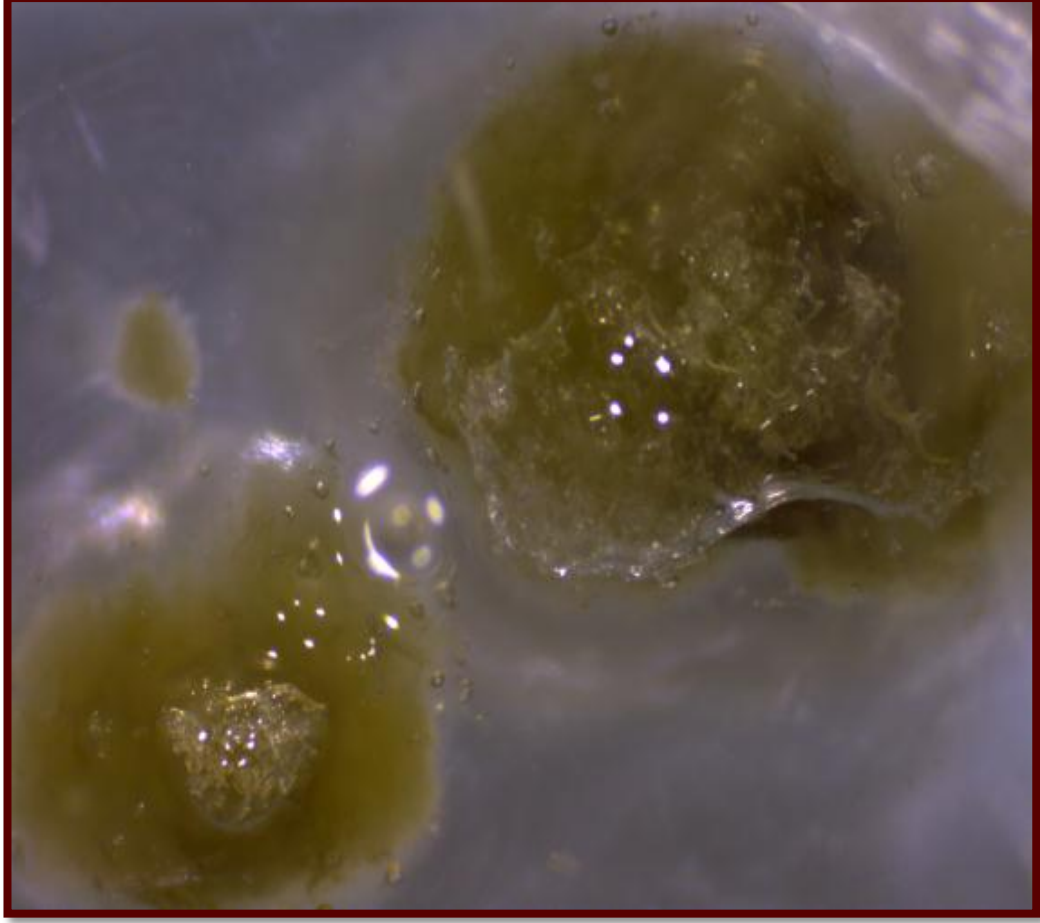
Şekil 4.17. Hormon içeren besi ortamında embriyogenik kallus oluşumu (10x4)

Şekil 4.18'de 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l kinetinden oluşan hormon kombinasyonu eklenerek hazırlanan B5 besi ortamında kültüre alınan F₄ genotipinin mikrospor kültüründen elde edilen torpedo embriyo oluşumunun görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4.18. Hormon içeren besi ortamında mikrospondan torpedo embriyo oluşumu (10x4)

Şekil 4.19'da ise aynı besi ortamı içeren petri içerisinde olduğu tespit edilen, Şekil 4.17'de görüntülenen embriyogenik kallus oluşumu ile Şekil 4.18'de görüntülenen mikrospordan torpedo embriyo oluşumları birarada sunulmuştur.

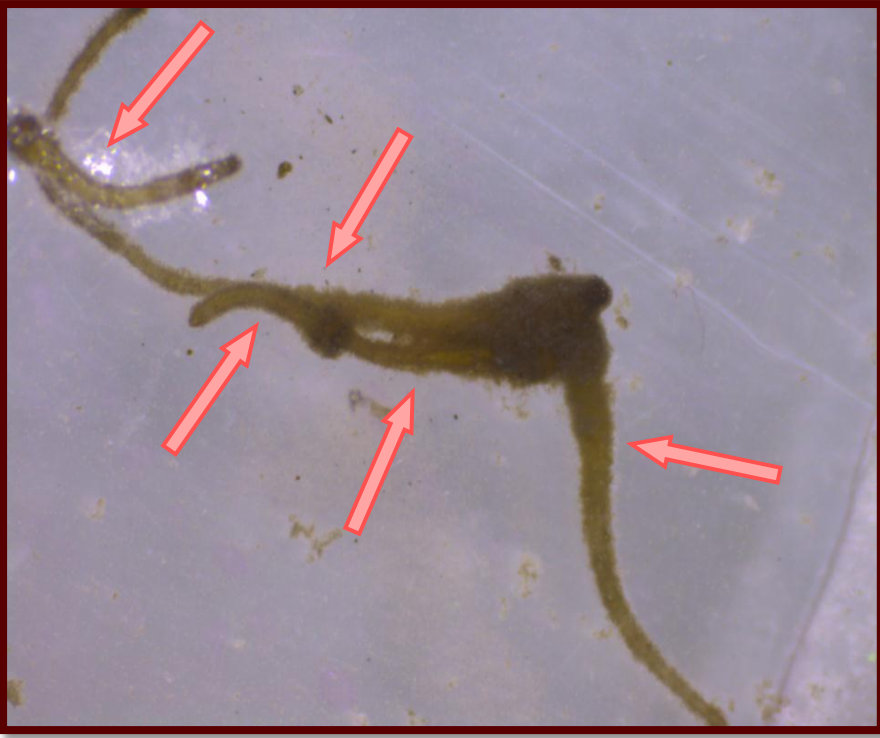


Şekil 4.19. Embriyogenik kallus ve torpedo embriyo yapısı (10x4)

Şekil 4.20'de ve Şekil 4.21'de, hem hormon kombinasyonu olmaksızın hazırlanan B5 besi ortamında hem de bu ortamda kültüre alınmadan önce herhangi bir ön uygulamaya maruz bırakılmaksızın F₄ genotipine ait mikrospordan meydana gelen gelişmiş embriyoların görüntüleri sunulmuştur.



Şekil 4.20. B5 temel besi ortamında gelişen embriyo (10x4)



Şekil 4.21. B5 temel besi ortamında oluşan embriyolar (10x4)

Yapılan bu çalışmada genotipler bazında kıyaslama yapıldığında farklı sonuçların gözlenmesi, genetik faktörünün anter ve mikrospor kültürlerinde çok önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermekte ve bugüne kadar yapılmış olan ve hala devam eden çalışmaların neden genotipin etkisi üzerine yoğunlaştığını açıklamaya yardımcı olmaktadır.

Bitkilerin genetik ilerleme seviyelerinin etkisinin anter kültürü ve mikrospor kültürü tekniklerini kullanarak haploid embriyo eldesi üzerine etkisi, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda tekrar belirlenmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda genetik faktörünün anter ve mikrospor kültürleri çalışmalarında etkisinin ne denli yüksek olduğu genel bir görüş olarak kabul edilmekteyken, yapılan bu çalışma ile bu faktörün etkisinin bir kez daha ortaya konulması ileriki çalışmalar için ümitvar olacaktır.

Ayrıca birçok araştırmacı tarafından biber anter ve mikrospor kültürleri çalışmalarında genotiple birlikte tomurcuk büyüklüğünün başarıyı etkileyen temel faktörlerden olduğu kabul edilmektedir (Kristiansen and Andersen 1993, Ayar 2011).

Anter kültüründe uygulanan yüksek sıcaklık ön uygulamalarının androgenesis üzerine etkisi birçok araştırmacı tarafından genel bir kabul görmektedir (Dumas de Vault vd 1981, Terzioğlu vd 2000, Çağlar vd 2004, Koleva-Gudeva vd 2007, Ercan ve Şensoy 2011, Parra-Vega vd 2013b). Aynı şekilde mikrospor kültürü tekniğinde de yapılan ön sıcaklık ile birlikte açlık uygulamalarının haploid embriyo ve bitki eldesi üzerine etkisi bu konuda çalışan araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Çağlar vd 2004, Lantos vd 2009, Lantos vd 2012). Anterlerin kültüre alınmadan önce ön uygulamalara tabi tutulduklarında anter kültüründe göstermiş oldukları tepkiler saptanmış olup, bu konuda yapılan çalışmalarla paralellik göstermiştir (Dumas de Vault vd 1981, Terzioğlu vd 2000, Çağlar vd 2004). Mikrospor kültüründe ise yapılan ön uygulamaların bugüne kadar gerçekleştirilmiş olan çalışmalardan (Lantos vd 2009, Lantos vd 2012) farklılık göstermiş olup, ön uygulama olmaksızın kültüre alınan mikrosporlardan elde edilen sonuçlar daha ümitvar olmuştur.

Sonuçları sunulmuş olan bu çalışmada, biber anter ve mikrospor kültürlerinde embriyo eldesinde genetik faktörünün etkisi açıkça görülmektedir. Kültüre alınan tomurcukların uygun aşamada mikrospor içermesi ise başarıyı büyük ölçüde etkilemektedir. Morfolojik kriterlere bakılarak genel bir çalışma ile sınıflandırmaları yapılan tomurcukların uygun aşamada olup olmadıklarının belirlenmesi ve tüm çalışma boyunca uygun büyüklükte oldukları belirlenen kullanılması sağlanmış olup, çekirdek boyaması yönteminin de kullanılması ile aşamaların kesin olarak saptanması sağlanmıştır. Araştırma sonucunda genetik ilerleme seviyelerine uygun aşamada mikrosporları içeren anterlerin kültüre alınması ile embriyo oluşum frekansının yükseltilebileceği saptanmıştır.

5. SONUÇ

Bu çalışmada standart, F₁, F₄ ve F₆ genetik ilerleme seviyelerinde biber genotipleri kullanılarak, anter kültürü ve mikrospor kültürü teknikleri ile haploid embriyo eldesi üzerine farklı genetik ilerleme seviyelerinin etkileri araştırılmıştır. Denemede kullanılan 4 genotipten anter kültürüne gösterdikleri tepki bakımından iyi sonuçları F₄ genetik ilerleme kademesindeki genotipin verdiği belirlenirken, F₆ genotipinin ise hiç yanıt vermediği gözlemlenmiştir. Çalışmanın mikrospor kültürü tekniğinin uygulandığı kısmında ise, genotiplerin tepkileri bazında değerlendirildiklerinde yine en iyi sonuçları F₄ genetik ilerleme kademesindeki genotipin gösterdiği gözlemlenmiş olup, F₁ ve standart çeşitlerin ise uygulamalara yanıt vermediği saptanmıştır.

Yapılan bu çalışmada anterden torpedo embriyo oluşturma oranında F₄ genetik ilerleme kademesindeki genotipten % 15.07 oranında torpedo (torpil) embriyo oluşum oranı ile uygulamada kullanılan diğer genotiplere göre daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır.

Uygun mikrospor aşamasını belirlemek amacıyla morfolojik olarak sınıflandırma yapılmış olup, tomurcuklar 5 grup altında toplanmıştır. Morfolojik bakımdan sınıflandırmanın yanı sıra, farklı boyutlardaki bu tomurcukların arasından anter ve mikrospor kültürü için uygun aşamadaki tomurcuk grubunun kesin olarak belirlenmesi amacıyla çekirdek boyaması yöntemi kullanılarak floresan mikroskobu aracılığıyla incelemeler yapılmıştır. 5 farklı gruba ayrılan tomurcuklarda çekirdek sayıları tek çekirdekliден çift çekirdekliye kadar farklılık göstermiş olup, çalışmada kullanılan biber genotiplerinde 2. ve 3. grup tomurcukların tek ve çift çekirdekli, 4. grup tomurcukların çoğunlukla çift çekirdekli ve 5. grup tomurcukların ise çift çekirdekli mikrosporları içerdiği saptanmıştır. Saptanan bu değerlere dayanarak, anter ve mikrospor kültürlerine verecekleri tepkiler bakımından 2. ve 3. grup tomurcukların seçilmesinin daha uygun olacağı söylenebilir. Bu bakımdan donör bitkilerin maruz kaldıkları iklim şartları, kültürel bakım işlemleri vb. yetiştirme koşullarının farklılaşması ile bitki gelişiminde farklılıklar yaşanabileceği ve buna bağlı olarak da mikrosporların içerdikleri çekirdek sayılarının değişiklik gösterebileceği dikkate alınmalıdır. Çekirdek boyanması tekniğinde etkili bir yöntem olan Ethidium Bromid ile yapılan uygun mikrospor aşamasının belirlenmesi yoluyla embriyo oluşum oranının arttırılabileceği göz ardı edilmemelidir.

Anter kültürü yöntemi ile haploid embriyo elde edilmesinde anterlere yapılan sıcaklık ön uygulamasının etkili olduğu belirlenmiştir. Genotiplerin genetik ilerleme seviyelerine bakılmaksızın yapılan sıcaklık ön uygulaması sonucunda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde sıcaklık ön uygulaması yapılmayanlara oranla daha yüksek sonuçlar elde edildiği söylenebilir.

Anter kültürü yönteminde olduğu gibi mikrospor kültürü tekniğinde de çalışma süresince sıcaklık ön uygulamasının yanı sıra açlık ön uygulaması da yapılmış olup, çalışılan farklı genetik ilerleme kademelerindeki genotiplerin bu ön uygulamalara olan tepkileri değerlendirildiğinde, çalışmada kullanılan ön uygulamaların mikrospor kültürü

yöntemi ile haploid embriyo elde edilmesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı, hatta ön uygulama yapılmadan oluşturulan kültürlerden daha iyi sonuç alındığı saptanmıştır.

Çalışılan farklı genetik ilerleme seviyelerine uygun olacak şekilde bu şartların iyileştirilmesi ile biber anter ve mikrospor kültürleri tekniklerinden beklenen daha yüksek başarılar sağlanmış olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- ABAK, K. 1988. Türkiye’de bitki ıslahı çalışmalarında *in vitro* tekniklerden yararlanma. I. Uluslararası Tarım ve Biyoteknoloji Sempozyumu. 1-3 Haziran, ss. 1-7, Adana.
- ABAK, K., DÜZYAMAN, E., ŞENİZ, V., GÜLEN, H., PEKŞEN, A. ve KAYMAK, Ç.H. 2010. Sebze Üretimini Geliştirme Yöntem ve Hedefleri. VII. Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi. 11-15 Ocak, Ankara, Türkiye.
- AKTAŞ, H., SÖYLEMEZ, S. ve PAKYÜREK, A.Y. 2009. Farklı budama şekillerinin sera dolmalık biber (*Capsicum annuum* L.) yetiştiriciliği üzerine etkisi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(3): 31-36.
- ANONİM 2011. <http://www.fao.org>
- ARI, E. 2006. Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*’da Anter Kültürü Çalışmaları, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, Adana, 169 s.
- AYAR, Ş, F. 2011. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Genotip, Bitki Yaşı ve Mevsimin Haploid Bitki Eldesine Etkisinin Araştırılması, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, Antalya, 143 s.
- BABAOĞLU, M., YORGANCILAR, M. ve AKBUDAK, M.A. 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. Mehmet BABAOĞLU, Ekrem GÜREL ve Sebahattin ÖZCAN, Bitki Biyoteknolojisi Cilt I - Doku Kültürü ve Uygulamaları. S. Ü. Vakfı Yayınları, ss. 1-35, Konya.
- BAJAJ, Y.P.S. 1990a. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Volume 12. Haploids in Crop Improvement I., pp. 3-44.
- BAJAJ, Y.P.S. 1990b. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Volume 12. Haploids in Crop Improvement I., pp. 372-380.
- BAL, U., ABAK, K., BUYUKALACA, S., COMLEKCIOGLU, N. 2003. Development of Callus Colonies From the Isolated Microspore Culture of *Capsicum annuum* L. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 17(2): 38-43.
- BAL, U., ELLİALTIOĞLU, Ş., ABAK, K. 2009. Induction of Symmetrical Nucleus Division and Multi-Nucleate Structures in Microspores of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Cultured *In Vitro*. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 66(4): 535-539.
- BÁRÁNY, I., GONZÁLEZ-MELENDI, P., FADÓN, B., MITYKOŹ, J., RISUEÑO, M.C. and TESTILLANO, P.S. 2005. Microspore-derived embryogenesis in

pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biol. Cell*, 97: 709–722.

- BİNER, Ş.B. 1998. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine Farklı Sıcaklık ve Işık Uygulamalarının Etkileri. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya, 59 s.
- COŞKUN, Y. 2011. Mikrospor Kültürü ile Makarnalık Buğday Bitkisinde (*Triticum durum* Desf.) Embriyo Üretimi ve Bitki Regenerasyonu, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, 115 s.
- ÇAĞLAR, G., ARAS, V. ve BAYRAM, A. 2004. Kurutmalık Kırmızı Biberlerde Androgenesis Yoluyla *In Vitro* Haploid Embriyo Uyarımı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(1): 87-94.
- ÇAĞLAR, G., BAYRAM, A. ve ARAS, V. 2003. Kahramanmaraş Kırmızı Biberlerinde Androgenesis Yoluyla Haploid Bitki Elde Edilmesi. TÜBİTAK, Proje no: TOGTAG/TARP-2024, Kahramanmaraş, 34 s.
- DUMAS DE VAULX, R., CHAMBONNET, D., POCHARD, E. 1981. *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) Anthers: high rate plant production from different genotypes by +35 °C treatments. *Agronomie*, 1(10): 859-864.
- ELLİALTIOĞLU, Ş. 2000. Haploid Bitkilerin Bitki Islahı Programlarında Kullanımı. Biki Islahı Kursu, Seminer Notları (Yayımlanmamış), Nisan 2000, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Samsun.
- ELLİALTIOĞLU, Ş., SARI, N., ABAK, K. 2001. Haploid Bitki Üretimi. Mehmet BABAOĞLU, Ekrem GÜREL ve Sebahattin ÖZCAN, Bitki Biyoteknolojisi Cilt I - Doku Kültürü ve Uygulamaları. S. Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 137-189.
- ELLİALTIOĞLU, Ş. ve TIPIRDAMAZ, R. 2002. Soğuk Uygulamaları Ve Aktif Kömürün Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Süresince Absisik Asit Miktarındaki Değişim Üzerine Etkisi. *Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1): 9-18.
- ERCAN, N. ve AYAR ŞENSOY, F. 2011. Androgenic Responses of Different Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4(2): 59-61.
- FERRIE, A.M.R., CASWELL, K.L. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 104: 301-309.

- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. and OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 60: 151-158.
- IRIKOVA, T. and RODEVA, V. 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): The effect of nutrient media. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 23: 101-104.
- IRIKOVA, T., GROZEVA, S., POPOV, P., RODEVA, V., TODOROVSKA, E. 2011. *In Vitro* Response of Pepper Anther Culture (*Capsicum annuum* L.) Depending on Genotype, Nutrient Medium and Duration of Cultivation. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 25(4): 2604-2609.
- KIM, M., KIM, J., YOON, M., CHOI, D.I., LEE, K.M. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue Org Cult*, 77: 63-72.
- KIM, M., JANG, I.C., KIM, J.A., PARK, E.J., YOON, M., LEE, Y. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep*, 27: 425-434.
- KOLEVA GUDEVA, L. and TRAJKOVA, F. 2012. Anther Culture of Pepper: Morphological Characteristics of Fruits of Androgenetic Pepper Lines (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Research in Agriculture*, 1(2): 136-145.
- KOLEVA GUDEVA, L., TRAJKOVA, F. and SPASENOSKI, M. 2007. Effectiveness of androgenesis induced in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). M-Ch. Daunay, E. Jullian, A. Whipkey, J. Janick, Eggplant and capsicum peppers: historical texts and images. In: Niemirowicz-Szczytt K. (Ed.), *Progress in Research on Capsicum & Eggplant*. Warsaw University of Life Sciences Press, Warsaw, pp. 385-392, Poland.
- KRISHNA DE, A. 2003. *Capsicum*, The genus *Capsicum*. Taylor & Francis 11 New Fetter Lane, London EC4P - 4EE, 296 pages.
- KRISTIANSEN, K. and ANDERSEN, S.B. 1993. Effects of donor plant temperature, photoperiod and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 67: 105-109.
- LANTOS, C., JUHÁSZ, A.G., SOMOGYI, G., ÖTVÖS, K., VÁGI, P., MIHÁLY, R., KRISTÓF, Z., SOMOGYI, N., PAUK, J. 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 97: 285-293.
- LANTOS, C., JUHÁSZ, A.G., VÁGI, P., MIHÁLY, R., KRISTÓF, Z., PAUK, J. 2012. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnol Rep*, 6: 123-132.

- LUITEL, B.P. and KANG, W.H. 2013. *In Vitro* Androgenic Response of Minipaprika (*Capsicum annuum* L.) Genotypes in Different Culture Media. *Hort. Environ. Biotechnol.*, 54(2): 162-171.
- MATSUBARA, S., YAMAMOTO, M., JO, M.H. and MURAKAMI, K. 1998. Embryoid and Callus Formation from Microspores by Anther Culture from July to November in Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Okayama University*, 87: 117-122.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- NOWACZYK, P., KISIALA, A. 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *J. Appl Genet* 47(2): 113–117.
- NOWACZYK, P., OLSZEWSKA, D., KISIALA, A. 2009. Individual reaction of *Capsicum* F₂ hybrid genotypes in anther cultures. *Euphytica*, 168: 225-233.
- ÖZKUM ÇİNER, D., TIPIRDAMAZ, R. 2001. A Short Report on the Parameters of a Successful Anther Culture. *G.Ü. Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 2(2): 35-39.
- ÖZKUM ÇİNER, D., TIPIRDAMAZ, 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.
- PARRA-VEGA, V., GONZÁLEZ-GARCÍA, B., SEGUÍ-SÍMARRO, J.M. 2013a. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiol Plant*, 35: 627–633.
- PARRA-VEGA, V., RENAÚ-MORATA, B., SIFRES, A., SEGUÍ-SÍMARRO, J.M. 2013b. Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 112: 353-360.
- PICKERSGILL, B. 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica* 96: 129–133.
- PIERIK, R.L.M., 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 344 pages.
- POCHARD, E. and DUMAS DE VAULX, R. 1971. La Monoploidie chez le piment (*Capsicum annuum*). *Z. Pflanzenzüchtg*, 65: 23-46.
- REYNOLDS, T.L. 1997. Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33: 1-10.

- RODEVA, V.N., IRIKOVA T.P. and TODOROVA V.J. 2004. Anther Culture of Pepper (*Capsicum annuum* L.): Comparative Study on Effect of the Genotype. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*,18(3): 34-38.
- SARIKAMIŞ, G., ELLİALTIOĞLU, Ş. ve YANMAZ, R. 2000. Lahanada çiçek tomurcuğu morfolojisi ile mikrospor gelişme dönemi arasındaki ilişkinin belirlenmesi. III. Sebze Tarımı Simpozyumu, 11-13 Eylül 2000, Isparta.
- SAYILIR, A., ÖZZAMBAK, E. 2005. Biber Anter Kültüründe Uygun Tomurcuk Büyüklüğü ile Besin Ortamı İçeriklerinin Embriyo Verimine Etkileri Üzerine Bir Araştırma. *Ege Üniv. Ziraat. Fak. Derg.*, 42(3): 1-11.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M., CORRAL-MARTÍNEZ, P., PARRA-VEGA, V., GONZÁLEZ-GARCÍA, B. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Rep*, 30: 765–778.
- SUPENA, E.D.J., CUSTERS, J.B.M. 2011. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 130: 769-774.
- SUPENA, E.D.J., SUHARSONO, S., JACOBSEN, E., CUSTERS, J.B.M. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.*, 25: 1–10.
- ŞALK, A., ARIN, L., DEVECİ, M. ve POLAT, S. 2008. Özel Sebzeçilik Ders Kitabı. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Namık Kemal Üniversitesi Basımevi, Tekirdağ, 488 s.
- TAŞKIN, H., BÜYÜKALACA, S., KELEŞ, D. and EKBİÇ, E. 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 10(75): 17116-17121.
- TERZİOĞLU, Ş., ELLİALTIOĞLU, Ş., ABAK, K. 2000. İnkübasyon Koşullarının Biber Anter Kültüründe Embriyo Oluşumu Üzerine Etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu, 11-13 Eylül 2000, ss. 233-237, Isparta.
- VAGERA, J. 1990. Pepper (*Capsicum* spp.): *In vitro* induction of haploids. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 12: 374-392.
- VURAL, H., EŞİYOK, D. ve DUMAN, İ. 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 440 s.
- YIN, T., TIAN, S., LUO, S., CHEN, X., WANG, Y., SHEN, S. 2010. Studies on isolated microspore embriyoid induction of *C. annuum* L. *Front. Agric. China*, 4(4): 438-442.

ÖZGEÇMİŞ

Araştırıcı 05.02.1987 yılında Antalya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamlayarak, 2005 yılında lisans öğrencisi olmayı hak kazandığı Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden 2010 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu. Araştırıcı ayrıca 2007 yılında lisans öğrencisi olmayı hak kazandığı Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. 2011 yılının Şubat ayında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı ve 2011 yılının Eylül ayında girdiği sınavı kazanarak Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Araştırıcı halen aynı anabilim dalında görevine devam etmektedir.