T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİBERDE ANTER KÜLTÜRÜ UYGULAMALARININ *IN VITRO* ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Münevver AĞCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Nisan-2021
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Münevver AĞCA

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİBERDE ANTER KÜLTÜRÜ UYGULAMALARININ *IN VITRO* ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Münevver AĞCA

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Ertan Sait KURTAR

2021, 39 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Ertan Sait KURTAR
Doç. Dr. Ercan EKBİÇ
Dr. Öğr. Üyesi Musa SEYMEN

Bu çalışma genotip, besin ortamları ve inkübasyon koşullarının 12 biber genotipinde (*Capsicum annuum* L.) anter kültüründe haploid bitki oluşumuna etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Öncelikle tomurcuklar +4 ^{o}C'de 1 gün ön soğuk uygulamasına tabi tutulmuş, yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra 3 farklı ortamda (O1, O2 ve O3) kültüre alınmıştır. Sonuçlar uygulamaların anterlerin gelişimi, embriyo ve bitkicik rejenerasyonu üzerine farklı etkilerin olduğunu göstermiştir. Anter gelişim oranında genotipler açısından en düşük değer % 2.47 ile SÜ-31 (Çarliston tipi) genotipinden elde edilirken, en yüksek değere % 12.79 ile Flinta F1 (sivri biber) sahip olmuştur. Ortamlar açısından en yüksek anter gelişim oranları O2 ortamından elde edilmiş, bu ortamda Dolphin çeşidi % 25.0 ile en yüksek değeri vermiştir. Embriyo sayısı açısından Dolphin 8 adet embriyo ve 5 adet bitki ile en fazla embriyo ve bitkinin elde edildiği çeşit olurken Flinta F1 ve SÜ-34 genotiplerinden embriyo ve bitki elde edilememiştir. Kültüre alınan 2868 anterden 195'i gelişim göstermiş ve gelişim oranı % 6.8 olarak gerçekleşmiştir. Toplamda 37 embriyo ve 18 bitki elde edilmiş frekansları ise sırasıyla % 1.29 ve % 0.63 olmuştur. Stomatal gözlemler sonucunda elde edilen bitkilerden 13 tanesinin haploid olduğu belirlenmiş ve bitkiler % 0.05'lik kolhisin ile dihaploid hale getirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anter kültürü, besin ortamı, biber, genotip

ABSTRACT

MS THESIS

THE EFFECTS OF ANTHER CULTURE APPLICATIONS ON *IN VITRO* ANDROGENESIS IN PEPPER

Münevver AĞCA

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
HORTICULTURE

Advisor: Prof. Dr. Ertan Sait KURTAR

2021, 39 Pages

Jury
Prof. Dr. Ertan Sait KURTAR
Assoc. Prof. Dr. Ercan EKBİÇ
Ass. Prof. Dr. Musa SEYMEN

This study was conducted to determine the effects of genotype, media composition and incubation condition on haploid plant formation in anther culture in 12 pepper genotypes (*Capsicum annuum* L.). Firstly, the buds were kept at +4 ^{o}C for 1 day in pre-cold treatment, then they were subjected to surface sterilization process and were cultured in 3 different medium compositions (O1, O2 and O3). The results showed that the treatments had different effects on the development of anthers, embryo and plantlet initiation. In terms of genotypes, the lowest value was obtained from SU-31 (Charleston type) genotype with 2.47%, while Flinta F1 (long pepper) genotype had the highest value with 12.79% in anther growth rate. In terms of media, the highest anther growth rates were obtained from O2 medium, and Dolphin variety produced the highest value with 25.0 %. , Dolphin variety was the prominent genotype which has the most embryos and plantlets with 8 embryos and 5 plants, respectively. Besides, Flinta F1 and SU-34 genotypes did not produce embryos and plants. Of the 2868 anthers taken into the culture, 195 anthers developed and the rate of development was 6.8 %. A total of 37 embryos and 18 plants were obtained, with frequencies of 1.29% and 0.63%, respectively. As a result of the stomatal observations, 13 plants were determined as haploid and the haploid plants were transformed to dihaploid at a dose of 0.05% colchicine.

Keywords: Anther culture, culture medium, pepper, genotype

ÖNSÖZ

Akademik eğitim sürecimin bir üst noktası olan Yüksek Lisans tez konumun belirlenmesi, hazırlanması, yazımı ve bu çalışmanın her aşamasında bilgi, öneri, deneyim, görüş, yardım ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Ertan Sait KURTAR'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans öğrenim hayatım süresince bana yardımcı olan, her türlü bilgi ve desteği paylaşmaktan hiç çekinmeyen, tecrübeleriyle daima yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Önder TÜRKMEN'e ve Dr.Öğr.Üyesi Musa SEYMEN'e saygı ve teşekkürü arz etmeyi bir borç bilirim.

Eğitim öğretim süresince bana sonuna kadar maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan ve koşulsuz yanımda olan başta babam ve annem olmak üzere aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca, destek ve yardımlarıyla yanımda olan Arş.Gör. Mert İLHAN ve değerli ailesi, ziraat mühendisi Gülbanu KIYMACI, Arif Selim ARICI, Vahide ZENGİN, Neslihan İSSİ ve Yüksek ziraat mühendisi Banu PARLAK ve Fırat UZUN'a, Laboratuar çalışmalarımda yardımlarını gördüğüm Arş.Gör. Zeynep NAS'a teşekkürlerimi sunarım.

Münevver AĞCA
KONYA-2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **x**

1.GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **11**

3.1. Materyal 11
3.1.1. Donör Genotipler ve Özellikleri 11
3.2. Yöntem 12
3.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi 12
3.2.2. Anterlerde Uygun Mikrospor Aşamasının Belirlenmesi 15
3.2.3. Kullanılan Besin Ortamları ve İçerikleri 16
3.2.4. Çiçek Tomurcuklarının Dezenfeksiyonu ve Anterlerin Çıkarılması 18
3.2.5. Ön Uygulamalar ve Bitkilerin Eldesi 19
3.2.6. Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması (Aklimatizasyon) 20
3.2.7. Ploidi Düzeyinin Tespiti ve Dihaploidizasyon (kromozom katlama) Çalışmaları 21
3.2.8. Gözlemlerin Alınması ve Değerlendirilmesi 22

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **23**

4.1. Genotip ve Ortamların Anter Gelişimi Üzerine Etkileri 23
4.2. Genotip ve Ortamların Embriyo Oluşumu ve Bitkiye Dönüşüm Üzerine Etkileri 25
4.3. Kullanılan Ortamların Androgenesis Üzerine Etkileri 28
4.4. Ploidi Testlemeleri ve Dihaploidizasyon Çalışmaları 29

KAYNAKLAR **34**

ÖZGEÇMİŞ **38**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 1. Denemede kullanılan genotipler 11
Şekil 3.2.Çimlenmekte olan tohumlar (üst sol), gelişmekte olan (üst sağ) ve şaşırtılmış fideler (alt). 13
Şekil 3. 3. Seraya dikilmiş fideler ve büyümekte olan bitkiler. 14
Şekil 3. 4. Serada gelişmekte olan bitkilerin yabancı ot temizliği. 15
Şekil 3. 5. Uygun tomurcuk boyutunun tespiti(solda), Tek çekirdekli mikrosporlar(Sağda). 16
Şekil 3. 6. Kültür için uygun tomurcuğun mikroskopta görüntüsü. 16
Şekil 3. 7. Steril kabin içerisinde besin ortamları ve ekipmanlar 18
Şekil 3. 8. . Steril kabin içinde tomurcukların sterilizasyonu 18
Şekil 3. 9. Tomurcuklardan anterlerin ayrılması ve ortama yerleştirilmesi 19
Şekil 3. 10. . İklim dolabında karanlık koşullarda inkübe edilen anterler (sol) ve iklim odasında gelişmekte olan anterler (sağ) 19
Şekil 3. 11. Büyütülmekte olan bitkiler (sol) ve mikro çelikleme yapılmış bir bitki (sağ). 20
Şekil 3. 12. Torf-perlit karışımına alınan bitkicik (sol) ve dış koşullara alıştırılan bitkicikler (sağ) 20
Şekil 3. 13. . Dış koşullara alıştırılmış bitkiler 21
Şekil 3. 14. Bitkilere kolhisin uygulama aşamaları 22

Şekil 4.1. Kallus oluşturmuş anterler (sol), anterden gelişen bir embriyo (sağ). 23
Şekil 4. 2. Embriyonun mikroskop görüntüsü (sol) ve anter üzerinde gelişmiş bir bitkicik (sağ). 23
Şekil 4. 3.Haploid (sol) ve diploid (sağ) bitkilere ait stomalar 30
Şekil 4. 4. Haploid (sol) ve diploid (sağ) bitkiler 30

ÇİZELGELER

Çizelge 3. 1. Sera 0-30 cm derinlikteki toprak analiz sonuçları 14
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan protokoller ve detayları. 16
Çizelge 3. 3. Kültür aşamasında kullanılan ortamların orijinal içerikleri 16

Çizelge 4. 1. Genotiplere ve besi ortamlarına göre kültüre alınan anter sayısı (AS), gelişim gösteren ve kallus oluşturan anter sayısı (KAS) gelişim gösteren anter yüzdesi (% GAS) 24
Çizelge 4. 2. Genotiplere ve besi ortamlarına göre embriyo sayısı (ES), embriyo frekansı (% EF), bitki sayısı (BS), bitki frekansı (% BF) ve bitkiye dönüşüm oranı (% BDO)……..... 26
Çizelge 4. 3. Besi ortamlarına göre kültüre alınan anter sayısı (AS), gelişim gösteren ve kallus oluşturan anter sayısı (KAS), gelişim gösteren anter yüzdesi (%GAS), embriyo sayısı (ES), embriyo frekansı (%EF), bitki sayısı (BS) ve bitki frekansı (%BF) 29
Çizelge 4. 4. . Genotiplere göre kültüre alınan anter sayısı (AS), mikro çelikleme yapılarak dış koşullara alıştırılan ve incelenen bitki sayısı (BS), haploit bitki sayısı (HS), diploit bitki sayısı (DS), anter sayısına göre haploit üretim etkinliği (% HÜEA), bitki sayısına göre haploid üretim etkinliği (% HÜEB). 31

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	:yüzde
g	:gram
^{o}C	:santigrat derece
Mm	:milimetre
m	:metre
m^2	:metre kare
ml	:Mililitre
cm	:santimetre
mg/kg	:miligram/kilogram
cm^2	:santimetrekare
Mm	:mikrometre
mm^2	:milimetrekare
mg/L	:miligram/Litre
g/L	:gram/Litre
kg/ha	:kilogram/hektar
µS/cm	:milisiemens/santimetre
µm	:mikrometre

KISALTMALAR	AÇIKLAMA
$(NH_4)_2SO_4$	Amonyum sülfat
2,4-D	Diklorofenoksiasetik asit
ABA	Absisik asit
$AgNO_3$	Gümüş nitrat
$AgNO_3$	Gümüş nitrat
atm	Atmosfer
BAP / BA	Benzil aminopürin
$CaCl_2$	Kalsiyum Klorür
$CaCl_2,2H_2O$	Kalsiyum klorür
$CoCl_2,6H_2O$	Kobalt klorür
$CuSO_4,5H_2O$	Bakır sülfat
DDWX	Dumas De Vaulx ve ark.
FAO	Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
ZT	Zeatin
$FeSO_4.\ 7H_2O$	Demir sülfat
H_3BO_3	Borik asit
KH_2PO_4	Mono potasyum fosfat
KI	Potasyum iyodür
KNO_3	Potasyum nitrat
$MgSO_4.7H_2O$	Magnezyum sülfat
$MnSO_4,H_2O$	Mangan sülfat
MS	Murashige ve Skoog besi ortamı
NN	Nitsch ve Nitsch besi ortamı
B5	Gamborg besi ortamı

$Na_2EDTA\ 2H_2O$	Sodyum EDTA
$Na_2MoO_4,2H_2O$	Sodyum molibdat
IAA	İndol 3-asetik asit
NAA	Naftalin asetik asit
KT	Kinetin
$NaH_2PO_4.2H_2O$	Mono sodyum fosfat
NH_4NO_3	Amonyum Nitrat
$ZnSO_4,7H_2O$	Çinko sülfat

1.GİRİŞ

Anavatanı Orta ve Güney Amerika olan biber (*Capsicum annuum* L.) 15.yüzyıldan itibaren Avrupa'da, 16. yüzyıldan bu tarafa da Türkiye'de ekonomik anlamda yetiştirilen bir sebze türüdür. Biber Solanaceae familyasında bulunmakta ve yaygın olarak kullanılan türü *Capsicum annuum* L.' dur. *Capsicum* cinsi yaklaşık 30 türü kapsamaktadır. Bunlar arasında *C.annuum, C. baccatum, C. pubescens, C. frutescens* ve *C. chinense* ekonomik olarak kültürü yapılan önemli türlerdir. Bütün doğal biber popülasyonları diploid (2n) olup, kromozom sayıları 2n=24'tür (Pickersgill, 1997).

Biber dünya genelinde önemli sebze türlerinden biridir. Çok yönlü kullanılan biber açıkta ve örtü altında yılın her döneminde yetiştirilmektedir. Çiğ, pişmiş, kurutulmuş, konserve edilmiş, toz ve pul biber halinde, salça ve sos gibi çok değişik şekillerde kullanılmaktadır. 2019 yılında Dünya biber üretimi 5.33 milyon hektar alanda toplam 62,7 milyon tondur. Önemli biber üreticisi ülkeler sırasıyla; Çin(19 milyon ton),Meksika (3,23 milyon ton),Türkiye (2,62 milyon ton),Endonezya (2,58 milyon ton), Hindistan (1,74 milyon ton) ve İspanya (1,4 milyon ton) şeklinde sıralanmaktadır (FAO, 2019). Türkiye biber üretimi 777.862 dekar alanda 1.291 091 milyon ton kapya (yağlık-salçalık), 389.957 bin ton dolmalık, 838.890 bin ton sivri, 116.967 bin ton çarliston biber olmak üzere toplamda 2,63 milyon ton biber üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK, 2020).

Ülkemizde yetiştirilen biber tipleri sofralık olarak sivri, çarliston, dolmalık, kapya, kurutmalık olarak yerel biberler; turşuluk ve süs biberleri gibi tiplerdir. *C. annuum L*. türünün meyvesinin kullanım şekilleri salça, toz, pul biber, turşu, sos, közleme olarak, yemeklerimizin içerisinde yer almaktadır. Biber tüketim şekilleri ile yıl boyunca piyasada talep görmüş bu yönü ile açık alan ve örtü altı sebzeciliğinde yerini almıştır. Anadolu'da çoğu bölgede yerel isimler almış köy popülasyonları mevcuttur. Ancak bu yerel çeşitler lezzet ve aroma açısından tercih edilse de verimlilik ve hastalıklara dayanıklılık açısından arzu edilen performansı verememektedir. Diğer taraftan sebzecilikte kullanılan F1 hibrit çeşitler büyük oranda ithal edilmekte ve dışa bağımlılığımız devam etmektedir. Tohumculukta dışa bağımlılığı azaltmak ülkemizde öncelikli alanlar içerisinde yer almaktadır.

Bitkisel üretimin başlangıcı olan tohum, verimi ve üretimi arttırıp ayrıca dayanıklı, daha az maliyetli ve rekabet gücü yüksek ürünlerin elde edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. F1 hibrit tohumlar ana ve baba olarak kullanılan iki ebeveyn

bitkinin melezlenmesi sonucu elde edilirler. Melezleme de kullanılan ebeveynler homojen hatlardan oluşturulur. Bu bağlam da özellikle yerel genetik kaynaklardan faydalanılarak F1 hibrit çeşitlerin geliştirilmesi dışa bağımlılığımızın azaltılması konusunda katkılar sağlayacaktır. Biber yüksek oranda kendine tozlanan bir bitki olarak bilinmekte olup, yabancı tozlaşma oranı tozlaşmada etkili faktörlere bağlı olarak %79'a kadar çıkmaktadır. Bundan dolayı biber yetiştiriciliğinde F1 hibrit çeşitlerin önemi büyüktür (Allard, 1999). Taşkın (2005) birbirinden farklı 5 biber çeşidinin farklı 4 ortam uygulamasında androgenesise verdikleri cevapların farklı olduğunu tespit etmiş, genotipin anter kültüründe başarıyı etkileyen önemli faktörlerden olduğunu bildirmiştir.

Biber ıslahında her generasyonda homozigotluk düzeyi arttırılarak kendilemeler sonunda %100'e yakın homozigot hatlara ulaşılabilmektedir. Bu şekilde homozigot hatların elde edilmesi uzun zaman almaktadır. Ayrıca varılabilecek hedefler kısıtlıdır. *İn vitro* teknikler kullanılarak çok daha kısa sürede %100 homozigot hatlar elde edilebilmektedir (Valera-Montero ve Ochoa-Alejo, 1992). Bitki ıslahında kullanılan *in vitro* tekniklerden bazı türlerde başarılı olabildiğimiz haploid bitki eldesi tekniği ıslahçılar için önemli avantajlara sahip olabilmektedir. Bitki ıslahında kullanılan *in vitro* tekniklerden birisi olan dihaploidizasyon (DH) ekniğinde amaç erkek (anter-polen kültürü) ve dişi (ovül-ovaryum kültürü) eşey hücresi veya partenogenesis (ışınlanmış polen tekniği) kökenli haploid (n) bitkilerin elde edilmesi ve bu bitkilerin kromozom sayılarının çeşitli antimitotik maddelerle katlanarak %100 saf (homozigot) dihaploid bitkilerin (2n) oluşturulması mümkün olmaktadır. Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler adı verilmektedir. Haploid bitkiler kromozomlardan sadece bir takımını içerdiği için resesif mutasyonların açığa çıkartılmasına olanak sağlarlar. Haploid bitkilerden %100 homozigot saf hatlar elde edebilmek için kromozom sayılarının katlanması gerekmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Anter kültürü tekniğinin, özellikle Solanaceae familyasının birçok türünde başarılı sonuçlar verdiği bilinmektedir. Solanaceae familyasında yer alan biberde ilk kez anter kültürü yöntemi ile dihaploid hat elde edilmesi Çin'de (Wang ve ark., 1973), Hindistan'da (George ve Narayanaswamy, 1973) ve Polonya'da (Novak, 1974) gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaları birçok faktörün etkisini inceleyen ve daha başarılı protokollerin geliştirildiği diğer çalışmalar izlemiştir (Sibi, 1979; Dumas de Vaulx ve ark., 1981; de Vaulx, 1989). Biberde androgenesis üzerine yürütülen çalışmalar yirminci yüzyılın sonlarında yoğunlaşmış ve günümüze kadar çalışmalar hala yoğun

şekilde devam etmektedir (Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Rodeva ve Cholakov, 2006; Kim ve ark., 2008; Lantos ve ark., 2009; Irikova ve ark., 2011a; Barroso ve ark., 2015, Çömlekçioğlu ve ark., 1999; Çömlekcioglu ve ark., 2001; Ellialtıoğlu ve ark., 2001; Çiner ve Tipirdamaz, 2002; Buyukalaca ve ark., 2004; Taskin ve ark., 2011; Al Remi ve ark., 2014; Arı ve ark., 2016; Durna, 2016).

Son yıllarda biberde anter kültüründe başarılı sonuçlar alınmakla beraber yapılan çalışmaların sayısı fazla değildir ve hala tüm genotiplerde rapor edilmiş geçerliliği olan bir protokol yoktur (Irikova ve ark., 2011b). Anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli unsurlardan biri olan genotip etkisi hala birçok biber genotipinde istenilen cevabın alınmamasına ya da başarının çok düşük olmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra hibrit biber çeşit ıslahında dihaploid hatların kullanılması düşünülüyor ise mümkün olduğunca çok sayıda haploid hatta ihtiyaç duyulur. Yukarıda belirtilen nedenler dikkate alındığında günümüzde biberde anter kültüründe elde edilen başarı düzeyi yeterli kabul edilmemelidir. Bu yaklaşım ile yola çıkılan bu tez çalışmasında farklı biber genotiplerinde besi ortamı, inkübasyon koşulları ve ön tomurcuk uygulamalarının *in vitro* androgenesis üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Günümüzde pek çok türde olduğu gibi biber tarımında F1 hibrit çeşitlerin kullanımı artmaya başlamıştır. Hibrit çeşit eldesinde haploidi tekniği pek çok türde başarılı sonuçlar vermekte ve ıslah sürecini kısalmaktadır. Sahip olduğu çeşitli ve uygun iklim koşulları ile Solanaceae familyasına bağlı birçok türün yetiştirilmesine olanak sağlayan ülkemizde biber; domates, karpuz, kavun, soğan ve hıyardan sonra en fazla üretilen sebzedir. Sebze yetiştiriciliğinde, verim, kalite, hastalık ve zararlılara dayanıklı yerli çeşitlerimizi ortaya çıkartmak ve bu çeşitlerden hareketle F1 hibrit çeşitler elde etmek amacıyla haploidi tekniği ıslah çalışmalarında gerek ıslah süresinin kısaltılmasında gerekse elde edilen dihaploid hatların %100 identik olması bakımından ıslah programlarına katkılar sağlayacaktır.

Besin ortamında bulunan şeker karbonhidrat kaynağı olarak görev alıp anter kültüründe başarı açısından bitki büyüme düzenleyici maddeler ve genotip faktörleri kadar etkilidir (Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997). Abak (1983), biberde kullanılan anter kültürü ortamlarında şeker dozunun artmasının haploid embriyo ve bitki oluşum oranını artırdığını embriyo ve bitki oluşumunun en yüksek 90 ve 120 g/L şeker içeren ortamlarda olduğunu bildirmektedir.

Biber anter kültürü çalışmalarında kültür öncesi veya kültüre alındıktan sonraki ilk günlerde uygulanan yüksek sıcaklık şoklarının (25, 30 ve 35 ºC) başarıyı etkileyen faktörler arasında olduğu, sıcaklık derecesi ve süresi arttıkça anterlerde şişkinleşme oranının da arttığı saptanmıştır (Karakullukçu ve Abak, 1993). Bazı yerli biber popülasyonlarında NAA ve BAP'ın besin ortamlarında birlikte kullanılması olumlu sonuç vermiştir (Çömlekçioğlu ve ark., 1999).

75 farklı biber tipinde yapılan anter kültürü çalışmasında embriyo oluşumunun sırayla en fazla acı biber daha sonra sırayla domates biberi, koyu yeşil biber, balmumu tipi şeklinde ki biberde olduğu belirlenmiştir (Mityko ve ark., 1995). Hatta biberde donör bitkilerin büyüme koşullarının optimum olmasının dahi genotipin düşük yanıt verme etkisini ortadan kaldırmayacağı ifade edilmektedir (Kristiansen ve Andersen, 1993). Diğer taraftan Ercan ve ark. (2006), biberde genotiplerin yetişme sezonlarına bağlı olarak androgenesis tepkilerinin de farklı olduğunu belirtmektedir. Kristiansen ve Andersen (1993), donör bitkinin yetiştiği ortam sıcaklığı, fotoperiyot ve yaşının anter kültüründe embriyo oluşumu üzerine etkisini incelemişler ve bitkinin yetiştirme sıcaklığı ve yaşının embriyo gelişimine etkili olduğunu fakat fotoperiyodun etkili olmadığını bildirmişlerdir. Matsubara ve ark. (1998), 6 biber genotipini Haziran ve

Aralık ayları arasında her ay anterleri modifiye edilmiş MS ortamına dikerek 35 ºC 24 saat inkübe etmişler ve 25 ºC de 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık kültür koşullarına bırakmışlardır. Genotiplerin yetişme sezonlarına bağlı olarak androgenesise verdiği tepkiler farklılık göstermiştir. Sıcaklığın 15–25 ºC olduğu Eylül ve Ekim aylarında embriyo ve kallus oluşumu diğer zamanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca genotiplerde kendi içlerinde birbirlerine göre kallus oluşumuna farklı cevaplar vermiştir. Cheongyang ve Fusihimi Amenega çeşitlerinde kallus daha yüksek bulunurken Shishitou ve California Wonder çeşitlerinde embriyo daha çok oluştuğunu bildirmişlerdir.

Biberde anter kültürü yoluyla embriyo eldesinde en uygun mikrospor döneminin geç tek çekirdekli mikrospor safhası olduğu (González-Melendi ve ark., 1995), ve bunun çiçeklerde morfolojik olarak karşılığının tomurcukların 3.5-4.0 mm iriliğe ulaştıkları zamana rastladığı, taç yaprak seviyesinin çanak yaprak seviyesiyle eşit veya taç yaprakların çanak yapraklar hafifçe geçtiği bu aşamanın en uygun dönem olduğu (Abak, 1983; Al Remi ve ark., 2014), 4-6 mm uzunluğundaki tomurcuklarla yapılan anter kültüründe en iyi embriyo gelişiminin sağlandığı bildirilmiştir (Sayılır ve Özzambak, 2005).

Birçok türde olduğu gibi biberde de androgenesis başarısını etkileyen en önemli faktör genotiptir (Çömlekcioglu ve ark., 2001; Rodeva ve ark., 2004; Koleva-Gudeva ve ark., 2007). Bazı biber genotiplerinin haploid bitkiye dönüşüm ve androgenesis oluşturma eğilimleri zordur. Hibrit çeşitler ve popülasyonlardan alınan her 100 anterden direkt embriyogenesis oluşturma sıklığı genotiple orantılı olarak %0.5 ile %75 arasında değişmektedir (Mityko ve ark., 1995; Koleva-Gudeva ve ark., 2007; Nowaczyk ve ark., 2009). Çömlekcioglu ve ark. (2001) besin ortamı olarak 4 mg/L NAA, 0.1 mg/L BAP, %0.25 aktif kömür, 30 g/L sakaroz içeren MS ortamına haploid embriyo oluşumunun etkisini araştırmak için 10 mg/L $AgNO_3$ eklenmiştir. Sonuç olarak araştırıcılar $AgNO_3$'ün haploid embriyo oluşumunu arttırdığını ve Şanlıurfa yerel popülasyonunda %51.6, Kahramanmaraş yerel popülasyonunda %35.7 oranında başarı sağlanmıştır. Ayrıca korollanın kalikse eşit olduğu veya bir miktar geçtiği tomurcuk aşamasının anter kültürü için en uygun aşama olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada araştırıcılar Malatya bölgesindeki yerel biber popülasyonunda, %0.8 agar, %3 sakaroz, %0.25 aktif kömür, 4 mg/L NAA, 1 mg/L BA içeren ve 1 mg/L NAA, 4 mg/L BA içeren MS besin ortamları kullanarak. anter kültüründe aktif kömürün ve soğuk uygulamasının etkisini araştırmışlardır. En başarılı sonuçlar hiçbir ön uygulamaya tabi tutulmayan ve aktif

kömürlü 4 mg/L NAA, 1 mg/L BA içeren ortamdan almışlardır (Çiner ve Tipirdamaz, 2002).

Ayar (2003), biberde yapılan bir tez çalışmasında Kekova ve Sera-Demre-8 çeşitlerinde mevsimin ve donör bitkilerin yaşının anter kültüründe etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, yaz döneminde en yüksek Kekova çeşidi %4.97'lik embriyo oluşum oranı verirken kış döneminde ise en yüksek embriyo oluşumu oranı Sera-Demre-8 %4.26 çeşidinde gözlemlenmiştir. Kekova çeşidinde çiçeklenmenin 2. ayı olan Haziran ayı (%7.3), Sera-Demre-8 çeşidinde ise çiçeklenmenin 3. ayı olan Ağustos ayı (%3.96) en yüksek embriyo oluşumunun gözlemlendiği ay olarak tespit edilmiştir. Kış döneminde ise her iki çeşitte de çiçeklenmenin 4. ayı olan Şubat ayında en yüksek embriyo oluşum oranları elde edildiğini bildirmiştir.

Anter kültürü yapılan çalışmalarda androgenesisin olumlu cevap vermesinde ve başarıyı yakalamada mikrospor hücresinin gelişme aşamasın da önemli faktörlerden birisidir. Eğer mikrosporlar uygun aşamada olmayıp anter hasatları yapılırsa ortama alınan anterlerde başarı elde edilemez (Kim ve ark., 2004; Nowaczyk ve Kisiała, 2006; Parra-Vega ve ark., 2013; Barroso ve ark., 2015). Supena ve ark. (2006) mikrosporların yarısından çoğunun birinci çekirdek bölünmesinin son döneminde olduğu evrenin mikrospor için en uygun evre olduğunu bildirmektedirler.

Sayılır ve Özzambak (2005) biberde hasat edilen tomurcukların başarılı sonucun 4-6 mm büyüklüğündeki tomurcuklarla yapılan anter kültüründe verdiğini bildirmiştir. Çömlekcioglu ve ark. (2001) ise, anterlerin uç kısımlarından itibaren antosiyanin oluşmaya başladığı dönemi kültür çalışmaları için en başarılı dönem olarak belirtmişlerdir. Anter kültürü çalışmalarında başarıyı artırmak için tomurcuklara herhangi bir stres uygulaması embriyo gelişimine teşvik etmektedir (Bárány ve ark., 2005; Jacquard ve ark., 2006). Mikrosporları gametofitik dönemden sporofitik döneme geçirebilmek için düşük sıcaklık gibi bir stres uygulamasına başvurulmaktadır (Koleva-Gudeva ve ark., 2007). Anter kültüründe çiçek tomurcuklarına uygulanan düşük sıcaklığın; genotip, stres, besin ortamı gibi faktörlere bağlı olarak androgenesis peformansı farklılık gösterebilmektedir (Sibi, 1979; Morrison ve ark., 1986; Supena ve ark., 2006).

Anterlerde var olan ve engelleyici özelliği sahip olan Absisik asit (ABA) hormonunun miktarı soğuk uygulamaları yapıldığı zaman azalır ve engelleyici etkisi ortadan kaldırılır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda azalan ABA miktarının embriyo sayısını artırmada herhangi bir olumlu etkisinin olmadığı rapor edilmiştir

(Johansson ve Eriksson, 1977; Ellialtıoğlu ve Tıpırdamaz, 1997; Özkum ve ark., 2000). Biberde anter kültürü uygulamalarında besin ortamının bileşimi ve inkübasyon koşulları embriyonik oluşum için önemli etkiye sahiptir (Terzioğlu ve ark., 2000). Bitki türlerinde anter kültürü için başarı sağlamak adına ortak bir ortam bulmak pek mümkün değildir. Anter kültürünün başarısı aynı türde farklı genotipler arasında bile farklılık gösterdiği bir durumda ortak bir besin ortamı ile çalışmak mümkün değildir. Anter kültüründe genel olarak oksinler ve sitokininler gibi büyümeyi düzenleyicilere gereksinim duyulur (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Sayılır ve Özzambak (2005), 6 biber çeşidinde MS ve NN temel besin ortamlarında aktif kömür ve havuç ekstraktı ile hazırlanan ortamlardan aktif kömür ve havuç ekstraktı bulunmayan MS+ 4 mg/L NAA+ 0.1 mg/L BA ortamının en iyi sonucu verdiğini bildirmiş, aktif kömürün tek başına herhangi bir etkisinin olmadığını sadece havuç ekstraktı ile kombinasyonunda iyi sonuç verdiğini belirtmiştir.

Zhao ve ark. (2010), biberde karbon kaynağı ve bitki büyümeyi düzenleyicilerin anter kültürü üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Karbon kaynağı olarak maltozun etkisi tüm dozlarda sakarozdan daha yüksek olarak belirlenmiştir. %3-6 arasındaki maltoz ve sakaroz dozları kallus ve embriyo oluşumunu arttırdığını fakat %6'nın üzerindeki dozlarda düşüşler gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Büyümeyi düzenleyicilerin etkileri kallus oluşumunda 2, 4-D > ZT > NAA > KT >6- BA şeklinde; embriyo oluşumunda ise 2, 4-D > NAA > ZT > KT >6- BA şeklinde olmuştur. Büyümeyi düzenleyiciler kallus ve embriyo oluşumunu kullanılan dozlara bağlı olarak olumlu ya da olumsuz yönde önemli derecede etkilemişlerdir. 1.0 mg/L 2, 4-D ve ZT, 0.5 mg/L NAA ve KT en iyi etkiyi göstermiştir. 1.0 mg/L 2, 4-D + 1.0 mg/L ZT + 0.5 mg/L KT + 0.5 mg/L 6-BA en başarılı kombinasyon olmuştur.

Irikova ve ark. (2011b), 8 adet ıslah hattı, 7 adet standart çeşit, 4 adet melez olmak üzere 19 adet Bulgaristan biber genotipinde anter kültüründe besin ortamının etkisini araştırmışlardır. İndüksiyon ortamı olarak C ve Cm, rejenerasyon ortamı olarak R ve Rm besin ortamlarını kullanmışlardır. Kültüre alınan besin ortamlarından rejenerasyon ortamına kadar geçen süreçte 12 ve 40 gün aralıklarla aktarmanın etkisi denenmiştir. 35-40 gün sonra 6 hat, 6 çeşit ve 3 melez çeşitten direkt embriyolar oluşmuştur. Rejenere olan bitkiler 4 adet hat, 6 adet çeşit ve 1 adet hibritten elde edilmiştir. C ortamında 12 günden sonra aktarma embriyo oluşumu için yeterli olmamış, 40 gün sonra aktarmada ise embriyo oluşumları gözlemlenmiştir. R ortamına aktarmadan sonra yüksek oranda (%50-100) bitkiye dönüşüm sağlanmıştır. Cm

ortamında 12 gün bekletip aktarmadan sonra daha yüksek oranda embriyo oluşumu görülmüş, ancak bu embriyoların Rm ortamına aktarılmasından sonra bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Çalışmada kullanılan her bir genotipin anter kültürü koşulu ihtiyaçlarının farklı olduğu belirlenmiştir.

Polonya'da sürdürülen bir çalışmada anter kültüründe 17 adet biber genotipinde 3 farklı (12, 14 ve 16 gün) inkübasyon koşulu ve CP ortamına eklenen 2 farklı kinetin dozunun (0.1 ve 0.3 mg/L) etkisi araştırılmıştır. Donör bitki olarak ıslah hatları; *C. annuum*'un tür içi 4 adet hibriti, *C. frutescens, C. chinense, C. baccatum* var. pendulum türleri, *C. frutescens* × *C. chinense*'nin türler arası F1 hibritleri, *C. frutescens* × *C. baccatum*'un türler arası F1 hibritleri ve hibritlerden elde edilen dihaploidler kullanılmıştır. Deneme sonuçları, daha önce belirlenen standart protokolün (CP ortamında 12 gün inkübasyon, 0,1 mg/L kinetin içeren R1 ortamı) sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Kontrolde denenen genotiplerden sadece 3 adedinden tepki alınırken, denemelerle bu sayı 12'ye çıkarılmıştır. En başarılı uygulama olarak CP ortamında 16 gün bekletme ile 0.1 mg/L kinetin içeren R1 ortamının kombinasyonu olmuştur. 12 ve 14 gün bekletme uygulaması, 0.3 mg/L kinetin içeren ortamların kombinasyonuyla daha başarılı olarak bulunmuştur (Niklas-Nowak ve ark., 2012).

Shimira ve ark. (2019) tarafından yapılan biberde anter kültürü çalışmasında, Alata 2095 ve Alata 2096 genotiplerinin, anter kültürüne etkisi ve soğuk ön uygulamasının çiçek tomurcuklarına etkisi araştırılmıştır. Besin ortamı olarak %0.25 aktif kömür, 6.5 g/L agar, 0.5 mg/L BAP, 4 mg/L NAA, 15 mg/L AgNO3 ve 30 g/L sakaroz içeren MS ortamı kullanılmıştır. Çiçek tomurcukları, 24 saat boyunca 4°C'de ön soğuk uygulamasına tabi tutulmuştur. Bu sonuçlara göre en yüksek bitki sayısı ortalaması Alata 2095 genotipi için 100 anter başına 39.08 adet iken Alata 2096 genotipi için, ortalama 1.96 bitki/100 anter olarak hesaplanmıştır. Ön soğuk uygulaması yapılmış anterlerden 46.61, uygulama yapılmamış olanlarda ise 31.56 adet bitki/100 anter olarak tespit etmişlerdir.

Ata (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, Alata 421, Alata 195 ve Alata 277A genotipleri ve İnan 3363 çeşitlerini iki farklı besin ortamında (Ortam 1 - MS + 4 mg/L NAA + 0.1 mg/L BAP + %0.25 aktif kömür + 8 g/L agar + 30 g/L sakaroz + 15 mg/L AgN03; Ortam 2 - MS + 4 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP +%0.25 aktif kömür + 8 g/L agar + 30 g/L sakaroz + 15 mg/L $AgN0_3$) farklı periyotlarda kültüre almıştır. Çalışma sonucunda Eylül, Temmuz ve Ağustos aylarında kültüre alınan anterler, haploid embriyoların sayısı açısından, diğer aylara göre en verimli sonuçları üretmişlerdir. En

yüksek haploid embriyo yüzdesinin, Inan-3363 çeşidinden elde edildiğini ayrıca araştırmacı embriyo oluşumunun ve haploid bitki gelişiminin hem genotip hem de kültür periyoduna göre değişebileceğini bildirmiştir.

Yapılan bir çalışmada 23 farklı biber genotipinde, anter kültürü performansı gözlemlenmiştir. Besin ortamı olarak ilk aşamada; 30 g/L sakaroz, 2.5 g/L aktif kömür, 15 mg/L $AgNO_3$, 4 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP ve 6.5 g/L agar içeren MS ortamı kullanılmış, sonrasında anterler 30 g/L sakkaroz ve 6.5 g/L agar içeren ve büyümeyi düzenleyici içermeyen MS besin ortamına aktarılmışlardır. Kültüre alınan anterler inkübatörde +35ºC sıcaklık ve karanlık koşullarda, 2 gün süre ile ön uygulamaya tabi tutulmuştur. Sonuç olarak FT-509 no'lu genotip, 44.44 embriyo/100 anter ile en yüksek performansı gösterirken en düşük tepkiye ise FT-1178 genotipi, 0.83 embriyo/100 anter ile sahip olmuştur (Atasoy, 2020).

Özsoy (2019) tarafından yürütülen bir yüksek lisans tezinde istek F1- dolma biber, Balca F1-uzun Demre tipi, Alkırmızı F1-kapya tipi biber ve Hızır F1-Çarliston biber olmak üzere 4 hibrit biber çeşidini donör bitki olarak kullanmıştır. Anter kültüründe Dumas de Vaulx 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) sakaroz ilave ederek modifiye etmiştir. Anterlere ön uygulama olarak 24 ve 48 saat süreyle 4 ve 10 ^{O}C soğuk şoku uygulamış ve embriyo oluşumu ile bitkicik ve haploid bitki rejenerasyonunu değerlendirmiştir. En iyi sonucu 10 °C'de 24 saat uygulaması verirken en yüksek embriyo oluşumunun ise 900 anterden 401 embriyo ile İstek F1 çeşidinden elde edildiği bildirilmiştir.

Kurt (2019) *C. annuum* L. türüne ait 4 farklı çeşitte (12-081(Kapya A), 10-714 (Kapya B),15-416 (Dolma 39), 12-013 (Dolma 47)) haploid bitki elde etmek amacıyla yaptığı anter kültürü çalışmalarında MS ve 0.1 mg/L BAP + 4 mg/L NAA + 2,5 mg/L aktif karbon ile karbonhidrat kaynağı olarak maltoz ve sakaroz kullanılmıştır. Çalışmada kültür ortamı bileşimi ile 25-35°C ön sıcaklık uygulamalarının biberde androgenesise etkisi incelenmiş ve kültüre alınan anterlerin, ön uygulama ve şeker içerikli besin ortamında kallus oluşumları değerlendirilmiştir. Her çeşitte kallus oluştuğunu, en başarılı sonucu Kapya B ve Kapya A çeşitlerinde 6 gün süresince 35 °C'de ön uygulama yapılmış, kültür ortamında karbonhidrat kaynağı olarak maltoz bulunan ortamdan aldığını bildirmiştir. Yürütülen çalışmalarda tüm bitki gruplarında aynı kültür şartları altında farklı genotipler arasında anter yapılarında büyük farklılıklar

görülmüştür. Ayrıca benzer genotiplerin bile farklı androgenik tepki verdiği ifade edilmiştir (Niklas-Nowak ve ark., 2012).

Yapılan bir çalışmada İnce sivri, kapya, dolmalık, üç burun ve çarliston biber genotipleri kullanılarak MS besin ortamına 4 farklı sakaroz dozu (%3, % 6,% 9,% 12) ile 3 farklı kinetin (0.1, 0.5 ve 1.0 mg/L) ve 3 farklı 2,4-D dozu (0.1, 0.5 ve 1.0 mg/L) ilave edilmiştir. Çalışma sonucunda en düşük başarı oranı % 2 embriyo oluşum oranıile 30 gL sakaroz ve 0,1 mgL Kinetin , 0,1 mgL 2,4 D, en yüksek başarı oranı ise % 84 ile 60 g/L sakaroz ve 1 mg/L Kinetin + 1 mg/L 2,4 D ilave edilmiş besi ortamından elde edilmiş, ayrıca bu ortamda üç burun genotipinin 42 anterden 108 embriyo oluşumu ile en yüksek embriyo oluşum değeri elde edilmiştir (Hülül, 2019).

Boncukçu ve ark. (2020) donör bitki olarak Tokat biberi ile İstek F1, Üç burun F1 ve Köylüm F1 biber çeşitlerinin kullanıldığı çalışmada, DDV ve MS temel besin ortamlarına ilaveten 0,01 mg/L Kinetin, 0,01mg/L 2,4-D, 0,03 mg/L Vitamin B-12 eklemiş, genotip, besin ortamı, ön işlemler ve inkübasyon koşullarının androgenesis üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonunda genotipler, anter kültürüne olumlu yanıt vermiş, en yüksek embriyo gelişimi Tokat genotipinden (86 adet), en düşük embriyo gelişimi ise Köylüm F1 çeşidinden (15 adet) elde edilmiştir.

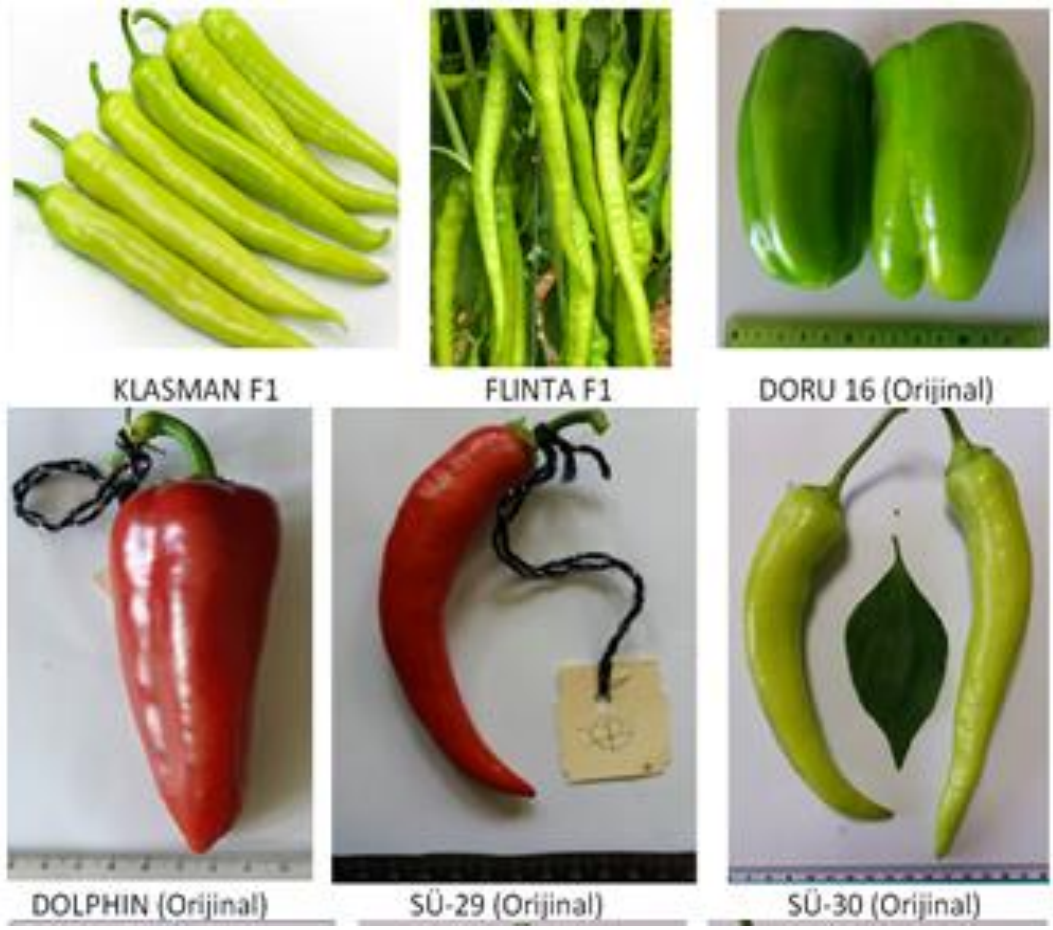
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

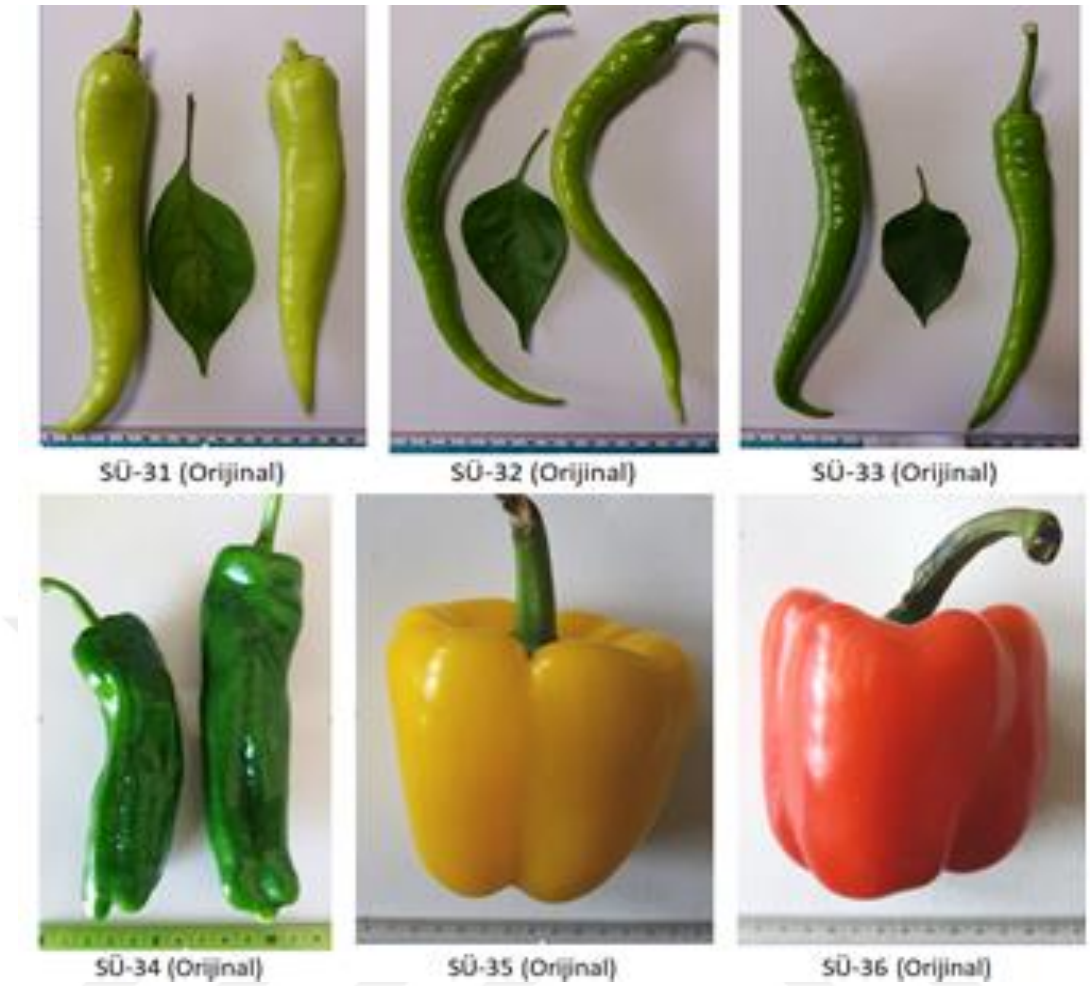
Çalışma Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait sera ve doku kültürü laboratuarında 2019-2020 yıllarında yürütülmüştür.

3.1.1. Donör Genotipler ve Özellikleri

Gen havuzumuzda bazı agronomik özellikleri sebebiyle ön plana çıkmış S3 kademesindeki 8 biber genotipi (SÜ-29, SÜ-30, SÜ-31, SÜ-32, SÜ-33, SÜ-34, SÜ-35 ve SÜ-36) ve 4 ticari çeşit (Klasman F1, Flinta F1, Doru 16 ve Dolphin) olmak üzere 12 genotiple çalışma yürütülmüştür. Kullanılan genotiplerden "SÜ-29" Urfa biberi, "SÜ-30" ve "SÜ-31" çarliston, "SÜ-32" tatlı sivri, "SÜ-33" acı sivri, "SÜ-34" üç burun, "SÜ-35" kırmızı dolma ve "SÜ-36" sarı dolma tipindedir. Ticari çeşitlerden "Klasman F1" çarliston, "Flinta F1" tatlı sivri, "Doru 16" dolma ve "Dolphin" kapya biber çeşitleridir (Şekil 3. 1).



Şekil 3. 1. Denemede kullanılan genotipler ve çeşitler



Şekil 3. 2'in devamı

3.2. Yöntem

3.2.1. Donör Bitkilerin Yetiştirilmesi

Çalışmanın başlangıcında genotiplere ait tohumlar 04 Temmuz 2019 tarihinde sera koşullarında içerisinde torf bulunan plastik kutulara ekilmiş, 2. gerçek yaprakları oluşmaya başlayan fideler torf ile doldurulmuş 45'lik viyollere şaşırtılmıştır (Şekil 3.2).

Dikim boyuna gelen 3-4 yapraklı aşamadaki fideler 29 Temmuz 2019 tarihinde her genotipten 20 bitki olacak şekilde 0.7x0.6 m dikim mesafeleri ile Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Deneme Serasına dikilmiştir. Dikim sonrası, seraya yerleştirilmiş olan damlama sulama sistemiyle can suyu verilmiştir.



Şekil 3.3.Çimlenmekte olan tohumlar (üst sol), gelişmekte olan (üst sağ) ve şaşırtılmış fideler (alt).

Serada yapmış olduğumuz toprak analizi sonuçlarına göre (Çizelge 3.1) bitkiler gelişme dönemleri boyunca haftada iki sefer suda eriyebilen 20-20-20 (20% azot - 20% fosfor - 20% potasyum) gübresinden bitki başına 0.5 g olacak şekilde gübrelenerek sağlıklı bir şekilde büyütülmüştür (Şekil 3.3).

Çizelge 3. 1. Sera 0-30 cm derinlikteki toprak analiz sonuçları

Analiz Adı	Birimi	Sonuç
Tekstür sınıfı		Tın
pH (1:2.5, Toprak:Su)		7,27
EC (Tuz) (1:5, Toprak:Su)	(µ/cm)	209
CaCO3 (Kireç)	(%)	39,2
Organik Madde	%)	1,64
İnorganik azot (NH4 +NO3-N)	mg/kg	13,7
Fosfor (P)	mg/kg	122,7
Potasyum (K)	mg/kg	327
Kalsiyum (Ca)	mg/kg	5536
Magnezyum (Mg)	mg/kg	552
Sodyum (Na)	mg/kg	91
Değişebilir Na Yüzdesi	%	1,18
Bor (B)	mg/kg	0,70
Bakır (Cu)	mg/kg	2,3
Demir (Fe)	mg/kg	4,2
Çinko (Zn)	mg/kg	2,5
Mangan (Mn)	mg/kg	6,6



Şekil 3. 4. Seraya dikilmiş fideler ve büyümekte olan bitkiler.

Bitkilerde ot alma, çapalama, hastalık ve zararlılarla mücadele gibi gerekli kültürel işlemler gerektiği gibi ve zamanında aksatılmadan uygulanmıştır (Şekil 3.4). Dönemsel olarak görülen yaprak bitleri ve beyaz sineklerle mücadelede "Rockypso"

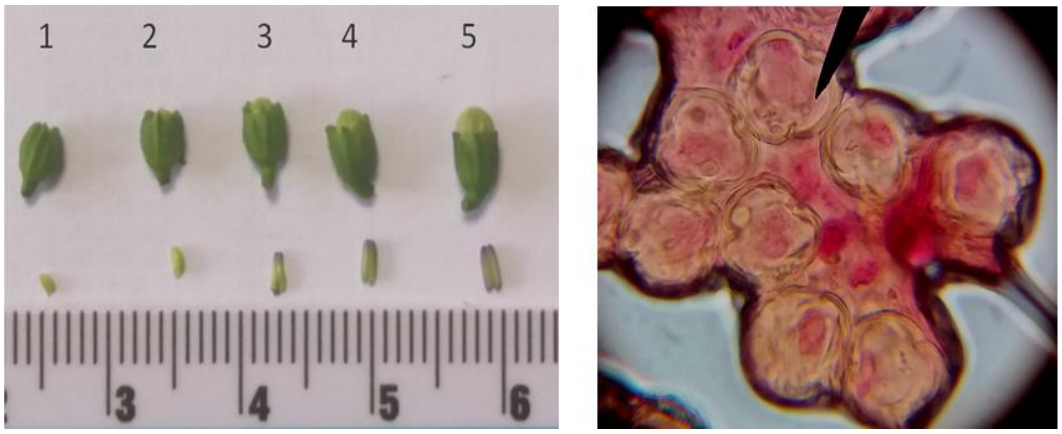
isimli insektisit kullanılmıştır. Donör bitkilerde meyve tutumuna izin verilmeyerek sürekli toplanmış, çalışma süresince sürekli bir şekilde sağlıklı anterler vermeleri sağlanmıştır.



Şekil 3. 5. Serada gelişmekte olan bitkilerin yabancı ot temizliği.

3.2.2. Anterlerde Uygun Mikrospor Aşamasının Belirlenmesi

Bitkilerde çiçeklenme görüldüğü zaman polenlerdeki tek çekirdekli dönem %1'lik aseto karmin çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla farklı gelişme dönemlerindeki anterler bitkilerden toplanmış, laboratuarda çıkarılan anterler bir lam üzerine yerleştirildikten sonra 1-2 damla %1'lik aseto karmin çözeltisi damlatılmıştır. Bu şekildeki anterler ezme preparat yöntemine göre iyice ezildikten sonra mikroskop altında incelenmiştir. Bu şekilde içerisinde mümkün olduğunca geç tek çekirdekli dönem ile erken çift çekirdekli dönem arasındaki polenleri içeren anterler kültüre alınmıştır. Bu dönemdeki anterleri içeren tomurcuk boyutu belirlenmiş, mor rengin (antosiyanin) anterin ucunda olduğu veya en fazla 1/3'üne kadar geldiği 3 ve 4 numaralı aşamadaki tomurcukların uygun olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.5 ve 3.6). Çalışmanın tamamında sürekli bu aşamadaki tomurcuklar kullanılmıştır.



Şekil 3. 6. Uygun tomurcuk boyutunun tespiti(solda), Tek çekirdekli mikrosporlar (Sağda – 400x).



Şekil 3. 7. Kültür için uygun tomurcuğun mikroskopta görüntüsü (25x).

3.2.3. Kullanılan Besin Ortamları ve İçerikleri

Çalışmamızda Taşkın ve ark. (2013), (Arı ve ark., 2016) ile Pınar ve ark. (2016)'nın kullanmış oldukları protokoller kısmen değiştirilerek uygulanmıştır (Çizelge 3.2). Çalışmada kullanılan besi ortamlarının orijinal içerikleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

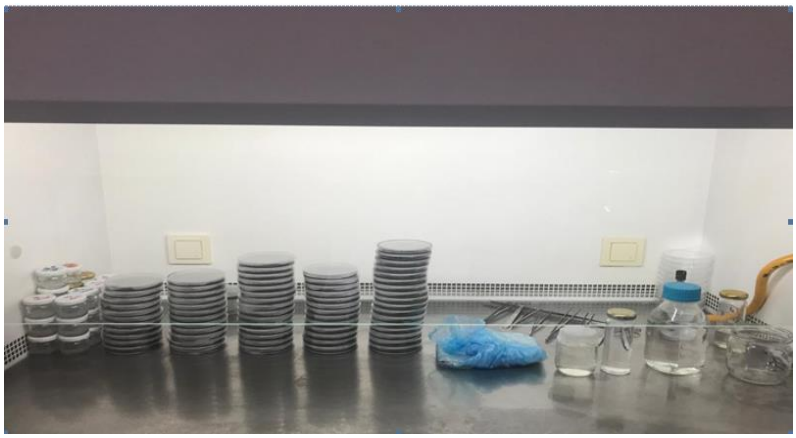
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan protokoller ve detayları.

Ortam	İçerik	Uygulamalar
O1	**MS** + 0.5 mg/L BAP + 4 mg/L NAA, + 15 mg/L gümüş nitrat + 0.25% aktif karbon + 30 g/L sakaroz + pH 5.8 + 8 g/L agar (Taşkın ve ark., 2013; Pınar ve ark., 2016).	35 °C'de karanlıkta 2 gün, daha sonra 25 °C ve 16/8-h fotoperyot.
O2	**B5** + 0.5 mg/L BAP + 4 mg/L NAA, + 15 mg/L gümüş nitrat + 0.25 % aktif karbon + 30 g/L sakaroz + pH 5.8 + 8 g/L agar (Arı ve ark., 2016a)	
O3	Çift katmanlı ortam Alt katman: **NN** + 1% aktif karbon + 20 g/L maltoz + 6 g/L agar, pH:5.8 Üst katman : **NN** + 20 g/L maltoz + 0.55 mg/L zeatin + 0.88 mg/L IAA, pH:5.8 (Arı ve ark., 2016b)	9 °C'de 1 hafta sonra , 28 °C'de 3 hafta ardından, 21 °C'de 3–5 hafta karanlık koşullarda.

Çizelge 3. 3. Kültür aşamasında kullanılan ortamların orijinal içerikleri

	Ortamlar		
Makro elementler(mg/L)	**MS**	**B5**	**NN**
KNO_3	1900	3000	950
NH_4NO_3	1650	-	720
$MgSO_4.7H_2O$	370	500	185
$(NH_4)_2SO_4$	-	134	-
$NaH_2PO_4.2H_2O$	-	150	-
$CaCl_2,2H_2O$	440	150	-
KH_2PO_4	170	-	68
Mikro elementler (mg/L)			
$MnSO_4,H_2O$	22.300	13.200	-
$MnSO_4,4H_2O$	-	-	25
$ZnSO_4,7H_2O$	8.600	2.000	10
H_3BO_3	6.200	3.000	10
KI	0.830	0.750	
$Na_2MoO_4,2H_2O$	0.250	0.250	0.25
$CuSO_4,5H_2O$	0.025	0,025	0.025
$CaCl_2,6H_2O$	0.025	0.025	
$CaCl_2$	-	-	166
Fe-EDTA (mg/L)			
$Na_2EDTA\ 2H_2O$	37.3	37.5	7.45
$FeSO_4,7H_2O$	27.8	27.8	0.557
Vitaminler (mg/L)			
Pyridoxin HCL	0.50	1.00	0.5
Nikotinik Asit	0.50	1.00	5
Thiamine HCL	0.10	10.00	0.5
Glycin	2.00	-	2
Myo-inositol	100.00	100.00	100
Vit B12	0.03	0.03	-
Folik asit	-	-	0.5
Biotin	-	-	0.05
Diğerleri			
Sakaroz (g/L)	60	60	20
Agar-agar (g/L)	8	8	8
pH	5.8	5.8	5.5

Ortamlar hazırlandıktan sonra 121 ^oC, 1.1 atm basınçta 15 dk otoklavlanmış ve kullanım öncesi steril kabin altında 6 cm çaplı petri kutularına her petride 5 ml olacak şekilde otomatik pipet ile boşaltılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3. 8. Steril kabin içerisinde besin ortamları ve ekipmanlar

3.2.4. Çiçek Tomurcuklarının Dezenfeksiyonu ve Anterlerin Çıkarılması

Kültür amacıyla uygun boydaki tomurcuklar sabah erken saatte toplanmış ve 4 ^{o}C'de 1 gün süreyle ön soğuk uygulamasına tabi tutulmuştur. Soğuk uygulamasından sonra anterlerde %15'lik ticari çamaşır suyu çözeltisinde 15 dakika süreyle yüzey sterilizasyonu yapılmıştır (Şekil 3.8). Sürenin sonunda tomurcuklar 3 sefer 5'er dakika steril saf ile durulanmış ve steril kurutma kağıtları ile fazla suları alınmıştır. Sterilize edilmiş tomurcuklar dikkatlice açılmış ve flament içermeyen anterler içlerine besi ortamı doldurulmuş 6 cm çaplı steril plastik petrilere ortama batırılmaksızın yerleştirilmiştir (Şekil 3.9). Dikim işlemi tamamlandıktan sonra kutularının kenarları ince plastik film şeritlerle kapatılarak dış atmosferle ilişkileri kesilmiştir.



Şekil 3. 9. . Steril kabin içinde tomurcukların sterilizasyonu



Şekil 3. 10. Tomurcuklardan anterlerin ayrılması ve ortama yerleştirilmesi

3.2.5. Ön Uygulamalar ve Bitkilerin Eldesi

Kültüre alınmış anterler O1 ve O2 ortamı için iklim dolabında 35 °C'de karanlıkta 2 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. O3 ortamının kullanıldığı anterler ise ilk önce 9 °C'de 1 hafta sonra 28 °C'de 3 hafta ve en sonunda 21 °C'de 5 hafta karanlık koşullarda inkübe edilmiştir (Şekil 3.10). İnkübasyon sonrası anterler 25 °C ve 3000 lüx ışık şiddetinde 16/8-h fotoperyota ayarlanmış iklim odasında gelişmeye bırakılmıştır.



Şekil 3. 11. . İklim dolabında karanlık koşullarda inkübe edilen anterler (sol) ve iklim odasında gelişmekte olan anterler (sağ)

Kültürden yaklaşık olarak 30 ile 60 gün sonra görülmeye başlayan ve kotiledon oluşturmuş bitkicikler 150 ml'lik kavanozlarda MS + 0.1 mg/L BA + 0.01 mg/IAA + 30 g/L sakaroz + 8 g/L agar içeren çimlendirme ortamına alınmıştır. Yeterli büyüklüğe ulaşan bitkicikler gelişimlerini tamamlamaları için aynı ortam içeren 250 ml'lik kavanozlarda büyütülmüştür. Bu bitkilerde 2-3 mikro çelikleme yapılarak bitki sayıları artırılmış ve bitki kayıpları önlenmeye çalışılmıştır. Bu süreç 25 °C'de, 16/8 fotoperyotta ve 3000 lüx ışık şiddetinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3. 12. Büyütülmekte olan bitkiler (sol) ve mikro çelikleme yapılmış bir bitki (sağ).

3.2.6. Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması (Aklimatizasyon)

Mikro çeliklemeler ile yeterli sayıya ulaşılmış ve belli bir büyüklüğe ulaşmış bitkiler dış koşullara alıştırılmaya başlanmıştır (Şekil 3.12). Dış koşullara alıştırma işleminde öncelikle otoklavda steril edilmiş torf plastik bardaklara doldurulmuş, kültür ortamından çıkarılan bitkilerin kökleri musluk suyu altında Agar'dan iyice arındırıldıktan sonra bardaklara dikilmiştir. Dikim öncesinde bitkilerin kıvrılmış, kararmış ve fazla uzamış kökleri kesilmiş, dikim sonrası ise daha sonra oluşacak bulaşmaları engellemek için ilk can suyunun içerisine %1 oranında fungusit (Orvego) eklenerek sulama yapılmıştır. Daha sonra bitkilerin üzeri plastik bir poşetle kapatılmış, her iki günde bir poşette bir makasın ucuyla 2'şer küçük delik açılarak yaklaşık 2 hafta içerisinde bitkiler dış koşullara alıştırılmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3. 13. Torf-perlit karışımına alınan bitkicik (sol) ve dış koşullara alıştırılan bitkicikler (sağ) .



Şekil 3. 14. . Dış koşullara alıştırılmış bitkiler

3.2.7. Ploidi Düzeyinin Tespiti ve Dihaploidizasyon (kromozom katlama) Çalışmaları

Çalışmada ploidi düzeyinin belirlenmesinde biber türünde rutin olarak kullanılan ve geçerliliği kanıtlanmış stoma gözlemleri ile ploidi tespiti yapılmıştır. Bu amaçla dış koşullara alıştırılan bitkilerden alınan yapraklarda birim alandaki (mm^2) stoma sayısı, stoma büyüklükleri (en-boy) ve arkadaş hücrelerindeki kloroplast sayıları incelenmiştir. Bu amaçla bitkilerden alınmış yaprakların alt epidermisleri dikkatlice soyularak bir lam üzerine yerleştirilmiş ve üzerine 1-2 damla %1'lik gümüş nitrat çözeltisi damlatıldıktan sonra mikroskopta incelenmiştir. Haploid oldukları belirlenen bitkiler 2:1 oranında torf ve perlit bulunan 2.5. litrelik saksılara dikilmiş ve büyütülmüştür. Yeterli büyüklüğe ulaşan bitkilerde *in vivo* kolhisin katlama çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle kolhisin saf su içerisinde çözüldükten sonra haploit biber bitkilerinin sürgün uçlarına ve koltuk sürgünlerine % 0.5 konsantrasyonunda 12 ve 24 saat süreyle uygulanmıştır. Bu amaçla ilk önce sürgün etrafındaki fazla yapraklar ve dallar budanmış, sürgün uçları ve koltuk sürgünleri bir pamuk parçasıyla örtülmüş, pamukların üzeri alüminyum folyo ile çevrildikten sonra streç film ile sarılmış, kolhisin çözeltisi bir şırınga yardımıyla içerdeki pamuk üzerine pamuk iyice ıslanıncaya kadar (yaklaşık 2-3 ml) enjekte edilmiştir (Şekil 3.14). Kolhisin uygulanan sürgünler gelişmiş ve gelişen sürgünler üzerinde oluşan yapraklarda tekrar stoma incelenmesi yapılmıştır. Stoma gözlemleri sonunda kromozom katlaması gerçekleşmeyen bitkilere tekrardan kolhisin uygulanmıştır. Bu işlem kromozom katlaması gerçekleşinceye kadar devam edilmiştir.

Ayrıca çalışma süresince seraya dikilmiş olan haploid ve dihaploid bitkilerde görsel olarak ploidi farklılıkları gözlenmiştir. Bu gözlemlerde her ne kadar ölçüm yapılmamış olsa da dihaploid bitkiler ile haploid bitkilerin bitkisel organlarda ki

gelişimin farklı olduğu, haploid bitkilerin yapraklarının ve çiçeklerinin daha küçük, bitki boylarının daha kısa olduğu ve daha yavaş geliştikleri belirlenmiştir.



Şekil 3. 15. Bitkilere kolhisin uygulama aşamaları

3.2.8. Gözlem ve Ölçümlerin Alınması ve Değerlendirilmesi

Çalışma süresince aşağıdaki gözlem ve ölçümler yapılmıştır.

Kültüre alınan anter sayısı: Her bir genotip ve her bir ortam için belirlenmiştir.

Kallus oluşturan anter sayısı: Kültür süresince farklılaşarak kallus oluşturan anter sayısı kayıt edilmiştir.

Embriyo sayısı (ES) (adet): Her uygulamada elde edilen toplam embriyo sayıları hesaplanmıştır.

Embriyo frekansı (ES): Her bir genotip ve her bir ortam için kültüre alınan anterlerden anter başına embriyo sayısı belirlenmiştir.

Embriyoların bitkiye dönüşüm oranları (BDO) (%): Her bir genotip ve her bir uygulama için elde edilen bitkilerin embriyo sayısına oranı olarak hesaplanmıştır.

Haploid üretim etkinliği (HÜE): Her bir genotip ve her bir uygulama için "100 anter/haploid bitki", "100 embriyo/haploid bitki" kriterleri göz önüne alınarak belirlenmiştir.

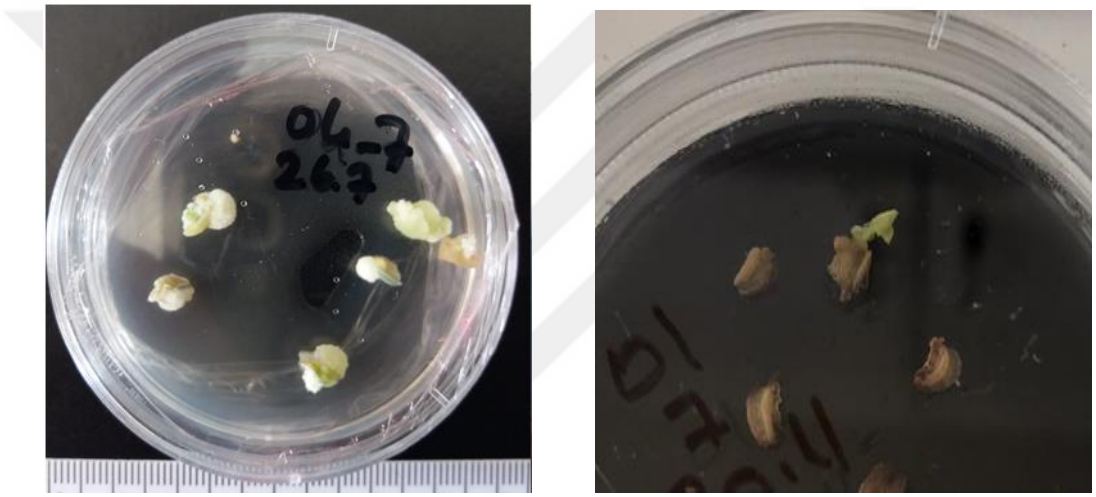
Çalışmada her bir uygulama için eşit sayıda materyal kullanılamamasından dolayı sadece ortalamaların verilmesiyle yetinilmiş, istatistiki analiz yapılamamıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

12 genotiple yürütülen çalışmada, O3 ortamında meydana gelen yüksek orandaki bulaşma (kontaminasyon) nedeniyle gözlem ve değerlendirmeler yapılamamış ve sonuçlara dahil edilmemiştir. Deneme süresince O1 ve O2 ortamlarında toplamda 2260 anter kültüre alınmış ve ortalama 40 gün geçtikten sonra dikimi yapılan tüm genotiplerin anterlerinde gelişmeler takip edilmiş ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

4.1. Genotip ve Ortamların Anter Gelişimi Üzerine Etkileri

Kültüre alınan anterlerin bir kısmı kallus oluşturmuş (Şekil 4.1), bazıları ise doğrudan embriyo ve bitkicikler meydana getirmiştir (Şekil 4.2). Çalışmamızda kallus oluşturan anterler bitkicik eldesinde kullanılmamış sadece direk embriyo oluşturan anterlerle çalışmaya devam edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Kallus oluşturmuş anterler (sol), anterden gelişen bir embriyo (sağ).



Şekil 4. 2. Embriyonun mikroskop görüntüsü (sol) ve anter üzerinde gelişmiş bir bitkicik (sağ).

Çizelge 4. 1. Genotiplere ve besi ortamlarına göre kültüre alınan anter sayısı (AS), gelişim gösteren ve kallus oluşturan anter sayısı (KAS) gelişim gösteren anter yüzdesi (% GAS)

Genotipler	Ortamlar	AS	KAS	GAS
KLASMAN F1	O1	114	18	15.79
	O2	48	6	12.50
	Toplam	***162***	***24***	***14.81***
FLINTA F1	O1	138	22	15.94
	O2	66	11	16.66
	Toplam	***204***	***33***	***16,17***
DORU 16	O1	60	5	8.33
	O2	54	9	16.67
	Toplam	***114***	***14***	***1.28***
DOLPHIN	O1	216	6	2.78
	O2	84	21	25.00
	Toplam	***370***	***27***	***7.29***
SÜ-29	O1	102	8	7.84
	O2	114	17	14.91
	Toplam	***216***	***25***	***11.57***
SÜ-30	O1	60	1	1.67
	O2	84	6	7.14
	Toplam	***144***	***7***	***4.86***
SÜ-31	O1	72	0	0.00
	O2	48	4	8.33
	Toplam	***120***	***4***	***3.33***
SÜ-32	O1	192	4	2.08
	O2	66	11	16.67
	Toplam	***258***	***15***	***5.81***
SÜ-33	O1	96	7	7.29
	O2	72	6	8.33
	Toplam	***168***	***13***	***7.73***
SÜ-34	O1	72	2	2.78
	O2	48	5	10.42
	Toplam	***120***	***7***	***5.83***
SÜ-35	O1	102	3	2.94
	O2	72	9	12.5
	Toplam	***174***	***12***	***6.89***
SÜ-36	O1	138	9	6.52
	O2	72	5	6.94
	Toplam	***210***	***14***	***6.66***
	∑Toplam	***2260***	***195***	***8.62***

O1 ortamında anter gelişimi açısından en yüksek değerler %15.94 ile Flinta F1 ve %15.79 ile Klasman F1 çeşitlerinden elde edilmiş, bu çeşitleri %8.33 ile Doru 16 takip etmiştir. SÜ-31 genotipindeki anterlerin hiç birisi O1 ortamında gelişme göstermemiştir. O2 besi ortamında en yüksek anter gelişimi %25.00 ile Dolphin, %16.67 ile Doru 16 ve SÜ-32, %16.66 ile Flinta F1 çeşitlerinden elde edilmiş en düşük değere ise %6.94 ile SÜ-36 genotipi sahip olmuştur. SÜ-31 genotipi hariç her genotipten O1 ve O2 ortamlarında anter gelişimi elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Anter kültürü çalışmalarında donör bitkinin yetişme periyodu, yetişme şartları, besin ortamı, ön uygulamalar ve genotip gibi birçok faktör başarıyı etkilemektedir. Bu

faktörler arasında başarıyı etkileyen en önemli faktörün genotip olduğu birçok araştırıcı tarafından savunulmaktadır (Kristiansen ve Andersen, 1993; Qin ve Rotino, 1993; Mityko ve ark., 1995; Rodeva ve ark., 2004; Lantos ve ark., 2009; Nowaczyk ve ark., 2009; Arı ve ark., 2016). Shtereva ve ark. (1998) 9 farklı biber genotipinde yürüttükleri anter kültürü çalışmasında embriyo oluşumu açısından her genotipin birbirinden farklı sonuçlar verdiğini, Kurt (2019) 4 biber çeşidi ile yürüttüğü anter kültürü çalışmasında androgenesis performasını etkileyen en önemli parametrenin genotip olduğunu ve ayrıca her genotipin kallus oluşumuna farklı cevaplar verdiğini bildirmiş ve başka bir çalışmada biberde anter kültüründe başarının yine genotiplere bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (Keleş ve ark., 2015). Bu sonuçlar, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla benzer şekilde, genotipin ve kullanılan besi ortamının anter kültüründe başarıyı etkilediğini ortaya koymaktadır.

4.2. Genotip ve Ortamların Embriyo Oluşumu ve Bitkiye Dönüşüm Üzerine Etkileri

Çalışmada kullanılan farklı besi ortamlarına ve yapılan ön uygulamalara bağlı olarak denemeye konu biber genotip ve çeşitlerinin embriyo ve bitki oluşturma oranları farklılıklar göstermiştir. Embriyo oluşturma başarısı yüksek genotipler olduğu gibi düşük başarı gösteren genotipler de olmuştur. Aynı genotipin farklı ortamlarda embriyo oluşumuna verdiği tepki yüksek olurken aynı başarılı tepkiyi bitkiye dönüşüm sırasında verememiş ve başarısı düşük kalmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 2. Genotiplere ve besi ortamlarına göre embriyo sayısı (ES), embriyo frekansı (%EF), bitki sayısı (BS), bitki frekansı (% BF) ve bitkiye dönüşüm oranı (% BDO)

Genotipler	Ortamlar	ES	EF	BS	BF	BDO
KLASMAN F1	O1	1	0.88	1	0.88	100.0
	O2	1	2.08	1	2.08	100.0
	Toplam	***2***	***1.23***	***2***	***1.23***	**100.0**
FLINTA F1	O1	1	0.72	0	0.00	0.0
	O2	1	1.52	0	0.00	0.0
	Toplam	***2***	***0.98***	***0***	***0.00***	**0.0**
DORU 16	O1	1	1.67	0	0.00	0.0
	O2	4	7.41	1	1.85	25.0
	Toplam	***5***	***4.38***	***1***	***0.87***	**20,0**
DOLPHIN	O1	2	0.93	1	0.46	50.0
	O2	6	7.14	4	4.76	66.6
	Toplam	***8***	***2.16***	***5***	***1.35***	**62.5**
SÜ-29	O1	0	0.00	0	0.00	0.0
	O2	4	3.51	3	2.63	75.0
	Toplam	***4***	***1.85***	***3***	***1.38***	**75.0**
SÜ-30	O1	0	0.00	0	0.00	0.0
	O2	3	3.57	1	1.19	33.3
	Toplam	***3***	***2.08***	***1***	***0.69***	**33.3**
SÜ-31	O1	0	0.00	0	0.00	0.0
	O2	2	4.17	1	2.08	50.0
	Toplam	***2***	***1.66***	***1***	***0.83***	**50.0**
SÜ-32	O1	1	0.52	1	0.52	100.0
	O2	2	3.03	1	1.52	50.0
	Toplam	***3***	***1.16***	***2***	***0.77***	**66.6**
SÜ-33	O1	0	0.00	0	0.00	0.0
	O2	2	2.78	1	1.39	50.0
	Toplam	***2***	***1.19***	***1***	***0.59***	**50.0**
SÜ-34	O1	0	0.00	0	0.00	0.0
	O2	0	0.00	0	0.00	0.0
	Toplam	***0***	**0.00**	***0***	**0.00**	**0.0**
SÜ-35	O1	0	0.00	0	0.00	0.0
	O2	2	2.78	1	1.39	50.0
	Toplam	***2***	***1.14***	***1***	***0.57***	**50.0**
SÜ-36	O1	0	0.00	0	0.00	0.0
	O2	4	5.56	1	1.39	25.0
	Toplam	***4***	***1.90***	***1***	***0.47***	**25.0**
	∑Toplam	***37***	***1.63***	***18***	***0.79***	**48.6**

O1 besi ortamında en yüksek embriyo oluşum yüzdeleri sırasıyla %1.67 ile Doru 16, %0.88 ile Klasman F1 ve %0.93 ile Dolphin çeşitlerinden elde edilmiştir. SÜ-36, SÜ-35, SÜ-34, SÜ-33, SÜ-31, SÜ-30 ve SÜ-29 genotipleri bu açıdan nispeten daha düşük değerler vermiştir. SÜ-31 dışında embriyo oluşumunda başarısız olan genotipler anter gelişimlerini sürdürmelerine rağmen embriyo oluşumuna cevap veremeyip, gelişen bazı anterler sadece kallus oluşturmuştur. O2 besin ortamında embriyo oluşumunda ilk üç sırada %7.41 ile Doru 16, %7.14 ile Dolphin ve %5.56 ile SÜ36 yer alırken, en düşük başarı ise SÜ-34 genotipinden elde edilmiştir. SÜ-34 genotipi anter

gelişme oranında % 10.42'lik bir orana sahip olmasına rağmen bu anterlerden embriyo dönüşümü gerçekleşmemiştir.

Ata (2011) yaptığı çalışmada MS ortamına ilaveten 0.5 mg/L ve 0.1 mg/L BAP dozlarını I ve II numaralı olarak isimlendirdiği ortamlarda genotipleri incelemiştir. Ekim ayında kültüre alınan genotiplerden 277A ve İnan 3363 genotipleri için en uygun ortamın I nolu ortam olduğunu, 421 nolu genotipin, II nolu ortama dikilen anterlerinden 1 adet embriyo elde edilirken, 195 nolu genotipten embriyo elde edilememiştir. II nolu ortam çalışmamızdaki O1 ortamı ile aynı olup, çalışmamızda da bazı genotipler O1 ortamında başarılı iken bazılarında başarı oranı oldukça düşük kalmıştır. Ortamlar arasında oluşan bu farklılıkları kullanılan genotip, yetiştirme koşulları ve kültüre alma zamanlarının farklı olmasıyla açıklamak mümkündür.

Genotiplerin ortamlara göre bitkiye dönüşüm frekansları karşılaştırıldığında O1 ortamında en yüksek frekansa Klasman F1 (%0.88) sahip olurken, bunu %0.46 ile Dolphin ve %0.52 ile SÜ-32 genotip izlemiş, bu genotipler dışında diğerlerinin bitkiye dönüşümü gerçekleşmemiştir. O2 ortamında en yüksek bitki döşüm frekansı %4.76 ile Dolphin çeşidinde gerçekleşmiş ve ardından %2.63 ile SÜ-9 ve %2.08 ile Klasman F1 gelmiştir. SÜ-34 ve Flinta F1 embriyo oluşturmasına rağmen bu embriyolardan bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir.

Klasman F1 çeşidinde O1 ve O2 ortamlarında embriyo frekansları ve bitki frekansları eşit olarak bulunmuş ve elde edilen embriyolar bitkiye dönüşmüştür. Flinta F1 çeşidinde O1 ve O2 ortamında oluşan embriyo bitkiye dönüşememiştir. Doru 16 çeşidinde O1 ortamında elde edilen embriyo bitkiye dönüşmezken O2 ortamından elde edilen 4 embriyodan 1 tanesi bitkiye dönüşebilmiştir. Dolphin çeşidinde O1 ortamından elde edilen 2 embriyodan 1 tanesi, O2 ortamından ise 6 embriyodan 4 tanesi bitkiye dönüşmüştür. SÜ-29 genotipinde O1 ortamında embriyo elde edilememiş, O2 ortamında ise 4 embriyodan 3 tane bitki elde edilmiştir. SÜ-30 genotipinde O1 ortamında embriyo elde edilmemiş O2 ortamında ise 3 embriyodan 1 bitki elde edilmiştir. SÜ-31 genotipinde O1 ortamından embriyo elde edilememiş, O2 ortamından ise 2 embriyodan 1 bitki elde edilmiştir. SÜ-32 genotipinde O1 ortamında elde edilen bir embriyo, O2 ortamında ise oluşan 2 embriyodan bir tanesi bitkiye dönüşmüştür. SÜ-33 genotipinde O1 ortamında embriyo elde edilememiş, O2 ortamında ise 2 embriyodan bir tanesi bitkiye dönüşmüştür. SÜ-34 genotipinde O1 ve O2 ortamlarından embriyo ve bitki elde edilememiştir. SÜ-35 genotipinde O1 ortamından embriyo elde edilememiş, O2 ortamında ise 2 embriyodan bir tanesinde bitkiye dönüşüm gerçekleşmiştir. SÜ-36

genotipinde O1 ortamından embriyo elde edilememiş, O2 ortamından ise 4 embriyodan bir bitki elde edilmiştir. Özsoy (2019) yapmış olduğu çalışmada MS ve B5 ortamlarını kıyasladığında MS ortamından 209 embriyo, 134 bitkicik ve 57 haploid bitki elde ederken, B5 ortamından ise 218 embriyo, 100 bitkicik, 27 haploid bitki elde etmiştir. Bu sonuçlara göre en başarılı sonucu MS ortamı vermiştir. Ancak bizim bulduğumuz sonuçlar ile Özsoy (2019)'un bulmuş olduğu sonuçlar arasında farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu farklılığın ise kullanmış olduğumuz genotiplerden ve modifiye etmiş olduğumuz MS ve B5 ortamından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Literatürde de anter kültürü çalışmalarında embriyo oranı ve embriyoların bitkiye dönüşümünde genotipin, besin ortamının ve diğer faktörlerin başarıyı etkilediği bildirilmektedir (Parra-Vega ve ark., 2013). Yapmış olduğumuz çalışmada başarının genotiple ilişkisinin olduğu tespit edilmiş, yapılan çalışmalarda da aynı dönemde kültüre alınan anterlerin genotiplere göre değişik tepkiler gösterdiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Karakullukçu ve Abak, 1992; Mityko ve ark., 1995; Çömlekçioğlu ve ark., 1999; Çömlekcioglu ve ark., 2001; Çiner ve Tipirdamaz, 2002; Buyukalaca ve ark., 2004; Koleva-Gudeva ve ark., 2007; Taskin ve ark., 2011). Bu çalışmaların sonuçları, araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir. Yaptığımız çalışmada oluşan embriyoların bitkiye dönüşüm oranlarının bazı genotiplerde ya hiç ya da az miktarda olduğu tespit edilmiştir. Nitekim Çiner ve Tipirdamaz (2002), biberde anter kültürü çalışmalarında embriyo oluşum oranının % 0.5 ile % 12.5 arasında olmasına rağmen, oluşan bazı embriyoların bitkiye dönüşemediğini ve sadece % 12.5 embriyo başarısı yakalanan uygulamada bitkiye dönüşüm oranının % 0.5 olduğunu bildirmişlerdir.

4.3. Kullanılan Ortamların Androgenesis Üzerine Etkileri

O1 ortamında kültüre alınan toplam 1362 anterden gelişim gösteren anter yüzdesi 6.09 olmuştur ve bu gelişen anterlerden elde edilen embriyo frekansı yüzde 0.44 olmuş, bunlardan elde edilen bitki dönüşüm frekansı %0.22 olarak gerçekleşmiştir. Al Remi (2013), besin ortamı olarak MS temel besin ortamının 8 farklı kombinasyonu (B serisi, B1-B8) kullanmıştır. Kullandığı genotiplerden 151 ve 171 no'lu yerel genotipler MS temelli ve 4 mg/L NAA + 0.1mg/L BAP kombinasyonuna sahip B serisi ortamlarında androgenik embriyo oluşumu üzerine olumlu tepkilerde bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da B serisi ortamlar O1 ortamı ile benzerlik göstermiştir. Fakat O2 ortamı daha olumlu sonuçlar vermiştir. Bu farklılığın O1 ortamında farklılık gösteren

$AgNO_3$ veya BAP dozlarından ve genotiplerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim bizim çalışmamızda da kullanmış olduğumuz %0.25 aktif kömür embriyo oluşumunu genotipe bağlı olarak olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir.

O2 ortamında kültüre alınan 828 anterden gelişim gösteren anter yüzdesi 13.53 olmuş, embriyo frekansı ise %3.74 olarak geçekleşmiştir (Çizelge 4.3). Oluşan embriyolardan ise bitkiye dönüşüm frekansı %1.81 olarak gözlenmiştir. O2 ortamı O1 ortamına göre çok daha iyi sonuçlar vermiştir. Çalışmamızda elde edilenin aksine biberde anter kültürü yapılan çalışmalarda pek çok farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılsa da en yüksek başarının 4 mg/L NAA + 0.1 mg/L BAP + 2,5 mg/L aktif karbon kullanılan MS temel besin ortamından alındığı araştırıcılar tarafından kabul edilmiştir (Çömlekcioglu ve ark., 2001; Al Remi, 2013). Çalışmamızda her genotipin androgenik başarısının kullanılan ortama göre değişebileceği tespit edilmiştir. Nitekim Özsoy (2019)'da yapmış olduğu çalışmada bizim bulgularımıza benzer şekilde genotiplerin başarılı olduğu ortamların değiştiğini, İstek F_1 ve Alkırmızı F_1 genotiplerinin en yüksek androgenik performansı DDVX ortamında, Balca F_1 genotipinin MS ortamında, Hızır F_1 genotipinin ise B5 ortamında gösterdiğini ifade etmiştir.

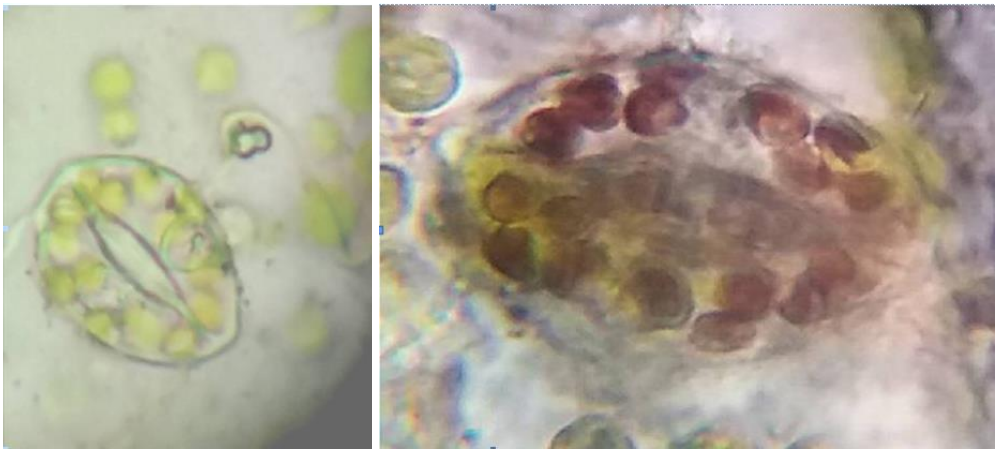
Çizelge 4. 3. Besi ortamlarına göre kültüre alınan anter sayısı (AS), gelişim gösteren ve kallus oluşturan anter sayısı (KAS), gelişim gösteren anter yüzdesi (%GAS), embriyo sayısı (ES), embriyo frekansı (%EF), bitki sayısı (BS) ve bitki frekansı (%BF)

Ortamlar	AS	KAS	GAS	ES	EF	BS	BF
O1	1362	83	6.09	6	0.44	3	0.22
O2	828	112	13.53	31	3.74	15	1.81

4.4. Ploidi Testlemeleri ve Dihaploidizasyon Çalışmaları

Mikro çeliklemeler ile yeterli sayıya ulaşılmış bitkilerin ploidi düzeyleri stoma (stoma büyüklüğü, kloroplast sayısı ve birim alandaki stoma sayısı) gözlemleri ile tespit edilmiştir. Ortalama stoma uzunluğu ve stoma genişliği diploitlerde 30.4 ve 19.21 µm iken, haploitlerde bu değerler 19.08 ve 13.81 µm olarak belirlenmiştir. Diploidlerde haploidlere göre stoma çaplarının % 28.1, stoma uzunluklarının ise % 37.2 daha fazla olduğu saptanmıştır. Arkadaş hücrelerindeki kloroplast sayıları haploid bitkilerde ortalama 7.2, diploid bitkilerde ise 10.4 adet olarak sayılmıştır. Birim alandaki (mm^2) stoma sayısı diploidlerde 172.9 iken, haploidlerde 237.4 olmuş (Şekil 4.3), diploid

bitkiler daha iri yapraklar ve bitkiler oluştururken, haploid bitkiler daha küçük yapraklara ve bitkilere sahip olmuşlardır (Şekil 4.4).



Şekil 4. 3.Haploid (sol) ve diploid (sağ) bitkilere ait stomalar (400x)



Şekil 4. 4. Haploid (sol) ve diploid (sağ) bitkiler

Elde edilen bitkilerin ploidi düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda incelenen toplam 18 bitkiden 13 adedi haploit (n=x=12) ve 5 adedi diploit (2n=2x=24) yapıda bulunmuştur. Genotiplere göre haploit üretim etkinliği (HÜE) 100 anter/haploit bitki (% HÜEA), 100 bitki/haploit bitki (% HÜEB) kriterleri, bitki elde edilen genotipler ve besi ortamları göz önüne alınarak belirlenmiştir. Tüm çalışma boyunca % HÜEA 0.41 ve % HÜEB 59.16 olarak belirlenmiştir. Genotipler incelendiğinde en yüksek % HÜEA değerlerine sırasıyla 1.0 ve 0.98 değerleriyle SÜ-29 ve Klasman F1 genotipleri sahip olmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4. . Genotiplere göre kültüre alınan anter sayısı (AS), mikro çelikleme yapılarak dış koşullara alıştırılan ve incelenen bitki sayısı (BS), haploit bitki sayısı (HS), diploit bitki sayısı (DS), anter sayısına göre haploit üretim etkinliği (% HÜEA), bitki sayısına göre haploid üretim etkinliği (% HÜEB).

Genotipler	**AS**	**BS**	**HS**	**DS**	**% HÜEA**	**% HÜEB**
Klasman F1	162	2	2	0	1.23	100.0
Flinta F1	204	0	0	0	0.00	0
Doru 16	114	1	0	1	0.00	0
Dolphin	370	5	3	2	0.81	60
SÜ-29	216	3	3	0	1.38	100.0
SÜ-30	144	1	1	0	0.69	100.0
SÜ-31	120	1	1	0	0.83	100.0
SÜ-32	258	2	1	1	0.38	50
hSÜ-33	168	1	0	1	0.00	0
SÜ-34	120	0	0	0	0.00	0
SÜ-35	174	1	1	0	0.57	100.0
SÜ-36	210	1	1	0	0.47	100.0
∑	**2260**	**18**	**13**	**5**	**0.57**	**72.2**

Haploid bitkilerin sürgün ucu ve koltuk sürgünlerine % 0.5 dozunda 12 ve 24 saat süreyle kolhisin uygulamaları yapılmıştır. 12 saat uygulamasında sürgün gelişimleri normal bir seyir izlerken, 24 saat uygulamasında sürgün uçlarında kararmalar, bazı sürgünlerde deformasyonlar görülmüştür. Bu sebeple % 0.5 kolhisinin dozunun 12 saat süreyle uygulanması daha başarılı ve tavsiye edilebilir bulunmuştur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

F1 biber çeşitlerinin eldesine yönelik olarak, daha önce tarafımızca selekte edilmiş ve piyasada var olan ticari çeşitlerden faydalanılarak verimli, kaliteli, hastalık ve zararlılara dayanımlı yerli çeşitlerimizi ortaya çıkarmak amacıyla planladığımız çalışmamızda çeşit ıslah çalışmalarında önemli bir yere sahip olan dihaploidizasyon yönteminin etkinliği anter kültürü tekniği kullanılarak ortaya koyulmaya çalışılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenerek verilmiştir.

Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Sebze Yetiştiriciliği ve Islahı ABD ıslah koleksiyonunda bulunan S3 kademesindeki biber genotiplerinden 8 tanesinde (SÜ-29, SÜ-30, SÜ-31, SÜ-32, SÜ-33, SÜ-34, SÜ-35 ve SÜ-36) ve 4 ticari çeşit (Klasman F1, Flinta F1, Doru 16 ve Dolphin) olmak üzere 12 genotiple anter kültürü tekniği ile haploit bitki elde etmek amacıyla yapılan çalışmada O3 ortamında meydana gelen yüksek orandaki bulaşma (kontaminasyon) nedeniyle anterler gelişme göstermeyip, gözlem ve değerlendirmeler yapılamamıştır. 2 farklı besi ortamında 2260 anter kültüre alınmış, bu anterlerden 37 embriyo ve 18 bitki elde edilmiş, frekansları ise sırasıyla % 1.29 ve % 0.63 olmuştur. Elde edilen bitkicik sayıları genotiplere ve besi ortamlarına göre değişiklik göstermiştir. Besi ortamlarından O2 ortamı (B5 + 0.5 mg/L BAP + 4 mg/L NAA, + 15 mg/L gümüş nitrat + 0.25 % aktif karbon + 30 g/L sakaroz + 8 g/L agar + pH 5.8) daha başarılı sonuçlar vermiş, toplamda elde edilen 18 bitkicikten 15 tanesi O2 ortamından elde edilmiştir. Anter gelişim oranında genotipler açısından en düşük değer % 2.47 ile SÜ-31 (Çarliston tipi) genotipinden elde edilirken, en yüksek değere % 12.79 ile Flinta F1 (sivri biber) çeşidi sahip olmuştur. Aynı şekilde ortamlar açısından duruma bakıldığında en yüksek anter gelişim oranları O2 ortamından elde edilmiş, bu açıdan Dolphin çeşidi % 25.0 ile en yüksek değeri vermiştir. Embriyo sayısı açısından Dolphin çeşidi 8 adet embriyo ve 5 adet bitki ile en fazla embriyo ve bitkinin elde edildiği genotip olurken Flinta F1 çeşidi ve SÜ-34 genotipinden embriyo ve bitki elde edilememiştir. O2 ortamı O1 ortamına göre çok daha iyi sonuçlar vermiş,

Stomatal yöntemlerle (stoma boyutları, kloroplast sayısı, birim alandaki stoma sayısı) yapılan ploidi analizleri sonucunda 18 bitkiden 13 tanesi haploid (n=x=12) olarak belirlenmiştir. Genotiplere göre haploit üretim etkinliği (HÜE) 100 anter/haploit bitki (% HÜEA) ve 100 bitki/haploit bitki (% HÜEB) kriterlerine göre belirlenmiş, % HÜEA 0.52 ve % HÜEB 72.2 olarak bulunmuştur. En yüksek % HÜEA değerlerine sırasıyla 1.0 ve 0.98 değerleriyle SÜ-29 ve Klasman F1 genotipleri sahip olmuştur. Bu

sonuçlar anter kültürü tekniğindeki başarının yüksek oranda genotip ile sıkı sıkıya ilişkili olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur. 13 haploid bitkinin mikro çeliklemeler ile çoğaltılmış bitkilerinin sürgün ucu ve koltuk sürgünlerine % 0.5'lik kolhisin 12 saat süreyle uygulanarak sağlıklı dihaploid sürgünler elde edilmiş, bu sürgünlerdeki çiçeklerde kendilemeler yapılarak meyveler ve saf tohumluklar elde edilmiştir.

Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre ileride yapılacak çalışmalara ışık tutması açısından; haploidi frekansı yüksek olan genotiplerle ve besi ortamı x genotip ikilisinin daha etkin çalışılmasının, kültüre alınan anter sayısının mümkün olduğunca yüksek tutulmasının, anter ekimi öncesi ve sonrası farklı sıcaklık şokları ve sürelerinin denenmesinin, kültürün belli aşamalarında besi ortamının tazelenmesinin, farklı miktarlarda aktif karbon uygulamalarının yapılmasının, donör bitkilerin kontrollü şartlarda iyi bakım koşullarında yetiştirilmeli hatta yetiştirilme şartları fizyolojik olarak etki ettiğinden bitkiler güz ve bahar dönemi, açık tarla ve sera koşullarında ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Başarısı düşük genotiplerde başarılı genotiplerle melezlemeler yapılmalıdır. Ayrıca çalışmada elde edilen embriyoların gerek bitkiye gerekse haploid bitkiye dönüşümünde sayılarının düşük olması dikkat çekmektedir. Literatürde de anter kültürü çalışmalarında embriyoların bitkiye dönüşümünde bu tip sorunlarla karşılaşıldığı bildirilmektedir. Embriyoların bitkiye dönüşümünde başarı oranının artırılmasına yönelik embriyo büyütme ortamı bileşiminin daha etkin hale getirilmesinin başarıyı yükselteceği kanısıyla yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

Abak, K., 1983, Biberde *(Capsicum annuum L.)* anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırma, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı*, 33, 155-163.

Akgün, İ., Tosun, M. ve Sağsöz, S., Biyoteknolojive Bitki Islahındaki Kullanım Alanları/Biotechnology And Its Applıcation In Plant Breeding *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27 (2).

Al Remi, F., 2013, Biberde *(Capsicum annuum L.)* Anter Kültüründe Genotip ve Besin Ortamlarının Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi*, ADANA.

Al Remi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S. ve Ellialtıoğlu, Ş., 2014, Biber *(Capsicum annuum L.)*'de genotip ve besin ortamının anter kültürüne etkileri, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1 (2), 108-116.

Allard, R. W., 1999, Principles of plant breeding, *Kanada*, John Wiley & Sons, p. 72-84.

Arı, E., Bedir, H., Yildirim, S. ve Yildirim, T., 2016, Androgenic responses of 64 ornamental pepper *(Capsicum annuum L.)* genotypes to shed-microspore culture in the autumn season, *Turkish Journal of Biology*, 40 (3), 706-717.

Ata, A., 2011, Biberlerde *(Capsicum annuum)* anter kültüründe mevsim etkisi ve mikrospor gelişimi, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi*, 89.

Atasoy, D., 2020, Bazı Biber *(Capsicum annuum L.)* Islah Genotiplerinin Anter Kültürü Performanslarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi*, ADANA.

Ayar, F., 2003, Bazı Biber *(Capsicum annuum L.)* Çeşitlerinde Anter Kültürü Yöntemiyle Haploid Bitki Elde Edilmesinde Mevsimin ve Bitki Yaşının Etkilerinin Araştırılması, *Akdeniz Üniversitesi*, ANTALYA.

Bárány, I., González-Melendi, P., Fadón, B., Mitykó, J., Risueño, M. C. ve Testillano, P. S., 2005, Microspore-derived embryogenesis in pepper *(Capsicum annuum L.)*: subcellular rearrangements through development, *Biology of the Cell*, 97 (9), 709-722.

Barroso, P., Rêgo, M., Rêgo, E. ve Soares, W., 2015, Embryogenesis in the anthers of different ornamental pepper *(Capsicum annuum L.)* genotypes, *Genetics and Molecular Research*, 14 (4), 13349-13363.

Boncukçu, S., Çelik, M. ve Geboloğlu, N., 2020, Effect of media, stress conditions and genotype on androgenetic performance of pepper, *Gaziosmanpasa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 37 (1), 23-29.

Buyukalaca, S., Kilic, N., Comlekcioglu, N., Abak, K. ve Ekbic, E., 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.

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.

Çömlekcioglu, N., Buyukalaca, S. ve Abak, K., 2001, Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper *(Capsicum annuum L.)*, *XIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant, Antalya, Turkey*, 133-136.

Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S. ve Abak, K., 1999, Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber populasyonlarında anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etme olanakları, *Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ankara*, 897-900.

Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E. ve Huerta, A., 1997, Androgenesis in Capsicum annuum L.—effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122 (4), 468-475.

Dumas de Vaulx, 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.

Dumas de Vaulx, R. D., 1989, Haploidy and pepper breeding: a review, *Capsicum Newsletter* (8-9), 13-17.

Durna, P., 2016, Bazı Biber Genotiplerinde *In Vitro* Androgenesis Uygulamalarının Dihaploid Hat Geliştirmeye Etkisi ve Dihaploid Hatların Morfolojik Karakterizasyonu Doktora Tezi, *Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi*, TOKAT.

Ellialtıoğlu, Ş. ve Tıpırdamaz, R., 1997, Soğuk uygulamaları ve aktif kömürün patlıcan ve biberde in vitro androgenezis üzerine etkileri, *TOGTAG 87 No'lu Proje Sonuç Raporu*.

Ellialtıoğlu, Ş., Kaplan, F. ve Abak, K., 2001, The effect of carrot extract and activated charcoal on the androgenesis of pepper, *Proceedings of XIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant*, 9-13.

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.

FAO, 2019, http://www.fao.org/faostat/ Erişim tarihi 15.02.2021.

George, L. ve Narayanaswamy, S., 1973, Haploid Capsicum through experimental androgenesis, *Protoplasma*, 78 (4), 467-470.

González-Melendi, P., Testillano, P. S., Ahmadian, P., Fadón, B., Vicente, O. ve Risueño, M. C., 1995, In situ characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in Capsicum, *Protoplasma*, 187 (1), 60-71.

Hülül, M., 2019, Bitki Büyüme Düzenleyiciler ve Sakkaroz Dozlarının Bazı Biber Genotiplerinde Androgenik Embriyo Oluşumuna Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, *Tokat GaziOsmanpaşa Üniversitesi*, TOKAT.

Irikova, T., Grozeva, S., Popov, P., Rodeva, V. ve Todorovska, E., 2011a, In Vitro Response of Pepper Anther Culture *(Capsicum annuum 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.

Jacquard, C., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Devaux, P., Baillieul, F. ve Clément, C., 2006, Plant defence mechanisms are triggered in the anther during the pre-treatment process, *The international conference 'Haploids in Higher Plants III'Vienna*, 12-15.

Johansson, L. ve Eriksson, T., 1977, Induced embryo formation in anther cultures of several Anemone species, *Physiologia Plantarum*, 40 (3), 172-174.

Karakullukçu, Ş. ve Abak, K., 1992, Bazı patlıcan çeşitlerinin anter kültürüne tepkileri, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı*, 42, 7-12.

Karakullukçu, Ş. ve Abak, K., 1993, Patlıcanda anter kültürü üzerinde araştırmalar: II. şeker ve büyümeyi düzenleyicilerin etkisi, *Turk J Agric For*, 17, 811-820.

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.

Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D.-I. ve Lee, K.-M., 2004, Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper *(Capsicum annuum)*, *Plant cell, tissue and organ culture*, 77 (1), 63-72.

Kim, M., Jang, I.-C., Kim, J.-A., Park, E.-J., Yoon, M. ve Lee, Y., 2008, Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper *(Capsicum annuum L.)* through isolated microspore culture, *Plant cell reports*, 27 (3), 425-434.

Koleva-Gudeva, L. R., Spasenoski, M. ve Trajkova, F., 2007, Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media, *Scientia Horticulturae*, 111 (2), 114-119.

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 (1), 105-109.

Kurt, M., 2019, Biberde Anter Kültürü Çalışmalarında Farklı Besi Ortamlarının Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi*, İZMİR.

Lantos, C., Juhász, A. G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, 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 and Organ Culture (PCTOC)*, 97 (3), 285-293.

Matsubara, S., Yamamoto, M., Jo, M. H. ve Murakami, K., 1998, Embryoid and callus formation from microspores by anther culture from July to November in pepper *(Capsicum annuum L.)*, *Sci Rep Fculty Agric Okayama Univ*, 87 (1), 117-122.

Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G. ve Fári, M., 1995, Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum L.*), *Plant Breeding*, 114 (1), 78-80.

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.

Murashige, T. ve Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.

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.

Novak, F., 1974, Induction of a haploid callus in anther cultures of Capsicum sp. Z Pflanzenzücht 72, 46-54.

Nowaczyk, P. ve Kisiała, A., 2006, Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum L*. anther culture, *Journal of applied genetics*, 47 (2), 113-117.

Nowaczyk, P., Olszewska, D. ve Kisiała, A., 2009, Individual reaction of Capsicum F 2 hybrid genotypes in anther cultures, *Euphytica*, 168 (2), 225-233.

Özkum, D., Tipirdamaz, R. ve Ellialtioglu, S., 2000, The relationship between the endogenous abscisic acid content of anthers and *in vitro* androgenesis in peppers (*Capsicum annuum L.*), *IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560*, 327-329.

Özsoy, B., 2019, Genotip Besin Ortamı ve Stres Uygulamalarının Biberde Androgenesis Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, *Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi*, TOKAT.

Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A. ve Seguí-Simarro, J. M., 2013, 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, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112 (3), 353-360.

Pickersgill, B., 1997, Genetic resources and breeding of Capsicum spp, *Euphytica*, 96 (1), 129-133.

Qin, X. ve Rotino, G., 1993, Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes, *International Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops. Part 1: Vegetable Crops 402*, 313-316.

Rodeva, V., Irikova, T. ve Todorova, V., 2004, Anther culture of pepper (*Capsicum annuum L.*): comparative study on effect of the genotype, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 18 (3), 34-38.

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, *The international conference haploids in higher plants III, Vienna, Austria*, 12-15.

Sayılır, A. ve Özzambak, E., 2005, Biber Anter Kültüründe Uygun Tomurcuk Büyüklüğü ile Besin Ortamı İçeriklerinin Embriyo Verimine Etkileri Üzerine Bir Araştırma, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 42 (3), 1-11.

Shimira, F., Keleş, D., Taşkın, H. ve Abak, K., 2019, The Assessment of Androgenic Response of Two Nematode Resistant Pepper (*Capsicum annuum L.*) Genotypes, *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7 (12), 2103-2110.

Shtereva, L., Zagorska, N., Dimitrov, B., Kruleva, M. ve Oanh, H., 1998, Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis, *Plant cell reports*, 18 (3), 312-317.

Sibi, M., 1979, Obtention de plantes haploids par androgenese *in vitro* chez le piment (*Capsicum annuum L.*), *Ann. Amélior. Plantes*, 29, 583-606.

Supena, E., Suharsono, S., Jacobsen, E. ve Custers, J., 2006, Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum L.*), *Plant cell reports*, 25 (1), 1-10.

Taskin, H., Büyükalaca, S., Keles, D. ve Ekbiç, E., 2011, Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes, *African Journal of Biotechnology*, 10 (75), 17116-17121.

Taşkın, H., 2005, Bazı biber genotiplerinde anter kültürü ile haploid embriyo uyartımında embriyo kalitesinin artırılmasına yönelik bazı uygulamalar, *Ziraat Fakültesi Yüksek Lisans, Sayfa Sayısı*, 79.

Terzioğlu, Ş., Ellialtıoğlu, Ş. ve Abak, K., 2000, İnkübasyon koşullarının biber anter kültüründe embriyo oluşumu üzerine etkisi. III, *Sebze Tarımı Sempozyumu*, 11-13.

TÜİK, 2020, http://www.tuik.gov.tr Erişim tarihi: 15.02.2019.

Valera-Montero, L. ve Ochoa-Alejo, N., 1992, A novel approach for chili pepper (*Capsicum annumL.*) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls, *Plant Science*, 84 (2), 215-219.

Wang, Y.-Y., Sun, C.-S. ve Wang, C.-C., 1973, The induction of the pollen plantlets of triticale and *Capsicum annuum* from anther culture, *Scientia Sinica*, 16 (1), 147-151.

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*, 36 (2), 181-187.