



**GENOTİP, BESİN ORTAMI VE STRES
UYGULAMALARININ BİBERDE
ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ**

BÜŞRA ÖZSOY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI**

Prof.Dr. Naif GEBOLOĞLU

**2019
Her hakkı saklıdır**

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GENOTİP, BESİN ORTAMI VE STRES UYGULAMALARININ
BİBERDE ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

BÜŞRA ÖZSOY

TOKAT

Nisan- 2019

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

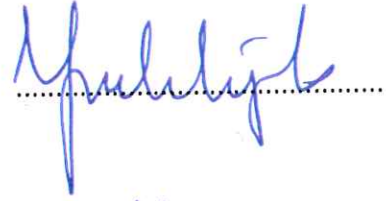
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2017/104 nolu proje ile desteklenmiştir.

BÜŞRA ÖZSOY tarafından hazırlanan “Genotip, Besin Ortamı ve Stres Uygulamalarının Biberde Androgenesis Üzerine Etkileri” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 2 NİSAN 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

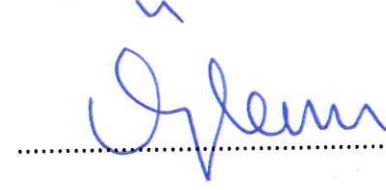
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
PROF.DR. NAİF GEBOLOĞLU



Üye
DR. ÖGR. ÜYESİ ÖZLEM ALTUNTAŞ
MALATYA TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ



Üye
DR. ÖGR. ÜYESİ YASİN BEDRETTİN KARAN
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ



ONAY


Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
22/04/2019

TEZ BEYANI

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

BÜŞRA ÖZSOY

Nisan, 2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GENOTİP, BESİN ORTAMI VE STRES UYGULAMALARININ BİBERDE ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

BÜŞRA ÖZSOY

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. NAİF GEBOLOĞLU

Anter kültürü biber ıslahında %100 homozigot hatların elde edilmesinde kullanılan önemli bir tekniktir. Biberde anter kültüründe başarı üzerine genotip, besin ortamı, ön uygulamalar ve inkübasyon koşulları gibi birçok faktör etkilidir. Bu çalışmanın amacı biberde anter kültürünün başarısı üzerine genotip, besin ortamı düşük sıcaklık uygulamasının etkilerinin belirlenmesidir. Denemede 4 hibrit biber çeşidi (İstek F₁-dolma biber, Balca F₁-uzun Demre tipi, Alkırımı F₁-kapyra tipi biber ve Hızır F₁-Çarliston biber tipi) donör bitki olarak kullanılmıştır. Anter kültüründe Dumas de Vault ve ark. (1981) (DDVX), Murashige ve Skoog (1962) (MS) ve Gamborg ve ark. (1968) (B5) tarafından önerilen protokoller 0.03 mg.l⁻¹ vitamin B₁₂, %0.8 (w/v) agar ve %6 (w/v) sucrose ilave edilerek kullanılmıştır. Çiçek tomurcuklarına 24 ve 48 saat süreyle 4 ve 10 °C soğuk şoku uygulanmıştır. Soğuk şoku uygulanmayan tomurcuklar kontrol olarak kullanılmıştır. Denemede embriyo oluşumu ile bitkicik ve haploid bitki rejenerasyonu değerlendirilmiştir. En yüksek embriyo oluşumu ile bitkicik ve haploid bitki rejenerasyonu İstek F₁ genotipinden elde edilmiştir (900 anterden 401 embriyo, 192 bitkicik ve 84 haploid bitki). Bütün genotipler için embriyo ve haploid bitki oluşumunda DDVX ve MS protokolleri B5 protokolünden daha etkili olmuştur. En yüksek embriyo oluşumu (60 anterden) İstek F₁ için 57 (DDVX, 10 °C-24 h), Balca F₁ için 21 (MS, 10 °C-24 h), Alkırımı F₁ için 28 (DDVX, 4 °C-48 h) ve Hızır F₁ için 14 (B5, 10 °C-48 h) olmuştur. Sonuç olarak, genotiplerin androgenik performansları besin ortamlarına ve ön uygulamalara göre değişmiştir. Biberde anter kültürü için soğuk şoku uygulamasının önemli bir faktör olduğu değerlendirilmiştir.

2019, 66 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Anter kültürü, Stres, Genotip, Embriyo, Haploid bitki

ABSTRACT

MASTER THESIS

EFFECTS OF GENOTYPE, NUTRIENT MEDIA AND STRESS TREATMENTS ON ANDROGENESIS IN PEPPER

BÜŞRA ÖZSOY

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

DEPARTMENT OF HORTICULTURE

SUPERVISOR: PROF.DR. NAİF GEBOLOĞLU

Antherculture is an important technique to obtain full homozygous lines in pepper breeding. Various factors such as genotype, nutrient media, pretreatments, incubation condition and plant growth regulator are effective on anther culture success of pepper. The aim of this study was to evaluate the effect of genotype, nutrient media and cold pretreatment on androgenic responses in pepper. Four pepper hybrid cultivars (İstek F₁-bellpepper, Balca F₁-long Demre type, Alkırımız F₁-capia pepper type and Hızır F₁-Charlston pepper type) were used as donor plants. Antherculture was performed according to Dumas de Vaulx et al. (1981) (DDVX), Murashige and Skoog (1962) (MS) and Gamborg et al. (1968) (B5) supplemented with 0,03 mg.l⁻¹ vitamine B₁₂, 0.8% (w/v) agar and 6% (w/v) sucrose. Flower buds were exposed to 4 and 10 °C cold shock for 24 and 48 hours. Buds untreated with cold shock were used as control treatment. In the study, embryo formation, plantlet and haploid plant regeneration were evaluated. Androgenic responses changed according to genotypes. The highest embryo, plantlet and haploid plant regenerated from İstek F₁ genotype (401 embryos, 192 plantlet and 84 haploid plants from 900 anthers). For all genotypes tested, DDVX and MS protocol promoted more embryo and haploid plant than B5 protocol. Cold shock treatments had a greater effect than control on androgenic success. The highest embryo formation from 60 anthers was 57 for İstek F₁ (DDVX, 10 °C-24 h), 21 for Balca F₁ (MS, 10 °C-24 h), 28 for Alkırımız F₁ (DDVX, 4 °C-48 h) and 14 for Hızır F₁ (B5, 10 °C-48 h). As a result, androgenic performance of genotypes changed according to nutrient media and pretreatments. Cold shock treatment was evaluated as an important factor for antherculture in pepper.

2019, 66 PAGE

KEYWORDS: Antherculture, Stress, Genotyp, Embryo, Haploid plant

ÖNSÖZ

Biber sebze türleri arasında anter kültürüne yanıt veren başarılı türlerden biridir. Biber ıslahında homozigot saf hatların elde edilmesinde anter kültürü önemli tekniklerden biri olmuştur. Bununla beraber halen daha istenen başarı oranları yakalanamamıştır. Bunun değişik nedenleri olmakla beraber genotiplerin uygulamalara göre farklı tepkiler göstermesi en önemli neden olarak görülmektedir. Dolayısıyla anter kültürü çalışmasına alınan her yeni genotipte başarı düzeyi farklı olmaktadır. Bu tez çalışmamda biberde değişik genotiplerin androgenik başarısı üzerine farklı besin ortamlarının ve çiçek tomurcuklarına ön soğuk uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Tez çalışmamın ülkemize ve bilim dünyasına yararlı olmasını temenni ederim.

Tez çalışmamda ilgi ve desteğini esirgemeyip, değerli bilgilerini aktaran saygı değer hocam Prof. Dr. Naif GEBOLOĞLU'na ve çalışmaların yürütülmesi sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Sevtap DOKSÖZ BONCUKCU'ya teşekkür ederim. Girdiğim her yolda maddi ve manevi olarak yanımda olan aileme, çalışmalarım boyunca desteğini ve yardımını hiç esirgemeyen ve sonsuz sabrı ile beni destekleyen eşim Ziraat Yüksek Mühendisi Ahmet ÖZSOY'a yürekten teşekkürler.

BÜŞRA ÖZSOY

Nisan, 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Haploid Bitkilerin Önemi ve Oluşum Yolları.....	7
2.2. Anter Kültürü (Androgenesis).....	9
2.3. Biberde Androgenik Başarı Üzerine Genotipin Etkisi.....	10
2.4. Androgenik Başarıda Donör Bitkinin Yaşı ve Yetiştirme Koşullarının Etkisi.....	11
2.5. Anter Geliştirme Döneminin Biberde Androgenik Başarıya Etkisi.....	12
2.6. Biberde Stres ve İnkübasyon Uygulamalarının Androgenik Başarıya Etkisi.....	13
2.7. Biberde Temel Besi Ortamları ve Bileşimlerinin Androgenik Başarıya Etkileri.....	15
2.8. Biberde İnkübasyon Koşullarının Androgenik Başarıya Etkisi.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Donör Bitkiler ve Özellikleri.....	19
3.1.2. Donör Bitkilerin Yetiştirme Koşulları.....	19
3.1.3. Kültür Aşamasında Kullanılan Ekipmanlar.....	22
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	25
3.2.2. Çiçek Tomurcuklarının Gruplandırılması ve Toplanması.....	26
3.2.3. Çiçek Tomurcuklarına Soğuk Uygulaması.....	27
3.2.4. Çiçek Tomurcuklarının Dezenfeksiyonu, Anterlerin Çıkarılması ve Dikimi.....	28
3.2.5. Besin Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanması.....	29
3.2.6. Uygulamalar.....	31
3.2.7. Ploidi testi (stomal inceleme).....	35
3.2.8. Gözlemler.....	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1. Genotiplerin Uygulamalara Göre Androgenik Performansları.....	39
4.2. Genotiplere Göre Androgenik Başarı Düzeyleri.....	46
4.3. Besin Ortamlarına Göre Androgenik Başarı Düzeyleri.....	47
4.4. Düşük Sıcaklık Stresi Uygulamalarına Göre Androgenik Başarı Düzeyleri.....	48
4.5. Genotip x Besin Ortamı İnteraksiyonunun Androgenik Başarıya Etkisi.....	51
4.6. Genotip x Düşük Sıcaklık Stresi Uygulamasının Androgenik Başarıya Etkisi.....	52
5. SONUÇ	55
6. KAYNAKLAR	56
7. ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
g	Gram
h	Saat
l	Litre
m ²	Metre kare
mg	Miligram
ml	Mililitre

Kısaltmalar

Açıklama

(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
2,4-D	Dikloro fenoksiasetik asit
ACC	Aminocyclopropanecarboxylic asit
AgNO ₃	Gümüş nitrat
B5	Gamborg ve ark. (1968) tarafından önerilen besin ortamı
BAP / BA	Benzilaminopürin
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	Kalsiyum nitrat
CaCl ₂ , 2H ₂ O	Kalsiyum Klorür
CoCl ₂ , 6H ₂ O	Kobalt klorür
CuSO ₄ , 5H ₂ O	Bakır sülfat
DDVX	Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1981) tarafından önerilen besin ortamı
EDTA	Etilen diamintetraasetik asit
FeSO ₄ , 7H ₂ O	Demir sülfat
H ₃ BO ₃	Borik asit

Kısaltmalar	Açıklama
KCl	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Mono potasyum fosfat
KI	Potasyum iyodür
KNO_3	Potasyum nitrat
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum sülfat
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	Mangan sülfat
MS	Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen besin ortamı
Na_2EDTA	Sodyum EDTA
$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	Sodyum molibdat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$	Mono sodyum fosfat
NH_4NO_3	Amonyum nitrat
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	Çinko sülfat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Hızır F ₁ çeşidinin meyve ve bitki görünüşleri.....	20
Şekil 3.2. İstek F ₁ çeşidinin meyve ve bitki görünüşleri.....	20
Şekil 3.3. Balca F ₁ çeşidinin meyve ve bitki görünüşleri.....	21
Şekil 3.4. Alkırımızı F ₁ çeşidinin meyve ve bitki görünüşleri.....	21
Şekil 3.5. Donör bitkilerin yetiştirildiği sera	22
Şekil 3.6. Anter kültürü çalışmalarının yürütüldüğü laboratuvar ekipmanları.....	23
Şekil 3.7. Denemede kullanılan inkübatör ve otoklav	24
Şekil 3.8. Denemede kullanılan mikroskop, manyetik karıştırıcı ve pH metre	24
Şekil 3.9. Denemede kullanılan petripler.....	25
Şekil 3.10. Çiçek tomurcuklarının görünümü.....	27
Şekil 3.11. Uygun çiçek tomurcuğu ve anter aşaması.....	27
Şekil.3.12. Çiçek tomurcuklarının dezenfeksiyonu.....	28
Şekil 3.13. Çiçek tomurcuklarından anterlerin çıkarılması ve anter dikimi.....	29
Şekil 3.14. Besin ortamlarının hazırlanması.....	30
Şekil 3.15. R ve V ortamında embriyo ve bitki gelişme durumu.....	34
Şekil 3.16. Bitkiciklerin haploid bitkiye dönüşüncüye kadar geçirdikleri aşamalar..	35
Şekil 3.17. İstek F ₁ ve Balca F ₁ genotiplerinde diploid ve haploid bitkilerin mikroskopik stoma görünüşleri.....	36
Şekil 3.18. Akırımızı F ₁ ve Hızır F ₁ genotiplerinde diploid ve haploid bitkilerin mikroskopik stoma görünüşleri.....	37
Şekil 4.1. Normal gelişimini sürdüren İstek F ₁ ve Alkırımızı F ₁ genotiplerine ait anterler.....	39
Şekil 4.2 Genotiplere göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları.....	50
Şekil 4.3 Besin ortamlarına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (%).....	50
Şekil 4.4 Düşük sıcaklık uygulamalarına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (%).....	51
Şekil 4.5 Genotiplerin besin ortamlarına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (%).....	52
Şekil 4.6 Genotiplerin düşük sıcaklık uygulamalarına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (%).....	54

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge.3.1. Denemede kullanılan besin ortamları ile R ve V ortamlarının bileşimi	33
Çizelge 4.1. İstek F ₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu.....	41
Çizelge 4.2. Balca F ₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu.....	42
Çizelge 4.3. Alkırımızı F ₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu.....	44
Çizelge 4.4. Hızır F ₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu.....	45

1. GİRİŞ

Solanaceae familyasının önemli türlerinden biri olan biberin ana vatanı Orta ve Güney Amerika olup, dünyada 5.6 milyon hektar alanda 69 milyon tonu aşan üretimi ile önemli sebze türleri arasında yer almaktadır (Anonim, 2018). Geniş bir tip ve çeşit zenginliğine sahip olan biber, sahip olduğu tür ve tip zenginliği sayesinde çiğ, pişmiş, sos, salça, kurutulmuş, konserve edilmiş vb. şekillerde değerlendirilmektedir.

Türkiye’de biber tarımında üç veya dört burunlu dolmalık tiplerin yanında günümüzde Charlston, Kapyra ve Sivri biber tipleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. Türkiye’de biber tarımı uzun yıllar standart çeşitler veya köy popülasyonlarının kontrolünde devam etmiştir. 1980’li yıllarda gerçekleşen yeşil devrim ile birlikte Türkiye’de de biber yetiştiriciliğinde hibrit çeşitler kullanılmaya başlanmıştır. Yine Türkiye hibrit biber çeşitlerinde uzun yıllar dışa bağımlı kalmış, son yıllarda bu bağımlılıktan büyük ölçüde kurtulmuş, hatta yurt dışına hibrit biber tohumu satmaya başlamıştır. Birçok sebze türünde olduğu gibi biber ıslahında da önemli gelişmeler sağlanmış, yerli tohum firmaları kamu ve üniversite ile işbirliği yaparak biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı hibritler geliştirebilecek düzeye ulaşmışlardır.

Hibrit biber çeşitlerinin geliştirilmesinde farklı aşamalar söz konusudur. Başlangıç materyalinin toplanması veya gen havuzunun oluşturulması, homozigot hatların elde edilmesi ve melezleme bu aşamaların başlıcalarıdır.

Hibrit biber çeşitleri genelde iki, fakat bazı özel durumlarda ikiden fazla (üçlü melez, dördü melez gibi) homojen hattın melezlenmesi ile elde edilir. Biber yüksek oranda kendine tozlanan bir bitki olarak bilinmekte olup, yabancı tozlaşma oranı tozlaşmada etkili faktörlere bağlı olarak %79’a kadar çıkmaktadır (Allard, 1999). Bu nedenle hibrit biber ıslahında homozigot hatların elde edilmesi uzun zaman almaktadır. Ayrıca klasik yöntemlerle varılabilecek hedefler kısıtlıdır. Kombinasyon ıslahında homozigot ebeveyn hatların elde edilmesi için 5-6 generasyon kendileme yapılması gerekmektedir. Böylece her generasyonda homozigotluk düzeyi artırılarak kendilemeler sonunda %100’e yakın homozigot hatlara ulaşılabilir. Oysa *in vitro* teknikler kullanılarak çok daha kısa

sürede %100 homozigot hatlar elde edilebilmektedir (Alejo, 1992). Bu sayede homozigot hatlar elde etmek için gereken 6-7 generasyonluk süre bir generasyona inmektedir. Kombinasyon ıslahında biyoteknolojinin kullanılması sayesinde 10-12 yılda ulaşılan sonuca 5-6 yılda ulaşılabilir. Bitki ıslahında kullanılan *in vitro* teknikler arasında en önemlilerinden biri anter kültürü tekniğidir. Bitki ıslahının çeşitli alanlarında kullanılan anter kültürü ıslah çalışmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır. Klasik ıslah yöntemlerine kıyasla sağladığı zaman ve işgücü kazancı hem karlılığı artırmakta, hem de firmaların rekabet gücüne katkı sağlamaktadır.

Anter kültürü 25 yıldan daha uzun zamandır biberde dihaploid hatların elde edilmesinde kullanılmakta ve bu alanda başarı oranını artırmaya yönelik araştırmalar geniş kapsamlı şekilde devam etmektedir. Biberde haploid teknolojisi anter veya mikrospordan haploid embriyoların elde edilmesini kapsar. Anter kültürü yöntemi kullanılarak haploid kromozoma sahip bitkilerin rejenerasyonu genetik açıdan oldukça idealdir (Nervo ve ark. 2007; Pauk ve ark. 2010). Biberde anter kültürü kullanılarak haploid bitkilerin elde edilmesi ilk olarak Çin, Hindistan ve Polonya'da gerçekleştirilmiştir (Wang ve ark., 1973; George ve Narayanaswamy, 1973; Novak, 1974). Bu protokol daha sonra Dumas de Vaulx ve ark. (1981) ve Dumas de Vaulx (1990) tarafından geliştirilmiştir. Günümüze kadar da değişik modifikasyonlar uygulanarak başarı oranı artırılmaya çalışılmıştır.

Biberde yapılan anter kültürü çalışmalarında çok yüksek başarılar elde edilmesinin yanında, sonuç alınamayan veya başarı düzeyi çok küçük olan çalışmalara da rastlanmaktadır. Bunun en önemli nedeni anter kültüründe başarı üzerine birçok faktörün etkili olmasıdır. Anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörleri; genotip ve donör bitkinin yetiştirme koşulları ve anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler (anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı ve inkübasyon koşulları) olarak iki grupta değerlendirmek mümkündür (Ellialtıoğlu ve ark., 2002). Bu faktörler arasında en önemlilerinden biri genotiptir (Çömlekçioğlu, 2001; Rodeva ve ark., 2004; Liu ve ark., 2007). Bir başka etkili faktör kültür ortamıdır (Dumas de Vaulx ve ark., 1981; Murashige and Skoog, 1962). Bunların dışında bitki büyüme düzenleyiciler (Prayantini, 2006), sıcaklık stresi uygulamaları

(Barany ve ark., 2005; Özkum ve Tıyrıdamaz, 2002), anterlerin alınma zamanı ve kültür koşulları (Keller, 1984) başarıyı etkileyen diğer önemli faktörlerdir.

Biberde yürütölen anter kültürü çalışmalarında genotipin genetik yatkınlığının en önemli faktörlerden biri olduğu artık kesin olarak bilinmektedir ve birçok çalışmada bu durum teyit edilmiş durumdadır. Androgenik yanıt konusunda çok yüksek başarı gösteren genotipler olduğu gibi hiç yanıt vermeyen genotipler de olmuştur. Ancak halen daha genotipik farklılıkların nedeni tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Genotiplerin androgenik performansları genetik yapıları dışında diğer faktörlere bağlı olarak ta değişebilmektedir. Biberde yürütölen anter kültürü çalışmalarında biberin anter kültürüne son derece yatkın bir tür olduğu belirtilmektedir. Bununla beraber genotiplerin androgenik başarılarının besin ortamları, besin ortamlarının bileşimi, stres ve inkübasyon uygulamaları gibi faktörlerden etkilendiği değişik çalışmalarda ortaya konmuştur (Irikova,ve ark., 2011a; Nowazyk ve Kisiala, 2006; Ari ve ark., 2016; Popova ve ark., 2016).

Anter kültürüne yanıt veren birçok bitki türünde olduğu gibi biberde de besin ortamı, ortam bileşenleri ve ilave büyüme düzenleyiciler androgenik başarıda genotip kadar etkilidir. Biberde yakın zamana kadar Dumas de Vaultx ve Chambonnet (1982) ve Murashige ve Skoog (1962) tarafından geliştirilen protokoller araştırmacılara göre modifiye edilerek kullanılırken, bu protokollerin yanında Gamborg ve ark. (1968) tarafından önerilen ve B5 olarak bilinen ortam ile Nitsch ve Nitsch (1969) tarafından önerilen ve Nitsch ortamı olarak bilinen ortamlar da denenmiş, ancak MS ve DDVX ortamlarının en geçerli ortamlar olduğu kabul edilmiştir.

Anter kültüründe anterler besin ortamına aktarıldıktan sonra da anter içindeki mikrosporlar canlılıklarını devam ettirmektedirler. Dolayısıyla gelişmeleri devam edecektir. Bu durumda tek çekirdekli aşamanın son evresinde olan mikrosporlarda çekirdek bölünmesi tamamlanmaktadır. Anter kültüründe en uygun anter alım zamanı olan tek çekirdekli evrenin son döneminde mikrospordan embriyo gelişimi sağlanabilmektedir. Dolayısıyla kültür aşamasında da bu evrenin geçmemesi gerekmektedir. Bunu sağlamak için başvurulan yöntemlerden biri de çiçek

tomurcuklarına soğuk şoku uygulanmasıdır. Biberde anter kültürü çalışmalarında çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık şoku uygulayan Liu ve ark. (2009) ile Popova ve ark. (2016), düşük sıcaklık uygulamalarının androgenik başarıyı artırdığını belirtmektedirler. Bununla beraber Çiner ve Tıpırdamaz (2002) ile Özkum ve Tıpırdamaz (2010), biberde çiçek tomurcuklarına 48 ve 96 saat boyunca 4 °C soğuk şoku uygulamasının androgenik başarıyı arttırmadığını belirtmektedirler. Bu durumda soğuk şokunun genotip ve besin ortamı gibi diğer faktörlerden etkilenip etkilenmediği de merak konusu olmaktadır.

Bu çalışmada biberde anter kültüründe androgenik başarı üzerine genotip, besin ortamı ve çiçek tomurcuklarına soğuk şoku uygulamalarının etkileri araştırılmıştır. Ayrıca genotip x besin ortamı ve genotip x düşük sıcaklık interaksiyonları da incelenerek genotiplerin androgenik başarılarının besin ortamlarına ve düşük sıcaklık uygulamalarına göre nasıl bir değişim gösterdiği incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Biber (*Capsicum annuum* L.) *Solanaceae* familyasının önemli türlerinden biridir. Dünya üzerinde ılıman iklim kuşağından subtropik kuşağa kadar çok geniş alanlarda yetiştiriciliği yapılmaktadır. *Capsicum* cinsi yaklaşık 50 tür içermektedir. Bu türler içinde yetiştiriciliği en fazla yapılan tür *C. annuum* türüdür. Biber ılıman iklimlerde tek yıllık, subtropik iklimlerde çok yıllık olarak yaşar. Erselik çiçek yapısına sahip olan biberde 5 çanak yaprak, 5 taç yaprak, 5 erkek organ ve 3-5 karpelli bir dişi organ bulunur. Dişi organların erkek organlardan önce reseptif hale geçmesi ve tozlayıcı faktörlerin etkisi ile biberde %3-30 oranında yabancı tozlaşma görülebilir. Ancak, genelde biber kendine tozlaşmalı olarak kabul edilir.

Biber açık alanda olduğu gibi örtü altında da yaygın olarak yetiştirilebilmektedir. Bu denli yaygın yetiştirilen bir türde verim ve kalite özelliklerinin iyileştirilmesi, biyotik ve abiyotik faktörlere karşı dayanıklılık veya tolerantlığın geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu amaç için biberde ıslah çalışmaları yıllardan beri yürütülmektedir. Gelecekte de biber ıslahı önemini ve güncelliğini korumaya devam edecektir. Dünya’da uzun bir geçmişe sahip olan biber ıslahında klasik yöntemler kullanılmış ve bu yöntemlerle birçok yeni çeşit üretime kazandırılmıştır.

Türkiye’de önemli sebze türlerinden biri olan biber üretimi her geçen yıl artarak devam etmiştir. Biber üretimi 1980 yılında 41 bin hektar alanda 580 bin ton iken, 2000 yılında 70 bin hektar alanda 1.48 milyon ton ve 2017 yılında 94.4 bin hektar alanda 2.61 milyon tona ulaşmıştır. Üretim alanı ve üretim miktarındaki artışın yanında birim alandan elde edilen verimde de önemli artışlar kaydedilmiştir. 1980 yılında biber verimi 1.41 ton/da iken 2000 yılında 2.12 ton/da ve 2017 yılında 2.76 ton/da olmuştur (Anonim, 2018). Üretimde ve verimlilikte sağlanan artışta üretim alanlarının genişlemesi ve modern tarım tekniklerinin devreye girmesinin yanında yüksek verimli, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı veya tolerant ve adaptasyon yeteneği yüksek hibrit çeşitlerin geliştirilmesinin de önemli katkıları olmuştur. Türkiye’de 1980’li yıllarda bitki ıslahında yaşanan gelişmeler etkisini biber ıslahında da göstermiş, bu gelişmeler biberde üstün özellikli hibrit çeşitlerin üretilmesinde rol oynamıştır. Bu dönemden itibaren biber

ıslahında her geçen gün yeni tekniklerinde devreye girmesiyle gelişmiş ülkeler ile rekabet edecek düzeye gelinmiştir. Bir zamanlar hibrit biber çeşidinde %100 dışa bağımlı olan Türkiye bugün artık dünyanın birçok ülkesine hibrit biber tohumu satmaktadır.

Biber ıslahında yakalanan başarıda biyoteknolojik yöntemlerin ıslah programlarında kullanılmasının önemli katkıları olmuştur. Klasik ıslah yöntemleri ile moleküler ve anter kültürü tekniklerinin birlikte kullanılması sayesinde genetik zenginliklerimiz artmış, ıslah süreleri kısalmış ve daha başarılı hibritler geliştirilmiştir. Biber ıslahına önemli katkılar sağlayan yöntemlerden biri olan anter kültürü tekniği 12 ay gibi çok kısa sürede %100 homozigot hatların elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Böylece biber ıslahında en zor ve en uzun aşama olan yarı yol materyallerinin (homozigot hatlar) elde edilmesinde çok önemli avantajlar sağlamaktadır.

Biberde anter kültürü konusunda ilk çalışmalar Wang ve ark., (1973) tarafından Çin’de, George ve Narayanaswamy (1973) tarafından Hindistan’da ve Novak (1974) tarafından Polonya’da yürütülmüştür. Bu çalışmaların ardından Sibi ve ark., (1979) Dumas de Vault ve ark., (1981) ve Dumas de Vault (1990) tarafından androgenik başarıyı artırmaya yönelik çalışmalar yayınlanmıştır. Ülkemizde biberde anter kültürü konusunda ilk çalışmalar Abak (1983), Tıprıdamaz ve Ellialtıoğlu (1998), Abak ve ark.,(1998), Özkum ve ark., (2001) ve Comlekcioglu ve ark., (2001) tarafından yürütülmüştür. Sonraki yıllarda besin ortamı, genotip v.b. uygulamaların etkilerini araştıran çok sayıda çalışma yayınlanmıştır.

Gerek ülkemizde ve gerekse dünyada biberde anter kültürü ile ilgili yürütülen çalışmalarda androgenik başarı üzerine birçok faktörün etkili olduğu belirtilmektedir. Androgenik başarıda en etkili faktörün genotip olduğu, donör bitkinin genetik yapısı ve anter kültürüne yatkınlığının başarı üzerine doğrudan etkili olduğu değişik çalışmalarda ortaya konmuştur (Qin ve Rotino, 1995; Mityko ve ark., 1995). Biberde anter kültüründe genotipin yatkınlığının yanında donör bitkilerin yetiştirme koşulları ve yaşı (Ouyang ve ark., 1987; Ercan ve ark., 2006; Niklas-Nowak ve ark., 2012; Grozeva ve ark., 2013; Al Remi ve ark., 2014), anter kültüründe kullanılan besin ortamları ve ortam

bileşenleri (Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Lihao ve ark., 2004; Liu ve ark., 2009), besin ortamlarına ilave edilen bitki büyüme düzenleyiciler ile organik ve inorganik katkı maddeleri (Thomas, 2008; Yang ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2010; Cheng ve ark., 2013; Roshany ve ark., 2013) ve çiçek tomurcuklarına uygulanan ön stres uygulamaları ile anterlere uygulanan inkübasyon koşullarının (Kim, 1999; Koleva-Gudeva ve ark., 2007a; Özkum ve Tıprıdamaz, 2007; Parra-Vega ve ark., 2013a; Nowaczyk ve ark., 2015) etkili faktörler arasında olduğu birçok çalışma ile teyit edilmiştir. Bu faktörlerin dışında anter kültüründe başarı üzerine en çok etki eden faktörlerden biri de anter alım döneminde mikrosporların hangi gelişme evresinde olduğudur (Nowaczyk ve Kisiala, 2006; Parra-Vega ve ark., 2013b; Barroso ve ark., 2015). Anterlerden embriyo oluşumunun gerçekleşebilmesi için mikrosporların uygun evrede olmaları gerekir.

2.1. Haploid Bitkilerin Önemi ve Oluşum Yolları

Anter kültürü uygulanarak elde edilen haploid bitkiler her lokuslarında tek allel seri içerirler. Haploid bitkiler n kromozom yapısına sahip oldukları için bu bitkilerde resesif özellikler de açığa çıkmaktadır. Kromozom katlaması yapıldığında ve haploid bitkiler diploid hale geldiklerinde bu resesif özellikler görünmeye devam eder. Kromozom katlaması sonucunda %100 homozigot diploid (dihaploid) bitkiler elde edilir. Bu hatlar hibrit çeşit ıslahında doğrudan ebeveyn olarak kullanılabilirler. Bunun yanında haploid bitkiler donör bitki kaynağından geniş varyasyonların elde edilmesine olanak sağlar. Bitkilerde haploidinin oluşumunun farklı yolları vardır. Bunlardan biri doğal yollarla haploid bitki oluşumudur. Ginogenesis, androgenesis, poligami, semigami ve kromozom eliminasyonu ile doğal haploid bitkiler oluşabilmektedir. Haploidlerin oluşum yolları farklı şekillerde gözlenebilmektedir. Ginogenesisinde spermiler yumurtaya girdikleri halde yumurta hücresinde döllenme meydana gelmemektedir. Yumurta hücresi zigot gibi davranarak bölünmekte ve haploid yapıdaki embriyo oluşmaktadır (Dong ve ark., 2016, Sauton ve Dumas de Vaulx, 1987). Androgenesiste erkek cinsiyet hücrelerinin gelişmesiyle haploid bitkiler oluşmaktadır (Seguí-Simarro, 2010). Semigamide erkek ve dişi eşey hücreleri birleşerek embriyo oluşumuna katılırlar ancak çekirdek erimesi gerçekleşmez ve kimeralı haploid bitkiler meydana gelir (Batygina, 2000). Poliembriyonide döllenme sonucunda embriyo oluşur ancak aynı zamanda

döllenmiş yumurta hücresinin yanındaki sinerjit hücrelerinden bazılarında bölünerek gelişmeye başlar ve bunun sonucunda da haploid yapıya sahip embriyolar oluşur (Batygina ve Vinogradova, 2007). Kromozom eliminasyonunda ise yumurta hücresi ile generatif çekirdek birleşir ve döllenme gerçekleşir. Ancak bu dönemde cinsiyet hücrelerinden birinin kromozomları eriyerek kaybolur. Genellikle erkek cinsiyet hücresinin kromozonu elemine olur. Bu durumda haploid embriyo meydana gelir (Ishii ve ark., 2016).

Doğada haploid bitkilerin oluşum frekansı türlere ve tür içi genotiplere bağlı olarak %0.1 - 0.001 arasında değişmektedir. Doğada 100 dolayında bitki türünde doğal haploid meydana gelirken, birçok bitki türünde ise doğal yollarla haploid bitki oluşumuna rastlanmamaktadır (Pochard ve Dumas de Valux, 1979). Spontan olarak ortaya çıkan haploid bitkilerdeki yetersiz ve düzensiz çıkışlar ıslah çalışmaları açısından önem taşımamaktadır. Spontanhaploid oluşumu yerine ıslah çalışmalarında kullanılabilen sayıda düzenli olarak haploid bitkilerin elde edilebileceği çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Haploid bitkileri elde edebilmek için geliştirilen bu yöntemler; ışınlanmış polenlerle tozlama, tozlaşmanın geciktirilmesi, türler arası melezlemeler, sıcaklık şokları, *in vitro* teknikler, X ve UV ışınları uygulamaları gibi yöntemlerdir. Haploid bitki elde edilmesinde en çok kullanılan yöntemlerden biri olan *in vitro* teknikler 2 farklı şekilde uygulanabilmektedir. Erkek gamet hücresinin uyarılmasıyla haploid bitki geliştirmeye androgenesis, dişi gamet hücresinin uyarılmasıyla haploid bitki geliştirmeye gynogenesis denmektedir. Androgenesis yöntemi anter kültürü ve mikrospor kültürü olarak ikiye ayrılmaktadır. Dişi gametten haploid uyarımı ovül ve ovaryum kültürleri, yetersiz polenle tozlama ve kromozom eliminasyonları ile yapılmaktadır. Çiçek tozlarına veya bitkilere toluidin mavisi, maleyik hidrazid, azotoksit, kolhisin, kloramfenikol ve paraflor fenilalanin gibi bazı kimyasallar ve büyüme düzenleyicisi (2-kloro etik fosfoik asit, 2,4-D) uygulamaları dayöntemler arasında yer almaktadır (Bajaj, 1983; Pierik, 1987).

Haploid bitkiler eksik ve kusurlu bir yapıya sahip olmadıkları halde diğer normal gelişim gösteren bitkilere oranla küçük yapı ve organlara sahiptirler. Haploid bitkilerin hücreleri taşıdıkları kromozom sayıları bakımından gamet hücreleri ile aynıdır, bu

yüzden bu bitkiler gamet oluşturamazlar. Dolayısı ile haploid bitkiler tohum bağlayamazlar ve kısırdırlar (Reinert ve Bajaj, 1977).

In vitro koşullarda uygulanan teknikler ile elde edilen haploid bitkilerin, ıslah çalışmalarında kullanılabilmesi için verimli hale getirilip diploid yapıya dönüştürülmeleri gerekmektedir. Haploid bitkilerin verimli (diploid) yapıya dönüşmeleri için kromozomlarının katlanması gerekmektedir. Kromozom katlaması işleminin gerçekleşebilmesi belirli kimyasalların yardımı ile kendiliğinden olarak gerçekleşmektedir. Haploid bitkilerin kısa sürede durağanlaşması, kromozomlarının katlanması ve ıslah çalışmalarında kullanılabilmesini sağlayan yöntem dihaploidizasyon adı verilmektedir. Günümüzde biber, patlıcan, hıyar, kavun, arpa, buğday gibi birçok bitki türünde dihaploidizasyon yöntemi başarıyla kullanılmaktadır.

2.2. Anter Kültürü (Androgenesis)

Anter kültürü, haploid embriyo ve bitki oluşumu amacıyla olgunlaşmamış mikrosporları (polenleri) içeren anterlerin aseptik koşullarda çiçek tomurcuklarından çıkarılarak yapay besin ortamları üzerinde kültüre alındığı *in vitro* tekniktir. Büyükalaca ve ark., (2004) androgenesis veya mikrospor androgenesis çekirdek bölünmesinin son aşamasına gelmiş olan polen tanesinin tek çekirdekli dönemdeyken somatik hücre olarak gelişmeye yönlendirilmesi olarak tanımlamaktadır. Anter kültüründeki en yüksek başarı *Solanaceae* (Patlıcangiller) familyasından elde edilmiştir. *Gramineae* (Buğdaygiller), *Ranunculaceae* (dügünçiçeğigiller) ve *Cruciferae* (Trupgiller) familyalarının anter kültürüne verdiği tepkiler olumlu düzeyde sayılmaktadır (Bajaj 1983; Rashid, 1983). Tsay ve ark., (1986)çeltik ve mısır bitkilerindeki çalışmalarında başarılı sonuçlara imza atmışlardır. Yapılan çalışmalarda tek yıllık ve otsu bitkilerde anter kültürünün olumlu sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Odunsu bitkilerde ise otsu bitkilerin aksine anter kültürü çalışmalarının başarı oranı oldukça düşüktür.

Anter kültürü yapılırken, uygun koşullardaki tomurcuklar bitkilerden alınarak sterilize edilir, tomurcuklardan anterler çıkarılır ve aseptik besin ortamlarına aktarılırlar. Daha sonra besin ortamları uygun koşullara alınarak anterlerden embriyo gelişmesi beklenir.

Bu aşamadan sonra kullanılan besin ortamı, hormon ve vitaminlere bağlı olarak embriyo gelişimi olarak 2 şekilde gerçekleşir. Direkt embriyo oluşumunda kültür koşullarında belirli bir süre (genellikle 2 ay) bekletildikten sonra anterlerin içindeki mikrospordan embriyolar gelişmeye başlar. İndirekt androgenesiste ise mikrospordan önce kallus oluşmakta ve daha sonra kalluslardan embriyolar elde edilmektedir.

2.3. Biberde Androgenik Başarı Üzerine Genotipin Etkisi

Anter kültürünün uygulandığı birçok bitki türünde olduğu gibi biberde de başarı üzerine etki eden en önemli faktörlerden biri genotiptir. Yapılan birçok araştırmaya göre androgenik reaksiyonu sınırlandıran en önemli faktörün genotip olduğu ve genotipin anter kültüründeki başarıyı önemli ölçüde etkilediği belirtilmektedir (Mityko ve Fari 1997; Çömlekçiöğlü ve ark., 2001; Rodeva 2001; Wang and Zhang 2001; Rodeva ve ark., 2004; Ercan ve ark., 2006; Koleva- Gudeva ve ark., 2007b; Liu ve ark., 2007; Asakaviciute, 2008; Nowaczyk ve ark., 2009; Başay ve Ellialtıoğlü, 2013).

Morison ve ark., (1986) biberde anter kültürü üzerine genotipin etkisini araştırdıkları çalışmalarında anterden embriyo oluşumu ve embriyoların bitkiye dönüşmesinde genotiplerin önemli rol oynadığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde farklı biber genotipleri üzerinde anter kültürünün etkisini inceleyen Mityko ve ark., (1995) 4 biber hattı, 7 ticari çeşit ve 4 hibrit olmak üzere 15 biber genotipini kullanmışlardır. Araştırmacılar 2 kültür çeşidi dışında diğer genotiplerde embriyo oluşumu sağlamışlardır. Daha geniş genotiple çalışan Rodeva ve ark., (2004) 20 biber genotipinin ikisinde indirekt embriyo oluşumu elde ettiklerini, diğer genotiplerde ise direkt embriyo oluşumu sağladıklarını belirtmektedirler. Diğer bir çalışmada ise 5 farklı biber genotipinin 4 farklı besin ortamında androgenik performanslarını inceleyen Taşkın (2005), androgenik başarıda genotiplerin etkili olduğunu bildirmektedirler.

Geboloğlü ve Çelik (2016) yılında biberde yürüttükleri tez çalışmasında lokal popülasyon olan Tokat biberi ile İstek F₁, Üçburun F₁ ve Köylüm F₁ ticari biber çeşitlerini kullanmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında uygulamalara ve ortamlara bağlı olarak başarı oranlarında farklılıklar olduğunu, embriyo oluşturma oranları bakımından

en yüksek başarının 187 embriyo ile Tokat biberinden elde edildiğini, bu genotipi 86 embriyo ile İstek F₁ çeşidinin izlediğini, Üçburun F₁ genotipinden 17 embriyo, Köylüm F₁ genotipinden ise 15 embriyo elde ettiklerini belirtmektedirler. Rodeva ve ark., (2004) biberde anter kültüründe androgenik başarının genotiplere bağlı olarak değişmesinin genotiplerin anter kültürüne yatkınlığı ile alakalı olduğunu ve genotipin genetik yapısının etkili olduğunu öne sürmektedirler.

Genotip, anterden bitki oluşumunu ve embriyodan bitkiye dönüşümü etkilemektedir (Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Mityko ve Fari 1997). Başarı düzeyinin genotiplere bağlı olarak %0.5 ile %75 aralığında değiştiği ve popülasyonlardan alınan anterlerde başarı düzeyinin daha yüksek olduğu savunulmaktadır (Qin ve Rotino 1995; Ltifi ve Wenzel 1994; Mityko ve ark., 1995; Koleva-Gudeva ve ark., 2007b). Günümüze kadar yapılmış olan birçok çalışmada tüm bitki gruplarında aynı kültür koşullarına tabi tutulmalarına rağmen, anter yapıları bakımından genotiplerden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Niklas-Nowak ve ark., (2012) aynı genotipin bile farklı tepkiler verebildiğini ifade etmektedirler.

2.4. Androgenik Başarıda Donör Bitkinin Yaşı ve Yetiştirme Koşullarının Etkisi

Anter kültüründe donör bitkinin yetiştirme koşulları ve anter alım döneminde donör bitkinin yaşı başarıyı etkileyen faktörlerdendir. Donör bitkinin yetiştirme koşullarından kasıt ortamın ışık yoğunluğu, ışıklandırma süresi, sıcaklık, oransal nem, CO₂konsantrasyonu, bitkinin beslenme koşulları vb. faktörlerdir (Dunwell, 1991; Alpsoy, 1999). Aynı genotipin farklı koşullarda yetiştirilmesi veya anter alımının farklı dönemlerde yapılması başarıyı etkileyebilmektedir. Donör bitki yaşlandıkça, optimal koşullardan yoksun yetiştirildiğinde veya bitki besin elementlerinin düzenli olarak uygulanmadığı durumlarda bu bitkilerden alınan anterlerden embriyo gelişimi azalmaktadır.

Biberde donör bitkilerin yetiştirme koşulları ve donör bitkinin yaşının anter kültüründe embriyo oluşumuna etkisini inceleyen Kristiansen ve Andersen (1993), donör bitkileri 16-18-22-26 ve 30 °C sıcaklığa sahip serada 11-19 saat fotoperiyotta yetiştirmişlerdir.

Araştırcılar donör bitkilerden dikimden 6 hafta sonra her hafta anter almışlardır. Anter alımı 14. haftaya kadar devam etmiştir. Araştırcılar en yüksek androgenik başarıyı 26 °C derecede yetişen bitkilerden alırken, başarı oranının 16°C’de sifıra yakın olduğunu, 26 °C sıcaklıkta yetişen bitkilerden alınan anterlerde başarı oranının %2 olduğunu ve bu dereceden daha yüksekte yetişen bitkilerde ise androgenik başarının düştüğünü, fotoperiyod uygulamasının etkisinin ise olmadığını belirtmektedirler. Araştırcılar donör bitkilerin yaşı ilerledikçe embriyo elde etme başarısının da düştüğünü, en iyi sonucun genç bitkilerden elde edildiğini ifade etmektedirler.

Ercan ve ark., (2006) biberde yapmış oldukları çalışmada donör bitkinin yaşı ve yetişme koşullarının anter kültüründe embriyoid oluşumuna etkisini araştırmışlar, donör bitkinin yaşının ve yetişme koşullarının androgenik başarı üzerine önemli etkileri olduğunu belirtmişlerdir. Biberde ekolojik faktörlerin androgenik başarı üzerine etkisini araştıran Rodeva ve Cholakov, (2006) donör bitkilerin yetiştirildiği vejetasyon süresince güneşli gün sayısının, bulutlanma süresinin ve aylık ortalama sıcaklıkların embriyo oluşumu üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu belirtmektedir.

Biber dışında lahana, arpa, duğday, pirinç ve mısırdaki yapılan çalışmalarda da donör bitkinin yetişme koşullarının anter kültüründe başarı üzerine etkili olduğu belirtilmektedir.

2.5. Anter Gelişme Döneminin Biberde Androgenik Başarıya Etkisi

Anter kültüründe en uygun dönem tek çekirdekli evrenin son dönemleridir (Heberle-Bors 1989; Vicente ve ark.,1991; Telmer ve ark., 1992; Pretova ve ark., 1993; Mityko ve Fari 1997).

Supena ve ark.,(2006) mikrosporların %50’den fazlasının birinci çekirdek bölünmesinin son döneminde olduğu evrenin anter kültürü için en uygun evre olduğunu belirtmektedirler. Bununla beraber yapılan çalışmalarda birinci çekirdek bölünmesinin ardından iki çekirdekli dönemin başlangıç döneminde de anter kültürüne yanıt alınabildiği belirtilmektedir (Gonzalez-Melendi ve ark.,1995; Kao ve Horn 1999). Kim

ve ark. (2004, 2008), mikrospor kültürü için mikrosporların %75'inde iki çekirdekli evrenin başlangıç dönemini en uygun dönem olarak kabul etmektedirler. Lantos ve ark.,(2009) mikrosporların %80'inin tek çekirdekli son evrede ve %20'sinin iki çekirdekli başlangıç evresinde oldukları dönemi en uygun dönem olarak belirtmektedirler.

Mikrospor gelişim döneminden hareketle bu dönemde çiçek tomurcuklarının morfolojik yapısına bakılarak bir hükme varmak mümkündür. Sibi ve ark., (1979) çiçek tomurcuklarının büyüklüğü ve yapısına bakarak mikrospor gelişim aşamasını indirekt olarak belirlemenin mümkün olduğunu belirtmektedirler. Özkum ve Tıprıdamaz (2002) ile Nowaczyk ve Kisiala (2006), biberde yürütülecek anter kültürü çalışmalarında tomurcuk alım zamanı olarak çiçek tomurcuklarının taç yaprakları ile çanak yapraklarının aynı hizada oldukları dönemin veya taç yaprakların çanak yapraklardan hafifçe uzun oldukları dönemin en uygun dönem olduğunu bildirmektedirler. Çömlekçioğlu ve ark., (2001) ise, anterlerin uç kısmında antosiyan oluşmaya başladığı dönemi en uygun dönem olarak belirlemektedir.

Anter alım zamanını belirlemede morfolojik belirteçlerin kullanılabileceğini belirten araştırmacıların yanında, tomurcuk büyüklüğü, anter rengi gibi morfolojik belirteçlerin yanıltıcı olabileceğini, bu özelliklerin çeşitlere göre değişeceğini savunan araştırmalar da bulunmaktadır (Rodeva 2001; Rodeva ve ark.,2007; Irikova 2008). Bu durumda anter kültürü çalışmalarında uygun mikrospor gelişme evresini belirlemek için çalışmada kullanılacak genotiplerin mikrospor gelişme aşamalarının sitolojik olarak belirlenmesi gerekmektedir. Böylece her genotip için sitolojik bulgulardan hareket edilerek morfolojik belirteçler kullanılabilir (Irikova ve ark., 2011b).

2.6. Biberde Stres ve İnkübasyon Uygulamalarının Androgenik Başarıya Etkisi

Anter kültürü çalışmalarında mikrosporların embriyo gelişimi için stres uygulamasına ihtiyaç duyulmaktadır (Ahmadian ve ark.,1998; Barany ve ark.,2005; Jacquard ve ark., 2006). Mikrosporların gametofitik evreden sporofitik evreye geçebilmeleri için düşük

ve yüksek sıcaklık, ozmotik basınç veya yetersiz besleme gibi faktörler uygulanabilir (Maraschin ve ark., 2005).

Anter kültürü çalışmalarında stres uygulamaları arasında en etkili faktör sıcaklık şoku uygulamasıdır. Değişik bitki türlerinde yapılan çalışmalarda sıcaklık şoku uygulamasında en etkili yöntemin düşük sıcaklık uygulaması olduğu belirlenmiştir (Sunderland ve ark., 1981; Wenzel ve Uhrig, 1981; Genovesi ve Collins, 1982; Morrison ve ark., 1986). Sibi ve ark., (1979) biberde çiçek tomurcuklarını 48 saat süreyle 4°C sıcaklıkta beklettikleri çalışmalarında 100 anterden 1-3 bitki elde etmişlerdir. Morrison ve ark., (1986) ile Supena ve ark., (2006) anter alımından önce çiçektomurcuklarına düşük sıcaklık uygulamışlar ve 24 saatten 100 saate kadar bekletmenin embriyo oluşumunu uyardığını belirlemişlerdir. Biberde düşük sıcaklık şoku uygulamalarının androgenik başarıyı artırdığını belirten çalışmaların yanısıra düşük sıcaklığın embriyo oluşumuna önemli bir etkisinin olmadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (Vagera ve Havranek 1985; Munyon ve ark.,1989; Özkum ve ark., 2001; Kim ve ark., 2005). Ayrıca düşük sıcaklık uygulamasının embriyo formasyonunu azalttığı ve kallus oluşumunu teşvik ettiği de belirtilmektedir (Özkum ve Tipirdamaz, 2002).

Çiçek tomurcuklarına sıcaklık stresi uygulanmasının yanında anterler kültür ortamına alındıktan sonra yapılan uygulamaların da etkisi bulunmaktadır. Dolcet-Sanjuan ve ark., (1997), biber anterlerini kültüre aldıktan sonra 7 °C'de bir hafta bekletmenin embriyo oluşumunu artırdığını, Supena ve ark., (2006) ise, anterlerin 9 °C'de bir hafta bekletmenin etkili olduğunu belirtmektedirler. Anterlerin düşük sıcaklıkta inkübasyona alınmasının yanında yüksek sıcaklık uygulamalarının da etkili olduğu belirtilmektedir. Sibi ve ark., (1979), biber anterlerini 2 gün süreyle düşük ve yüksek sıcaklıklarda inkübasyona bırakmışlardır. Araştırmacılar 35 °C uygulamasının 4 °C'ye göre daha etkili olduğunu belirtmektedirler. Biberde anter kültürü çalışmalarında anterlerin inkübasyona bırakılması konusunda en etkili çalışma Dumas de Vaulx ve ark.,(1981, 1982) tarafından yürütülmüştür. Araştırmacı anterleri kültüre aldıktan sonra 8 gün süreyle 35 °C'de bekletmiş ve androgenik başarıyı artırmıştır. Daha sonra bu uygulama birçok araştırmacı tarafından da tercih edilmiş, aynı uygulama veya modifiye edilerek

denenmiştir (Koleva-Gudeva 2003; Prayantini, 2006; Morrison ve ark.,1986; Phillips ve ark., 1984; Ellialtioglu ve ark., 2001).

2.7. Biberde Temel Besi Ortamları ve Bileşimlerinin Androgenik Başarıya Etkileri

Anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler arasında besin ortamları, ortam bileşenleri ve besin ortamına ilave edilen vitamin, hormon ve bitki büyüme düzenleyicileri önemli rol oynamaktadır. Değişik bitki türlerinde yürütülen anter kültürü çalışmalarında tek bir besin ortamının kullanılması yeterli olmamaktadır. Türlerle bağlı olarak besin ortamları değişebilmektedir. Besin ortamlarının yanında besin ortamı içerikleri de türlere göre değiştiği gibi tür içi çeşit veya genotiplere göre de farklılıklar göstermektedir.

Anter kültürü çalışmalarında değişik temel besin ortamları kullanılmaktadır. Temel besin ortamları arasında Dumas de Vault ve ark., (1981) ve Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen ortamlar çalışmalarda en çok tercih edilen ve androgenik başarı düzeyi en yüksek temel besin ortamlarıdır. Bu ortamlar çok değişik şekillerde modifiye edilerek kullanılmaktadır.

Dumas de Vault ve ark., (1981) geliştirdikleri besin ortamında biberde 100 anterden 40 bitki elde ettiklerini belirtmektedirler. Dumas de Vault ve ark., (1981) tarafından geliştirilen besin ortamını biberde anter kültüründe kullanan araştırmacılar Mityko ve Fari (1997) 100 anterden 15.56 embriyo, Irikova ve Rodeva (2005) 4 embriyo, Supena ve ark., (2006) 10.96 embriyo, Rodeva ve ark., (2007) 33.6 embriyo elde etmişlerdir. Bu çalışmaların dışında aynı besin ortamını modifiye ederek kullanan Qin ve Rotino (1995) 3 çiçek tomurcuğundan 268 embriyo, Gyulai ve ark., (2000) 100 anterden 4.8 bitki, Gemesne ve ark., (2000) ise 3000 anterden 144 bitki elde Olszewska ve ark. (2014) uygulamaya bağlı olarak 0-6.15 embriyo, Niklas-Nowak ve ark. (2012) genotiplere bağlı olarak %0-16.5 embriyo elde etmişlerdir.

Murashige ve Skoog (1962) tarafından geliştirilen ve MS olarak adlandırılan besin ortamını modifiye ederek kullanan araştırmacılar uygulamalara bağlı olarak farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Matsubara ve ark., (1998) %0-11.12 embriyo, Özkum ve Tipirdamaz

(2002) %12.5 embriyo, Rodeva ve ark., (2007) %0.32-7.6 embriyo, Ercan ve Şensoy (2011) 2398 anterden 44 embriyo ve 12 bitkicik, Keleş ve ark. (2015) ise spontan dihaploid oranının %53.4 olduğunu belirlemişlerdir.

Ari ve ark., (2016) MS, B5 ve Nitsch ve Nitsch (1969) (NN) ortamlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında 48 biber genotipini kullanmışlardır. Araştırmacılar embriyo oluşumunun genotiplere ve ortamlara bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterdiğini, genotiplerin ortamlara göre androgenik performanslarının da değiştiğini, yerel genotiplerin androgenik performanslarının ticari çeşitlerden daha iyi olduğunu, besin ortamları içinde en iyi performansın NN ortamından alındığını ve bunu B5 ve MS ortamlarının izlediğini belirtmektedirler.

Kültüre alınan anterlerin (mikrosporların) gelişimi için, besin ortamına eklenen bileşenler ve bu bileşenlerin miktarı önemli rol oynamaktadır. Besin ortamına eklenen bileşenler mikrosporların gametofik gelişmeden sporofitik gelişmeye geçişini teşvik etmede büyük önem taşımaktadır. Özellikle kültürün ilk dönemlerinde besin ortamlarına ilave edilen yüksek oranda şeker dozları (%6-12) biber (Dumas de Valux ve ark., 1981), patlıcan (Dumas de Valux ve Chambonnet, 1982) ve patatest (Sopory ve ark., 1978) androgenik başarının artmasında önemli rol oynamaktadır. Besin ortamlarına katılan serin ve glutamin gibi aminoasitler, AgNO₃ gibi etilen biyosentezini inhibe edici maddeler (Paksoy ve ark., 1995) veya aktif kömür gibi maddeler elde edilecek başarı oranını arttıran çeşitli kimyasal maddelerdir.

Agar eklenmiş yarı katı ortamlar anter kültüründe en fazla kullanılan ortamlardır. Genel olarak ortama %0.7-0.8 oranında agar ilave edilmesi önerilmektedir. Olumlu sonuç almada sıvı besin ortamları ve çift bazlı ortamların da etkili olduğu belirtilmektedir. Supena ve ark., (2006)'nın yapmış oldukları çalışmada biberde hibrit çeşitlerin geliştirilmesi için saf hatlar elde etmek üzere çift bazlı ortamlar en etkili ve en başarılı ortam olarak kabul edilmektedir.

Sayılr ve Özzambak (2002), yapmış oldukları bir çalışmada NAA, BA, aktif kömür ve havuç ekstratını ekledikleri Murashige ve Skoog (1962) ve Nitsch'in (1969) 6 farklı

besin ortamındaki etkilerini araştırmışlardır. En iyi sonucu NAA ve BA içeren MS besin ortamlarından alırken, aktif kömür ve havuç ekstaratının herhangi bir olumlu etkisinin olmadığını belirtmektedirler.

Ercan ve ark., (2001),11 farklı besi ortamı (kinetin, BA, NAA, 2,4D, aktif kömürün farklı dozlarını içeren) ve 5 farklı biber çeşidi ile çalışmışlar ve en iyi sonuçları %1 aktif kömür, 5 mg L-1 2,4D, 5 MG L-1 kinetin içeren %1 aktif kömür, 4 mg L-1 NAA ve 0.1 mg L-1 BA içeren MS ortamlarından almışlardır. Al Remi ve ark., (2014) biberde 4 mg L-1 NAA + 0.1 mg L-1 BAP ilave edilen MS ortamının androgenik başarıyı olumlu yönde etkilediğini belirlemişlerdir.

2.8. Biberde İnkübasyon Koşullarının Androgenik Başarıya Etkisi

İnkübasyon koşulları anter kültürü çalışmalarında başarı üzerine doğrudan etki eden faktörlerdir. Bazı bitki türlerinde anterle, kültüre alındıktan sonra yüksek sıcaklıkta değişik sürelerle inkübe edildiklerinde bu uygulamanın embriyo oluşumunu olumlu yönde etkilediğini belirtmektedirler (Dumas de Vaulx ve ark., 1981).Anterlerin inkübasyon koşulları konusunda ilk çalışmalardan birini yapan Dumas de Vaulx ve ark. (1981, 1982) anterlerin 35  C’de 8 gün bekletilmesinin daha kısa süreli bekletmeye göre çok daha başarılı sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Daha sonra inkübasyon uygulamasının etkisini araştıran Koleva-Gudeva (2003) ve Prayantini (2006) inkübasyon süresinin 12 gün olmasının etkili olduğunu bulmuşlardır.

Farklı inkübasyon koşullarının anter kültürü üzerine olan başarısının araştırıldığı bir çalışmada 2000 lux 29  C ve 35  C’de iki farklı inkübasyon koşulu incelenmiştir. İncelemenin sonucunda 29  C’ye tabi tutulan anterlerin inkübasyon koşulları daha etkin bulunmuştur (Terzioğlu ve ark. 2000).

İnkübasyon uygulamasının embriyogenesis üzerine etkisini değişik çalışmalara dayanarak inceleyen Irikova ve ark. (2011b), kritik noktanın anterlere sıcaklık uygulama zamanı olduğunu ve bunun için en uygun dönemin mikrosporların tek çekirdekli

oldukları evrenin sonu ile iki çekirdekli oldukları evrenin başlangıcı olduğunu belirtmektedirler.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Laboratuvar ve araştırma alanında yürütülmüştür.

3.1.1. Donör Bitkiler ve Özellikleri

Denemede İstek F₁ genotipi, Balca F₁ genotipi, Hızır F₁ genotipi ve Alkırımızı F₁ genotipi donör bitkiler olarak kullanılmışlardır. İstek F₁ genotipi, Tokat dolması olarak da bilinen güçlü bitki yapısı olup açıkta ve serada yetiştiriciliği yapılan çok erkenci, yüksek verimli, çok ince kabuklu meyve boyu 8-9 cm uzunluğunda meyve çapı 3.5-4 cm olan biber çeşididir. Balca genotipi, güçlü bitki yapısı olup açıkta ve serada yetiştiriciliği yapılan erkenci yapıda yüksek verimli meyve boyu 24-26 cm uzunluğunda meyve çapı 0.5-0.7 cm olan tatlı biber çeşididir. Hızır F₁ genotipi, güçlü bitki yapısı olup açıkta ve sarada yetiştiriciliği yapılan çok erkenci, yüksek verimli, kaliteli ve ihracata uygun meyve boyu 24 cm meyve çapı 2.0-2.5 cm olan Charleston olarak da adlandırılan biber çeşididir. Alkırımızı F₁ genotipi, güçlü bitki yapısına sahip orta erkenci, yüksek verimli, iklim şartlarından kaynaklanan strese dayanıklı, çatlamamın olmadığı, ilk zamanlarda koyu yeşil renge sahip olup meyve olgunlaştıkça kırmızı renk alan, meyve boyu 24 cm uzunluğunda, meyve çapı 5.0-5.5 cm olan, aynı zamanda kopya olarak da adlandırılan biber çeşididir. Denemede kullanılan genotiplerin görünümleri (bkz. Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4) verilmiştir.

3.1.2. Donör Bitkilerin Yetiştirme Koşulları

Donör bitkiler yarı otomasyona sahip bir serada yetiştirilmiştir. Sera oluk altı yüksekliği 5 metre, taban 2000 m², ısı ve gölge perdesi bulunan, üstleri kelebek havalandırmalı, sirkülasyon ve egzoz fanlarına sahip, yanları uzay havalandırmalı, havalandırma boşlukları insect net ile kapalı, sulama ve gübreleme sistemi otomasyona bağlı, içinde hem fide yetiştirme bölümü, hem de topraksız yetiştiriciliğe uygun altyapıya sahip

bölümler mevcuttur. Seranın bulunduğu alanın rakımı 595 metre ve konumu 40°19'55.58"K - 36°28'27.49"D şeklindedir. Donör bitkilerin yetiştirildiği seradan görünüm (bkz. Şekil 3.5.) verilmiştir.



Şekil 3.1. Hızır F₁ çeşidinin meyve ve bitki görünümü



Şekil 3.2. İstek F₁ çeşidinin meyve ve bitki görünümü



Şekil 3.3. Balca F₁ çeşidinin meyve ve bitki görünüşleri



Şekil 3.4. Alkımız F₁ çeşidinin meyve ve bitki görünüşleri



Şekil 3.5. Donör bitkilerin yetiştirildiği sera

3.1.3. Kültür Aşamasında Kullanılan Ekipmanlar

Doku kültürü laboratuvarı: Stres ve inkübasyon uygulamaları, dezenfeksiyon, besin ortamı hazırlama ve anter atımı çalışmaları Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü laboratuvarın da gerçekleştirilmiştir.

İklimlendirme odası: Anterlerin inkübasyon evrelerini tamamlamalarından dış koşullara aktarılincaya kadarki süreyi geçirmeleri için ışık, sıcaklık ve nem kontrollü iklimlendirme odası kullanılmıştır. İklimlendirme odasında krom nikel malzemedan imal edilmiş raflar bulunmaktadır ve bu rafların aydınlatılması LED lambalarla sağlanmaktadır.

GrowthChamber(Büyütme Dolabı): Anterleri 10 °C'de bekletmek için sıcaklık nem ve ışık kontrolünü sağlayan 600 lt hacimli Nüve Test Kabini kullanılmıştır.

Floww kabin: Steril ortam çalışmalarının yürütülmesi için TelstarBio II A marka flow kabin kullanılmıştır.

İnkübatör: Anterlerin ekimi yapıldıktan sonra 8 gün boyunca 35 °C'de karanlık koşullarda bekletmede Memmert 'IPP 400' inkübatör kullanılmıştır.

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



Şekil 3.6. Anter kültürü çalışmalarının yürütüldüğü laboratuvar ekipmanları



Şekil 3.7. Denemede kullanılan inkübatör ve otoklav

Isıtmalı manyetik karıştırıcı, pH metre ve mikroskop: Besin ortamı hazırlanırken gerekli olan kimyasalların belirli bir sıcaklık ve devirde manyetik alan etkisiyle karıştırılmasını sağlayan karıştırıcı cihaz kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH değerlerini ölçmek için pH metre kullanılmıştır. Anterlerin gelişimi ve stoma incelemelerinde mikroskoptan faydalanılmıştır.



Şekil 3.8. Denemede kullanılan mikroskop, manyetik karıştırıcı ve pH metre

Petri: Çalışmada besin ortamları ve anterlerin anter dikimi için steril plastik petri kapları kullanılmıştır. Anterlerin inkübasyonu aşamasında 60 mm'lik petriler, anterlerin R1 ve R2 ortamlarına aktarılmasında ise 90 mm'lik steril plastik petriler kullanılmıştır.



Şekil 3.9. Denemede kullanılan petriler

3.2. Yöntem

Çalışmada 4 genotip, 3 farklı besin ortamı ve kontrol ile birlikte 5 farklı soğuk stres uygulaması, 6 tekerrürlü olarak denenmiştir. Böylece (4x3x5x6): 360 muamele kullanılmış olup her muamelede 10 anter kullanılmıştır. Toplamda ise 3600 anter atımı yapılmıştır.

3.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi

Denemede kullanılan biber genotiplerine ait tohumlar 25 Nisan 2017 tarihinde çoklu saksılarda torf ortamına ekilmiştir. Fideler 30 Mayıs 2017 tarihinde ısıtılmalı sera içinde topraksız tarım sisteminde cocopeat bloklara dikilmiştir. Denemede her genotip için 20 bitki yetiştirilmiştir. Toplamda 4 genotip ve 80 bitki donör bitki olarak kullanılmıştır. Tomurcuk hasadından önce bitkiler üzerindeki açmış bütün çiçekler uzaklaştırılmıştır. Bitkiler düzenli olarak budanarak vegetatif-generatif denge sağlanmış ve yeni çiçek tomurcuğu oluşumu teşvik edilmiştir.

Donör bitkiler yetiştirilirken stres oluşumunu önlemek maksadıyla hastalık ve zararlılara karşı mümkün olduğunca ilaçlı mücadeleden kaçınılmış ve kültürel tedbirler alınmıştır. Bitkiler için 2:1:3:1:1 oranında N:P:K:Ca:Mg içerecek şekilde besin elementi stok solüsyonları hazırlanmıştır. Stok solüsyonlarda 1 nolu tank asit tankı olarak kullanılmıştır. 2 nolu tank Ca için 3 nolu tank ise N-P-K-Mg ile S ve mikro elementler için hazırlanmıştır. Başlangıçta sulama suyunun EC değeri 1400 $\mu\text{S}/\text{cm}$ olacak şekilde gübreleme yapılmış ve bitkiler çiçeklenmeye başladıklarında sulama suyunun EC değeri 1800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ve daha sonraki dönemde 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ olarak ayarlanmıştır. Haftada en az bir kere gübresiz sulama yapılmış, ayrıca düzenli olarak drenaj suyu alınmış ve EC ve pH değerleri ölçülmüştür. Drenaj sularında EC değerinin 2800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 'nin üzerine, pH değerinin 7.00'ın üzerine çıktığı durumlarda otomasyona müdahale edilerek değerler yeniden ayarlanmıştır.

3.2.2. Çiçek Tomurcuklarının Gruplandırılması ve Toplanması

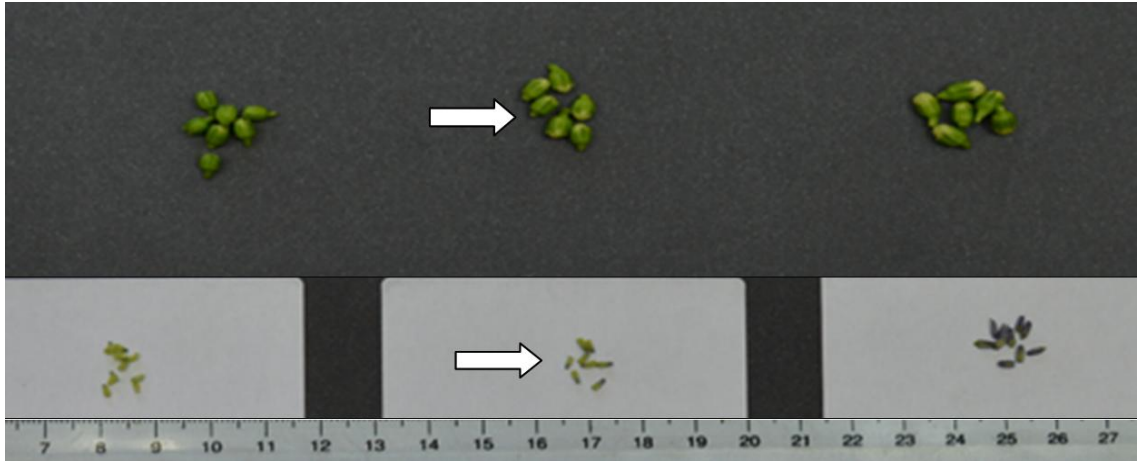
Anterlerin yeşilden sarıya dönüşmeye başladığı evre anter hasadı için baz alınmıştır. Bu devre tek çekirdekli mikrospor gelişmesinin son evreleri ile birinci polen mitozunun başlangıç evresini kapsamaktadır (Sibi ve ark., 1979; Abak, 1983; Karakullukçu, 1991). Genotipler arasında farklılıkların olma ihtimaline karşı anterlerin gelişme aşamalarını belirleyebilmek amacıyla, tomurcuklar önce kendi aralarında morfolojik özelliklerine göre gruplandırılmış ve bu gruplardan alınan anterlerde mikrospor gelişim aşamalarının kontrol edilmesi için %2'lik asetokarmin yöntemi ile boyama işlemi yapılarak NIKON marka ışık mikroskobu ile mikrosporlar incelenmiş ve en uygun evrenin tespiti yapılmıştır. (Elçi,1982; Karakullukçu,1991). Mikrosporların durumuna göre tomurcuk gelişme aşamaları belirlenmiş ve deneme süresince tomurcuk hasadında aynı kriterler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan çiçek tomurcuklarının morfolojik görünüşleri (bkz. Şekil 3.10.), çiçek tomurcuğu ve anterlerin görünüşleri (bkz. Şekil 3.11.) verilmiştir. Çiçek tomurcukları sabahın erken saatlerinde hasat edilmiştir.

3.2.3. Çiçek Tomurcuklarına Soğuk Uygulaması

Çiçek tomurcukları sabah erken saatlerde (07:00 ile 08:00 saatleri arasında) toplanmıştır. Tomurcuklar cam beher içine konulmuş ve soğuk uygulamaları için sıcaklıkları 4 ve 10 °C'ye ayarlanmış buzdolaplarına konulmuştur. Tomurcuklar +4 °C ve +10 °C sıcaklıkta 24 ve 48 saat bekletilmiş ve bu süreler sonunda dolaplardan çıkarılan tomurcuklar dezenfeksiyon işlemine alınmıştır. Soğuk uygulamalarının kontrolü olan tomurcuklara ise herhangi bir uygulama yapılmamış, hasat edilen tomurcuklar doğrudan sterilize edilmiş ve anter atımı yapılmıştır.



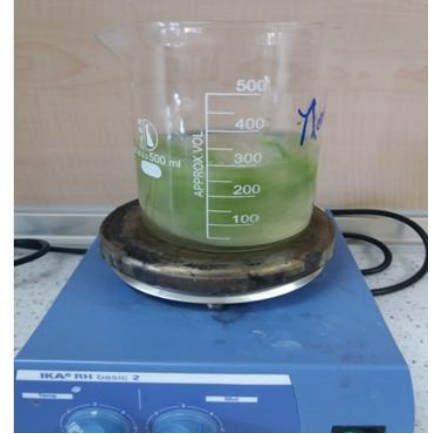
Şekil 3.10. Çiçek tomurcuklarının görünümü



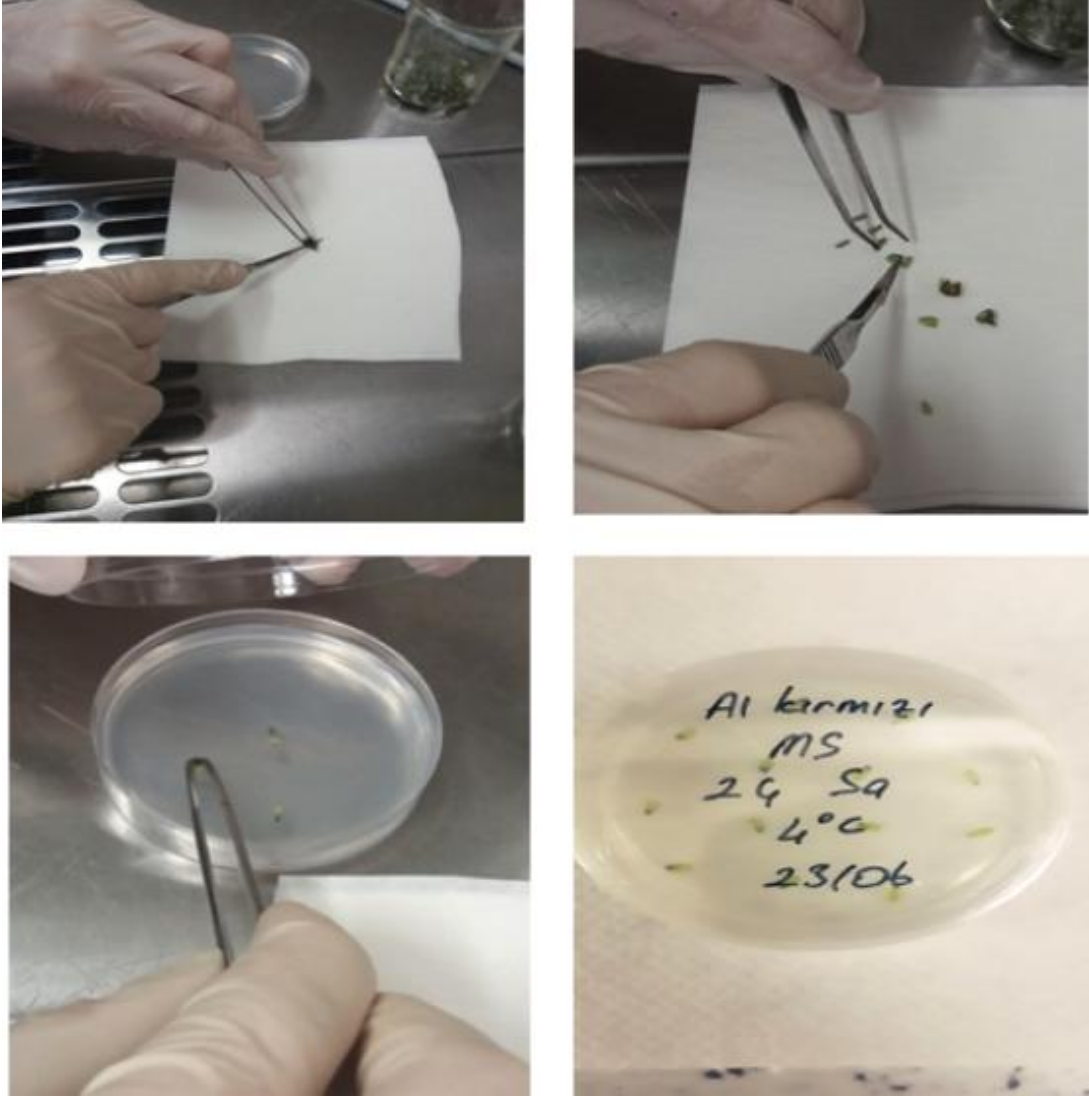
Şekil 3.11. Uygun çiçek tomurcuğu ve anter aşaması

3.2.4. Çiçek Tomurcuklarının Dezenfeksiyonu, Anterlerin Çıkarılması ve Dikimi

Polen embriyogenesi için en uygun mikrospor gelişme dönemine sahip olan anterleri içeren çiçek tomurcukları dezenfeksiyona alınmadan önce deterjanlı suda 1-2 dakika süreyle bekletilmiş ve ardından 8-10 dakika çeşme suyunda yıkanmıştır. Daha sonra çiçek tomurcukları birkaç damla Tween-20 damlatılmış %20'lik ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 15 dakika süreyle dezenfekte edilmiş, daha sonra üç kez beşer dakika süreyle steril saf su ile durulanmıştır. Anterler, çiçek tomurcukları içerisinden bistüri ve kıvrık uçlu bir pens yardımıyla çıkarılmıştır. Anterler tomurcuktan çıkarıldıktan sonra bekletilmeden ince uçlu bir pens yardımıyla besin ortamı üzerine, dorsal yüzeyi ortamla temas edecek biçimde ve ortama batırılmaksızın yerleştirilmiştir. (Karakullukçu, 1991). Her petri kutusuna 2 çiçek tomurcuğundan çıkan anterlerin tamamı dikilmiş olup, bu sayı 10-12 arasında değişmektedir. Dikim işlemi tamamlandıktan sonra petri kutularının kenarları ince plastik film şeritlerle kapatılarak dış atmosferle ilişkileri kesilmiştir. Çalışma sırasında izolasyon ve dikim aletleri; sık sık cam boncuk sterilizatöre batırılarak sterilize edilmiştir. Ayrıca dikim işlemi sırasında steril kabin içerisine sık sık %70'lik etil alkol spreyleneştir.



Şekil 3.12. Çiçek tomurcuklarının dezenfeksiyonu



Şekil 3.13. Çiçek tomurcuklarından anterlerin çıkarılması ve anter dikimi

3.2.5. Besin Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanması

Çalışmada besin ortamı olarak anter kültüründe en çok kullanılan temel besin ortamlarından Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982) tarafından önerilen DDVX besin ortamı, Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen MS besin ortamı ve Gamborg ve ark., (1968) tarafından önerilen B5 besin ortamı kullanılmıştır.

Besin ortamları hazırlanırken ortamların katılaştırılmasında %0.8 Agar-agar kullanılmıştır. Ortama ayrıca %6 sucrose eklenmiştir. Besin ortamlarının bileşimleri

(bkz. Çizelge 3.1.) verilmiştir. Besin ortamları erlenmayerler içine konulduktan sonra pH seviyesi 5.8'e ayarlanmış, ağızları alüminyum folyo ile kapatılmış ve otoklava yerleştirilmiştir. Ortamlar otoklavda 15 dk boyunca 121 °C'de 1 atm basınç altında sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besin ortamları steril kabin içinde petrilere aktarılmıştır. Her petri kabına 10 ml besin ortamı doldurulmuştur. Kabin içinde besin ortamlarının petrilere doldurulması ve anterlerin petrilere yerleştirilmesi süresince kabin içi sık sık %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir.



Şekil 3.14. Besin ortamlarının hazırlanması

3.2.6. Uygulamalar

Çalışmada 4 farklı ön uygulama yapılmıştır. Çiçek tomurcuklarına herhangi bir uygulama yapılmadan donör bitkilerden alınarak kültür ortamına aktarılan anterleri içeren tomurcuklar kontrol uygulaması olarak kullanılmıştır.

Tomurcuklara yapılan ön stres uygulamaları aşağıdaki gibidir;

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

2.Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 24 saat 10 °C 'de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra anterler 8 gün boyunca 35 °C' de karanlık ortamda inkübasyona tabi tutulmuştur.

3. Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 48 saat 4 °C'de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra anterler 35 °C'de 8 gün süre ile karanlık ortamda inkübasyona tabi tutulmuştur

4. Çiçek tomurcukları dezenfekte edilmeden önce 48 saat 10 °C 'de bekletilmiştir. Bu tomurcuklardan alınan anterler C ortamına aktarıldıktan sonra anterler 8 gün boyunca 35 °C' de 8 gün süre ile karanlık ortamda inkübasyona tabi tutulmuştur.

5.Çiçek tomurcukları dezenfekte edildikten sonra anterler bekletilmeden C ortamına aktarılmış, ardından anterler 35 °C'de 8 gün süre ile karanlık ortamda inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu uygulama tomurcuklara sıcaklık uygulamalarının kontrolü olarak alınmıştır.

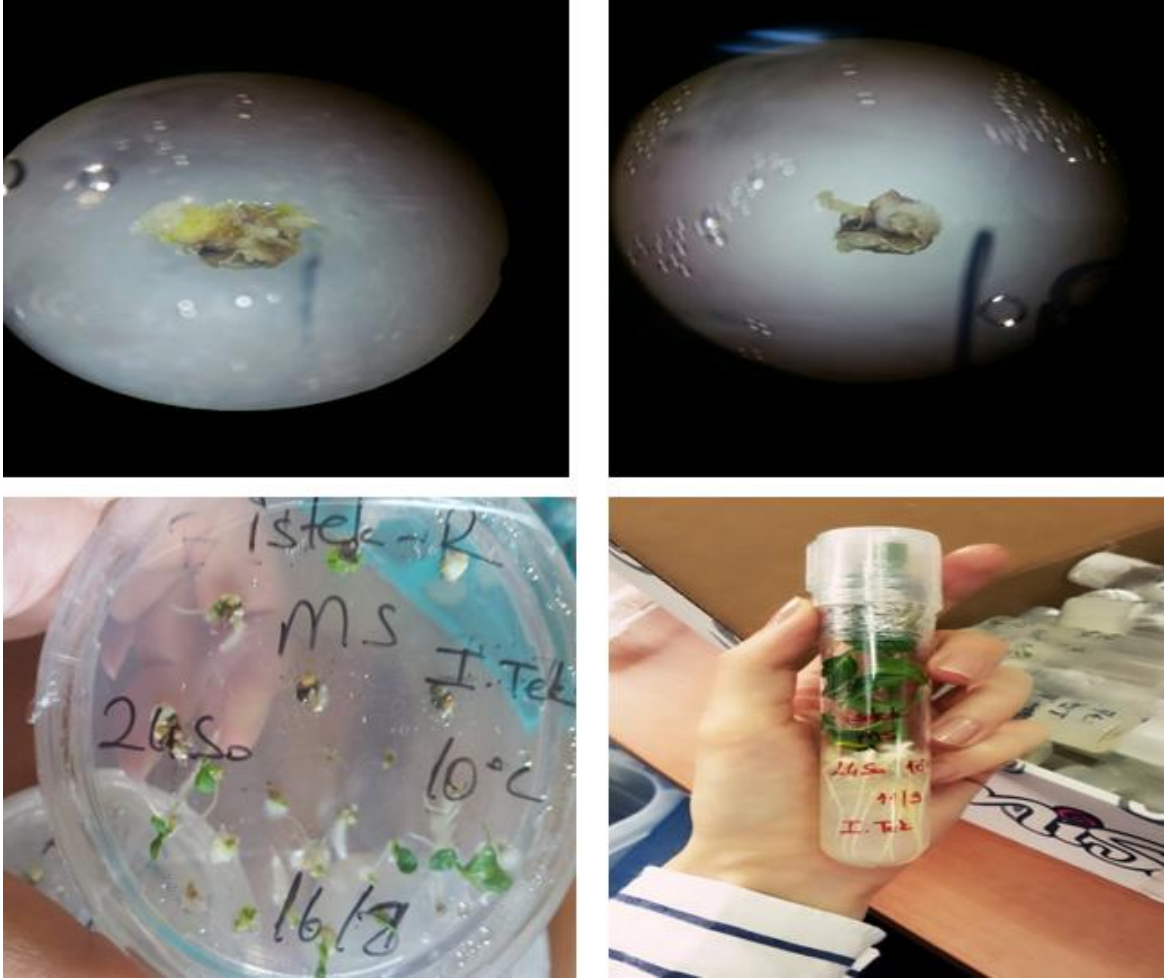
İnkübasyon uygulama sürelerinin sonunda petrilere 3000 lux ışık intensitesi, 25 °C ±1 °C sıcaklık ve 16 saat fotoperiyoda sahip iklimlendirme odasına alınmıştır. Petrilere iklimlendirme odasına alındıktan 4 gün sonra anterler içinde R ortamı bulunan petrilere

aktarılmıştır. Her 4 haftada bir anterler yeni bir R ortamına transfer edilmiştir. R ortamında yaklaşık 6-7 hafta sonra anterlerin yüzeyinde embrioidler görülmüştür. Anterler üzerinde embriyolar görülünce bu embriyolar steril koşullarda içinde yenilenmiş R ortamı bulunan petrilere aktarılmıştır. R ortamları her 3 besin ortamı için ortak kullanılmıştır. R ortamı DDVX ortamı esas alınarak hazırlanmıştır. R ortamına 0,1 mg/l kinetin ilave edilmiş, 2,4-D ve Vitamin B12 ilave edilmemiştir. Ayrıca R ortamında 30 000 mg/l sucrose kullanılmıştır. R ortamı yaklaşık 4 hafta bekledikten sonra ortamların etkinliğinin azalması nedeniyle bu ortamlar her 4 haftada bir yenilenmiştir. Bunun için taze R ortamları petrilere doldurulmuş ve anterler steril koşullarda bu petrilere aktarılmıştır. R ortamında gelişen embriyolar yine steril koşullarda içinde V ortamı bulunan cam tüplere aktarılmıştır.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan besin ortamları ile R ve V ortamlarının bileşimi

<u>Kimyasal Maddeler</u>	C Ortamları			R Ortamı	V Ortamı
	MS	B5	DDVX		
<u>Makroelementler (mg/l)</u>					
KNO ₃	1900	3000	2150	2150	1900
NH ₄ NO ₃	1650	-	1238	1238	1650
MgSO ₄ , 7H ₂ O	370	500	444	444	370
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	34	34	-
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	-	150	38	38	-
CaCl ₂ , 2H ₂ O	440	150	313	313	440
KCl	-	-	7	7	-
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	-	-	50	50	-
KH ₂ PO ₄	170	-	142	142	170
<u>Mikroelementler (mg/l)</u>					
MnSO ₄ , H ₂ O	22,300	13,200	22,130	22,130	22,300
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8.600	2.000	3,625	3,625	8.600
H ₃ BO ₃	6.200	3.000	3,150	3,150	6.200
KI	0.830	0.750	0,695	0,695	0.830
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.250	0.250	0,188	0,188	0.250
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025	0.025	0,016	0,016	0.025
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025	0.025	0,016	0,016	0.025
<u>Fe-EDTA</u>					
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O(mg/l)	37.3	37.3	18.65	18.65	37.3
FeSO ₄ , 7H ₂ O (mg/l)	27.8	27.8	13.90	13.90	27.8
<u>Vitaminler (mg/l)</u>					
Pyridoxin HCL	0.50	1.00	5,500	5,500	0.5
nicotinamic Acid	0.50	1.00	0,700	0,700	0.5
Thiamine HCL	0.10	10.00	0,600	0,600	0.1
Glycin	2.00	-	0,100	0,100	2.0
MioInositol	100.00	100.00	50,300	50,300	100.0
Vit B ₁₂	0.03	0.03	0,03	-	-
Calcium panthotenate	-	-	0,500	0,500	-
Biotine	-	-	0,005	0,005	-
<u>Karbonhidratlar</u>					
Sucrose (mg/l)	60.000	60.000	60.000	30.000	30.000
<u>Büyüme düzenleyiciler</u>					
Kinetin (mg/l)	1.0	1.0	1.0	0,1	-
2,4-D (mg/l)	1.0	1.0	1.0	-	-
<u>Agar</u>					
Agar-agar (mg/l)	8000	8000	8000	8000	8000
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

MS besin ortamı V ortamı olarak kullanılmıştır. MS besin ortamına göre sucrose miktarı 30 000 mg/l olarak alınmıştır. Ayrıca V ortamında kinetin, 2,4-D ve Vitamin B12 kullanılmamıştır. R ortamında gelişme gösteren embriyo ve V ortamındaki gelişme durumu (Şekil 3.15.) verilmiştir.



Şekil 3.15. R ve V ortamında embriyoid ve bitki gelişme durumu



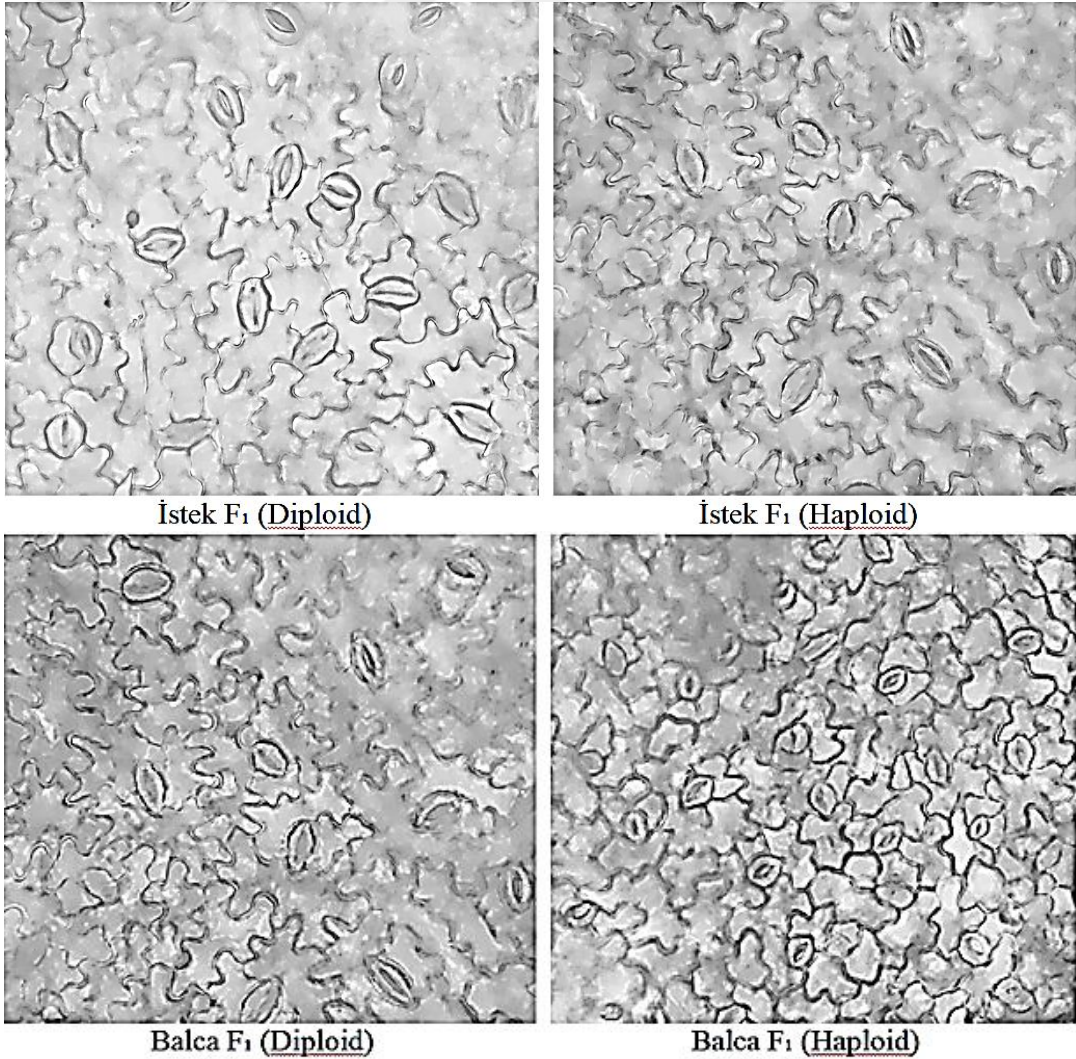
Şekil 3.16. Bitkiciklerin haploid bitkiye dönüşüncüye kadar geçirdikleri aşamalar

3.2.7. Ploidi testi (stomal inceleme)

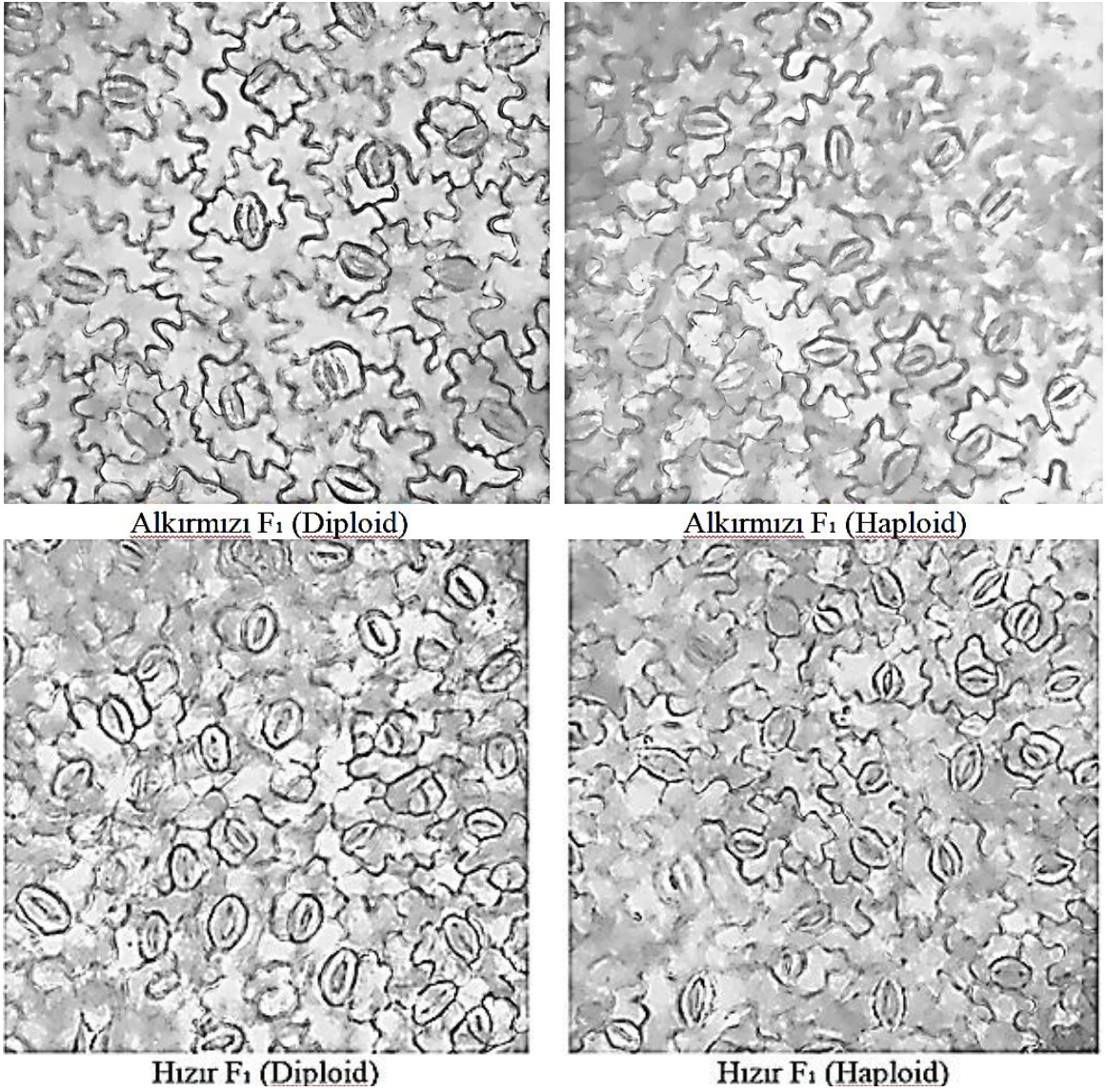
V ortamında gelişmesini tamamlayan bitkicikler dış koşullara alıştırmak için saksılara alınmıştır. İçinde 2:1 oranında torf+perlit karışımı bulunan saksılara bitkicikler dikildikten sonra üzerleri beherle kapatılarak alıştırmayı sağlanmıştır. Beherler 3 gün kapalı tutulduktan sonra bitkilerin üzeri açılmış ve iklim odasında gelişmeye bırakılmıştır.

Dış koşullara alıştıırılan ve 8-10 yapraklı aşamaya gelen bitkilerden yaprak örnekleri alınmış yaprakların alt yüzeyindeki stoma büyüklüğü ve stoma sayıları NIKON Eclipse E600 marka ışık mikroskopunda 40x100 büyütme olarak incelenmiştir. Stomal incelemede kontrol olarak her genotipin kendi diploid bitkisi kullanılmıştır. Anter kültüründen elde edilen ve haploid olduğu düşünölen bitkiler ile diploid bitkilerin görüntöleri karşılaştırılmış, kontrole göre stoma sayısı daha az ve özellikle stoma ebatları daha küçük olan örnekler haploid olarak kaydedilmiştir. Sitolojik çalışmalarda haploid bitkilerinin stomalarının diploid bitkilere göre daha fazla sayıda ve diploid bitkilere göre daha küçük olduğu bilinmektedir (Ellialtıoğlu ve ark.,2001).

Genotiplere ait stoma görüntöleri (bkz. Şekil 3.17., 3.18.) verilmiştir.



Şekil 3.17. İstek F₁ ve Balca F₁ genotiplerinde diploid ve haploid bitkilerin mikroskopik stoma görünömleri



Şekil 3.18. Alkırımı F₁ ve Hızır F₁ genotiplerinde diploid ve haploid bitkilerin mikroskobik stoma görünüşleri

3.2.8. Gözlemler:

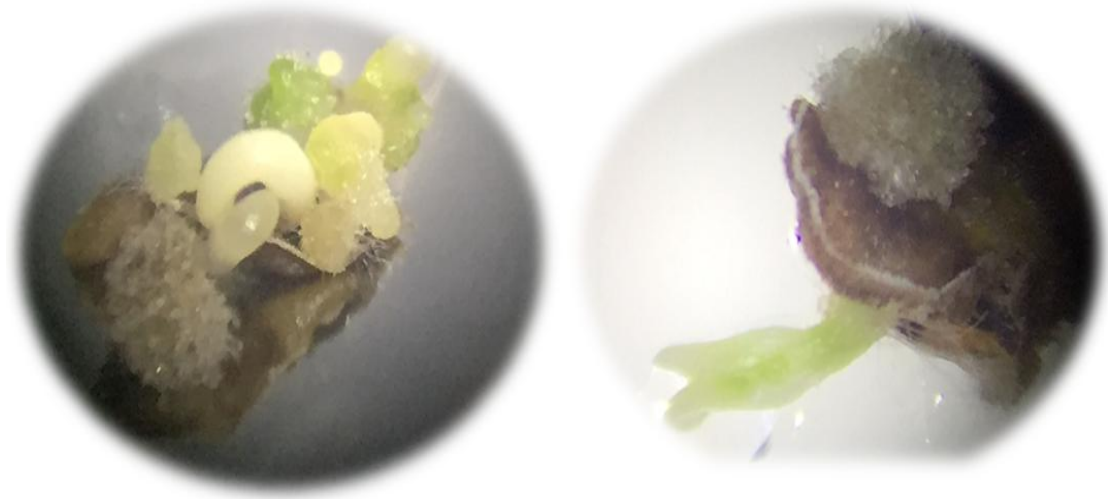
Çalışmada anterlerden elde edilen embriyo sayıları, embriyolardan elde edilen bitkicik sayıları ve dış koşullara alıştırılan bitki sayıları kaydedilmiştir. Embriyo sayıları kültüre alınan anter sayısına oranlanmış, bitkicik ve dış koşullara alıştırılan bitki sayıları kültüre alınan anter ve embriyo sayılarına oranlanmıştır. Ayrıca stomal inceleme yapılarak haploid bitki sayıları belirlenmiştir. Ayrıca genotiplere, soğuk uygulamalarına ve besin ortamlarına göre başarı oranları da hesaplanmıştır. Anter kültürü

alışmalarında sonuçların analizinde iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Kullanılan uygulamalara göre başarı oranı sıfıra kadar indiğinden uygulamalar arasındaki farklılıkların istatistiksel analizi pek tercih edilmemektedir. Bu nedenle genelde uygulamalardan elde edilen sayısal değerler ve bu verilerin anter veya embriyo sayısına oranları verilmektedir. Bu nedenle denemede başarı oranları sayı ve yüzde olarak verilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada 4 biber genotipinden alınan çiçek tomurcuklarından toplam 3600 adet anter besin ortamlarına aktarılmıştır. Anterlerin besin ortamlarına aktarılmasından 12 gün sonra tüm uygulamalarda anter gelişmesi takip edilmiştir. Kültür ortamına alınan anterlerden anormal şişme, kuruma veya bozulma olmadan canlılıklarını sürdüren anterler besin ortamlarında normal olarak gelişen anterler olarak kabul edilmiştir. Normal gelişimini sürdüren anterlere ait görüntüler (Şekil 4.1.) verilmiştir. Çalışmada genotip, besin ortamları ve tomurcuklara soğuk stresi uygulamasına bağlı olarak androgenik başarıda farklılıklar görülmüştür. En yüksek embriyo oluşumu 57 embriyo/60 anter ile İstek F₁ genotipinden DDVX ortamında ve tomurcukların 10 °C sıcaklıkta 24 saat bekletildiği uygulamadan elde edilmiştir. Denemede genotipler, besin ortamları ve soğuk şoku uygulamaları dikkate alındığında 60 uygulama kullanılmış ve bu uygulamaların 55'inden embriyo elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Normal gelişimini sürdüren İstek F₁ ve Alkırmızı F₁ genotiplerine ait anterler

4.1. Genotiplerin Uygulamalara Göre Androgenik Performansları

İstek F₁ genotipinde tüm uygulamalardan embriyo elde edilmiştir. Androgenik başarı elde edilen uygulamalarda embriyo oluşum oranı %8.33–95.00 arasında değişmiştir. Bitkiciklerin alıştırma aşamasından sonra stoma incelemeleri yapılmış

ve haploid bitki sayıları belirlenmiştir. En yüksek haploid bitki MS ortamında 10 °C 24 saat uygulamasından (60 anterden 13 haploid bitki) elde edilmiştir. Bütün uygulamalar dikkate alındığında İstek F₁ genotipinde toplamda 401 embriyo, 192 bitkicik ve 84 haploid bitki elde edilmiştir. İstek F₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki sayıları ile anter ve embriyo sayısına göre başarı oranları (bkz. Çizelge 4.1.) verilmiştir.

Balca F₁ genotipinde 2 uygulamadan embriyo elde edilememiştir. Androgenik başarı elde edilen uygulamalarda embriyo oluşum oranı %5.00 – 35.00 arasında değişmiştir. Denemede Balca F₁ genotipinde en yüksek başarı MS ortamından ve tomurcukların 10 °C sıcaklıkta 24 saat bekletildiği uygulamadan (60 anterden 21 embriyo ve 9 bitkicik) elde edilmiştir. Bitkiciklerin alıştırma aşamasından sonra stoma incelemeleri yapılmış ve haploid bitki sayıları belirlenmiştir. En yüksek haploid bitki sayısı MS ortamında 4 °C 24 saat uygulaması ile 10 °C 24 saat uygulamalarından elde edilmiştir (60 anterden 2 haploid bitki). Bütün uygulamalar dikkate alındığında Balca F₁ genotipinde toplamda 148 embriyo, 63 bitkicik ve 14 haploid bitki elde edilmiştir. Balca F₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki sayıları ile anter ve embriyo sayısına göre başarı oranları (bkz. Çizelge 4.2.) verilmiştir.

Çizelge 4.1. İstek F₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu

Ortam	Soğuk Uygulaması	E1	B1	E2	B2	B3	B4	B5	B6
MS	Kontrol	5	2	8,33	3,33	40,00			
MS	4 °C 24 saat	49	19	81,67	31,67	38,78	11	18,33	22,45
MS	10 °C 24 saat	37	25	61,67	41,67	67,57	13	21,67	35,14
MS	4 °C 48 saat	25	9	41,67	15,00	36,00	4	6,67	16,00
MS	10 °C 48 saat	28	14	46,67	23,33	50,00	6	10,00	21,43
DDVX	Kontrol	17	11	28,33	18,33	64,71	7	11,67	41,18
DDVX	4 °C 24 saat	41	16	68,33	26,67	39,02	7	11,67	17,07
DDVX	10 °C 24 saat	57	25	95,00	41,67	43,86	12	20,00	21,05
DDVX	4 °C 48 saat	12	9	20,00	15,00	75,00	2	3,33	16,67
DDVX	10 °C 48 saat	45	23	75,00	38,33	51,11	11	18,33	24,44
B5	Kontrol	8	5	13,33	8,33	62,50	2	3,33	25,00
B5	4 °C 24 saat	20	10	33,33	16,67	50,00	2	3,33	10,00
B5	10 °C 24 saat	27	11	45,00	18,33	40,74	3	5,00	11,11
B5	4 °C 48 saat	12	6	20,00	10,00	50,00	2	3,33	16,67
B5	10 °C 48 saat	18	7	30,00	11,67	38,89	2	3,33	11,11

E1: Embriyo sayısı (60 anterden)

B1: Bitkicik sayısı (60 anterden)

E2: Embriyo oluşum oranı (%)

B2: Bitkicik oluşum oranı (%)

B3: Embriyodan bitkicik oluşum oranı (%)

B4: Haploid bitki sayısı

B5: Anterdenhaploid bitki oluşum oranı (%)

B6: Embriyoidan gelişen haploid bitki oranı (%)

Çizelge 4.2. Balca F₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu

Ortam	Soğuk Uygulaması	E1	B1	E2	B2	B3	B4	B5	B6
MS	Kontrol	4	1	6,67	1,67	25,00	1	1,67	25,00
MS	4 °C'de 24 saat	13	6	21,67	10,00	46,15	2	3,33	15,38
MS	10 °C'de 24 saat	21	9	35,00	15,00	42,86	2	3,33	9,52
MS	4 °C'de 48 saat	19	7	31,67	11,67	36,84	1	1,67	5,26
MS	10 °C'de 48 saat	16	5	26,67	8,33	31,25	1	1,67	6,25
DDVX	Kontrol								
DDVX	4 °C'de 24 saat	14	5	23,33	8,33	35,71	1	1,67	7,14
DDVX	10 °C'de 24 saat	18	11	30,00	18,33	61,11	2	3,33	11,11
DDVX	4 °C'de 48 saat	7	3	11,67	5,00	42,86	1	1,67	14,29
DDVX	10 °C'de 48 saat	9	2	15,00	3,33	22,22	1	1,67	11,11
B5	Kontrol								
B5	4 °C'de 24 saat	5	4	8,33	6,67	80,00			
B5	10 °C'de 24 saat	9	4	15,00	6,67	44,44	1	1,67	11,11
B5	4 °C'de 48 saat	10	5	16,67	8,33	50,00			
B5	10 °C'de 48 saat	3	1	5,00	1,67	33,33	1	1,67	33,33
E1: Embriyo sayısı (60 anterden)		B3: Embriyodan bitkicik oluşum oranı (%)							
B1: Bitkicik sayısı (60 anterden)		B4: Haploid bitki sayısı							
E2: Embriyo oluşum oranı (%)		B5: Anterdenhaploid bitki oluşum oranı (%)							
B2: Bitkicik oluşum oranı (%)		B6: Embriyoidan gelişen haploid bitki oranı (%)							

Denemede Alkırmızı F₁ genotipi İstek F₁ genotipinden sonra en yüksek performansı gösteren ikinci genotip olmuştur. Alkırmızı F₁ genotipinde 2 uygulamadan embriyo elde edilememiştir. Embriyo elde edilen uygulamalarda embriyo oluşum oranı % 5.00- 46.67 arasında değişmiştir. Denemede Alkırmızı F₁ genotipinde en yüksek başarı DDVX ortamından ve tomurcukların 4 °C sıcaklıkta 48 saat bekletildiği uygulamadan elde edilmiştir (60 anterden 28 embriyo ve 9 bitkicik). Bitkiciklerin alıştırma aşamasından sonra stoma incelemeleri yapılmış ve haploid bitki sayıları belirlenmiştir. En yüksek haploid bitki sayısı MS ortamında 10 °C 24 saat uygulaması ile B5 ortamında 10 °C 24 saat uygulamalarından elde edilmiştir (60 anterden 5 haploid bitki). Bütün uygulamalar dikkate alındığında Alkırmızı F₁ genotipinde toplamda 177 embriyo, 80 bitkicik ve 28 haploid bitki elde edilmiştir. Alkırmızı F₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki sayıları ile anter ve embriyo sayısına göre başarı oranları (bkz. Çizelge 4.3.) verilmiştir.

Hızır F₁ genotipinde 1 uygulamadan embriyo elde edilememiştir. Androgenik başarı elde edilen uygulamalarda embriyo oluşum oranı % 3.33 –23.33 arasında değişmiştir. Denemede Hızır F₁ genotipinde en yüksek başarı B5 ortamından ve tomurcukların 10 °C sıcaklıkta 48 saat bekletildiği uygulamadan (60 anterden 14 embriyo ve 5 bitkicik) elde edilmiştir. Bitkiciklerin alıştırma aşamasından sonra stoma incelemeleri yapılmış ve haploid bitki sayıları belirlenmiştir. En yüksek haploid bitki sayısı MS ortamında 10 °C 48 saat uygulamasından elde edilmiştir (60 anterden 2 haploid bitki). Bütün uygulamalar dikkate alındığında Hızır F₁ genotipinde toplamda 100 embriyo, 35 bitkicik ve 12 haploid bitki elde edilmiştir. Hızır F₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki sayıları ile anter ve embriyo sayısına göre başarı oranları (bkz. Çizelge 4.4.) verilmiştir.

Çizelge 4.3. Alkırımızı F₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu

Ortam	Soğuk Uygulaması	E1	B1	E2	B2	B3	B4	B5	B6
MS	Kontrol								
MS	4 °C'de 24 saat	10	5	16,67	8,33	50,00	2	3,33	20,00
MS	10 °C'de 24 saat	19	10	31,67	16,67	52,63	5	8,33	26,32
MS	4 °C'de 48 saat	9	4	15,00	6,67	44,44	2	3,33	22,22
MS	10 °C'de 48 saat	15	8	25,00	13,33	53,33	3	5,00	20,00
DDVX	Kontrol	3	1	5,00	1,67	33,33			
DDVX	4 °C'de 24 saat	18	5	30,00	8,33	27,78	2	3,33	11,11
DDVX	10 °C'de 24 saat	16	9	26,67	15,00	56,25	3	5,00	18,75
DDVX	4 °C'de 48 saat	28	9	46,67	15,00	32,14	4	6,67	14,29
DDVX	10 °C'de 48 saat								
B5	Kontrol	10	4	16,67	6,67	40,00	1	1,67	10,00
B5	4 °C'de 24 saat	13	7	21,67	11,67	53,85	2	3,33	15,38
B5	10 °C'de 24 saat	18	13	30,00	21,67	72,22	5	8,33	27,78
B5	4 °C'de 48 saat	7	2	11,67	3,33	28,57			
B5	10 °C'de 48 saat	11	3	18,33	5,00	27,27	1	1,67	9,09

E1: Embriyo sayısı (60 anterden)

B1: Bitkicik sayısı (60 anterden)

E2: Embriyo oluşum oranı (%)

B2: Bitkicik oluşum oranı (%)

B3: Embriyodan bitkicik oluşum oranı (%)

B4: Haploid bitki sayısı

B5: Anterdenhaploid bitki oluşum oranı (%)

B6: Embriyodan gelişen haploid bitki oranı (%)

Çizelge 4.4. Hızır F₁ genotipinde uygulamalara göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu

Ortam	Soğuk Uygulaması	E1	B1	E2	B2	B3	B4	B5	B6
MS	Kontrol	3	1	5,00	1,67	33,33			
MS	4 °C'de 24 saat	10	2	16,67	3,33	20,00	1	1,67	10,00
MS	10 °C'de 24 saat	2		3,33					
MS	4 °C'de 48 saat	5	1	8,33	1,67	20,00	1	1,67	20,00
MS	10 °C'de 48 saat	9	6	15,00	10,00	66,67	2	3,33	22,22
DDVX	Kontrol	4	1	6,67	1,67	25,00	1	1,67	25,00
DDVX	4 °C'de 24 saat	7	3	11,67	5,00	42,86	1	1,67	14,29
DDVX	10 °C'de 24 saat								
DDVX	4 °C'de 48 saat	4	2	6,67	3,33	50,00	1	1,67	25,00
DDVX	10 °C'de 48 saat	9	1	15,00	1,67	11,11			
B5	Kontrol	10	4	16,67	6,67	40,00	1	1,67	10,00
B5	4 °C'de 24 saat	12	4	20,00	6,67	33,33	2	3,33	16,67
B5	10 °C'de 24 saat	4	3	6,67	5,00	75,00	1	1,67	25,00
B5	4 °C'de 48 saat	7	2	11,67	3,33	28,57			
B5	10 °C'de 48 saat	14	5	23,33	8,33	35,71	1	1,67	7,14

E1: Embriyo sayısı (60 anterden)

B1: Bitkicik sayısı (60 anterden)

E2: Embriyo oluşum oranı (%)

B2: Bitkicik oluşum oranı (%)

B3: Embriyodan bitkicik oluşum oranı (%)

B4: Haploid bitki sayısı

B5: Anterdenhaploid bitki oluşum oranı (%)

B6: Embriyodan gelişen haploid bitki oranı (%)

Anter kültürü çalışmalarında başarı birçok faktörden etkilenebilmektedir. Araştırmalarda birden fazla faktörün kullanıldığı durumlarda başarı oranlarında farklılıklar çıkmaktadır. Denemede uygulamalara bağlı olarak embriyo ve bitki oluşum oranları farklılıklar göstermiştir. Embriyo ve bitkicik oluşum oranı yüksek genotiplerin yanında düşük başarı gösteren genotipler de olmuştur. Aynı genotipin farklı besin ortamlarında farklı androgenik yanıtlar verdiği görülmüştür. Genotiplere göre değişen bazı uygulamalarda embriyo oluşumu yüksek olmasına rağmen, bitkiye dönüşüm oranları düşük kalmıştır. Literatürde değişik bitki türlerinde anter kültürü çalışmalarında başarı üzerine birçok faktörün etkili olduğu belirtilmektedir. Özellikle genotip ve besin ortamının bileşimi başta olmak üzere stres ve inkübasyon koşulları gibi faktörlerin de etkisiyle embriyo oluşum oranı ve bitkiye dönüşümde farklılıkların olduğu değişik araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Ochoa-Alejo ve Ramirez- Malagon (2001), Ercan ve ark., (2006) ve Kothari ve ark., (2010) biberde; Karakullukçu (1991), Karakullukçu ve Abak (1992), Salas ve ark., (2011) ve Ellialtıoğlu ve ark. (2012) patlıcanda; Smith (2013), Touraev ve Heberle-Bors (2003) ve Belogradova ve ark. (2009) tütünde; Achar (2002), Zhang ve ark., (2005) ve Cardoza ve Stewart (2004) lahanada anter kültürü ile ilgili yürüttükleri çalışmalarda androgenik başarı üzerine birçok faktörün etkili olduğunu belirtmektedirler. Literatürde bahsedilen ve anter kültürü çalışmalarında kullanılan faktörlere bağlı oluşan androgenik başarı farklılıkları denemede de benzer şekilde görülmüştür.

4.2. Genotiplere Göre Androgenik Başarı Düzeyleri

Embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu bakımından genotipler arasında önemli farklar ortaya çıkmıştır. Çalışmada kullanılan genotiplerin hepsi androgenik yanıt vermiştir. Genotiplerin ortalama performansları incelendiğinde en yüksek yanıt İstek F₁ genotipinden elde edilmiştir (900 anterden 401 embriyo, 192 bitkicik ve 84 haploid bitki). İstek F₁ genotipini 177 embriyo, 80 bitkicik ve 30 haploid bitki ile Alkırmızı F₁ ve 148 embriyo, 63 bitkicik ve 14 haploid bitki ile Balca F₁ çeşidi izlemiştir. Hızır F₁ çeşidi androgenik yanıtı en zayıf genotip olmuştur. Genotiplere göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (bkz. Şekil4.2.) verilmiştir.

Biberde anter kültürü çalışmalarında embriyo oluşumu ve haploid bitki elde edilmesinde donör bitkinin androgenik yatkınlığının önemli etkisi bulunmaktadır. Biber genotiplerinin bir kısmı anter kültürüne yanıt vermezken, yanıt veren genotiplerin sayısının daha fazla olduğu, ancak başarı oranının değiştiği araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Rodeva ve ark., 2004; Koleva-Gudeva ve ark, 2007b; Koleva-Gudeva ve ark., 2009; Irikova ve ark., 2011; Barroso ve ark., 2015). Mityko ve ark., (1995) 11 biber genotipinin DDVX ortamında androgenik başarısını inceledikleri çalışmada 2 genotip hiç sonuç vermezken, diğer genotiplerin başarı düzeyinin değiştiğini, en başarılı genotipte 100 anterden 178.2 embriyo ve 75.8 bitki elde ettiklerini, Koleva-Gudeva ve ark., (2012) 19 genotipten 12 sinin embriyo oluşturduğunu ve embriyo oluşum oranının %3.33 ile 50.55 arasında değiştiğini belirtmektedirler. Biberde 17 genotipin DDVX ortamında androgenik başarısını inceleyen Qin ve Rotino (1995), androgenik başarının genotiplere göre farklılıklar gösterdiğini, ayrıca ortam bileşenlerine bağlı olarak genotiplerin tepkilerinin değiştiğini, Rodeva ve ark., (2004) 16 biber genotipinde yürüttüğü anter kültürü çalışmasında genotiplerin direkt ve indirekt embriyogenesisine verdikleri yanıtların değiştiğini, Nervo ve ark., (1995) 12 biber genotipinde yürüttüğü anter kültürü çalışmasında kültüre aldığı 8169 anterden 3310 embriyo (%40.5) ve 512 olgunlaşmış bitki (%6.3) elde ettiklerini belirtmektedirler.

Biberde anter kültüründe başarı donör bitkinin genetik yapısının yanında biber tipine bağlı olarak ta değişmektedir. Mitykó ve Fári (1997) 4 farklı biber tipine ait 500 genotip üzerinde yürüttükleri anter kültürü çalışmasında başarı oranının %0-76 arasında değiştiğini ve en başarılı tipin dolma biber tipi olduğunu belirtmektedirler. Bizim denememizde de en yüksek başarı elde edilen İstek F₁ biber çeşidi dolmalık biber tipidir.

4.3. Besin Ortamların Göre Androgenik Başarı Düzeyleri

Embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu bakımından besin ortamlarının etkileri değişmiştir. Denemede kullanılan besin ortamlarının üçünden de yanıt alınmıştır. En yüksek başarı DDVX ortamından elde edilirken (1200 anterden 309 embriyo, 136 bitkicik ve 56 haploid bitki), DDVX ortamını hemen hemen benzer sonuçlarla MS ortamı izlemiştir (299 embriyo, 134 bitkicik ve 57 haploid bitk). B5 besin ortamı 218

embriyo, 100 bitkicik ve 27 haploid bitki ile ortamlar arasında en düşük yanıtı vermiştir. Besin ortamlarına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları Şekil 4.3.'te verilmiştir.

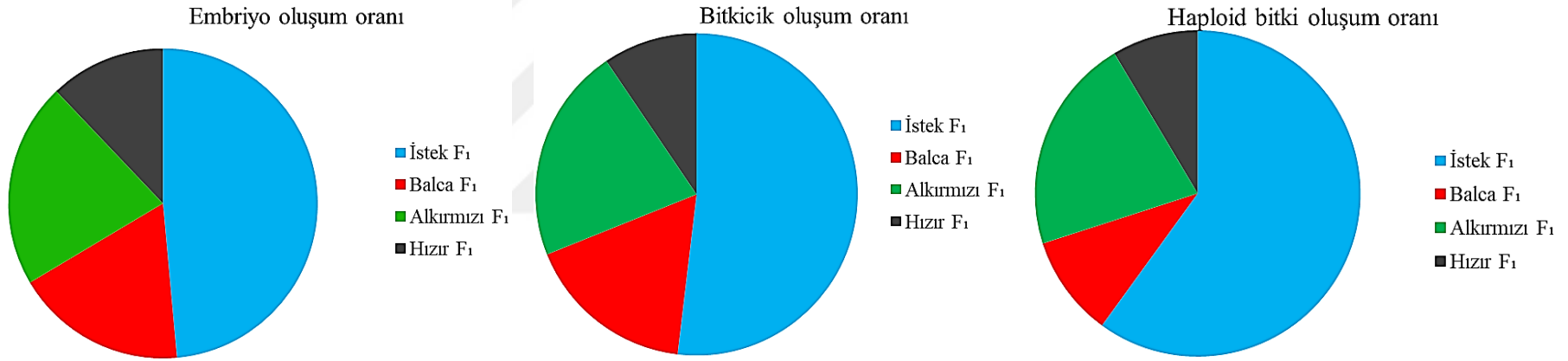
Biberde anter kültürü çalışmalarında değişik besin ortamları denemiş ve genellikle DDVX ve MS ortamları daha başarılı bulunmuştur. Dumas de Vault ve ark., (1981) ile Sibi ve ark. (1979) tarafından geliştirilen besin ortamı protokollerini karşılaştıran Irikova ve ark., (2011a) Dumas de Vault ve ark., (1981) tarafından geliştirilen DDVX ortamının daha başarılı olduğunu belirtmektedirler. DDVX (Dumas de Vault ve ark., 1981) ile Supena ve ark. (2006) tarafından önerilen protokolleri karşılaştıran Parra-Vega ve ark., (2013) androgenik başarıda DDVX ortamının daha başarılı olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca Ari ve ark., (2016) 48 biber genotipini MS, B5 ve Dolcet-Sanjuan ve ark., (1977), Supena ve ark. (2006) ve Supena ve Custers (2011) tarafından geliştirilen çift fazlı ortam (DL) protokolünde kültüre aldıkları çalışmada DL ortamının MS ve B5 ortamlarına göre oldukça başarılı olduğunu, bu ortamı B5 ve MS ortamlarının izlediğini belirtmektedirler.

4.4. Düşük Sıcaklık Stresi Uygulamalarına Göre Androgenik Başarı Düzeyleri

Donör bitkilerden alınan çiçek tomurcuklarına ön uygulama yapılması embriyo oluşumu ve bitkicik rejenerasyonunu artırmıştır. Düşük sıcaklık uygulamasında çiçek tomurcuklarının 10 °C'de 24 saat bekletilmesi en iyi sonucu vermiştir (720 anterden 228 embriyo, 120 bitkicik ve 47 haploid bitki). Bu uygulamayı 4 °C'de 24 saat uygulaması izlemiştir (720 anterden 212 embriyo, 86 bitkicik ve 33 haploid bitki). Denemede en etkisiz stres uygulaması 720 anterden 64 embriyo, 30 bitkicik ve 13 haploid bitki ile kontrol uygulamasından elde edilmiştir. Düşük sıcaklık uygulamalarının embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranlarına etkileri (bkz. Şekil 4.4.) verilmiştir.

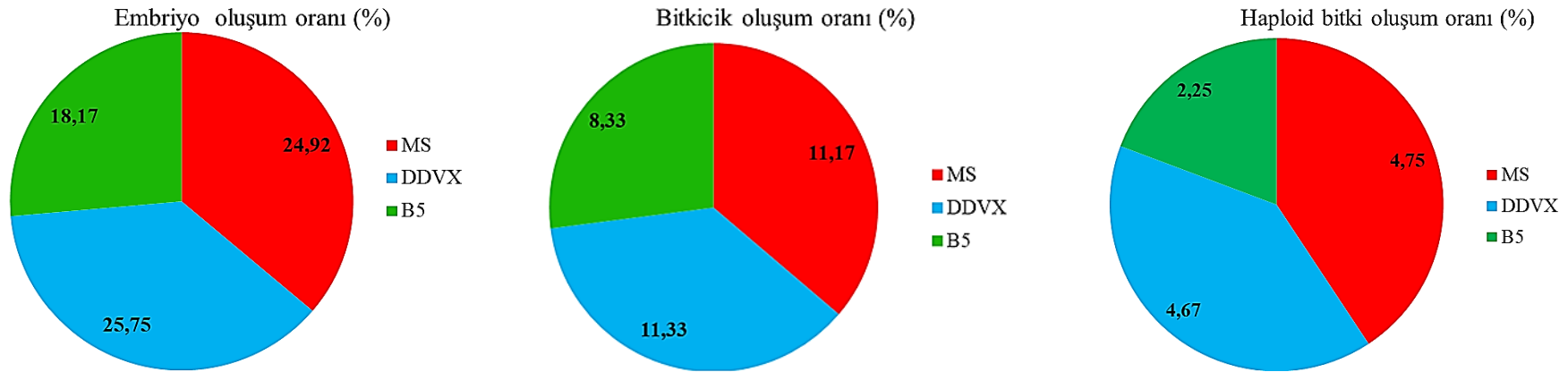
Anter kültürü ile ilgili yürütülen sitolojik çalışmalarda kültüre almadan önce anter içeren çiçek veya çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık (stres) uygulamasının mikrosporların gametofitik gelişimlerini durdurarak sporofitik gelişimlerini düzenlediği belirtilmektedir (Sunderland ve Roberts 1977; Lazar ve ark., 1985; Henry ve Buyser

1990). Bu nedenle anter kültüründe androgenik başarıda düşük sıcaklık uygulaması etkili yöntemlerden biridir. Biberde anter kültürü çalışmalarında çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulamasının embriyo oluşumunu artırdığını belirten çalışmalarda bu etkinin diğer faktörlere göre farklı düzeylerde gerçekleştiği belirtilmektedir. Morrison ve ark., (1986), biberde çiçek tomurcuklarını 4 °C’de 24, 48, 100 ve 120 saat beklettiklerinde en iyi sonucun sırasıyla 100, 48, 120 ve 24 saat uygulamalarından alındığını belirtmektedirler. Heidar ve ark., (2017), biberde çiçek tomurcuklarını 4 °C’de 24 saat bekletmenin, Liu ve ark., (2009) ise biberde çiçek tomurcuklarının düşük sıcaklıkta 3-5 gün bekletilmesinin androgenik yanıtı artırdığını belirtmektedirler. Bununla beraber çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık şoku uygulamasının etkisinin olmadığını veya olumsuz etki ettiğini savunan araştırmalar da bulunmaktadır. Çiner ve Tıprıdamaz (2002), biberde çiçek tomurcuklarına 48 ve 96 saat süreyle 4 °C soğuk şoku uygulamışlar ve ön uygulamanın androgenik başarıyı azalttığını belirlemişlerdir. Popova ve ark., (2016) 18 biber genotipine 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle 4 °C soğuk şoku uygulamışlar ve soğuk şoku uygulamasının embriyo oluşumunu kontrole göre artırmadığını, en iyi performansın kontrol grubundan elde edildiğini, ancak bazı genotiplerde 48 saat süreyle soğuk uygulamasının kontrolden daha iyi sonuç verdiğini belirtmektedirler. Ön stres uygulaması ile ilgili yürütülen çalışmalardan da anlaşılacağı gibi stres uygulamasının tek başına etkisinden çok genotip, besin ortamı ve bileşimi, uygulama zamanı ve dozunun da bu etkiye rol oynadığı anlaşılmaktadır.

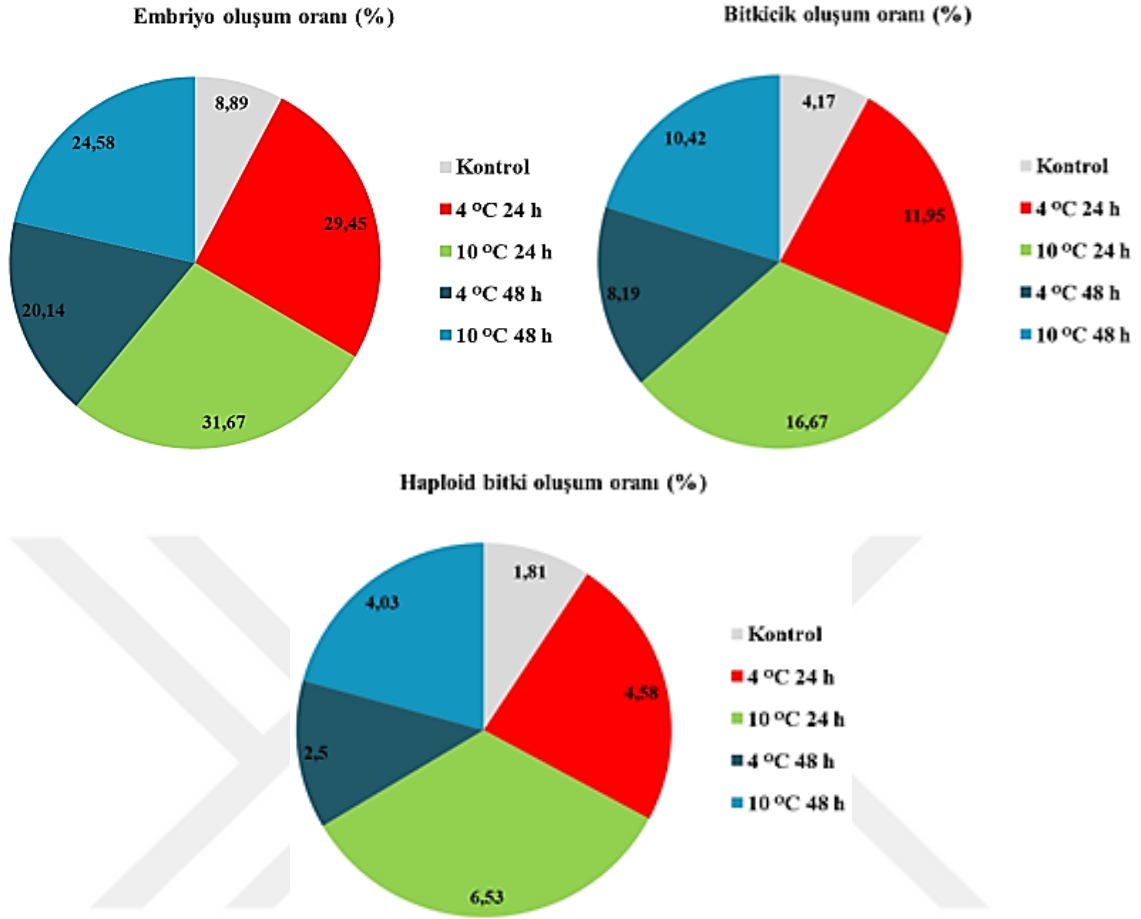


Şekil 4.2. Genotiplere göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (%)

50



Şekil 4.3. Besin ortamlarına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (%)



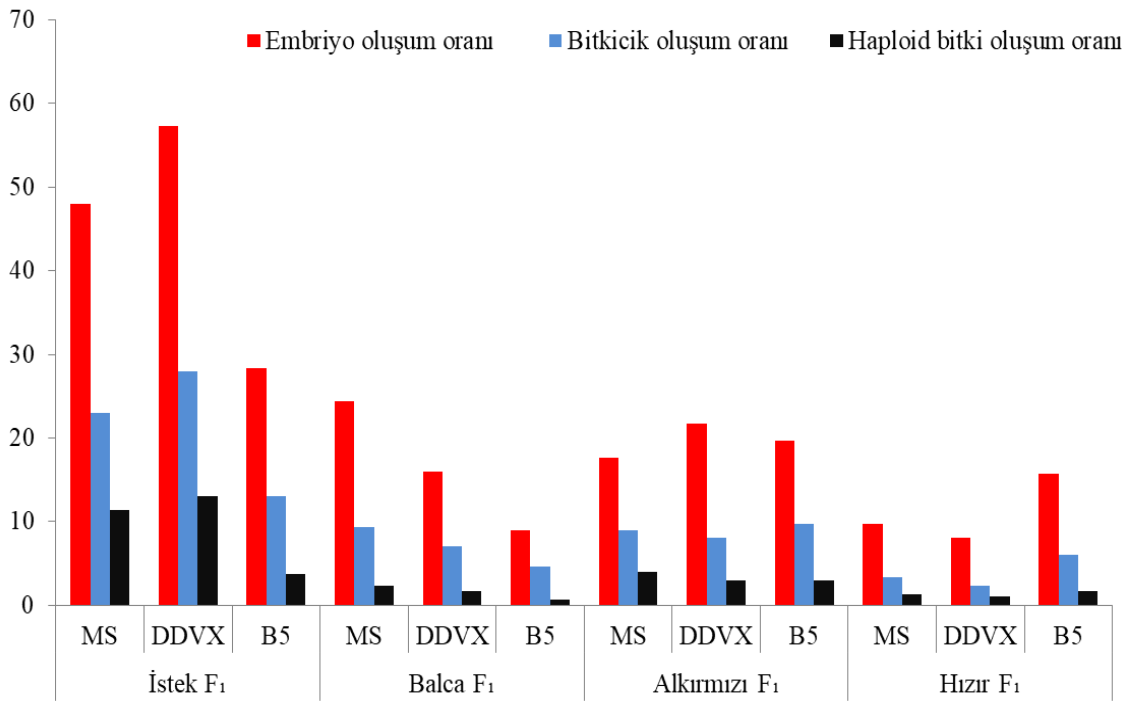
Şekil 4.4. Düşük sıcaklık uygulamalarına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (%)

4.5. Genotip x Besin Ortamı İnteraksiyonunun Androgenik Başarıya Etkisi

Genotiplerin androgenik performansları üzerine besin ortamlarının açık bir etkisi olduğu belirlenmiştir. İstek F₁ ve Alkırmızı F₁ genotipleri en yüksek androgenik performansı DDVX ortamında gösterirken, Balca F₁ genotipi MS ortamında, Hızır F₁ genotipi ise B5 ortamında daha başarılı olmuştur. Bununla beraber Alkırmızı F₁ genotipinde haploid bitki eldesi MS ortamında gerçekteşmiştir. Genotiplerin besin ortamlarına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (bkz. Şekil4.5.) verilmiştir.

Biberde anter kùltürü çalışmalarında androgenik başarıda birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir. Bu faktörler tek başına veya interaksiyon şeklinde etkilerini göstermektedirler. Denemede de genotiplerin başarıları ortamlara göre değişmiştir.

Alremi ve ark. (2014) biberde anter kültüründe MS ve DDVX ortamlarını kullanmışlar ve ortamların başarı düzeyinin genotiplere göre değiştiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar 2 genotipin DDVX ortamında daha başarılı olduğunu, diğer iki genotipin ise MS ortamında daha iyi yanıt verdiğini belirtmektedirler. Irikova ve ark., (2011a) 19 biber genotipini Dumas de Vault ve ark., (1981) ve Sibi ve ark., (1979) tarafından geliştirilen besin ortamlarında kültüre aldıkları çalışmada androgenik yanıtın genotiplere bağlı olarak değiştiğini ve genotiplerin besin ortamlarına göre performanslarının da değiştiğini belirtmektedirler.



Şekil 4.5. Genotiplerin besin ortamlarına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (%)

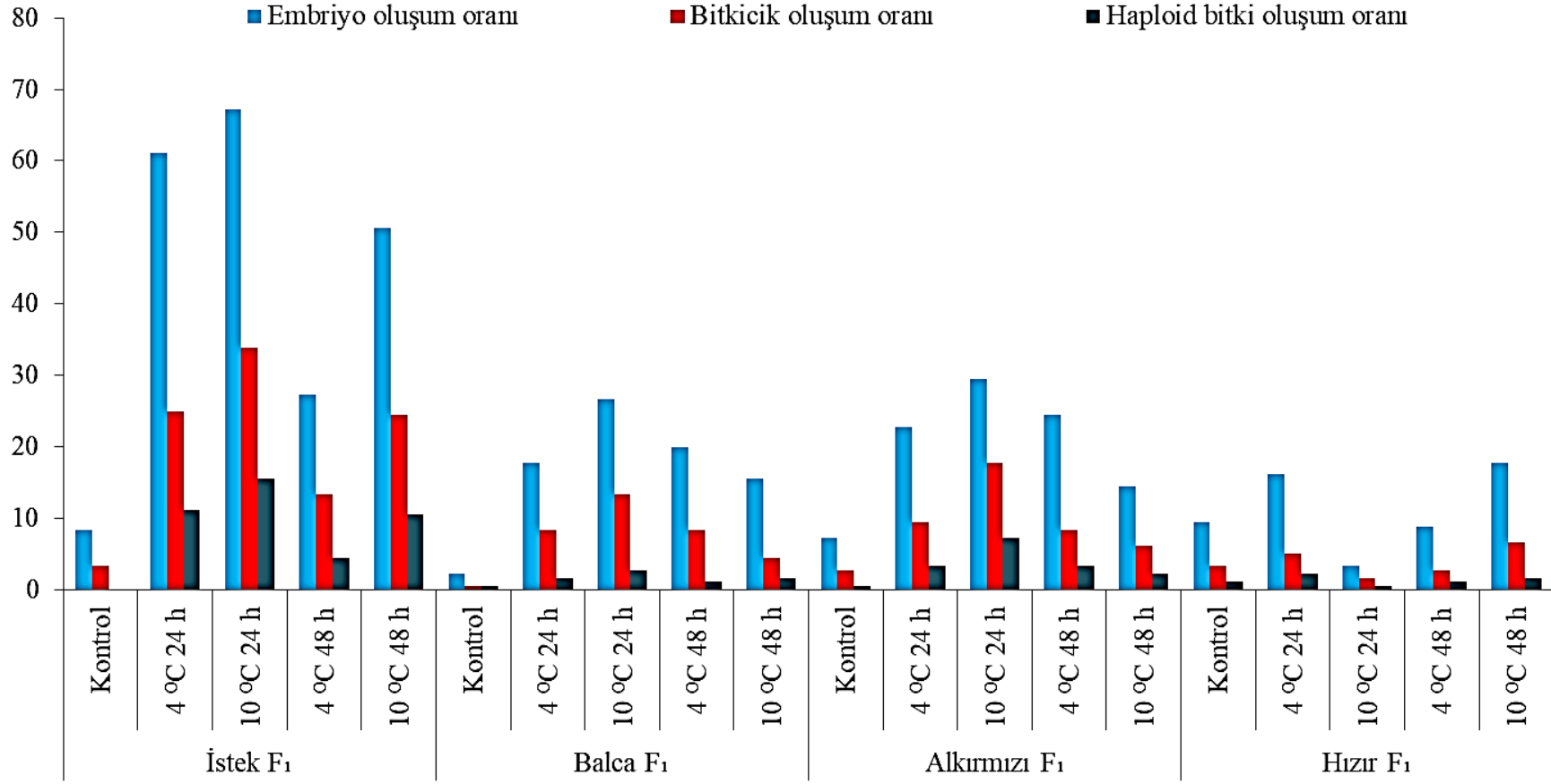
4.6. Genotip x Düşük Sıcaklık Stresi Uygulamasının Androgenik Başarıya Etkisi

Denemede çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulaması tek başına veya diğer faktörler ile birlikte embriyogenik başarıda etkili olmuştur. Genotiplerin düşük sıcaklık uygulamalarına verdikleri yanıtlarda farklılıklar görülmüştür. İstek F₁, Alkırımız F₁ ve Balca F₁ genotiplerinde en yüksek başarı 10 °C'de 24 saat uygulamasından elde edilmiştir. Bu uygulama aynı zamanda bitkicik ve haploid bitki oluşumunda da en etkili uygulama olmuştur. Hızır F₁ genotipinde ise 10 °C'de 48 saat uygulaması ile 4 °C'de 24 saat uygulaması embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumunda daha etkili olmuştur.

Denemede 4 genotipin üçünde kontrol uygulaması en düşük performansı göstermiştir. Genotiplerin düşük sıcaklık stresi uygulamasına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (bkz. Şekil 4.6.) verilmiştir.

Anter kültürü çalışmalarında embriyo oluşumunu teşvik etmek için stres uygulamasına ihtiyaç vardır (Ahmadian ve ark., 1998; Barany ve ark., 2005; Jacquard ve ark., 2006). Mikrosporların gametofitik gelişimlerini sporofitik yöne çevirmek için düşük sıcaklık, besin ortamı ayarlaması veya osmotik stres uygulamasına başvurulmaktadır (Maraschin ve ark., 2005; Koleva-Gudeva ve ark., 2009). Çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulamasın alınan yanıt; stres uygulaması, kullanılan besin ortamı ve bileşimi ve genotip başta olmak üzere birçok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir (Sibi ve ark., 1979; Morrison ve ark., 1986, Supena ve ark., 2006). Bununla beraber çiçek tomurcuklarına soğuk uygulamasının etkisinin olmadığı veya olumsuz etkisinin olduğu da bildirilmektedir (Vagera ve Havranek 1985; Munyon ve ark., 1989; Özkum ve ark., 2001; Kim ve ark., 2005).

Genotip x soğuk stresi uygulamasının anter kültüründe başarı üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda stres uygulamasının başarıyı artırdığını, ancak genotiplerin başarı düzeyinin uygulamalara göre farklılıklar gösterdiği belirtilmektedir. Thengane ve ark. (1994) ayçiçeğinde, Cistue ve ark. (1999) ise arpada, farklı genotiplere düşük sıcaklık stresi uygulamışlar ve stres uygulamasının embriyogenik başarıyı artırdığını, ancak başarı düzeyinin genotip x stres uygulamasına göre değiştiğini belirlemişlerdir.



Şekil4.6. Genotiplerin düşük sıcaklık uygulamalarına göre embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşum oranları (%)

5.SONUÇ

Islah çalışmalarında ebeveyn hatların elde edilmesinde önemli katkılar sağlayan anter kültürü son elli yıl içinde önemli mesafeler almıştır. Günümüzde artık biyoteknolojik altyapısını kuran ıslah firmaları anter kültüründen önemli faydalar sağlamaktadırlar. Biber, anter kültürüne en kolay tepki veren türlerden biridir. Biberde anter kültürü çalışmalarında halen daha eksik veya yetersiz noktalar bulunmaktadır. Başlangıca göre androgenik başarıda geline nokta çok yüksek olsa da özellikle genotipe göre başarı düzeyinde çok ciddi farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca yapılan anter kültürü çalışmalarında besin ortamlarının karşılaştırılması, genotip x besin ortamı ve genotip x ön uygulama interaksyonları konusunda yeterli araştırma bulunmamaktadır. Buradan hareketle ele alınan çalışmada değişik biber genotiplerinin farklı besin ortamı ve düşük sıcaklık uygulamalarına verecekleri androgenik tepkiler araştırılmıştır.

Denemede uygulamalara göre farklılıklar olmakla beraber bütün genotiplerden embriyo elde edilmiştir. Denemede İstek F₁, Hızır F₁, Alkırımı F₁ ve Balca F₁ genotipleri karşılaştırıldığında en iyi sonucu İstek F₁ genotipi vermiştir. Bununla beraber denemedeki 4 genotip içinde başarı sıralaması İstek F₁, Alkırımı F₁, Balca F₁ ve Hızır F₁ şeklinde gerçekleşmiştir. Androgenik başarı oranları 60 anterden elde edilen embriyo ve bitkicik sayısı ile ölçülmüş ve en yüksek sonuç alan uygulamada 60 anterden 57 embriyo, 25 bitkicik ve 12 haploid bitki elde edilmiştir (İstek F₁ genotipi DDVX ortamı 10 °C’de 24 saat uygulaması).

Genotip ortam interaksyonuna bakıldığında embriyo sayısı bakımından İstek F₁ ve Alkırımı F₁ genotipleri DDVX ortamında daha başarılı olurken, Balca F₁ genotipi MS ortamında ve Hızır F₁ genotipi B5 ortamında daha başarılı olmuşlardır. Haploid bitki sayısı bakımından genotiplerin ortamlara göre gösterdikleri tepkiler de farklı olmuştur. İstek F₁, Balca F₁ ve Hızır F₁ genotiplerinde en yüksek haploid bitki sayısı MS ortamından elde edilirken, Alkırımı F₁ genotipinde B5 ortamından elde edilmiştir

Çalışmada kullanılan üç farklı ortamdan da embriyo, bitkicik ve haploid bitki elde

edilmiştir. Ancak başarı düzeyi uygulamalara göre farklılıklar göstermiştir. Embriyo oluşumu bakımından ortamlar sıralandığında en iyi ortam MS ortamı olurken, bu ortamı DDVX ve B5 ortamları izlemiştir. Denemede MS ve DDVX ortamlarının birbirine çok yakın sonuç vermeleri dikkat çekmektedir.

Denemede anter kültüründe en etkili uygulamalardan biri de çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık stresi uygulaması olmuştur. Çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulanmayan kontrol grubunda androgenik başarı düzeyi diğer uygulamalarla karşılaştırıldığında çok düşük bulunmuştur. Embriyo ve bitkicik oluşumu bakımından 10 °C'de 24 saat bekletilen tomurcuklar en iyi sonucu verirken, bunu sırası ile 4 °C'de 24 saat ve 10 °C'de 48 saat bekletilen tomurcuk uygulamaları izlemiştir. Çiçek tomurcuklarına düşük sıcaklık uygulaması embriyo oluşumuna etki ettiği gibi haploid bitki oluşumuna da etkili olmuştur. Denemede haploid bitki oluşumu en yüksek 10 °C 'de 24 saat bekletilen tomurcuk uygulamalarından elde edilirken, bu uygulamayı 4 °C'de 24 saat bekletilen tomurcuk uygulamaları izlemiştir. Çiçek tomurcuklarına ön uygulama yapılmayan kontrol uygulaması en düşük uygulama olmuştur.

Sonuç olarak biberde değişik genotipler üzerinde farklı besin ortamları ve ön stres uygulamasının anter kültüründe başarı üzerine etkisinin incelendiği çalışmada genotiplere, besin ortamlarına ve ön uygulamalara bağlı olarak androgenik yanıtlarda farklılıklar olmuştur. Deneme sonuçları literatürde bugüne kadar yürütülen biberde anter kültürü çalışmaları ile karşılaştırıldığında embriyo, bitkicik ve haploid bitki oluşumu bakımından bazı uygulamaların literatüre göre daha başarılı olduğu, bazı uygulamaların ise literatürde belirtilen başarı oranlarının altında kaldığı görülmektedir. Anter kültüründe başarı üzerine birçok faktörün tek başına veya interaksiyonlar şeklinde etkisinin olduğu düşünüldüğünde denemede elde edilen sonuçlar normal, hatta başarılı bulunmuştur. Çalışmada elde edilen embriyo ve bitki sayılarının yanında haploid bitki sayısının düşük olması dikkat çekmektedir. Bu durum embriyoların bitkiye dönüşümünde yaşanan zorluklardan kaynaklanmıştır. Literatürde de anter kültürü çalışmalarında embriyoların bitkiye dönüşümünde zorlukların olduğu sürekli olarak tartışılmaktadır. Embriyoların bitkiye dönüşümünde başarı oranının artırılmasına yönelik yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- Abak K., Comlekcioglu N., Buyukalaca S. ve Sari N., 1998. Use of stomatal characteristics to estimate ploidy level of haploid and dihaploid pepper plants. In: Xth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant, Avignon, France, 179–182
- Abak, K., 1983. Study on the anther culture in vitro of pepper (*Capsicum annuum*). *Capsicum Newslett.* 2, 66–67.
- Ahmadian, P., Testillano, P. S., Gonzalez, P., Fadon, B., Prestamo, G., Jimenez-Duran, G. ve Risueno, M.C., 1998. Cell biology of the polen developmental program and the induction of microspore embryogenesis in *Capsicum annuum L.* In: Xth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant, Avignon, France, 183–186.
- Al Remi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S. ve Ellialtıoğlu, Ş., 2014. Effect of genotype and nutrient medium on anther culture of pepper (*Capsicum annuum L.*). *Turkish J. Agr. Natural Sci.* 1, 108-116.
- Alejo, N. O., 1992. Culture d’Antheres. In “Fondements Theoriques et Pratiques de la Culture des Tissus Vegetaux”, (C.H.Rosell, J.M. Villalobos, eds.), 61-67, Etude FAO Production Vegetale et Protection des Plantes, Rome.
- Allard, R. W., 1999. Principles of Plant Breeding (Hardcover, Revised)
- Alpsoy, HC., 1999. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Bursa.
- Alremi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S. ve Ellialtıoğlu, Ş., Biber (*Capsicum annuum L.*)’de Genotip ve Besin Ortamının Anter Kültürüne Etkileri. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1(2), 108-116.
- Anonim, 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> 23.08.2018
- Ari, E., Yildirim, T., Mutlu, N., Büyükalaca, S., Gökmen, Ü. ve Akman, E., 2016. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum L.*). *Turkish Journal of Biology*, 40(4), 944-954.
- Asakaviciute, R., 2008. Androgenesis in anther culture of Lithuanian spring barley (*Hordeum vulgare L.*) and potato (*Solanum tuberosum L.*) cultivars. *Turkish Journal of Biology*, 32(3), 155-160.
- Bajaj, YPS., 1983. In vitro production of haploids. In: Evans DA. Sharp VR. Ammirato PV. Yamada Y (eds). Handbook of Plant Cell Culture. Mc Millan Publ. Co. Vol. I Chapter 6. 228-287
- Barany, I., Gonzalez-Melendi, P., Fadon, B., Mityko, J., Risueno, M. C. ve Testillano, P. S., 2005. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum L.*): subcellular rearrangements through development. *Biol Cell* 9709–722.
- Barroso, P. A., Rêgo, M. M., Rêgo, E. R. ve Soares, W. S., 2015. Embryogenesis in the anthers of different or namental pepper (*Capsicum annuum L.*) genotypes. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 13349-13363.
- Başay, S. ve Ellialtıoğlu, Ş. Ş., 2013. Effect of genotypical factors on the effectiveness of anther culture in eggplant (*Solanum melongena L.*). *Turkish Journal of Biology*, 37(4), 499-505.

- Batygina, T. B. ve Vinogradova, G. Y., 2007. Phenomenon of polyembryony. Genetic heterogeneity of seeds. *Russian Journal of Developmental Biology*, 38(3), 126-151.
- Batygina, T. B., 2000. Genetic heterogeneity of clones in different types of apomixis in vitro and in vivo. In *IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560* (361-364).
- Belogradova, K., Lewicka, I., Heberle-Bors, E., ve Touraev, A. (2009). An overview on tobacco doubled haploids. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants (75-85)*. Springer, Dordrecht.
- Büyükalaca, S., Çömlekçiöğlü, N., Abak, K., Ekbiç, E. ve Kılıç, N., 2004. Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum L.*) haploid embryos via anther culture. *European Journal of Horticultural Science* 69,206–209.
- Cheng, Y., Ma, R. L., Jiao, Y. S., Qiao, N. ve Li, T. T., 2013. Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum L.*). *South African Journal of Botany*, 88, 306-309.
- Cistué, L., Ramos, A. ve Castillo, A. M., 1998. Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant cell, tissue and organ culture*, 55(3), 159-166.
- Çiner, D. Ö. ve Tipirdamaz, R., 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annuum L.*). *Turkish Journal of Botany*, 26(3), 131-139.
- Çömlekçiöğlü, N., Buyukalaca, S. ve Abak, K., 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum L.*). In: *XIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant*. Antalya. Turkey. pp 133–136.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveira, E. ve Huerta, A. 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum L.* effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *Journal of the American Chemical Society*. 122,468–475.
- Dong, Y. Q., Zhao, W. X., Li, X. H., Liu, X. C., Gao, N. N., Huang, J. H. ve Tang, Z. H., 2016. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant cell reports*, 35(10), 1991-2019.
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D. ve Sibi, M., 1982. Stimulation of in vitro androgenesis in pepper (*Capsicum annuum*) by elevated temperature treatments. In: Earle E., Demarly Y., (eds) *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Praeger Publication, New York, 92–98.
- Dumas de Vault, R., 1990. Haploid and pepper breeding: a review. *Capsicum Newsl* 8–9,13–17
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D. ve Pochard, E., 1981. In vitro anther culture in red pepper (*Capsicum annuum L.*): improvement of the rate of plant production in different genotypes by treatments at 35 C. *Agronomie* 1,859–864
- Dunwell, JW., 1991. Haploid Cell Cultures. In “*Plant Cell Culture: a Practical Approach*”. (R.A.Dixon. ed.). IRC Pres. Oxford. Washington D.C. 21-36.
- Elçi, Ş., 1982. Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri. *Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları*. Biyoloji: 3. Elazığ. 165s.

- Ellialtıoğlu, Ő., Sarı, N. ve Abak, K., 2002. Haploid Bitki Üretimi. (M. Babaoğlu, E. Gürel ve S. Özcan editörleri). Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s:137-189.
- Ellialtıoğlu S., Kaplan E. ve Abak K., 2001. The effect of carrot extract and activated charcoal on the androgenesis of pepper. In: XIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant, Antalya, Turkey, pp 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. Őanlıurfa. Cilt 1.121-128.
- Ercan, N., Sensoy, F. A.ve Sensoy, A. S., 2006. Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum L.*). Scientia horticulturae, 110(1), 16-20.
- Ercan, N.ve Şensoy, F. A., 2011. Androgenic responses of different pepper (*Capsicum annuum L.*) cultivars. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, (2), 59-61.
- Gamborg OL., Miller RA. ve Ojima K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50,151-158
- Geboloğlu, N. ve Çelik, M. E., 2016. Üç Burun Biber Genotiplerinde In vitro Androgenesis Yöntemi ile Dihaploid Hatların Elde Edilmesi. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, 60 sayfa. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/14.04.2018>
- Gémesné Juhász, A., Petus, M., Venczel, G., Zatyko, L., Gyulai, G. ve Cséplö, M.,2000. Genetic variability of anther donor versus spontaneous doubled haploid descendents and colchicine induced doubled haploid sweet pepper (*Capsicum annuum L.*) lines. In IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560 (149-152).
- Genovesi, A. D. ve Collins, G. B., 1982. In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. Crop Science 22,1137-1144.
- George, L. ve Narayanaswamy, S., 1973. Haploid Capsicum through experimental androgenesis. Protoplasma 78,467–480
- Gonzalez-Melendi P., Testillano PS., Ahmadian P., Fadon B., Vicente O. ve Risueno MC., 1995. In situ characterization of the late vacuolated microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in Capsicum. Protoplasma 187,60–71.
- Grozeva, S., Todorova, V., Cholakov, T. ve Rodeva, V., 2013. Effect of temperature and growth period of donor plants on pepper anther culture. In Proceedings of the Fourth International Conference, Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences, Lozenec, Bulgaria, 12-16 June 2013. Volume 1, Agriculture and Veterinary Medicine Technical Sciences, Processing & Post Harvest Technology and Logistics, Power and Machinery (60-64).
- Gyulai, G., Gémesné, J. A., Sági, Z. S., Venczel, G., Pintér, P., Kristóf, Z. ve Zatykó, L.,(2000). Doubled haploid development and PCR-analysis of F₁ hybrid derived DH-R2 paprika (*Capsicum annuum L.*) lines. Journal of plant physiology, 156(2), 168-174.
- Heberle-Bors E., 1989. Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. Sex Plant Reprod 2,1–10.
- Heidari, A. A., Shariatpanahi, M. E., Mousavi, A. ve Kalatejari, S. 2017. Efficient Androgenic Embryo Induction and Plant Regeneration in Different Genotypes

- of Sweet Pepper via Anther Culture. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(1), 23-30
- Henry, Y. ve Buysen, J. de, Wheat Anther Culture: Agronomic Performance of Doubled Haploid Lines and the Release of a New Variety “Florin.” *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1990; 13,285–352.
- Henry, Y. ve Buysen, J., 1990. Wheat Anther Culture: Agronomic Performance of Doubled Haploid Lines and the Release of a New Variety “Florin.” *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1990; 13, 285–352..
- Irikova T., 2008. Obtaining and genotype investigations of androgenic haploids from Bulgarian pepper (*Capsicum annuum L.*) varieties. PhD thesis, University of Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria, 199.
- Irikova, T. ve Rodeva, V., 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum L.*): the effect of nutrient media. *Capsicum Eggplant Newsl*, 23, 101-104.
- Irikova, T. ve Rodeva, V.,2005. The effect of silver nitrate on in vitro embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum L.*) anther culture. *Genet. Breeding* 34,33–38.
- Irikova, T., Grozeva, S., Popov, P., Rodeva, V. ve Todorovska, E., 2011a. In Vitro Response of Pepper Anther Culture (*Capsicumannuum L.*) Depending on Genotype, Nutrient Medium and Duration of Cultivation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(4), 2604-2609.
- Irikova, T., Grozeva, S. ve Rodeva, V., 2011b. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum L.*) in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), 1559-1570.
- Ishii, T., Karimi-Ashtiyani, R. ve Houben, A., 2016. Haploidization via chromosome elimination: means and mechanisms. *Annual review of plant biology*, 67, 421-438.
- Jacquard, C., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Devaux, P., Baillieul, F. ve Clement, C., 2006. Plant defense mechanisms are triggered in the anther during the pre-treatment process. In: *The international conference haploids in higher plants III*, Vienna, Austria, 12–15 February 2006, 29.
- Kao KN. ve Horn D.,1999. Practical improvement to microspore culture. *PBI Bulletin*, Jan 99. Available via <http://www.pbi.nrc.ca/bulletin/jan99/improve.html>.
- Karakullukçu, Ş. 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde in vitro Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Ankara. 131s.
- Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S. ve Büyükalaca, S., 2015. Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. *HortScience*, 50(11), 1671-1676.
- Keller, W. A., 1984. Anther Culture of Brassica spp. In I. K., Vasil Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, 1, Academic Press, New York. 825
- Kim JY., Kim YS., Yi G. ve Kim K.M., 2005. Anther culture of transgenic pepper (*Capsicum annuum L.*). *Korean J Breed* 37,241–246.
- Kim M., Kim J., Yoon M, Choi DI. ve Lee K.M., 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum L.*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 77,63–72.
- Kim, M., Jang, I., Kim, J., Park, E., Yoon, M. ve Lee, Y., 2008. Embriyogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annum L.*) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.* 27,425-434.

- Kim, M. Z., 1999. The influence of temperature pretreatment on the production of microspore embryos in anther culture of *Capsicum annuum* L. Korean Journal of Plant Tissue Culture.
- Koleva Gudeva, L., 2003. The influence of incubation treatment on androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). Yearbook of Institute of Southern Crops, Strumica, R. of Macedonia, 3, 87-94.
- Koleva-Gudeva, L., Spasenoski, M. ve Trajkova, F., 2007a. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media. Sci Horti 111,114–119.
- Koleva-Gudeva, L., Trajkova, F. ve Spasenoski, M., 2007b. Effectiveness of androgenesis induced in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). Progress in Research on Capsicum and Eggplant.
- Kristiansen, K. ve Andersen, S. B., 1993. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. Euphytica 67,105–109.
- Lantos C., Gemes AJ., Somogyi G., Otvos K., Vagi P., Mihaly R., Kristof Z., Somogyi N. ve Pauk J., 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. Plant Cell Tissue Organ Cult 97,285–293.
- Lazar, M.D., Schaeffer, G.W. ve Baenziger, P.S., 1985. The physical environment in relation to high frequency callus and plantlet development in anther cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. Journal of plant physiology, 1985; 121(2), 103–109.
- Lihao, W., Baoxi, Z., Jiazhen, G., Guimei, Y. ve Meizhen, D., 2004. Studies of Effects of Several Factors on Anther Culture of *Capsicum annuum* L. Acta Horticulturae Sinica, 31(2), 199-204.
- Liu, F., Zhao, H., Chen, B. ve Zhang, Y.Y., 2007. Embryogenesis of microspore derived multicells in *Capsicum annuum* L. Fen Zi Xi Bao Cheng Wu Xue Bao 40,371-379.
- Liu, G. X., Zhang, X. W., Jiang, W. S., Yuan, Y. X. ve Yaq, Q. J., 2009. Effects of Temperature and Additives in Medium on Embryoid Induction in Anther Culture of Pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 5, 029.
- Ltifi, A. ve Wenzel, G., 1994. Anther culture of hot sweet pepper (*Capsicum annuum* L.): influence of genotype and plant growth temperature. Capsicum Eggplant Newsletter, 13,74-77.
- Maraschin, S. F., W.de Priester, Spaink, H. P. ve Wang, M., 2005. Journal of Experimental Botany, Volume 56, Issue 417, 1 July 2005, Pages 1711–1726.
- Matsubara, S., Yamamoto, M., Man-Hyun, J., Murakami, K. ve Man, HJ., 1998. Embryoid and callus formation from microspores by anther culture from July to November in pepper (*Capsicum annuum* L.). Sci Rep Faculty Agric Okayama Univ 87,117-112.
- Mityko J, Fari M., 1997. Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture. Acta Horti 447,281–287.

- Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G. ve Fari, M., 1995. Anther culture response in different genotypes and F₁ hybrids of pepper (*Capsicum annum L.*). *Plant Breed* 114,78-80.
- Morrison R.A., Koning E.R. ve Evans D.A., 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *J Plant Physiol* 126,1-9
- Morrison, R. A., Koning, R. E. ve Evans, D. A., 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *Journal of plant physiology*, 126(1), 1-9.
- Munyon I.P., Hubstenberger J.F. ve Phillips G.C., 1989. Origin of plantlets and callus obtained from Chile pepper anther cultures. *In Vitro Cell Dev Biol* 25,293-296.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tabacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nervo, G., Azzimonti, M. T., Bonelly, A. ve Tamietti, G., 2007. Application of in vitro anther culture methods to a pepper breeding program for disease resistance. In: *Proceeding of the 51st Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Riva del Granda, Italy*
- Nervo, G., Carannante, G., Azzimonti, M. T. ve Rotino, G. L., 1995. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In *Current issues in plant molecular and cellular biology* (155-160). Springer, Dordrecht.
- Niklas-Nowak, A., Olszewska, D., Kisiała, A. ve Nowaczyk, P., 2012. Study of individual plant responsiveness in anther cultures of selected pepper (*Capsicum spp.*) genotypes. *Folia Horticulturae*, 24(2), 141-146.
- Nitsch, J. P. ve Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163,85-87.
- Novak F., 1974. *Capsicum* haploids. *Z Pflanzenzeucht* 72,46-54.
- Nowaczyk P. ve Kisiała A., 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annum L.* anther culture. *J Appl Genet* 47,113-117.
- Nowaczyk, L., Nowaczyk, P., Olszewska, D. ve Niklas-Nowak, A., 2015. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pretreatment of *Capsicum spp.* donor plants on the anther culture efficiency of lines selected by capsaicinoid content. *BTA JBCBB* 96, 179-183.
- Nowaczyk, P., Olszewska, D. ve Kisiała, A., 2009. Individual reaction of *Capsicum* F₂ hybrid genotypes in anther cultures. *Euphytica* 168, 225-233.
- Olszewska, D., Kisiała, A., Niklas-Nowak, A., ve Nowaczyk, P. (2014). Study of in vitro anther culture in selected genotypes of genus *Capsicum*. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 118-124.
- Ouyang, J. W., He, D. G., Feng, G. H. ve Jia, S. E., 1987. The response of anther culture to culture temperature varies with growth conditions of anther-donor plants. *Plant Science*, 49(2), 145-148.
- Özkum D., Tipirdamaz R. ve Ellialtioglu S., 2001. The relationship between the endogenous abscisic acid content of anthers and in vitro androgenesis in pepper (*Capsicum annum L.*). *Acta Horti* 560,327-329.
- Özkum, D. ve Tipirdamaz, R., 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annum L.*). *Turkish Journal of Biology* 26,131-139.
- Özkum, D. ve Tipirdamaz, R., 2007. Effects of silver nitrate, activated charcoal and cold treatment on the in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annum L.*). *Acta Horticulturae* 729, 133-136.

- Özkum, D. ve Tipirdamaz, R.. 2010. Effects of L-proline and cold treatment on pepper (*Capsicum annuum L.*) anther culture. In *Survival and Sustainability* (pp. 137-143). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Paksoy, M., Ellialtioglu, S., Sari, N. ve Abak, K., 1995. Factors effecting in vitro culture of the anthers of some Brassica species. *Turkish Journal of Botany* (Turkey).
- Parra-Vega, V., González-García, B. ve Seguí-Simarro, J.M., 2013b. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum L.*). *Acta Physiol Plant* 35, 627- 633.
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A. ve Seguí-Simarro, J.M., 2013a. Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum L.*). *Plant Cell Tiss Organ Culture* 112, 353-360.
- Pauk, J., Lantos, C., Somogyi, G., Vagi, P., Abraham, T. Z. Gemes, J. A., Mihaly, R., Kristof, Z., Somogyi, N. ve Timar, Z. 2010. Tradition, quality and biotechnology in Hungarian spice pepper (*Capsicum annuum L.*) breeding. *Acta Agron Hung* 58(3),259–266.
- Phillips G.C., Tanksley S.D., Munyon I., Hubstenberger J.F., 1984. Influence of incubation environment and genotype on anther culture of Chile pepper (*Capsicum annuum L.*). *In Vitro* 20,277.
- Pierik, R.L.M., 1987. *In vitro Culture of Higher Plants*. Marthinus Nijhoff Publ. Dordrecht. Boston. Lanchaster. 344.
- Pochard, E. ve Dumas de Vaulx, R., 1979. Haploid parthenogenesis in *Capsicum annuum L.* In *Linnean Society symposium series*.
- Popova, T., Grozeva, S., Todorova, V., Stankova, G., Anachkov, N. ve Rodeva, V., 2016. Effects of low temperature, genotype and culture media on in vitro androgenic answer of pepper (*Capsicum annuum L.*). *Acta physiologiae plantarum*, 38(11), 273.
- Prayantini, D. C., 2006. Anther culture in hot pepper (*Capsicum annuum L.*). http://libntrs.avrdc.org.tw/scripts/minisa.dll/144/VAVLIB/VAVLIB_SDI_REPORT/S
- Pretova A., Ruijter N.C.A., Van Lammeren AAM. ve Schel JHN 1993 Structural observation during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype of *Zea mays L.* *Euphytica* 65,61–69.
- Qin, X. ve Rotino, G. L., 1995. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. *Acta Hortic.* 402, 313-316.
- Rashid, A., 1983. Pollen dimorphism in relation to pollen plant formation. *Physiol. Plant.* 58, 544-548.
- Reinert, J. ve Bajaj, Y. P. S., 1977. Anther Culture: Haploid Production and Its Significance. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag. Berlin. 251-267.
- Rodeva V., Koleva-Gudeva L., Grozeva S. ve Traikova F., 2007. Obtaining of haploids in anther culture of pepper *Capsicum annuum L.* and their including in the breeding process. *Goce Delchev Univ Stip Fac Agric Yearbook* 7,7–17.
- Rodeva, V. N., Irikova, T. P. ve Todorova, V. J. 2004. Anther cultue of pepper (*Capsicum annuum L.*): comparative study on effect of the genotype. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 18(3), 34-38.

- Rodeva, V., 2001. In vitro regeneration in anther culture of pepper (*Capsicum annum* L.). *Sci Works Agricult Univ. Plovdiv* 3,211-214.
- Rodeva, V., ve Cholakov, T., 2006. Influence of some climatic factors in the period of donor plants growing on responsiveness of pepper anthers to embryogenesis. In: *The international conference haploids in higher plants III*. Vienna. Austria. 12-15 February 2006. 42p.
- Roshany, G., Kalantarai, S., Naderi, R. ve Hassani, M. E., 2013. Callus formation via anther culture in *Capsicum annum* L. with differences in genotypes. media and incubation temperature. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences* 3, 3847-3853.
- Sauton, A. ve Dumas de Vault, R., 1987. Production of haploid plants in melon (*Cucumis melo* L.) as a result of gynogenesis induced by irradiated pollen. *Agronomie*, 7(2), 141-147.
- Sayılır, A. ve Özzambak, E., 2002. Biber anter kültüründe uygun tomurcuk büyüklüğü tespiti ile besin ortamları karışımlarının ve soğuk uygulama sürelerinin embriyo verimine etkisi üzerine bir araştırma. IV. Sebze Tarımı Sempozyumu. Bursa.
- Seguí-Simarro, J. M., 2010. Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76(3), 377-404.
- Sibi, M., Dumas de Vault, R. ve Chambonnet, D., 1979. Obtention de plantes haploides par androgenese in vitro chez le piment (*Capsicum annum* L.). *Ann.Amelior.Plant.* 29(5), 583-606.
- Sopory S. K., Jacobsen E. ve Wenzel G.,1978. Production of monohaploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*. *Plant Sci Lett* 12:47-54.
- Sunderland, N. ve Roberts, M., 1977. New approach to pollen culture. *Nature*, 1977; 270, 236– 238.
- Sunderland, N., Xu, ZH. ve Huang, B., 1981. Recent advances in barley anther culture. In: *Barley Genetics IV. Proc. 4th Int. Barley Genetics Symp.*. Edinburgh Univ. Press. Edinburgh. 699-703.
- Supena, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E. ve 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 reports*, 25(1), 1-10.
- Taşkın, H., 2005. Different applications to improve the embryo quality on stimulation of embryo by anther culture in some pepper genotypes.
- Telmer C.A., Simmonds D.H. ve Newcombe W., 1992. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol Plant* 84, 417–424.
- Terzioğlu, Ş., Ellialtıoğlu, Ş. ve Abak, K., 2000. İnkübasyon koşullarının biber anter kültüründe embriyo oluşumu üzerine etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu. 11-13 Eylül 2000. Isparta. s: 233-238.
- Thengane, S. R., Joshi, M. S., Khuspe, S. S. ve Mascarenhas, A. F., 1994. Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. *Plant cell reports*, 13(3-4), 222-226.
- Thomas, T. D., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology advances*, 26(6), 618-631.

- Tipirdamaz, R. ve Ellialtioglu, S. 1998. The effects of cold treatments and activated charcoal on ABA contents of anthers and in vitro androgenesis in eggplant (*Solanum melongena L.*). In 1st Balkan Botanical Congress, Thessaloniki (Greece), 19-22 Sep 1997. Kluwer Academic Publishers.
- Tsay, H. S., Miao, S. H. ve Widholm, J. M., 1986. Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture. *Journal of plant physiology*, 126(1), 33-40.
- Vagera, J. ve Havranek, P., 1985. In vitro induction of androgenesis in *Capsicum annuum L.* and its genetic aspects. *Biologia plantarum*, 27(1), 10-21.
- Vicente O., Benito Moreno R.M. ve Heberle-Bors E., 1991. Pollen cultures as a tool to study plant development. *Cell Biol Rev* 25,295–305.
- Wang, L. H. ve Zhang, BX., 2001. Advancement in the anther culture of *Capsicum annuum L.* *China Veg* 3,52-53
- Wang, Y. Y., Sun, C. S., Wang, C. C. ve Chien, N. J. 1973. The induction of pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* anther culture. *Sci Sin* 16,147–15.
- Wenzel, G. ve Uhrig, H., 1981. Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 59, 333-340.
- Yang, B. Z., Zhou, S. D., Zhang, Z. Q., Dai, X. Z., Li, L. H. ve Xie, D. P., 2009. Effects of different medium and hormone on cultured anther of hot pepper [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 1, 018.
- Zhao, J., Zhou, X., Zhang, Z., Yang, B. ve Zhou, S., 2010. Effects of culture media on anther culture of chili pepper (*Capsicum annuum L.*). *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)* 36, 181-184.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Büşra ÖZSOY
Doğum Tarihi ve Yeri	01.03.1992 – YOZGAT
E-posta	Busraylmz7@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Tokat Gaziosmanpaşa Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü	2016
Lise	Anadolu Ticaret Meslek Lisesi/ YOZGAT	2010