

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

**SÜS BİBERİ SHED-MİKROSPOR KÜLTÜRLERİNDE
ÇALKALAYICI KULLANIMININ EMBRİYO VERİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Selcen YILDIRIM DOĞAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

2016

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

**SÜS BİBERİ SHED-MİKROSPOR KÜLTÜRLERİNDE
ÇALKALAYICI KULLANIMININ EMBRİYO VERİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Selcen YILDIRIM DOĞAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez TÜBİTAK-TEYDEB (1505) tarafından
5120019 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

2016

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

**SÜS BİBERİ SHED-MİKROSPOR KÜLTÜRLERİNDE
ÇALKALAYICI KULLANIMININ EMBRİYO VERİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Selcen YILDIRIM DOĞAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 26/02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Esin ARI
Doç. Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM


.....
.....
.....

ÖZET

SÜS BİBERİ SHED-MİKROSPOR KÜLTÜRLERİNDE ÇALKALAYICI KULLANIMININ EMBRİYO VERİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Selcen YILDIRIM DOĞAN

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Esin ARI

Şubat 2016, 53 sayfa

Süs biberleri (*Capsicum annuum* L.), morfolojik çeşitlilikleri sebebiyle mevsimlik çiçek ve yer örtücü olarak park ve bahçelerde, aranjman dal olarak kesme çiçekçilikte ve saksı bitkisi olarak iç mekanlarda sıklıkla kullanılan, son dönemlerde süs bitkisi sektöründe önemi artan bitkilerdir. Süs bitkisi değerinin yanı sıra süs biberlerinin içerdiği çeşitli etken maddeler gıda, kozmetik ve ilaç gibi pek çok sektörde kullanılmakta, bütün bunlar göz önüne alındığında, çeşitli sektörler için ıslah çalışmalarının önemi ortaya çıkmaktadır. Ancak literatürde süs biberinde haploidizasyon destekli yapılan ıslah çalışmaları oldukça sınırlı sayıdadır. Söz konusu amaç için ele alınan 5120019 nolu TÜBİTAK-TEYDEB 1505 projesi kapsamında yürütülen bu tez çalışmasında; ticari ve yerel orijinli toplam 29 süs biberi genotipinin shed-mikrospor kültürlerinde, çalkalayıcı kullanımının embriyo verimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle, çalışmada kullanılacak uygun mikrospor safhasına sahip süs biberi genotiplerine ait tomurcuk morfolojileri tespit edilmiştir. Elde edilen morfolojik bulgular DAPI destekli sitolojik çalışmalarla desteklenerek, uygun safhadaki mikrosporlara sahip tomurcuk boyutları saptanmıştır. Uygun safhadaki tomurcuklar bir gün süreyle karanlık koşullarda +4°C’de ön soğuklatma uygulamasına tabi tutulduktan sonra, anterler çift fazlı shed-mikrospor ortamında kültüre alınmışlardır. Kültürler bir hafta süreyle karanlık koşullarda 9°C’de inkübe edildikten sonra, yarısı çalkalayıcı üzerinde, diğer yarısı ise kontrol grubu olarak durağan halde 28°C’de 3 hafta ve ardından 3-5 hafta süreyle 21°C karanlık ortam koşullarında bekletilmişlerdir. Çalışmada gözlem olarak, petride oluşan toplam embriyo sayıları, globular embriyo sayıları, kotiledonları uzayan embriyo sayıları ve çift kotiledonlu normal görünümü embriyo sayıları ile çimlendirme ortamına aktarılan embriyo sayıları kaydedilmiştir. Çalışmada, durağan ve çalkalayıcı üzerindeki kültür ortamlarından elde edilen toplam embriyo ve normal görünümü çift kotiledonlu embriyo sayılarının varyans analizleri sonucunda uygulamalar arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmazken, genotipler arasındaki fark ise oldukça önemli bulunmuştur. Toplam embriyo ve globular embriyo oluşturma yönüyle, çalkalayıcı üzerindeki kültürlerin daha başarılı oldukları saptanmıştır. Embriyo oluşturma performansı açısından en başarılı sonucu veren 754. genotipin çalkalayıcı üzerindeki kültürlerinde kontrol grubuna göre, yaklaşık 4.5 kat daha fazla ortalama embriyo oluştuğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Süs biberi, shed-mikrospor kültürü, haploid

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Esin ARI (Danışman)

Doç. Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM

ABSTRACT

THE EFFECT OF SHAKER USE ON EMBRYO YIELD OF SHED-MICROSPORE CULTURES IN ORNAMENTAL PEPPER

Selcen YILDIRIM DOĞAN

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Esin ARI

February 2016, 53 pages

In recent years, due to their morphological diversity, ornamental peppers (*Capsicum annuum* L.) has become a favored plant in ornamental plant sector as seasonal flowers and bedding plant in parks and gardens, as arrangement branch use in cut flower sectors and as pot plants in indoor ornamental plant usage. In addition to their ornamental value, ornamental peppers are utilized in food, cosmetics and medicinal sectors because of their various active substances. However in literature, there are limited numbers of breeding studies for ornamental peppers based on haploid technology. In this study which is carried out within the scope of TUBITAK-TEYDEB-1505 type project (no 5120019), the effect of using shaker on embryo yield was determined in the shed-microspore cultures of a total of 29 ornamental pepper genotypes derived from different commercial and domestic origins. For this purpose, firstly the bud morphologies of ornamental peppers were identified. The morphological findings were supported with the cytological studies using DAPI staining to confirm the bud morphologies having the microspores in proper stages. After pretreatment of proper buds at +4°C for one day in dark conditions, the anthers were cultured in shed-microspore culture media with two phase. Later, the cultures were incubated at 9°C for one week in dark conditions and after that the cultures were divided equally as shaker and control groups and transferred to 28°C for 3 weeks and then the treatment groups were incubated at 21°C for 3-5 weeks in dark conditions. The numbers of total embryos, globular embryos, embryos extending cotyledons, dicotyledonous normal looking embryos and embryos transferred to germination medium were recorded. According to variance analysis of total embryos and dicotyledonous normal looking embryos obtained from cultures of control and shaker groups, it was revealed that there is no significant difference between the applications, however the genotypes are found to be significantly different from each other. It was determined that the cultures on shakers gave more successful androgenic performance in regard of forming total and globular embryos. The most successful embryogenic performance was obtained from genotype 754 and the cultures of genotype 754 on shaker formed about 4.5 times more average total embryos when compared to its control group.

KEYWORDS: Ornamental pepper, shed-microspore culture, haploid

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Esin ARI (Supervisor)
Assoc. Prof. Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU
Asst. Prof. Dr. Tolga YILDIRIM

ÖNSÖZ

Süs biberleri çeşitli avantajları nedeniyle dünyada yeniden rağbet görmeye başlamıştır ve ekonomik değerleri gittikçe artmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda bu bitkilerin ıslahına yönelik çalışmalar da artmaya başlamıştır. Ancak bu çalışmalarda literatürden gözlemlendiği kadarı ile şimdiye kadar genellikle klasik ıslah yöntemleri kullanılmakta olup, haploidizasyon tekniği ile çok sınırlı sayıda süs biberi ıslah çalışması yapılmıştır. Bu tez çalışmasının öncelikle literatüre, daha sonra da süs biberinde yapılabilecek haploidi çalışmalarına, dolayısıyla ıslah sürecinin kısaltılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

Bu tezin şekillenmesinde ve tamamlanmasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, doğru kaynaklara ulaşmamı sağlayan, laboratuvar ve arazi çalışmalarında bütün imkanları sunarak beni destekleyen, başarısını ve azmini örnek aldığım çok değerli danışman hocam Yrd. Doç Dr. Esin ARI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli tavsiye ve yorumlarıyla tezime son şeklinin verilmesini sağlayan, tez savunma jürimde bulunan Doç. Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın istatistiksel analiz kısmına bilimsel katkılarından ve değerli yorumlarından ötürü sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM'a çok teşekkür ederim.

Değerli tecrübelerini paylaşan tüm Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar ve arazi çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Hilal BEDİR ve Merve BANKOĞLU'na teşekkür eder, hayat boyu başarılarının devamını dilerim.

Bu tez çalışmasına TEYDEB 1505 nolu program çerçevesinde, 5120019 nolu proje kapsamında destek veren TÜBİTAK'a ayrıca teşekkür ederim.

Tüm yaşamımda, bana her daim güvendiklerini bildiğim, maddi ve manevi yönden beni her zaman destekleyen, bugünlere gelmemi sağlayan çok kıymetli annem Emsal YILDIRIM'a, fedakâr babam Doğan YILDIRIM'a ve biricik kardeşim Şakir Semih YILDIRIM'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Son olarak hayat arkadaşım Dr. Güray DOĞAN'a tezime katkılarından ve özellikle hayatıma katmış olduğu değerden ötürü sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	7
2.1. Süs Biberiyle İlgili Yapılan Klasik Islah Çalışmaları	7
2.2. Süs Biberinde Yapılan Biyoteknolojik Islah Çalışmaları	8
2.3. Androgenesis ile İlgili Kuramsal Bilgiler	9
2.4. Biber ve Süs Biberinde Yapılan Androgenesis Çalışmaları.....	15
2.4.1. Sebze biberinde yapılan androgenesis çalışmaları	15
2.4.2. Süs biberinde yapılan androgenesis çalışmaları	18
3. MATERYAL VE METOT.....	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Kullanılan bitki materyali	21
3.1.2. Bitki yetiştiriciliği	23
3.2. Metod	23
3.2.1. Morfolojik ve sitolojik çalışmalar	23
3.2.1.1. Uygun tomurcuk büyüklüğünün tespit edilmesi.....	23
3.2.1.2. Uygun mikrospor safhasının tespit edilmesi	24
3.2.2. Anterlerin kültüre alınması	25
3.2.2.1. Ön uygulamalar ve kültür koşulları	25
3.2.2.2. Kullanılan besin ortamları ve kurulan denemeler.....	25
3.2.2.3. Embriyo rejenerasyonu	26
3.2.2.4. İncelenen özellikler.....	26
3.2.2.5. Deneme deseni.....	27
4. BULGULAR	28
4.1. Morfolojik ve Sitolojik Çalışma Bulguları	28
4.1.1. Uygun tomurcuk büyüklüğünün tespit edilmesi.....	28
4.1.2. Uygun mikrospor safhasının tespit edilmesi.....	29
4.2. Embriyo Verim Bulguları.....	30
4.2.1. Durağan ortamdaki shed-mikrospor kültür sonuçları	31
4.2.2. Çalkalayıcı üzerinde bulunan shed-mikrospor kültür sonuçları	34
4.3. Embriyo Rejenerasyonu Bulguları	37
4.3.1. Durağan ortamdaki kültürlerin embriyo rejenerasyon bulguları	37
4.3.2. Çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerin embriyo rejenerasyon bulguları	38
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ	45
7. KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Derece santigrat
mg ^l ⁻¹	Miligram/litre
µL/L	Mikrolitre/litre
µM	Mikromol
µm	Mikrometre
m ²	Metrekare
gl ⁻¹	Gram/litre
µl	Mikrolitre
dk	Dakika
ml	Mililitre
nm	Nanometre
mg	Miligram
M	Mol
µmol/m ² .s	Mikromol/metre-kare.saniye
rpm	Dakikadaki tur sayısı

Kısaltmalar

2,4-D	2,4-diklorafenoksiasetik asit
NLN	Nitsch ve Nitsch (1969) tarafından geliştirilen ve Lichter (1981, 1982) tarafından modifiye edilen besi ortamı
NN	Nitsch ve Nitsch (1969) besin ortamı
IAA	Indole-3-asetik asit
NAA	Naftalin asetik asit
DH	Doubled haploid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Na ₂ HPO ₄	Disodium Hydrogen OrthoPhosphate
AgNO ₃	Gümüş nitrat
B5	Gamborg vd (1968) besin ortamı
KOH	Potasyum hidroksit
BA	Benzyl adenine
HCl	Hidroklorik asit
MS	Murashige ve Skoog (1962) besin ortamı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. (a) 96 nolu genotipe ait seradan bir görüntü, (b) 174 nolu genotipe ait seradan bir görüntü	21
Şekil 4.1. Antosiyansiz 96 nolu ve antosiyanlı 174 nolu genotipin büyüklüklerine göre 6 gruba ayrılmış tomurcuklarının görüntüsü.....	28
Şekil 4.2. Antosiyansiz 96 ve antosiyanlı 174 nolu genotiplerin farklı tomurcuk boylarında tespit edilen mikrospor safhaları	30
Şekil 4.3. Durağan ortamdaki kültürlerden elde edilen çeşitli embriyo gelişim örnekleri.....	37
Şekil 4.4. Çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerden elde edilen çeşitli embriyo gelişim örnekleri.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan 29 süs biberi genotipinin morfolojik özellikleri ve potansiyel kullanım alanları	22
Çizelge 4.1. Antosiyaninsiz 96 nolu genotipin farklı tomurcuk boyutlarındaki morfolojik ve sitolojik bulgular	29
Çizelge 4.2. Antosiyaninli 174 nolu genotipin farklı tomurcuk boyutlarındaki morfolojik ve sitolojik bulgular	29
Çizelge 4.3. Genotiplerden elde edilen petride oluşan toplam embriyo sayılarının varyans analiz sonuçları	31
Çizelge 4.4. Genotiplerden elde edilen petride oluşan normal embriyo sayılarının varyans analiz sonuçları	31
Çizelge 4.5. Durağan ortamda mikrospor embriyogenesis performansları test edilen 29 genotipten tomurcuk başına elde edilen toplam embriyo ve normal embriyo sayıları ortalamalarının karşılaştırılması	32
Çizelge 4.6. Durağan kültür ortamında mikrospor embriyogenesis performansları test edilen 29 genotipten elde edilen toplam embriyo, gelişimi globular aşamayı geçemeyen toplam embriyo, kotiledonları uzayan embriyo, çift kotiledona sahip normal sağlıklı embriyo ve çimlendirme ortamına aktarılan embriyo sayıları	33
Çizelge 4.7. Çalkalayıcı üzerinde mikrospor embriyogenesis performansları test edilen 29 genotipe ait kültürlerden tomurcuk başına elde edilen toplam embriyo ve normal embriyo sayıları ortalamalarının karşılaştırılması	34
Çizelge 4.8. Çalkalayıcı üzerinde mikrospor embriyogenesis performansları test edilen 29 genotipe ait kültürlerden elde edilen toplam embriyo, gelişimi globular aşamayı geçemeyen toplam embriyo, kotiledonları uzayan embriyo, çift kotiledona sahip normal sağlıklı embriyo ve çimlendirme ortamına aktarılan embriyo sayıları	36

1. GİRİŞ

Süs biberleri (*Capsicum annuum* L.), sebze biberi ıslah çalışmaları sırasında rastlanan süs bitkisi değerine sahip genotiplerin değerlendirilmesi sonucu süs bitkileri sektörüne kazandırılan sebze kökenli bitkilerdir.

Capsicum cinsinin kökeni Orta ve Güney Amerika'ya dayanmaktadır. Buradan Asya ve Avrupa kıtalarına yayılmıştır. *Capsicum* türleri M.Ö. 7500'den bu yana insanların beslenme kültürlerinde yer almıştır. İçerisinde süs bitkisi değeri taşıyan saksı tipi biberlerin de bulunduğu, *Capsicum* cinsine ait, *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* Willd ve *C. pubescens* Ruis&Pav gibi pek çok türdeki ıslah çalışmaları 15. yüzyılda Kristof Kolomb'un Amerika'yı keşfinden evvel başlamıştır. Öyle görünmektedir ki, farklı ve güzel görünen *Capsicum* türlerine olan ilgi çok eski dönemlere dayanmaktadır (Stommel ve Bosland 2007).

C. annuum, *Capsicum* türleri arasında bugün dünyada en çok tarımı yapılan ve ekonomik öneme sahip olan türdür. Mutfakta taze ve kurutulmuş olarak, gıda endüstrisinde taze tüketim, konserve, sos, baharat ve turşuluk amaçlı ve peyzajda dekoratif amaçlı olarak kullanılan ticari çeşitleri bulunmaktadır (Stommel ve Bosland 2007). Ayrıca sadece *Capsicum* cinsine özgü, güçlü bir alkaloid olan kapsaisin, güvenlik amaçlı göz yaşartıcı spreylerde, biber gazının etken maddesi olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında, kapsaisin maddesi geçmişten bu zamana tedavi amaçlı olarak da kullanılmaktadır. Geçmişte Mayalar *Capsicum* cinsine ait bitkileri astıma, öksürüğe ve boğaz enfeksiyonlarına karşı, Aztekler ise diş ağrıları için tedavi edici olarak kullanmışlardır. Günümüz ilaç endüstrisinde, kapsaisin maddesi, özellikle kas ağrıları için ağrı kesici ilaçlarda, tahriş olmuş bölgelerin iyileştirilmesi için cilt yüzeyinden kullanılan ilaçlarda, zona tedavisi ve kaşıntı gidermek için geliştirilen ilaçlarda etken madde olarak kullanılmaktadır. Biber meyvelerinin çeşitli renk almasında rol oynayan, yine sadece *Capsicum* cinsine ait olan kapsantin, kapsorubin ve kriptokapsin gibi bazı keto-karotenler aynı zamanda gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde boya katkı maddesi olarak değer görmektedir (Bosland 1996).

Biber, meyvelerinin yüksek miktarda kuru madde, C vitamini, B vitamini kompleksi, mineral, esans, karoten benzeri içeriklere sahip olması sebebiyle dünyanın pek çok yerinde önemli ticari ve biyolojik değere sahip bir sebzedir (Irikova vd 2011a). *C. annuum* L. çeşitlerinden süs bitkisi değerine sahip olanlar ise morfolojik çeşitlilikleri sebebiyle mevsimlik çiçek ve yer örtücü olarak park ve bahçelerde, aranjman dal olarak kesme çiçekçilikte ve saksı bitkisi olarak iç mekan süs bitkisi sektöründe kullanılmaktadır. Farklı meyve ve yaprak şekilleri, olgun meyvelerinde görülen kırmızı, turuncu, sarı, mor, eflatun gibi çeşitli renk ahenkleri, yeşilden mora değişik tonlara sahip yaprak pigmentasyonu, süs biberlerini kesme çiçekçilik ve peyzaj amaçlı kullanıma elverişli hale getiren özelliklerden bazılarıdır. Bu fiziksel özelliklerinin yanı sıra süs biberinin, kolay ve hızlı yetişebilme özellikleri, sıcak ve kuraklığa dayanıklılıkları ve yüksek meyve tutum oranları peyzaj değerlerini arttırmaktadır (Stommel ve Bosland 2007).

Capsicum cinsine ait birçok türün, tam çiçekli ve kendine döllenir olduğu bilinmektedir. Buna karşılık *C. cardenasaii*, *C. buforum*, *C. flexuosum* gibi bazı yabancı türlerde ve ıslah edilmiş *C. pubescens* türünde kendine döllenememe sorunu görülmektedir. Süs biberleri ise genellikle kendileme depresyonu göstermezken, hibritlerinde heterosis etkisi görülebilir. Süs biberinin bütün tiplerinde dişi üreme organı erkek üreme organından daha önce gelişir (protogeny) ve süs biberleri yabancı döllenebilirler. Süs biberleri kendine döllenebilir olarak tanımlansa da tozlanmaları böcekler vasıtasıyla da olabilir. Bosland (1993)'ın bildirdiğine göre farklı biber genotiplerinin bitki çiçek yapılarına bağlı olarak süs biberlerinde çapraz döllenme oranı %2 ile %90 arasında değişebilmektedir. Bu sebeple süs biberi tohumu yetiştiricilerinin kontrolsüz tozlanmaları önleme konusunda dikkatli olmaları gerektiği vurgulanmaktadır (Stommel ve Bosland 2007). Kontrolsüz polinasyon, biberde ıslah edilmek istenen karakteristik özelliklerin hızla kaybedilmesine neden olmaktadır. Bu durum biberin geleneksel yöntemlerle zahmetli ve uzun sürelerde ıslah edilmesi sorununu karşımıza çıkarmaktadır. *In vitro* yöntemlerle doubled haploid bitkiler elde etmenin, biber ıslahında geleneksel yöntemlerde karşılaşılan problemlerin üstesinden gelebileceği düşünülmektedir (Irikova vd 2011a).

In vitro yöntemlerle, yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin elde edilmesi amacıyla, bütün bir bitki ya da hücre, doku ve organ gibi bitki parçacıklarının steril şartlarda ve yapay besin ortamlarında kültüre alınması işlemi bitki doku kültürü olarak bilinmektedir. Doku kültürü; bitkilerin klonal olarak hızlı çoğaltılması, geleneksel yöntemlerle kolay çoğaltılamayan bitki elde edilmesi, somaklonal varyasyonların oluşturulması, haploid bitkilerin elde edilmesi, bitki gen kaynaklarının muhafazası, sekonder metabolitlerin üretilmesi, ıslah amaçlı çalışmalar ve hastalıktan arındırılmış bitkiler elde edilmesi gibi amaçlar için kullanılmaktadır (Ellialtıoğlu vd 2001). Bu amaçlar arasında yer alan haploid bitkilerin elde edilmesi haploid bitki teknolojisi ile gerçekleştirilmektedir.

Haploid bitki teknolojisi; erkek ya da dişi gametten haploid embriyo elde edilmesini ve bu embriyolardan haploid veya doubled haploid (DH) bitkiler üretmeyi kapsamaktadır. Bu teknik, homozigot saf hatların elde edilmesine giden en hızlı yol olarak bilinmektedir (Supena 2004). Haploid bitkiler, her bir lokustaki alellerden sadece bir seriyi içerdiği için bitki ıslahında önemli bir yer tutmaktadır. Haploid bitkilerin homolog kromozomlardan sadece bir takımını içermesi, resesif mutasyonların açığa çıkartılmasına olanak tanımaktadır. Bunun yanı sıra bu bitkilerin kromozom sayılarının katlanması sayesinde %100 homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir. Böylece uzun yıllara gereksinim duyan saflaştırma işlemi, tek bir generasyonda yapılabilmekte, kombinasyon ıslahı ve F₁ hibrit çeşit ıslahı programlarında zaman yönünden ve ekonomik açıdan önemli düzeyde kazanç sağlanabilmektedir (Ellialtıoğlu vd 2001). Haploidlerin bitki ıslahına sağlamış olduğu diğer avantajlar şöyle sıralanabilir: Çeşitli mutasyon uygulamalarından sonra değişen resesif ya da dominant genlerin ilk generasyonda izlenebilmesine yardımcı olarak, *in vitro* aşamada seleksiyon yapabilmeye olanak sağlamaktadır (Maluszynski vd 2003). Haploid bitkiler patojenlere ve ırklarına karşı *in vitro* aşamada seleksiyona olanak sağlayarak, dayanıklılık ıslah çalışmalarında yer, zaman ve maddi kazanç sağlamaktadır. DH bitkilerden elde edilen saf hatlar, F₁ hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilirler. Kendileme depresyonu gösteren

lahana ve çilek gibi türlerde tek generasyonda homozigot hatlara ulaşılması sağlanabilmektedir (Ellialtıoğlu vd 2001).

Haploid bitkilerin çeşitli yollardan doğada kendiliğinden ortaya çıkma sıklığı türlere ve hatta tür içerisinde genotiplere bağlı olarak değişmekte, çoğunlukla %0.1 – 0.001 gibi çok düşük oranlarda gerçekleşmekte, birçok türde ise doğal haploid oluşumuna hiç rastlanmamaktadır (Pocard ve Dumas de Vaulx 1971, Ellialtıoğlu vd 2001). Şebboy, tütün, domates, darı, çavdar vb. doğada spontan bir şekilde haploid oluşumları tespit edilmiş bitkiler arasında bulunmaktadır (Dunwell 2010).

Haploid bitki elde etmede gynogenesis ve kromozom eliminasyonu gibi diğer *in vitro* yöntemlere kıyasla, anter ve mikrospor kültürlerini kapsayan androgenesis yöntemleri daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Bajaj, 1990, Ferrie vd 1994, 1995, Palmer ve Keller 1999, Supena 2004). Androgenesis yöntemleri ile oluşan bitkiler haploid veya spontan olarak katlanarak DH olabilmektedirler. Oluşan haploid bitkilerin kromozom sayıları *in vivo* şartlarda kolhisin gibi farklı antimitotik kimyasalların kullanımı ile ikiye katlanabilmekte ve DH bitkilere dönüştürülebilmektedirler. Bu kimyasallar aynı amaçla *in vitro* koşullarda ise bitkinin mikrospor, embriyo ve boğum arasındaki sürgün gibi farklı eksplantlarına uygulanabilmektedir.

Haploidi ile ilgili ilk önemli gelişme, Guha ve Maheshwari tarafından 1964 yılında *Datura innoxia* bitkisinin anter kültürü çalışmalarında atılmıştır. Söz konusu çalışmadaki birçok kültürde embriyo gözlenmiş ve bu embriyoların haploid kromozom sayıları içerdikleri kanıtlanmıştır (Guha ve Maheshwari 1966). Bu keşif; erkek gametofitik hücrelerinin totipotensi yeteğini göstermiş, olgunlaşmamış polen tanelerinin, sporofitik bölünmelerle, embriyo oluşturarak bütün bir bitki elde edilebileceğini ortaya koymuştur (Supena 2004). Sonraki yıllarda Bourgin ve Nitsch (1967), *Nicotiana tabacum* türünde anter kültürü yoluyla tam bir haploid bitkiyi elde etmeyi başarmışlardır. Androgenesis yöntemlerinin zaman içinde geliştirilmesiyle birlikte haploid ve DH bitki elde etmede sadece katı ortamların kullanıldığı anter kültürü metodlarından başka yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. İzole edilmiş mikrospor kültürü ve çift fazlı ortamda gerçekleştirilen shed-mikrospor kültürü bu yeni yöntemlere örnek olarak gösterilebilir. Geçmişten bu yana androgenesis çalışmalarında önemli aşamalar kaydedilmiş olup, 2003 yılı itibariyle literatürde yayınlanmış, içerisinde buğday, arpa, pirinç gibi otsu bitkilerden, çeşitli ağaç türlerine kadar 250'den fazla bitki türü için DH bitki elde etme protokolleri geliştirilmiştir (Maluszynski vd, 2003). Yeni yaklaşımlarla birlikte günümüzde bu sayının çok daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. Bu protokollerin geliştirilmesi tarımsal ve ekonomik değeri yüksek olan Solanaceae familyasının türleri için de oldukça önemlidir.

Solanaceae familyasına ait türler, tarihte tarımsal faaliyetlerin başlamasından itibaren yiyecek ve baharat olarak kullanılmaktadır. Ancak Solanaceae türleri içinde başta domates (*S. lycopersicum*) olmak üzere biber (*C. annuum*) ve patlıcan (*S. melongena*) androjenik yönden inatçı türler arasında kabul edilmektedir (Segui-Simarro vd 2011). Segui-Simarro vd (2011) androgenesise güç cevap veren Solanaceae familyasına ait türlerle ilgili yaptıkları derleme çalışmasında, biberde mikrospor embriyogenesis çalışmalarından en verimli sonuçların alındığı protokolleri: (i) Dumas de Vaulx vd (1981)

tarafından ortaya konan anter kültürü metodu, (ii) Dolcet-Sanjuan vd (1997) tarafından geliştirilen çift fazlı metod, (iii) Supena (2004) tarafından geliştirilen shed-mikrospor yöntemi ve (iv) izole edilmiş mikrosporların doğrudan kültüre alınma metodu olarak bildirmişlerdir. Bu yöntemlerden mikrospor kültürü; başlangıç materyali olarak çok sayıda ve daha homojen bir mikrospor popülasyonu bulundurması, anter dokusundan yayılan büyümeyi engelleyici maddeleri içermemesi, anter bağ dokusu gibi büyüme esnasında rekabet oluşturabilecek yapıları bulundurmaması ve izole edilmiş mikrosporların, maternal doku olmaksızın doğrudan kullanılarak, kültür koşullarının daha kontrollü yönetilmesi gibi sebeplerle anter kültürüne göre daha avantajlıdır (Supena 2004). Ancak androgenesise güç tepki veren inatçı türler arasındaki biber için genotip faktörü ve embriyo gelişim sorunu yüzünden rutin işleyen bir androgenesis protokolü geliştirmek hala mümkün olmamıştır (Segui-Simarro vd 2011).

Genotip, DH bitki gelişimini etkileyen en önemli faktörlerden birisi olarak kabul edilmektedir (Dunwell 2010, Segui-Simarro 2010). Özellikle biber mikrospor embriyogenesisinde, haploid bitki elde etmenin önündeki en büyük ikinci engel, embriyo gelişimindeki bazı anormallikler olarak görülmektedir (Segui-Simarro vd 2011). Mikrospor kaynaklı embriyoların zigotik embriyolara kıyasla daha kısa kotiledonları olduğu, hatta bazen kotiledonlarının bulunmadığı, lateral gelişimlerinde önemli eksikliklerin görüldüğü ve anormal yapılar oluşturduğu saptanmıştır (Supena vd 2006a, Kim vd 2008, Parra Vega vd 2010).

Süs biberlerine dönmek gerekirse, çok uzun zamandır yurtdışında süs amacıyla kullanılan ve ıslah çalışmaları yapılan bu bitkilerin ülkemizdeki kullanımı, turşuluktan öteye geçememiş ve herhangi bir çeşit henüz geliştirilmemiştir.

Türkiye süs bitkileri sektörünün en önemli sorunlarından birisi, bu sektörün çeşitli alt sektörlerinde kullanılan üretim materyalleri konusunda çoğunlukla dışa bağımlı olunmasıdır. Dış mekan süs bitkileri sektörü içerisinde mevsimlik bitki üretiminde tamamen dışa bağımlılık söz konusudur. Bu nedenle mevsimlik çeşit geliştirmeye yönelik ıslah çalışmaları bu sektör için son derece önemlidir. Süs biberleri, süs değerlerinin yanı sıra sıcağa – kuraklığa dayanıklılık gibi çeşitli nedenlerle peyzajda kullanım yönünden önemli avantajlara sahiptir ve dünyadaki ıslah çalışmalarında da bu nedenle son yıllarda belirgin bir artış görülmeye başlanmıştır.

Peyzaj değerinin yanı sıra süs biberinin yukarıda açıklanan kapsaisin içeriği nedeni ile tedavi amaçlı medikal sektörde ve renklendirici bileşikler içermesi sebebiyle gıda, kozmetik ve ilaç gibi pek çok sektördeki ticari potansiyeli göz önüne alındığında, ıslahın önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır.

Bilindiği kadarı ile süs bitkisi kullanımı amacıyla süs biberi ile ilgili yapılan ıslah çalışmaları Stommel ve Griesbach tarafından klasik ıslah yöntemleri ile geliştirmiş ticari çeşitlerden öteye geçememiştir. Haploidizasyon destekli ıslah çalışmaları ise edinilen araştırmalara göre bu tez çalışmasının yürütüldüğü laboratuvar ile işbirliği içinde olan PEY-ART Ltd. Şti. (Antalya)'nde ve Brezilya'da Dr. Rego Elizanilda Ramalho ve ekibi tarafından yürütülmektedir.

Bu çalışmanın temeli Supena vd (2006a) ile Supena ve Custers (2011)'in Endonezya tipi acı sebze biberleri için geliştirmiş olduğu çift fazlı shed-mikrospor yöntemine dayanmaktadır.

Son dönemde biberde yapılan diğer başarılı bir çalışmada, Kim vd (2013) acı bir biber çeşitinin, sıvı, çift fazlı ve iki aşamalı yöntemin kullanıldığı mikrospor kültürlerindeki embriyo gelişimlerini ve ileriki dönemlerde bitkiye dönüşebilme kapasitelerini kıyaslamışlardır. Söz konusu izole edilmiş mikrospor kültürü çalışmasında, sadece sıvı ortamda kültüre alınan mikrospordan daha çok embriyo elde edilmesine karşın, sıvı ortamdaki kotiledonları uzayan embriyo elde edilememiştir. Bu durum embriyoların ileriki dönemlerde bitkiye dönüşebilme ihtimalini düşürmektedir. Kim vd (2013), sıvı kültürlerdeki çok sayıda embriyo oluşumunu, sıvı ortamdaki mikrospordan hareket özgürlüğünün gerekli besin elementlerine ulaşmasına yardımcı olması ve anter ve mikrospordan salgılanan toksik özellikteki maddelerin, sıvı ortam sayesinde embriyodan kolayca uzaklaşması olarak açıklamıştır. Düşük kalitedeki embriyoları ise petrinin altında kalan embriyoların anaerobik koşullarda kalmasından kaynaklandığı üzerinde durmuşlardır.

Yang vd (2013)'nin *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* alt türü üzerinde yaptıkları çalışmada ise çalkalayıcı kullanımının, mikrospordan embriyo gelişimine teşvik edici bir unsur olduğu saptanmıştır. Çalkalayıcı kullanımının, hücrelerin daha rahat solunum yapmasına olanak tanıyarak ve ortam içerisindeki besinlerin hücreler tarafından alınmasını kolaylaştırarak, erken dönemdeki embriyoları çift kotiledonlu embriyo olma yolunda harekete geçirici etkisi olduğu gözlenmiştir. Söz konusu çalışmada farklı çalkalayıcı hızlarının embriyo gelişimi üzerinde etkileri denenerek, en uygun çalkalama hızı belirlenmeye çalışılmıştır.

Shed-mikrospor kültürü; açılan anter duvarlarından sıvı ortama saçılan sporların çift fazlı ortamın sıvı fazında gelişmesi açısından bir yönüyle sıvı kültür olarak kabul edilebilir. Sıvı ve hareketli sistemlerin kullanıldığı literatürde yer alan bazı çalışmalar da yorumlandığında, shed-mikrospor kültüründe hareketli ortamların kullanılmasının çalışmaya olumlu katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Yukarıda özet şeklinde açıklanmaya çalışılan literatürlerdeki özgün uygulama ve fikirleri de göz önüne alarak, bu yüksek lisans tezinin birkaç yönden özgün olduğu düşünülmektedir: Öncelikle bitkisel materyal olarak kullanılacak olan süs biberi genotipleri haploid performansları yönünden ilk kez test edilmiştir. Ayrıca bu çalışmanın yürütüldüğü laboratuvar ve Brezilya'da yapılmış az sayıda çalışma dışında süs biberinde yapılmış bir haploidi çalışmasına rastlanmadığı için yöntem yönünden özgünlük taşımaktadır. Öte yandan bu performansların belirlenmesinde kullanılan shed-mikrospor kültürünün dünyadaki örnekleri bile çok kısıtlı iken, bildiğimiz kadarı ile ülkemizde bu yöntemin çok fazla kullanılmamış olması ve haploidi çalışmalarında embriyo verimi üzerine çalkalayıcı etkisinin henüz araştırılmamış olması, tez yönteminin başka bir özgün değerini ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasında, bir androgenesis yöntemi olan Supena vd (2006a)'nin geliştirdiği çift fazlı shed-mikrospor kültürü kullanılarak, toplam 29 ticari ve yerel orijinli

süs biberi hatlarının haploid embriyo oluşturma performansları üzerine çalkalayıcı kullanımının etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır.



2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Süs Biberiyle İlgili Yapılan Klasik İslah Çalışmaları

Biber yetiştiriciliğinin tarihi, kökenlerinin bulunduğu Amerika kıtasında, oldukça eski zamanlara dayanmaktadır. Meksika’da yapılan arkeolojik kazılarda, M.Ö. 5000 yılına ait *C. annuum*’un yabani tür tohumlarına rastlanmıştır. *C. annuum* türünün M.Ö. ıslah edilmiş olduğu da yine yapılan arkeolojik kazılar sonucu rastlanan ıslah edilmiş tohumlar sayesinde anlaşılmıştır. 15. yüzyılda Kristof Kolomb’un Amerika’yı keşfi ile biber, Avrupa ile tanışırılmış daha sonra da İspanyol-Portekiz deniz ticaret yolları vasıtasıyla Afrika ve Asya’ya kadar ulaşmıştır. *Capsicum* cinsinden *C. annuum* türü bugün dünyada en çok yetiştiriciliği yapılan ve ekonomik değeri çok yüksek olan bir türdür. *Capsicum* cinsine ait süs biberleri (*C. annuum* L.) kolay ve kısa sürede yetiştirilebilen, sıcak ve kuraklığa toleranslı yapılarının yanı sıra göze hitap eden görünüşleri itibarıyla çeşitli süs bitkileri sektörlerinde, taze tüketim ve baharat amaçlı gıda sektörlerinde, içerdiği değerli bileşiklerle ilaç ve kozmetik sanayisinde önemli değere sahiptir (Stommel ve Bosland 2007). Süs biberlerinin çeşitli sektörlerde önem kazanması, üzerinde yapılan ıslah çalışmalarını yoğunlaştırmış ve çeşitlendirmiştir.

Taychasinpitak ve Taywiya (2003), Tayland’da yürüttükleri çalışmada, çeşitli yerel ve diğer süs biberi çeşitlerinde heterosis ve heterobeltiosis etkisini saptamaya çalışmışlardır. Söz konusu çalışmada araştırmacılar toplam 83 Tayland’a özgü ve diğer süs biberi hattı kullanmışlardır. Toplam 83 biber hattından, kendileme yapıldıktan sonra en verimli 12 ebeveyn (1, 2, 3, 4, 14, 53, 62, 67, 77, 79, 80, 81) ve bu ebeveynlerden elde edilen 11 hibrit genotipin, kanopy, meyve uzunluğu, meyve genişliği, meyve sayısı ve meyve ağırlığı gibi özelliklerini değerlendirilerek, özellikler arasındaki ilişkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Söz konusu çalışmada test edilen hibritlerden yedi tanesi (1x77, 3x77, 4x77, 14x77, 53x77, 62x77, 67x77) bitki başına meyve sayısı ve meyve ağırlığı yönüyle en yüksek heterosis oranı göstermişlerdir. Test edilen hibritlerden 3x77, 4x77’nin kompakt kanopy yapısına sahip olması ve yüksek meyve tutumu; 53x77 hibritinin ise kompakt kanopy yapısı, uzun meyveleri ve yüksek tutum oranı özellikleri sebebiyle dekorasyon amaçlı saksı bitkisi ya da yemeklik olarak değerlendirilebileceği ifade edilmiştir.

Stommel ve Griesbach (2004), tatlı dolmalık bir hibrit biber çeşiti olan Cadice ile açık tozlanan tatlı kabak görünümlü olarak ifade edilen Tennessee Cheese çeşitini çaprazlayarak Tangerine Dream (*C. annuum* L.) adını verdikleri bir süs biberi çeşiti geliştirmişlerdir. Turuncu renkli meyvelerinin albenili renk ve parlaklıkta olması, yayvan duruşlu yapısı ile Tangerine Dream peyzajda mevsimlik çiçek olarak kullanılmaya elverişli bulunmuştur.

Stommel ve Griesbach (2005), Black Pearl adını verdikleri ticari çeşidi Royal Black ile Arberatum-1 çeşitlerini kullanarak seleksiyon yoluyla elde etmişlerdir. Bu çeşit; kompakt büyüme göstermesi, siyah ve dik duruşlu parlak meyve yapısı ve siyah yapraklarıyla peyzajda mevsimlik bitki olarak kullanılmaktadır. Bu araştırmacıların yaptığı bazı çalışmalar Black Pearl çeşidinin yüksek ışığa maruz kaldığında saksı tipi yetiştiriciliğine de uygun olduğunu göstermiştir.

Süs biberinde yapılan klasik ıslah çalışmalarından bir diğeri yine Stommel ve Griesbach (2008a) tarafından yürütülmüş ve Lil' Pumpkin ile Pepper Jack isimli iki çeşit geliştirilmiştir. Lil' Pumpkin ve acı bir çeşit olan Pepper Jack, kompakt meyveleri, bodur yapıları, pürüzsüz ve parlak yaprakları ile peyzajda mevsimlik bitki olarak kullanılmaktadır.

Klasik yollar ile elde edilen süs biberi çeşitlerinden Midnight Creeper ve Solar Eclipse ticari çeşitleri yine Stommel ve Griesbach (2008b) tarafından geliştirmiştir. Araştırmacılar, uzun vejetasyon sürelerinden dolayı bu çeşitleri peyzajda örtü bitkisi olarak kullanılmanın elverişli olduğunu altını çizmişlerdir.

Gajanayake vd (2011), ticari 12 süs biberi çeşitinin, yüksek ve düşük sıcaklık toleranslarını belirleyebilmek amacıyla, polen yaşayabilirliği, hücre membranı termostabilitesi, klorofil stabilite indeksi ve kanopy sıcaklık depresyonu olarak tanımladıkları parametrelerin ölçümlerini yapmışlar ve bu değerler ile sıcaklık toleransları arasında ilişki kurmuşlardır. Çalışmaları sonucunda, Red Missile ve Salsa Yellow çeşitlerinin soğuğa dayanıklı, Chilly Chili, Medusa, Thai Hot, Explosie Ember ve Treasures Red'in sıcağa dayanıklı çeşitler olduğunu tespit etmişlerdir.

Barroso vd (2012), UFPB 134 × UFPB 77.1 kodlu süs biberi ebeveynlerinin çaprazlanmasından elde edilmiş 50 adet F₂ hattında bitkileri, fide boyu, bitki boyu ve kotiledon yaprak uzunluğu açısından karakterize etmişlerdir. Çalışma, medikal ve peyzaj değeri günden güne artan süs biberlerinde kantitatif karakterlerin tanımlanmasına katkı sağlayarak gen kaynaklarını karakterize etmek amacıyla yapılmıştır.

Santos vd (2014), süs biberinde önemli özelliklerden olan bitki yapısı ve meyve kalite özelliklerinin kalıtım ve epistasis etkisini incelemişlerdir. Söz konusu çalışmada P₁, P₂ ebeveynleri, bu ebeveynlerin çaprazlanmasından elde edilen F₁ ve F₁'lerin kendilenmesinden elde edilen F₂ kademesindeki bitkiler ile F₁'in P₁ ile geriye melezlenmesinden elde edilen BC₁ ve P₂ ile geriye melezlenmesinden elde edilen BC₂'deki bitkiler incelenmiştir. Araştırmacılar izledikleri yaprak genişliği, meyve ağırlığı, meyve büyüklüğü, corolla ve petal genişliği gibi morfolojik ölçüleri değerlendirmişlerdir. Süs biberi ıslahında önem taşıyan bitki boyu ve meyve özelliklerinin ağırlıklı olarak dominans etkileşim ile buna ek olarak allelik etkileşimler gösterdiğini tespit etmişlerdir.

2.2. Süs Biberinde Yapılan Biyoteknolojik Islah Çalışmaları

Süs biberinde, yukarıda aktarılmaya çalışılan çeşitli klasik ıslah ve androgenesis çalışmalarının yanında farklı biyoteknolojik yöntemlerin kullanıldığı modern ıslah çalışmaları da giderek yaygınlaşmaktadır.

Bu yaklaşımlardan mutasyon ıslahı, spontan olarak oluşan mutasyonlar ya da yapay olarak gerçekleştirilen mutasyonlar ile olabilmektedir. Stommel ve Bosland (2007)'in bildirdiğine göre mutasyon ıslahı ile süs bitkisi değeri taşıyabilecek Numex Pinata isimli bir süs biber çeşitinin gelişmesi sağlanmıştır. Bu ticari çeşidin olgun meyvelerinde *tra* geninin mutasyona uğraması sonucu yeşilden sarıya ve turuncudan

kırmızıya çeşitli renkler görülebilmektedir. Bununla birlikte mutasyon ıslahı süs biberi ıslah çalışmalarında henüz etkili şekilde kullanılan bir ıslah metodu değildir.

Süs biberi biyoteknolojik ıslah çalışmalarında bir başka yaklaşım olarak karşımıza çıkan markör destekli seleksiyon yöntemini Lee vd (2008)'nin, süs biberinde dik duruşlu meyve yapısını saptamak için geliştirdikleri CAPS markörü çalışmasında görmekteyiz. Söz konusu çalışmada araştırmacılar *C. annuum*'un meyvedeki dik duruş yapısını kontrol eden 12. kromozomun *up* lokusuna 4.3 cM uzaklıkta bir markör geliştirmişler, test ettikleri 34 adet dik meyveli genotipin 28 tanesinden doğru sonuç almışlardır. Araştırmacılar geliştirdikleri CAPS markörünün biberde markör destekli ıslah çalışmalarında erken fide döneminde kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Süs biberinde genetik düzeyde yapılan başka bir çalışma Lightbourn vd (2007)'nin *C. annuum*'da antosiyanin gen ekspresyonlarını etkileyen epistatik etkileşimleri inceledikleri çalışmadır. Araştırmacılar çalışmalarında, antosiyanin miktarına etkisi olduğu bilinen üç yapısal chalcone synthase (*Chs*), dihydroflavonol reductase (*Dfr*), anthocyanin synthase (*Ans*) genleri ile *Myc*, *Myb_A*, *Wd40* düzenleyici genlerinin çeşitli ışık ve sıcaklık koşullarında ekspresyonlarını incelemişlerdir. Söz konusu çalışmada, antosiyanin konsantrasyonu ile ilgili olarak sıcaklık faktörünün yapısal gen ekspresyonlarında etkili olmadığı, ancak ışık faktörünün yapısal gen ekspresyonlarının ortaya çıkmasında olumlu etkisinin olduğu saptanmıştır. Bunun yanında, düşük ışık koşullarında sıcaklık faktörünün *Myc*, *Myb_A* ve *Wd40* gen ekspresyonlarında etkisinin bulunmadığı, ancak yüksek ışık koşullarında sıcaklığın sadece *Wd40* gen ekspresyonuna etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Süs biberi ıslahındaki bir başka biyoteknolojik yaklaşım olan haploidizasyon çalışmaları ise yeni yeni kullanılmakta olup, bununla ilgili bilgilere aşağıda “Süs biberinde yapılan androgenesis çalışmaları” başlığı altında yer verilecektir.

2.3. Androgenesis ile İlgili Kuramsal Bilgiler

Androgenesis, çeşitli biyolojik aşamalar sonucu sadece erkek eşey hücresinden gelen kalıtıma sahip bireylerin oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Bu kavram önceleri, döllenmeden sonra dişi eşey hücresinin bertaraf olması neticesinde sadece erkek eşey hücresinden türemiş haploid bitkilerin oluşması olarak bilinmekteydi. Artık günümüzde, haploid ve DH bitkiler indirekt veya *in vitro* koşullarda direkt veya indirekt olarak da geliştirilebilmektedir. Androgenesiste erkek gametten haploid uyartımı anter kültürü, izole edilmiş mikrospor kültürü ve çift fazlı besin ortamlarının kullanıldığı shed-mikrospor yöntemi kullanılarak yapılabilmektedir.

Mikrospor embriyogenesisi ile haploid ve DH bitki elde edilmesi, androgenesis çalışmalarında en yaygın ve pratikte kullanılan güçlü bir uygulamadır (Segui Simarro 2010). Mikrospor embriyogenesisi, polen tanelerinin ya da öncü polen yapılarının embriyogenesis yolunda gelişimlerini tetiklemek için hücrelerin yeniden programlanması anlamına gelmektedir. Bu dönüşüme ilk kez *Datura innoxia* (Guha ve Maheshwari 1966) ve *Nicotiana tabacum* (Bourgin ve Nitsch 1967) türlerinde rastlanmıştır. Literatürde tanımlanan pek çok androgenesis protokolü olmasına karşı bunlardan *Brassica napus*,

Nicotiana tabacum, *Hordeum vulgare* ve *Triticum aestivum* mikrospor embriyogenesisine yeterli tepki veren model bitki türleri arasında kabul edilmektedir (Segui-Simarro ve Nuez 2008). Bugün içlerinde dünyada ekonomik değeri yüksek bitkilerin de bulunduğu başta domates olmak üzere biber, patlıcan ve Arabidopsis, androjenik yönden inatçı türler arasında sayılmaktadır. Bu önemli bitkilerin androgenesise direnç göstermesi, mikrosporların embriyogenesis yolunda ilerlemesinde kilit noktaların ne olduğu konusunu uzun yıllardır pek çok araştırmacının ilgi odağı haline getirmiştir (Segui-Simarro vd 2011).

Androgenesis başarısını etkileyen çeşitli faktörler mevcuttur ve bunlar arasından en önemlisi genotip olarak görülmektedir. Mikrosporların embriyogenesisine doğru ilerlemelerinde, uygun safhada çekirdek bulundurmaları androgenesis başarısını etkileyen bir diğer önemli etmendir. Kültür koşulları ve fiziksel/kimyasal muamelelerin de mikrosporları embriyogenesisine teşvik etmede önemli rol oynadığı bilinmektedir (Segui-Simarro 2010). Ellialtıoğlu vd (2001), androgenesisi etkileyen faktörleri donör bitkiden kaynaklı ve anter kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki koşullar olarak ayrı ele almışlardır. Genotip ve donör bitkinin yetiştirme koşullarını donör bitki kaynaklı; mikrosporların gelişme dönemlerini, ön uygulamaları, kullanılan besin ortamlarının bileşimlerini, yapılarını ve inkübasyon koşullarını androgenesis tekniklerinden kaynaklı etmenler olarak tanımlamışlardır.

Farklı tür ve çeşitlerin, hibritlerin, ıslah hatlarının yani farklı genotiplerin androgenesise verdikleri tepkilerin yukarıdaki etmenlere bağlı olarak farklılık gösterdiği androgenesis ile ilgili yapılan çeşitli yayınlarda ortaya konmuştur. Irikova vd (2011b), 19 farklı Bulgar biber genotipinde, androgenesis tepkisinin genotip, besin ortamı ve kültür süreleriyle olan ilişkisini tespit ettikleri çalışmada, bütün bu değişkenlerin anter kültürüne olan *in vitro* tepkiyi etkilediğini ortaya koymuşlardır. 19 genotipin üzerinde, C ve Cm ile kodlanan iki farklı indükleme ortamında, 12 ve 40 günlük kültüre alındığı ve R ile Rm kodlu iki farklı embriyo rejenerasyon ortamının kullanılarak yürütüldüğü çalışmada araştırmacılar, 15 genotipin kültüre alındıktan 35-40 gün sonra direk embriyo oluşumu gösterdiğini ve 11 genotipten bitki rejenerasyonu sağlandığını tespit etmişlerdir. Söz konusu çalışmada, C ortamında 12 gün süreyle kültüre alınan genotiplerin, 40 gün süreyle kültüre alınanlara göre direk embriyogenesis oluşturmada yetersiz kaldıkları kaydedilmiştir. Çalışmada bitkiye dönüşebilme kapasiteleri incelendiğinde ise R rejenerasyon ortamına aktarılan embriyoların 50-100% gibi yüksek oranlarda bitkiye dönüştükleri görülmektedir. Bunun yanısıra her iki indükleme ortamında 12 gün süreyle kültüre alınan genotipler yüksek androgenesis tepkisi veririrken, Rm ortamına aktarılan embriyoların bitkiye dönüşemedikleri gözlemlenmiştir. Çalışma genel olarak değerlendirildiğinde genotip, besin ortamı ve kültür süresinin androgenesise verilen tepkide önemli rol oynadığı ortaya çıkmıştır.

Besin ortamının ve içeriklerinin androgenesise cevap vermede önemi Lantos vd (2012)'nin çalışmasında bir kez daha karşımıza çıkmaktadır. Söz konusu çalışma F₁ kademesindeki tatlı biber hibrit çeşitleriyle yürütülmüş, izole edilmiş mikrospor kültürü yöntemiyle genotiplerin androgenesise verdikleri cevaplar tespit edilmiştir. Araştırmacılar öncelikli olarak iki genotip üzerinde dört farklı besin ortamı (W14, B5, MS ve NLN) kullanarak, mikrospor orijinli yapılar oluşturmada en etkin ortam içeriğinin B5 ortamı

olduğunu belirlemişlerdir. Sonraki adımda, iki genotip üzerinde B5 ortamına farklı konsantrasyonlarda 2,4-diklorophenoksiasetic asit (2,4-D) ve kinetin uygulamaları yaparak, büyüme düzenleyicilerinin mikrospor kültürüne etkisini incelemişlerdir. Söz konusu çalışmadan en başarılı sonuçlar B5 ortamında 0.1 mg l^{-1} 2,4-D ve 0.2 mg l^{-1} kinetin uygulaması yapılan mikrospor kültürlerinden elde edilmiştir. Araştırmada androgenesise tepki veren 11 genotipin kültürlerinden petri başına 20-100 arası embriyo benzeri yapı ve 0-8 arasında bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. Söz konusu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, embriyo oluşumundan bitkiye dönüşüme kadar androgenesinin başarısında, genotipin yanı sıra besin ortamındaki makro ve mikro elementlerin önemli etkisinin bulunduğu görülmektedir.

Androgenesis çalışmalarında besin ortamı içeriklerinden karbon kaynağı olarak sıklıkla sukroz ve glukoz kullanılmaktadır (Elliältioğlu vd 2001). Bunun yanında bazı çalışmalarda alternatif bir karbon kaynağı olarak maltozun başarı ile kullanıldığı görülmektedir. Örneğin Scott vd (1995), *H. vulgare* L. türünde glukoz ve sukroz kullanılan kültürler göre maltoz şekeri kullanılan kültürlerden daha fazla embriyogenesis tepkisi aldıklarını açıklamışlardır. Söz konusu çalışmada sukrozun mikrosporlar tarafından hızlı metabolize edilerek, hücrelerde etanol birikimine neden olup hücrelerin ölmesine neden olduğu, maltozun ise yavaş salınım göstermesi sebebiyle besin ortamında hücreler tarafından kullanılabilir yeterli miktarda oksijen kalmasına olanak sağladığı bildirilmiştir. Biber androgenesis çalışmalarında maltoz kullanımının olumlu sonuçları ise ilk defa Dolcet Sanjuan vd (1997)'nin çalışmasında rapor edilmiştir. Daha sonraki biber androgenesis çalışmalarında da maltoz kullanımının olumlu sonuçları görülmektedir (Supena vd 2006a, 2006b, Parra Vega vd 2013).

Androgenesis çalışmalarında başarıyı etkileyen önemli kilit noktalardan bir diğeri, mikrosporların gelişim safhası olarak kabul edilmektedir. Öyle ki, bir androgenesis çalışmasında diğer bütün kültür koşullar kusursuz olsa bile, uygun gelişim safhasında bulunan mikrosporlar kültüre alınmazsa, polen embriyogenesisi gerçekleşmeyecektir (Arı ve Büyükalaca 2010). Bu durum androgenesis çalışmalarına başlanmadan önce uygun mikrospor safhasının tespit edilmesinde yapılacak ön çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Arı ve Büyükalaca (2010), *Anemone coronaria* var. *coccinea*'da androgenesis için uygun çiçek tomurcuğu morfolojisinin tespit edilmesine yönelik yaptıkları çalışmada, farklı sitolojik ve histolojik boyama yöntemlerini kullanarak uygun tomurcuk morfolojisinin tanımlamasını yapmışlardır. Tomurcukları 10 grupta değerlendiren araştırmacılar *A. coronaria* var. *coccinea*'da anter kültürü için uygun safha olduğu düşünülen geç tek çekirdekli safhadaki mikrosporları $6 \times 9 \text{ mm}$ büyüklükteki 2 ve 3 numaralı tomurcukların içerdiğini belirlemişlerdir. Söz konusu çalışmada anter kültürü için uygun tomurcukların morfolojileri, genç tomurcukların özellikle toprak yüzeyinde yeni görünmeye başladığı sıralarda eğik durması ve çiçek sapı ile neredeyse paralel yakın şekilde oldukça dar bir açı oluşturması ve involukrum yaprakların henüz açılmaması nedeniyle tepallerin dışarıdan görünmemesi olarak tanımlanmıştır.

Androgenesis çalışmalarında kullanılacak bitkilerin yetiştirildiği dönemdeki bitki beslenme koşulları dâhil tüm çevresel faktörler, bitki materyalinden elde edilecek başarı yüzdesini etkileyen önemli etmenler arasında görülmektedir. Donör bitki yetiştirme koşullarının, androgenesis çalışmalarında mikrosporlardan embriyo oluşumuna etkisinin

yanı sıra oluşan embriyoların ileriki dönemde bitkiye dönüşme oranlarını da etkilediği belirtilmektedir (Ferrie ve Caswell 2011). Bitki yetiştirme koşullarının önemi Dahleen (1999)'in, *H. vulgare* L. türünde haploid embriyo kaynaklı kallus yapılarının bitki rejenerasyon başarısında, bitki yetiştirme koşullarının etkisini araştırdığı çalışmada görülebilir. Söz konusu çalışmada, Golden Promise ve Morex isimli *H. vulgare* çeşitlerinin, dört farklı uygulama zamanında, sera ve kontrollü yetiştirme koşullarından elde edilen bitki rejenerasyon başarıları değerlendirilmiştir. Çalışmada, Kasım ayında kontrollü koşullarda yetiştirilen bitkilerle yürütülen doku kültürlerinde rejenerasyon başarısının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Ön uygulamalar, besin ortamları ve ortamların içerdikleri makro mikro elementler, anter kültürü ve mikrospor kültürü başarısında rol oynayan diğer önemli etmenlerdir. Mikrospor embriyogenesisini başlatmada kullanılan kimyasal ve fiziksel ön uygulamalar, mikrosporları gametofitik yollarından saptırarak sporofitik yola yönelmelerini sağlamaktadır. Bu yöne teşvik edilen mikrosporlar embriyo ve sonrasında bitki oluşturmaya doğru ilerlemektedir (Ferrie ve Caswell 2011). Shariatpanahi vd (2006), stres uygulamalarının polenlerin mikrospor embriyogenesisine doğru programlanmalarına etkisini ortaya koydukları derleme çalışmasında, stres koşullarını üç grupta toplamışlardır: Bunlardan ilki, pek çok bitki üzerinde sıklıkla kullanılan ve başarı oranı yüksek kabul edilen, soğuk-sıcak şok uygulamaları, karbon kaynağı bulunmayan ortamlarda bekletme (açlık uygulaması), kolhisin uygulaması, santrifüj ve gama ışını uygulaması olarak sıralanmıştır. Diğer stres koşulları ise, ilkinin göre daha az kullanılan absisik asit uygulaması, feminize ajan kullanımı, etanol muamelesi, düşük atmosfer basıncı ve hipertonic şok uygulaması olarak tanımlanmıştır. En nadir yapılan ön uygulamalar ise yüksek pH değerine sahip ortamların kullanımı, karajenan oligosakkarit uygulaması, ağır metal muamelesi, indükleyici bazı kimyasallar ve 2,4-D uygulaması olarak belirtilmiştir.

Aynı türün farklı çeşitlerinin bile androgenesise tepkilerinin farklılık gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda, literatürde tür ve çeşit bazında yayınlanmış çok fazla sayıda besin ortamı bileşimine rastlanmaktadır (Maluszynski 2003). Bunlardan *B. napus*'un izole edilmiş mikrospor kültüründe kullanılan pH değeri 5.8, %13 sukroz içeren NLN rutin olarak kullanılan etkili besin ortamlarından biri olarak kabul edilmektedir (Lichter 1982). Kasha vd (2001), aralarında kışlık ve baharlık çeşitlerin de bulunduğu 30 adet *Hordeum vulgare* çeşitinde yürüttükleri izole edilmiş mikrospor kültür çalışmasında, rutin olarak kullanılan FGH ortamında (Hunter 1988) bazı modifikasyonlar yaparak yüksek embriyo verimleri elde etmişlerdir. Ortama oksin olarak phenyl asetik asit eklemişler, ortamda düşük oranda inorganik azot ve yüksek oranda organik azot (glutamin) bulundurmışlar ve karbonhidrat kaynağı olarak maltoz şekeri kullanmışlardır. Elde edilen başarılı sonuçlar neticesinde, Kasha vd (2001) tarafından geliştirilen bu yöntem arpada etkili bir mikrospor kültürü protokolü olarak literatürde yerini almıştır. Besin ortamlarına bitki büyüme düzenleyicileri, çeşitli amino asitler, aktif karbon, AgNO₃ ve diğer katkı elementlerinin eklenmesiyle pek çok besin ortamı bileşimlerinin kullanıldığı rutin protokoller geliştirilmiştir. Yukarıda belirtilenler bu etkin protokollerden sadece iki tanesidir (Maluszynski 2003). Öte yandan besin ortamlarında kullanılan aktif karbon doku kültüründe hücre büyüme ve gelişmesi için sıklıkla kullanılan önemli bir katkı maddesidir. Aktif karbon, por yapısı ve iç hacminin geniş oluşu sayesinde, kültür ortamında oluşan mikrosporlar tarafından üretilen toksik ve

fenolik bileşenleri adsorbe ederek, bu zararlı maddelerin doku kültürü materyaline zarar vermesini önlemektedir (Thomas 2008). Supena vd (2006b)'nin, Endonezya acı biber çeşitlerinde yürüttükleri shed-mikrospor kültürü çalışmasında, farklı konstantrasyonlarda (0.025 – 0.2 g/l) besin ortamına ilave edilen aktif karbon 'Tombak' çeşitinde olumlu sonuçlar ortaya koymuştur. Söz konusu çalışmada 0.2 g/l aktif karbon eklenmiş besin ortamından, aktif karbon bulunmayana göre daha yüksek sayıda toplam ve normal görünümlü sağlıklı embriyolar elde edilmiştir.

Besin ortamlarına makro ve mikro bileşenler, vitamin, bitki büyüme düzenleyicileri, karbonhidrat kaynağı ve bazı diğer zenginleştirici öğelerin yanı sıra, kültürde oluşabilecek kontaminasyon riskine karşı cefotaxime, timentin, rifampicin gibi gram pozitif ve gram negatif bakterilere etki eden antibiyotikler de eklenebilmektedir (Lantos vd 2006, Supena vd 2006b). Supena vd (2006b), Tombak ve Galaxy biber çeşitlerinde yürüttükleri shed-mikrospor kültür çalışmasında, 200 mg/l timentin ve 10 mg/l rifampicin antibiyotik uyguladıkları kültür ortamlarından, donör bitki kaynaklı kontaminasyonun önlendiğini tespit etmişlerdir.

Androgenesis yöntemleri türe ve çeşide göre uygulanabilirliği açısından değişiklik göstermekle birlikte, her bir yöntem kendi içerisinde avantajlar ve dezavantajlar barındırmaktadır. Örneğin anter kültürü uygulanabilirliği yönüyle pratik bir yöntem olmasına karşın sıvı kültürler (izole edilmiş mikrospor kültürü ve shed-mikrospor kültürü) ile kıyaslandığında anter başına embriyo verimi açısından düşük sonuçlar vermektedir (Forster vd 2007). Ferrie ve Caswell (2011) izole edilmiş mikrosporların kullanıldığı sıvı kültürlerin anter kültürüne göre avantajlarını şu şekilde sıralamıştır: (i) anter kültüründe anter duvarı mikrosporları olumsuz yönde etkileyebilir ya da anter duvarından somatik, diploid kallus ve embriyolar gelişebilir, (ii) Anterleri tomurcuk içerisinden çıkarmak uzun süren ve beceri isteyen bir işlemdir, (iii) İzole edilmiş mikrospor kültürlerinde, mikrosporlar besinlere daha kolay ulaşırlar ve daha iyi gelişirler, (iv) mikrospor olgunlaşması ve embriyo gelişimlerini takip etmek ve bu konular üzerinde çalışmalar yapmak için izole edilmiş mikrospor kültürleri daha başarılıdır. Buna ek olarak sıvı ortamda besin maddelerinin daha hareketli olması ve zararlı toksik maddelerin anter ya da mikrospordan daha çabuk uzaklaşabilmesi sebebiyle, buğdayda sıvı ortamlarda katı ortamlara göre daha fazla kallus gelişimi olduğu tespit edilmiştir (Zhou vd 1991).

Sıvı kültürlerin olumlu sonuçları doku kültürüyle mikroçoğaltım çalışmalarında da karşımıza çıkmaktadır. Öte yandan bu olumlu sonuçların yanında, mikrospor kültürleri iyi bir laboratuvar alt yapısı ve yatırımı isteyen, kontaminasyon riski yüksek uygulamalardır. Tam da bu noktada anter kültürü ile sıvı mikrospor kültürü arasında sayılabilecek shed-mikrospor kültüründen bahsetmek uygun olabilir. Shed-mikrospor kültürü, anter kültüründe olduğu gibi uygulama yönünden kolaydır. Ayrıca mikrosporların anterden sıvı ortama dağılırarak sıvı ortamda gelişimlerini sürdürmeleri açısından ise embriyo verimi yönüyle yüksek sonuçların alınabildiği bir androgenesis metodudur.

Mikrospor kültürü çalışmalarında hareketli sistemlerin embriyo verimine olumlu katkı sağladığını ise literatürde şimdiye kadar rastlanan tek yayın olma özelliğine sahip Yang vd (2013) tarafından *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* alt türü ile yapılan çalışmada

görmekteyiz. Söz konusu çalışmada alt türün yedi genotipinde farklı çalkalama frekanslarında (0, 40, 50, 80, 100 rpm) mikrospor kültürlerinin gösterdiği embriyo gelişim ve bitki rejenerasyon kapasiteleri ölçülmüştür. Araştırmacılar, 40-50 rpm'lik düşük frekanslarda çalkalanan kültürlerden, durağan kültürlerle kıyasla daha fazla sayıda kotiledonları uzayan embriyo oluştuğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte çalkalayıcı kullanımının embriyoların bitkiye dönüşmelerine de olumlu etki yaptığını saptamışlardır. Bu sonucun sebebini, çalkalayıcı kullanımının kültür süresini 1-4 gün arasında kısaltmasından dolayı, embriyoların daha kısa sürede rejenerasyon ortamına aktarılabilmesi olarak açıklamışlardır. Böylece elde edilen embriyolar, uzun süre sıvı ortamda kalarak yüksek nemden ötürü canlılıklarını yitirmeden rejenerasyon ortamında kalmışlardır.

Hareketli sistemlerin mikrospor kültürleri dışında diğer doku kültürü çalışmalarında da olumlu sonuçları ortaya konulmuştur. Adelberg vd (2000), *Hosta tokudama* (Newberry Gold), *Hosta x hybrid* Tratt. (Blue Cadet) adlı iki ticari çeşit üzerinde yaptıkları karşılaştırmalı mikroçoğaltım çalışmasında, agarda bulunan ve hareketli erlenler içinde sıvı ortamdaki kültürlerden, sıvı ortamda hareketli olanların, kuru madde miktarlarının agardaki kültürlerle göre daha yüksek oranlarda olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, sıvı ortamda gelişen bitkilerin, aklimatizasyona daha hızlı cevap verdikleri ve dış ortama daha kolay uyum sağladıkları ortaya konmuştur. *In vitro* gelişimde karbonhidrat birikiminin *ex vitro* gelişimde fotosentez başlangıcına kadar gerekli olduğu bilinmektedir. Bu sebeple söz konusu bu çalışmada, hareketli ortamda sıvı kültürlerde bulunan bitkilerin dış ortama daha kolay uyum sağlamalarının nedeni, sıvı ortamdan elde edilmiş bitkilerin karbonhidrat rezervlerinin daha fazla olmasıyla açıklanmaktadır (Williams 1995, Adelberg 2000). Bir başka deyişle sıvı ve hareketli kültürlerdeki eksplantlar, sıvı ortamdaki karbonhidrat kaynağı sukrozu daha iyi kullanabilmektedirler.

Sıvı ve hareketli ortamlarda kültüre alınan materyallerin ortamdaki besin kaynaklarını daha etkili kullanması, Adelberg ve Toler (2004)'in *C. esculenta* (L.) Schott Fontanesii ve *Alocasia macrorrhizos* G.Don çeşitlerinin mikroçoğaltımında sıvı ve hareketli ortamlar ile hareketsiz katı ortamları karşılaştırdığı araştırmada ortaya konmuştur. Söz konusu çalışmada araştırmacılar sıvı ortamda bulunan ve sallanan sistemler içerisindeki bitkilerin daha iyi gelişim göstererek, daha büyük yapıda olduklarını ve kuru madde miktarlarının katı ortamdaki bitkilere göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Adelberg ve Toler (2004), bu gelişimi agarlı ortama göre sıvı ve hareketli ortamda daha fazla ulaşılabilir şeker olmasıyla açıklamışlardır.

Adelberg (2005)'in, yine *Hosta*'nın Striptease, Minuteman ve Stiletto çeşitlerinde yaptığı çalışmada, bu kez ince film tabaka kültürü adı verilen kültürde, kare şeklinde kültür kavanozlarına koyulan eksplantların periyodik aralıklarla sallanan raflara yerleştirildiği patentli bir sistemin mikroçoğaltım üzerine etkisini denemiştir. Çalışmada yarı agarlı ortam ile hareketli ince film tabaka kültür sistemi karşılaştırılmış, ortamlara koyulan eksplantlardan sıvı ve hareketli ortamlarda bulunan üç *Hosta* çeşitinin de çoğalma katsayılarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Adelberg vd (2000)'nin çalışmasında olduğu gibi, bu çalışmada da sıvı ortamdaki bitkiler dış ortama daha kolay adapte olmuşlardır. Bunun sebebi yine, sıvı ve hareketli ortamdaki bitkilerin karbonhidrat

rezervlerinin daha fazla olmasıyla açıklanmaktadır. Söz konusu çalışmada, sıvı ve hareketli ortamlarda katı ortamlara göre bitkilerin gelişim sürecinde fonksiyonlarını daha iyi gösterebilmelerine imkân verildiği ve bitkilerin sıvı ve hareketli ortamlarda çevreye uyumlarının daha başarılı olduğu bildirilmiştir. Özetle, Adelberg (2005), sıvı ve hareketli kültürlerin Hosta mikroçoğaltımında ergonomik bir çözüm olduğunu ifade etmiştir.

Adelberg ve Naylor-Adelberg (2012) *Aloe vera* bitkisinin mikroçoğaltımı sırasında meta-topolin ve benzyladenin sitokinlerini kullanarak çoğalma ve köklenme etkisini araştırdıkları çalışmada, sıvı kültürlerdeki bitkilerin, agar kültürlerdeki bitkilerden daha büyük ve ağır olduklarını saptamışlardır. Çalışmaya göre katı ortamda gelişen bitkiler ortalama 1.34 g/bitki iken, sıvı ortamda gelişen bitkilerin ortalama ağırlığı 2.79 g/bitki olarak saptanmıştır. Söz konusu çalışmada sonuç olarak, *Aloe vera* bitkisinin mikroçoğaltımı için en uygun kültür koşulunun 6 µM BA içeren sıvı kültür ortamı olduğu belirtilmiştir.

Arı vd (2015), *Ophiopogon planiscapus* 'Nigrescens' (Black Mondo)'de iyi klonu seçmeye yönelik yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında sıvı kültürlerde olumlu sonuçlar ile karşılaşmışlardır. 114 Black Mondo genotipinin test edildiği çalışmada, sürgün gelişim çalışmaları sıvı ortamda, köklendirme çalışmaları ise hem sıvı hem katı ortamlar kullanılarak yürütülmüştür. Söz konusu çalışmada köklendirme açısından sıvı ortamın katı ortama göre daha başarılı olduğu ortaya konmuştur.

Özetle, androgenesis başarısını etkileyen faktörler arasında yer alan genotip, donör bitki yetiştirme koşulları, uygun mikrospor safhası, kültür koşulları ve besin ortamlarının yanında, çalkalayıcı kullanımının etkisi de başarıyı etkileyen faktörler arasına eklenebilir. Hareketli sistemlerin mikrospor kültüründe kullanımından elde edilen başarılı sonuçlarının yanı sıra, diğer doku kültürü tekniklerinde ortaya koyduğu faydalı sonuçlar da, çalkalayıcı kullanımının avantajlarını desteklemektedir.

2.4. Biber ve Süs Biberinde Yapılan Androgenesis Çalışmaları

Bu bölümde süs biberi ile ilgili literatürde yeterli sayıda kaynağa ulaşılamadığı için, öncelikle sebze biberi ile ilgili androgenesis çalışmalarından bahsedilecek olup, daha sonra literatürde süs biberi ile ilgili erişilebilen az sayıda kaynaktan bilgiler aktarılacaktır.

2.4.1. Sebze biberinde yapılan androgenesis çalışmaları

Biberde ilk haploid bitki Asya orijinli çeşitlerde anter kültürü ile elde edilmiş, ancak yapılan bu çalışmalarda haploid bitki sayısı çok düşük olmakla birlikte, bitkiler kallus safhasından rejenere olmuşlardır (George ve Narayanaswamy 1973, Kuo vd 1973, Wang vd 1973, Segui-Simarro vd 2011). Sibi vd (1979), iki aşamalı başarılı bir anter kültürü protokolü geliştirmiş ve bu protokol daha sonra Dumas de Vaultx vd (1981) tarafından daha uygun hale getirilmiştir. Bu yöntemde biber anterleri önce yüksek konsantrasyonda büyüme hormonu içeren ortamda inkübe edilip daha sonra düşük konsantrasyonlu ortamlara aktarılmışlardır. Çalışma sonucunda, iki tatlı biber çeşidinden 100 anterden ortalama 42 ve 51 haploid bitki elde edilmiştir. Bu protokol pek çok araştırmacı tarafından modifiye edilmiş, çeşitli versiyonları denenmiş ve bazılarından küçük

çaplı gelişmelere ulaşılmıştır. Dumas de Vault vd (1981) tarafından geliştirilmiş bu yöntemin besin ortamına, Vagera ve Havranek (1985) aktif karbon ekleyerek, daha verimli sonuçlara ulaşmışlardır. 1986 yılında Morrison vd ve 1997’de ise Dolcet-Sanjuan vd, dolmalık biberde denedikleri, umut verici yeni bir yöntem olan, katı ortama aktif karbon ve maltozun eklendiği çift fazlı yeni bir sistem geliştirmişlerdir. Söz konusu çalışmada 14 adet dolmalık F₁ hibrit biber çeşiti kullanılmış, 40 g/L oranında maltoz bulunan ortamdan en yüksek sayıda toplam embriyo elde edilmiştir. Bununla birlikte, embriyoların 10 g/L ve 20 g/L konsantrasyonları arasında daha iyi embriyo gelişimi gösterdikleri tespit edilmiştir. Dolcet Sanjuan vd (1997), çalışmalarında genotip etkisine bağlı olarak, 100 anter başına 3-750 arasında embriyo ve 0.25-8 arasında bitki gelişimi gözlemlemişlerdir. Kültürlerin 900 µL/L CO₂ içeren hava ile yıkanması ile de 100 anter başına ortalama 3561 embriyo ve 23 bitki sayısına ulaşılmışlardır. Mityko vd (1995), çift fazlı kültür ortamından her ay sağlıklı anterleri seçerek tekrar kültüre alma yöntemini izlerken, Dolcet-Sanjuan vd (1997) çift fazlı bu yöntemde büyüme hormonları kullanmadan aktif karbon kullanmak ve besin kaynağı olarak sukroz yerine maltoz kullanmak suretiyle, kültüre alma işlemini tek basamakta yapma yolunu izlemişlerdir. Öte yandan Regner 1994 ve 1996 yıllarında yaptığı çalışmalarda, izole edilmiş dolmalık biber mikrosporlarını doğrudan kültüre alma yoluna gitmiş, ancak başarılı bir mikrospor protokolü geliştirememiştir.

Biberle ilgili olarak denenmiş bütün bu yöntemlerde, anter başına elde edilen haploid bitki sayısı incelenecek olursa; Dumas de Vault vd (1981)’nin anterleri öncelikli olarak yüksek konsantrasyonlu büyüme düzenleyicilerle inkübe ettikleri, daha sonra da düşük konsantrasyonlu büyüme düzenleyicilerle alt kültüre aldıkları ve 35°C ön sıcaklık uygulamasına maruz bıraktıkları protokolden; iki dolmalık biber çeşitinde, 100 anter başına sırasıyla ortalama 42 ve 51 haploid bitki edildiği görülmektedir. Mityko vd (1995)’nin kullandıkları yöntemle, ‘Fehezörön’ biber çeşidinde, 100 anter başına ortalama 76 bitki elde ettikleri, Morrison ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntemle ise, ‘Emerald Giant’ biber çeşidinde 100 anter başına ortalama 40 haploid bitki elde ettikleri görülmektedir.

2000’li yıllarla birlikte biberde androgenesis çalışmaları çeşitlenerek, daha verimli sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Supena vd (2006a), 10 Endonezya tipi acı biber genotipi üzerinde yürüttükleri çalışmayla shed-mikrospor kültürü adını verdikleri başarılı bir sistem geliştirmişlerdir. Söz konusu çalışmada daha önce biber ve tütünde denenmiş dört farklı anter ve mikrospor kültürü protokolü bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmış, bu protokoller arasında özellikle Dolcet Sanjuan vd (1997) tarafından geliştirilen çift fazlı besin ortamının kullanıldığı protokol üzerinde durulmuştur. Araştırmacılar, biber tomurcuklarını 4°C ön uygulama koşullarında farklı sürelerde (0, 1, 3, 7 gün) bekletmişler, farklı inkubasyon sıcaklıklarının etkisini (4°C, 9°C, 28°C, 32°C, 35°C) test etmişler, %2 oranına kadar aktif karbonun embriyo gelişimini üzerine etkisini araştırmışlar, sıvı faza 2.5-25 µM zeatin ile 5-50 µM indole-3-asetik asit (IAA) içeren büyüme düzenleyici kombinasyonları ekleyerek, en verimli sonuçların elde edilebileceği başarılı bir protokol geliştirmeye çalışmışlardır. Söz konusu çalışmada %50 geç tek çekirdek aşamasını içeren ve bir gün süreyle 4°C’de bekletilen tomurcuklardan en başarılı embriyo gelişim sonuçları elde edilmiştir. Tomurcukların anterleri bir günlük ön soğuklatma işleminden sonra çift fazlı ortamda kültüre alınıp bir hafta 9°C ve ardından 28°C sürekli ve karanlık ortamda inkubasyon koşullarına maruz bırakılmıştır. Besin

ortamı içeriği yönünden en başarılı androgenesis performansı katı fazda Nitsch bileşenleri, %2 maltoz ve %1 aktif karbon içeren, sıvı fazda Nitsch bileşenleri ile 2.5 µM zeatin ve 5 µM IAA içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Çalışmada ‘Galaxy’ ve ‘Tombak’ adlı çeşitler en iyi bitki rejenerasyon sonucunu vererek, tomurcuk başına sırasıyla yedi ve dört adet bitki oluşturmuşlardır. Supena vd (2006a)’nin, bu çalışması Endonezya tipi acı biberlerin ıslah programlarında kullanılabilir bir başarılı bir androgenesis protokolü olarak literatürde yerini almıştır. Bununla birlikte, araştırmacılar çalışmalarında özellikle, apikal sürgün ucu gelişiminde görülen anormalliklerin altını çizerek, daha sonraki çalışmalarında embriyo kalitesini arttırmaya yönelik çalışmalar planladıklarını ifade etmişlerdir. Çift kotiledonu bulunan embriyoların sağlıklı bitkiler oluşturabilmede daha başarılı olduğunu tespit eden araştırmacılar, bundan sonraki araştırmalarını, laboratuvarında geliştirdikleri homozigot DH bitkiler kullanarak protokollerini geliştirmeyi planladıklarını bildirmişlerdir.

Kim vd (2008), *C. annuum* L. cv. ‘Milyanj-jare’ acı biber çeşitinde yürüttükleri izole edilmiş mikrospor kültürü çalışmasında başarılı embriyogenesis ve bitki rejenerasyon sonuçları elde etmişlerdir. Söz konusu çalışmada, modifiye edilmiş NLN ortamından (NLNS) dört hafta sonunda elde edilen çift kotiledonlu embriyolar, B5 katı ortamına aktarılarak bitkiye dönüşüm oranları tespit edilmiştir. Araştırmacılar çalışmada aynı zamanda farklı ön uygulamalar, farklı karbon kaynakları ve farklı mikrospor yoğunluklarının embriyo oluşumuna etkilerini de test etmişlerdir. Çalışmada 8×10^4 - 10×10^4 /ml mikrospor konsantrasyonu ile 32°C’de sukroz bulunmayan NLN ortamında açığa maruz bırakarak ön uygulama yaptıkları, daha sonra %9 sukroz içeren NLN ortamında kültüre aldıkları petriyelerde, petri başına ortalama 45.4 toplam embriyo ve petri başına ortalama 5.8 kotiledonları uzayan embriyo sayısı ile en verimli sonuçlar alınmıştır. Kim vd (2008), Supena vd (2006a)’nin çalışmasında maltoz ile elde edilen başarıyı kendi çalışmalarında gözlemleyememe sebeplerini, karbon kaynağına shed-mikrospor kültüründe başta anter içerisinde olan mikrosporların, izole edilmiş mikrosporlardan daha farklı tepki vermeleri olarak açıklamışlardır.

Lantos vd (2008) çift kotiledonlu bitki türleri arasında biber androgenesis çalışmalarında ilk defa denenen, izole edilmiş biber mikrosporu kültürlerinin indüksiyon ortamlarına buğday ve biber ovaryumları yerleştirilerek embriyo oluşumlarını arttırmak istemişlerdir. Söz konusu çalışmada, biber ovaryumları bulunmayan kültürlerde herhangi yapıda bir embriyo gelişimi gözlenmezken, biber ovaryumu olan kültürlerde proembriyo yapılarıyla karşılaşmıştır. Buğday ovaryumu yerleştirilen kültürlerden ise biber ovaryumu yerleştirilenlere göre az da olsa sağlıklı embriyolar elde edilebilmiştir. Çalışma verim yönünden düşük olsa da çift çenekli biberde hem aynı türden hem de farklı türden ovaryumların mikrosporlarla birlikte kültüre alınması yönüyle literatürde özgün bir çalışma olarak yer almıştır.

Supena ve Custers (2011), acı biber shed-mikrospor kültürlerinde normal görünümü embriyo sayısını arttırmaya yönelik yaptıkları protokol geliştirme çalışmasında normal görünümü embriyo sayısında %50 gibi yüksek bir oranda artış sağlamışlardır. Araştırmacılar bu başarılı artışı, shed-mikrospor kültürlerinin sıvı besin ortamlarına 3 hafta sonra 2.5 µM zeatin ve 5 µM IAA ekleyip, inkubasyon koşullarını 28°C’den 21°C’ye düşürdükleri kültürlerden elde etmişlerdir. Söz konusu çalışmada

materyal olarak ‘Galaxy’ DH homozigot bitkiler kullanılmış, en iyi sonuçlar tomurcuk başına 106.4 toplam embriyo ve tomurcuk başına 35.3 normal görünümlü embriyo olarak kaydedilmiştir. Söz konusu çalışmada, katı ortama eklenen %1 aktif karbonun sadece embriyo veriminde etkili olduğu, sıvı ortama eklenen çeşitli konsantrasyondaki absisik asitin ise besin ortamının ozmolalitesini etkileyerek embriyo gelişimini olumsuz yönde etkilediği elde edilen diğer bulgulardandır.

Lantos vd (2012), tatlı biber F_1 hibrit genotipleri üzerinde yaptıkları mikrospor kültürü çalışmasında her bir genotipin androgenesis indüklenme kapasiteleri, hücre bölünmeleri ve mikrospor türevli yapılarını gözlemlemişlerdir. Söz konusu çalışmada genel olarak embriyo benzeri yapılara rastlanmış, toplam 12 genotipten petri başına ortalama 48.1 embriyo benzeri yapı ve 1.5 bitki elde edilmiştir. Ancak araştırmacılar, bu olumlu sonuçların yanı sıra embriyo benzeri yapılarda anormal sürgün oluşumları izlemişlerdir. Bu anormal yapıların çalışmalarında sınırlayıcı bir faktör olduğunu belirterek, ileride yapılacak çalışmaların embriyo benzeri yapılarda kalitenin artırılmasına yönelik olması gerektiğinin altını çizmişlerdir.

Kim vd (2013), biberde yüksek kalitede embriyo ve bitki elde edebilmeyi hedefledikleri mikrospor kültürü çalışmasında, sıvı, çift fazlı ve iki basamaklı olmak üzere üç farklı kültür protokolünü test etmişlerdir. Araştırmacılar en verimli sonuçları iki basamaklı kültür uygulamasından petri başına ortalama 164.3 embriyo ve 16.3 çift kotilendonlu embriyo olarak elde etmişlerdir. Söz konusu çalışmada, ortam yenilemenin sıvı ortamın tabanında oksijensiz ve besinsiz kalan embriyoların, yeni bir ortama aktarılacak hem besin takviyesi almalarına hem de toksik bazı maddelerin ortamda etkisinin azalmasına bağlı olarak elde edildiğini belirtmişlerdir.

2.4.2. Süs biberinde yapılan androgenesis çalışmaları

Süs biberi ile ilgili ilk androgenesis çalışmasına, Barroso vd (2015)’nin, farklı süs biberi genotiplerinde tomurcuk büyüklüğü ile mikrospor gelişim safhası arasındaki ilişkiyi ve farklı dört uygulamanın kullanılan süs biberi genotiplerinde embriyo gelişimine olan etkisini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada rastlamaktayız. Söz konusu çalışmada materyal olarak UFPB 134 ve UFPB 390 kodlu ebeveyn genotipler ile bu ebeveynlerin F_1 generasyonlarının kendilenmesinden elde edilen sekiz adet F_2 kademesindeki genotipler kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle mikrospor gelişim safhası ve tomurcuk büyüklüğü arasında bir bağlantı kurabilmek için, UFPB 390 kodlu ebeveynin beş bireyinden tesadüfi olarak tomurcuklar toplanarak, petal yapraklarının sepal yapraklarından küçük, eşit ve daha büyük olduğu üç gruba ayrılmışlardır. Her bir tomurcuk içinde bulunan anter boyları da ölçüldükten sonra, mikrosporların gelişim safhalarını belirlemek üzere, asetik orsein boyama tekniği kullanılmıştır. Tomurcuklardan, ortalama 1.61 mm uzunluğunda ve 1.26 mm çapında petallerin sepallerden daha küçük olduğu birinci grup tomurcuklarda anter uzunluğu ortalama 0.48 mm olarak ölçülmüş ve bu grup tomurcuklarda iki ve üçüncü grup tomurcuklarda bulunmayan çok sayıda mikrospor ana hücrelerine rastlanmıştır. Ortalama 1.92 mm uzunluğunda ve 1.79 mm çapında bulunan sepallerin petallerle hemen hemen aynı boyutta olduğu ikinci grup tomurcuklarda ise anter uzunlukları ortalama 0.87 mm ölçülmüş ve bu grup tomurcuklarda ağırlıklı olarak tek çekirdekli mikrosporlar

gözlenmiştir. İkinci grup tomurcuklarda anter başına ortalama 2247 tane tek çekirdekli mikrospor ve az miktarda tetrat ve çift çekirdekli mikrosporlar saptanmıştır. 2.48 mm uzunluğunda ve 2.16 mm çapında petallerin sepallerden daha büyük olduğu üçüncü grup tomurcuklarda ise anterlerin yüksek sayıda (7184/anter) olgunlaşmış polen taneleri ve az miktarda tek çekirdekli mikrosporlar içerdiği belirlenmiştir. Bu durumda araştırmacılar androgenesiste kullanılmak üzere uygun tomurcuk morfolojisinin ikinci grup tomurcuklar olduğunu açıklamışlardır. Çalışmanın diğer aşaması olan anter kültürü ile haploid embriyo elde etmede ise 10 genotipin her birinden çoğu tek çekirdekli gelişim safhasına sahip mikrosporları içeren 200 anter, dört farklı uygulamada (M1, M2, M3, M4) kültüre alınmıştır. Söz konusu çalışmada, embriyoların kallustan geliştiği tespit edilmiştir. Kallustaki kırılğan, beyaz ve yarısaydam yapıdaki bölgelerin varlığı bu yapıların embriyojenik kallus olduğunu göstermiştir. Embriyojenik kallus ve embriyo oluşturmada 1, 2, 3, 4, 5 numaralı genotipler bütün uygulamalara benzer tepkiler verirken 6, 7, 8, 9, 10 numaralı genotipler uygulamalara farklı tepkiler vermişlerdir. Genel olarak M3 uygulaması dışında bütün genotipler farklı uygulamalara anlamlı tepkiler vermiştir. Embriyojenik kallus oluşturmada en başarılı sonuç 7 nolu genotipin M4 ortamında anterlerinin %36'sının embriyojenik kallusa dönüşmesiyle elde edilmiştir. Öte yandan 8 ve 10 nolu genotipler M1 ve M2 ortamlarına göre M4 ortamında düşük tepki göstermişlerdir. Bu durum M1 ve M2 ortamlarında sitokininle birlikte naftalin asetik asit (NAA) bulunmasıyla açıklanmaktadır. Sonuç olarak süs biberlerinde yapılan bu androgenesis çalışmasında kallus oluşturmada genotip etmeninin en önemli ve sınırlayıcı faktör olduğu neticesine ulaşılmıştır.

Arı vd (2016a), süs biberi ıslah programlarında kullanılmak üzere DH bitki üretimi amacıyla F₂ veya F₃ kademesinde bulunan ve bahar sezonunda yetiştirilen 48 yerel veya ticari orijinli süs biberi genotipinin androjenik performanslarını üç farklı yöntemle test etmişlerdir. Söz konusu çalışmada kullanılan genotiplerin androgenesise tepkilerinde en etkili yöntemi belirlemek amacıyla anterler MS (Murashige ve Skoog 1962) ve B5 (Gamborg vd 1968) katı ortamları ile shed-mikrospor (Supena vd 2006a, Supena ve Custers 2011) besin ortamlarında kültüre alınmış, en verimli sonuçlar shed-mikrospor kültürlerinden elde edilmiştir. Tomurcuk başına ortalama toplam embriyo oluşturma yönüyle MS, B5 ve shed-mikrospor kültürlerinden sırasıyla 0.13, 0.70 ve 6.50 toplam embriyo elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan 48 genotipten yedi genotipin MS, 13 genotipin B5 ve 46 genotipin shed-mikrospor kültür protokolüne cevap verdiği tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan yerel veya ticari kökenli genotiplerden toplam embriyo ve normal görünümlü embriyo oluşturma yönüyle en verimli sonuç 89 numaralı yerel orijinli genotipten alınmıştır. Bu genotipin shed-mikrospor kültürlerinde tomurcuk başına ortalama 102.9 toplam embriyo ve 34.11 normal görünümlü embriyo elde edilmiştir. Shed-mikrospor kültürlerinden elde edilen toplam 18578 embriyodan ortalama %39 dönüşüm oranı ile 5587 adedi normal görünümlü embriyoya dönüşmüştür. Çimlendirme ortamına aktarılan embriyolardan rejenere olan 204 *in vitro* bitkicik aklimatizasyon aşamasına ulaşmış ve bunlardan %59.8 yaşama oranıyla 122 adet bitki elde edilmiştir. Flow sitometri analizleri sonucu spontan katlanma oranı %51.6 olarak belirlenmiştir. Böylece bu çalışma sayesinde ilk kez süs bitkisi değeri taşıyan 122 adet DH süs biberi hattı elde edilmiştir. Sonuç olarak Arı vd (2016a), shed-mikrospor kültürünün süs biberindeki ıslah programlarında kullanılabilecek başarılı bir androgenesis yöntemi olduğunu belirtmişlerdir.

Arı vd (2016b), sonbahar-kış sezonunda yetiştirilen F₃ veya F₄ kademesindeki 64 süs biberi genotipinin shed-mikrospor kültürüne verdiği androgenesis tepkilerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, 48 genotipin çeşitli oranlarda embriyo oluşumu gösterdiğini saptamışlardır. Söz konusu çalışmada en iyi sonuçlar tomurcuk başına 12.7 toplam embriyo ve 1.48 normal görünümlü sağlıklı embriyo ile alınmıştır. Çalışmadan elde edilen 2406 toplam embriyodan 297 tanesi normal görünümlü embriyo olma yolunda ilerlemiş, bu embriyolardan 263 tanesi çimlenme ortamlarına alınmış ve bunlardan 132 tanesi yaprak oluşumu ve kök gelişimi göstermiştir. Ancak bu aşamadan sonra çoğunlukla bitki gelişimleri durmuş ve kahverengileşerek canlılıklarını yitirmişler, bunlardan çok az sayıda bitkicik aklimatizasyon aşamasına ulaşabilmiştir. Çalışmada aynı zamanda uygun mikrospor safhasına sahip olan tomurcuk morfolojileri DAPI destekli sitolojik çalışmalarla belirlenmiştir. Araştırmacılar, tomurcuk morfolojisi belirlemede antosiyoninli ve tamamen yeşil görünümlü iki genotipin tomurcuklarını kullanmışlar, sepal/tomurcuk boyu oranının uygun tomurcukların seçilmesinde etkili bir markör olarak kullanılabileceğini tespit etmişlerdir. Bu oran antosiyoninli genotip tomurcuklarında %70-80 ve yeşil görünümlü genotip tomurcuklarında %70-85 olarak kaydedilmiştir. Çalışmada DAPI destekli bulgularla birlikte anter ucundaki antosiyoninleşme oranı yeşil genotipin tomurcuklarında %10-40 olarak tespit edilirken, antosiyoninli genotipin tomurcuklarda bu oran %70-90 olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, biber androgenesis çalışmalarında sıklıkla kullanılan anter ucundaki antosiyoninleşmenin, dış görünüşü antosiyoninli genotipler için uygun bir markör olarak kullanılamayacağını ifade etmişlerdir.

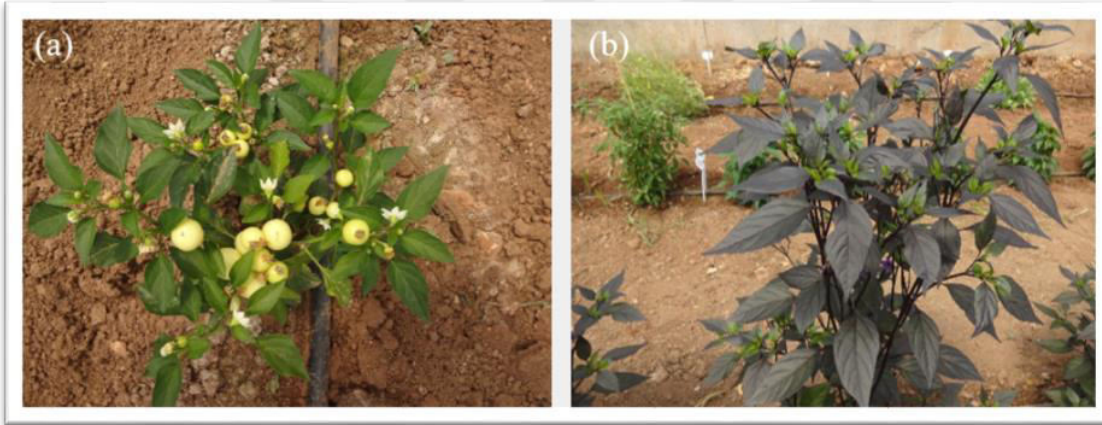
3. MATERYAL VE METOT

Bu araştırma 2014 yılı İlkbahar-Yaz döneminde Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümüne ait plastik sera ve doku kültürü laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bitki materyali

Çalışmada bitkisel materyal olarak, ticari veya yerel orijinli 29 süs biberi genotipine ait anterler kullanılmıştır. Bu genotiplerin orijinleri ticari kökenli olanlar için T, yerel orijinli olanlar için ise Y harfi ile kodlandırılmıştır. Kullanılan süs biberi genotipleri farklı kademedeki ıslah hatları olup, bu hatlardan ticari kökenli olanlar F₄, yerel orijinli hatlar ise F₅ kademesinde kültüre alınmıştır. Bu hatlara ait tohumlar Antalya'da faaliyet gösteren, Pey-Art Peyzaj İnşaat Mimarlık Tic. Ltd. Şti.'den temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan 96 ve 174 numaralı genotiplerin sera koşullarındaki görüntüleri Şekil 3.1'de sunulmuştur.



Şekil 3.1. (a) 96 nolu genotipe ait seradan bir görüntü, (b) 174 nolu genotipe ait seradan bir görüntü

Çalışmada kullanılan 29 süs biberi genotipinin yaprakta, gövde sapında ve çiçeğindeki antosiyanin durumu, meyve şekilleri, meyve oluşum yönleri, meyve dönüşüm renkleri ve potansiyel kullanım alanları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan 29 süs biberi genotipinin morfolojik özellikleri ve potansiyel kullanım alanları

Orijin	Genotip	Bitkisel Özellikler						Meyve Renk Değişimi	Potansiyel Kullanım Alanı
		Antasiyonin Durumu			Meyve Şekli ve Meyve Büyüklüğü	Meyve Yönü			
		Yaprakta	Gövde Sapında	Çiçekte		Aşağı	Yukarı		
T1	3	+	+	+	Yuvarlak, küçük		+	Siyah > Kırmızı	Çalı ve aranjman bitkisi
	17	-	+	+	Yuvarlak, küçük		+	Yeşil > Mor	Çalı ve aranjman bitkisi
T2	34	+	+	+	Yuvarlak, küçük		+	Açık mor > Koyu mor > Turuncu	Yer örtücü bitki
T3	47	-	-	-	Sivri, orta		+	Açık sarı > Koyu sarı	Saksı bitkisi ve mevsimlik bitki
T4	54	-	-	-	Yuvarlak, küçük		+	Açık sarı > Sarı > Turuncu > Kırmızı	Saksı bitkisi ve mevsimlik bitki
	96	-	-	-	Yuvarlak, küçük		+	Açık sarı > Sarı > Turuncu > Kırmızı	Saksı bitkisi ve mevsimlik bitki
T5	107	-	-	-	Sivri, küçük		+	Açık yeşil > Yeşil > Sarı > Turuncu > Kırmızı	Saksı bitkisi ve mevsimlik bitki
T6	108	+	+	+	Sivri, orta		+	Yeşil > Kırmızı	Turşuluk ve çalı bitkisi
T8	127	+	+		Küt uçlu, küçük		+	Mor > Kırmızı	Kesme çiçek ve aranjman bitkisi
	132	+	+	+	Yuvarlak, küçük		+	Mor > Kırmızı	Çalı ve aranjman bitkisi
	419	+	+	+	Yuvarlak, küçük		+	Mor > Kırmızı	Saksı bitkisi ve mevsimlik bitki
T9	143	+	+	+	Yuvarlak küçük		+	Mor > Kırmızı	Saksı bitkisi ve mevsimlik bitki
	146	-	-	+	Yuvarlak, küçük		+	Mor > Turuncu > Kırmızı	Saksı bitkisi ve mevsimlik bitki
	155	+	+	+	İnce-uzun, küçük		+	Yeşil > Mor > Kırmızı	Aranjman bitkisi
	166	+	+	+	Yuvarlak küçük		+	Yeşil > Mor > Kırmızı	Aranjman bitkisi
	174	+	+	+	Konik, küçük		+	Yeşil > Kahverengi > Turuncu > Kırmızı	Aranjman bitkisi
T10	230	+	+	+	Küt uçlu, küçük		+	Koyu mor > Kırmızı	Çalı bitkisi
T11	283	-	-	-	Sivri, orta		+	Yeşil > Sarı	Saksı bitkisi, mevsimlik bitki
	292	-	-	-	Sivri, küçük		+	Yeşil > Sarı	Saksı bitkisi, mevsimlik bitki
T12	313	-	-	-	Sivri, orta		+	Yeşil > Sarı	Turşuluk, çalı bitkisi
T13	324	-	+	+	Yuvarlak küçük		+	Mor > Turuncu > Kırmızı	Aranjman bitkisi
	330	-	-	+	Yuvarlak küçük		+	Mor > Turuncu > Kırmızı	Çalı bitkisi
T14	337	+	+	+	Küt uçlu, küçük		+	Koyu mor > Turuncu > Kırmızı	Çalı ve aranjman bitkisi
T18	383	-	-	+	Sivri, orta		+	Koyu mor > Turuncu > Kırmızı	Çalı bitkisi
T20	754	-	-	-	Sivri, uzun		+	Yeşil > Sarı	Turşuluk, mevsimlik

Çizelge 3.1'in devamı

Orijin	Genotip	Bitkisel Özellikler					Meyve Renk Değişimi	Potansiyel Kullanım Alanı	
		Antasiyonin Durumu			Meyve Şekli ve Meyve Büyüklüğü	Meyve Yünü			
		Yaprakta	Gövde Sapında	Çiçekte		Aşağı			Yukarı
Y1	441	-	-	-	Sivri, küçük		+	Yeşil > Açık mor > Turuncu > Kırmızı	Saksı bitkisi, mevsimlik bitki
Y5	564	-	-	-	Çan, dilimli, büyük	+		Yeşil > Sarı > Turuncu > Kırmızı	Çalı bitkisi
Y12	707	-	-	-	Damla-konik, orta		+	Sarı > Turuncu > Kırmızı	Turşuluk ve saksı bitkisi
Y16	735	-	-	-	Yuvarlak, büyük		+	Açık sarı > Turuncu > Kırmızı	Turşuluk ve çalı bitkisi

3.1.2. Bitki yetiştiriciliği

29 süs biberi genotipine ait tohumlar, 17-18 Ocak 2014 tarihinde %10 vermikulit, %25 perlit ve %65 torf karışımı içeren viyollere ekilmiştir. Gelişen fideler, Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'ne ait yüksek plastik seraya 30x80 cm sıra üzeri x sıra arası mesafeyle 6 Nisan 2014 tarihinde dikilmiştir. İleriki dönemlerde gösterecekleri büyüme ve gelişme oranları da dikkate alınarak fideler arasında 30 cm aralık bırakılmıştır. Bitki başına 0.50 gl⁻¹ 15-15-18 (%15 azot - %15 fosfor - %18 potasyum) dozajında, iki haftada bir, damlama sulama ile gübre verilmiştir. Bitkilerden verimli materyaller alabilmek için, bitki gelişimleri boyunca budama, tomurcuk ve meyve temizliği yapılmıştır. Haploidi çalışmaları için tavsiye edilmemesine karşın, serada yoğun olarak görülen ve bitki kalitesini olumsuz yönde etkileyen kırmızı örümcek ve afid zararlılarına karşı, zorunluluk nedeniyle bir kez insektisit uygulaması yapılmıştır.

Mayıs 2014 - Temmuz 2014 tarihleri arasında, anterler üzerinde yapılan sitolojik çalışmalar da dâhil, uygun mikrospor safhasını içerdiği düşünülen süs biberi tomurcukları, bitkilerin yetiştirildiği seradan, sabah saat 8-9 arasında toplanmıştır. Tomurcuk toplama zamanı, 21.05.14 ve 01.07.14 tarihleri arasında olmak üzere ilkbahar-yaz dönemlerini kapsamaktadır. Bu tarihler arasında, uygun mikrosporları içeren çiçek tomurcukları falkon tüplerde biriktirilerek, buz kutusu içerisinde ve hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Morfolojik ve sitolojik çalışmalar

3.2.1.1. Uygun tomurcuk büyüklüğünün tespit edilmesi

Çalışmada kullanılan süs biberi genotipleri için, doğru aşamadaki mikrosporları içeren tomurcuk büyüklüklerini tanımlayabilmek amacıyla, morfolojik ve sitolojik çalışmalar yürütülmüştür. Androgenesis çalışmalarında kültüre alınacak uygun

mikrospor safhası ile tomurcuk şekli ve büyüklüğü arasında bir ilişki kurulmaktadır. Literatürde, süs biberi ile ilgili yayınlanmış herhangi bir haploidi çalışmasına rastlanmadığı için, uygun tomurcuk ve mikrospor safhasının ne olduğu bilgisine de ulaşılamamıştır. Genel olarak biber androgenesis çalışmalarında geç tek çekirdekli ya da erken çift çekirdekli aşamalarda mikrosporlar kullanılmaktadır. Supena ve Custers (2011) sebze biberinde yaptıkları, yüksek androgenesis başarısının elde edildiği çalışmada, petal yaprakların sepal yapraklardan çok az daha uzun ya da eşit olduğu tomurcukları kullanmışlardır. Bu tomurcukların içerisindeki anterlerde bulunması gereken bir diğer özellik, uçlarının %10-25 oranında mor renk oluşumu (antosiyanınleşme) göstermesidir. Çalışmada Supena ve Custers'ın (2011) materyal seçimi dikkate alınmış ve uygun tomurcuk morfolojisinin tespiti bu şekilde yapılmıştır. 29 süs biberi genotipinden bir kısmının, genç tomurcukları dahil yaprak ve gövde sapında antosiyanınleşme mevcut iken bir kısmının tomurcuklarının tamamen yeşil renktedir. Yapılan gözlemlerde, tamamen antosiyanınli genotiplerin, anter ucunda hafif antosiyonin başlama büyüklüğünün, yeşil tomurcuklara sahip genotiplere oranla daha küçük olduğu görülmüştür. Bu sebeple, uygun tomurcuk morfolojisinin tespitinde antosiyanınli (174. genotip) ve antosiyansız (96. genotip) kullanılmıştır. Tomurcuk büyüklüğüne göre, iki genotip de 6 gruba ayrılmıştır. Uygun tomurcuk tanımlaması yapabilmek amacıyla, 6 gruba ayrılmış tomurcukların boyu, petal görünüm durumları ve anterlerindeki antosiyanın yüzdeleri ölçülmüştür.

3.2.1.2. Uygun mikrospor safhasının tespit edilmesi

Tomurcuklarda yapılan morfolojik gözlemlerin yanı sıra çalışmada, doğru aşamadaki mikrosporların hangi tomurcuk boyunda bulunduğunu tespit etmek amacıyla, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) adlı DNA-spesifik florokrom ile boyama tekniği kullanılmıştır. Farklı büyüklükteki her bir tomurcuktan izole edilen birer anter, bir lam üzerine yerleştirilmiş, Coleman ve Goff (1985) ile Kim ve Jang (2000)'a göre üzerine 1-2 damla 1µl stok DAPI + 1ml Tampon (Tampon + Triton) karışımından oluşan solüsyon damlatılmıştır. Bisturi ucuyla anterler hafifçe ezilerek, içerilerindeki mikrosporların serbest hale gelmesi sağlanmıştır. Üzerleri lamel ile kapatılan preparatlar, 10-15 dk karanlıkta bekletildikten sonra, florasana ışık mikroskobunda 365 nm dalga boyunda görüntü veren DAPI filtresi ile gözlemlenmiştir. Sitolojik gözlem olarak tomurcuklardaki uygun mikrospor safhasının varlığı araştırılmıştır.

DAPI stok hazırlanışı: 1 mg DAPI 1ml saf su içerisinde çözülerek stok hazırlanmıştır. Hazırlanan stok, ışık görerek bozulmaması için, koyu renkli bir şişede +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Tampon hazırlanışı: 0.1 M Citric acid solüsyonundan 61.5 ml, 0.2 M Disodium Hydrogen OrthoPhosphate (Na_2HPO_4) solüsyonundan 38.5 ml karıştırılıp pH'sı 4'e ayarlanan karışımın üzerine %1 oranında Triton 100 ilave edilmiştir. Karışım 1 ml hacimler halinde eppendorf tüplerde -20°C de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Anterlerin kültüre alınması

Kültüre almak için uygun safhada olduğu düşünülen, geç tek çekirdek ve erken çift çekirdek aşamasındaki mikrosporları içeren anterlere sahip tomurcuklar, %15 sodyum hipoklorit ve 1-2 damla Tween 20 içeren çözeltide 10 dakika bekletilmiş ve ardından tomurcuklar 3 defa steril suda durulanmıştır. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tomurcukların anterleri, steril kabin içerisinde bisturi ve pens yardımıyla çıkarılarak, çift fazlı shed mikrospor besin ortamına aktarılmışlar.

3.2.2.1. Ön uygulamalar ve kültür koşulları

Anterleri kültüre alma işleminden bir gün önce sabah saatlerinde seradan toplanmış tomurcuklara, karanlık ortamda 24 saat süreyle +4°C soğuk uygulaması yapılmıştır. Kültüre alma işleminden sonra ise petriyer kabin içerisinde parafilm ile kaplandıktan sonra, bir hafta süreyle +9°C'de karanlık koşullarda inkübe edilmişlerdir. Bu işlem Memmert IPP 55 (Almanya) marka, soğutmalı bir inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra tezin esas amacını oluşturan, embriyo oluşum ve gelişiminde çalkalayıcı etkisini görebilmek amacıyla, her bir genotip için hazırlanan 10 petriden 5 adedi kontrol için hareketsiz ortamda bırakılmış, 5 adedi ise 50 rpm/dk hızındaki orbital sallanan çalkalayıcı (GFL-3011, Almanya) üzerinde 3 hafta süreyle 28°C'de karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Durağan kültürler Dev-Pet esde (Türkiye) marka iklim dolabında, çalkalayıcı üzerindeki kültürler ise aynı sıcaklık koşullarının klima ile sağlandığı bir odada bekletilmişlerdir. 3 hafta sonunda kültürler 3-5 hafta süreyle 21°C'de, karanlık ortam koşullarında inkübe edilmişlerdir. Durağan olan kültürlerde bu ortam iklim dolabında, çalkalayıcı üzerindeki hareketli kültürlerde ise bu ortam koşulları yine klima ile sıcaklık ayarlamasının yapıldığı bir odada sağlanmıştır. Bu süre sonrasında petriyerdeki embriyoların gelişimleri değerlendirilmek üzere gözlemler yapılmıştır.

3.2.2.2. Kullanılan besin ortamları ve kurulan denemeler

Bu tez çalışmasında metod olarak Supena vd (2006a) ile Supena ve Custers (2011)'in çalışmalarında kullandığı protokollerin birleştirilerek, üzerinde bazı değişikliklerin yapıldığı bir metod takip edilmiştir.

Embriyo oluşturma ve geliştirme ortamı olarak, Dolcet-Sanjuan vd (1997) tarafından ilk defa kullanılan, daha sonra Supena vd (2006a, 2006b)'nin Endonezya tipi acı biberler için geliştirdiği ve Supena ve Custers (2011)'in normal görünümlü embriyo sayısını arttırmak için bazı modifikasyonlar yaptığı, çift fazlı, shed-mikrospor kültür ortamı adı verilen ortam kullanılmıştır. Katı ve sıvı fazın bir arada bulunduğu bu kültür ortamının hem alt tabakasını oluşturan katı besiyeri, hem de üst fazını oluşturan sıvı besin ortamı Nitsch ve Nitsch (NN) (1969) bileşenleri içermektedir. Katı besin ortamı 2.18 g/L hazır NN ortamı, %2 oranında maltoz, %1 oranında aktif karbon ve %0.6 agar eklenerek hazırlanmıştır. Sıvı besin ortamı ise yine 2.18 g/L hazır NN ortamı ve %2 oranında maltozdan oluşturulmuştur. Her iki besin ortamının pH değerleri 1 N KOH ve 0,1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır. Katı besin ortamındaki agar, pH ölçümü yapıldıktan sonra besin ortamına eklenmiştir. Her iki fazdaki ortam da 121°C'de 20 dk otoklavlanarak

steril hale getirilmiştir. Katı besin ortamı steril kabinde 6 cm çaplı Isolab marka petrilere, 6 ml hacminde dökülmüş ve kültür yapılıncaya kadar karanlık ve oda sıcaklığı koşullarında muhafaza edilmiştir. Kültür yapılacağına ise anterler katı ortam üzerine ekildikten sonra, petrinin kenarından 5-6 ml sıvı ortam eklenmiş ve petri kapakları uygun şekilde kapatılarak inkübe edilmiştir. Shed-mikrospor kültürünün sıvı ortamı hazırlanırken, Supena ve Custers (2011)'in normal embriyo gelişimini arttırmak amacıyla Endonezya tipi acı biberler üzerinde yaptıkları çalışma göz önünde bulundurulmuştur. Supena ve Custer (2011), acı biber genotiplerinde normal embriyo geliştirmeye yönelik çalışmada, 3 haftalık 28°C'deki inkübasyon aşamasından sonra sıvı ortama eklenen 2.5 µM zeatin ve 5 µM IAA uygulamasının normal embriyo oluşumu üzerine olumlu etki yaptığını gözlemlemişlerdir. Supena ve Custers (2011)'in çalışmasından farklı olarak, bu tez çalışmasında, zeatin ve IAA, anterler kültüre ilk alındığında sıvı ortama ilave edilmiştir. Böylece zeatin ve IAA eklemek amacıyla petrilere tekrar açılmak durumunda kalınmamış ve bu şekilde bir uygulama ile kontaminasyon riskinin aza indirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla yeni kültüre alınmış anterlerin üzerine 2.5 µM zeatin ve 5 µM IAA içeren sıvı ortam inkübasyon işleminden önce eklenmiştir. Bu çalışmada besin ortamları, bidestile saf su ve Duchefa (Netherland) marka kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.2.3. Embriyo rejenerasyonu

Çalışma süresince, özellikle de petrilere 21°C karanlık ortamda inkübasyonlarını tamamlamalarının ardından, embriyo oluşum ve gelişimleri stereo mikroskop altında incelenmiştir. Çift kotiledon yapısına sahip, normal görünümlü embriyolar, rejenerasyonlarının sağlanması amacıyla, içerisinde %2 sukroz, 0.1 µM benzyladenine (BA), tuzları ½ oranında azaltılmış hazır Murashige ve Skoog (MS) (1962) ve %0.6 agar bulunan cam kavanozlara aktarılmışlardır. Katı embriyo çimlendirme ortamı hazırlanırken, pH 5.8'e ayarlandıktan sonra agar eklenmiş ve ortam 121°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Katı ½ MS çimlendirme ortamları, steril kabin içerisinde, kavanozlara 40 ml hacminde dökülmüştür. Çimlenme ortamına aktarılmak için uygun yapıda olduğu gözlemlenen ve kavanozlarda kültüre alınan sağlıklı embriyolar, 25°C sıcaklık ve 16 saat ışık (50 µmol/m².s), 8 saat karanlık koşullara 4-5 hafta maruz bırakıldıktan sonra, aklimatizasyon işlemine uygun hale gelip gelmediği gözlemlenmiştir. Bu gözlemler bitkinin 3-4 sayıda gerçek yaprak oluşmasına ve kök gelişimine bakılmak suretiyle yapılmıştır.

3.2.2.4. İncelenen özellikler

Çalışmada gözlem olarak; petrideki (tomurcuktaki) anter sayısı, petrideki globular embriyo sayısı, petrideki kotiledonları uzayan embriyo sayısı, petrideki çift kotiledonlu normal embriyo sayısı, petriden aktarılan embriyo sayısı ve çimlenen embriyo sayıları kaydedilmiştir. Çalışma sonunda bu verilere uygulanan istatistik analiz ile genotiplerin uygulamalara verdikleri tepkiler ortaya konulmuştur.

Shed-mikrospor yöntemi, androgenesis teknikleri içerisinde sıklıkla kullanılan bir yöntem değildir. Bu yöntemi modifiye eden Supena vd (2006a, 2006b) diğer çalışmalardan farklı bir embriyo verim değerlendirme kriteri kullanmışlardır. Diğer

çalışmalarda olduğu gibi 100 anter başına değil, bir tomurcuk başına bir diğer deyişle petri başına elde edilen embriyo sayılarını esas almışlardır. Supena vd (2006a) ile Supena ve Custers (2011)'in shed-mikrospor protokollerinin takip edildiği bu çalışmada, sağlıklı kıyaslamalar yapabilmek için, embriyo verim değerleri söz konusu çalışmalarda olduğu gibi hesaplanmıştır.

3.2.2.5. Deneme deseni

Tomurcuk toplama aşamasında, her bitkiden eşit sayıda tomurcuk toplanmıştır. Anterlerin kültüre alınması aşamasında ise, bir tomurcuk içerisinden çıkan bütün anterler, aralarında seçim yapılmaksızın bir petride kültüre alınmışlardır.

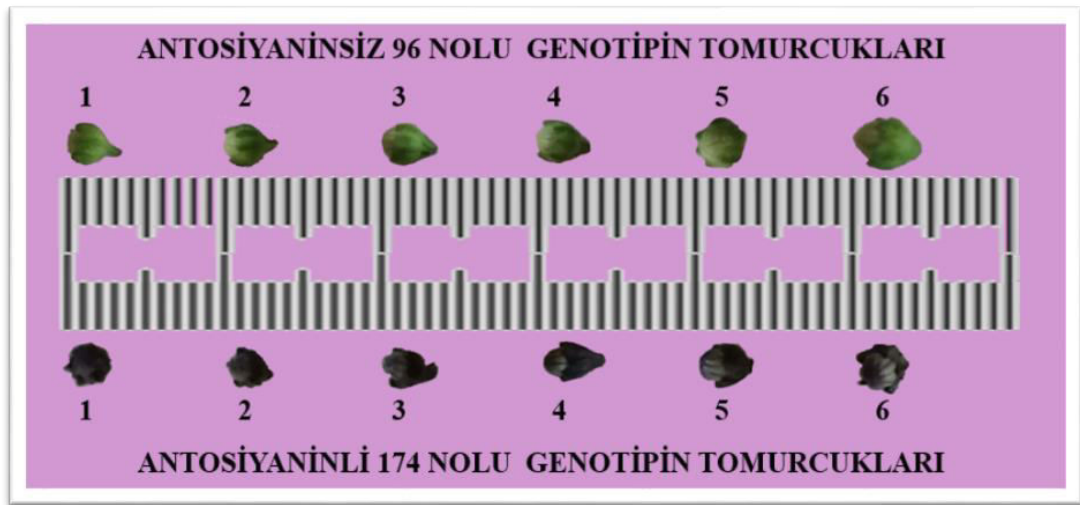
Çalışmada toplam 29 süs biberi genotipi kullanılmıştır. Her bir genotip için 2 uygulama gerçekleştirilmiştir. Bunlardan birincisi kontrol grubunu (durağan kültürleri), diğeri ise çalkalayıcı üzerinde kültüre alınan ikinci grubu (hareketli kültürleri) oluşturmuştur. Çalışmadaki iki uygulamanın her biri, 29 genotipin kullanıldığı her bir genotip için tesadüf parselleri deneme deseninde üç tekerrürlü olarak dizayn edilmiştir. Her tekekkürde 5 petri kullanılmış ve her petride, bir tomurcuğa ait, içerisinde sayısı 5-7 arasında değişiklik gösterebilen tüm anterler kültüre alınmıştır. Böylece toplam 870 petride, 870 adet tomurcuğun anterleri kültüre alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Morfolojik ve Sitolojik Çalışma Bulguları

4.1.1. Uygun tomurcuk büyüklüğünün tespit edilmesi

Geç tek çekirdekli ya da erken çift çekirdekli mikrospor safhasını içeren uygun tomurcuk büyüklüklerini seçebilmek amacıyla, 96 ve 174 numaralı iki genotipten farklı büyüklükteki tomurcuk örnekleri alınmıştır. Supena ve Custer'ın (2011) sebze biberi çalışmasında, materyal seçiminde işaret ettiği, anter ucundaki %10-25 oranında antosiyaninleşme kriteri de dikkate alındığında, anter ucundaki antosiyaninleşme derecesinin, bu çalışmadaki bütün aksamaları antosiyaninli olan genotiplerde daha küçük tomurcuk büyüklüklerinde olduğu saptanmıştır. Antosiyaninsiz 96 nolu genotipin ve antosiyaninli 174 nolu genotipin morfolojik ve sitolojik çalışmalarda kullanılmasının temel nedeni bu farklılığı doğrulamak ve çalışmada hem antosiyaninli hem de antosiyaninsiz genotipler için doğru tomurcukları tercih edebilmektir. Büyüklüklerine göre gruplandırılan 96. ve 174. genotiplere ait tomurcuklar Şekil 4.1'de sunulmuştur. Büyüklüklerine göre her biri altı gruba ayrılan genotipler, tomurcuk boyu, sepal yaprakların tomurcuk boyuna oranı, anterlerindeki antosiyaninleşme yüzdeleri ve uygun mikrospor safhasına sahip olup olmadıklarına göre sınıflandırılmış, saptanan değerler yeşil görünümü 96 nolu genotip için Çizelge 4.1'de ve antosiyaninli 174 nolu genotip için Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Yapılan DAPI destekli sitolojik çalışmalar ile her iki genotip için uygun mikrospor safhasını içeren anterlerin bulunduğu tomurcuk morfolojileri belirlenmiştir. Buna göre antosiyaninsiz 96 nolu genotipte anter ucunda %10 ile %40 oranları arasında antosiyaninleşme gösteren, tomurcuk boyu 3.5 mm ile 3.75 mm arasında olan ve anter içerisinde uygun mikrospor safhasına sahip 3 ve 4 nolu tomurcuk grubu uygun tomurcuklar olarak tespit edilmiştir. Antosiyaninli 174 nolu genotipte ise anter ucunda %70 ile %90 oranları arasında antosiyaninleşme gösteren, tomurcuk boyu 2.95 mm ve 3.30 mm arasında olan ve anter içerisinde uygun mikrospor safhasına sahip 2 ve 3 nolu tomurcuk grubu, yapılacak shed-mikrospor kültüründe kullanılabilir en uygun tomurcuklar olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Antosiyaninsiz 96 nolu ve antosiyaninli 174 nolu genotipin büyüklüklerine göre altı gruba ayrılmış tomurcuklarının görüntüsü

Çizelge 4.1. Antosiyaninsiz 96 nolu genotipin farklı tomurcuk boyutlarındaki morfolojik ve sitolojik bulgular

Tomurcuk Grup No	Tomurcuk Boyu (mm)	Sepal Yaprakların Tomurcuk Boyuna Oranı (%)	Anterdeki Antosiyaninleşme (%)*	Uygun Mikrospor Safhası **
1	2.90	90-95	0	-
2	3.00	80-90	0-10	-
3	3.50	75-80	10-20	+
4	3.75	70-75	20-40	+
5	3.95	60-70	40-70	-
6	4.43	50-60	70-100	-

*Oranlar görsel olarak tahmin edilmiştir.

**Geç tek çekirdekli ve erken aşamadaki çift çekirdekli mikrospor safhalarının tespiti DAPI boyama tekniği ile belirlenmiştir (+ : Uygun mikrospor safhası var; - : uygun mikrospor safhası yok).

Çizelge 4.2. Antosiyaninli 174 nolu genotipin farklı tomurcuk boyutlarındaki morfolojik ve sitolojik bulgular

Tomurcuk Grup No	Tomurcuk Boyu (mm)	Sepal Yaprakların Tomurcuk Boyuna Oranı (%)	Anterdeki Antosiyaninleşme (%)*	Uygun Mikrospor Safhası**
1	2.70	80-90	60-70	-
2	2.95	75-80	70-80	+
3	3.30	70-75	80-90	+
4	3.50	60-70	100	-
5	3.75	40-50	100	-
6	4.30	30-40	100	-

*Oranlar görsel olarak tahmin edilmiştir.

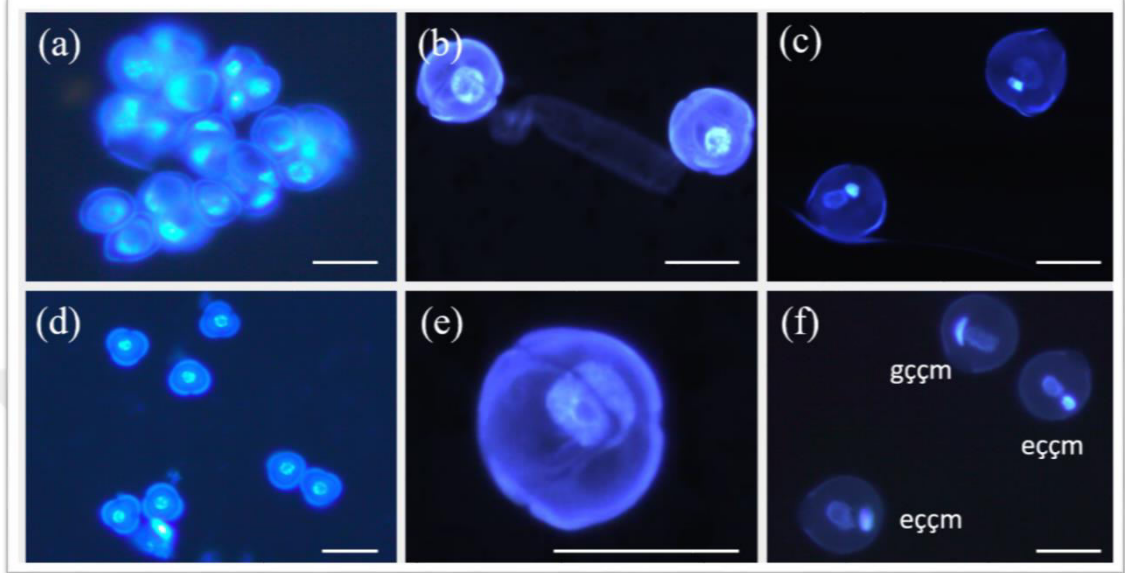
**Geç tek çekirdekli ve erken aşamadaki çift çekirdekli mikrospor safhalarının tespiti DAPI boyama tekniği ile belirlenmiştir (+ : Uygun mikrospor safhası var; - : uygun mikrospor safhası yok).

4.1.2. Uygun mikrospor safhasının tespit edilmesi

Androgenesis çalışmalarında, doğru aşamadaki mikrospor safhasına sahip tomurcukların tespit edilmesi, belli ölçü ve işaret kriterlerinin kullanımı ile mümkündür. Morfolojik olan bu kriterlerin yanı sıra, doğru mikrospor safhasındaki tomurcukların tespit edilmesinde yapılacak olan sitolojik çalışmalar araştırmaların güvenilirliğini arttırmaktadır. Bu çalışmada sitolojik yöntem olarak DAPI boyama tekniği kullanılmış, DAPI ile hazırlanmış preparatlardaki mikrospor aşamaları floresan mikroskopunda gözlemlenmiştir. Yapılan gözlemler sonucu tespit edilen 96 ve 174 nolu genotiplere ait bazı mikrospor gelişimleri Şekil 4.2’de sunulmuştur.

Şekil 4.2’ye göre 96. genotipin 1 nolu tomurcuk grubunda tetrad aşamasında, 3 nolu tomurcuk grubunda geç tek çekirdek aşamasında, 5 nolu tomurcuk grubunda erken çift çekirdek aşamasında mikrosporlar tespit edilmiştir. 174 nolu genotipte ise 1 nolu tomurcuk grubunda tetrattan yeni dağılmış erken tek çekirdekli, 2 nolu tomurcuk grubunda geç tek çekirdekli ve 4 nolu tomurcuk grubunda geç tek çekirdek ve erken çift

çekirdek aşamasında mikrosporların varlığı gözlemlenmiştir. Bu gözlemlere göre 96. genotipte 3-4, 174 nolu genotipte ise 2-3 nolu tomurcuk gruplarının geç tek çekirdek ve erken çift çekirdek safhasındaki mikrosporları içeren en uygun tomurcuklar olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Antosiyansiz 96 ve antosiyanlı 174 nolu genotiplerin farklı tomurcuk boylarında tespit edilen mikrospor safhaları (a-f arası barlar: 40µm): (a) 96 nolu genotipin 1. grup tomurcuklarında tetrad aşamasındaki mikrosporların görüntüsü; (b) 96 nolu genotipin 3. grup tomurcuklarında geç tek çekirdek aşamasındaki mikrosporların görüntüsü; (c) 96 nolu genotipin 5. grup tomurcuklarında erken çift çekirdek aşamasında mikrosporların görüntüsü; (d) 174 nolu genotipin 1. grup tomurcuklarından tetrattan yeni dağılmış erken tek çekirdek aşamasındaki mikrosporların görüntüsü; (e) 174 nolu genotipin 2. grup tomurcuklarında geç tek çekirdek aşamasındaki mikrospor görüntüsü; (f) 174 nolu genotipin 4. grup tomurcuklarında eççm (erken çift çekirdekli mikrospor) ve gççm (geç çift çekirdekli mikrospor) görüntüleri

4.2. Embriyo Verim Bulguları

Durağan ve çalkalayıcı üzerindeki 29 genotipin kültür sürelerinin sonunda yapılan gözlemler sonucu toplanan veriler istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Bu çalışmalarda genotiplerden elde edilen, petride oluşan toplam embriyo sayılarının varyans analiz sonuçları Çizelge 4.3'te ve petride oluşan normal embriyo sayılarının varyans analiz sonuçları ise Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Genotiplerden elde edilen petride oluşan toplam embriyo sayılarının varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Sd	Kareler ortalaması	F Değeri	
Genotip	28	3.45	9.21	***
Uygulama	1	0.06	0.17	NS
Hata	780	0.37		
sd: Serbestlik Derecesi, *** $p < 0.001$, NS: önemli değil				

Çizelge 4.4. Genotiplerden elde edilen petride oluşan normal embriyo sayılarının varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Sd	Kareler ortalaması	F Değeri	
Genotip	28	0.14	7.36	***
Uygulama	1	0.01	0.48	NS
Hata	780	0.02		
sd: Serbestlik Derecesi, *** $p < 0.001$, NS: önemli değil				

Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'teki varyans analizi sonuçlarına göre genotiplerin istatistiksel düzeyde ($p < 0.001$) birbirinden farklı olduğu, ancak uygulamalar arasında fark bulunmadığı tespit edilmiştir.

4.2.1. Durağan ortamdaki shed-mikrospor kültür sonuçları

Çalkalayıcının kullanılmadığı durağan ortamda kültüre alınan genotipler Tukey's ikili karşılaştırma yöntemi kullanılarak karşılaştırılmış ve bunlara ait sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5'te verilen istatistik analiz sonuçlarına göre, durağan ortamda kültüre alınan 29 genotipten 13 adedi buldukları ortama tepki göstermişlerdir. Bu genotiplerden tomurcuk başına 0.14 ile 4.69 arasında embriyo elde edilmiştir. Performansı en yüksek genotipin 754 nolu ticari kökenli bir genotip olduğu belirlenmiş ve bu genotipin istatistiksel olarak diğer genotiplerden farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu genotipi 2.17 ve 2.00 embriyo ortalama ile sırasıyla yerel kökenli 735. ve ticari kökenli 283. genotipler takip etmiştir. Genotipler tomurcuk başına oluşan normal embriyo ortalamaları açısından değerlendirildiğinde ise 0.67 ile en yüksek normal embriyo sayısı 735. genotipten elde edilmiştir.

Durağan ortamda kültüre alınan her bir genotipten elde edilen toplam embriyo, gelişimi globular aşamayı geçemeyen toplam embriyo, kotiledonları uzayan embriyo, çift kotiledona sahip normal sağlıklı embriyo ve çimlendirme ortamına aktarılan embriyo sayıları Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Durağan ortamda mikrospor embriyogenesis performansları test edilen 29 genotipten tomurcuk başına elde edilen toplam embriyo ve normal embriyo sayıları ortalamalarının karşılaştırılması*

Orijin	Genotip	Tomurcuk başına ortalama embriyo sayısı			
		Toplam embriyo sayısı ortalaması		Toplam normal embriyo sayısı Ortalaması	
T1	3	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	17	0.14±0.14	ab	0.00±0.00	ab
T2	34	1.00±0.54	ab	0.27±0.15	ab
T3	47	0.69±0.40	ab	0.08±0.08	ab
T4	54	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	96	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T5	107	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T6	108	0.57±0.40	ab	0.07±0.07	a
T8	127	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	132	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T9	419	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	143	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	146	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	155	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	166	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	174	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T10	230	0.47±0.27	ab	0.00±0.00	ab
T11	283	2.00±0.79	bd	0.20±0.14	bc
	292	0.27±0.21	ad	0.00±0.00	ab
T12	313	1.27±0.40	abc	0.27±0.12	abc
T13	324	0.07±0.07	a	0.07±0.07	a
	330	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T14	337	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T18	383	0.27±0.19	ab	0.00±0.00	ab
T20	754	4.69±2.33	dc	0.46±0.22	c
Y1	441	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
Y5	564	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
Y12	707	0.31±0.31	ab	0.00±0.00	ab
Y16	735	2.17±2.17	abc	0.67±0.67	c

*Tukey çoklu karşılaştırma testine göre aynı harfi taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($\alpha=0.05$)

Çizelge 4.6. Durağan kültür ortamında mikrospor embriyogenesis performansları test edilen 29 genotipten elde edilen toplam embriyo, gelişimi globular aşamayı geçemeyen toplam embriyo, kotiledonları uzayan embriyo, çift kotiledona sahip normal sağlıklı embriyo ve çimlendirme ortamına aktarılan embriyo sayıları

Orijin	Genotip	Toplam embriyo sayısı	Gelişimi globular aşamayı geçemeyen toplam embriyo sayısı	Kotiledonları uzayan embriyo sayısı	Normal sağlıklı embriyo (çift kotiledonlu) sayısı	Aktarılan embriyo sayısı
T1	3	0	0	0	0	0
	17	2	2	0	0	0
T2	34	15	8	3	4	4
T3	47	10	1	8	1	1
T4	54	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
T5	107	0	0	0	0	0
T6	108	8	3	4	1	1
T8	127	0	0	0	0	0
	132	0	0	0	0	0
T9	419	0	0	0	0	0
	143	0	0	0	0	0
	146	0	0	0	0	0
	155	0	0	0	0	0
	166	0	0	0	0	0
	174	0	0	0	0	0
T10	230	7	4	3	0	0
T11	283	30	13	14	3	3
	292	4	4	0	0	0
T12	313	19	5	10	4	3
T13	324	1	0	0	1	1
	330	0	0	0	0	0
T14	337	0	0	0	0	0
T18	383	3	1	2	0	0
T20	754	61	17	38	6	3
Y1	441	0	0	0	0	0
Y5	564	0	0	0	0	0
Y12	707	4	0	4	0	0
Y16	735	13	5	4	4	4
	Toplam	177	63	90	24	20

Çizelge 4.6'ya göre daha önce en iyi performansa sahip oldukları tespit edilen 754., 735. ve 283. genotiplerden elde edilen toplam embriyo sayıları sırasıyla 61, 13 ve 30 olarak belirlenmiştir. Normal embriyo oluşumu da yine en fazla 754. genotipte gerçekleşmiştir. Toplam embriyolar arasından normal çift kotiledonlu embriyoya dönüşemeyenler ise ya globular olarak kalmış ya da anormal gelişim göstermişlerdir. Durağan ortamda kültüre alınan genotiplerin embriyo ortalamaları ve toplam embriyo sayıları kıyaslandığında (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6) androgenesise verdikleri tepki sıralamasında tutarsızlık varmış gibi görülmekte, bu durum kontaminasyon nedeni ile kaybedilen petri sayılarından kaynaklanmaktadır.

4.2.2. Çalkalayıcı üzerinde bulunan shed-mikrospor kültür sonuçları

Çalkalayıcı etkisini test etmek üzere kültüre alınan 29 genotip Tukey's ikili karşılaştırma yöntemi kullanılarak karşılaştırılmış ve bunlara ait sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Çalkalayıcı üzerinde mikrospor embriyogenesis performansları test edilen 29 genotipe ait kültürlerden tomurcuk başına elde edilen toplam embriyo ve normal embriyo sayıları ortalamalarının karşılaştırılması*

Orijin	Genotip	Tomurcuk başına ortalama embriyo sayısı			
		Toplam embriyo sayısı Ortalaması		Toplam normal embriyo sayısı Ortalaması	
T1	3	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	17	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T2	34	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T3	47	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T4	54	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	96	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T5	107	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T6	108	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T8	127	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	132	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T9	419	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	143	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	146	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	155	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	166	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	174	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T10	230	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T11	283	1.23±0.90	a	0.23±0.17	a
	292	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T12	313	0.57±0.39	a	0.00±0.00	a

*Tukey çoklu karşılaştırma testine göre aynı harfi taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($\alpha=0.05$)

Çizelge 4.7'nin devamı

Orijin	Genotip	Tomurcuk başına ortalama embriyo sayısı			
		Toplam embriyo sayısı Ortalaması		Toplam normal embriyo sayısı Ortalaması	
T13	324	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
	330	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T14	337	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
T18	383	0.38±0.38	a	0.08±0.08	a
T20	754	20.4±9.76	b	1.27±0.44	b
Y1	441	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
Y5	564	0.13±0.13	a	0.00±0.00	a
Y12	707	0.00±0.00	a	0.00±0.00	a
Y16	735	3.15±3.15	a	0.08±0.08	a

*Tukey çoklu karşılaştırma testine göre aynı harfi taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir ($\alpha=0.05$)

Çizelge 4.7'de verilen istatistik analiz sonuçlarına göre, çalkalayıcı üzerinde kültürleri bulunan 29 genotipten 6 adedi buldukları ortama tepki göstermişlerdir. Bu genotiplerden tomurcuk başına 0.13 ile 20.4 arasında embriyo elde edilmiştir. Performansı en yüksek genotipin 754 nolu ticari kökenli genotip olduğu belirlenmiş ve bu genotipin istatistiksel olarak diğer genotiplerden farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu genotipi 3.15 ve 1.23 embriyo ortalama ile sırasıyla yerel kökenli 735 ve ticari kökenli 283. genotipler takip etmiştir. Genotipler tomurcuk başına oluşan normal embriyo ortalamaları açısından değerlendirildiğinde ise 1.27 ile en yüksek normal embriyo sayısı 754. genotipten elde edilmiştir.

Çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerde her bir genotipten elde edilen toplam embriyo, gelişimi globular aşamayı geçemeyen toplam embriyo, kotiledonları uzayan embriyo, çift kotiledona sahip normal sağlıklı embriyo ve çimlendirme ortamına aktarılan embriyo sayıları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8'e göre daha önce en iyi performansa sahip oldukları tespit edilen 754. 735. ve 283. genotiplerden elde edilen toplam embriyo sayıları sırasıyla 306, 41 ve 16 olarak belirlenmiştir. Normal embriyo oluşumu da yine en fazla 754. genotipte gerçekleşmiştir. Toplam embriyolar arasından normal çift kotiledonlu embriyoya dönüşemeyenler ise ya globular olarak kalmış ya da anormal gelişim göstermişlerdir.

Çizelge 4.8. Çalkalayıcı üzerinde mikrospor embriyogenesis performansları test edilen 29 genotipe ait kültürlerden elde edilen toplam embriyo, gelişimi globular aşamayı geçemeyen toplam embriyo, kotiledonları uzayan embriyo, çift kotiledona sahip normal sağlıklı embriyo ve çimlendirme ortamına aktarılan embriyo sayıları

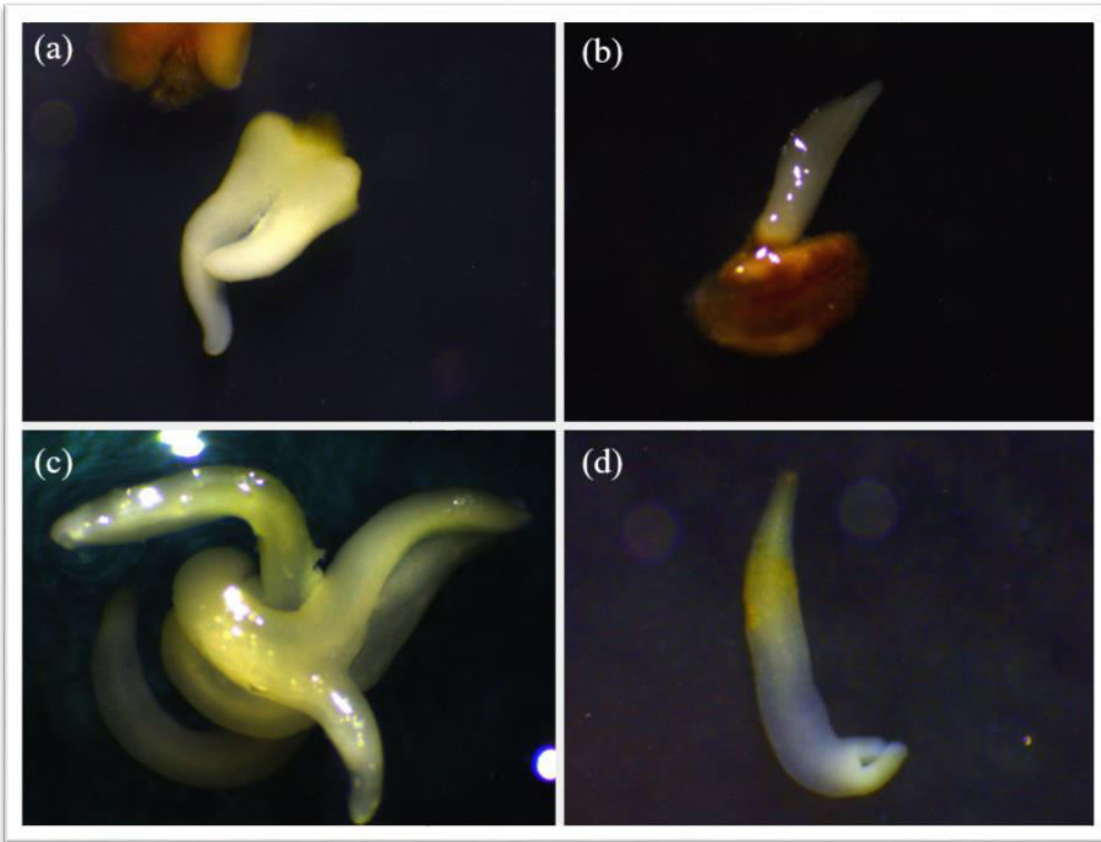
Orijin	Genotip	Toplam embriyo sayısı	Gelişimi globular aşamayı geçemeyen toplam embriyo sayısı	Kotiledonları uzayan embriyo sayısı	Normal sağlıklı embriyo (çift kotiledonlu) sayısı	Aktarılan embriyo sayısı
T1	3	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0
T2	34	0	0	0	0	0
T3	47	0	0	0	0	0
T4	54	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
T5	107	0	0	0	0	0
T6	108	0	0	0	0	0
T8	127	0	0	0	0	0
	132	0	0	0	0	0
T9	419	0	0	0	0	0
	143	0	0	0	0	0
	146	0	0	0	0	0
	155	0	0	0	0	0
	166	0	0	0	0	0
	174	0	0	0	0	0
T10	230	0	0	0	0	0
T11	283	16	6	7	3	3
	292	0	0	0	0	0
T12	313	8	8	0	0	0
T13	324	0	0	0	0	0
	330	0	0	0	0	0
T14	337	0	0	0	0	0
T18	383	5	0	4	1	1
T19	754	306	230	57	19	6
Y1	441	0	0	0	0	0
Y5	564	2	2	0	0	0
Y12	707	0	0	0	0	0
Y16	735	41	30	10	1	0
	Toplam	378	276	78	24	10

4.3. Embriyo Rejenerasyonu Bulguları

4.3.1. Durağan ortamdaki kültürlerin embriyo rejenerasyon bulguları

Durağan ortamdaki kültürlerin embriyo verimi genel olarak değerlendirildiğinde 13 genotipten toplam 177 embriyo oluşmuş, bunların 63'ü globular aşamanın ötesine geçememiş, 90 embriyo kotiledon oluşturmuş, toplam embriyolardan 24 adedi çift kotiledonlu normal sağlıklı embriyoya dönüşmüş ve bunların 20 adedi çimlendirme ortamına aktarılmıştır (Çizelge 4.6).

Durağan ortamdaki kültürlerde gelişen bazı embriyo görüntüleri Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Durağan ortamdaki kültürlerden elde edilen çeşitli embriyo gelişim örnekleri: (a) 34 nolu genotipte radisil gelişimini tamamlayamamış bir embriyo; (b) 34 nolu genotipte gelişimini anter içinde sürdüren bir embriyo; (c) 108 nolu genotipte birbirine yapışık olarak gelişen embriyolar; (d) 735 nolu genotipte çift kotiledonlu normal gelişim gösteren bir embriyo

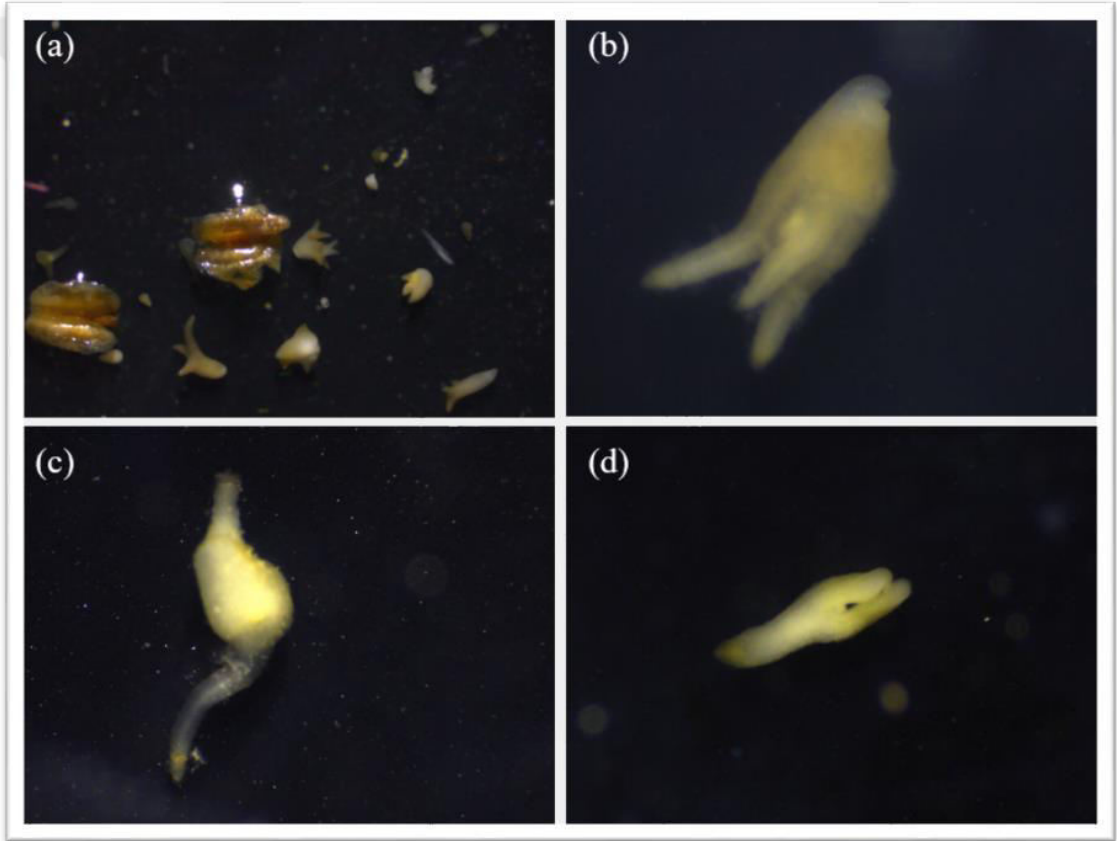
Şekil 4.3.c'de görüldüğü gibi durağan ortamdaki kültürlerde embriyoların sık ve birbirine bitişik olarak geliştiği gözlemlenmiştir. Bu sebeple, durağan ortamdaki kültürlerde embriyo aktarımı sırasında, materyallerin zedelenmesi problemiyle karşı

karşıya kalınmıştır. Bu durum embriyo aktarma sırasında bazı kayıpların verilmesine neden olmuştur.

4.3.2. Çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerin embriyo rejenerasyon bulguları

Çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerin embriyo verimi genel olarak değerlendirildiğinde altı genotipten toplam 378 embriyo oluşmuş, bunların 276'sı globular aşamanın ötesine geçememiş, 78 embriyoda kotiledon oluşmuş, toplam embriyolardan 24 adedi çift kotiledonlu normal sağlıklı embriyoya dönüşmüş ve bunların 10 adedi çimlendirme ortamına aktarılmıştır (Çizelge 4.8).

Çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerde gelişen bazı embriyo görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerden elde edilen çeşitli embriyo gelişim örnekleri: (a) 754 nolu genotipte kahverengileşme gösteren embriyolar; (b) 313 nolu genotipte anormal gelişim gösteren bir embriyo; (c) 283 nolu genotipte anormal gelişim gösteren bir embriyo; (d) 735 nolu genotipte çift kotiledonlu normal gelişim gösteren bir embriyo

Çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürler embriyo gelişimleri için mikroskop altında incelendiğinde, bazı embriyoların çift kotiledonlu olduğu ve çimlendirme ortamına

aktarılmadan önce gelişimlerini biraz daha sürdürmeleri için bekletilen bu embriyoların bir süre sonra kahverengileşerek büyümelerini sürdüremedikleri görülmüştür. Şekil 4.4.a'da görüldüğü gibi çalkalayıcı üzerinde bulunan 754. genotipe ait kültürlerde karşılaşılan en büyük problem, petri içerisinde yoğun embriyo oluşumu gerçekleşmesine karşın, bu embriyoların kısa bir süre sonra kahverengileşerek canlılıklarını kaybetmesi olmuştur. Bu sebeple durağan ortamdaki kültürlerde, çimlendirme ortamına aktarılan çift kotiledonlu sağlıklı normal embriyo oranı, çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerdeki aktarma oranından daha yüksek olmuştur.



5. TARTIŞMA

Androgenesis çalışmalarında, mikrosporların embriyogenesis tepki vermelerinde donör bitkiden kaynaklanan en önemli etken genotip olarak görülmektedir (Segui-Simarro 2010). Mikrospor embriyogenesisine olan yatkınlık, model olarak kabul edilen türlerin farklı çeşitlerinde bile değişiklikler gösterebilmektedir. Aynı model bitki türünün bazı çeşitleri mikrospor embriyogenesisine hiç yanıt vermezken, bazıları yüksek tepkiler ortaya koyabilmektedir (Ferrie vd 1995, Touraev vd 2001, Malik vd 2008, Segui-Simarro 2010). 29 süs biberi genotipinde yapılan bu tez çalışmasında; durağan ortamda kültüre alınan 29 genotipten 13 adedi, çalkalayıcı üzerindeki kültürlerden ise 6 adedi buldukları ortama tepki vermişlerdir. Embriyo oluşturma ve normal görünümü sağlıklı embriyo geliştirme yönünden hem durağan hem de çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerde genotip etkisi oldukça önemli bulunmuştur ($p \leq 0.001$). Bununla birlikte uygulamalar arasında önemli bir fark tespit edilememiştir.

Uygun safhadaki mikrospora sahip tomurcukların toplanması, başarılı bir androgenesis çalışması için en belirleyici faktörlerden biridir. Biberde androgenesis çalışmalarında kullanılan, genel kabul görmüş uygun mikrospor safhası, geç tek çekirdekli ya da erken aşamadaki çift çekirdekli olduğu safhalardır (Segui-Simarro 2010). Bugüne kadar pek çok araştırmacı uygun aşamadaki tomurcukların tespit edilmesine yönelik çalışmalarda bulunmuştur (Kim vd 2004, Supena vd 2006a). Bu amaçla tomurcuklar; tomurcuk boyu, sepal/tomurcuk boyu oranı ve anterdeki antosiyaninleşme oranı gibi bazı morfolojik özellikler ile ilişkilendirilmiştir. Ancak bu tez çalışmasına başlandığında, literatürde süs biberi ile ilgili herhangi bir haploidi çalışmasına rastlanmadığından, çalışmada uygun tomurcuk büyüklüğü tespit edilmeye çalışılırken, sebze biberinde yapılan çalışmalarda kullanılan tomurcuk seçim kriterleri dikkate alınmıştır. Supena ve Custer (2011) materyal seçiminde, petal yaprakların sepal yapraklardan çok az daha uzun ya da eşit olduğu tomurcukları kullanmışlardır. Aynı zamanda, bu tomurcukların içerisindeki anter uçlarının %10-25 oranında antosiyaninleşme göstermesi de seçimlerini etkileyen bir diğer önemli kriter olmuştur. Supena ve Custers (2011) çalışmalarında anter uçları %10-25 oranında antosiyaninleşme gösteren tomurcukların, içlerinde %60'dan fazla oranda geç tek çekirdekli, %20'yi geçmeyecek miktarda orta tek çekirdekli ve %40 oranını geçmeyecek miktarda çift çekirdekli mikrospor bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında tomurcuk seçimi dikkate alınırken bütün bu bilgilerin yanı sıra, kullanılan farklı morfolojilere sahip süs biberi genotiplerinin, tomurcuklarının da farklı morfolojik özelliklere sahip olduğu göz önünde bulundurulmuştur. Çalışmada kullanılan 29 genotipten bazıları tamamen yeşil aksama sahipken, bazı genotipler yapraklarından gövde saplarına hatta meyvelerine kadar antosiyanin içermiştir (Çizelge 3.1). Sebze biberi akrabalarına göre zaten daha küçük tomurcuklara sahip olan süs biberlerinin, bu çalışmada kullanılan bütün aksamaları antosiyaninli olan genotiplerde, tomurcuk büyüklüğünün genel olarak yeşil genotiplere göre daha küçük olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, uygun tomurcuk safhasını tespit etme çalışmaları için dış görünüşü tamamen yeşil olan 96. genotip ile dış görünüşü tamamen antosiyaninli olan 174. genotipin kullanımı tercih edilmiştir.

Bugüne kadar doğru tomurcuk seçimi yapabilmek için sepal/tomurcuk boyu oranı pek çok araştırmacı tarafından önemli bir morfolojik işaret olarak görülmüş ve

çalışmalarında kullanılmıştır (Nowaczyk ve Kisiela 2006, Supena vd 2006a, Kim vd 2008, Parra Vega vd 2013). Tez çalışmasında yapılan incelemeler sonucu antosiyaninsiz 96. genotip ve antosiyaninli 174. genotipte uygun mikrospor safhasına sahip tomurcukların sepal/tomurcuk boyu oranı her iki genotip için de %70-80 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç Parra Vega vd (2013)'nin üç İspanyol tatlı sebze biberi üzerinde yaptıkları morfolojik ve sitolojik çalışmayla örtüşmektedir. Parra Vega vd (2013) yaptıkları çalışmada bazı sebze biberi çeşitlerinde uygun mikrospor safhasını içeren anterlere sahip tomurcuklarda %80 oranında sepal/tomurcuk boyu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, süs biberinde ve sebze biberindeki tomurcuk seçimi yaparken sepal/tomurcuk boyu oranının benzerliği ortaya çıkmaktadır. 29 süs biberi genotipinin kültüre alındığı bu çalışmada, materyal seçiminde tomurcuk büyüklükleri değerlendirilirken, antosiyaninli genotiplerde uygun mikrospor safhasına sahip tomurcuk boyunun, antosiyaninsiz olanlara göre daha küçük olduğu tespit edilmiştir.

DAPI ile yapılan gözlemler sonucu uygun safhadaki mikrosporları içerdiği tespit edilen 174. genotipin 2 ve 3 numaralı grup tomurcuklarına ait anterler morfolojik olarak incelediğinde %70-90 oranında antosiyaninleşme gösterdikleri saptanmıştır. Genel aksamı yeşil 96. genotipten ise bu oran %10-40 arasında, 3 ve 4 numaralı tomurcuk grubunun anterlerinde tespit edilmiştir. Bu durum sitolojik bulguların çalışmalara sağlayacağı güvenilirliğin önemini ortaya koymaktadır. Arı vd (2016b), 64 süs biberi genotipinin androgenesis performansını değerlendirdikleri çalışmada bütün aksamları antosiyaninli genotiplerde uygun aşamadaki mikrospor safhasının antosiyaninsiz olanlara göre daha küçük boyutlu tomurcuklar içerisinde bulunduğunu saptamışlardır. Söz konusu bu çalışmadan elde edilen bir diğer sonuç; uygun mikrospor safhasını içeren antosiyaninli genotiplerin anterlerindeki antosiyaninleşme oranının %70-90 aralığında bulunduğudır. Bu sonuçlar da dikkate alındığında bütün aksamları antosiyaninli olan biber genotiplerinde uygun tomurcuk seçiminde, sadece anterdeki antosiyaninleşme oranının tek başına bir işaret olarak kabul edilemeyeceği ortaya çıkmaktadır. Öte yandan, sadece genel aksamı yeşil genotipler için anter ucundaki antosiyaninleşme oranının bir gösterge olarak kullanılabilmesi, diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Nowaczyk ve Kisiela 2006, Supena vd 2006a, Kim vd 2008, Parra Vega vd 2013). Ayrıca bu tez çalışmasında uygun mikrospor safhası içeren antosiyaninli genotiplerdeki tomurcukların daha küçük boyutlarda olmasından dolayı, anterlerin çıkarılması aşamasında zorluklar yaşanmıştır. Özellikle antosiyaninli biber genotiplerinde androgenesis çalışmalarının anter çıkarma işleminin mikroskop altında yürütülmesiyle, olası anter zedelenmelerinin ve embriyo kayıplarının önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

Androgenesis çalışmalarında donör bitkinin genotipi son derece elverişli olsa ve uygun safhadaki mikrosporlar içeren materyaller kullanılsa bile, mikrosporlardan *in vitro* koşullarda haploid embriyo uyartımını başlatabilmek önemli ölçüde bu bitkilerin yetiştirildiği koşullara da bağlıdır (Ellialtıoğlu vd 2001). Ferrie ve Caswell (2011) başarılı ve kalıcı bir mikrospor kültürünün ön koşulunun sağlıklı ve pestisitsiz donör bitkiler kullanılması olduğunu bildirmiştir. Sıcaklık, nem, fotoperiyod, ışık yoğunluğu kontrolünün sağlanabildiği, zararlı istilasından korunaklı iklim odalarında kontrollü olarak yapılan bitki yetiştiriciliği, mikrospor kültüründe embriyo oluşumuna, hatta embriyo rejenerasyonuna olumlu etkiler yapmaktadır (Ferrie ve Caswell 2011). Ayrıca kontrolsüz koşullardan elde edilmiş donör bitkilerin kullanıldığı çalışmalarda,

kontaminasyon oluşumu nedeniyle potansiyel embriyo oluşumunun olumsuz yönde etkilendiği yine Ferrie ve Caswell (2011) tarafından ifade edilmiştir. Donör bitkileri serada, toprak koşullarında yetiştirilen bu tez çalışmasında durağan ortamda kültüre alınan genotiplerden, özellikle 735 numaralı genotipten kontaminasyon oluşumu nedeniyle çok sayıda petri kaybedilmiştir.

Supena vd (2006b), Endonezya acı biberi üzerinde yaptıkları, kontaminasyonu önlemeye yönelik çeşitli antibiyotik denemeleri çalışmasında, başarılı bir kültüre alma işleminde sağlıklı donör bitkinin önemine değinmişlerdir. Söz konusu araştırmacılar sadece tamamen kontrollü phytotronlar içerisinde yetiştirilen bitkilerden sağlıklı tomurcuklar elde edilmesinin mümkün olduğunu özellikle vurgulamışlardır. Çalışmalarında her ne kadar gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı kullandıkları antibiyotik uygulamalarından başarılı sonuçlar elde etseler de, fazla antibiyotik kullanımının bakteri direncine yol açacağını ve esas dikkat edilmesi gereken hususun sağlıklı bir donör bitkiden geçtiğine özellikle dikkat çekmişlerdir (Kneifel ve Leonhardt 1992, Supena vd 2006b). Donör bitki yetiştirmede kontrollü koşulların önemi arpa bitkisinde yapılan bir çalışmada daha karşımıza çıkmaktadır (Dahleen 1999). Söz konusu çalışmada kontrollü ortamda yetiştirilen donör bitkilerden daha fazla sayıda DH bitki rejenerasyonu gerçekleştiği saptanmıştır. 29 süs biberi genotipi ile yürütülen bu tez çalışmasında, mikrospor embriyogenesis performansı en yüksek genotip, 754. genotip olarak öne çıkmış olup, bu genotip hem durağan olarak hem de çalkalayıcı üzerinde en yüksek tepkiyi vermiştir. Bu genotipten tomurcuk başına toplam embriyo oluşumu ve normal görünümlü sağlıklı embriyo gelişimi durağan ortamda ortalama 4.69 ± 2.33 olarak gerçekleşmiştir. Aynı genotip, çalkalayıcı üzerinde ortalama 20.4 ± 9.76 toplam embriyo ve 1.27 ± 0.44 normal görünümlü embriyo oluşturmuştur. 29 süs biberi genotipine ait shed-mikrospor kültürlerinin çalkalayıcı üzerinde ve durağan olarak androgenesis performanslarının test edildiği bu embriyogenesis çalışmasının embriyo verim sonuçları, Supena vd (2006b), Supena ve Custers (2011) veya Arı vd (2016a,b)'nin sebze biberinde yaptıkları shed-mikrospor çalışmaları ile karşılaştırıldığında, sonuçlar beklentinin altında gerçekleşmiştir. Supena vd (2006b) 'Galaxy' adlı bir Endonezya acı biberi çeşitinde tomurcuk başına ortalama 40.8 toplam embriyo ve 22.6 normal görünümlü sağlıklı embriyo sonuçlarını almışlar, Supena ve Custers (2011), aynı protokol üzerinde yaptıkları bazı iyileştirmelerle bu sonucu Galaxy-DH hattında toplam embriyo yönünden 106.4 ve normal görünümlü embriyo açısından 35.3 ortalama yükseltmişlerdir. Öte yandan, Arı vd (2016a) ise, bu tez çalışmasının yürütüldüğü serada iki dönem önce F₂ veya F₃ kademesindeki 48 süs biberi genotipi ile yaptıkları çalışmada tomurcuk başına 102.9 toplam embriyo ve 34.1 normal görünümlü embriyo elde etmişlerdir. Bu başarılı çalışmalarla kıyaslandığında, androgenesis çalışmalarında donör bitki yetiştirme koşullarının önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Bu tez çalışmasının sera koşullarında toprakta yapılan bitki yetiştiriciliği esnasında bazı zararlı problemleri ile karşılaşmıştır. Sera yetiştirme ortamında yoğun şekilde ortaya çıkan kırmızı örümcek ve afit zararlılarına karşı mücadele edebilmek için zorunluluk nedeniyle bir defaya mahsus insektisit uygulaması yapılmıştır. Kontrollü koşullarda donör bitki yetiştiriciliğinin önemini vurgulayan çok sayıda araştırma da göz önünde bulundurulduğunda, çalışmadan elde edilen beklentinin altındaki toplam embriyo oluşumu ve sağlıklı embriyo gelişimi ve rejenerasyon sonuçlarının nedenleri arasında sera koşullarında yapılan yetiştiricilik sırasında yapılan insektisit uygulamasının etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Çalkalayıcı etkisinin mikrospor embriyogenesi ve embriyo gelişimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma; Yang vd (2013) tarafından *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* alt türünde yapılmıştır. Söz konusu bu çalışmada, yedi genotipin farklı frekanslara sahip çalkalayıcılar üzerindeki kültürlerindeki mikrospor embriyogenesi ve embriyo gelişimleri değerlendirilmiş, bütün genotiplerin çalkalayıcı üzerinde oluşturdukları mikrospor embriyogenesi ve embriyo gelişim sonuçları, durağan ortamdaki kontrol gruplarına göre daha başarılı sonuçlar göstermiştir. Çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerden en iyi sonuçlar, 40 ve 50 rpm frekanslı çalkalayıcılardan elde edilmiş, bu kültürlerden embriyo gelişimi yönüyle %11.6'dan %69.37'ye artış ve kotiledonlu embriyo gelişimi açısından %3.4'ten %22.67'ye artış sağlanmıştır. Yang vd (2013) çalkalayıcı kullanımının *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*'de embriyo verimi üzerinde tespit ettikleri olumlu sonuçlarını, çalkalayıcının petride havalandırma etkisini arttırarak, hücrelerin solunumunu desteklemesine bağlamışlardır. Ayrıca ortamdaki besinlerin embriyolar tarafından çalkalayıcı hareketinden dolayı daha kolay absorbe edildiğini, embriyoların gelişimleri sırasında salgıladıkları zararlı maddelerin çalkalayıcı hareketi sayesinde embriyolardan uzaklaştırıldığını ve bu sayede embriyoların daha kısa sürede kotiledonlu embriyolara dönüştüklerini belirtmişlerdir. Söz konusu çalışmada 'Jinpinxiaguan' çeşidinden durağan kontrol ortamında %77.42 oranında kotiledonlu embriyo elde edilirken, çalkalayıcı üzerindeki kültürlerinden %91.43 oranında kotiledonlu embriyo verimi tespit edilmiştir. Aynı genotipin durağan kültürlerinde %6.45 olan anormal embriyo sayısının, çalkalayıcı üzerindeki kültürlerinde %2.86'ya düştüğü saptanmıştır. Bu tez çalışmasında süs biberinde yapılan shed-mikrospor kültürlerinde ise embriyo oluşturma performansı açısından en başarılı sonucu veren 754. genotipin çalkalayıcı üzerindeki kültürlerinde kontrol grubuna göre, yaklaşık 4.5 kat daha fazla ortalama embriyo oluştuğu tespit edilmiştir. Ancak hem durağan hem de 50 rpm frekansta çalkalanan kültürlerin, normal embriyo oluşturma kapasitelerinin genel olarak düşük olduğu, durağan kültürlerdeki toplam embriyolardan %6.34'ünün, çalkalayıcı üzerinde bulunan kültürlerdeki embriyolardan ise %13.56'sının normal sağlıklı embriyoya dönüştüğü saptanmıştır. Bu yönüyle, tez çalışmasında çalkalayıcının ortaya koyduğu olumlu sonuçlar Yang vd (2013) ile uyum göstermektedir. Öte yandan, kültürlerde özellikle çalkalayıcı üzerinde bulunanlarda, embriyo rejenerasyon ortamına aktarılmak üzere gelişimini ilerletmesi için bekletilen küçük boyutlu çift kotiledonlu normal sağlıklı embriyoların, çalkalayıcının etkisinden kaynaklandığı düşünülen sebeple kısa sürede kahverengileşerek canlılıklarını yitirdikleri görülmüştür.

Jiang vd (2008)'nin bildirdiğine göre sıvı kültürde uzun süre kalan embriyolar katı rejenerasyon ortamına aktarıldıklarında kahverengileşerek canlılıklarını yitirmektedirler. Çalkalayıcı kullanımı sırasında ortam değiştirmenin bu olumsuzlukları önleyerek embriyogenesi oluşumuna ve oluşacak embriyoların kalitesi ve rejenerasyonuna olumlu etkide bulunduğu bazı çalışmalarda ortaya konmuştur (Mathias, 1988). Li ve Devaux (2003), *Hordeum vulgare* L. türünde yaptıkları izole edilmiş mikrospor kültürü çalışmasında, 3 hafta sıvı ve 3 hafta katı kültürlerde inkübe edilen mikrosporların embriyo gelişimleri ve yeşil bitki oluşturma kapasitelerinin, 6 hafta süreyle sıvı ortamda inkübe edilen kültürlerle göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Söz konusu çalışmadan elde edilen bir diğer sonuç; 3 hafta sıvı ve ardından 3 hafta katı ortamda bekletilen kültürlerden, 6 hafta boyunca sıvı ortamda bekletilen kültürlerle kıyasla daha az sayıda albino bitkinin tespit edilmesidir. Li ve Devaux (2003), ortam değiştirmenin embriyoların hava almasına olanak tanıyarak, daha sağlıklı gelişim göstermelerini sağladığını ifade

etmişlerdir. Ortam değiştirmenin embriyo gelişimine etkisi üzerinde duran bir diğer çalışma, Kim vd (2008) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, “Milyanj-jare” biber çeşidi üzerinde yaptıkları izole edilmiş mikrospor kültürü çalışmasında, 4 hafta sonunda kotiledonları oluşan embriyoların %2 sukroz içeren katı B5 ortamına aktarılacak ve ışığa maruz bırakılarak, 5 gün içinde kök gelişimi gösterdiklerini ifade etmişlerdir. Söz konusu çalışmada elde edilen embriyolar globular ve kalp şekilli (A), kotiledonları uzayan (B) ve anormal görünümlü olan (C) gruplarına ayrılmışlardır. 4 hafta sonunda %2 sukroz içeren B5 katı ortama aktarılan kotiledon oluşumu gösteren B grubunun %80’inden fazlasının bitkiye dönüştüğü tespit edilmiştir. A ve C gruplarından ise herhangi bitki rejenerasyonu sağlanamamıştır. Kim vd (2008), 4 hafta sonunda, ortamdaki besin miktarının azalmasından dolayı embriyo gelişiminin düştüğünü, ortam değiştirmenin kültürlere besin takviyesi anlamına geldiği için, ortam yenilemenin bitkilerin yeşil aksamlar oluşturmasını ve köklenmeye başlamasını teşvik ettiğini vurgulamışlardır. Çalışmada araştırmacılar en iyi sonucu; $8 \times 10^4 - 10 \times 10^4$ /ml mikrospor oranı ile 32°C’de sukroz bulunmayan NLN ortamında açığa maruz bırakarak yaptıkları ön uygulama ve daha sonra %9 sukroz içeren NLN ortamında kültüre aldıkları petriyelerden elde etmişlerdir. ‘Milyanj-jare’ çeşitinde yapılan bir başka çalışmada ise (Kim vd 2013), izole edilmiş mikrosporlar, önce sıvı, daha sonra çift fazlı ortama alınan 2 basamaklı, sadece çift fazlı ve sadece sıvı ortamlarda kültüre alınmışlardır. Çalışmada uygulanan 3 farklı kültür ortamından en etkili sonuç, önce sıvı ortama daha sonra çift fazlı ortama aktarılan, mikrosporların kültürlerinden elde edilmiştir. 2 basamaklı kültürlerde petri başına ortalama 164.3 embriyo ve 16.3 kotiledolu embriyo gözlemlenmiştir. Öte yandan çift fazlı ortamda petri başına ortalama 85.7 embriyo elde edilirken, 12.5 kotiledonlu embriyo oluşumu sağlanmıştır. Sıvı ortam ise embriyo oluşum açısından petri başına ortalama 263.5 değeri verirken, sıvı ortamda kotiledonu uzayan embriyo görülmemiştir. Araştırmacılar, önce sıvı ortamda 1 hafta inkübe edilen ve daha sonra 3 hafta süreyle çift fazlı ortamda kültüre alınan mikrosporlardan daha yüksek sayıda kotiledonları uzayan embriyo elde edilmesini; sıvı ortamda petri dibinde gelişen ancak oksijensiz kalan embriyoların yeni ortama aktarılacak gelişimlerine devam etmesi olarak değerlendirmişlerdir. Kim vd (2013), sıvı ortamların embriyolara besin taşıma açısından olumlu sonuçları olduğunu ancak aynı zamanda toksik ve büyümeyi engelleyici maddelerin de sıvı ortamdan kolay bir şekilde embriyolara taşındığını, bu sebeple, ortam tazelenmenin zararlı maddeleri seyrelterek, embriyo üzerindeki olumsuz etkilerini azaltacağını belirtmişlerdir.

Bütün bu sonuçlar değerlendirildiğinde, bu tez çalışmasında hem durağan hem de çalkalayıcı üzerindeki kültürlerde görülen düşük embriyo veriminin sebebi; donör bitki yetiştirme koşullarından başka, yaklaşık 2 ay boyunca anterlerin ve onların açılmasıyla sıvı ortama dağılan mikrosporların baştan itibaren aynı ortam içinde kültüre alınmış olmaları ile açıklanabilir. Bu nedenle ileride süs biberinde yapılabilecek sıvı kültür çalışmalarında ortam yenilemenin, embriyo kalitesi ve gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, ticari veya yerel orijinli 29 süs biberi genotipinin shed-mikrospor kültürlerinde çalkalayıcı kullanımının embriyo verimi üzerine etkisi tespit edilmiştir. Bu amaçla öncelikle çalışmada kullanılacak uygun mikrospor safhasına sahip süs biberi genotiplerine ait tomurcuk morfolojileri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Antosiyeninli ve yeşil görünümlü iki süs biberi genotipinden alınan biber tomurcukları altı gruba ayrılarak her bir gruptaki tomurcuklar; tomurcuk boyu, sepal/tomurcuk boyu oranları, anter ucundaki antosiyeninleşme oranı ve uygun safhaki mikrosporları içerip içermediklerine göre değerlendirilmiştir. Yapılan DAPI destekli sitolojik çalışmalar ile her iki genotip için uygun mikrospor safhasını içeren anterlerin bulunduğu tomurcuk morfolojileri belirlenmiştir. Antosiyeninsiz 96 nolu genotipten 3 ve 4 nolu tomurcuk grupları uygun mikrospor safhasını içerirken, 174 nolu antosiyeninli genotipte uygun mikrospor safhası 2 ve 3 nolu tomurcuk gruplarında saptanmıştır. Tez çalışmasında yapılan incelemeler sonucu antosiyeninsiz 96. genotip ve antosiyeninli 174. genotipte uygun mikrospor safhasına sahip tomurcukların sepal/tomurcuk boyu oranı her iki genotip için de %70-80 olarak belirlenmiştir.

29 süs biberi genotipinin kültüre alındığı bu çalışmada, materyal seçiminde tomurcuk büyüklükleri değerlendirilirken, antosiyeninli genotiplerde uygun mikrospor safhasına sahip tomurcuk boyunun, antosiyeninsiz olanlara göre daha küçük olduğu tespit edilmiştir. DAPI boyama ile yapılan gözlemler sonucu uygun safhadaki mikrosporları içerdiği tespit edilen 174. genotipin 2 ve 3 numaralı grup tomurcuklarına ait anterler morfolojik olarak incelediğinde, %70-90 oranında antosiyeninleşme gösterdikleri saptanmıştır. Genel aksamı yeşil 96. genotipte ise bu oran %10-40 arasında, 3 ve 4 numaralı tomurcuk grubunun anterlerinde tespit edilmiştir. Bu durum anter ucundaki antosiyeninleşme oranının sadece antosiyeninsiz genotiplerde morfolojik bir markör olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Çalışmada, 29 genotipin durağan ve çalkalayıcı üzerinde bulunan petrillerinde oluşan toplam ve normal embriyo sayılarının varyans analiz sonuçlarına göre; genotiplerin istatistiksel düzeyde ($p < 0.001$) birbirinden farklı olduğu, ancak uygulamalar arasında fark olmadığı tespit edilmiştir.

Durağan ortamda kültüre alınan 29 genotipten 13 adedi buldukları ortama tepki göstermişler, bu genotiplerden tomurcuk başına 0.14 ile 4.69 arasında embriyo elde edilmiştir. Performansı en yüksek genotipin, 4.7 embriyo ortalaması ile 754 nolu ticari kökenli bir genotip olduğu belirlenmiş ve bu genotipin istatistiksel olarak diğer genotiplerden farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu genotipi 2.17 ve 2.00 embriyo ortalama ile sırasıyla yerel kökenli 735. ve ticari kökenli 283. genotipler takip etmiştir.

Çalkalayıcı üzerinde kültürleri bulunan 29 genotipten 6 adedi buldukları ortama tepki göstermişler, bu genotiplerden tomurcuk başına 0.13 ile 20.4 arasında embriyo elde edilmiştir. Performansı en yüksek genotipin 20.4 embriyo ortalaması ile 754 nolu ticari kökenli genotip olduğu belirlenmiş ve bu genotipin istatistiksel olarak diğer genotiplerden

farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu genotipi 3.15 ve 1.23 embriyo ortalama ile sırasıyla yerel kökenli 735 ve ticari kökenli 283. genotipler takip etmiştir.

Çalkalayıcı üzerinde bulunan ve durağan kültürler toplam embriyo ve globular embriyo oluşturma yönüyle kıyaslandığında, çalkalayıcı üzerindeki kültürlerde daha yüksek sayıda toplam embriyo ve globular embriyo oluştuğu saptanmıştır. Örneğin, embriyo oluşturma performansı açısından en başarılı sonucu veren 754. genotipin çalkalayıcı üzerindeki kültürlerinde kontrol grubuna göre, yaklaşık 4.5 kat daha fazla ortalama embriyo oluştuğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalkalayıcı kullanımının süs biberinde shed-mikrospor kültürlerinde embriyo verimi üzerine olumlu etkileri tespit edilmiştir. Durağan ve çalkalayıcı üzerindeki kültür ortamlarından elde edilen embriyo verimlerinin, donör bitki yetiştiriciliğinin kontrollü koşullarda yapılması ve özellikle çalkalayıcı üzerindeki kültürlerin besin ortamlarının belli aralıklarla yenilenmesi ile iyileştirilebileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- ADELBERG, J., KROGGEL, M. and TOLER, J. 2000. Physical environment *in vitro* affects laboratory and nursery growth of micropropagated hostas. *Hort Technology*, 10 (4): 754-757.
- ADELBERG, J. and TOLER, J. 2004. Comparison of agar and an agitated, thin-film, liquid system for micropropagation of ornamental elephant ears. *Hort Science*, 39 (5): 1088-1092.
- ADELBERG, J. 2005. Efficiency in thin-film liquid system for *Hosta* micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81 (3): 359-368.
- ADELBERG, J. and NAYLOR-ADELBERG, J. 2012. Effects of cytokinin on multiplication and rooting of *Aloe barbadensis* during micropropagation on agar and liquid medium. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1 (1): 1-5.
- ARI, E. ve BÜYÜKALACA, S. 2010. *Anemone coronaria* var. *coccinea*'da androgenesis çalışmaları için uygun çiçek tomurcuğu morfolojisinin tespit edilmesi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23 (2): 71-78.
- ARI, E., ADELBERG, J., DELGADO, M. and KROGGEL, M. 2015. Selection of the best black mondi (*Ophiopogon planiscapus* 'Nigrescens') clone in tissue culture conditions for micropropagation. Proceedings of the 25th International Eucarpia Symposium Section Ornamentals "Crossing Borders", *Acta Horticulturae*, 1087: 423-428.
- ARI, E., YILDIRIM, T., MUTLU, N., BÜYÜKALACA, S., GÖKMEN, Ü. and AKMAN, E. 2016a. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turkish Journal of Biology*, DOI: 10.3906/biy-1509-36, Basım aşamasında.
- ARI, E., BEDİR, H., YILDIRIM, S. and YILDIRIM, T. 2016b. Androgenic responses of 64 ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to shed-microspore culture in autumn season. *Turkish Journal of Biology*, DOI: 10.3906/biy-1505-41, Basım aşamasında.
- BAJAJ, Y.P.S. 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 12, Haploids in Crop Improvement I, pp. 3-44, Berlin.
- BARROSO, P.A., REGO, E.R., REGO, M.M., NASCIMENTO, K.S., NASCIMENTO, N.F.F., NASCIMENTO, M.F., SOARES, W.S., FERREIRA, K.T.C. and OTONI, W.C. 2012. Analysis of segregating generation for components of seedling and plant height of pepper (*Capsicum annuum* L.) for medicinal and ornamental purposes. *Acta Horticulturae*, 953: 269-275.

- BARROSO, P.A., REGO, M.M., REGO, E.R. and SOARES, W.S. 2015. Embryogenesis in the anthers of different ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes. *Genetics and Molecular Research*, 14 (4):13349-13363.
- BOSLAND, P.W. 1993. An effective plant field cage to increase the production of genetically pure chile (*Capsicum* spp.) seed. *HortScience* 28 (10): 1053.
- BOSLAND, P.W. 1996. *Capsicums*: innovatiand uses of an ancient crop. Progress in new crops, ASHS press, pp 479-487, Arlington, VA.
- BOURGIN, J.P. and NITSCH, J.P. 1967. Obtention de Nicotiana haploides a partir d'etamines cultivees in vitro. *Ann. Pysiol. Veget.*, 9 (4): 377-382.
- COLEMAN, A.W. and GOFF, L.J. 1985. Applications of Fluorochromes to Pollen Biology. I. Mithramycin and 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (Dapi) as Vital Stains and for Quantitation of Nuclear Dna. *Stain Technology*, 60 (3): 145-154.
- DAHLEEN, L.S. 1999. Donor-plant environment effects on regeneration from barley embryo-derived callus. *Crop Science*, 39 (3): 682-685.
- DOLCET-SANJUAN, R., CLAVERIA, E. and 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. and POCHARD, E. 1981. *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) anthers: high rate plant production from different genotypes by +35°C treatments haploid and diploid plants, cultivars. *Agronomy for Sustainable Development*, 1 (10): 859-864.
- DUNWELL, J.M. 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8 (4): 377-474.
- ELLİALTIOĞLU, Ş., SARI, N. ve ABAK, K. 2001. Haploid Bitki Üretimi. In: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. (ed.), In: Bitki Biyoteknolojisi Cilt:I. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, pp. 138-189, Konya.
- FERRIE, A.M.R., PALMER, C.E. and KELLER, W.A. 1994. Biotechnological applications of haploids. In: Shargool, P.D., Ngo, T.T. (Eds.), *Biotechnological Applications of Plant Cultures*, CRC Press, pp. 77-110, Boca Raton.
- FERRIE A.M.R., PALMER, C.E. and KELLER, W.A. 1995. Haploid embryogenesis. In: Thorpe TA (ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants*, pp. 309-244, Kluwer, Dordrecht.
- FERRIE, A.M.R. and CASWELL, K.L. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 104: 301-309.

- FORSTER, B.P., HEBERLE-BORS, E., KASHA, K.J. and TOURAEV, A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Science*, 12 (8): 368–375.
- GAJANAYAKE, B., TRADER, B. W., REDDY, K.R. and HARKESS, R.L. 2011. Screening ornamental pepper cultivars for temperature tolerance using pollen and physiological parameters. *HortScience*, 46 (6): 878-884.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. and OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50 (1): 151– 158.
- GEORGE, L. and NARAYANASWAMY, S. 1973. Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 78 (4): 467-470.
- GUHA, S. and MAHESHWARI, S.C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212 (5057): 97-98.
- HUNTER, C.P. 1988. Plant regeneration from microspores of barley, *Hordeum vulgare*. PhD thesis. Wye College, University of London.
- IRIKOVA, T., GROZEVA, S., POPOV, P., RODEVA, V. and TODOROVSKA, E. 2011a. In vitro response of pepper anther culture (*Capsicum annuum* L.) depending on genotype, nutrient medium and duration of cultivation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 25 (4): 2604-2609.
- IRIKOVA, T., GROZEVA, S. and RODEVA, V. 2011b. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33 (5): 1559-1570.
- JIANG, W.S., YAO, Q.J., ZHANG, X.W., YUAN, Y.X. and GENG, J.F., 2008. Influence of activated charcoal and agitation culture on frequency of embryogenesis from microspore of Chinese cabbage. *China Cucurbits Vegetables*, 4: 1–3.
- KASHA, K.J., SIMION, E., ORO, R., YAO, Q.A., HU, T.C. and CARLSON, A.R. 2001. An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica*, 120 (3): 379-385.
- KIM, M. and JANG, J.C. 2000. Rapid assessment of microspore development stage in pepper using DAPI and ferric chloride. *Journal of Plant Biotechnology*, 2: 129-134.
- KIM, M., KIM, J., YOON, M., CHOI, D-I and 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., PARK, E-J., YOON, M., and LEE, K-M. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Cell Biology and Morphogenesis*, 27 (3): 425-434.

- KIM, M., JANG, I-C., AN, D. and LEE, Y. 2013. High-quality embryo production and plant regeneration using a two-step culture system in isolated microspore cultures of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 112 (2): 191-201.
- KNEIFEL, W. and LEONHARDT, W. 1992. Testing of different antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 29 (2): 139–144.
- KUO, J.S., WANG, Z.Z., CHIEN, N.F., KU, S.J., KUNG, M.L. and HSU, H.C. 1973. Investigation on the anther culture in vitro of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. *Acta Botanica Sinica*, 15 (1): 43–47.
- LANTOS, C., PÁRICSI, S., ZOFAJOVA, A., WEYEN, J. and PAUK, J., 2006. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with Hungarian cultivars. *Acta Biologica Szegediensis*, 50 (1-2): 31-35.
- LANTOS, C., GEMES JUHASZ, A., SOMOGYI GY., OTVOS, K., VAGI, P., MIHALY, R., KRISTOF, Z, SOMOGYI, N. and PAUK, J. 2008. 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*, 97 (3): 285–293.
- LANTOS, C., GEMES JUHASZ, A., VAGI, P., MIHALY, R., KRISTOF, Z. and PAUK, J. 2012. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnology Reports*, 6 (2): 123-132.
- LEE, H-R., CHO, M-C., KIM, H-J., PARK, S-W. and KIM, B-D. 2008. Marker Development for Erect versus Pendant-Orientated Fruit in *Capsicum annuum* L. *Molecules and Cells*, 26 (6): 548-553.
- LI, H. and DEVAUX, P., 2003. High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. *Plant Science*, 164 (3): 379-386.
- LICHTER, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 105 (5): 427-434.
- LIGHTBOURN, G.J., STOMMEL, J.R. and GRIESBACH, R.J., 2007. Epistatic interactions influencing anthocyanin gene expression in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132 (6): 824–829.
- MALIK, M.R., WANG, F., DIRPAUL, J.M., ZHOU, N., HAMMERLINDL, J., KELLER, W., ABRAMS, S.R., FERRIE, A.M.R. and KROCHKO, J.E. 2008. Isolation of an embryogenic line from non-embryogenic *Brassica napus* cv. Westar through microspore embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 59 (10): 2857-2873.

- MALUSZYNSKI, M., KASHA, K.J. and SZAREJKO, I. 2003. Published doubled haploid protocols in plant species. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) *Doubled Haploid Production in Crop Plants A Manual*. Kluwer Academic Publishers, pp. 309-335, Dodrecht, Hollanda.
- MATHIAS, R., 1988. An improved in vitro culture procedure for embryos from isolated microspores of rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding*, 100 (4): 320–322.
- MITYKO, J., ANDRASZALVY, A., CSILLERY, G. and FARI, 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. and EVANS, D.A. 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *Journal of Plant Physiology*, 126 (1): 1-9.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473-497.
- NITSCH, J.P. and NITSCH, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163 (3862): 85–87.
- NOWACZYK, P. and KISIALA, A. 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *Journal of Applied Genetics*, 47 (2): 113-117.
- PALMER, C.E. and KELLER, W.A. 1999. Haploidy. In: Gómez-Campo, C. (Ed.), *Biology of Brassica Coenospecies*. Elsevier, pp. 247–286. Amsterdam.
- PARRA-VEGA, V., PALACIOS-CALVO, N., CORRAL-MARTINEZ, P. and SEGUI-SIMARRO, J.M. 2010. Establishment of isolated microspore cultures in pepper of the California and Lamuyo types. In: Prohens J, Rodriguez-Burruezo A (eds) *Advances in genetics and breeding of Capsicum and eggplant*, pp. 411–441, UPV Press, Valencia.
- PARRA-VEGA, V. GONZALEZ GARCIA, B. and SEGUI SIMARRO, J.M., 2013. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (2): 627-633.
- POCHARD, E. and DUMAS DE VAULX, R. 1971. La monoploidie chez le piment (*Capsicum annuum*). *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 65 (1): 23-46.
- REGNER, F. 1994. Microspore culture of *Capsicum annuum*. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 13: 72-73.
- REGNER, F. 1996. Anther and microspore culture in *Capsicum*. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro haploid production in higher plants*, vol. 3., pp. 77-89, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- SANTOS, R.M., DO RÊGO, E.R., BORÉM, A., NASCIMENTO, M.F., NASCIMENTO N.F., FINGER, F.L. and RÊGO, M.M., 2014. Epistasis and inheritance of plant habit and fruit quality traits in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genetics and Molecular Research*, 13 (4): 8876-8887.
- SCOTT, P., LYNE, R.L. and AP REES, T. 1995. Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta*, 197 (3): 435-441.
- SEGUI-SIMARRO, J.M. and NUEZ, F., 2008. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134 (1): 1-12.
- SEGUI-SIMARRO, J.M. 2010. Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76 (3): 377-404.
- SEGUI-SIMARRO, J.M., CORRAL-MARTINEZ P., PARRA-VEGA, V. and GONZÁLEZ-GARCIA, B. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, 30 (5): 765-778.
- SHARIATPANAHI, M.E., BAL, U., HEBERLE-BORS, E. and TOURAEV, A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127 (4): 519-534.
- SIBI M, DUMAS DE VAULX, R. and CHAMBONNET, D. (1979) Obtention de plantes haploides par androgenese *in vitro* chez le piment (*Capsicum annuum* L.). *Ann Amelior Plantes*, 29: 583-606.
- STOMMEL, J.R. and GREISBACH, R.J. 2004. *Capsicum annuum* L. 'Tangerine Dream'. *HortScience*, 39 (2): 448-449.
- STOMMEL, J.R. and GRIESBACH, R.G. 2005. *Capsicum annuum* L. 'Black Pearl'. *HortScience*, 40 (5): 1571-1573.
- STOMMEL, J.R. and BOSLAND, P.W. 2007. Ornamental pepper. In: N.O. Anderson (ed.), *Flower breeding and genetics - Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century*, pp.561-599, Springer, Dordrecht, Netherlands.
- STOMMEL, J.R. and GRIESBACH, R.G. 2008a. *Capsicum annuum* L. Lil' Pumpkin and Pepper Jack. *HortScience*, 43 (3): 935-938.
- STOMMEL, J.R. and GRIESBACH, R.G. 2008b. *Capsicum annuum* L. Midnight Creeper and Solar Eclipse. *HortScience*, 43 (3): 939-942.
- SUPENA, E.D.J. 2004. Innovations in microspore embryogenesis in Indonesian hotpepper (*Capsicum annuum* L.) and *Brassica napus* L. PhD Thesis, Wageningen University, 131 s.

- SUPENA, E.D.J., MUSWITA, W., SUHARSONO, S. and CUSTERS, J.B. 2006a. Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 107 (3): 226-232.
- SUPENA, E.D.J., SUHARSONO, S., JACOBSEN, E. and CUSTERS, J.B. 2006b. 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.
- SUPENA, E.D.J. and CUSTERS, J.B. 2011. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 130 (4): 769-774.
- TAYCHASINPITAK, T. and TAYWIYA, P. 2003. Specific Combining Ability of Ornamental Peppers (*Capsicum annuum* L.). *The Kasetsart Journal: Natural Sciences*, 37 (2): 123-128.
- THOMAS, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26 (6): 618-631.
- TOURAEV, A., PFOSSER, M. and HEBERLE-BORS, E. 2001. The microspore: A haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35: 53–109.
- YANG, S., LIU, X., FU, Y., ZHANG, X., LI, Y., LIU, Z. and FENG H. 2013. The effect of culture shaking on microspore embryogenesis and embryonic development in Pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*). *Scientia Horticulturae*, 152: 70-73.
- VAGERA, J. and HAVRÁNEK P. 1985. *In vitro* induction of androgenesis in *Capsicum annuum* L. and its genetic aspects. *Biologia Plantarum* 27 (1): 10-21.
- WANG, Y.Y., SUN, C.S., WANG, C.C. and CHIEN, N.F. 1973. The induction of the pollen plantlets of triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. *Science Sinica*, 16: 147-151.
- WILLIAMS, R.R. 1995. The chemical microenvironment. In: Aitken-Christie J, Kozai T & Smith MAL (eds) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, pp. 405-439, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- ZHOU, H., ZHENG, Y. and KONZAK, C.F. 1991. Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Reports*, 10 (2): 63-66.

ÖZGEÇMİŞ



Selcen YILDIRIM DOĞAN 1985 yılında Isparta'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 2012 yılında Ankara'da Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimini tamamladı. 2013 yılında Antalya'da Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans çalışmalarına başladıktan sonra TÜBİTAK-TEYDEB (1505) 5120019 nolu projede çalıştı ve aynı projeden burs aldı. Ayrıca, 2013 yılında İş Sağlığı ve Güvenliği Sertifikası'nı ve İş ve Meslek Danışmanlığı Sertifikası'nı aldı. 2014 yılından itibaren merkezi Antalya Organize Sanayi Bölgesi'nde bulunan mikrobiyal gübre üretimi yapan bir firmanın ihracat bölümünde görev yapmaktadır.