

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİBER (*Capsicum Annuum* L.) ISLAH MATERYALLERİNDEN DİHAPLOİD
HATLARIN ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Fatma Nur KAPLAN**

Anabilim Dalı : Biyoloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ali Ramazan ALAN

MAYIS 2012

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAY FORMU

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 091462011 nolu öğrencisi Fatma Nur KAPLAN tarafından hazırlanan “**BİBER (*Capsicum Annuum L.*) ISLAH MATERYALLERİNDEN DİHAPLOİD HATLARIN ÜRETİMİ**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ali Ramazan ALAN (PAÜ)
(Jüri Başkanı)



Jüri Üyesi : Prof. Dr. Anne FRARY (İYTE)



Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Fevziye ÇELEBİ-TOPRAK (PAÜ)



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
04/07/2012 tarih ve ..17/17..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Nuri KOLSUZ

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

İmza

Öğrenci Adı Soyadı : Fatma Nur KAPLAN

ÖNSÖZ

Bu çalışmada haploid biber üretimi için uygun protokol geliştirilmesi üzerinde durulmuştur. Denenen yöntemlerin ve uygulamaların ilerideki çalışmalarda başarılı sonuç elde etmek için dikkat edilmesi gereken konular için öneriler verilmiştir. Bu çalışmanın gerçekleşmesinde katkıda bulunan bilgi ve tecrübesi ile kendisinden çok şey öğrendiğim, çalışmanın her aşamasında emekleri ve katkıları bulunan danışmanım Doç. Dr. Ali Ramazan ALAN'a, ve yine çalışmanın her aşamasında emekleri ve katkıları bulunan Yard. Doç. Dr. Fevziye ÇELEBİ-TOPRAK'a, öğretim görevlisi Arzu KASKA'ya, çalışmanın yürütülmesinde bana yardımcı olan arkadaşlarım Nalan ALAN ve Kevser Esra ÖZDEMİR'e, PAÜ BİYOM çalışma ekibine, çalışma malzemesinin alınması için maddi destek veren Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu (BAP)'a ve her an sonsuz desteğini ve yardımını esirgemeyen, her an yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2012

Fatma Nur KAPLAN

(Yüksek lisans öğrencisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	xi
SUMMARY	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	3
1.2 Literatür Özeti	4
1.2.1 Haploid bitki ve haploid bitki oluşum yolları	5
1.2.1.1 Haploid bitkilerin önemi	5
1.2.1.2 Haploidlerin doğal oluşum yolları	6
1.2.2 Erkek gametten haploid uyartımı (Androgenesis)	8
1.2.2.1 Anter kültürü	8
1.2.2.2 Anter kültürü nasıl yapılır?	9
1.2.2.3 Anter kültürünü etkileyen faktörler.....	10
1.2.2.3.1 Anter verici (donör) bitkiden kaynaklanan faktörler	10
1.2.2.3.2 Anter kültüründen kaynaklan faktörler	11
1.2.2.3.3 Besin ortamının bileşimi ve yapısı.....	12
1.2.2.3.4 İnkübasyon koşulları	13
1.2.3 Androgenesis ile ilgili yapılmış çalışmalar	13
2. MATERYAL VE METHOD.....	18
2.1 Bitkisel Materyal	18
2.2 Tohum Ekimi Ve Bitki Büyütme	20
2.3 Çiçek Tomurcuğu Elde Etme Ve Androgenesis İndüklemeye Çalışmaları.....	23
2.4 Kullanılan Besin Ortamları	26
2.5 Ön Uygulamalar Ve Kültür Koşulları	29
2.6 Elde Edilen Androgenik Dokuların Flow Sitometri ile Analizi	29
2.7 Deney - 1	32
2.8 Deney - 2	33
2.9 Deney - 3	34
3. BULGULAR.....	36
3.1 Deney - 1' de Elde Edilen Sonuçlar	37
3.2 Deney - 2' de Elde Edilen Sonuçlar	43
3.3 Deney - 3' te Elde Edilen Sonuçlar	46
3.4 Flow Sitometri Analizi	49
4. TARTIŞMA	50
4.1 Farklı Medya Kompozisyonlarının Etkisi	50
4.2 Yapılan Ön Uygulamaların Etkisi	53
4.3 Genotip Etkisi.....	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
6. KAYNAKLAR	58

Kısaltmalar

AgNO₃	:Gümüş nitrat
BAP	:6-Benzylaminopurine
BİYOM	:Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
CP	:Chambonet induksiyon medyası
CaCl₂.2H₂O	:Kalsiyum klorid dihidrat
Ca(NO₃)₂.4H₂O	:Kalsiyum nitrat tetra hidrat
CuSO₄.5H₂O	:Bakır sülfat penta hidrat
CoCl₂.6H₂O	:Kobalt klorid hekza hidrat
DH	:Dihaploid
DAPI	:4-6 diamidinophenylindole
DNA	:Deoksiribonükleik asit
EtOH	:Etanol
FeSO₄.7H₂O	:Demir sülfat hepta hidrat
F₁	:İki farklı ebeveynin çapraz eşleşmesinden oluşan bireyler
FAO	:Tarım ve Gıda Örgütü
HEPES	:2-[4-(2-Hidroksietil)-1-piperazine]ethanesulfonik asit
H₃BO	:Borik asit
IAA	:İndol-3-asetik asit
KOH	:Potasyum hidroksit
KNO₃	:Potasyum nitrat
KCl	:Potasyum klorür
KH₂PO₄	:Potasyum dihidrojen fosfat
KI	:Potasyum İyodür
MS	:Murashige ve Skoog (1962) medyası
MgSO₄.7H₂O	:Magnezyum sülfat hepta hidrat
MnSO₄.H₂O	:Mangan sülfat mono hidrat
N	:Nitch medyası
NLN	:Sıvı N ve N medyası
NAA	:1-Naftalen asetik asit
NaH₂PO₄.H₂O	:Monosodyum di hidrojen fosfat mono hidrat
Na₂MoO₄.2H₂O	:Di sodyum molibdat tetra oksit di hidrat
NaOH	:Sodyum hidroksit
NaCl	:Sodyum klorür
Na₂EDTA	:Di sodyum etilendiamin tetraasetat
(NH₄)₂SO₄	:Di amonyum sülfat
NH₄NO₃	:Amonyum nitrat
NIB	:Çekirdek izolasyon tamponu
Pg	:Pikogram

Psi	:Pounds per square inch
PI	:Propidyum iyodür
PVP-40	:Polivinilpirolidon
PAU	:Pamukale Üniversitesi
pH	:Hidrojenin gücü
ZnSO₄.7H₂O	:Çinko sülfat hepta hidrat

TABLO LİSTESİ

Tablolar

1.1 : Biber üretiminde ilk 20 ülke (FAOSTAT-2010).	5
2.1 : Çalışmada kullanılan biber hatlarının genel özellikleri.....	18
2.2 : Birinci ve üçüncü deney aşamasında anter kültüründe kullanılan medyalarının kompozisyonu.	27
2.3 : İkinci deney aşamasında anter kültüründe kullanılan indükleme (CP) ve rejenerasyon (R1) medyalarının kompozisyonu.	28
2.4 : Çekirdek izolasyon tamponu (NIB) kompozisyonu (100ml için)......	30
2.5 : Birinci denemede kullanılan biber genotipleri.....	32
2.6 : Denemede kullanılan biber genotipleri.	33
2.7 : Deney - 3' te İM-3 medyasında kullanılan biber genotipleri.....	34
2.8 : Deney - 3' te İM-1 medyasında kullanılan biber genotipleri.....	35
3.1 : Deney - 1' de İM-1 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.....	38
3.2 : Deney - 1' de İM-1 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılmayan anterlerden elde edilen sonuçlar.....	39
3.3 : Deney - 1' de İM-2 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.....	39
3.4 : Deney - 1' de İM-2 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılmayan anterlerden elde edilen sonuçlar.....	40
3.5 : Deney - 1' de İM-3 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.....	40
3.6 : Deney - 1' de İM-3 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılmayan anterlerden elde edilen sonuçlar.....	41
3.7 : Deney - 2' de CP medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.	43
3.8 : Deney - 2' de CP medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılmayan anterlerden elde edilen sonuçlar.....	44
3.9 : Deney - 3' te İM-1 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.	46
3.10 : Deney - 3' te İM-3 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.....	47
3.11 : Androgenik kallus örneklerinde yapılan flow sitometri analizi bulguları.	49

ŞEKİL LİSTESİ

Şekiller

2.1 : Biber Tohumları.	21
2.2 : Serada biber tohumlarının stayrofoam viyollerine ekilmesi.	21
2.3 : Çimlenmiş biber fideleri.	21
2.4 : İki Litrelik saksılara aktarılmış biber hatları.	22
2.5 : 4,6 Litrelik saksıda büyüyen biber bitkisi.	22
2.6 : Kullanılan çiçek tomurcukları ve anterler.	23
2.7 : Biber tomurcuklarında sterilizasyon aşamaları ve anterlerin çıkarılması. ..	25
2.8 : Büyütme kabiniinde optimum şartlarda tutulan petri tabaklarındaki biber anterleri.	29
2.9 : Flow sitometri aşamaları.	31
3.1 : Elde edilen kalluslar.	36
3.2 : Deney -1’de edilen kalluslar.	42
3.3 : Deney -2’de elde edilen androgenik kallusların görüntüleri.	45
3.4 : Deney -3’de kullanılan PAU-127 genotipinden İM-3 medyasında elde edilen kallusların görüntüleri.	48

SEMBOL LİSTESİ

μL	Mikrolitre
g	Gram
M	Molar
mM	MiliMolar
N	Normal
mg	Miligram
ml	Mililitre
L	Litre
mg/ml	Miligram / mililitre
mg/L	Miligram / litre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

ÖZET

BİBER (*Capsicum annuum* L.) ISLAH MATERYALLERİNDEN DİHAPLOİD HATLARIN ÜRETİMİ

Biber (*Capsicum annuum* L.) *Solanaceae* familyasına ait olan önemli bir sebze türüdür. Biber meyveleri taze, kuru, salça, baharat, ve sos şeklinde tüketilir. Bu önemli sebze türünde yeni çeşitlerin üretilmesi için yapılan ıslah çalışmalarında kullanılan klasik kendileme uygulaması ile saf hatların üretilmesi için en az 5 generasyon gereklidir. Dihaploidi (DH) uygulamalarının mümkün olduğu durumda tek generasyonda tüm özellikleri açısından saf hale getirilmiş olan bitkiler mümkün olabilmektedir. Biberlerde anter kültürü ve mikrospor kültürü yoluyla haploid embriyoların üretilebileceği bilinmektedir. Androgenesis tekniği uygulanarak haploid embriyo uyartımı teknolojisinin bu önemli sebze türünde kullanılabilmesi ile ilgili yayınlanmış olan rapor sayısı çok sınırlı sayıdadır. Yayınlanmış araştırmalara göre ön uygulamalar, uyartım ve rejenerasyon ortamları ve çiçek tomurcuğu donörü bitkinin genotipi gibi faktörler androgenesis uyartımında önemlidir. Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (PAÜ BİYOM) tarafından ıslah çalışmalarında kullanılan açık tozlanan seleksiyon hatları ve standart ticari çeşitlerin androgenesis potansiyeli araştırılmıştır. Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan seleksiyon ıslahı yoluyla elde edilmiş 73 genotip ve 11 standart ticari genotipler kullanılmıştır. Bitkiler tohum ekiminden tomurcuk ve meyve oluşturmaya kadar bütün dönemlerinde uygun sera büyütme koşullarında tutulmuştur. Çalışmada haploid embriyo uyartımı amacıyla anter kültürü tekniği kullanılmıştır. Anter kültürü çalışmalarında üç farklı medya uygulaması yapılmıştır. Bu bitkilerden taç ve çanak yaprakları yaklaşık aynı boyda olan çiçek tomurcuklarından alınan anterler uyartım medyalarında kültüre alınmışlardır. Bu aşamadaki çiçek tomurcuklarında anterler içinde bulunan mikrosporların erken çift çekirdekli dönemde olduğu tahmin edilmektedir. Steril hale getirilmiş çiçek tomurcuklarından alınan anterler farklı konsantrasyonlarda NAA, 2,4-D, BAP ve kinetin hormonları içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962: İM-1, İM-2 ve İM-3) ve CP (Chambonnet, 1982) ortamlarına ekilmişlerdir. Genelde uyartım kültürleri bir inkübatörde 8 gün karanlıkta ve 35° C'de ön uygulamaya tabi tutulurken bazıları normal büyütme koşullarına konulmuşlardır. İM-1, İM-2 ve İM-3 kültürlerinde kallus oluşturan kültürler başlangıçtan 1 ay sonra normal MS medyasına transfer edilmişlerdir. CP medyalarına konan anterler 8 günlük ön uygulama ve 4 günlük normal kültür şartlarında tutulduktan sonra R1 medyasına transfer edilmişlerdir. Kültürler her hafta periyodik olarak gözlenmiş ve değişiklikler kayıt edilmiştir. Bu çalışmada 84 biber genotipinden toplam 7343 adet anter kültüre alınmıştır. Bu kültürlerden 72 adet (% 0.98) androgenik kallus üretilmiştir. Bu kalluslardan embriyoya dönüşmeden büyümeye devam etmişlerdir. Toplam 11 kallustan izole edilen çekirdek DNA örnekleri ile yapılan flow sitometri analizleri kalluslarda kromozom sayısı anormallikleri olduğunu göstermiştir. Biber anterlerinden elde edilen kallus örneklerinin sadece bir tanesi haploid çekirdek

DNA'sı taşırken, 2 anöploid, 2 mikroploid, 1 poliploid ve 4 diploid çekirdek DNA'sı taşıyan kallusların olduğu bulunmuştur. Çalışma sonucunda biber anter kültürlerinden embriyo veya sürgün gelişimi gözlenmemiştir. Sonuç olarak Türk biberlerinde androgenesis uyartım protokollerinin geliştirilmesi için çalışmalara devam edilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Androgenesis, Anter Kültürü, Bitki Büyüme Düzenleyicileri, *Capsicum annuum* L., CP, Haploid Bitki, MS, *Solanaceae*

SUMMARY

PRODUCTION OF DOUBLED HAPLOID LINES

FROM PEPPER (*Capsicum Annuum* L.) BREEDING MATERIALS

Pepper (*Capsicum annum* L.) is an important vegetable crop from *Solanaceae* family. Pepper fruits are consumed in various ways such as fresh, dried, paste, spice, sauce. In this important crop species, at least 5 generations of selfing are required in order to produce inbreds through classical breeding efforts. When applicable, doubled haploid (DH) applications can provide completely pure plant lines for all characteristics. It is known that pepper haploid embryos can be produced via anther and microspore cultures. However, there are a limited number of publications about the application of androgenesis based haploid embryo induction technology in this important vegetable species. According to published studies androgenic response in pepper anther cultures is influenced by factors such as pretreatments, induction and regeneration media and the genotype of flower bud donor plants. In this study, the androgenesis potential of open pollinated selection lines and standard commercial pepper lines, which are used in a breeding program carried out in Pamukkale University Plant Genetics and Agricultural Biotechnology Application and Research Center (PAU BIYOM) was determined. Seventy-three genotypes selected from pepper materials collected from different regions of Turkey and 11 standard commercial genotypes were used in the experiments. Donor pepper plants were grown in a greenhouse under standard growing conditions. In this study, anther culture technique has been used for haploid embryo induction. Three different induction media were used to test whether they can induce androgenesis in pepper anther cultures. Anthers were collected from the flower buds when sepals and petals were about the same length. This type of bud is considered to contain microspores at the early binucleate stage in pepper. Anthers extracted from surface sterilized flower buds were cultured on MS (Murashige and skoog, 1962: IM1, IM2 and IM3) containing various concentrations of NAA, 2,4-D, BAP, kinetin and CP (Chambonet, 1982) media. In general, induction cultures were pretreated for 8 days in dark in an incubator set for 35° C before transfer to a culture room, which was set for 25° C/16 hrs light and 18° C/8 hrs dark. Some induction cultures were directly placed in the culture room. Calli producing cultures established in IM1, IM2, IM3 were transferred to MS with no hormones one month after culture initiation. Anther cultures established in CP plates were kept in the pretreatment incubator for the first 8 days and then transferred to culture room where they were kept for 4 more days before transfer to plates containing R1 medium (Chambonet, 1982). Anther cultures were observed weekly and findings were noted. In this study, a total of 7535 anthers from 84 genotypes were placed in induction media. These cultures produced 72 androgenic calli (% 0.95). Androgenic calli continued to grow without forming

embryos. Flow cytometry analysis of nuclear DNA samples isolated from 11 calli showed the existence of chromosomal abnormalities in these calli. Among the samples tested only one of the pepper androgenic calli contained haploid nuclei and four of them contained diploid nuclei. Flow cytometry analysis detected two aneuploid, two mixoploid and one polyploid androgenic pepper callus. In this study, no embryo or shoot development were observed from pepper anther cultures. In conclusion, studies for the development of androgenesis induction protocols suited for Turkish pepper genotypes should be continued.

Key Words: Androgenesis, Anther Culture, Plant Growth Regulators, *Capsicum annuum* L., CP, Haploid Plant, MS, *Solanaceae*

1.GİRİŞ

Capsicum (biber) *Solanaceae* ailesinde yer alır. *Capsicum* türlerinin doğal yayılım alanları Orta ve Güney Amerika'dır. Orta Amerika'da özellikle *Capsicum* cinsinin beş kültür türü ve bu türlere ait yüzlerce çeşit bulunmaktadır. Bütün doğal biber populasyonları diploid olup aynı kromozom sayısına ($2n = 2x = 24$) sahiptirler. Kültüre alınmış türler arasında *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L. ve *C. pubescens* Ruiz & Pav.yer almaktadır (Pickersgill, 1997).

C. annuum dünyanın her tarafında yaygın olarak yetiştirilen ve tüketilen bir türdür. Tatlı dolmalık biber tipi çeşitleri kadar çok sayıda acı ve tatlı sivri biber tipleri de bulunmaktadır. Bu tür beyaz renkli çiçeklere sahip, küçük, dallı, otsu ve tek yıllık bir bitkidir. Meyveleri şekil, büyüklük ve renk bakımından oldukça farklılıklar arz etmektedir. Meyve şekilleri uzun, dar ve yuvarlak şekle kadar farklılık gösterir (IBPGR, 1983). *C. frutescens* tropik ve ılıman iklime sahip alanlarda esas olarak kültüre alınır ve genellikle çok acı tada sahiptir. *C. chinense* bilimsel isminin tersine, Güney Amerika orijinlidir. Bilinen en acı biberler arasında gösterilen habanero tip biber çeşitleri bu tür içerisinde yer almaktadır. *C. baccatum* çoğunlukla Orta ve Güney Amerika yüksek kesimlerinde yetiştirilen bir türdür ve *aji* olarak isimlendirilmektedir. *C. pubescens* kültüre alınmış biberler arasında en az bilinen türdür (Greenleaf, 1986).

C. annuum Türkiye'de ve Dünya'da oldukça fazla üretilen önemli bir biber türüdür. Ülkemizde biber üretiminin önemli bir kısmı (% 33) Akdeniz Bölgesinin kıyı kesimlerinde yapılmaktadır. Bu bölgemizi takiben Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgelerinde biber üretimi yapılmaktadır.

Biber ıslahçıları tarafından en yaygın olarak kullanılan metod saf hat ve pedigri seleksiyonudur. Dihaploid hatların (DH) üretilmesi saf hatların oluşturulması için gerekli sürenin kısaltılması ve tüm alleller için homozigot olan hatların geliştirilmesi amacıyla yapılır. Biberde haploid bitkiler poliembriyoni ve *in vitro* androgenesis yoluyla oluşurlar. Biberde *in vitro* haploid embriyo uyartımı erkek gametlerde embriyogenesis yöntemiyle mümkün olmaktadır. Anter kültürü, içinde

olgunlaşmamış polenleri bulunduran anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına aktarılması ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesidir. Anter kültürüyle, normal şartlarda iki çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmekte ve androgenesis meydana gelmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Embriyonun yalnızca erkek gametten meydana gelmesine androgenesis denir. *In vitro* da androgenesis ile haploid bitki elde edilmesinde anter ve mikrospor kültürü yaygın olarak kullanılan tekniklerden birisidir. Temel olarak normal erkek gameti oluşturacak olan polen hücresinin gelişimini belirli bir aşamada durdurarak somatik hücrelerde olduğu gibi polen hücresinin direkt olarak embriyo oluşturmaya zorlanmasıdır. Bu tekniğin diğer *in vitro* haploid bitki elde etme tekniklerine göre avantajı; bir anter içerisinde binlerce mikrospor bulunur ve bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilebilir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Biberlerde anter kültürü ile ilk haploid bitki üretimi Wang ve arkadaşları,(1973) tarafından elde edilmiştir. Haploid bitki üretim çalışmaları George ve Narayanswamy (1973), Saccardo ve Devreux (1974), Novak (1974), Harn ve ark. (1975) gibi bazı araştırmacılar tarafından devam ettirilmiştir. *In vitro* androgenesis için mikrosporum tek çekirdekli evresinin en uygun olduğu Sibi ve ark. (1979) tarafından gösterilmiştir. Dumas de Vaultx ve Chambonnet (1980) ve Dumas de Vaultx ve ark. (1981) tarafından androgenesis uyarımı için sıcak uygulaması denemişler ve daha fazla başarı elde etmişlerdir. Sonraki araştırmacılar bu tekniği geliştirirerek uygulamışlardır (Bajaj, 1990; Mityko ve ark., 1995; Kim ve ark., 2008; Nowaczyk ve ark., 2009). Ülkemizde de yerli biber genotipleri üzerinde ilk *in vitro* androgenesis çalışmaları Abak (1983) tarafından başlatılmıştır. Erkek gamet hücrelerinden haploid embriyo eldesi için farklı ön uygulamalar, kültür medyaları, büyüme düzenleyiciler, aktif kömür ve gümüş nitrat kullanımı önerilmiştir (Kristiansen ve Andersen, 1993; Ercan ve ark., 2001; Çiner ve Tıpırdamaz, 2002). Çömlekçioğlu ve ark. (1999), bazı yerli biber populasyonlarında yaptığı anter kültürü çalışmalarında, bitki gelişimini düzenleyicilerden NAA ve BAP'ın besin ortamlarında birlikte kullanılmasının ve kültürün ilk haftasında 35° C sıcaklık uygulamasının olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Türkiye’de çok sayıda biber genotipi olduğu bilinmektedir. Bununla beraber ekonomik öneme sahip biber genotipi sayısı çok düşük sayılarda kalmaktadır. Türkiye’nin farklı bölgelerinde değişik ekolojik koşullarda ve tüketim tercihlerine göre üretilen ama yüksek oranda genotipik ve fenotipik varyasyon gösteren yüzlerce çeşitten bazılarının genetik saflaştırma ve pedigrisi seleksiyon ıslahı ile çeşit olarak geliştirilebilmesi mümkündür. Dihaploidi (DH) yöntemiyle elde edilen saf hatlar çeşit olarak kullanılacakları gibi, pedigrisi seleksiyon ıslahında ve hibrit F₁ lerin üretiminde ebeveyn olarak kullanılabilirler için çok değerli ıslah materyalleridir. Bu nedenle ülkemizde başlatılacak olan biber ıslah programlarında ıslahçıların kullanabileceği dihaploid hatların elde edilmesinde kullanılacak olan haploid indüklemesi ve dihaploidizasyon yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

1.1 Tezin Amacı

Bu çalışmada, Türkiye’nin farklı bölgelerinden toplanıp seleksiyon ıslahı yöntemiyle elde edilmiş olan ve yaygın olarak üreticiliği yapılan standart biber çeşitlerinden dihaploid bitkilerin üretilmesi ve bu bitkilere uygun protokollerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. DH teknolojisi tüm özellikleri kontrol eden genlerin homozigot hale getirilmesine olanak sağlar. Bu nedenle DH bitkilerden kendileme yolu ile elde edilen bitkiler açılım göstermezler. Tüm allelleri saf hale getirilen bitkiler hem ıslah amacıyla hem de moleküler biyoloji ve genetik çalışmalarda kullanılabilirler. İstenen özellikler açısından homozigot olan bitkiler direkt çeşit olarak veya hibrit tohum eldesinde ebeveyn olarak kullanılabilirler. Bu tür çeşitler genetik uniformluk gösterdikleri için arazi ve sera yetiştiriciliğinde çok tercih edilirler. Bu hatlar melez gücü özelliği nedeniyle tercih edilen F₁ hibrit çeşitlerin üretiminde de ebeveyn olarak kullanılabilirler. Bu açılarından DH tekniği ile ülkemizin ihtiyacı olan biber çeşitlerinin ıslahında çok başarılı sonuçların elde edilmesi ve var olan genetik çeşitliliğimizin korunması ve geliştirilmesi mümkün olabilir. Bu da biberlerin ıslah çalışmalarında büyük avantaj sağlar. Türkiye birçok sebze ve meyve üretim materyali ihtiyacının çoğunu ithalat yoluyla karşılamaktadır. Bu çalışmanın temel amacı üstün tarımsal özelliklere sahip Türk biber hatlarının DH teknolojisi ile kısa bir zaman dilimi içerisinde geliştirilebilmesine olanak sağlamaktır.

1.2 Literatür Özeti

Biberin anavatanı Orta ve Güney Amerikadır (IBPGR, 1983). Yapılan araştırmalarda, biberin 1493 yılında Christopher Columbus tarafından Amerika'dan İspanya'ya daha sonra 1548 yıllarında İngiltere'ye ve 1578 yılında Avrupa ülkelerine girmiştir. 16. yüzyılda Osmanlı İmparatorluğu ile Avrupa ülkeleri arasındaki sıkı ilişkilerin sonucuyla biber bitkisi İstanbul'a getirilmiştir (Vural ve ark., 2000). Türkler tarafında biber bitkisi Orta Avrupa ve Kuzey Afrika ülkelerine tanıtılmıştır (Andrews, 1999).

Biber bitkisi *Solanaceae* familyasından olup en yaygın kullanılan türü *Capsicum annum* L. ($2n= 2x= 24$)' dir. Erselik çiçek yapısında olan biber çiçeğinde, dişi ve erkek organ aynı çiçek üzerinde bulunur. 5 çanak yaprak, 5 taç yaprak, 5 adet erkek organ ve 3-5 karpelli bir adet dişi organa sahiptir. Yaprak veya dal koltuklarında birden fazla çiçek bulunabilir. Çiçekler farklı türlerde mor veya beyaz renkte görülebilir (Günay, 1981). Dişi organlar erkek organlardan önce gelişerek döllenme olgunluğuna erişirler ve % 3-30 oranında yabancı döllenmeye rastlanır (Günay, 1981). Biber ülkemizde ve dünyada sos, baharat, taze sebze olarak, çeşitli gıda endüstrilerinde ve evlerde oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

C. annum Türkiye'de ve Dünya'da oldukça fazla üretilen önemli bir biber türüdür. Biber üretimi bakımından Türkiye yıllık 1.986.700 ton üretim miktarı ile Çin ve Meksika'dan sonra üçüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2010) (Tablo 1.1). Türkiye'de biber üretimi yıllara göre sürekli bir artış (%4-10 artış/yıl) göstermektedir. Bunun bir sonucu olarak, 1980 yılında 220.000 ton olan toplam biber üretimi son yıllarda 2.000.000 ton seviyelerine ulaşmıştır (FAO, 2010) .

Tablo 1.1 : Biber üretiminde ilk 20 ülke (FAOSTAT-2010).

Sıra	Ülke	Üretim Değeri (1000\$)	Üretim Miktarı (Ton)
1	Çin	6.208.969	13.189.303
2	Meksika	1.099.483	2.335.560
3	Türkiye	935.254	1.986.700
4	Endonezya	627.219	1.332.360
5	Amerika Birleşik Devletleri	432.212	918.120
6	İspanya	410.500	872.000
7	Mısır	308.742	655.841
8	Nijerya	235.379	500.000
9	Hollanda	171.826	365.000
10	Cezayir	149.465	317.500
11	Kore Cumhuriyeti	146.152	310.462
12	İsrail	138.544	294.300
13	Gana	138.449	294.100
14	İtalya	138.236	293.647
15	Tunus	131.812	280.000
16	Romanya	114.626	243.493
17	Etiyopya	111.899	237.700
18	Fas	105.754	224.648
19	Makedonya	79.157	168.150
20	Ukrayna	77.016	163.600

1.2.1 Haploid bitki ve haploid bitki oluşum yolları

Somatik hücrelerinde ki kromozom sayısı; ait olduğu türün gamet hücrelerindeki kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitki denir. Doku kültürü teknikleri arasında olan haploid bitki üretimi bitki ıslahında önemli bir yere sahiptir (Heiser, 1976; Andrews, 1985).

1.2.1.1 Haploid bitkilerin önemi

- Haploid bitkiler her bir lokustaki allelerden sadece bir seriyi içermekte ve bu özellikleri bitki ıslahında önemli yer tutmaktadır.
- Haploid bitkilerin homolog kromozomlardan sadece bir takımını içermesi resesif mutasyonların açığa çıkartılmasını sağlar.
- Haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması ile %100 homozigot saf hatlar elde edilebilir.
- En önemli avantajı homozigotiyi çok kısa bir sürede elde etmeyi sağlamasıdır. Dihaploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmaları kolaylaşmakta ve sonuca daha çabuk ulaşılabilmektedir.

- Dioik türlerde veya kendileme depresyonu nedeniyle homozigotiye ulaşmanın zor olduğu lahana ve çilek gibi türlerde, dihaploidi yöntemi kullanılarak bu sorun bir generasyonda çözülebilir.
- F₁ hibrit çeşitlerinin geliştirilmesinde homozigot hatlar arasında üstün kombinasyon yeteneği verenlerin belirlenmesi yöntemi kullanıldığından, haploidinin hibrit çeşit ıslahında özel bir önemi bulunmaktadır. Dihaploid bitkilerden elde edilen saf hatlar F₁ hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılmaktadır.
- Kombinasyon ıslahında sonuca çok kısa sürede ulaşmayı sağlayan haploidi sayesinde, F₁ kademesindeki melez bitkilerden haploid çekerek farklı genotiplerde bulunan ve tek bir genotipte toplanmasını arzu ettiğimiz özelliklere sahip bitkiler kazanmamız mümkündür.
- Haploid bitkiler, somatik hibridizasyon işleminin diploid protoplastlara göre daha kolay yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca iki haploid protoplastın birleşimi sonucunda 'diploid' olacağından; protoplast kültürü kullanılarak yapılan somatik hibridizasyon tekniğinin dezavantajları ortadan kalkmış olacaktır.

1.2.1.2 Haploidlerin doğal oluşum yolları

Haploid bitkiler bazı bitki türlerinde çeşitli doğal yollarla kendiliğinden oluşabilmektedir. Doğada haploidlerin oluşum yolları beş farklı şekilde gözlenir:

1-) **Ginogenesis:** Bu durumda yumurta hücresi döllenme olmaksızın zigot gibi bölünmeye başlayarak haploid yapıda embriyo oluşturur. Dişi eşey hücresi ile erkek eşey hücresi birleşmediği halde; embriyo kesesi sekonder çekirdekleri ile polen generatif çekirdeği birleşerek embriyonun gereksinim duyduğu endospermi oluştururlar (Sauton, 1987).

2-) **Androgenesis:** Yumurta hücresinin döllenmesinden önce dişi eşey hücresinin çekirdeği kaybolur veya inaktif hale geçer. Bu yolla oluşan haploidler, hücrelerinde yalnızca erkek gametin kromozom takımlarını içerirler (Goodsell, 1961).

3-) **Semigami:** Erkek ve dişi eşey hücreleri birleşerek embriyo oluşumuna katılırlar fakat çekirdeksel erime gerçekleşmez. Ana ve babaya ait sektörlerin bulunduğu kimeralı haploid bitkiler semigami ile oluşmaktadır (Turcotte ve Feaster, 1969).

4-) Poliembriyoni: Normal döllenme sonucu zigot bölünmeye başlar. Ancak döllenmiş yumurta hücresinin yanındaki sinerjit hücrelerinden biri de bölünerek gelişir ve haploid olan iki embriyo bulunur (Lacadena, 1974). Biberde ve şeftalide poliembriyoni yolu ile haploid bitkiler oluşabilmektedir.

5-) Kromozom eliminasyonu: Yumurta hücresi ile polen generatif çekirdeği birleşirler ve döllenme olur. Ancak embriyo gelişmesinin ilk devrelerinde ebeveynlerden birine, genellikle babaya ait kromozomlar elimine olur ve gelişen embriyo haploid (n) sayıda kromozom içerir (Subrahmanyam ve Kasha, 1973).

Haploid bitkilerin çeşitli yollarla doğada kendiliğinden ortaya çıkma sıklığı türlere hatta türler içi genotipe bağlı olarak değişmekte, çoğunlukla %0.1 - 0.001 gibi çok düşük seviyelerde kalmakta; bir çok türde ise doğal haploid oluşumuna hiç rastlanmamaktadır (Pocard ve Dumas de Valux, 1971). Bu yetersiz ve düzensiz çıkışlardan dolayı doğal haploid oluşumunu esas alarak bitki ıslahını gerçekleştirmek mümkün görünmemektedir.

Islah programında kullanılabilir sayı ve düzenli olarak haploidlerin elde edilmesi, bitki ıslahında kullanılabilmesi için çeşitli araştırmacılar tarafından çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar;

- Türler arası melezlemeler
- Tozlaşmanın geciktirilmesi
- Sıcaklık şokları
- Işınlanmış polenlerle tozlama
- X ve UV ışınları uygulaması
- Çiçek tozlarına veya bitkilere toluidin mavisi, maleyik hidrazid, azotoksit, kolhisin, kloramfenikol ve paraflor fenilalanin gibi bazı kimyasallar ve bazı büyüme düzenleyicilerin (2-kloro etik fosfoik asit, 2,4-D) uygulamaları (Yeung ve Thrope, 1981; Bajaj, 1983; Pierik, 1989).

Haploid bitkiler; morfolojik olarak diploidler göre daha küçük yapıdadırlar. Normal bitkilerde bulunan tüm organlara sahip olmasına karşın hücreleri daha küçük olduğu için haploid bitkilerin boyları daha kısa, yaprakları dar ve küçüktür. Çiçekleri de diploidlere oranla küçüktür. Hücreleride taşıdıkları kromozom sayısı bakımından indirgenmiş gamet yapısı gösteren bitkilerdir. Bu bitkiler gamet oluşturamadıkları için kısırdırlar ve tohum oluşturamazlar (Reinert ve Bajaj, 1977).

In vitro şartlarda elde edilen haploid bitkilerin ıslah programlarında kullanılabilmesi için yeniden verimli diploid bitkilere dönüştürülmesi gerekmektedir. Haploid bir bitki kromozomlarının bazı kimyasal maddeler yardımı veya spontane olarak kromozom katlanması sonucu dihaploid bitkiler oluşturulur. Kromozom sayısının diploid seviyeye (2n) çıkartılması ile homozigot bitkilerin elde edilmesine dihaplodizasyon adı verilir. Dihaplodizasyon yolu ile bir bitki materyalinin kısa bir süre içerisinde durağan hale getirilerek ıslah programlarında kullanılması günümüzde arpa, buğday, mısır, çeltik, kolza, biber, patlıcan, hıyar, kavun, gerbera gibi bir çok bitki türünde başarıya ulaşmıştır (Kaloo, 1986).

1.2.2 Erkek gametten haploid uyartımı (Androgenesis)

1.2.2.1 Anter kültürü

Anter kültürü esas olarak; içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulunduran anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesine ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid bitki elde edilmesidir. Anter kültürü yapılarak normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polen tanesinin gelişme yönü; henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmekte ve böylece ‘mikrospor androgenesis’ veya sadece ‘androgenesis’ olarak adlandırılan oluşum gerçekleşmektedir (Büyükalaca ve ark., 2004).

Anter kültürü, özellikle *Solanaceae* familyası üyelerinin çoğunda başarılı sonuçlar vermektedir. Ayrıca *Cruciferae*, *Gramineae* ve *Ranunculaceae* familyalarına ait değişik türlerden haploid bitkiler elde edilmiştir (Bajaj , 1983; Rashid, 1983). Bunlardan başka çeltik ve mısır türlerinde de başarılı sonuçlar rapor edilmiştir (Tsay ve ark., 1986). Tek yıllık veya otsu bitkilerde anter kültürü beklentilere az veya çok yanıt vermesine rağmen odunsu bitkilerle çalışılan anter kültürü çalışmalarında başarı oranı çok düşüktür.

1.2.2.2 Anter kültürü nasıl yapılır?

Başlangıç materyali olarak henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler uygundur. Belirlenen anterleri bulunduran çiçek tomurcukları birkaç damla Tween-20 damlatılmış %20'lik sodyum hipoklorit veya kalsiyum hipoklorit içerisinde 15 dakika boyunca yüzeysel sterilizasyona tabi tutulur ve daha sonra steril saf su ile yıkanır.

Steril forsep ve bistüri yardımı ile anterler tomucuk içerinden çıkarılır. Anterlerin tomucuk içerisinden çıkarılırken ezilmemesine ve anter sapının antere birleştiği noktadan kesilerek uzaklaştırılmasına dikkat edilmelidir. Steril koşullarda tomurcuklardan çıkarılan anterler önceden hazırlanmış ve sterilize edilmiş medyalara ekimi yapılır.

Agarla katılaştırılmış besin ortamlarına yerleştirilen anterlerin dikim işlemi tamamlandıktan sonra petri kutularının kenarları parafilm ile kapatılarak atmosferden kaynaklanacak herhangi bir kontaminasyon için önlem alınır.

Petri kutularındaki anterler inkübasyon için değişik koşullara alınabilmektedir. Tütün gibi anter kültürüne çok iyi yanıt veren bitkiler 24-28° C sıcaklıkta ve 16/8 saat fotoperiyodik bir düzende aydınlatılan bir büyütme kabini içinde yapılan inkübasyon yeterli olurken; patlıcan, biber, lahana grubu sebzelerde kültürün ilk günlerinde sıcaklık şoklarına gereksinim duyulabilmektedir.

Anterler normal koşullarda ilk iki hafta içerisinde embriyogenesis yönünde gelişmeye başlamaktadır. Bu aşamadan sonra gelişme iki farklı doğrultuda seyreder;

1-) Direkt androgenesis: Bu aşamada anter içerisindeki mikrospordan doğrudan embriyo gelişimi olur ve 6-8 hafta içerisinde toprağa transfer edilebilecek gelişme düzeyine ulaşır.

2-) İndirekt androgenesis: Anter içindeki mikrospordan ilk önce haploid kallus dokusu oluşmakta ve kallustan bitki rejenerasyonuna gidilmektedir.

1.2.2.3 Anter kültürünü etkileyen faktörler

1.2.2.3.1 Anter verici (donör) bitkiden kaynaklanan faktörler

A-) Genotip: Anter kültüründe başarı çok büyük bir oranda anterlerin alındığı bitkinin genotipine bağlıdır. Şimdiye kadar çalışılmış olan tüm bitki gruplarında aynı kültür koşulları altında anter yapıları bakımından genotipler arasında büyük farklılıklar gözlenmiştir. On iki tütün türünden 5 tanesinin, 18 farklı *Arabidopsis* hattından 3 tanesinin 118 farklı *Solanum* genotipi içerisinde sadece 19'unun polen embriyogenesi oluşturduğu belirtilmektedir. (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Haploid bitki vermesi istenen genotipten yüksek düzeyde androgenik yanıt almak için başvurulacak 2 yol bulunmaktadır:

1-) Dunwell (1981)'inde önerdiği gibi, her genotip için kültür koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir.

2-) Anter kültüründe embriyo oluşturma başarısı yüksek genotiplerle embriyo oluşturma kapasitesi düşük genotipleri melezleyerek, melez döllerden embriyo elde etmeyi sağlamaktır.

İkinci yolu seçerek çalışmalar yapan Tuberosa ve ark. (1987) değişik ülkelerden topladığı 8 farklı patlıcan çeşidi ve bunların arasında yapılan melezlemelerden 16 melez genotipte anter kültürü yapılmış ve embriyo oluşum oranları belirlenmiştir. Ebeveynlerde %17.3 embriyo oluşum oranı gözlenirken melezlerde %42 embriyo oluşumu gözlenmiştir.

B-) Donör bitkinin yetiştirme koşulları

Bitkilerin yetiştirildiği dönemdeki ve yetiştirildiği ortamda ki sıcaklık, ışık yoğunluğu ve günlük ışınlanma süresi, CO₂ konsantrasyonu, bitkinin beslenme koşulları ve tüm çevresel faktörler o bitkiden alınacak anterlerden elde edilecek başarıyı etkilemektedir. Aynı bitki türü ve hatta aynı çeşitlerde yapılan çalışmalardan farklı sonuçlar alınması da genotipi aynı olsa da donör bitkilerin yetiştirme koşulları anter kültüründe elde edilecek başarıyı etkilemiştir

1.2.2.3.2 Anter kültüründen kaynaklan faktörler

A-)Anterlerin gelişme dönemi

Anterlerin donör bitkiden izole edildiği anda mikrosporların gelişme dönemi önemlidir. Anter kültürlerinde en iyi sonuçlar tek çekirdekli mikrospor döneminin erken veya geç aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerden alınmaktadır. Mikrosporlar içerisinde nişasta depolanmaya başladıktan sonra alınan anterlerden haploid embriyo elde etmek için yapılan uyarılar etkili olmamaktadır.

Anterlerdeki polenlerin hangi gelişme döneminde olduğunu belirlemek için sitolojik gözlemler yapmak gerekmektedir. Mikrospor gelişme aşaması asetokarmin ile hızlı boyama yapılarak saptanabilir. Patates ve kolza da olduğu gibi kalın bir polen dış tabakası mevcut ise bir gece tespit çözeltisinde bekletilir ve ardından asetokarmin ile boyanır. Ayrıca floresan mikroskobu ve preparat hazırlanmasında buna uygun merkürük asit, DAPI gibi boyalar kullanılarak çok çabuk ve çok net bir şekilde mikrospor çekirdeklerinin görülebilmesi sağlanır. Diğer bir yöntem olarakta parafine gömerek kesit alma ve bunun ardından preparatların hematoksilin veya metilen mavisine boyanarakta net ve güvenilir şekilde mikrospor çekirdekleri gözlenebilir. Fakat bu yöntemin uzun süre alması en büyük dezavantajdır (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

B-) Anterlere yapılan ön uygulamalar

Çiçek tomurcuklarına yapılan bazı ön uygulamalar, mikrosporların kültür sırasındaki gelişmesinin üzerinde olumlu etki yapmaktadır. Anter kültüründe yapılan en etkili ön uygulama tomurcuklara yapılan soğuk şoklarıdır. 4-10° C 'ler arasında 72 saat-4 hafta tutulan tomurcuklar polen rejenerasyonu bakımından olumlu yanıtlar vermiştir. (Arpa: Sunderland ve ark. 1981; patates: Wenzel ve Uhring, 1981; mısır: Genovesi ve Collins, 1982; biber: Morrison ve ark, 1986)

Sunderland ve Roberts (1979), soğuk şoku uygulamasında sıcaklık derecesi ve süresinin önemli olduğunu vurgulamıştır; çok soğuk olmayan +7 ile +15° C gibi sıcaklıklarda uzun süre (7-14 gün) yapılan şoklamanın, daha düşük derecelerde kısa sürede yapılan uygulamalardan daha etkili olduğunu ileri sürmüştür.

Soğukta bekletme sırasında zayıf ve yaşama gücü olmayan anterler ve mikrosporlar hemen kahverengileşip ölmekte, böylece güçlü anterler seçilerek kültüre alınmakta ve bunlar da yüksek oranda rejenere olabilmektedir.

Mikrospor tanelerinde nişasta birikimi anter kültürü için çok önemlidir. Nişasta biriken mikrosporlarda haploid embriyo gelişimi olmamaktadır. Düşük sıcaklık nişasta üretimini bloke ederek mikrosporlarda nişasta birikimini engeller.

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

1.2.2.3.3 Besin ortamının bileşimi ve yapısı

Anter kültüründe genel olarak ilk aşamada gametofitik dokuları sporofitik gelişmeye dönüştürme yönünde uyaracak oksinler gerekli iken; bitkiye dönüşme aşamasında sitokininlerin varlığına ihtiyaç duyulur. Sitokinin kaynağı olarak genelde çalışmalarda kinetin, BAP ve zeatin kullanılırken oksin kaynağı olarak 2,4 D, NAA ve IAA kullanılır.

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

Anter kültürlerinde karbon kaynağı olarak çoğunlukla sakkoroz kullanılmaktadır. Besin ortamlarına özellikle kültürün ilk dönemlerinde ilave edilen yüksek şeker dozları (%6-12) patates (Sopory ve ark., 1978), biber (Dumas de Valux ve ark., 1981) ve patlıcan (Dumas de Valux ve Chambonnet, 1982) türlerinde haploid embriyolar elde edilmesini sağlamaktadır.

Besin ortamlarına katılan serin, glutamin gibi aminoasitler, AgNO₃ gibi etilen biyosentezini inhibe edici maddeler (Paksoy ve ark., 1995) veya aktif kömür gibi maddeler elde edilecek başarıyı arttıran çeşitli kimyasal maddelerdir.

Anter kültüründe en fazla kullanılan ortam yapısı, agar ilave edilerek jel kıvamına getirilmiş yarı-katı nitelikte olanlarıdır. Genel olarak % 0.7 - % 0.8 agar kullanımı yeterlidir. Bunun dışında sıvı besin ortamları veya çift fazlı ortamların anter kültüründe kullanılması olumlu sonuçlar vermiştir. Biberde hibrit çeşitlerin geliştirilmesi için saf hatlar elde edilmesi üzerine yapılan bir çalışmada çift fazlı ortamın kullanılması biber anter kültürü için en etkili ve en başarılı yöntem olduğu belirlenmiştir (Dolcet-Sanjuan ve ark., 2000).

1.2.2.3.4 İnkübasyon koşulları

Başlangıçta anterler genellikle karanlıkta 20-30° C arasında kültüre alınmaktadır. İlerleyen aşamalarda düşük ışık yoğunluğu ve değişik günlük ışıklanma sürelerinde bekletilen anterler embriyo oluştuktan sonra, rejeneren olan bitkicikler daha yüksek ışık yoğunluğuna alınır. Bazı bitki türlerine ait anter kültürlerinde inkübasyonun ilk günlerinde uygulanan yüksek sıcaklık uygulamaları embriyo oluşumu üzerine olumlu etki yapmaktadır (Dumas de Vaulx ve ark., 1981).

1.2.3 Androgenesis ile ilgili yapılmış çalışmalar

Andogenik haploid bitkiler ilk kez *in vitro* da kültüre alınan olgunlaşmamış *Datura* anterlerinden elde edilmiştir (Guha ve Maheshwari, 1966). Bourgin ve Nitsch (1967) tütün bitkisinde anter kültürü ile haploid bitkiler elde etmeyi başarmışlardır. Yapılan bu çalışmalardan sonra günümüze kadar bir çok bitki türünde anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Biberde anter kültürü ve mikrospor kültürü kullanılarak androgenesis yoluyla haploid bitkiler elde edilmesi, bazı kimyasallarla bu haploidlerin dihaploid duruma getirilmesi ile kısa sürede ıslah çalışmalarında yer alacak olan homozigot hatlar sağlanabilmektedir.

Haploid bitkilerin bazı bitki türlerinde doğada kendiliğinde oluşma oranı çok yüksek iken bazı bitki türlerinde bu oran çok düşüktür. Haploid bitkiler gamet oluşturmazlar ve tohum bağlayamazlar. Haploid bitkiler kromozom katlaması yoluyla dihaploid hale getirilebilir. Islah çalışmalarında başarılı sonuçları kısa sürede elde etmek için androgenesis yoluyla elde edilen haploid ve dihaploid bitkiler kullanılabilir. Yapılan bir çok araştırmada araştırmacılar farklı yöntemlere başvurmuşlardır ve çoğunda olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Anter kültüründe donör bitkinin genotipi kültüre tepki vermede en önemli faktörlerden biridir. Çömlekçioğlu ve ark. (2001) ile Ellialtıoğlu ve ark. (2001)'da anter kültürüne tepkilerinin Kahramanmaraş genotiplerinde elde edilen embriyoların bitkiye dönüşüm oranlarının çok düşük düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Ellialtıoğlu ve ark. (2001) besin ortamının ve inkübasyon koşullarının optimize edilmesi, androjenetik başarıda genotipten kaynaklanan olumlu ya da olumsuz tepkiyi ortadan kaldıramayacağını vurgulamıştır.

Anter kültürü ve mikrospor kültüründe, ekimi yapılan anterlerin canlılığını koruyabilmesi için anterlerin uygun gelişme dönemlerinde kültüre alınması ve bu dönemin tomurcuk ve anterlerin dış görünüşlerine bakarak tespit edilmesi gerekmektedir. Sayılır ve Özzambak (2002) biberde 4-6 mm uzunluğundaki tomurcuklarla yapılan anter kültüründe en iyi anter, kallus ve embriyo gelişimini vermiştir. Terzioğlu ve ark. (2000), biberde anter kültüründe besin ortamının bileşimi ve inkübasyon koşullarının embriyo oluşumu üzerinde önemli olduğunu belirtmişlerdir. Biber anter kültürlerinin ilk 8 gün 35° C'de karanlıkta bekletilmesi sonra 25° C'ye alınması birçok araştırmada kullanılan inkübasyon koşuludur. Araştırmacılar sürekli ışıklandırılan ve 29° C'de tutulan anterlerden oluşan embriyo sayısının, 25 ve 35° C uygulamasından daha yüksek olduğunu açıklamışlardır.

Kahramanmaraş biber populasyonundan alınan çiçek tomurcuklarından alınan anterler kullanılarak ve asetokarmin ile boyayarak hazırlanan ezme preparatlarda anter kültürü için elverişli olduğu tespit edilen tek çekirdekli mikrosporlar belirlenmiştir Terzioğlu ve ark. (2000). Tek çekirdekli mikrosporlar; petallerin sepaller içinden henüz çıkmadığı, ancak hafifçe görülmeye başladığı 5-7 mm uzunluğuna sahip tomurcuklarda bulunduğu ayrıca bu dönemdeki anterlerin soluk yeşil, kenarlarının açık mavi renkte olduğunu belirtmişlerdir. İçerisinde birinci mitoz aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran ve olgunlaşmamış anterler, anter kültürü için en uygun materyaldir.

Kültür için uygun çiçek tomurcuklarından çıkarılan anterlere yapılan ön uygulamalar, mikrosporların kültür sırasında gelişmeleri üzerinde olumlu sonuçlar vermiştir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000). Biberde 4-10° C'ler arasında, 72 saat ile 4 haftaya kadar tutulan tomurcuklar polen rejenerasyonu bakımından olumlu yanıt vermiştir (Morrison ve ark., 1986). Sunderland ve Roberts (1979), +7 ila +15° C gibi sıcaklıklarda uzun süre (7-14 gün) yapılan şoklamanın, daha düşük derecelerde kısa süreyle yapılan uygulamalardan daha etkili olduğunu açıklamışlardır. Çıkarılan ve ön uygulama yapılan anterler uygun besi ortamlarına ekilir. Besin ortamlarının

bileşimine 2,4-D, NAA, IAA, BAP ve zeatin gibi çeşitli büyüme düzenleyicileri eklenerek genotiplere en uygun besi ortamı seçilebilir.

Biberde erkek gametten haploid embriyo elde etmek için kullanılan diğer yöntemde mikrospor kültürüdür. Mikrosporlar anter içerisinden izole edilerek *in vitro* ortamlarda uygun besin ortamlarına aktararak haploid embriyo gelişimi sağlanır (Elliathoğlu ve ark., 2000). Davies ve Morton (1998), tüm bir anterin kullanılması yerine daha az olarak kullanılan izole edilmiş mikrosporların kullanımının haploid indüksiyonu için gerçekçi bir yaklaşım haline geldiğini açıklamışlardır. Çünkü çok farklı bitki türünün izole mikrosporlarında embriyo üretiminin çok etkili ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, izole edilmiş mikrospor kültürü anter kültürüne göre birçok avantaja sahiptir (Kim ve ark., 2008).

İzole mikrosporların kültürde sporofitlere dönüşmeleri için ön uygulama yapılması gereklidir. Çeşitli ön uygulamalar arasında düşük sıcaklık ya da ısı şoku en çok kullanılanlardandır. Acı biberin izole mikrosporları ilk üç gün 31° C'de ve %2' lik sükrözlu ortamda tutularak ön uygulama yapılmıştır (Kim ve ark., 2008). Ön uygulamadan geçirilmiş mikrosporlar kültüre alındığında, hem embriyogenez hem embriyonik gelişimleri B5 ortamında ön uygulama yapılmamış mikrospor kültürüne göre daha verimli sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir. Daha önceki tütün ve buğday çalışmalarıyla uyumlu olan bu sonuç acı biberin izole mikrospordan embriyonik indüksiyonda %2'lik sükröz ve ısı şokunun olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark., 2008).

Kültürde kullanılan besi ortamının fark edilir bir biçimde mikrospor embriyogenezinin hızlı ve verimli çalışmasını ve embriyonik gelişimini etkilediği bilinmektedir. *Brassica* türlerinin mikrospor kültürleri için NLN (S1v1 N ve N medyası) ya da modifiye NLN ortamı geniş çapta kullanılır. Çalışmalar sonucunda Kim ve ark. (2008), NLNS ortamı büyütme kültüründe 3. hafta sonunda küresel ve kalp şekilli embriyo oluşumuna sebep olduğunu bulmuşlardır ve bu embriyolardan bazılarının kültürde 4. haftanın sonunda kotiledon embriyolarına dönüşmüşlerdir. Bu nedenle, biber mikrospor kültürü için NLNS ortamı kullanılmıştır. Hem karbon kaynağı hem de temel ortamın bileşenleri mikrosporların embriyogenez sıklığını önemli bir biçimde etkilemektedir. Maltoz, glukoz, melibioz, fruktoz ve sukroz gibi çok çeşitli karbonhidratlar hızlı ve verimli embriyogenez çalışmasının indüksiyonu için test edilmişlerdir (Kim ve ark., 2008).

Androgenesis ile embriyo üretimi gerçekleştirmek için çoğunlukla değişik bitkilerde sukroz ve maltoz farklı konsantrasyonlarda kullanıldığında androgenik yanıtlarda değişiklikler gösterilmiştir. Maltoz ilavesi hızlı ve verimli çalışan mikrospor embriyogenezine neden olur ve tahıl türlerinde yeşil bitki rejenerasyonunu artırır (Kim ve ark., 2008). Supena ve ark. (2006) acı biberler de hem anter kültüründe hem de mikrospor kültüründe maltozun sukroza göre embriyogeneze daha etkili olduğunu göstermiştir. Fakat Kim ve ark. (2008) da sukrozun maltoza göre daha etkili olduğunu açıklamışlardır ve diğer çalışmalarla bu sonuç ters düşmektedir. Bu farklılığın, mikrosporların anter duvarına olan tepkisi ve izole mikrosporlarında ortama tepkisinden kaynaklandığını düşünmüşlerdir (Kim ve ark., 2008).

Supena ve ark. (2006), izole mikrospor kültürünü kullanarak acı biber mikrosporlarında başarılı embriyo ve bitki üretimini iddia etmelerine rağmen, elde edilen maksimum sağlıklı çiçek sayısı orijinal çiçek tomurcuklarının sadece 0.1 katıdır. 10-14 çekirdekli çok hücreli mikrosporların fotoğraflarını yayınlamışlardır; fakat embriyo üretim sıklığı ile ilgili nicel bir veri yayınlamamışlardır.

Kim ve ark. (2008), izole mikrospor kültürünü kullanarak 8×10^4 - 10×10^4 mikrospor içeren plakalarda, plaka başına en az 4 bitki elde etmişlerdir. Bu frekans çiçek tomurcuğu başına 4 bitkiye karşılık gelir, fakat bir çiçek tomurcuğundaki anter 10×10^4 'den fazla mikrospor içerir. İzole biber mikrosporlarında başarılı embriyo ve bitki nesli üretimi esas olarak 3 faktöre bağlı olduğunu bulmuşlardır. Birincisi; mikrosporların sukrozlu besin ortamında $32 \pm 1^\circ \text{C}$ 'de ön uygulama yapılmasıdır. İkincisi; karbon kaynağı olarak sukroz ile desteklenen NLNS ortamında kültüre alınmasıdır. Üçüncüsü de; 8×10^4 - 10×10^4 /ml mikrospor kaplama yoğunluğu optimizasyonudur. Bu sonuçlar ilerdeki gelişmeler için ve gelecekte acı biberin izole mikrosporlarında embriyo ve bitki rejenerasyonu için temel taslağını oluşturur. Bu mikrospor kültürü sistemi optimize edildiğinde genetik, moleküler ve ıslah çalışmalarında kullanılabilir.

Dihaploidi yöntemi ile elde edilen bitkilere çeşitli ploidi seviyeleri belirleme testleri yapılır. Flow sitometri ile ploidi düzeyinin belirlenmesi kullanılan en güvenilir yöntemdir. Barany ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada yeniden üretilen bitkilerin yapraklarındaki çekirdeklerin propidyum-iyodid ile boyanmış populasyonun flow sitometri analizi ile belirlenen haploid ve dihaploidleri diplod kontrol profili ile karşılaştırılarak elde etmişlerdir. Çoğunlukla kendiliğinden kromozom katlanması

görülmesine karşın elde edilen haploid bitkilerin dihaploid bitkilere dönüştürülmesi için kromozom katlaması yapılır. Kromozom katlanması pratikte çoğunlukla kimyasal madde uygulamalarıyla gerçekleşmektedir. Günümüzde kromozom katlaması için bitki ıslahçıları tarafından en yaygın kullanılan kimyasal madde kolhisindir. Kolhisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısıyla replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar (Ellialtıoğlu, 2000). Biberde anter kültürü ve mikrospor kültürü kullanılarak androgenesis yoluyla elde edilen haploid bitkilerin bazı kimyasallarla dihaploid duruma getirilmesiyle kısa sürede ıslah çalışmalarında yer alacak olan homozigot hatlar sağlanabilmektedir.

2. MATERYAL VE METHOD

2.1 Bitkisel Materyal

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (BİYOM) tarafından ülkemizin farklı yörelerinden toplanmış hatlardan seleksiyon yoluyla elde edilmiş olan 73 adet *Capsicum annuum* L. ıslah hattı ve 11 farklı standart hat (Duru 34, Sera Demre 8, Yalova Charleston 341, Göktürk, Bingo Yağlık, Yalova Tatlı Sivri, Yalova Sürmeli, Cayenne Long Slim, California Wonder, Top Girl) genotipleri kullanılmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 : Çalışmada kullanılan biber hatlarının genel özellikleri.

NO	GENOTİP	ÖZELLİKLERİ	KAYNAK
1	PAU-12	Geniş meyveli (Kale tipi)	BİYOM ^a
2	PAU-13/6	Geniş meyveli (Kale tipi)	BİYOM ^a
3	PAU-15	Geniş meyveli (Kale tipi)	BiYOM ^a
4	PAU-16	Geniş meyveli (Kale tipi)	BİYOM ^a
5	PAU-18	Geniş meyveli (Kale tipi)	BİYOM ^a
6	PAU-20	Geniş meyveli (Kale tipi)	BİYOM ^a
7	PAU-23/2	Kısa ve dar meyveli (Balık tipi)	BİYOM ^a
8	PAU-24/5	Kısa ve küçük meyveli (Beyagaç tipi)	BİYOM ^a
9	PAU-25/1	Kısa ve orta geniş meyveli (Balıkkarası tipi)	BİYOM ^a
10	PAU-36/1	Dolmalık tipi	BİYOM ^a
11	PAU-36/5	Dolmalık tipi	BiYOM ^a
12	PAU-46/3	Sivri	BİYOM ^a
13	PAU-54	Domates biberi	BİYOM ^a
14	PAU-55	Kapya tipi (Yağlık)	BİYOM ^a
15	PAU-57	Kapya tipi (Yağlık)	BİYOM ^a
16	PAU-58	Ucu sivri, yuvarlak	BİYOM ^a
17	PAU-59	Kısa, üçgen, ucu sivri, ve kırmızı	BİYOM ^a
18	PAU-62	Kısa sivri	BİYOM ^a
19	PAU-63	Kısa sivri	BiYOM ^a
20	PAU-64	Yarı uzun (Maraş tipi)	BİYOM ^a
21	PAU-65	Yarı uzun (Maraş tipi)	BİYOM ^a
22	PAU-66	Yarı uzun (Maraş tipi)	BİYOM ^a
23	PAU-67	Kapya tipi	BİYOM ^a
24	PAU-68	Yarı uzun (Maraş tipi)	BİYOM ^a
25	PAU-69	Yarı uzun (Maraş tipi)	BİYOM ^a
26	PAU-71	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)	BİYOM ^a

Tablo 2.1. (devamı)

NO	GENOTİP	ÖZELLİKLERİ	KAYNAK
27	PAU-72	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)	BİYOM ^a
28	PAU-73	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)	BİYOM ^a
29	PAU-74	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)	BiYOM ^a
30	PAU-76	Kalın, uzun, eğri	BİYOM ^a
31	PAU-79	Kalın, uzun, düz	BİYOM ^a
32	PAU-83	Kalın, uzun, düz	BİYOM ^a
33	PAU-84	Kalın, uzun, düz, yürek şekilli	BİYOM ^a
34	PAU-88	Kalın, uzun, eğri, dörtköşeli	BİYOM ^a
35	PAU-89	Kalın, uzun, eğri,	BİYOM ^a
36	PAU-101-1	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BİYOM ^a
37	PAU-101-2	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BiYOM ^a
38	PAU-101-3	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BİYOM ^a
39	PAU-101-9	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BİYOM ^a
40	PAU-101-10	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BİYOM ^a
41	PAU-101-11	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BİYOM ^a
42	PAU-101-14	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BİYOM ^a
43	PAU-101-15	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BİYOM ^a
44	PAU-101-18	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BİYOM ^a
45	PAU-101-19	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BiYOM ^a
46	PAU-101-20	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BİYOM ^a
47	PAU-101-24	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli	BİYOM ^a
48	PAU-102	Kısa, küçük, ampul şeklinde meyveli	BİYOM ^a
49	PAU-105	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)	BİYOM ^a
50	PAU-106	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)	BİYOM ^a
51	PAU-107	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)	BİYOM ^a
52	PAU-109	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)	BİYOM ^a
53	PAU-110	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)	BiYOM ^a
54	PAU-112	Dolmalık	BİYOM ^a
55	PAU-113	Küçük yuvarlak erken dönemde açık yeşil, olgunlukta kırmızı	BİYOM ^a
56	PAU-114	Kısa Kırmızı Üçgen Biber	BİYOM ^a
57	PAU-121	Yarı uzun, sivri, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı	BİYOM ^a
58	PAU-122	Yarı uzun, sivri, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı	BİYOM ^a
59	PAU-123	Yarı uzun, sivri, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı	BİYOM ^a
60	PAU-126	Yarı uzun, sivri	BİYOM ^a

Tablo 2.1 (devam)

NO	GENOTİP	ÖZELLİKLERİ	KAYNAK
61	PAU-127	Yarı uzun, sivri	BİYOM ^a
62	PAU-128	Yarı uzun, sivri	BiYOM ^a
63	PAU-129	Bir koltukta 6 meyveli süs biberi	BİYOM ^a
64	PAU-203/2	Sivri	BİYOM ^a
65	PAU-206/4	Sivri, küçük	BİYOM ^a
66	PAU-207/3	Sivri, küçük	BİYOM ^a
67	PAU-211/6	Sivri	BİYOM ^a
68	PAU-214	Çarliston tipi	BİYOM ^a
69	PAU-216/1	Sivri	BİYOM ^a
70	PAU-216/5	Sivri	BiYOM ^a
71	PAU-220	Sivri	BİYOM ^a
72	PAU-221/1	Kıl biberi	BİYOM ^a
73	PAU-228/5	Süs biberi	BİYOM ^a
74	Bingo Yağlık	Kapya tipi (Yağlık)	Asgen Tarım ^b
75	Sera Demre 8	Sivri	İstanbul Toh. ^c
76	Göktürk	Kapya tipi (Yağlık)	İstanbul Toh. ^c
77	Duru-34	Dolmalık tipi	İstanbul Toh. ^c
78	Cayenne Long Slim	Küçük, sivri	Lord Nelson ^d
79	California Wonder	Tatlı, bloky	Lord Nelson ^d
80	Top Gril	Domates biberi	Lord Nelson ^d
81	Yalova Yağlık	Kapya tipi (Yağlık)	Yalova ^e
82	Yalova Tatlı Sivri	Sivri, tatlı	Yalova ^e
83	Yalova Sürmeli	Sivri	Yalova ^e
84	Yalova Çarliston 341	Çarliston tipi	Yalova ^e

^aPAU olarak kodlanmış hatlar BİYOM da seçilen ıslah hatlarıdır.

^bAsgen tarım: Asgen Tarım ve Ticaret AŞ. Otakçılar Cad. No:80 34050 Eyüp-İstanbul.

^cİstanbul tohumculuk: İstanbul Tohumculuk Tarım San. Ve Tic. Ltd. Şti., Yeni Mahalle GNR., Gani Elitez Sk., No: 36, Bakırköy, İstanbul.

^dLord Nelson: Bröderna Nelson Frö AB, Lokgatan 11, 362 31 Tingsryd, Sweden.

^eYalova: Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova.

2.2 Tohum Ekimi Ve Bitki Büyütme

Kullanılacak hatlara ait biber genotiplerinin her birinden 36'şar adet tohum (Şekil 2.1) torf ve vermikulit (2:1) karışımı ile doldurulmuş styrofoam viyollerine 30 Ekim 2010 tarihinde tekilmiştir. Viyoller cam seraya konarak fidelerin büyümesi sağlanmıştır (Şekil 2.2-2.3). Ekilen tohumlarda % 55-100 oranları arasında çimlenme görülmüştür. Bir ay sonra büyüyen fidelerden her bir biber hattından 10 fide ilk önce torf ve vermikulit (2:1) karışımı ile doldurulmuş 2 litrelik saksılara dikilmiştir (Şekil 2.4). Yaklaşık iki ay sonra fideler 2 litrelik saksılardan 4,6 litrelik saksılara aktarılmıştır (Şekil 2.5). Haziran dönemine kadar bitkiler hafta da iki gün 18.18.18 gübresi kullanılarak gübreli su ile sulanmıştır. Diğer günlerde normal su ile bitkilerin

su ihtiyaçları karşılanmıştır. Yaz döneminde bitkilerin su ihtiyaçları her gün gübreli su ile sağlanmıştır. Yine yaz dönemine kadar iki hafta da bir kez, yaz döneminde haftada bir kez olmak üzere çeşitli böcek ve mantar zararlılarına karşı bitkiler ilalanmıştır.



şekil 2.1 : Biber Tohumları.



şekil 2.2 : Serada biber tohumlarının stayrofoam viyollerine ekilmesi.



şekil 2.3 : Çimlenmiş biber fideleri.



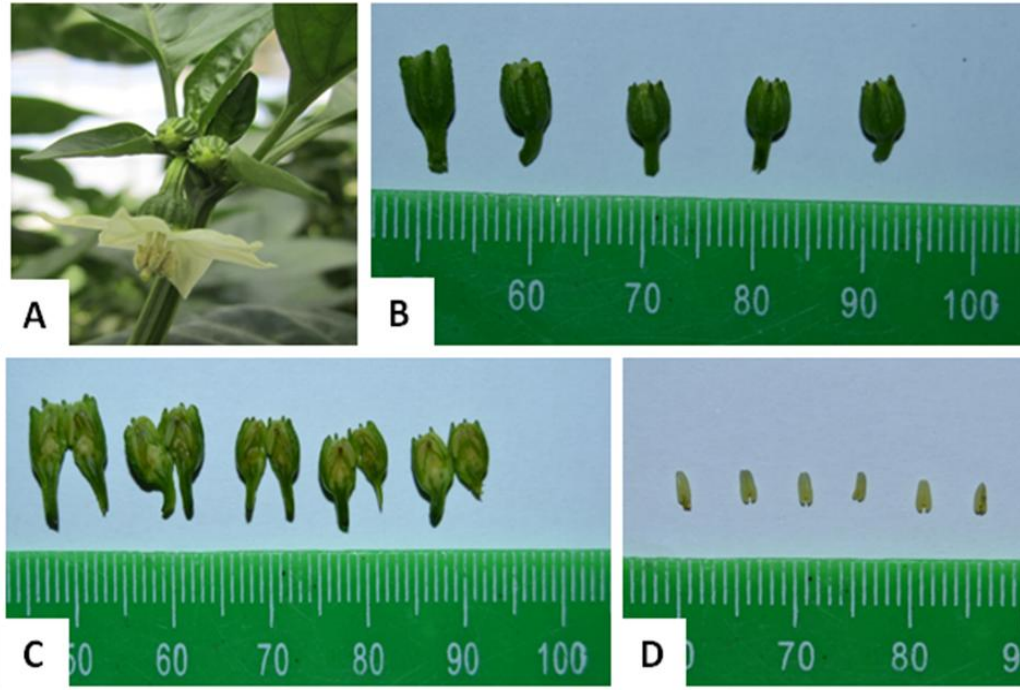
Şekil 2.4 : İki Litrelik saksılara aktarılmış biber hatları.



Şekil 2.5 : 4,6 Litrelik saksıda büyüyen biber bitkisi..

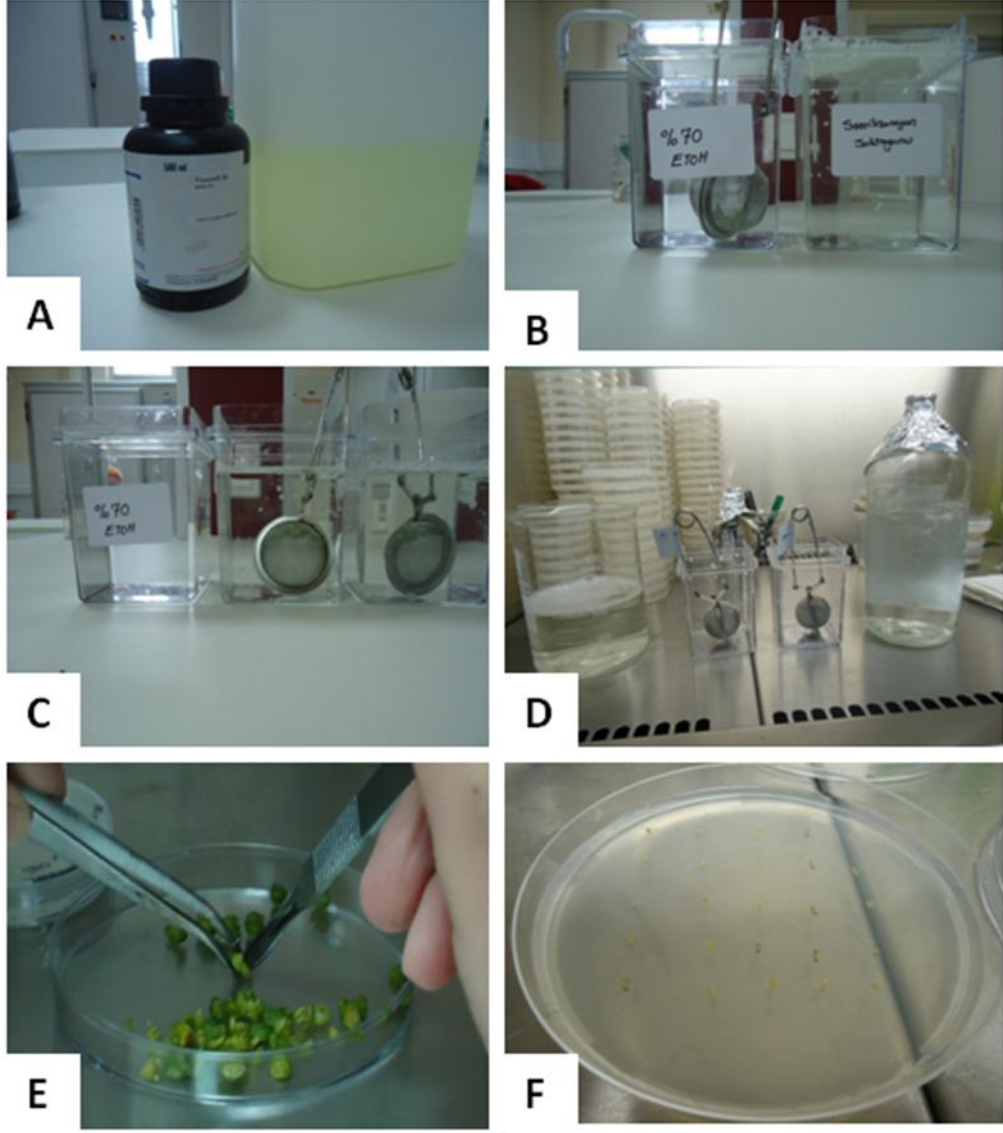
2.3 Çiçek Tomurcuğu Elde Etme Ve Androgenesis İndükleme Çalışmaları

Anter kültürü için uygun polen gelişim aşamasında olan yaklaşık olarak 3-4 mm olan petal ve sepalleri aynı büyüklükte olan çiçek tomurcukları toplanır. Androgenesis için uygun mikrosporları bulunduğu anterler; fizyolojik olarak krem-açık sarı renkli uç kısmında hafif morlaşmanın başladığı anterlerdir. Kullanılan tomurcuk boyutu ve kültür için uygun anterler Şekil 2.6.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.6 : Kullanılan çiçek tomurcukları ve anterler. A: Kültür için uygun anterlerin bulunduğu biber bitkisi üzerindeki çiçek tomurcuğu, B:Çeşitli genotiplerden alınan kültür için uygun anterlerin bulunduğu çiçek tomurcukları, C:tomurcukların açılmış şekli, D:Kültürde kullanılan androgenesis için uygun anterler.

Toplanan tomurcuklar sterilizasyon için metal süzek içerisinde koyulur ve ilk olarak %70'lik etanol içerisinde 20 saniye daha sonra sterilizasyon solüsyonu içerisinde (% 15'lik klorak ve tween-20) 15 dakika tutulur. Daha sonra sterilizasyon solüsyonu içerisindeki tomurcuklar steril kabine alınır ve steril su ile üç defa yıkanır. Yıkanan tomurcuklar metal süzek içerisinde steril bir petri kabına koyulur. Steril bistüri ve pens yardımı ile tomurcuklar içerisinde anterler çıkarılır. Anterleri çıkarırken dikkat edilecek nokta; anterlerin ezilmemesi ve anter sapından ayrılmış olmasıdır. Her tomurcuk içerisinde çıkarılan anterler (yaklaşık 5-6 anter çıkmaktadır) aynı sırada, anter sapından ayrılan kısım üstte olacak şekilde petri kabındaki medya ya yerleştirilir. Ekim yapılmış petrilerin kapağı bir de parafilm ile kaplanır. Şekil 2.7'de tomurcukların sterilizasyonu ve anterlerin çıkarılıp medyaya yerleştirilmesi gösterilmiştir.



Şekil 2.7 : Biber tomurcuklarında sterilizasyon aşamaları ve anterlerin çıkarılması. A: Sterilizasyonda kullanılan tween-20 ve sodyumhipoklorit, B: %70 EtOH içerisinde sterilizasyon C: Sterilizasyon solüsyonu (%15'lik sodyum hipoklorit ve 1 damla tween-20) içerisinde yüzey sterilizasyonu, D: Steril kabin içerisinde tomurcukların yıkanması, E: Tomurcuklar içerisinde anterlerin çıkarılması, F: Çıkarılan anterlerin petri tabağındaki medyaya ekilmesi.

2.4 Kullanılan Besin Ortamları

Çalışmada üç farklı deneme yapılmıştır. Bu deneme aşamalarında farklı medya protokolleri denenmiştir. Birinci deney aşamasında indükleme için İndükleme Medyası (İM) olarak İM-1, İM-2, İM-3 medyaları ve rejenerasyon için ise MS medyası kullanılmıştır. İkinci deney aşamasında indükleme için kallus üretme medyası (CP), ve rejenerasyon için R1 medyası kullanılmıştır. Üçüncü deneme aşamasında İM-1 ve İM-3 yeniden kullanılmıştır. Kullanılan besin ortamlarının içerikleri Tablo 2.2 ve 2.3'te gösterilmiştir.

Makromineraler, mikromineraler ve vitaminler daha önceden ilgili prosedüre göre stok solüsyonu olarak hazırlanmıştır. Medya hazırlama sırasında ilk önce 1000 ml lik beher içerisine 500 ml distile su koyulmuş daha sonra hazırlanacak medya için bulunan kimyasallar stok solüsyonlarından sırası ile eklenmiştir. Agar eklemeyen pH ölçümü yapılmış ve 1 N KOH veya 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılarak pH 5,8'e ayarlanmıştır. pH ayarlandıktan sonra hacim 1000 ml ye tamamlanmış ve 1000 ml'lik şişelere 500 ml olarak paylaştırılmıştır. Agar şişelere 4 g/500 ml toplamda 8 g/L olarak eklenmiştir.

Çalışmada kullanılan medyalar otoklavda 121° C'da 15 psi basınçta 20 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra steril kabin içerisinde döküm sıcaklığına kadar soğuyan medya 60 mm çapındaki petrilere 15 ml/petri oranında paylaştırılmıştır.

Tablo 2.2 : Birinci ve üçüncü deney aşamasında anter kültüründe kullanılan medyalarının kompozisyonu.

	MS ^a	İM-1 ^b	İM-2 ^b	İM-3 ^c
Makromineraler (mg l⁻¹)				
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650	1650
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440	440	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	370	370
KNO ₃	1940	1940	1940	1940
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170
Mikromineraler (mg l⁻¹)				
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	6.2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9	16.9	16.9	16.9
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	8.6
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8
Na ₂ ·EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3
KI	0.83	0.83	0.83	0.83
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
Vitaminler (mg l⁻¹)				
Thiamine (B1)	0.1	0.1	0.1	0.1
Nicotinic acid (B3)	0.5	0.5	0.5	0.5
Pyrodoxine (B6)	0.5	0.5	0.5	0.5
Glycine	2.0	2.0	2.0	2.0
Myo-inositol	100	100	100	100
Sucrose (g l ⁻¹)	30	30	30	30
Agar (g l ⁻¹)	10	10	10	10
Büyüme hormonları (mg l⁻¹)				
2,4-D	-	0.004	-	-
Kinetin	-	0.1	0.1	-
BAP	-	-	-	0.1
NAA	-	-	-	4

^a Murashige ve Skoog (1962).

^b Matsubara ve ark. (1992).

^c Büyükalaca ve ark. (2004).

Tablo 2.3 : İkinci deney aşamasında anter kültüründe kullanılan indükleme (CP) ve rejenerasyon (R1) medyalarının kompozisyonu.

	CP ^a	R1 ^a
Makromineraler (mg l⁻¹)		
KNO ₃	21500	21500
NH ₄ NO ₃	12380	12380
MgSO ₄ .7H ₂ O	4120	4120
CaCl ₂ .2H ₂ O	3130	3130
KH ₂ PO ₄	1420	1420
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	500	500
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	380	380
(NH ₄) ₂ SO ₄	340	340
KCl	70	70
Mikromineraler (mg l⁻¹)		
MnSO ₄ .H ₂ O	2213	2013
ZnSO ₄ .7H ₂ O	362.5	322.5
H ₃ BO ₃	315	155
KI	69.5	33
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	18.9	13.9
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.6	1.1
CoCl ₂ .6H ₂ O	1.6	1.1
Vitaminler (mg l⁻¹)		
Thiamine	0.6	0.6
Nicotinic acid	0.7	0.7
Pyrodoxine	5.5	5.5
Glycine	0.1	0.1
Myo-inositol	50.3	50.3
Ca pantothenate	0.5	0.5
B12 Vitamin	0.03	-
Biotine	0.005	0.005
Iron stock	2.5	2.5
Sucrose (g l ⁻¹)	30	30
Agar (g l ⁻¹)	8	8
Büyüme hormonları (mg l⁻¹)		
2,4-D	0.01	-
Kinetin	0.01	0.1

^a Chambonnet ve ark. (1988).

2.5 Ön Uygulamalar Ve Kültür Koşulları

Çalışmamızda kültüre alınan anterlere ön uygulamalar yapılmıştır. Bunlar; sıcaklık ve karanlık uygulamalarıdır. Buna göre kültürlerin bir kısmı ilk sekiz gün 35° C ve karanlıkta inkübatörde, diğer kısmı karanlıkta 18 saat/27° C ve 8 saat/17° C ye ayarlanmış olan büyütme kabinine konulmuştur. Sekiz gün sonunda tüm kültürler 18 saat aydınlık/ 27° C ve 8 saat karanlık/17° C ye ayarlanmış olan büyütme kabinine konulmuştur (Şekil 2.8).

İM-1, İM-2, İM-3 medyalarında ki kültürler rejenerasyon için 1 ay sonra hormonsuz MS ortamına aktarılmış yine aynı büyütme şartlarında embriyo oluşması beklenmiştir. CP ortamındaki kültürler ilk 12 günden sonra rejenerasyon için R1 ortamına aktarılmış ve yine aynı büyütme şartlarında embriyo oluşması beklenmiştir.



Şekil 2.8 : Büyütme kabininde optimum şartlarda tutulan petri tabaklarındaki biber anterleri.

2.6 Elde Edilen Androgenik Dokuların Flow Sitometri ile Analizi

Çalışmada kullanılan biber genotiplerine ait çekirdeksel deoksiribonükleik asit (DNA) miktarları ve androgenesis kültürlerinde ploidi stabilitesi analizleri Beckman Coulter Cell Lab Quanta™ SC flow sitometri ile yapılmıştır. Analiz için Bürüksel lahanası (*Brassica oleracea* ssp. *gemmifera*) çekirdekleri içsel referans standardı olarak kullanılmıştır. G0/G1 fazındaki (2C) bürüksel lahanası çekirdekleri 1.30 pg DNA/Çekirdek içerirler (Arumuganathan ve Earle 1991). Çekirdek örnekleri Murch ve ark. (2006) çalışmalarında kullandıkları Bino ve ark. (1992) tarafından

uygulanmış olan protokolün değiştirilerek uygulanmasıyla elde edilen protokol kullanılmıştır. Çekirdeklerin izolasyonu amacıyla 50 mg ağırlığında taze yapraklar ve kallus parçaları kullanılmıştır. Dokular 65x15 mm'lik petri kaplarında ıslak buzda soğutulmuş 1.5 ml çekirdek izolasyon tamponu-nuklei isolation buffer (NIB) kullanılarak jilet yardımı ile homojenize edilmişlerdir. NIB içeriği Tablo 2.5.'da verilmiştir.

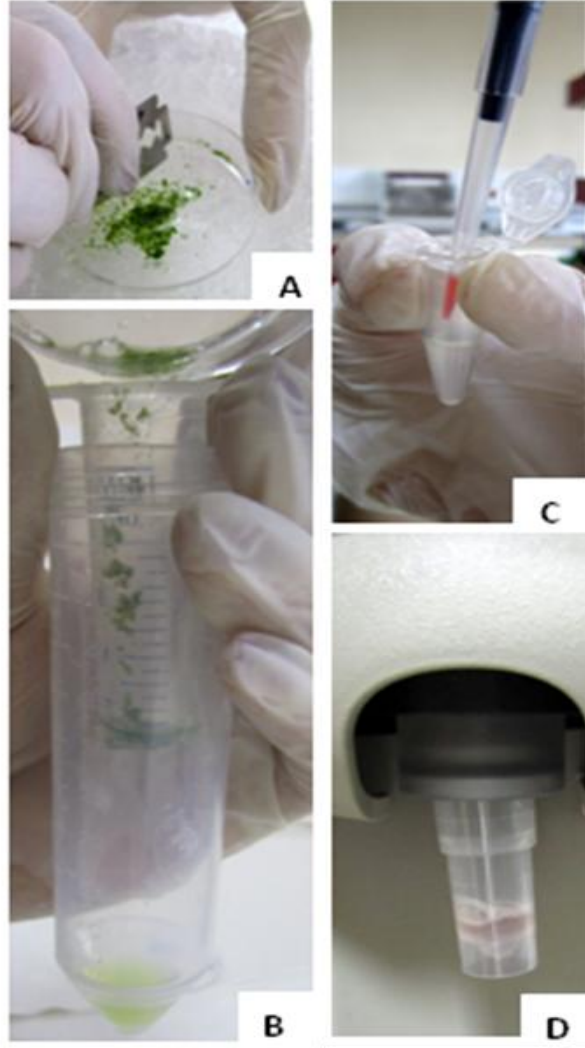
Tablo 2.4 : Çekirdek izolasyon tamponu (NIB) kompozisyonu (100 ml için).

KİMYASAL	KİMYASAL MİKTARI	FİNAL KONSANTRASYON MİKTARI^a
HEPES	360 mg	15 mM
Na ₂ EDTA	37.22 mg	1 mM
KCl	597 mg	80mM
NaCl	116.9 mg	20 mM
Triton X-100	200 mikro l	% 0.2 (v/v)
Sükroz	10.3 g	300 mM
Spermin	17.4 mg	0.5 mM
PVP-40	1 g	%1

^a pH 7.5' a ayarlanır ve -20° C'de saklanır.

Çekirdek süspansiyonu 37 mikron porlara sahip naylon filtre ile süzülmüştür. Filtreden süzülen çekirdekler 1,5 ml' lik ependorf tüpünde toplanmıştır. Daha sonra 8000 rpm'de 5 saniye mikrosantrifüj ile santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki süpernatant boşaltılmış ve tüp dibinde kalan çekirdek peletinin bir süre kuruması beklenmiştir. Daha sonra üzerine 300 ml NIB eklenmiştir. Çekirdeklerin boyanması için 1mg/1ml (PI/Distile su) konsantrasyonundaki propidyum iyodür (PI) kullanılmıştır. NIB eklenmiş tüplere 1 mg/ml konsantrasyonuna sahip PI stokundan 10 ml eklenmiştir.

Hazırlanan örneklerin çekirdek analizi 10/15.000 (çekirdek/numune) akış içerisinde flow sitometri ile yapılmıştır. DNA miktarları kontrol grubu ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Flow sitometri aşamaları Şekil 2.9' da gösterilmiştir.



Şekil 2.9 : Flow sitometri aşamaları. A: Kallus dokuları ile referans bitkisine ait yaprak dokularının jilet yardımı ile NIB içerisinde homojenize edilmesi, B: Homejenatın filtre ile süzülmesi, C: Santrifüj sonrası çekirdeklerin PI ile boyanması, D: Hazırlanan örneğin cihaza yerleştirilmesi, E: Kullanılan flow sitometri cihazı.

2.7 Deney - 1

Birinci deney aşaması Şubat, Mart, Nisan 2011 tarihlerinde alınan anterler ile anter kültürü çalışması yapılmıştır. Birinci denemede kullanılan özellikleri verilmiş biber genotipleri Tablo 2.5’da gösterilmiştir. Bu genotiplerde kullanılan medyalar indükleme medyası olarak İM-1, İM-2, İM-3 ve rejenerasyon medyası olarakta MS kullanılmıştır (bkz.Tablo 2.2).

Tablo 2.5 : Birinci denemede kullanılan biber genotipleri.

NO	GENOTİP	MEYVE ÖZELLİKLERİ
1	PAU-12	Geniş meyveli (Kale tipi)
2	PAU-18	Geniş meyveli (Kale tipi)
3	PAU-20	Geniş meyveli (Kale tipi)
4	PAU-54	Domates biberi
5	PAU-55	Kapya tipi (Yağlık)
6	PAU-57	Kapya tipi (Yağlık)
7	PAU-59	Kısa, üçgen, ucu sivri
8	PAU-63	Kısa sivri
9	PAU-64	Yarı uzun (Maraş tipi)
10	PAU-66	Yarı uzun (Maraş tipi)
11	PAU-69	Yarı uzun (Maraş tipi)
12	PAU-71	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)
13	PAU-72	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)
14	PAU-73	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)
15	PAU-74	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)
16	PAU-79	Kalın, uzun, düz
17	PAU-88	Kalın, uzun,eğri,dörtköşeli
18	PAU-89	Kalın, uzun,eğri
19	PAU-101	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
20	PAU-105	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)
21	PAU-106	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)
22	PAU-113	Küçük yuvarlak erken dönemde açık yeşil olgunlukta kırmızı meyveli
23	PAU-114	Kısa üçgen biber
24	PAU-121	Yarı uzun, sivri, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı
25	PAU-122	Yarı uzun, sivri, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı
26	Sera Demre 8	Sivri tipi
27	Göktürk	Kapya tipi (Yağlık)
28	Yalova Charleston 341	Charleston tipi
29	Duru-34	Dolmalık tipi
30	Top Gril	Domates biberi

2.8 Deney - 2

İkinci deney aşamasında Haziran-Temmuz-Ağustos 2011 dönemlerinde alınan anterler ile anter kültürü çalışmaları yapılmıştır. İkinci denemede kullanılan biber genotipleri ve özellikleri Tablo 2.6’da verilmiştir. Bu genotiplerde kullanılan medyalar; indükleme medyası olarak CP ve rejenerasyon medyası olarak R1 kullanılmıştır (Tablo 2.3).

Tablo 2.6 : Deney-2’de kullanılan biber genotipleri.

NO	GENOTİP	MEYVE ÖZELLİKLERİ
1	PAU-13/6	Geniş meyveli (Kale tipi)
2	PAU-15	Geniş meyveli (Kale tipi)
3	PAU-18	Geniş meyveli (Kale tipi)
4	PAU-23/2	Kısa ve dar meyveli (Balık tipi)
5	PAU-36/5	Dolmalık tipi
6	PAU-54	Domates biberi
7	PAU-55	Kapya tipi (Yağlık)
8	PAU-57	Kapya tipi (Yağlık)
9	PAU-59	Kısa, üçgen, ucu sivri
10	PAU-63	Kısa sivri
11	PAU-65	Yarı uzun (Maraş tipi)
12	PAU-67	Kapya tipi
13	PAU-69	Yarı uzun (Maraş tipi)
14	PAU-71	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)
15	PAU-72	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)
16	PAU-73	Yeşil, ince etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)
17	PAU-74	İnce etli dolmalık benzeri (Tokat tipi)
19	PAU-83	Kalın, uzun,düz
20	PAU-101	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
21	PAU-102	Kısa, küçük, ampul şeklinde meyveli
22	PAU-105	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)
23	PAU-107	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)
24	PAU-109	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)
25	PAU-110	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)
26	PAU-112	Dolmalık tipi
27	PAU-121	Yarı uzun, sivri, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı
28	PAU-126	Yarı uzun, sivri
29	PAU-207/3	Küçük sivri
30	Sera Demre 8	Sivri
31	Göktürk	Kapya tipi (Yağlık)
32	Bingo Yağlık	Kapya tipi (Yağlık)
33	Yalova Charleston 341	Çarliston tipi
34	Duru-34	Dolmalık tipi

2.9 Deney - 3

Üçüncü deney aşamasında Aralık 2011 Ocak-Şubat-Mart 2012 dönemlerinde alınan anterler ile İM-1 ve İM-3 medyaları kullanılarak anter kültürü çalışmaları yapılmıştır. Denemede kullanılan biber genotipleri Tablo 2.7 ve 2.8’de verilmiştir. Bu çalışma aşamasında kullanılan medyalar iki farklı şekildedir. İlk olarak Tablo 2.7 da verilen genotiplerde indüklemeye için İM-3(Tablo 2.2) ve rejenerasyon için R1(Tablo 2.3) medyaları kullanılmıştır. İkinci olarak Tablo 2.8 de verilen genotiplerde indüklemeye için İM-1 (Tablo 2.2) ve rejenerasyon için R1 (Tablo 2.3) medyaları kullanılmıştır.

Tablo 2.7 : Deney -3’te İM-3 medyasında kullanılan biber genotipleri.

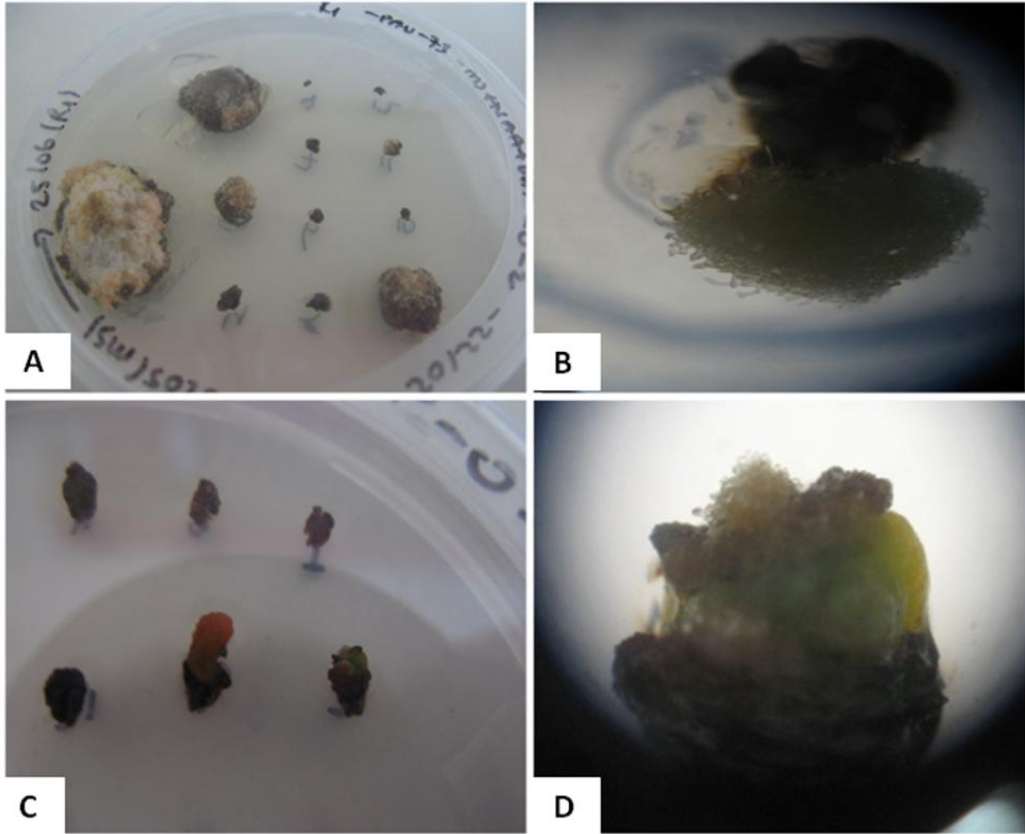
NO	GENOTİP	MEYVE ÖZELLİKLERİ
1	PAU-101\23	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
2	PAU - 123\2	Yarı uzun, sivri, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı
3	PAU- 126	Yarı uzun, sivri, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı
4	PAU- 127	Yarı uzun, sivri
5	PAU- 128	Yarı uzun, sivri
6	PAU- 129	Yarı uzun, sivri
7	PAU - 228-5/4	Süs biberi

Tablo 2.8 : Deney -3'te İM-1medyasında kullanılan biber genotipleri.

NO	GENOTİP	MEYVE ÖZELLİKLERİ
1	PAU-13/6	Geniş meyveli (Kale tipi)
2	PAU-16	Geniş meyveli (Kale tipi)
3	PAU-18	Geniş meyveli (Kale tipi)
4	PAU-23/2	Kısa ve dar meyveli (Balık tipi)
5	PAU-24/5	Kısa ve küçük meyveli (Beyazağaç tipi)
6	PAU-46/3	Sivri
7	PAU-62	Kısa, sivri
8	PAU-65	Yarı uzun (Maraş tipi)
9	PAU-66	Yarı uzun (Maraş tipi)
10	PAU-71	İnce etli küçük dolmalık (Tokat tipi)
11	PAU-74	İnce etli küçük dolmalık (Tokat tipi)
12	PAU-101-1	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
13	PAU-101-2	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
14	PAU-101-3	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
15	PAU-101-9	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
16	PAU-101-10	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
17	PAU-101-11	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
18	PAU-101-14	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
19	PAU-101-15	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
20	PAU-101-18	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
21	PAU-101-19	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
22	PAU-101-20	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
23	PAU-101-24	İnce kısa, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı meyveli
24	PAU-107	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)
25	PAU-110	Uzun ve kalın meyveli (Yağlık)
26	PAU-113	Küçük yuvarlak erken dönemde açık yeşil, olgunlukta kırmızı
27	PAU-114	Kısa Kırmızı Üçgen Biber
28	PAU-121	Yarı uzun, sivri, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı
29	PAU-123	Yarı uzun, sivri, erken dönemde mor, olgunlukta kırmızı
30	PAU-127	Yarı uzun, sivri
31	PAU-128	Yarı uzun, sivri
32	PAU-203/2	Yeşil, sivri
33	PAU-211/6	Sivri
34	PAU-214	Çarliston tipi
35	PAU-216/1	Sivri
36	PAU-216/5	Sivri
37	PAU-220	Sivri

3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan 84 adet genotipten Şubat-Mart-Nisan 2011, Haziran-Temmuz-Ağustos 2011 ve Aralık 2011, Ocak, Şubat, Mart 2012 dönemlerinde toplam 7343 adet anter ekimi yapılmıştır. Bunlardan 72 adet androgenik kallus ve 531 adet somatik kallus elde edilmiştir. Uygun kültür koşulları içerisinde bulunan kalluslardan embriyo oluşumu olmamıştır. Sağlıklı kalluslardan elde edilen dokularda flow sitometri ile çekirdek DNA miktarı analizi yapılmıştır. Yapılan analizlerde embriyonik gelişen haploid olması beklenen kallusların poliploid ve diploid kromozom sayısına sahip olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.1 : Elde Edilen Kalluslar. A: Rejenerasyon medyasında embriyoya dönüşmeden büyüyen androgenik kalluslar, B: Kalp şeklinde oluşan androgenik kallus, C: Renkli somatik kalus, D: Androgenik kallus çıkışı.

3.1 Deney-1' de Elde Edilen Sonuçlar

Bu denemede Şubat, Mart ve Nisan 2011 dönemlerinde alınan anterler ve İM-1 İM-2, İM-3 medyaları kullanılmış ve 30 adet genotipten toplam 2102 anter ekimi yapıŐtır . Yalnızca sıcaklık n uygulaması yapılmayan dolmalık tipi PAU-74 hattından elde edilen anterlere sıcaklık n uygulaması yapılmadan İM-3 medyasında % 2 oranında androgenik kallus elde edilmiştir. Ayrıca toplam 222 adet somatik kallus elde edilmiştir. PAU-71, PAU-73 ve PAU-74 hatlarından elde edilen anterlerde hem n uygulama yapılanlarda hemde yapılmayanlarda diğer genotiplere göre daha çok gelişme görüŐmüŐtür. Bu hatlara ait anterlerde deđiŐiklik kültüre alındıktan yaklaşık iki hafta sonra renk değişimi olarak görülmeye ardındanda anterler etrafında hücre farklılaŐması baŐlamıŐtır yani aynı dönemde ekimi yapılan diğer hatlara ait anterlerden on gün kadar daha önce gelişme göstermişlerdir. İM-3 medyası İM-1 ve İM-2 medyalarına göre daha başarılı olmuştur. Ayrıca sıcaklık n uygulaması anterlerdeki değişimi ve kallus oluşumunu olumlu Şekilde etkilemiştir. Birinci denemede kullanılan, sıcaklık n uygulaması yapılan ve yapılmayan genotiplerden ekilen anter sayıları ve deneme sonucunda elde edilen somatik ve androgenik kallus sayıları kullanılan medyalara göre hazırlanan aŐađıdaki Tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 3.1 :Deney – 1’de İM-1 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.

NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	ANDROGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
1	PAU-16	25	0 (0)	0 (0)
2	PAU-24/5	25	0 (0)	0 (0)
3	PAU-36/1	25	0 (0)	0 (0)
4	PAU-46/3	25	0 (0)	3 (12)
5	PAU-58	24	0 (0)	3 (12.5)
6	PAU-59	25	0 (0)	1 (4)
7	PAU-62	25	0 (0)	1 (4)
8	PAU-63	25	0 (0)	0 (0)
9	PAU-67	25	0 (0)	0 (0)
10	PAU-68	25	0 (0)	0 (0)
11	PAU-71	18	0 (0)	0 (0)
12	PAU-73	25	0 (0)	5 (20)
13	PAU-74	17	0 (0)	0 (0)
14	PAU-84	5	0 (0)	0 (0)
15	PAU-101	25	0 (0)	0 (0)
16	PAU-114	20	0 (0)	0 (0)
17	PAU-206/4	20	0 (0)	0 (0)
18	PAU-207/3	20	0 (0)	4 (20)
19	Sera Demre 8	25	0 (0)	0 (0)
20	Yalova Tathı Sivri	25	0 (0)	0 (0)
21	Yalova Sürmeli	50	0 (0)	0 (0)
22	C. Long Slim	50	0 (0)	5 (10)
23	C. Wonder	25	0 (0)	4 (16)
TOPLAM		574	0 (0)	26 (4.5)

Tablo 3.2 :Deney – 1’ de İM-1 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılmayan anterlerden elde edilen sonuçlar.

NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	EMBRİYOGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
1	PAU-36/1	25	0 (0)	0 (0)
2	PAU-58	13	0 (0)	0 (0)
3	PAU-59	25	0 (0)	0 (0)
4	PAU-67	25	0 (0)	0 (0)
5	PAU-68	25	0 (0)	0 (0)
6	PAU-69	25	0 (0)	0 (0)
7	PAU-71	23	0 (0)	0 (0)
8	PAU-113	20	0 (0)	2 (10)
9	PAU-114	45	0 (0)	0 (0)
10	PAU-207/3	17	0 (0)	8 (47)
11	Yalova Tatlı Sivri	25	0 (0)	0 (0)
12	C. Long Slim	25	0 (0)	0 (0)
13	C. Wonder	25	0 (0)	13 (52)
14	Top Gril	25	0 (0)	0 (0)
TOPLAM		343	0 (0)	23 (6.7)

Tablo 3.3 :Deney – 1’ de İM-2 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.

NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	EMBRİYOGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
1	PAU-25/1	11	0 (0)	0 (0)
2	PAU-62	25	0 (0)	4 (16)
3	PAU-69	23	0 (0)	0 (0)
4	PAU-71	20	0 (0)	10 (50)
5	PAU-76	25	0 (0)	8 (32)
6	PAU-105	25	0 (0)	0 (0)
7	PAU-112	25	0 (0)	0 (0)
8	PAU-113	15	0 (0)	0 (0)
9	PAU-114	20	0 (0)	0 (0)
10	Yalova Tatlı Sivri	25	0 (0)	0 (0)
11	Yalova Sürmeli	12	0 (0)	0 (0)
12	Y. Çarliston	25	0 (0)	0 (0)
13	Yalova Yağlık	50	0 (0)	0 (0)
14	C. Wonder	25	0 (0)	0 (0)
TOPLAM		326	0 (0)	22 (6.7)

Tablo 3.4 :Deney – 1’ de İM-2 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılmayan anterlerden elde edilen sonuçlar.

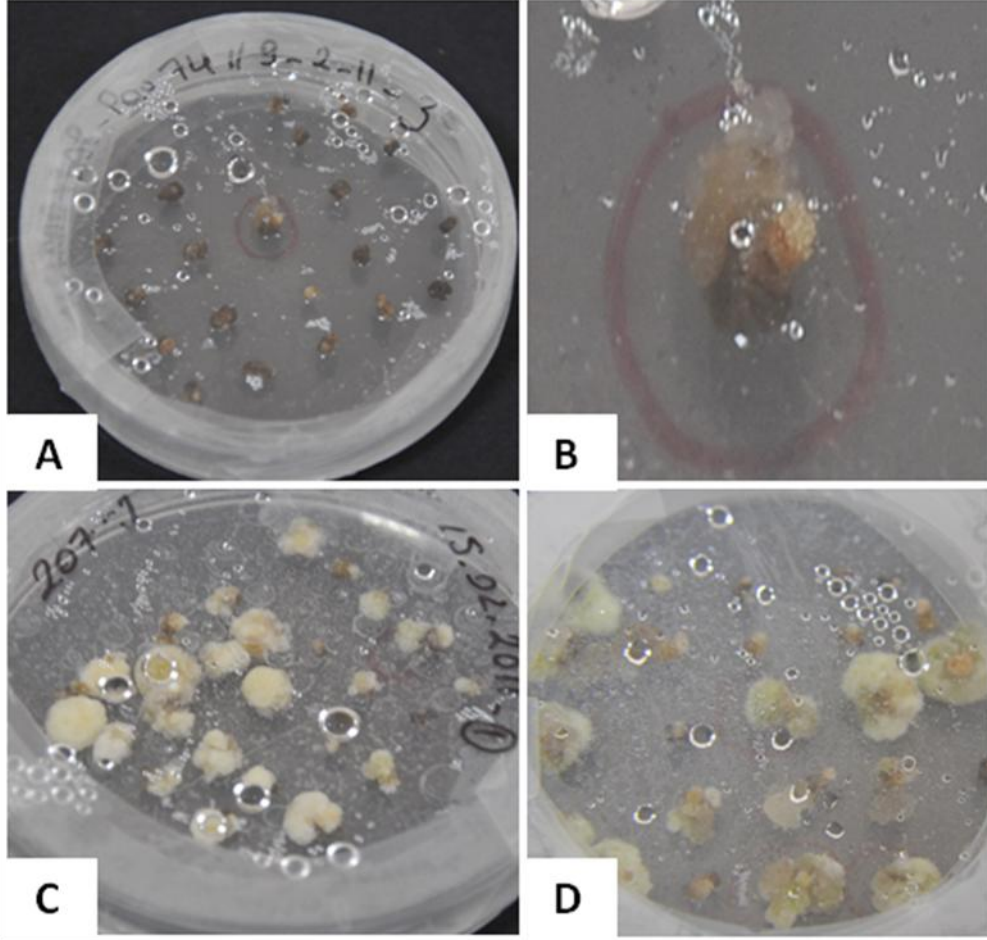
NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	ANDROGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
1	PAU-71	23	0 (0)	13 (56.5)
2	PAU-74	23	0 (0)	7 (30.4)
3	Yalova Yağlık	25	0 (0)	0 (0)
4	C. Long Slim	10	0 (0)	0 (0)
5	C. Wonder	20	0 (0)	6 (30)
TOPLAM		101	0 (0)	26 (25.7)

Tablo 3.5 :Deney – 1’ de İM-3 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.

NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	ANDROGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
1	PAU-16	25	0 (0)	0 (0)
2	PAU-25/1	6	0 (0)	3 (50)
3	PAU-58	25	0 (0)	0 (0)
4	PAU-66	50	0 (0)	17 (34)
5	PAU-69	25	0 (0)	0 (0)
6	PAU-73	69	0 (0)	6 (8,7)
7	PAU-74	50	0 (0)	9 (18)
8	PAU-113	25	0 (0)	20 (80)
9	PAU-221/1	25	0 (0)	1 (4)
10	PAU-207/3	45	0 (0)	6 (13,3)
11	Y. Çarliston	25	0 (0)	0 (0)
12	Long Slim	25	0 (0)	0 (0)
TOPLAM		395	0 (0)	62 (15.7)

Tablo 3.6 :Deney – 1’ de İM-3 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılmayan anterlerden elde edilen sonuçlar.

NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	ANDROGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
1	PAU-46/3	20	0 (0)	4 (20)
2	PAU-58	25	0 (0)	8 (32)
3	PAU-62	25	0 (0)	20(80)
4	PAU-73	25	0 (0)	7 (28)
5	PAU-74	35	2 (5.7)	4 (11.4)
6	PAU-83	19	0 (0)	0 (0)
7	PAU-113	25	0 (0)	20 (80)
8	PAU-122	50	0 (0)	8 (16)
9	PAU-221/1	25	0 (0)	8 (32)
10	PAU-206/4	14	0 (0)	4 (28.5)
11	PAU-207/3	25	0 (0)	25(100)
12	Yalova Tatlı	25	0 (0)	0 (0)
13	Y. Çarliston	25	0 (0)	1 (4)
14	C. Long Slim	25	0 (0)	0 (0)
TOPLAM		363	2 (0.5)	109(30)



Şekil 3.2 : Birinci deneme aşamasında elde edilen kalluslar. A-B: PAU-74 hattından elde edilen anterde androgenik kallus çıkışı. C: PAU- 207/3 Hattından elde edilen anterlerden gelişen somatik kalluslar D: PAU 71 hattından elde edilen anterlerden gelişen somatik kalluslar.

3.2 Deney-2' de Elde Edilen Sonuçlar

Bu denemede Haziran, Temmuz ve Ağustos 2011 dönemlerinde alınan anterler ve CP medyası kullanılmıştır. Toplam 1555 anter ekimi yapılmıştır. Bu anterlerden 897 tanesine sıcaklık ön uygulaması yapılmış ve % 2.6 oranında androgenik kallus elde edilmiştir. Ön uygulama yapılmayan 658 anterden % 4.2 oranında androgenik kallus elde edilmiştir. Bu denemede en yüksek androgenik yanıt kopya ve dolmalık tiplerinden alınmıştır. Tokat hatları dolmalık biber tipi PAU-71, PAU-72, PAU-73, PAU-74 genotiplerine ait anterlerde daha fazla gelişme görülmüştür. PAU-71 hattından elde edilen kalluslardan kök gelişmesinde olmuş fakat bitkiye dönüşmemiştir. İkinci denemede kullanılan, sıcaklık ön uygulaması yapılan ve yapılmayan genotiplerden ekilen anter sayıları ve deneme sonucunda elde edilen somatik ve androgenik kallus sayıları Tablo 3.7 ve Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7 :Deney – 2' de CP medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.

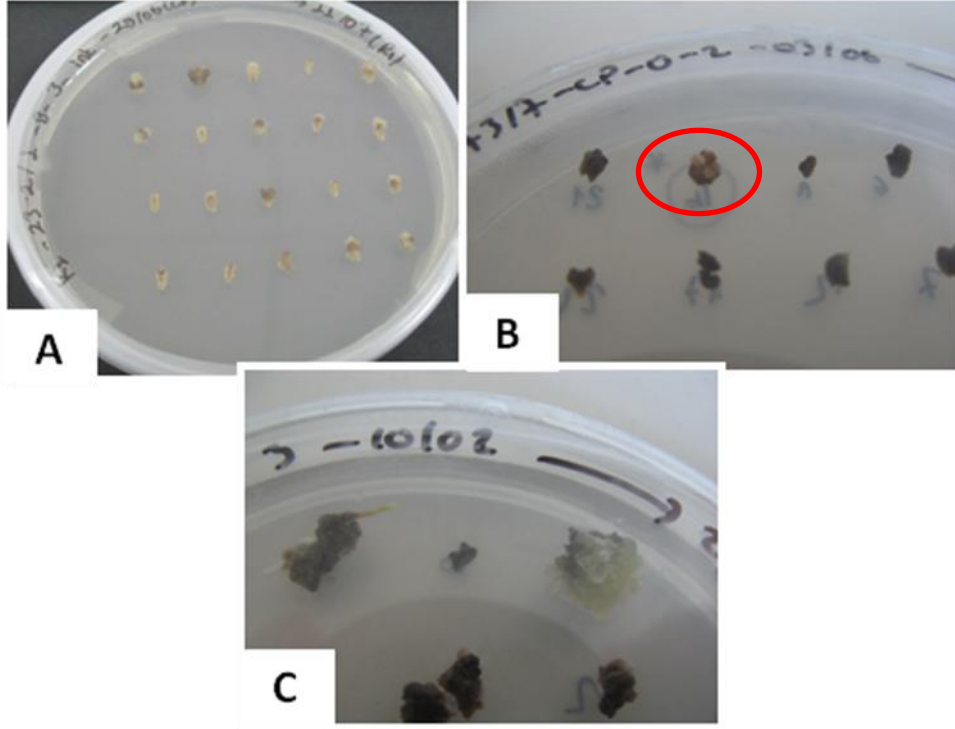
NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	ANDROGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
1	PAU-13-6	25	0 (0)	0 (0)
2	PAU-15	23	5 (21.7)	4(17.3)
3	PAU-18	17	0 (0)	0 (0)
4	PAU-23-2	35	0 (0)	9 (25.7)
5	PAU-36-5	23	0 (0)	3 (13.04)
6	PAU-54	25	0 (0)	0 (0)
7	PAU-55	69	0 (0)	16 (23.1)
8	PAU-57	24	0 (0)	5 (20,8)
9	PAU-59	25	0 (0)	13 (52)
10	PAU-63	25	0 (0)	0 (0)
11	PAU-64	25	0 (0)	0 (0)
12	PAU-67	18	1 (5.5)	2 (11)
14	PAU-71	90	4 (4.4)	18 (20)
15	PAU-72	52	1 (1.9)	8 (15.3)
16	PAU-73	22	1 (4.5)	6 (27)
17	PAU-74	70	1 (1.4)	4 (5.7)
19	PAU-101	24	0 (0)	0 (0)
20	PAU-102	25	3(12)	10 (40)
21	PAU-105	23	0 (0)	0 (0)
23	PAU-109	47	0 (0)	0 (0)
24	PAU-110	25	0 (0)	6 (24)
25	PAU-112	16	2 (12.5)	2 (12.5)
26	PAU-121	12	2 (16.6)	8 (66.6)
27	PAU-126	25	0 (0)	1 (4)

Tablo 3.7 (devamı)

NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	ANDROGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
28	PAU-207-3	50	0 (0)	11(22)
29	Sera Demre 8	25	0 (0)	0 (0)
30	Göktürk	4	0 (0)	1 (25)
31	Bingo Yağlık	34	0 (0)	1 (2.9)
32	Yalova Çarliston 341	4	0 (0)	0 (0)
33	Duru-34	15	4 (26)	0 (0)
TOPLAM		897	24 (2.6)	128 (14.2)

Tablo 3.8 :Deney – 2’de CP medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılmayan anterlerden elde edilen sonuçlar.

NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	ANDROGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
1	PAU-13-6	25	0 (0)	0 (0)
2	PAU-15	23	5 (21.7)	4(17.3)
3	PAU-18	7	0 (0)	0 (0)
4	PAU-23-2	20	0 (0)	0 (0)
5	PAU-57	25	0 (0)	0 (0)
6	PAU-59	25	0 (0)	0 (0)
7	PAU-63	24	0 (0)	0 (0)
8	PAU-65	49	0 (0)	0 (0)
9	PAU-67	25	0 (0)	0 (0)
10	PAU-71	43	7(16.2)	22 (51.1)
11	PAU-72	25	0 (0)	8 (32)
12	PAU-73	47	4 (8.5)	8(17)
13	PAU-74	50	2 (4)	17 (34)
14	PAU-83	19	0 (0)	0 (0)
15	PAU-101	15	0 (0)	0 (0)
16	PAU-102	25	0 (0)	21(84)
17	PAU-107	25	0 (0)	0 (0)
18	PAU-109	50	9 (18)	5 (10)
19	PAU-110	25	0 (0)	0 (0)
20	PAU-112	25	0 (0)	0 (0)
21	PAU-121	25	0 (0)	0 (0)
22	PAU-207-3	25	0 (0)	6(24)
23	Bingo Yağlık	11	1(9)	0 (0)
24	Duru-34	25	0 (0)	0 (0)
TOPLAM		658	28 (4.2)	91(13.8)



Şekil 3.3 :Deney – 2’ de elde edilen androgenik kallusların görüntüleri. A: Petri tabağında kallus oluşumu başlamış anterlerin genel görünümü B: PAU 73 hattından elde edilen anterde androgenik kallus çıkışı daire içerisinde gösterilmiştir. C: PAU 71 hattından elde edilen anterlerden androgenik kallus oluşumu.

3.3 Deney – 3’ te Elde Edilen Sonuçlar

Bu denemede Aralık 2011, Ocak, Şubat ve Mart 2012 dönemlerinde alınan anterler ve İM-1 ve İM-3 medyaları kullanılmıştır. Denemede 49 adet genotipten toplam 3875 anter ekilmiş ve bütün anterlere sıcaklık n uygulaması yapılmıştır. Yalnızca İM-3 medyasında PAU-126’dan % 2, PAU-127’den % 15, PAU-128’den % 7 oranlarında androgenik kallus elde edilmiştir. Kullanılan genotiplerden ekilen anter sayıları ve deneme sonucunda elde edilen somatik ve androgenik kallus sayıları Tablo 3.9 ve Tablo 3.10’da verilmiştir.

Tablo 3.9 :Deney – 3’te İM-1 medyasında sıcaklık n uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.

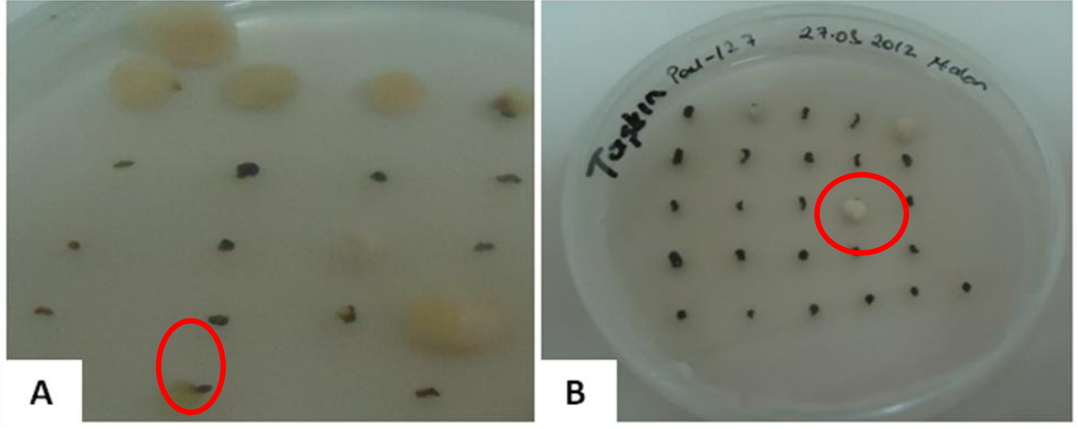
NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	ANDROGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
1	PAU-13-6	75	0 (0)	0 (0)
2	PAU-16	125	0 (0)	0 (0)
3	PAU-18	200	0 (0)	0 (0)
4	PAU-23	50	0 (0)	0 (0)
5	PAU-24-5	100	0 (0)	0 (0)
6	PAU-46-3	75	0 (0)	0 (0)
7	PAU-62	125	0 (0)	0 (0)
8	PAU-65	125	0 (0)	0 (0)
9	PAU-66-5	50	0 (0)	0 (0)
10	PAU-71	175	0 (0)	0 (0)
11	PAU-74	75	0 (0)	0 (0)
12	PAU-101-1	50	0 (0)	0 (0)
13	PAU-101-2	100	0 (0)	0 (0)
14	PAU-101-3	100	0 (0)	0 (0)
15	PAU-101-9	100	0 (0)	0 (0)
16	PAU-101-10	100	0 (0)	0 (0)
17	PAU-101-11	75	0 (0)	0 (0)
18	PAU-101-14	150	0 (0)	0 (0)
19	PAU-101-15	75	0 (0)	0 (0)
20	PAU-101-18	75	0 (0)	0 (0)
21	PAU-101-19	75	0 (0)	0 (0)
22	PAU-101-20	75	0 (0)	0 (0)
23	PAU-101-24	75	0 (0)	0 (0)
24	PAU-107	150	0 (0)	0 (0)
25	PAU-110	125	0 (0)	0 (0)
26	PAU-113	75	0 (0)	0 (0)
27	PAU-114	100	0 (0)	0 (0)
28	PAU-121	175	0 (0)	0 (0)
29	PAU-123-2	25	0 (0)	0 (0)
30	PAU-127-5	25	0 (0)	0 (0)
31	PAU-128-4	25	0 (0)	0 (0)
32	PAU-203-2	75	0 (0)	0 (0)

Tablo 3.9 (devamı)

NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	ANDROGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
33	PAU-211-6	50	0 (0)	0 (0)
34	PAU-214	100	0 (0)	0 (0)
35	PAU-216-1	100	0 (0)	0 (0)
36	PAU-216-1-9	75	0 (0)	0 (0)
37	PAU-216-5	100	0 (0)	0 (0)
38	PAU-220-6	25	0 (0)	0 (0)
39	PAU-228-5-4	25	0 (0)	0 (0)
TOPLAM		3475	0 (0)	0 (0)

Tablo 3.10 :Deney – 3’ te İM-3 medyasında sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden elde edilen sonuçlar.

NO	GENOTİP	EKİLEN ANTER SAYISI	ANDROGENİK KALLUS SAYISI (%)	SOMATİK KALLUS SAYISI (%)
1	PAU-101\23	50	0 (0)	0 (0)
2	PAU-123\2	25	0 (0)	0 (0)
3	PAU-126	50	2 (4)	0 (0)
4	PAU-127	100	15 (15)	0 (0)
5	PAU-128	100	7 (7)	0 (0)
6	PAU-129	25	0 (0)	0 (0)
7	PAU-228-5-4	50	0 (0)	0 (0)
TOPLAM		400	24 (6)	0 (0)



Şekil 3.4 : Üçüncü denemede kullanılan PAU-127 Genotipinden İM-3 medyasında elde edilen kallusların görüntüleri. A: 1 Mart 2012 de ekilen anterlerden elde edilen kalluslar androgenik kallus çıkışı daire içerisine alınmıştır. B: 27 Mart 2012 de ekilen anterlerden elde edilen kalluslar androgenik kallus çıkışı daire içerisine alınmıştır.

3.4 Flow Sitometri Analizi

Deneyle de kullanılan hatlardan elde edilen kallus dokularından elde edilen çekirdek DNA örnekleri ile flow sitometri analizi yapılmıştır. Bu hatlardan yalnızca PAU-59/5 hattından elde edilen kallusta haploid çekirdek DNA'sı (2.8 pg) tespit edilmiş, diğer hatlar anoploid, mixoploid olarak tespit edilmiştir. Kullanılan hatlar ve flow sitometri analiz sonucu Tablo 3.11'de gösterilmiştir.

Tablo 3.11 : Androgenik kallus örneklerinde yapılan flow sitometri analizi bulguları.

NO	GENOTİP	PLOİDİ SEVİYELERİ
1	PAU-59/5 ^a	Haploid (n)
2	PAU-66 ^b	Anöploid
3	PAU-73 ^b	Mixoploid
4	PAU-73 ^b	Mixoploid
5	PAU-74 ^b	Diploid (2n)
6	PAU-74 ^b	Diploid (2n)
7	PAU-112 ^a	Diploid (2n)
8	PAU-206/4 ^b	Poliploid
9	PAU-207/3 ^b	Mixoploid
10	PAU-221/1 ^b	Diploid (2n)
11	C. Wonder ^a	Anöploid

^aCP (Chambonet, 1988).

^bİM-3 (MS + 0.1mg / l 2,4-D, 0.2 mg / l Kinetin).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada Türkiyenin çeşitli bölgelerinden toplanarak karakterize edildikten sonra biber ıslah programına dahil edilen 73 ıslah hattı ve 11 standart ticari genotiplerin androgenesis potansiyeli araştırılmıştır. Yayınlanmış araştırmalara göre, medya kompozisyonu, ön uygulamalar, uyartım ve rejenerasyon uygulamaları ve çiçek tomurcuğu donorü bitkinin genotipi gibi faktörler androgenesis uyartımında önemli oldukları gösterilmiştir (Mityko ve ark., 1995; Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Koleva-Gudeva ve Spasenoski, 2001; Özkum ve Tıprıdamaz, 2002; Koleva-Gudeva, 2003; Ashok Kumar ve ark.,2003; Irikova ve ark., 2004; Rodeva ve ark., 2004). Bu çalışmada değişik medya kompozisyonları, ön uygulamalar ve farklı genotipler kullanılmıştır.

4.1 Farklı Medya Kompozisyonlarının Etkisi

Çalışmada MS ve CP ortamlarına farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda oksin ve sitokin gibi bitki büyüme düzenleyicileri eklenerek dört farklı indükleme medya kompozisyonu oluşturulmuştur. MS bazal medyası kullanılarak oluşturulan ortamlar İM-1, İM-2, ve İM-3 ortamlarıdır. İM-1 ortamında 0.004 mg/L 2,4-D ve 0.1 mg/L kinetin bulunmaktadır. İM-2 ortamında yalnızca 0.1 mg/L kinetin bulunmaktadır. İM-3 ortamında 0.1 mg/L BAP ve 4 mg/L NAA bulunmaktadır. Birinci deneyde kullanılan bütün genotiplerden bu üç farklı indükleme ortamına anter ekimi yapılmıştır. İM-3 ortamında % 0.5 oranında androgenik ve kallus elde edilmiştir. İM-1 ve İM-2 ortamlarında yalnızca somatik kallus gelişimi olmuştur. Ayrıca İM-3 ortamında anterler daha büyük kallus dokuları oluşturmuştur. İM-3 ortamı üçüncü deney aşamasında yeniden kullanılmış ve burada da % 6 oranında androgenik kallus elde edilmiştir. Bütün medyalarda kallusların gelişme yönü embriyoya dönmemiştir

Matsubara ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada MS bazal medyasında farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve kinetin kombinasyonlarını denemişlerdir. Hazırladıkları medyalarla California Wonder genotipi ile çalışmışlardır. Bizim çalışmamızda da

kullanılan İM-1 olarak adlandırılan MS + 0.004 mg /L 2,4-D + 0.1 mg/L kinetin ortamında Matsubara ve arkadaşları % 41.4 oranında androgenik embriyo elde etmişlerdir. Yine bizim çalışmamızda kullanılan İM-2 olarak adlandırılan MS + 0.1 mg/L kinetin ortamında % 8 oranında embriyo elde etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada İM-1 ortamında embriyo ve androgenik kallus elde edilememiştir. Bu ortam birinci deney aşamasında ve üçüncü deney aşamasında iki kere kullanılmıştır. Birinci deney aşamasında İM-1 ortamına toplam 917 adet anter ekilmiş ve % 5.3 oranında somatik kallus gelişimi olmuştur. Üçüncü deney aşamasında İM-1 ortamına toplam 3475 adet anter ekilmiş ve anterlerde yalnızca koyu kahverengi şeklinde renk değişimi gözlenmiş herhangi bir kallus oluşumu olmamıştır. Çalışmamızın 1. Deney aşamasında İM-2 medyasına ekilen anterlerden % 11.2 oranında somatik kallus elde edilmiştir.

Dumas de Valux ve ark. (1981) C ve R medyaları ve 0,001 mg/L kinetin ve 0.001 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarında bitki büyüme düzenleyicileri kullanarak yaptıkları çalışmada %5-40 oranında embriyo elde etmişlerdir. Kristiansen ve Andersen (1993) aynı medya ve bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları ile % 2.1 oranında embriyo elde etmişlerdir.

Elliältioğlu ve ark. (2001) yapmış oldukları çalışmada MS bazal medyası ve 4 mg/L NAA ve 0.1 mg/L BAP konsantrasyonlarında bitki büyüme düzenleyicilerini kullanarak hazırladıkları ortamda Kahramanmaraş biberleri genotiplerinin androgenesis potansiyellerini araştırmışlardır ve % 2.28 oranında embriyo elde etmişlerdir. Yine aynı ortamı kullanan Çömlekçioğlu ve ark. (2001) çalışmalarında embriyo elde edememişlerdir. Çağlar ve ark. (2004) MS bazal medyası ve oksinlerden NAA (2.0, 4.0, 6.0 mg/L) ve 2,4-D (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L) ile sitokininlerden BAP (0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L) ve kinetin (0.1, 1.0, 5.0 mg/L) bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarını ilave ederek hazırlanan ortamlarda yerli Kahramanmaraş biberlerini kullanmışlardır. MS + 0.1 mg/L BAP + 4 mg/L NAA + % 0.2 aktif karbon + 10 mg AgNO₃ kullanılan ortamda kallus oluşmadan % 2.8 oranında direk embriyo gelişimi elde etmişlerdir. Sayılır ve Özzambak (2002) çalışmalarında Ege Acı Sivri, Demre Sivrisi, Kandil Dolma, Çarliston Bağcı, Tatlı Sivri Kıl ve Acı Sivri Ilıca-256 genotiplerini kullanarak MS+ 4 mg/L NAA+ 0.1 mg/L BAP ortamına aktif kömür ekleyerek ve eklemeden anter kültürü çalışmaları yapmışlardır. Kömür eklenen ortamda Ege acı sivri genotipinde 52 anterden 6

kallus,1 embriyo, kömür eklenmemiş ortamda 25 kallus, 1 embriyo elde etmişlerdir. Diğer genotiplerde sadece kallus gelişimi olmuştur. Bizim çalışmamızda MS + 0.1 mg/L BAP + 4 mg/L NAA ortamı İM-3 olarak adlandırılarak kullanılmıştır. İM-3 ortamı hem birinci deney aşamasında hem de üçüncü deney aşamasında kullanılmıştır. Birinci deney aşamasında İM-3 ortamına ekilen anterlerden % 0.5 oranında androgenik kallus, % 22.5 oranında somatik kallus elde edilmiştir. Üçüncü deney aşamasında İM-3 ortamında ekilen anterlerde %6 oranında androgenik kallus elde edilmiştir. İM-3 ortamında oluşan kalluslar bizim çalışmamızda kullanılan diğer ortamlara göre daha hızlı gelişmiş ve daha büyük olmuşlardır. Ayrıca çalışmamızda İM-3 ortamının yüksek adrogenik yanıt oluşturduğu tespit edilmiştir.

Koleva-Gudeva (2006) biber anter kültürüne inkübasyon uygulamaları ve farklı medyaların etkisini araştıran bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında MS (Murashige ve Skoog, 1962), N (Nitch, 1969), LS (Linsmaer ve Skoog, 1965), NN (Nitch ve Nitch, 1969) ve CP (Dumas de Valux ve ark., 1981) medyalarını kullanmışlardır. MS ve CP ortamları diğer ortamlara göre daha başarılı olmuştur. Haploid embriyo gelişimini sadece CP ortamında elde etmişlerdir. Bu sonuç Dumas de Valux ve ark. (1981) ile uyumludur. CP ortamını geliştiren Dumas ve arkadaşları bu ortamda haploid embriyolar elde etmişlerdir. Bizim Çalışmamızda CP ortamı ikinci deney aşamasında kullanılmıştır. Toplam 1555 adet anter ekimi yapılmış, 52 adet yüzde olarak % 3.3 androgenik kallus, 219 adet yüzde olarak % 14 somatik kallus elde edilmiştir. Ayrıca elde edilen kalluslar ile flow sitometri analiz sonucuna göre de tek haploid doku CP ortamında gelişen anterlerde tespit edilmiştir. Nowaczyk ve ark. (2006) CP ortamına % 5 aktif kömür ve 5 mg/l AgNO₃ ekleyerek yaptıkları çalışmada % 4,1 oranında embriyo elde etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmaya göre içerisinde 4 mg/L NAA, ve 0.1 mg/L BAP olan İM-3 medyası ve CP diğer medyalara göre daha yüksek oranda androgenik kallusun oluşmasına olanak sağlamıştır.

4.2 Yapılan Ön Uygulamaların Etkisi

Çalışma da kültüre alınan anterlerin bir kısmına ilk sekiz gün 35° C’ de karanlık, bir kısmına 25° C’de karanlık şeklinde iki farklı ön uygulama yapılmıştır. İlk sekiz günden sonra anterler normal büyütme koşullarında bulunan büyütme odasına alınmıştır.

Kurutmalık kırmızı biberlerde androgenesis yoluyla *in vitro* haploid embriyo uyarımı adlı çalışmalarında Çağlar ve ark. (2004) yerli Kahramanmaraş biberlerini kullanmıştır. Anterler MS bazal medyası ve oksinlerden NAA (2.0, 4.0, 6.0 mg/l) ve 2,4-D (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L) ile sitokininlerden BAP (0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L) ve kinetin (0.1, 1.0, 5.0 mg/L) bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarını ilave ederek hazırlanan medya ya ekilmiştir. Kültüre alınan anterlere ilk yedi gün 4° C, 29° C ve 35° C karanlıkta 3 farklı sıcaklık ön uygulaması yapılmıştır. Bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları ve sıcaklık uygulamaları ile toplam 37 uygulama yapmışlar ve yalnızca bazı genotiplerde kallus gelişimi olmuştur. Bizim çalışmamızda kullanılan Kahramanmaraş biberlerinden (PAU-64, PAU-65, PAU-66, PAU-68, PAU-69) PAU-66 (bkz. Tablo 2.1) genotipi çalışmada kullanılan aynı ortamda (İM-3) yalnızca 35°C de ön uygulama yapılan anterlerde % 17 oranında somatik kallus oluşturmuştur.

Koleva-Gudeva (2006) biber anter kültürüne inkübasyon uygulamaları ve farklı medyaların etkisini araştıran bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında farklı medyalar olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962), N (Nitch, 1969), LS (Linsmaer ve Skoog, 1965), NN (Nitch ve Nitch, 1969) ve CP (Dumas de Valux ve ark., 1981) ortamlarını kullanmışlardır. Dokuz farklı biber genotipden alınan anterlere 7° C, 25° C ve 35° C farklı sıcaklıkta inkübasyon uygulamaları denenmişlerdir. MS ortamında 25° C’ de kallus ve CP ortamında 35° C’ de embriyo elde etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda birinci deney aşamasında 25° C’de 807 adet anter ekilmiş 2 adet androgenik kallus, 53 adet somatik kallus elde edilmiştir. 35° C’de 1295 adet anter ekilmiş ve 110 adet somatik kallus elde edilmiştir. İkinci deney aşamasında 25° C’ de 658 adet anter ekilmiş ve 28 adet androgenik kallus, 91 adet somatik kallus elde edilmiştir. 35° C’de 897 adet anter ekilmiş ve 24 adet androgenik kallus, 128 adet somatik kallus elde edilmiştir. Üçüncü deney aşamasında bütün anterlere 35° C’de sıcaklık ön uygulaması yapılmış 3875 adet anter ekilmiş ve 24 adet androgenik

kallus elde edilmiştir. Bütün aşamalarda 35° C’de sıcaklık ön uygulaması yapılan anterlerden daha büyük kalluslar elde edilmiştir. Literatürde de belirtildiği gibi sıcaklık ön uygulamasının anter kültüründe olumlu etki yaptığı tespit edilmiştir.

4.3 Genotip Etkisi

Anter kültüründe genotip etkisi önemli bir yere sahiptir. Literatürde çalışılan Endonezya biberleri, Avrupa biberleri bizimde kullandığımız medya ve uygulamalara embriyo şeklinde cevap verirken bizim çalışmamızda kullanılan 81 adet Türk biberleri genotipleri kallus olarak cevap vermiştir. Elde edilen kallusların bir kısmında kök benzeri gelişmeler olsada bitkiye dönüşmemiştir.

Matsubara ve ark. (1992)’ de yaptıkları çalışmada California Wonder genotipini kullanmışlar ve MS + 0.004 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L kinetin ortamında % 12.2 oranında embriyo elde etmişlerdir. Bizim Çalışmamızda aynı ortamda % 16 oranında somatik kallus elde edilmiştir. Matsubara ve ark. (1992) yine aynı çalışmada kullanılan MS + 0.1 mg/L Kinetin ortamında California Wonder genotipinden % 26.3 oranında embriyo elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılan aynı ortamda California Wonder genotipinden elde edilen anterlerde yalnızca renk değişimi gözlenmiştir.

Kahramanmaraş biberi genotipleri ile çalışan Çağlar ve ark. (2004) bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları ve sıcaklık uygulamaları ile toplam 37 uygulamayı yapmışlar ve MS + 0.1 mg/L BAP + 4 mg/L NAA + % 0.2 aktif karbon + 10 mg AgNO₃ kullanılan ortamda kallus oluşmadan % 2.8 oranında direk embriyo gelişimi elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılan Kahramanmaraş biberlerinden (PAU-64, PAU-65, PAU-66, PAU-68, PAU-69) PAU-66 (bkz. Tablo 2.1) genotipi çalışmada kullanılan aynı ortamda (İM-3) yalnızca 35° C de ön uygulama yapılan anterlerde % 17 oranında somatik kallus oluşturmuştur. MS bazal medyaly diğer ortamlarda da (İM-1, İM-2) Kahramanmaraş genotiplerinde kallus ya da embriyo gelişimi olmamıştır. Bu genotiplerden ekilen anterlerde yalnızca anterlerde renk değişimi gözlenmiştir.

Sayılr ve Özzambak (2002) çalışmalarında Ege Acı Sivri, Demre Sivrisi, Kandil Dolma, Çarliston Bağcı, Tatlı Sivri Kıl ve Acı Sivri Ilıca-256 genotiplerini kullanarak anter kültürü çalışmaları yapmışlardır. MS+ 4 mg/L NAA+ 0.1 mg/L BAP ortamına % 0.1 aktif kömür ekleyerek ve eklemeyen kullanmışlardır. Kömür eklenen ortamda Ege

acı sivri genotipinde 52 anterden 6 kallus,1 embriyo, kömür eklenmemiş ortamda 25 kallus, 1 embriyo elde etmişlerdir. Diğer genotiplerde sadece kallus gelişimi olmuştur. Bizimde çalışmamızda kullanılan standart hatlarda İM-3 ortamında yalnızca anterlerde renk değişimi şeklinde değişme gözlenmiştir.

Koleva-Gudeva (2006) biber anter kültürüne inkübasyon uygulamaları ve farklı medyaların etkisini araştıran bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında MS (Murashige ve Skoog, 1962), N (Nitch, 1969), LS (Linsmaer ve Skoog, 1965), NN (Nitch ve Nitch, 1969) ve CP (Dumas de Valux ve ark., 1981) medyalarını kullanmışlardır. Dokuz farklı biber genotipden alınan anterlere 7 ° C, 25° C ve 35° C de farklı sıcaklıkta inkübasyonlar denenmiştir. Bu çalışmada kullanılan California Wonder genotipi 25° C’de, MS ortamında % 30,6 oranında yüksek kallus oluşumu olduğunu göstermişlerdir. California Wonder genotipi bu çalışmada deney-1 de MS bazal medyalı İM-1 (bkz. Tablo 2.2) ve İM-2 (bkz. Tablo 2.2) medyalarında kullanılmıştır. İM-1 medyasında 25° C’de California Wonder genotipinden alınan anterlerden % 13 oranında somatik kallus oluşumu olmuştur. Ön uygulama yapılan anterlerden ise % 4 somatik kallus gelişimi olmuştur. İM-2 medyasında 25° C’de % 6 oranında kallus gelişimi olmuştur. Yine aynı çalışmada kullanılan CP ortamında 35° C’de kullandıkları dokuz genotipten dördü hiçbir yanıt vermemiştir. CP ortamında en iyi androgenik yanıt veren genotipler % 33.6 oranı ile Féherözön (Macar tatlı dolmalık tipi) ve % 6.66 oranı ile California Wonder olmuştur. Bizim Çalışmamızda da CP ortamında PAU-109 dan sonra en çok kallus oluşturan genotipler dolmalık tipi dediğimiz Tokat hatları (PAU-71, PAU-72, PAU-73, PAU-74) ve yine dolmalık tipi ticari hatlardan Duru-34 olmuştur. Ön uygulama yapılan anterlerde PAU-71 hattında % 4,4 androgenik kallus, % 20 somatik kallus, PAU-72 hattında % 1,9 androgenik kallus, % 15,32 somatik kallus, PAU-73 hattında % 4,5 androgenik kallus, % 27 somatik kallus, PAU-74 hattından % 1,4 androgenik kallus, % 5,7 somatik kallus, Duru-34 hattında % 26 androgenik kallus oluşmuştur. 25° C’de sıcaklık ön uygulama yapılmayan anterler de PAU-71 hattında % 16,4 androgenik kallus, % 51,16 somatik kallus, PAU-72 hattında % 32 somatik kallus, PAU-73 hattında % 8,5 androgenik kallus, % 17 somatik kallus, PAU-74 hattında % 4 androgenik kallus, % 34 somatik kallus oluşmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Üç deneme şeklinde yapılan çalışmada birinci deney aşamasında kullanılan medyalar İM-1, İM-2, İM-3 (bkz. Tablo 2.2)'da 35° C'de ön uygulama yapılan ve yapılmayan anterlerden embriyo gelişimi olmamıştır. Androgenik kallus gelişimi de yalnızca sıcaklık ön uygulaması yapılmayan İM-3 ortamında kültüre alınan PAU-74 hattından alınan anterlerde % 5.7 oranında olmuştur. Androgenik kallus embriyoya dönüşmemiş kallus olarak büyüme göstermiştir.

İkinci deney aşamasında kullanılan CP (bkz. Tablo 2.3) ortamında 35° C'de sıcaklık ön uygulaması yapılan anterler arasında PAU-15 hattından % 21.7 androgenik kallus, PAU-67 hattından % 5.5 androgenik kallus, PAU-71 hattından % 4.4 androgenik kallus, PAU-72 hattından % 1.9 androgenik kallus, PAU-73 hattından % 4.5 androgenik kallus, PAU-74 hattından % 1.4 androgenik kallus, *C.baccatum* türü olan PAU-102 hattından % 12 androgenik kallus, PAU-121 hattından % 16.6 androgenik kallus, Duru-34 hattından % 26 androgenik kallus elde edilmiştir. Sıcaklık ön uygulaması yapılmayan doğrudan 25/17° C iklim koşullarında inkübe edilen anterlerde; PAU-15 hattından % 21.7 androgenik kallus, PAU-71 hattından % 16.2 androgenik kallus, PAU-73 hattından % 8.5 androgenik kallus, PAU-74 hattından % 4 androgenik kallus, PAU-109 hattından % 18 androgenik kallus ve Bingo Yağlık hattından % 9 oranında androgenik kallus elde edilmiştir.

Üçüncü aşamada kullanılan İM-1 ve İM-3 ortamlarından yalnızca İM-3 ortamında PAU-126 hattından % 2 androgenik kallus, PAU-127 hattından % 15 androgenik kallus, PAU-128 hattından % 7 androgenik kallus elde edilmiştir.

Anter kültürü için kullanılan bütün biber hatları içerisinde Tokat Biberi dediğimiz dolmalık tipi benzeri PAU-71, PAU-72, PAU-73, PAU-74 hatları kullanılan medya ortamlarında hem androgenik hem de somatik kalluslar oluşturmuşlardır. Bu hatların uygun prosedür ve medya kullanıldığında ve uygun anter gelişim aşaması yakalandığında androgenik yanıt verme olasılığı diğer yerli genotiplere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada oluşan kallusların embriyoya dönüşmemesinin nedeni Irikova ve ark. (2010) yayınlarında göre belirttikleri gibi

genotipik farklılıklardan ve uygun anter gelişim evresinin yakalanmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen kallusların flow sitometri analizi sonucu anöplöid kromozom yapısında olması ve belirli bir kromozom stabilitesinin sağlanamamasından dolayı kallustan bitki rejenerasyonu olmadığı düşünülmektedir.

Çalışmada en yüksek androgenik yanıtı CP medyasında kale biberi tipi PAU-15 (%21.7) ile salçalık biber tipi PAU-109 (%18) genotipleri vermiştir. Genel olarak ise dolmalık biber tipleri ve kopya tiplerinin anter kültüründe androgenik yanıt verme oranı diğer tiplere göre daha yüksektir.

Bitkilerden elde edilen anterlerin en verimli döneminin Mart-Nisan-Mayıs-Haziran dönemi olduğu görülmüştür. ileride yapılacak çalışmada anterlerin bu dönemde alınması daha verimli sonuçlar verecektir. Türk hatlarının genotipik farklılığında göz önünde bulundurularak yapılan anter kültüründe sağlıklı embriyolar elde etmek için anterlerin gelişim evreleri çok iyi kontrol edilmeli ve anterler uygun evrede alınıp ekimi yapılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Abak, K.**, (1983). Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırma. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı. Cilt: 33, Fasikül 1-2-3-4'den ayrı basım, 155-163
- Andrews, J.**, (1985). Peppers. The Domesticated Capsicum. University. of Texas Pres, Box 7819 Austin, Texas 78713.
- Andrews, J.**, (1999). The Pepper Trail, History and Recipes from Around the World, University of North Texas Pres, Denton, TX, USA.
- Arumuganathan K, Earle ED**, (1991a). Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Biol Rep 9:208–218
- Arumuganathan K, Earle ED**, (1991b). Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Mol Biol Rep 9:229– 241
- Barany, I, Gonzalez-Melendi, P., Fadon, B., Mitykot, J., Risueno, M.C., Testillano P.S.**, (2005). Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annum* L.) subcellular rearrangements through development, Biol Cell, 97:709-722.
- Bajaj, Y.P.S.**, (1983). In vitro production of haploids. In: Handbook of Plant Cell Culture (eds: Evans, D.A., Sahrp, W.R., Ammirato, P.V., Yamada, Y.). Macmillan Publishing Company, Vol. 1., Chapter 6: 228-287.
- Bajaj, Y.P.S.**, (1990). Haploids in crop improvement. I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol: 12, Berlin, Germany; Springer-Verlag.
- Bino, R.J., Devries, J.N., Kraak, H.L. & Van Pijlen, J.G.**, (1992). Flow cytometric determination of nuclear replication stages in tomato seeds during priming and germination. Ann. Bot. 69, 231–236.
- Bourgin JP, Nitsch JP.**, (1967). Obtention de Nicotiana haploides a partir de' etamines cultivees in vitro. Ann. Phyiol. Veget., 9:377-382
- Büyükalaca, S.**, (1993). Somatic embryogenesis of *Capsicum annuum* L. (Sweet pepper). Doctor of Phil. Thesis, Unv. of Manchester, Fac. of Technology, Dept. of Chemical Engineering,265.
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu, N., Abak, K., Ekbiç, E., and Kılınç, N.**, (2004). Effect of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. Europ. J. Hort. Sci., 69 (5):206-209.
- Chambonet, D.**, (1988). Production of haploid pepper plants. Bulletin interne de la station d'Amelioration des Plantes Maraicheres d'Avignon-Montfavet, France, 1-10.
- Çiner, D. ve Tıprıdamaz, R.**, (2002). The effects of cold treatment and charcoal on the in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). Turkish Journal of Botany, 26:131-

- Çömlekçiöğlu, N., Büyükalaca, S., ve Abak, K.,** (1999). Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber popülasyonlarında anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etme olanakları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ankara, 897-900.
- Çömlekçiöğlu, N.,** (2001). Güneydoğu Anadolu Biber Popülasyonlarını Dihaploidizasyon Yöntemiyle Islahı ve Geleneksel Yöntemlerle Karşılaştırılması. Ç. Ü. Fen B. Enst. (Doktora Tezi), Adana.
- Davies PA, Morton S** (1998). A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. Plant Cell Rep 17(3):206–210. doi:10.1007/s00299 0050379
- Dolcet-Sanjuan, R., E. Claveria, and A. Huerta,** (1997). Androgenesis *Capsicum annuum* L.- Effects of Carbon Dioxide Enrichment. J.Amer. Soc.Hort. Sci.122(4):468-475
- Dumas De Vaulx, R., Chambonet, D., and Sibi, M.,** (1981). Culture in vitro d'antheres de piment (*Capsicum annuum* L.): amelioration des taux d'obtention de plantes chez differents genotypes par de traitements A+35°C. Agronomie, 11:859.
- Dunwell, J.M.,** (1981). Influence of genotype and environment on growth of barley embryos in vitro. Ann. Bot, 48:535-542.
- Ellialtıöğlu, Ş., Tıpırdamaz, R.,** (1997). Soğuk uygulamaları ve aktif kömürün patlıcan ve biberde *in vitro* androgenesis üzerine etkileri, TÜBİTAK-TOGTAG 87 No'lu proje Sonuç Raporu, 70 s. Ankara.
- Ellialtıöğlu, Ş. , Sarı, N., Abak, K.** (2000). Haploid Bitki Üretimi, Bitki Biyoteknolojisi – Doku Kültürü ve Uygulamaları, Cilt:I, (Ed: Babaoğlu, M., Özcan , S., Gürel, E.), Selçuk Üniversitesi Basımevi, s:137-189.
- Ellialtıöğlu, Ş., Kaplan, F., and Abak, K.** (2001). The effect of carrot extract and activated charcoal on the androgenesis of pepper. XIth EUCARPIA Meeting on Genetic and Breeding of Capsicum and Eggplant, Antalya-Turkey, 142-145
- Ercan, N., Boyacı, F., ve Ayar, F.,** (2001). Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine farklı besin ortamlarının etkisi. GAP II. Tarım Kongresi, 24-26 Ekim, Şanlıurfa, Cilt 1,121-128.
- FAO 2010,** Faostat database (2010).
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151± 158.
- George L, Narayanaswamy S,** (1973). Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. Protoplasma 78: 467–470.
- Greenleaf, W.H.,** (1986). Pepper Breeding. Breeding Vegetable Crops. A.V.I., 67-127.
- Guha, S., Maheshwari, S.C.,** (1966), Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature, 212:97.

- Günay, A.**, (1981). Serler. Özel Sebze Yetiştiriciliği. Cilt II Çag Matbaası, Ankara,323s.
- Goodsell S.F.** (1961). Male sterility in corn by androgenesis. *Crop. Sci.* 1:227–228.
- Heiser, C.B.JR.**, (1976). Peppers, In *Evolution of Crop Plants*. (Edited by N. W. Simmonds, 1986). Longman Sci.& Tech. Report, 265-268.
- IBPGR**, (1983). Genetic resources of *Capsicum*, IBPGR Secretariat, Rome, 49.
- Johansson, L.**, (1983). Effects of activated carbon in anther cultures. *Physiol Plant*, 59:397-403.
- Kaloo, D.**, (1986). Vegetable Breeding Volume III. CRC Press. Inc. Boca raton, Florida, 136-140
- Kim, M., Jang, I., Kim, J., Park, E., Yoon, M., Lee, Y.**, (2008): Embriyogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annum* L.) through isolated microspore culture, *Plant Cell Rep*, 27:425-434.
- Koleva – Gudeva LR, Spasenovski M, Trajkova F** (2007). Somatic embryogenesis in pepper andher culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horti* 2:114-119
- Kristiansen, K., and Andersen, B.**, (1993). Effect of donor plant temperature, photoperiod and age on anther culture response of *Capsicum annum* L. *Euphitica* 67:105-109.,
- Linsmaier, E. M.; Skoog, F.** (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 18:100±127.
- Matsubara S, Hu K, and Murakami K.** (1992). Embryoid and callus formation from pollen grains of eggplant and pepper by anther culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 61: 69–77.
- Mityko J., Andrasfalvy, A., Csillery, G., and Fari, M.**, (1995). Anther culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Breeding*, 114:78-80.
- Morrison, R.A., Köning, R.E, Evans, D.A.**, (1986). Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*, *J. Plant Physiol.*, 1:1-9.
- Murashige, T., and Skoog, F.**, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassy with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-497.
- Murch, S.J., Ragone, D., Shi, W.L., Alan, A.R. & Saxena, P.K.** (2006). In vitro conservation and sustained production of breadfruit (*Artocarpus altilis*, *Moraceae*): Modern technologies to improve distribution of a traditional tropical crop. *Naturwissenschaften* in press.
- Nitsch,J.P. and C. Nitsch**, (1969). Haploids Plants from Pgrains. *Science* 163:85-87.
- Nowaczyk P, Kisiala A, Olszewska D** (2006). Induced androgenesis of *Capsicum rutescens* L. *Acta Physiol Plant* 1: 523-527
- Nowaczyk P, Olszewska D, Kisiala A** (2009). Individual reaction of *Capsicum* F2 genotypes in anther cultures. *Euphytica* 168:225-233

- Pierik, R.L.M.**, (1989).. In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, 344 p.
- Pickersgill B** (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. Euphytica 96:129-133
- Pochard, E., Dumas De Vault, R.**, (1979). Haploid parthenogenesis in *Capsicum annum* L. Reprinted from the biology and taxonomy of the *Solanaceae* (eds: Hawkins, G., Lester, Shelding, A.D.). Linnean Society Symp., Series No: 7, 455-472.
- Rashid, A. and J. Reinert.** (1981). In vitro differentiation of embryogenic pollen, control by cold treatment and embryo formation in ab initio pollen cultures of *Nicotiana tobacum* var. *badischer bueley*. Protoplasma 109 : 285-294.
- Sayılır, A., ve Özzambak, E.**, (2002). Biber anter kültüründe uygun tomurcuk büyüklüğü tespiti ile besin ortamları karışımlarının ve soğuk uygulama sürelerinin embriyo verimine etkisi üzerine bir araştırma. IV. Sebze Tarımı Sempozyumu, Bursa.
- Sauton, A.**, (1987). Obtention of Embryo and Plants from In Vitro Culture of Fertilized Ovules of *Cucumis melo* 5 Days After Pollination. *Cucurbits Genetics Cooperative Rep.*,10: 62-63.
- Sibi, M., Vault D.R., and Chambonet, D.**, (1979). Obtention de plantes haploides par androgenèse in vitro chez le Piment (*Capsicum annuum* L.). Ann Amel Plantes, 29: 583-606.
- Sunderland, N., Roberts, M.**, (1979). Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anther, Ann. Bot., 43:405-414.
- Supena, E.D.J., Shuharsono, 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 annum* L.), Plant Cell Rep, 25:1-10.
- Subrahmanyam N.C., Kasha K.J.** (1973). Crop Sci., 13, 749-750.
- Spory SK, Jakobson E, Wenzel G** (1978) Production of monoploid embryos and plantlets in cultured anthers of *solanum tuberosum*, Plant. Sci. Lett. 12:47-54
- Terzioğlu, Ş., Ş. Ellialtıoğlu ve K. Abak**, (2000). İnkübasyon Koşullarının Biber Anter Kültüründe Embriyo Oluşumu üzerine Etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu. 11-13 Eylül, Isparta. s:233-238.
- Tıprıdamaz, R., Ellialtıoğlu, Ş.**, (2002). Soğuk uygulamaları ve aktif kömürü biberde (*Capsicum annum* L.) anter Kültürü Süresince Absizik Asit Miktarındaki Değişim Üzerine Etkisi, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt: 15, Sayı:1, 9-18.
- Tuberosa, R., Sanguinetti, M. C., Conti, S.** (1987). Anther culture of eggplant (*Solanum melongena* L.) lines and hybrids, Genetica Agraria, 41, 267-274.
- Turcotte, E. L. and C. V. Feaster.** (1969). Semigametic production of haploids in Pima cotton. Crop Sci. 9:653-655.

- Vaulx, D.R., Chambonet, D., and Pochard, E.**, (1981). Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à +35°C. *Agronomie*, 1:859-864
- Vural, H., Eşiyok, D. ve Duman, İ.**, (2000). Kültür Sebzeleri (Sebzem Yetiştirme). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bornova, İzmir, 440 s.
- Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C. and Chien, N.J.**, (1973). The induction of pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. *Sci. Sin* 16: 147-151.
- Wenzel, G.**, (1985). Strategies in unconventional breeding for disease resistance. *Ann. Rev. Phytopat.*, 23: 149-172.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Fatma Nur KAPLAN

Doğum Yeri ve Tarihi: DENİZLİ - 19.03.1987

Adres: Zeytinköy mahallesi Barboros Bulvarı Koru Sitesi NO:69 C Blok Kat:5
Daire:9 Bağbaşı / DENİZLİ

Lisans Üniversitesi: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yayın Listesi:

- **F.N. Kaplan**, A.R. Alan, Production of haploid and double haploid plants from three solanum species. Secondary Metabolites- ISSMET 2011 Symposium September 12-15, 2011 / Denizli, Turkey
- K. E. Özdemir, N. Alan, **F. N. Kaplan**, A.R Alan, Evaluation of Turkish eggplant (*Solanum melongena* L.) breeding materials for androgenesis response. . Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium April 12-14 2012 Kayseri, Turkey