

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**FARKLI BİBER (*Capsicum annuum* L.) GENOTİPLERİ ÜZERİNDE SHED-  
MİKROSPOR KÜLTÜRÜ TEKNİĞİNİN UYGULANMASI VE MİKROSPOR  
GELİŞİM AŞAMALARININ BELİRLENMESİ**

**Faruk Berkay ERİM**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAHÇE BİTKİLERİ**

**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEMMUZ 2019**

**ANTALYA**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**FARKLI BİBER (*Capsicum annuum* L.) GENOTİPLERİ ÜZERİNDE SHED-  
MİKROSPOR KÜLTÜRÜ TEKNİĞİNİN UYGULANMASI VE MİKROSPOR  
GELİŞİM AŞAMALARININ BELİRLENMESİ**

**Faruk Berkay ERİM**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAHÇE BİTKİLERİ**

**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS**

**TEMMUZ 2019**

**ANTALYA**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI BİBER (*Capsicum annuum* L.) GENOTİPLERİ ÜZERİNDE SHED-  
MİKROSPOR KÜLTÜRÜ TEKNİĞİNİN UYGULANMASI VE MİKROSPOR  
GELİŞİM AŞAMALARININ BELİRLENMESİ

Faruk Berkay ERİM  
BAHÇE BİTKİLERİ  
ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 25/07/2019... tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüsnü ÜNLÜ



## ÖZET

### FARKLI BİBER (*Capsicum annuum* L.) GENOTİPLERİ ÜZERİNDE SHED-MİKROSPOR KÜLTÜRÜ TEKNİĞİNİN UYGULANMASI VE MİKROSPOR GELİŞİM AŞAMALARININ BELİRLENMESİ

Faruk Berkay ERİM

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı!!!

Danışman: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Temmuz 2019; 53 sayfa

*Solanaceae* familyasına ait bir sebze türü olan biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisi ekonomik önemi, iklimsel koşulların uygunluğu ve yetiştiriliş alanları açısından bölgemizde oldukça önemli bir yere sahiptir. Özellikle serada yetiştiriciliğinin yaygın olması ve sebze yetiştiriciliğinde F<sub>1</sub> tohum kullanımı ve sebze ıslahının ön plana çıkması doğal olarak biber ıslahının da popüler bir konu olmasına sebep olmuştur. Bölgemizde açıkta ve serada yetiştiriciliği yaygın olarak yapılan biberde; hastalık ve zararlılara dayanıklı, yüksek kalite ve miktarda ürün verebilecek yeni çeşitlerin geliştirilmesi ayrıca bu çeşitlerin korunması önemlidir. Ülkemizde üstün nitelikli yeni çeşitlerin elde edilmesi için klasik ıslah yöntemleri kullanılmakla birlikte; ıslah çalışmalarının uzun yıllar alması, hibrid üretiminin zor ve yavaş olması, yurt dışından tohum girişi nedeniyle biyoteknolojik yöntemlere başvurulmaktadır. Bitki doku kültürü çalışmaları ıslah çalışmalarında kullanılan biyoteknolojik yöntemlerin başında gelmektedir. Bitki doku kültürünün kullanılmasıyla uzun süre gerektiren yeni çeşitlerin ıslahı, geliştirilen çeşitlerin üretimi ve korunması daha kolay ve kısa sürede yapılabilir. Bitki doku kültürü teknikleri içerisinde de haploid bitkilerin elde edilmesini sağlayarak ıslah çalışmalarına hizmet eden yöntemlerin ayrı bir önemi vardır.

Ülkemizde önemli düzeyde yetiştirilen biberin kalite ve verim yönünden iyileştirilmesi, hastalık ve zararlılara dayanıklı hale getirilmesi ve gelecekteki olası tüketim alışkanlıklarına uygun olarak ıslah edilmesi gerekmektedir. Erkenci ve toplam verim bakımından daha iyi, hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşitlerin daha çok F<sub>1</sub> olarak elde edilmesi ıslah amaçlarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Klasik ıslah yöntemlerinin kullanıldığı ülkemizde, çeşitli biyoteknolojik yöntemler kullanılarak uzun süre alan yeni çeşitlerin ıslahı kısaltılabilir ve kolaylaştırılabilir. Özellikle *in vitro* androgenesis, biber ıslahında heterozigot materyallerden hızlı bir şekilde homojen hatlar elde etmek ve geleneksel F<sub>1</sub> hibritlerini üretmede ıslahçılar tarafından çok sık kullanılmaktadır (Collonnier ve ark. 2001). Böylece ıslah süresi kısaltmakta ve klasik ıslahta zaman alan veya görülmesi mümkün olmayan resesif genlerin kontrol ettiği özellikler ortaya çıkmaktadır.

Ancak yapılan çalışmalarda özellikle yurtdışındaki bazı biber genotiplerinde klasik mikrospor kültürü ve anter kültüründen haploid bitki elde edilmesi işlemlerinde donör bitkiden kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların oluşan embriyolar ve kültürler üzerindeki olumsuz etkileri, bazı genotiplerin klasik mikrospor kültürü ve anter kültürüne yeterli oranda cevap vermemesi gibi problemler ortaya çıkmıştır.

Shed-mikrospor kültürü tekniği bunlar gibi problemleri ortadan kaldırmak üzere geliştirilmiş ve henüz çok yeni olan bir besin ortamı bileşeni ve materyal kullanım bakımından modifiye edilmiş bir mikrospor kültürü tekniğidir.

Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler, erkek gametten haploid bitki elde etme yöntemi (androgenesis) için uygun başlangıç materyalleridir. Bu anterlerin *in vitro* koşullarda içerindeki genç mikrosporlarla, bu mikrospora korunak olacak şekilde bütünüyle çift katmanlı besi ortamında kültüre alınmasıyla shed-mikrospor kültürü tekniği uygulanabilmektedir.

Yapılan bu çalışmada shed-mikrospor tekniğinin tüm adımları anlatılmıştır. Bitkisel materyal olarak üç farklı biber genotipine ait ticari çeşitler kullanılmıştır. Bu çeşitlerin anter boyları ve antosiyanin seviyeleri ile anterlerdeki mikrosporların gelişim evreleri arasındaki ilişki belirlenmiştir. Bu üç farklı genotipin oluşturduğu embriyo ve haploid bitki sayıları belirlenerek shed-mikrospor kültürü tekniğine yatkınlıkları sıvı besin ortamında embriyo gelişim potansiyelleri incelenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Biber, Bitki ıslahı, Bitki biyoteknolojisi, *Capsicum annuum*, çift katmanlı besin ortamı, Haploid, *In vitro*, Embriyo, Mikrospor, Shed-Mikrospor kültürü

**JÜRİ:** Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüsnü ÜNLÜ

## ABSTRACT

### APPLICATION OF SHED-MICROSPORE CULTURE TECHNIQUE ON DIFFERENT PEPPER (*Capsicum annuum* L.) GENOTYPES AND IDENTIFICATION OF MICROSPORE DEVELOPMENT STAGES

Faruk Berkay ERİM

MSc Thesis in Agricultural Engineering

Supervisor: Prof. Dr. A. Naci ONUS

July 2019; 53 pages

Pepper plant (*Capsicum annuum* L.) which belongs to *Solanaceae* family has high economic importance because of the proper climatic conditions and high amount of production on wide fields (Including greenhouses) in our region. Especially producing in the greenhouses and extensive usage of F1 vegetable seeds make pepper breeding very popular. Further development of high yielding pepper breeds with high quality fruits and resistance against pests and diseases; also, protection of those breeds are highly important in our region which has high potential on pepper producing. Along with classical plant breeding methods; biotechnological methods are implemented in our country to produce high-grade plant breeds because of the difficulties and slowness on hybrid producing, seed importation from other countries and time-consuming breeding process. Plant tissue culture is the leading application amongst all biotechnological applications about plant breeding. With plant tissue culture applications, new plant breeds can be produced and protected much easier and faster. Within plant tissue culture techniques, methods serving plant breeding researches by producing haploid plants have furthermore importance.

In our country pepper must be bred as high-grade, high yielding, resistant to pests and diseases, at the same time suitable to future consumption habits as it is produced widely in the high amounts. Plant breeding researches overwhelmingly aim to produce high-grade, resistant and early grown plants as F1 breeds. Biotechnological applications can fasten and ease the production of new plant breeds. Especially *in Vitro* androgenesis has been in use in order to produce homogeneous genetic line from heterozygote materials and to produce F1 hybrids (Collonier 2001). This makes breeding process work faster and reveals characteristic controlled by recessive genes which takes long time or impossible to detect with classical plant breeding methods.

Researches show that, bacterial infections caused by donor plants can affect haploid plant production or embryos in classical anther and microspore culture methods negatively; also, some pepper genotypes don't respond to classical anther and microspore culture treatments.

Shed-microspore culture technique is a brand new technique developed in order to eliminate these problems by using a new combined culture medium and a different method to isolate anthers and microspores.

Anthers preserving immature microspores still in the phase of pollen mitosis I are desirable starting materials for the haploid plant production by androgenesis. Shed-microspore culture technique can be implemented by *in vitro* cultivation of these anthers in the new double-layer culture medium as they provide shelter to the immature microspores inside themselves in the beginning.

In this work, all the steps of the shed-microspore technique are explained. Commercial varieties of three different pepper genotypes were used as vegetable material. The relationship between the anther length and anthocyanin levels of these cultivars and the developmental stages of microspores in anthers were determined. Embryo development potentials in the liquid nutrient environment were investigated by determining the numbers of embryos and haploid plants that these three different genotypes were forming and their susceptibility to shed-microspore culture technique.

**KEYWORDS:** *Capsicum annuum*, Double layer culture media, Embryo, Haploid, *In vitro*, Microspore, Pepper, Plant biotechnology, Plant breeding, Shed-Microspore culture

**COMMITTEE:** Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüsnü ÜNLÜ

## ÖNSÖZ

Öncelikle bu çalışma sırasında kazandığım bilgi, deneyim ve becerilerin benim için çok değerli olduğunu belirtmek isterim. Akdeniz Üniversitesi Bahçe Bıktıkları Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı'nda kendi çalışma konum olan shed-mikrospor kültürü tekniği ile birlikte, anter kültürü, mikrospor kültürü ve sürgün ucu kültürü gibi diğer teknikleri de gözlemlene, araştırma, öğrenme ve uygulama fırsatı buldum. Bu süreç içerisinde çalışmalar yaparken kendimi geliştirmekle birlikte çok büyük bir keyif aldığımı ve yapılan bu çalışma sırasında kazandığım bilgi, deneyim, tecrübe ve becerilerin benim için çok değerli olduğunu belirtmek isterim.

Bu çalışmada konu olarak shed-mikrospor kültürü tekniğinin seçilmesinin sebebi, ülkemizde daha önce biber bitkisi üzerinde böyle bir uygulamanın yapılmamış olması ve bu konuda araştırmaların yapılması, araştırmaların devam ettirilmesi gerektiği ve çalışmanın özgün olmasıdır.

Tez konusunun belirlenmesinde, yürütülmesinde, yaptığım tüm laboratuvar denemelerimde ve çalışmamın her safhasında desteğini, deneyimlerini, engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, isteklerimi göz önünde bulundurup bana çalışmamda her konuda yardımcı olan danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. A. Naci ONUS'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yaptığım bu çalışma süresince yine doku kültürü ile ilgili tecrübe, tavsiye, birikim ve bilgilerinden sıkça yararlandığım sayın Arş.Gör. Buse ÖZDEMİR hocama ve tecrübeleri ile fikirlerini benden esirgemeyen sayın Arş.Gör. Tuğçe ÖZSAN hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvardaki çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen üniversite arkadaşlarım Ziraat Mühendisi Kutluk Bilge BOSTANCI'ya, Melis AKSOY BOSTANCI'ya ve arkadaşım Anıl YALÇIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak beni tüm yaşamımda ve eğitim hayatımda olduğu gibi yüksek lisans çalışmamda da maddi ve manevi tüm desteklerini esirgermeden, özveri ile beni destekleyen annem Şükriye İlkay ERİM'e ve babam Ümit ERİM'e en içten teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN .....	ixiii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK TARAMASI .....	9
2.1. Anter Kültürü Tekniği ile İlgili Kaynak Taramaları .....	9
2.2. Mikrospor Kültürü Tekniği ile İlgili Kaynak Taramaları .....	17
2.3. Shed-Mikrospor Kültürü Tekniği ile İlgili Kaynak Taramaları .....	20
3. MATERYAL VE METOT .....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Bitkisel materyal .....	22
3.1.2. Araştırmada kullanılan çeşitlerin özellikleri.....	22
3.2. Metot .....	23
3.2.1. Donör bitkilerin yetiştirilme koşulları .....	23
3.2.2. Genel laboratuvar ekipmanları ve işlemleri.....	23
3.2.3. Çiçek tomurcuklarının toplanması.....	25
3.2.4. Tomurcukların sınıflandırılması .....	26
3.2.5. Mikrospor gelişim evrelerinin belirlenmesi.....	26
3.2.6. Ön soğuk stresi uygulaması .....	27
3.2.7. Kültür ortamı ve ortam sterilizasyonu .....	27
3.2.8. Çiçek tomurcuklarının sterilizasyonu .....	28
3.2.9. Anterlerin izole edilmesi ve gelişen kültür aşamaları.....	28
3.2.10. Kontrol gruplarının kurulması .....	31
3.2.11. Sonuçların değerlendirilmesi .....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	34
4.1. Mikrospor Gelişim Evreleri ve Tomurcuk Boyları .....	34
4.2. Kültürlerde Mikrospor ve Embriyoların Gelişim Süreci.....	38

4.3. Kontrol Grupları ve Kontrol Gruplarından Elde Edilen Bulgular.....	45
4.4. Donör Bitkilerin Gelişiminin Embriyo Oluşumu Üzerine Etkisi.....	46
6. SONUÇLAR.....	48
7. KAYNAKLAR .....	50
ÖZGEÇMİŞ	

## AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Farklı Biber (*Capsicum annuum* L.) Genotipleri Üzerinde Shed-Mikrospor Kültürü Tekniğinin Uygulanması ve Mikrospor Gelişim Aşamalarının Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

Tarih 25/07/2019

Faruk Berkay ERİM



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
cm <sup>2</sup>	: Santimetrekare
g	: Gram
kg	: Kilogram
l	: Litre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
µM	: Mikromolar
µm	: Mikrometre
%	: Yüzde

### Kısaltmalar

2,4-D	: 2,4 Diklorafenik Asetik Asit
ABA	: Absisik asit
AgNO <sub>3</sub>	: Gümüş nitrat
B5	: Gamborg besi ortamı (1968)
BA	: Benzil adenin
BAP	: Benzil amino pürin
C	: Dumas de Vault başlangıç ortamı (1981)
CaCl <sub>2</sub>	: Kalsiyum klorid
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	: Kobalt(II) klorid heksahidrat
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	: Bakır(II) sülfat pentahidrat

CP	: Dumas de Vaulx başlangıç ortamı
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
F1	: First Filial Generation
F2	: Second Filial Generation
FeNaEDTA	: Sodyum ferrik etilen-diamintetraasetat
GBP	: Genç bisellular polen
GM	: Genç mikrospor
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	: Borik asit
IAA	: İndol asetik asit
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Mono potasyum fosfat
KI	: Potasyum iyodür
KNO <sub>3</sub>	: Potastum nitrat
MgSO <sub>4</sub>	: Magnezyum sülfat
MM	: Mid mikrospor
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	: Mangan(II) sülfat monohidrat
MS	: Murashige & Skoog besin ortamı (1962)
MP	: Mid polen
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	: Sodyum molibdat dihidrat
NAA	: Naftalen asetik asit
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	: Amonyum nitrat
NLN	: Nitsch & Nitsch (1967) tarafından geliştirilen Lichter (1981-1982) tarafından mofıye edilen besin ortamı
NN	: Nitsch & Nitsch besin ortamı (1967)
R	: Dumas de Vaulx rejenerasyon ortamı
T	: Tetrat
TMGMV	: Tobacco Mild Green Mosaic Virus

TMV : Tobacco Mosaic Virus - Tütün Mozaik Virüsü  
ToMV : Tomato Mosaic Virus - Domates Mozaik Virüsü  
UV : Ultraviyole (Morötesi)  
V : Vakuol  
ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O : Çinko sülfat heptahidrat

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b> Mikrospor ve polen gelişim evreleri.....	3
<b>Şekil 1.2.</b> Anter ve izole edilmiş mikrospor kültürü tekniklerinin adımları .....	4
<b>Şekil 1.3.</b> Shed-Mikrospor kültürü tekniğinin adımları.....	6
<b>Şekil 3.1.</b> A) Entegre bilgisayar sistemi; B) sistemde görüntülen tetradlar .....	24
<b>Şekil 3.2.</b> A) Kültür kapları ve sıvı ortam enjeksiyon tabancası; B) Otoklav içerisindeki besi ortamı ve laboratuvar ekipmanı .....	24
<b>Şekil 3.3.</b> Sabah erken saatte toplanılmış çiçek tomurcuklarının termal kap içerisindeki bir görünümü .....	25
<b>Şekil 3.4.</b> A) Bellisa çeşidinin tomurcukları; B) Filinta çeşidinin tomurcukları .....	26
<b>Şekil 3.5.</b> Steril kabin içerisinde kültüre alma işlemi esnasında alınan bir görüntü .....	29
<b>Şekil 3.6.</b> Cam tüplere dikilmiş bitkiciklerin toplu bir görünümü.....	30
<b>Şekil 3.7.</b> Büyüme odasında ışık geçirmeyen kaplarda tutulan petrieller.....	30
<b>Şekil 3.8.</b> Kontrol gruplarında Benino çeşidinden elde edilen bir embriyo.....	31
<b>Şekil 3.9.</b> Kontrol gruplarında Benino çeşidine ait çimlendirmeye alınmış anormal embriyolar .....	32
<b>Şekil 4.1.</b> A) Benino çeşidine ait bir çok mid mikrosporun mikroskop altında bir görünümü; B) Benino çeşidine ait vakuol ve mid mikrosporların bir arada görünümü .	34
<b>Şekil 4.2.</b> A) Bellisa çeşidine ait bir çok genç mikrosporun mikroskop altında bir görünümü; B) Bellisa çeşidine ait bir çok tetradın mikroskop altında bir görünümü.....	35
<b>Şekil 4.3.</b> Filinta çeşidine ait 3.80 mm boyunda bir tomurcuktaki tetrad, genç mikrospor ve mid mikrosporların bir arada bir görünümü .....	36
<b>Şekil 4.4.</b> A) Bellisa çeşidine ait 3.65 mm boyunda bir tomurcuk tomurcuktaki çok sayıda tetradın bir arada görünümü; B) Bellisa çeşidine ait 3.50 mm boyunda bir tomurcuktaki 4 adet tetradın yakından görünümü .....	36
<b>Şekil 4.5.</b> Benino çeşidine ait 3.25 mm boyunda bir tomurcuktaki hücre duvarları parçalanmakta olan 2 adet tetrad.....	37
<b>Şekil 4.6.</b> Filinta çeşidine ait 3.77 mm boyunda bir tomurcuktaki genç mikrospor evresinden mid mikrospor evresine geçiş aşamasında olan mikrosporlar .....	37
<b>Şekil 4.7.</b> A) Filinta çeşidine ait 4.15 mm boyunda bir tomurcuktaki çok sayıda mid mikrospor; B) Filinta çeşidine ait 4.30 mm boyunda bir tomurcuktaki çok sayıda mid mikrospor.....	38

<b>Şekil 4.8.</b> Bellisa çeşidine ait aynı petrideki iki adet normal görünümlü embriyonun 7. haftanın başında görüntüsü .....	39
<b>Şekil 4.9.</b> Benino çeşidine ait 7 haftalık iki adet normal görünümlü embriyo .....	39
<b>Şekil 4.10.</b> A) Benino çeşidine ait 3 adet globüler embriyo; B) Benino çeşidine ait başka bir petrideki 6 adet globüler embriyo.....	39
<b>Şekil 4.11.</b> Kültüre alınan beşinci hafta içerisindeki bir petrideki Bellisa çeşidine ait 5 adet globüler embriyonun yakından bir görüntüsü .....	40
<b>Şekil 4.12.</b> Benino çeşidine ait bir çok globüler, normal ve anormal embriyoların farklı karelerde bir arada görünümleri .....	40
<b>Şekil 4.13.</b> Bellisa çeşidine ait bir çok globüler, normal ve bir adet anormal yapıdaki embriyoların farklı karelerde bir arada görünümleri.....	41
<b>Şekil 4.14.</b> Filinta çeşidine ait gelişimlerini anterlerin içinde sürdürmekte olan üç adet embriyonun görüntüleri .....	41
<b>Şekil 4.15.</b> Benino çeşidine ait 8 haftalık kültürlerde gelişmeye devam eden farklı boyutlardaki embriyolar .....	41
<b>Şekil 4.16.</b> Benino çeşidine ait kültüre alındıktan 9 hafta sonra oluşan embriyolar.....	42
<b>Şekil 4.17.</b> Benino çeşidine ait bir kültürde 10. hafta içerisinde gelişmeye devam eden farklı boylardaki embriyoların bir arada görünümü .....	42
<b>Şekil 4.18.</b> Bellisa çeşidinden elde edilen gerçek kök ve yaprak dokuları oluşmuş bitkicikler .....	43
<b>Şekil 4.19.</b> Benino çeşidinden elde edilen gerçek kök ve yaprak dokuları oluşmuş bitkicikler .....	43
<b>Şekil 4.20.</b> Kontrol gruplarından elde edilen Bellisa çeşidine ait 6 haftalık petrilereki embriyolar.....	45
<b>Şekil 4.21.</b> Kontrol gruplarından elde edilen Benino çeşidine ait 5 haftalık bir petrideki embriyolar .....	45



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Biber ( <i>Capsicum annuum</i> ) bitkisinin sistematığı .....	2
<b>Çizelge 3.1.</b> Bitkilerin yetiştirilme ve tomurcuk alma tarihleri .....	23
<b>Çizelge 3.2.</b> NN besi ortamının temel içeriği .....	27
<b>Çizelge 3.3.</b> MS besi ortamının temel içeriği .....	28
<b>Çizelge 4.1.</b> Benino çeşidine ait bulgularda kültüre alınmaya en uygun boyutlardaki tomurcuklar 3.25 mm ile 5.00 mm arasında olanlardır .....	34
<b>Çizelge 4.2.</b> Filinta çeşidine ait bulgularda kültüre alınmaya en uygun boyutlardaki tomurcuklar 3.75 mm ile 5.50 mm arasında olanlardır .....	35
<b>Çizelge 4.3.</b> Bellisa çeşidine ait bulgularda kültüre alınmaya en uygun boyutlardaki tomurcuklar 4.00 mm ile 5.50 mm arasında olanlardır .....	35
<b>Çizelge 4.4.</b> Genotiplerde oluşan embriyo sayısı, normal ve sağlıklı embriyo sayısı ve yüzdesi, oluşan sağlıklı bitkiciklerin sayısı ve normal embriyo sayısına göre yüzdesi.....	44
<b>Çizelge 4.5.</b> Genotiplerde kültüre alınan petri başına oluşan toplam embriyo ve normal embriyo sayısı ile normal embriyo yüzdesi .....	44
<b>Çizelge 4.6.</b> Kontrol gruplarında elde edilen embriyo sayıları ve petri başına oluşan embriyo sayısı .....	46
<b>Çizelge 4.7.</b> Kontrol grupları ile 2.5 µM Zeatin ve 5 µM IAA eklenmiş sıvı besin ortamından elde edilen sonuçların karşılaştırılması .....	46

## 1. GİRİŞ

İnsanlığın başlangıcından günümüze kadar bitkilerin insanların beslenmesinde çok önemli bir yeri vardır. Sebzelerin bu besinsel öneminin anlaşılması ile birlikte bitkiler ve yetiştiricilikleri ilgili araştırmalar da giderek artmıştır. İnsan oğlunun sağlıklı bir şekilde var oluşunu devam ettirebilmesi için nüfus artış kontrolleri, sağlık uygulama ve protokolleri ile birlikte bitkisel ve hayvansal besin üretiminin de sağlanması ve artırılması gerekmektedir.

Günümüzde bitki biyokimyası, bitki fizyolojisi, moleküler biyoloji alanlarındaki hızlı ve teknolojik gelişmeler bitki yetiştiriciliğindeki bazı sorunların önüne geçilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte yeni teknik ve protokollerin geliştirilmesi ile yetiştiriciliği yapılan bitkilerin ıslahı ve geliştirilmesi alanında önemli gelişmeler meydana gelmektedir.

Bitki organ, doku ve hücrelerinin izole edilerek steril koşullarda yapay besin kaynakları kullanılarak kültüre alınmasını ve genetik özelliklerinin geliştirilmesini sağlayan tekniklerin tümü olan bitki biyoteknolojisi kavramı bazı ihtiyaçlardan dolayı ortaya çıkmıştır. Bitki biyoteknolojisi, klasik ıslah yöntemleri ile çözülmesi zor olan veya çözülemeyen bazı problemlere alternatif çözümler sunan; bitki ıslahını daha hızlı, ekonomik, verimli ve kaliteli kılmayı amaçlayan uygulamalar bütünüdür.

Türkiye, dünya üzerinde açıkta sebze yetiştiriciliği ve seracılık açısından büyük potansiye sahip bir ülke konumundadır. *Solanaceae* familyasına ait bir sebze türü olan biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisi ise vitamin, mineral ve besin içeriği bakımından ülkemizde dünyada büyük öneme sahip olan ve ülkemizde oldukça geniş alanlarda yetiştiriciliği yapılan bir sebze türüdür.

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

Botanikçilerin yaptıkları çalışmalara göre *Capsicum* cinsine ait türlerin tamamı henüz tanımlanmamış olup, günümüzde toplam 30 kadar *Capsicum* türü olduğu bilinmektedir. Bunlardan subtropikal ve ılıman iklim görülen ülkelerdeki en yaygın 5 türün *C. annuum* L., *C. frutescens* Mill., *C. baccatum* L., *C. chinense* ve *C. pubescens* olduğu bilinmektedir (Pickersgill 1997, Lantos vd. 2012).

Anavatanı Amerika kıtası olan biber bitkisinin tümü ile taksonomisi ve bilimsel sınıflandırması tür bilgisine kadar bir sonraki sayfadaki Çizelge 1.1.'de tümü ile verilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Biber (*Capsicum annuum*) bitkisinin sistematigi

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

Biber toprağın ilk 10-15 cm derinliğinde kazık köklü olarak gelişen ve bu köklerin dallanması ile meydana gelen saçak köklerden oluşarak gelişimine devam eden kök sistemine sahip bir bitkidir. Gövdesi gelişimin başlarında otsu bir yapıya sahipken, bitki yaşlandıkça yarı odunsu bir yapı kazanır. Gövdenin üzeri parlak ve tüysüzdür, bazen gövdede antosiyanin oluşumu görülebilir. Yaprak rengi çeşide göre değişmekle birlikte açık ve koyu yeşil tonlarında değişir. Bazı çeşitlerde anterlerde ve gövdede görülen antosiyanin (Mor renk) yapraklarda da görülebilir. Çiçekleri erselik yapıdadır, 5 sepal, 5 petal, 5 stamen ve 1 adet karpelden oluşur. Meyvelerinde kapsaisin ( $C_{18}H_{27}NO_3$ ) adında bir moleküler bileşik içerir, bu bileşik acı tada sebep olur, çekirdek hariç meyvenin her kısmında ve en yoğun olarak da plasentada bulunur.

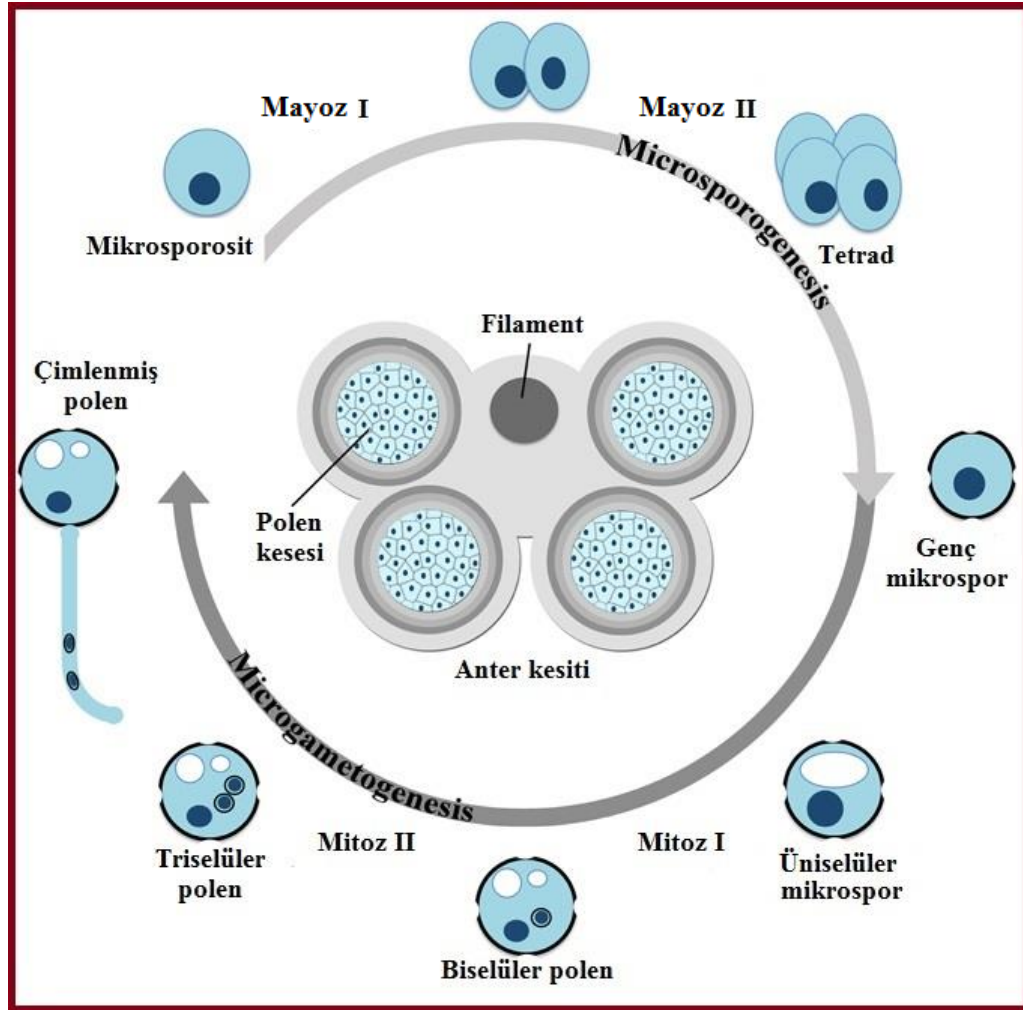
Biber bitkisinde çeşitlere göre değişmekle beraber %8 ile 37 arasında yabancı dölllenme görüldüğü bilinmektedir. Bu durum biber bitkisinin yabancı tozlanma ile genetik açılım göstererek karakteristik özelliklerini kaybedebilmesine neden olmaktadır. Böylelikle uzun bir sürece dayanan klasik ıslah ve seleksiyon metodlarında zorluklar ortaya çıkmıştır ve ıslahçılar bu yöntemler yerine F1 hibritlerin ıslahı üzerine çalışmaya başlamışlardır.

Ülkemizde çok önemli bir yetiştiricilik potansiyeli olan biber bitkisinin özellikle örtüaltı için üretilen çeşitlerin neredeyse tamamı hibrit çeşitlerdir. Son yıllarda verimin ve seralarda biber yetiştiriciliğinin daha da artması ile birlikte F1 tohum kullanımı artmış ve biber ıslahı ön plana çıkmıştır. Böylelikle bölgemizde daha verimli, kaliteli, hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda ticari değeri yüksek yeni çeşitler geliştirilerek dışa bağımlılığın azaltılması da ıslah amaçları arasına girmiştir. Bu hedeflere ulaşmak için ise günümüzde klasik ıslah yöntemlerinin yanında birçok biyoteknolojik teknikler ve doku kültürü kullanılarak, ıslah sürecini kısaltmak, kalite ve verimi daha da arttırmak hedeflenmektedir.

Doku kültürü teknikleri ile haploid bitki üretimi üzerine anter ve mikrospor kültürü tekniklerinin önemli bir yeri vardır. Haploidi tekniği ıslah sürecini kısalttığı için sebze ıslahında geniş bir uygulama alanına sahiptir. Klasik ıslah yöntemleri ile çok uzun sürelerde sonuç elde edilebilirken, özellikle biber bitkisinde *in vitro* koşullarda anter ve mikrospor kültürü teknikleri ile androgenik haploid bitkiler elde edilip kromozom katlaması ile birkaç yılda homozigot hatlar ve donör bitki ile aynı özellikleri gösteren çok sayıda birey elde edilebilir. Biber bitkisinden bol miktarda anter elde edilebileceği gibi bu anterlerin de kültüre alınmaları için çok büyük ve geniş alanlara da ihtiyaç yoktur. Böylece ıslah işlemlerinde zaman ve alan gereksinimi büyük ölçüde azaltılabilir, materyal bulma zorluğu ise bir nebze aşılabılır.

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

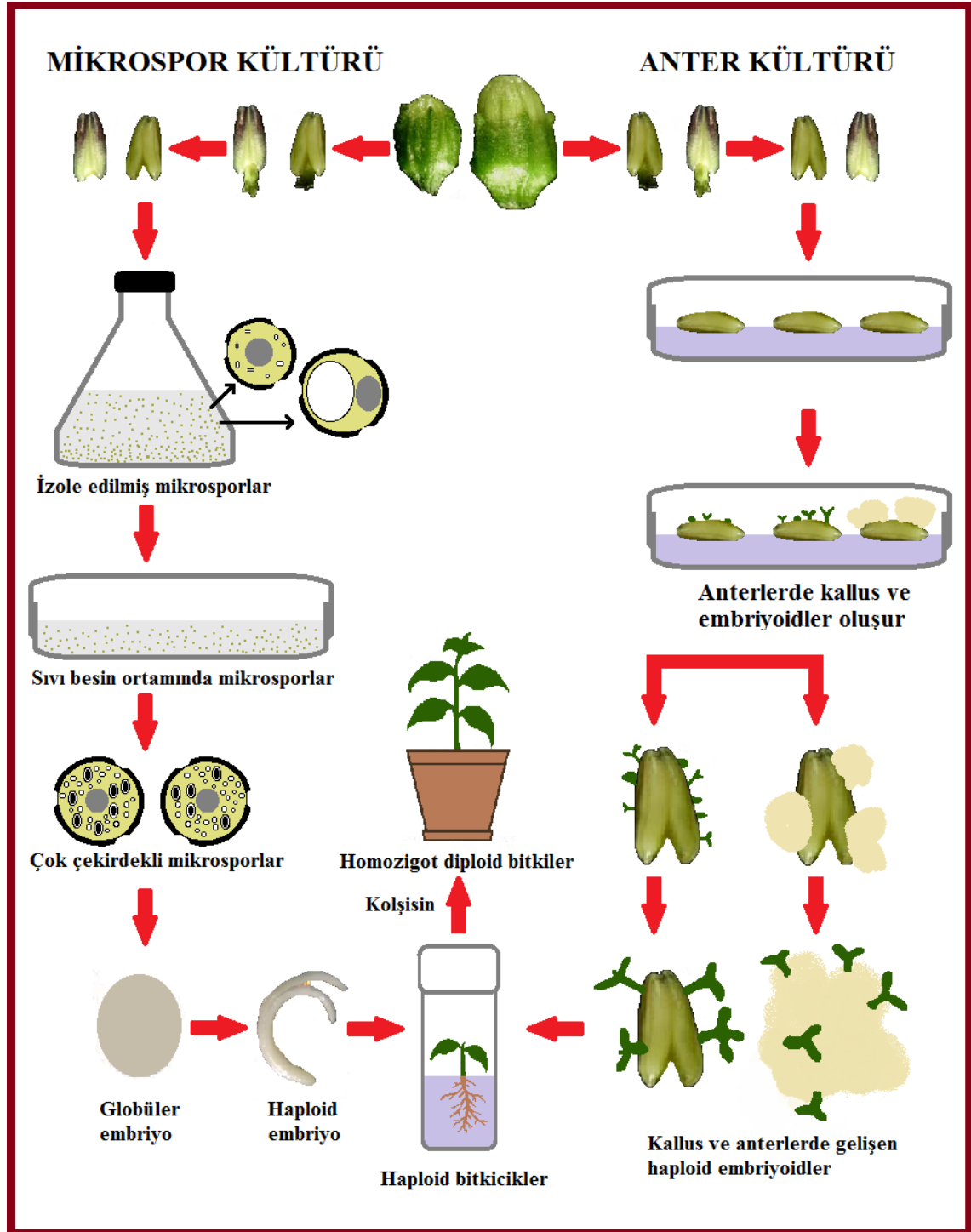
Anter, shed ve klasik mikrospor kültürüne giriş yapmadan önce bilinmesi gereken bir diğer önemli bilgi ise mikrospor ve polenlerin oluşum evreleridir. Anter ve mikrospor kültürü tekniklerinde haploid embriyo elde edilen mikrosporlar teknik olarak olgunlaşmamış haploid yapıda birer polen hücresidirler. İlk olarak mikrosporosit adı verilen mikrospor ana hücresi iki defa mayoz bölünme geçirerek bir hücre duvarı içerisinde haploid yapıda 4 adet mikrospor içeren tetradlara dönüşürler. Bu hücre duvarı selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi etmenlerden oluşur ve mikrosporlar bir süre gelişene kadar koruma görevi yapar. Tetradin hücre duvarı parçalanır ve 4 adet mikrospor serbest kalarak gelişimlerine devam ederler. Buraya kadar olan evre mikrosporogenesis olarak adlandırılır. Genç mikrosporlar iki adet mitoz bölünme geçirerek önce triselüler polenlere ve sonrasında da çok hücreli olgunlaşmış, tozlanma ve çimlenme yeteneğine sahip polenlere dönüşürler. Bu evre ise mikrogametogenesis olarak adlandırılır.



Şekil 1.1. Mikrospor ve polen gelişim evreleri

Anterlerden iki yolla haploid bitkicik oluşumu olmaktadır:

- 1) Direkt androgenesis: Mikrosporlardan direkt olarak sadece erkek gametten gelen kromozomları içeren embiyolar oluşur.
- 2) İndirekt androgenesis: Mikrosporlardan önce kalluslar meydana gelmekte ve sonrasında embriyolar ya da sürgün rejenerasyonu olmaktadır.



Şekil 1.2. Anter ve izole edilmiş mikrospor kültürü tekniklerinin adımları

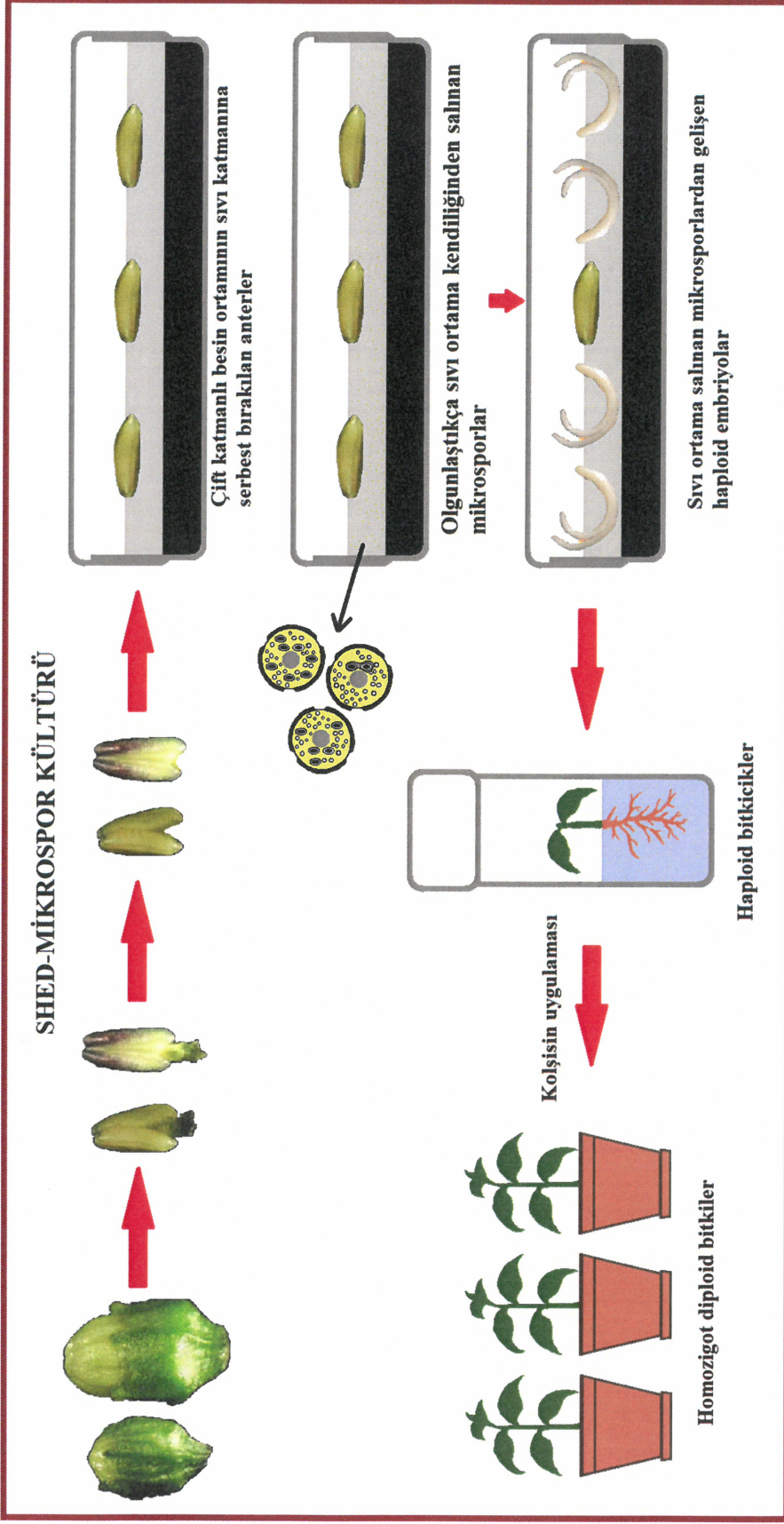
Erkek gametten haploid bitki elde etmek için en uygun başlangıç materyalleri içerisinde birinci polen mitozu aşamasındaki tek çekirdekli mikrosporları ihtiva eden olgunlaşmamış anterlerdir. Bu anterlerin *in vitro* koşullarda bütünüyle kültüre alınması işlemi anter kültürü tekniği, bu anterlerin içlerindeki mikrosporların izole edilerek sıvı ortam içerisinde kültüre alınması işlemi ise mikrospor kültürü tekniğidir. Anter kültürü tekniğinde katı veya yarıkatı besin ortamlarında kültüre alınan anterler gelişerek üzerlerinde haploid kallus dokuları veya embriyoidler oluşur. Anterlerdeki embriyoidler anterlerden ayrılarak gelişebilecekleri şekilde tekrar kültüre alınır ve direkt androgenesis yolu ile anterlerdeki mikrospordan haploid bitkicikler elde edilir; kallus dokuları ise yine ayrılarak üzerlerinde indirekt androgenesis yolu ile haploid sürgünler veya embriyolar meydana gelmesi beklenir, bu sürgün veya embriyolardan ise haploid bitkicikler elde edilir. Bu bitkiciklere kolşisin uygulaması ile kromozom katlaması yapılarak homozigot diploid bitkiler elde edilir.

Geçmişten günümüze kadar klasik anter ve mikrospor kültürü teknikleri ile ilgili bir çok araştırma yapılmıştır. Bunlardan bazıları başarılı sonuçlar verirken, bazılarında problemler ile karşılaşmış ve olumsuz sonuçlara ulaşılmıştır. Genel açıdan mikrospor kültürü, anter kültürüne göre daha karmaşık ancak daha başarılı sonuçlar elde edilebilen bir teknik olarak kabul edilebilir durumdadır. Anter ve mikrospor kültürlerinde genotip, besin ortamının içeriği ve kıvamı, donör bitkinin özellikleri, donör bitkinin yetiştirildiği mevsim ve yetiştirme koşulları, sıcaklık, tomurcukların toplanması sırasında uygulanan işlemler, ön uygulamalar gibi bir çok faktör başarıyı etkilemektedir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar ile klasik anter ve mikrospor kültürü tekniklerine alternatif olarak ‘‘Shed-Mikrospor Kültürü’’ adlı bir teknik geliştirilmiştir. Shed-mikrospor kültürü henüz çok yeni olan, daha fazla geliştirilmesi gereken ve daha önce sadece bir grup araştırmacı tarafından Endonezya’nın acı biber genotipleri üzerinde denenmiş bir mikrospor kültürü tekniğidir. Tekniğin geliştiriliş amacı, klasik anter ve mikrospor kültüründen daha sağlıklı, daha kolay ve uygulanabilir bir şekilde haploid embriyolar ve bitkicikler elde etmektir.

Shed-Mikrospor kültürü tekniğinin başlıca farkı çiçek tomurcuklarından izole edilen anterlerin filamentlerinden tamamen ayrılarak, ezme veya ayrıştırma işlemi ile içlerindeki mikrosporlar izole edilmeksizin, anterlerin zedelenmeden bütünüyle çift katmanlı besin ortamında kültüre alınmasıdır. Anterler içerisindeki mikrosporlar çift katmanlı besin ortamının sıvı katmanına serbestçe yüzer biçimde kültüre alınır. Böylelikle anterler içerisinde gelişen mikrosporların hem besin ortamından kolaylıkla faydalanması hem de anter içerisinde korunaklı bir şekilde yeterince olgunlaştıktan sonra sıvı ortama kendiliğinden salınarak serbestçe gelişimlerine devam etmeleri sağlanır.

Shed-Mikrospor kültürü tekniğinde anter kültüründe görüldüğü gibi kültüre alınan anterlerin üzerlerinde embriyoidler ve kallus dokuları oluşumu sıklıkla görülmez. Oluşan embriyoların neredeyse tamamı sıvı ortamın içerisinde oluşumunu ve gelişimini tamamlayan haploid mikrospordan oluşmuş embriyolardır. Sıvı ortamda serbest halde bulunan embriyolar üzerinde çalışmak ve gözlem yapmak diğer tekniklere nazaran daha kolaydır.



Şekil 1.3. Shed-Mikrospor kültürü tekniğinin adımları

Shed-mikrospor kültürü tekniğinin anter ve klasik mikrospor kültürüne göre sahip olduğu avantajlar Supeda vd. yaptıkları araştırmalardan elde ettikleri sonuçlara göre belirttikleri üzere şunlardır:

- Kullanılan çift katmanlı besin ortamı sayesinde kültürün ilerleyen aşamalarında besi ortamına farklı maddeler ekleme veya sıvı katmanı yenileme olanağı oldukça kolaydır. Bu durum özellikle bitki düyüme düzenleyicilerin istendiği zaman kültürlere ilave edilmesinde ve sıvı ortam içerisinde daha etkin bir şekilde kullanılmasına olanak sağlar.
- Bir petri içerisinde çok fazla embriyo oluşması durumunda sıvı besin ortamı yenilenecek embriyoların bir arada ve yerleri değişmeden gelişimleri devam ettirilebilir. Bu durum özellikle katı katmana kök atarak kendini sabitleyen embriyoların tüplere dikilecek boyutlara daha rahat ulaştırılmasında avantaj sağlar.
- Sıvı katman sayesinde besin ortamına antibiyotikler daha kolay ve etkili olacak şekilde eklenebilir. Bu durum özellikle donör bitkiden kaynaklı enfeksiyonlara karşı etkin bir koruma sağlar.
- Uygun gelişim aşamasında mikrosporları içeren anterler bütün olarak izole edildiklerinden kültürün başlangıç aşamalarında mikrospora barınak vazifesi görür ve mikrosporlar daha rahat gelişerek daha yüksek oranda embriyo oluştururlar.
- Shed-mikrospor kültürü tekniği ile elde edilen bitkicikler üzerinde kolşisin uygulamaları çok daha başarılı olmuş ve haploid bitki yüzdesi daha yüksek olmuştur.
- Shed-mikrospor kültürü tekniği ile elde edilen bitkiciklerin flow sitometri ve kloroplast sayımı yöntemleriyle ploidi seviyelerinin belirlenmesi daha kolaydır.
- Besi ortamının katı katmanına eklenen %1 oranında aktif kömür oluşan embriyo sayısını oldukça arttırmıştır. Gelişen embriyolar ileriki seviyelerde katı katman ve içerdiği aktif kömürden daha kolay yararlanmıştır.

Shed-Mikrospor kültürü tekniğinde dikkat edilmesi gereken en önemli ve başlıca husus, kültüre alınacak anterlerin ihtiva ettikleri mikrosporların hangi gelişim aşamasında olduklarıdır. Bu aşamalar sırası ile tetrad, genç mikrospor, mid mikrospor, vakuol, genç biselüler polen, mid polen ve polendir. Kültüre alınacak mikrosporlar 1. polen mitozundan önceki evrede olmalıdır. Buna en uygun aşamalar ise mid mikrospor ve vakuol aşamalarıdır. Bu aşamalardan sonra mikrosporlar içerisinde nişasta depolanmaya başlanır ve bu mikrosporların gelişimini sporofitik yöne kaydırıp, bunlardan haploid embriyolar elde etmek neredeyse olanaksızdır. Bu yüzden öncelikle kültüre alınacak olan anterlerin boyları ve antosiyanin seviyeleri ile ihtiva ettikleri mikrosporların gelişim aşamaları arasındaki ilişkinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Yapılan bu çalışmada ülkemizde önde gelen ve piyasada her zaman yeri bulunan üç farklı biber genotipine ait birer F1 hibrit çeşit materyal olarak seçilmiştir. Öncelikle her genotip için farklı boylara göre tomurcuklar sınıflandırılmıştır. Sonrasında bu tomurcuklardaki anterlerin boyları ve antosiyanin (Renklenme ya da pigmentasyon) seviyeleri incelenip kayıt altına alınmış, ihtiva ettikleri mikrosporların gelişim aşamaları



mikroskop altında incelenmiştir. Böylelikle anterlerin fiziksel özellikleri ile ihtiva ettikleri mikrosporların gelişim aşamaları ilişkilendirilmiştir. Çalışmada ülkemizde daha önce sofralık biber üzerinde denenmemiş bu yeni tekniğe üç ticari genotipin verecekleri tepki ve Shed-Mikrospor kültürü tekniği ile embriyo üretim potansiyelleri hakkında bilgi ve veriler elde etmek amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK TARAMASI

Shed-mikrospor kültürü tekniğinin uygulanışı klasik anter ve mikrospor kültürleri ile bağlantılıdır ve bu uygulamalara alternatif olarak geliştirilmiş çok yeni bir tekniktir. Bu yüzden öncelikle klasik anter ve mikrospor kültürü ile ilgili kaynak ve bilgilerin taranması gerekmektedir.

### 2.1. Anter Kültürü Tekniği ile İlgili Kaynak Taramaları

Bitki ıslahı, mevcut bir bitkisel materyalden başlanarak, üreme yeteneği olan ve dayanıklılık, verim, yetiştirme kolaylığı, raf ömrü gibi özellikleri daha üstün olan yeni bitki grupları elde etmek amacıyla yapılan işlemlerin tümünü içerir. Geleneksel ıslah yöntemlerinde karşılaşılan bazı sorun ve zorluklar ise ‘‘doku kültürü’’ veya ‘‘*in vitro*’’ olarak adlandırılan teknikler ile çözümlenebilmektedir. Klasik bitki ıslahına göre daha kısa sürede sonuç elde edilen bu teknikler günümüzde hala geliştirilmekte ve önem kazanmaktadır. Bitki doku kültürü ile ilgili ilk çalışmalar 19. yüzyılın sonlarında başlamış ve 20. yüzyılın yarısında tarımda uygulanabilir hale gelmiştir.

Bitkilerde doku kültürü çalışmalarının temeli, ilk olarak Schwan ve Schleiden’in 1838 yılında totipotens teorisini öne sürmeleri ile atılmıştır (Pierik 1987).

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

Biber bitkisinde ilk anter kültürü çalışmaları ise 1973 yılında Wang vd., George ve Narayanaswamy, Kuo vd. tarafından eş zamanlı olarak başlatılmış olup, 1979 yılında Sibi vd. tarafından uygulanan çift aşamalı anter kültür sistemi 1981 yılında Dumas de Vaultx vd. tarafından geliştirilmiştir. Sonrasında bu sistem yapılan birçok çalışma (Dolcet-Sanjuan vd. 1997, Kim vd. 2004, Barany vd. 2005) ile modifiye edilmiştir.

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

Anter kültüründen elde edilen başarı, yani elde edilen haploid embriyo sayısı birçok faktörün etkisi altında bulunmaktadır. Bu faktörlerin bir bölümü, anterlerin alındığı donör bitkiden kaynaklanmakta olup diğer bir bölümü de anter kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki koşullarla ilişkilidir (Ellialtıoğlu vd. 2001). Donör bitkiden kaynaklanan faktörler, genotipin doku kültüre yatkınlığı, donör bitkinin gelişim durumu ve yetiştirme koşulları iken; anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler ise anterlerin

gelişim durumu, anterlere yapılan ön uygulamalar, inkübasyon koşulları, besin ortamının içeriği ve yapısı olarak başlıca özetlenebilir.

Doku kültürü çalışmalarında klasik anter ve mikrospor kültürlerinin önemine vurgu yaparak, erkek gametten haploid bitki elde etmeyi amaçlayan Özkum vd. (2001) birçok bitki türünde anter kültürü tekniği ile haploid bitki oluşum oranının düşük olmasından dolayı bu tekniğin bitki ıslahında sınırlı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerin, donör bitkinin genotipi ve gelişimi, anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besi ortamı ve kültür koşulları olduğunu belirtmişlerdir.

Koleva vd. (2012) biber bitkisinin *in vitro* anter kültüründe androgenesis etkinliğinin artırılmasını amaçlamışlar ve buna bağlı olarak embriyogenesis sağlanması, oluşan embriyoların bitkiciklere dönüşmesi, bitkiciklerin steril koşullardan sera koşullara başarılı adaptasyonu, bitkiciklerin dış ortama alıştırılması ve plastik tünel koşulları altında elde edilen androjenetik biber hatlarının ıslah sürecinde kullanılmasını hedeflemişlerdir. Bu araştırmacıların kullandıkları 19 farklı biber genotipinden, 12 tanesi anter kültüründe embriyo oluşumu için potansiyele sahip olup, oluşan bitkiciklerin dış çevreye alıştırılması ve adaptasyon sağladıktan sonra tohum materyalini 4 biber genotipinden toplamışlardır. Sonuç olarak anter kültürü uygulamasında androgenesis etkinliğinin genotipe ve donör bitkilerin yetiştirme koşullarına bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Parra-Vega vd. (2013) mikrosporogenesis ve mikrogametogenesis süresince belirli bir gelişim aşamasında olan polen ya da mikrospor tanesinin belirlenmesinin, farklı temel ve uygulanabilir amaçlar doğrultusunda önemli olduğunu belirtmişlerdir. Androjenetik double haploid tekniği ve diğer teknikleride belirli gelişim aşamalarındaki mikrospor ya da polenleri ihtiva eden çiçek tomurcuklarını belirlemek için kesin, hızlı ve güvenilir kriterlerin esas alındığı görüşündelerdir. Antosiyanin üreten biber genotiplerinde, çiçek gelişim özellikleri potansiyel olarak yararlı olan bu gibi bir belirleme için kriter olarak birçok morfolojik faktörün belirlenmesine olanak tanır. Araştırmacılar, bu çalışmalarında mikrosporogenesis ve mikrogametogenesisin bireysel aşamalarının her biri ile ilgili tomurcuk ve anter gelişiminin görülebilir ve ölçülebilir özelliklerini ilişkilendirebilmek için mümkün olduğunca en basit ve en kesin kriterleri belirlemeyi hedeflemişlerdir. Çalışmalarında 3 farklı F1 İspanyol biber hibriti kullanmışlardır. Mikrospor ve polen gelişim aşamalarının belirleyicileri olarak anter uzunluğunun, tomurcuk uzunluğunun, anterlerdeki mor pigmentasyonun ve kaliks uzunluğu ile tomurcuk uzunluğu arasındaki oranın kullanılmasının ne kadar kesin sonuçlar verdiğini ve pratik olarak kullanılabilirliğini tartışmışlar ve analiz etmişlerdir. Araştırmacılarından elde ettiklerini sonuçlara göre kaliks/tomurcuk uzunluğu oranı ve anterlerdeki mor pigmentasyonun kombine edilerek kullanılmasının, antosiyanin üreten biber genotiplerinde özel markörleri belirlemek amacı ile potansiyel olarak uygulanabilir, kolay, hızlı, pratik ve kesin bir kriter olduğunu önermektedirler.

Irikova ve Rodeva (2004) yaptıkları çalışmalarında, Bulgar biberlerine ait 4 hat, 5 varyete ve 2 F1 hibriti farklı besin ortamlarında kültüre alarak, *in vitro* koşullarda anter kültürüne tepkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında *in vitro* koşullarda biber bitkilerinin anter kültürüne tepkisinin donör bitkinin genotipi, besin ortamının kompozisyonu, besin

ortamına eklenen maddeler ve bitki büyüme düzenleyicilere bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak ise kültürlerde, sitokininlere oranla daha düşük oksin konsantrasyonuna sahip olan C ve MS ortamlarını direkt embriyogenesis için uygun bulmuşlardır.

Çağlar vd. (2004), Kahramanmaraş kırmızı biberlerinde androgenesis yoluyla *in vitro* haploid embriyo oluşturmada farklı oksin ve sitokinin kombinasyonlarının etkisini araştırdıkları ve aktif kömür ile AgNO<sub>3</sub> içeren besi ortamları ile farklı ön sıcaklık uygulamaları içeren çalışmalarında, kaliks ve korollanın aynı seviyede ya da korollanın kaliksten 1-2 mm uzun olduğu safhadaki tomurcukları kullanmışlardır. Kültür uygulamalarında 100 mg/l myo-inositol, 30 g/l sakkaroz ve 8 g/l agar ilave edilmiş MS ortamı kullanmışlardır. Bu ortama oksin olarak NAA (2.0, 4.0 ve 6.0 mg/l) ve 2,4-D (1.0, 2.0,3.0 ve 4.0 mg/l), sitokinin olarak BAP (0.1, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l) ve Kinetin (0.1, 1.0 ve 5.0 mg/l) ilave ederek farklı miktardaki kombinasyonlar ile uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca ortamlarına %0.25 aktif kömür ve 10 mg/l AgNO<sub>3</sub> ekleyerek etkilerini denemişlerdir. Kültüre aldıkları anterlere 1) ön uygulamasız, 2) 4°C sıcaklık ve karanlıkta, 3) 29°C sıcaklık ve karanlıkta, 4) 35°C sıcaklık ve karanlıkta olmak üzere 4 farklı ön uygulama da yapmışlardır. Bazı anterlerde sadece kallus oluşumu gördüklerini belirten araştırmacılar, MS + 0.1 gm/l BAP + 4 mg/l NAA + %0.25 aktif kömür + 10 mg/l AgNO<sub>3</sub> bileşimli besi ortamına dikilen anterlerin hiç kallus oluşturmadan %2.8 oranında haploid embriyo gelişimi sağladıklarını bildirmişlerdir.

Parra-Vega vd. (2013) başka bir çalışmada, ıslaha uygun saf hatlar elde etmek için en güvenilir aracın double haploidlerin olduğunu ve şimdiye kadar biberde double haploid elde etmek için en kolay ve en kullanışlı yöntemin ise anter kültürü olduğunu belirtmektedirler. Araştırmacılar bu çalışmalarında, Dumas de Vault vd. (1981) ve Supena vd. (2006) olmak üzere 2 protokol kullanarak 4 biber çeşidindeki embriyo ve kallus oluşumlarını değerlendirmişlerdir. Bu protokollere göre tüm genotipler test edilmiş ve Dumas de Vault (1981) protokolünden hem embriyo hem kallus oluşumu gözlenirken, Supena vd. (2006) protokolünden yalnızca embriyo oluşumu meydana gelmiştir. Genotipler arasında da embriyo üretimi bakımından farklılıklar gözlemlenmiştir. Biber anterlerini kültüre almadan 35°C'de 4, 8, 12 ve 16 gün olmak üzere sıcaklık şokuna maruz bırakmışlardır. Buna bağlı olarak embriyo ve kallus üretiminde uygulanan sıcaklık şokunun süresinin önemli etkileri olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar 35°C'ye maruz kalma süresinin uzatıldığında kallus oluşumunun arttığını gözlemlenmiştir. Embriyo ve kallusların orijinlerini ışık mikroskobu, flow sitometri ve moleküler markırlar yardımı ile analiz etmişler ve bu analizlerin sonucunda test edilen tüm embriyoların gametofitik orijinli olduğunu, test edilen tüm kallusların ise sporofitik orijinli olduğunu görmüşlerdir. Buna ek olarak araştırmacılar, elde ettikleri sonuçlardan sadece mikrospor türevli embriyoların oluşumunda değil aynı zamanda anter duvarından kallus oluşumunda da kültür koşullarının çok önemli etkilerinin olduğunu gözlemlenmiştir.

Kristiansen ve Andersen (1993) biber anter kültüründe yaptıkları çalışmalarında donör bitkinin yaşı, sıcaklık değerleri ve fotoperiyot koşullarının embriyo oluşumundaki etkilerini araştırmışlardır. Denemelerinde üç farklı fotoperiyot (11, 15 ve 19 saat), üç farklı sıcaklık (22°C, 26°C ve 30°C) uygulamış ve üç farklı hibrit çeşit kullanmışlardır. Anterleri ise donör bitkinin yaşının etkisini test etmek için 5 ile 9 haftalık periyotlardaki farklı bitkilerden toplamışlardır. Embriyolar 26.4°C olarak hesaplanan optimum

sıcaklıkta elde edilmiştir. Çalışmalarında embriyo oluşumu fotoperiyot farklılıklarından etkilenmemiştir. Buna ek olarak donör bitkilerin farklı sıcaklıklarda yetiştirilmesinin sonucunda sıcaklığın artması ile embriyo oluşumunun da arttığını gözlemlemiştir. Bitkiler için en uygun gelişme sıcaklığı olan 26°C’de yetiştirilen bitkilerden maksimum (%2 oranında) embriyo elde edilirken, düşük sıcaklıkta (16°C) yetiştirilen bitkilerden çok daha az (%0.2 oranında) embriyo elde edildiğini belirtmişlerdir. Donör bitkinin yaşının etkisini test etmek için ise araştırmacılar anterleri haftalık olarak kültüre almışlardır. Çalışmada yapılan her üç denemede de donör bitkinin yaşı arttıkça anter kültürüne verdiği tepkinin de önemli oranda düştüğü gözlemlenmiştir. Genç bitkilerden alınan anterlerden %2 oranında embriyo elde edilirken, 12-14 haftalık bitkilerden alınan anterlerden hiç embriyo oluşmadığını gözlemlemiştir.

Kim vd. (2004) biber anter kültüründe farklı aşamalarda anterlerin ihtiva ettiği mikrosporların gelişim aşamalarını araştırmış ve embriyo gelişimi için en uygun aşamayı belirlemiştir. Araştırmacılar, biber anterlerini 0.1 mg/l NAA ve 0.1 mg/l Kinetin ekledikleri MS ortamında kültüre almışlar, sonrasında 3 gün boyunca 31°C sıcaklığa tabi tutup 25°C’de karanlık ortama almışlardır. Kültüre alındıktan 6 hafta sonra mikrospordan oluşan embriyoların ve oluşan kallusları saymışlardır. Araştırmacılar, 1) 1/4’ü mor renk olan anterler, 2) 2/4’ü mor renk olan anterler, 3) 3/4’ü mor renk olan anterler, 4) tamamen mor renkli olan anterler olmak üzere pigmentasyon seviyelerine göre dört gruba ayırmışlardır. Her bir aşamadan aldıkları 10 anteri, kültürün 0, 2, 4, 7, 9 ve 14. günlerinde fikse ettikten sonra DAPI boyama yöntemi ile boyamışlar ve mikrosporların gelişimlerini sitolojik olarak gözlemlemiştir. Buna dayanarak kültürlerin ikinci gününden itibaren ölü polen çok önemli bir artış gözlemlemiştir. Araştırmacılar bu çalışmalarında embriyo oluşturan anterleri yüzdeleri bakımından incelemişler ve buna göre 1., 2., 3. ve 4. aşamalarda gözlemler sırasıyla; %1.5, %11.5, %18.6 ve %6 olurken, 100 anter için embriyo oluşumu oranı bakımından %3.0, %34.3, %57.8, ve %12.6 olmuştur. Araştırmacılar sonuç olarak en başarılı tepkileri 3/4’ü mor renk olan erken-çift çekirdekli aşamadaki polenleri içeren anterlerin verdiklerini bildirmişlerdir.

Terzioğlu vd. (2000) Kahramanmaraş biber popülasyonunda anter kültüründe farklı inkübasyon koşulları ve besi ortamlarının embriyo oluşuma etkisini araştırmışlardır. Ortalama 5-7 mm uzunluğundaki, petallerin sepallerin içinden henüz çıkmadığı ancak hafifçe görüldüğü ve tek çekirdekli mikrosporları içeren tomurcukların anter kültürü için uygun olduklarını asetokarminle boyama yöntemiyle belirlemiştir. Çalışmalarında iki farklı inkübasyon koşulu denemişlerdir. İlk inkübasyon koşulunda anterler 35°C’de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlıkta 8 gün tutulduktan sonra 25°C’ye alınmışlardır. İkinci inkübasyon koşulunda ise anterler sürekli 2000 lux şiddetinde aydınlıkta 29°C’de 3 ay tutulmuşlardır. En yüksek embriyo oluşumunu (%4.8 oranında) 4 mg/l NAA ve 1 mg/l BA eklenen ve %0.25 aktif kömür içeren MS besi ortamında kültüre alınan, 29°C’de sürekli aydınlıkta tutulan anterlerden elde etmişlerdir. Aynı besin kombinasyonu, sıcaklık ve ışıklandırma koşullarında aktif kömür olmaksızın kültüre alınan anterlerde ise %3.3 oranında embriyo oluşumu gözlemleyerek, aktif kömürün embriyo oluşumu olumlu yönde etkilediğini belirtmişlerdir. Buna ek olarak, 4 mg/l NAA ve 1 mg/l BA hormon kombinasyonunun, 1mg/l NAA ve 4 mg/l BA kombinasyonundan daha başarılı olduğunu ve 29°C’de 2000 lux şiddetinde ışıklandırma koşullarının, 35°C ve sonrasında 25°C ile 16 saat aydınlık fotoperiyot koşullarından daha üstün olduğunu saptamışlardır.

Elliialtıoğlu ve Tıyrıdamaz (2002) 11-B-14 ve Demre Sivrisi biber çeşitlerine ait iek tomurcuklarında yaptıkları soğuk şoku ve besi ortamına çift fazlı sistemde katılan aktif kömürün anter kltrnde, anterlerdeki içsel absisik asit miktarına etkilerini araştırmışlardır. Araştırmalarında soğuk şoku ve aktif kömürün anterlerdeki ABA miktarını azaltırken, embriyo oluşumuna olumlu bir etki yapmadığını bildirmışlerdir.

Ercan ve şensoy (2011) yaptıkları çalışmada genotip, donör bitki, tomurcuklara ya da anterlere n uygulama yapılması, mikrospor gelişim aşaması ve inkübasyon koşulları gibi faktörlerin androgenetik tepkiyi etkilediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar anter kültürüne verilen genotipik cevabı açığa çıkarmak için 11 farklı biber tipi kullanmışlardır. Korolla ve kaliks eşit uzunluktaırken veya korollanın kaliksten hafifçe uzun olduğu iek tomurcuklarını toplamışlardır. Tomurcukları 24 saat boyunca 4 C soğukta bekleten araştırmacılar, 8 g/l agar ve 30 g/l sükroz eklenmiş MS ortamını kullanmışlar, inkübasyon koşulu olarak ise 35 C'de 8 günlük tam karanlık ardından 25C'de 3000 lux şiddetinde 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarını kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre biber genotiplerinin farklı androgenetik tepkileri olduğunu görmüşlerdir. Araştırmacılar test ettikleri çeşitlerden ikisinde hiç bir şekilde embriyo oluşmadığını, diğer çeşitlerde ise genotipe bağlı olarak farklı oranlarda embriyo oluştuğunu hatta bunların direkt embriyogenesis ile oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri embriyoların oluşum oranları %0.33 ile %7.69 arasında değişirken, bütün genotiplerdeki kallus oluşum frekansı %17.31 ile %44.15 arasında olmuştur. Oluşan bu kalluslardan hiç bir embriyo oluşmadığı, kök oluşumu veya anormal gelişimlerin meydana geldiği ve bunlar gittikçe kahverengiye döndükleri görülmüştür. Bu çalışmada 11 genotipten 2398 anter çıkarılmış ve toplamda 44 adet embriyo ile 12 adet bitkicik elde edilmiştir. Kullandıkları 2 genotipten (arliston - Yalova ve dolmalık - Kandil) hiç embriyo oluşumu olmazken, iki genotipten (Sivri - Sera Demre 8 ve blok - Odessa) diğerlerine nazaran daha iyi androgenetik cevap gözlemlemişlerdir.

Irikova vd. (2011) yaptıkları çalışmada 8 hat, 7 varyete ve 4 hibrit olmak üzere 19 Bulgar biber genotipinin *in vitro* anter kültürüne olan tepkisini sırayla 12 ve 40 gün aralıklarla 2 kez olmak üzere, 2 başlangıç ortamı (C ve Cm) ve 2 rejenerasyon ortamı (R ve Rm) kullanarak denemişlerdir. *In vitro*'da inokülasyondan 35-40 gün sonra kültüre alınan anterlerde 6 hat, 6 varyete ve 3 hibrit direkt embriyo üretmiştir. 4 hat, 6 varyete ve 1 hibritten rejenera olan bitkiler gözlemlemişlerdir. Testlerde embriyo oluşumu için 12 gün C ortamında kültüre alma etkili değilken, 40 gün süre ile anterlerin kültür ortamında kalması genotiplerin direk embriyogenesis yeteneklerini açığa çıkarmıştır. R ortamına transfer ettikleri embriyoların bitki rejenerasyon oranının %50-100 arasında olduğunu görmüşlerdir. En yüksek embriyonik anter frekansı Cm ortamında 12 gün süren kültürlerde görülmüştür ancak Rm ortamına transfer edilen embriyolar bitkicik oluşurmamıştır. Araştırmacılar sonuç olarak genotiplerin besin ortamında ve kültür süresince özel gereksinimlere sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Matsubara vd. (1998) yaptıkları çalışmada Temmuz ayından Kasım ayına kadar alınan anterlerden 6 biber çeşidinin mikrosporlarından embriyoid ve kallus rejenera etmişlerdir. Tek ekirdekli aşamadaki mikrosporları ihtiva eden anterleri 0.004 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l Kinetin, 30 gr/l Sükroz ve 2 gr/l Gelrite ilave ettikleri MS ortamına dikmişler ve 35 C'de 24 saat tuttuktan sonra 25 C'de 16 saat gün ışığı altında 40 gün inkübe etmişlerdir. Açılmış durumdaki anterlerdeki mikrospordan embriyoidler rejenera

olmuştur, bunlar 40 gün sonrasında kalp ve torpedo şekilli embriyolara dönüşmüştür. Kallusların ise mikrosporlardan, filamentlerden ve de anter duvarlarından geliştiklerini; embriyolara göre büyümelerinin daha yavaş, canlılıklarının daha az ve renklerinin ise beyazımsı olduğunu gözlemlemişlerdir. Embriyo ve kallus oluşumu çeşitlere ve zaman periyoduna göre değişiklik göstermiştir. Eylül ile Ekim ayları arasında embriyoid oluşumu daha çok olmuştur, bu aylardaki 15-25°C sıcaklıklar daha yüksek embriyo oluşumu için etkili olmuştur. Bütün çeşitlerden embriyoid ve kallus elde edilmesine rağmen, embriyoid ve kallus oluşum oranları çeşitlere göre farklılıklar göstermiştir. MS ortamına alınan embriyoidler bitkiciklere dönüşmüş ve iklime alıştırmışlardır.

Nowaczyk ve Kisiala (2006), 2 biber ıslah hattının (ATZ1 ve PO) ve bu iki hattan elde edilen bir F1 hibritin (ATZ1 x PO) *in vitro*'da anter kültürü ile androgenesis başlatımının etkinliğinin kurulmasını hedeflemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarını çeşitli modifikasyonlar ekleyerek Dumas de Valux vd. (1981) tarafından geliştirilmiş metoda göre yürütmüşlerdir. Deneylerinde, androgenesisin etkinliğinin ATZ1 hattı için %4'ten, F1 hibriti (ATZ1 x PO) için %1.5'e kadar değiştiğini ve anter kültürünün devam ettirilmesi için gerekli koşullar ile birlikte çiçek tomurcuğunun gelişim aşamasına da fazlasıyla dayandığını ortaya çıkarmışlardır. Çalışmalarında, androgenik embriyoların gelişiminin sepallerin petallere eşit ya da petallerin sepallerden çok az uzun olan tomurcuklardan alınan anterlerden oluştuğunu ve CP ortamında anter başlatım periyodunun uzunluğu ile R1 jenerasyon ortamında kinetinin seviyesi arasında çok açık bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Luitel ve Kang (2013) çalışmalarında haploid bitki üretiminde androgenesisin etkinliğini belirlemek için CP ve MS ortamlarını kullanarak Vine Sweet (Tatlı mini biber hibriti) çeşidinin kırmızı, sarı ve turuncu tiplerinin *in vitro* androgenik tepkisini araştırmışlardır. Çalışmalarındaki sonuçlara göre her iki besin ortamında da her üç tipin anter kültüründe embriyo ve kallus oluşturma oranları değişiklik göstermiştir. İki besin ortamındaki anterler her tip için rejenerasyon olmaksızın kallus oluşturarak tepki vermiştir. Sarı tipe ait anterler CP ve MS ortamında sırası ile %62.5 ve %46.7 normal embriyo oluşturmuştur. Her iki besin ortamında da sarı tip yaklaşık 4 kat daha fazla normal görümlü embriyo oluşturmuştur ve turuncu tip anter kültürü tekniğine düşük oranda androgenik tepki göstermiştir. Rejenerasyon için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına aktarılan toplam 51 embriyodan 45 adet bitkicik rejenerasyon olmuştur. Flow sitometri analizi kırmızı, sarı ve turuncu tipler için sıra ile %44.5, %42.4 ve %33.3 oranında bitkinin haploid ve %55.5, %57.6 ve %66.7 oranında bitkinin ise spontane diploid olduğunu ortaya koymuştur. Haploid bitkilerde kromozom sayısı 12, diploid olanlarda ise 24'tür. Buna ek olarak yaprak stomasının bekçi hücrelerindeki stomata karakterleri ve kloroplast sayıları, rejenerasyon olan bitkilerin ploidi seviyelerini analiz etmek için basit ve güvenli bir yöntem olarak bulunmuştur. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmalarında kendine döllenmeyi takiben spontane diploidlerin double haploid oldukları doğrulanmışlardır. Ayrıca anter kültüründen elde edilen haploid ve double haploid bitkilerin heterosis ıslahı için değerli ıslah materyalleri olabileceklerini vurgulamışlardır.

Rodeva vd. (2004) çalışmalarında 16 Bulgar biber genotipinin anterlerinin *in vitro*'da kültüre alınmasının reaksiyonlarındaki genotipe dayalı farklılıkları araştırmayı ve karşılaştırmayı hedeflemişlerdir. Çalışmalarında materyal olarak farklı genotiplerden

6 hat, 6 çeşit ve 4 hibrit kullanmışlardır. Anterler hem direkt embriyogenesis hem de kallus oluşumu göstermiştir. Sadece 2 genotip (1 hat, 1 çeşit) indirekt organogenesis göstermiştir. Sonuçlar hatların, çeşitlerin ve hibritlerin anterlerinin çok yakın tepkiler verdiklerini göstermiştir ancak en yüksek oranda çeşitlerden tepki alınmıştır. Kallus oluşumu açısından da materyalleri değerlendirdiklerinde aynı şekilde birbirine yakın değerler gözlemlemişlerdir. İndirekt organogenesis bakımından ise hat ve çeşit arasında anter kültürüne tepki bakımından eşitlik söz konusu olduğunu belirtmişlerdir.

Taşkın vd. (2011) 5 biber genotipi ve 4 farklı besin ortamı kullanarak embriyo üretiminin frekansını optimize etmek için anterleri farklı periyotlarda kültüre aldıkları bir çalışma yapmışlardır. Oluşan embriyoları ise mevcut buldukları ortamda gelişmeyecekleri için 0.5 mg/l ABA içeren ortamda 10 gün bekletmişlerdir. Çalışmaların sonucunda ise embriyo gelişiminin genotipe, anterlerin kültüre alınma periyoduna ve besin ortamına göre değiştiğini belirtmişlerdir. En çok embriyo oluşumu düşük sıcaklıklara tolerat olan genotipten elde etmişlerdir. Periyot olarak ise Nisan ayından Mayıs ayna kadar alınan anterlerden en yüksek verim elde edilmiştir. En çok embriyoyu birinci olarak 4 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 15 mg/l AgNO<sub>3</sub>, 30 g/l sükroz ve %0.25 aktif kömür ilave ettikleri MS ortamından; ikinci olarak 4 mg/l NAA, 0.1 mg/l BAP, 0.5 mg/l ABA, 15 g/l AgNO<sub>3</sub> ve %0.25 aktif kömür ilave ettikleri MS ortamından elde etmişlerdir. Araştırmacılar olgun embriyolar üzerinde absisik asitin hiçbir pozitif etkisinin olmadığını da belirtmişlerdir.

Koleva, Gudeva vd. (2007) çalışmalarında elde edilen androgenik bitkilerin sıklığının büyük bir oranda genotipe dayalı olduğunu ve buna bağlı olarak haploid bitki oranının düşük olmasının biber ıslahında anter kültürünün kullanımını sınırladığı görüşünü belirtmişlerdir. Çalışmalarında 19 biber genotipinin *in vitro* anter kültüründe androgenesis başlatımının etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışmalarında haploid ve diploid bitki rejenerantlarının çalışması için etkili bir *in vitro* tekniğinin kurulmasını, biber anter kültüründe embriyogenesisin başlatılmasını, embriyoların rejenerantlara gelişimini, bu rejenerantların sağlıklı bir şekilde steril koşullardan sera koşullarında adaptasyonunu ve alıştırılmasını hedeflemişlerdir. Anterleri Dumas de Vaulx vd. (1981) tarafından geliştirilmiş metoda göre kültüre almış, 35°C sıcaklıkta ve 8 gün karanlıkta ön uygulamaya tabi tutmuşlardır. Denemeler, androgenesis sürecinin etkinliğinde anter kültürünün sürdürülmesinin genotipe ve kültür koşullarına dayandığını göstermiştir. Test edilen 19 genotipten 12 tanesi embriyo oluşturma yeteneği göstermiştir. Bunların 2 tanesi iyi, 4 tanesi ortalama ve 6 tanesi zayıf androgenik potansiyele sahipken kalan 7 genotip ise androgenik potansiyele sahip değildir. Direkt embriyogenesis bitkiciklere dönüşen embriyoların oluşumu ile sonuçlanmıştır. Rejenerantların başarılı bir şekilde dış ortama alıştırılmasından sonra ilk olarak dış ve sonra sera koşullarında 4 genotipten tohum toplanmıştır. Araştırmalar sonuç olarak elde edilen bu tohumların sonraki ıslah süreçleri, sitogenetik ve diğer moleküler düzeyde araştırmalar için mükemmel imkanlar sağlayacağını belirtmişlerdir.

Nowaczyk vd. (2009) biber F2 hibrit generasyonunun (ATZ1 x PO ve ATZ1 x CDT) ve iki adet türler arası hibritin (*C. frutescens* x *C. annuum* ATM1 ve *C. frutescens* x *C. chinense*) anter kültürü tekniğinde androgenesis koşullarında ayrı ayrı bitki reaksiyonunu değerlendirmiştir. Bu çalışmalarını Dumas de Vaulx vd. (1981) tarafından modifiye edilen metodu takiben sürdürmüşlerdir. Araştırmacılara göre, hem biber hibrit



formlarının hem de test edilen bütün genotiplerin ayrı ayrı bireyleri arasındaki androgenesis etkinliğinde oldukça açık farklılıklar vardır. Androjenetik embriyo gelişiminin en yüksek etkinliğini *C. annuum* (ATZ1 x PO) F2'nin kültüre alınan tipinde gözlemlemişlerdir. İkinci *C. annuum* hibriti olan (ATZ1 x CDT) F2'nin kültürlerinde neredeyse 3 kat daha az embriyo ve bitki üretilirken, bu hibritin bitkilerinin anterleri %5'den daha yüksek oranda embriyo üretmiştir. Türler arası hibritlerin anterlerinden çok daha düşük sayıda embriyo oluşmuştur. Araştırmacılar *C. frutescens* x *C. chinense* F2 androjenik embriyolarını iki bitkinin anterlerinden elde ederken, *C. frutescens* x *C. annuum* ATM1 F2'lerinin 5 hibrit bitkisi için pozitif reaksiyon kaydetmişlerdir. Bu bitkilerin yalnızca bir tanesi androgenesis etkinliği bakımından %5'i aşmıştır. Araştırmacılar rejenerantların ploidi seviyelerini flow sitometri yöntemi ile belirlemişler ve rejenerantlar arasında haploidlerle birlikte diploid bitkiler de gözlemlemişlerdir.

Ata vd. (2011) yaptıkları çalışmada üç farklı genotip ve bir adet tescilli çeşit kullanarak, bu dört farklı biber genotipin en yüksek embriyo oluşturma oranları ve bu embriyoların bitkilere dönüşüm oranını belirlemek için anterleri mevsimsel olarak farklı zaman ve aylarda kültüre almışlardır. Araştırmalarında I nolu (MS + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür+ 15 mg/l AgNO<sub>3</sub> + 4 mg/l NAA + 0.1mg/l BAP) ve II nolu (MS + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO<sub>3</sub> + 4 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP) olmak üzere iki adet modifiye edilmiş MS ortamına her ay kültüre alma işlemi yapmışlardır. Yaptıkları araştırmada yüksek sıcaklığa dayanıklı İnan 3363 çeşidinin Mart, Mayıs, Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım aylarında en yüksek oranda embriyo oluşturan genotip olduğunu ve Aralık ayında özellikle düşük sıcaklıklara dayanıklı 421 nolu genotipin en yüksek oranda embriyo oluşturan genotip olduğunu gözlemlemişlerdir. Kullandıkları tüm genotiplerde Nisan ayında embriyoların en yüksek oranda bitkilere dönüştüklerini gözlemlemişlerdir. Sürgün gelişiminin, bitkilerin içsel oksin seviyelerinin daha az ve sıcaklığın daha düşük olduğu Kasım, Aralık, Ocak, Nisan ve Eylül aylarında I nolu besin ortamının; sürgün gelişiminin, bitkilerin içsel oksin seviyelerinin daha çok ve sıcaklığın daha yüksek olduğu Ekim, Mart, Mayıs, Temmuz ve Ağustos aylarında II nolu besin ortamının daha başarılı olduğunu kaydetmişlerdir. Denemelerinde ayrıca haploid embriyo uyartımı ve bitkiye dönüşümün sağlanabilmesi için genotiplerin iklim isteklerine uygun bir zamanda kültür çalışmasının yapılması gerektiği sonucuna varmışlardır.

Al Remi vd. (2013) yaptıkları çalışmada B ıslah hattı, 151 No'lu Çankırı biberi olarak bilinen genotip, 171 (Yağlık biber) No'lu genotip ve Suriye'nin ticari bir biber çeşidi olan Alfajer'I materyal olarak kullanmışlardır. Bu genotiplerden elde ettikleri anterleri farklı miktarlarda aktif kömür ve gümüş nitrat ekledikleri sabit olarak 30 g/l sakkaroz + 4 mg/l NAA + 1 mg/l BAP içeren MS (1962); 30 g/l sakkaroz + 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l kinetin içeren Dumas de Vault (1981) ve 30 g/l sakkaroz + 0,01 mg/l 2,4-D + 0,01 mg/l kinetin içeren Dumas de Vault (1981) ortamlarında kültüre alarak genotiplerin bu iki ortamda aktif kömür ve gümüş nitrat yoğunluklarına verdikleri tepkileri gözlemlemişlerdir. Bulgularında anter kültüründe kullanılan oksin + sitokinin cins ve dengesinin büyük önem taşıdığını, bunların etkilerinin çalışılan tür, genotip ve besin ortamına göre değişebileceğini belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda androjenik embriyo oluşumu üzerine en olumlu etkiye sahip ortamın 4 mg/l NAA + 1 mg/l BAP içeren MS ortamı olduğunu ve bu ortama aktif kömür + gümüş nitrat ilave ettiklerinde bazı genotiplerde düşüş, bazılarında ise artışlar elde etmişlerdir. Besin ortamı ve aktif

kömür + gümüş nitrat ilavesine verilen tepkinin tamamen genotype bağlı olduğunu, yaptıkları çalışma kapsamında genel bir değerlendirmenin yapılamayacağını ve denemelerinde kullandıkları faktörlerin tek başlarına değil interaksiyon kapsamında etki gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Pelliccione vd. (2013) Granada Üniversitesin’de yaptıkları çalışmada 14 farklı acı biber genotipinin anter kültürü ve klasik mikrospor kültürü tekniklerinde farklı ortam ve ön uygulamalara verdikleri tepkileri araştırmışlardır. Araştırmalarında Dumas de Vaulx (1981), MS ve NN ortamlarını kullanmışlardır. Ön uygulama olarak ayrı ayrı 35°C’de 8 gün, 35°C’de 7 gün, 31°C’de 7 gün, 31°C’de 3 gün ve 7°C’de 4 gün halinde denemeler kurmuşlardır. Çalışmalarında acı biber genotiplerinin anter ve mikrospor kültürü tekniklerinde en iyi embriyogenesis oranını sağlayacak uygulamaları optimize etmeyi amaçlamışlardır. Sonuç olarak her iki kültür tekniğinde de en elverişli ortamın NN ortamı olduğunu, NN bazlı kombinasyonlar arasında ise en yüksek oranda mikrospor embriyogenesisinin hiç büyüme düzenleyici eklenmemiş sade NN ortamı olduğunu belirtmişlerdir. Ön uygulamalar ile ilgili olarak anter kültürü tekniğinde kayda değer değişimler gözlemediklerini belirtirken, izole mikrospo kültürü tekniğinde olumlu etki gösterdiğini kaydetmişler ve bazı genotiplerde 35°C’de 7 gün, bazılarında ise 31°C’de 7 gün ön uygulamalarının en iyi sonuçları verdiğini kaydetmişlerdir. Tatlı biber genotipleri ile yaptıkları diğer anter kültürü denemelerinin sonuçları ile karşılaştırdıklarında, acı genotiplerin anterlerinde tatlı genotiplerden farklı şekilde çok daha fazla oksidayson meydana geldiğini, aktif kömür ilavesinin acı genotiplerde oksidasyonu önemli ölçüde azaltırken tatlı genotiplerde oluşan embriyo miktarını arttırdığını vurgulamışlardır. Denemede tüm sonuçlar göz önüne alındığında anter ve mikrospor kültürü tekniklerine en yakın acı biber genotipinin Serrano olduğunu bildirmişlerdir.

## 2.2. Mikrospor Kültürü Tekniği ile İlgili Kaynak Taramaları

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

Ellialtıoğlu vd. (2001) bildirdiğine göre, mikrospor kültürü ile ilk haploid bitki 1974 yılında elde Nitsch tarafından elde edilirken, ilk mikrospor kültürü çalışmaları ise 1989 yılında Pesticelli ve arkadaşları tarafından tütün (*Nicotiana tabacum*) ve mısır (*Zea mays*) bitkilerinde gerçekleştirilmiştir.

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

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

Yin vd. (2010) çalışmalarında biber anterinden izole edilen mikrosporların kültüründe embriyoid başlatımını ilerletmek için bir sistem geliştirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda ise düşük sıcaklık ön uygulaması, bitki büyüme düzenleyicilerin kombinasyonları, aktif karbon konsantrasyonları ve sıcaklık ön uygulamalarının *in vitro* koşullarda izole edilen biber mikrosporlarının embriyoid oluşumunu etkileyen klasik kritik faktörler olduğunu göstermişlerdir. Bir gün boyunca 4°C’de tomurcukların ön uygulamasından sonra farklılaşan ve embriyoya dönüşen anterleri bir hafta boyunca 7°C’de çift katmanlı ortam sisteminde kültüre almışlar ve sonrasında 28°C’de karanlıkta kültüre devam etmişlerdir. Bir hafta boyunca 28°C’de karanlıkta kültüre alınan tek çekirdekli aşamadaki mikrosporların bazıları birkaç bölünmüş ve araştırmacılar 2-3 hafta sonra gelişimlerinin farklı aşamalarında olan embriyoidleri tespit etmişlerdir. Çalışmalarında kullanılan 7 genotipteki embriyoid oluşum oranlarının %9.44 ile %81.11’e kadar değiştiğini görülmüştür. Kotiledon embriyoidleri seçerek katı ortama almışlar 4000-5000 lux ışıktaki birkaç gün kültüre almışlardır. Sonrasında bu embriyoların çoğu normal gelişim göstererek normal bitkiler oluşturmuştur. Çiçek tomurcuklarına 4 °C’de 1, 2, 3 ve 4 gün ön uygulama denemişler ve sonrasında 28°C’de kültüre devam etmişlerdir. Bunun sonucunda embriyoid oluşu oranında düşüş olduğunu ve kontrolde %57 olan oranın 4. güne kadar %45.37’ye kadar indiğini görmüşlerdir. Buna dayanarak biberde çiçek tomurcukları için 4°C’de uygulama periyodunun ilk 24 saat olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda mikrosporları sürekli 28°C’de kültüre alınması yerine, bir hafta boyunca yüksek ya da düşük sıcaklıkta inkübe etmenin daha yüksek oranda embriyoid oluşumunu teşvik ettiğini ve düşük sıcaklık uygulamalarının, genellikle daha iyi sonuç verdiğini, hatta bu çalışmalarında 7°C’nin en yüksek oranda embriyoid oluşumu sağladığını belirtmişlerdir. Test edilen 7 biber genotipi bu protokole cevap vermiştir. En iyi tepki veren genotipin embriyoid oluşum oranı %81.11’den %147.22’ye kadar artmıştır. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara dayanarak, geliştirdikleri bu protokolün biber ıslahı için double haploid bitkileri üretmek için potansiyel bir araç olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Lantos vd. (2009) üç Macar ve üç İspanyol biber genotipinin izole edilen biber mikrospor kültüründe androgenesis başlatımının etkinliği üzerine mikrospor gelişim aşamasının etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında, %80 tek çekirdekli ve %20 çift çekirdekli mikrosporları ihtiva eden anterler, başarılı bir mikrospor kültürünün en yüksek verimini vermiştir. Kültür ortamlarına biber ve buğday ovaryumlarını eklemişler ve buğday ovaryumları ile yapılan ko-kültürlerde, biber ovaryumları ile yapılanlardan daha fazla embriyo elde etmişlerdir. Çalışmada izole edilen mikrospor kültürlerinin başlatımı sırasında olan etkinliğindeki farklılıkları, farklı biber genotiplerinde gözlemlenmiştir. Yeşil bitkicikler mikrospor türevli embriyoidlerden rejenere olmuşlardır, ancak bunlardan bazıları yapraklarının rozetleşmesi gibi anormal gelişimler göstermiştir. Sonuç olarak araştırmada 6 adet İspanyol ve 1 adet Macar genotipinden mikrospor türevli 7 adet bitki elde etmişlerdir.

Lantos vd. (2012) biber F1 hibrit genotiplerinde izole edilmiş mikrospor kültürü deneylerini uygulamışlardır. İlk denemelerinde iki genotiple mikrospor türevli yapıların oluşumunu başlatmadaki etkinliğini test etmek için dört farklı besin ortamını (W14, B5, MS ve NLN) karşılaştırmışlardır. İkinci denemelerinde iki genotipte B5 besin ortamında 2,4-D (0, 0.1, 0.2 ve 0.5 mg/l) ve kinetinin (0, 0.2 ve 0.5 mg/l) farklı oranlarının etkilerini araştırmışlardır. Ayrıca bitki büyüme düzenleyicilerin mikrospor kültüründe kallus ve

embriyo oluşuma etkisini araştırmışlardır. Çalışmada en olumlu sonuçları her iki genotipte de en fazla bitkicik oluşumu ile 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l kinetin kombinasyonu vermiştir. En iyi temel besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerin kombinasyonu ile test edilen her biber genotipinin tepkisi androgenesis başlatımında başarılı olmuştur. Genotipe bağlı olarak yeşil bitkiciklerin sayısı her bir petrideki bitkicik sayısı olarak 0 ile 8 arasında (Ortalama 1.5 bitkicik/petri) değişirken, embriyo benzeri yapıların sayısı petri başına 20 ile 100 arasında değişmektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre her iki genotipte de B5 ve W14 ortamlarında en fazla mikrospor türevli yapıları ve en iyi sonuçları elde etmişlerdir. İkinci denemede ise mikrospor türevli embriyo benzeri yapılar, kalluslar, kallusların ve embriyo benzeri yapıların oranı, oluşan bitkiciklerin sayısında bitki büyüme düzenleyicilerin ve kombinasyonlarının etkisi hakkında veri toplamışlardır. Bu verilerin istatistiksel analizlerine göre bitki büyüme düzenleyicilerin mikrospor kültürünün etkinliği üzerinde ve mikrospor türevli yapıların kalite ve kantitesi üzerinde mutlak bir etkiye sahip olmasına rağmen, androgenesis başlatımı için gerekli olmadığı sonucuna varmışlardır. En yüksek bitkicik oluşum oranının ise 0.1 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l kinetin kombinasyonunda olduğunu ortaya koymuşlardır.

Kim vd. (2008) araştırmalarında biberin izole edilen mikrosporlarının kültüründe embriyo üretiminin ve bitki rejenerasyonunun yüksek frekansını belirtmişlerdir. Modifiye ettikleri NLN ortamında mikrosporlar bölünmüş ve embriyolar oluşturmuştur. Kültürün başından 3 hafta sonra kalp ve globüler embriyolar gözlemlenmişler ve 4. hafta sonrasında bunların kotiledonlu aşamaya ulaştığını görmüşlerdir. Bu kotiledon embriyolar katı B5 ortamına alındıktan sonra bitkicikler gelişmiştir. Aynı zamanda ön uygulama ortamı, karbon kaynağı ve kültür yoğunluğu değiştirilerek embriyo üretimi için şartları optimize etmişlerdir. Sükroz açlık ortamında sıcak şoku uygulamasının, B5 besi ortamındakinden daha etkili olduğunu görmüşlerdir. Karbon kaynağı olarak sükroz ve maltozu direkt olarak karşılaştırmış ve sükrozun maltoza üstünlüğünü gözlemlemiş, en yüksek embriyo oluşum oranı %9 olarak sükrozun varlığında gözlemlemişlerdir. Ayrıca mikrospor ekim yoğunluğunun embriyonik başlatım ve gelişim etkinliği için büyük öneme sahip olduğunu ve optimal ekim yoğunluğunun  $8 \times 10^4 - 10 \times 10^4$ /ml olmasının iyi olacağını bildirmişlerdir. Araştırmacılar kendilerinin optimize ettikleri bu koşullarda, her petride  $10 \times 10^4$  yoğunluğundaki mikrosporlar olgunlaştığında 54'ten fazlası sayıda embriyoyu ve ortalama 5.5 adet kotiledon aşamasında embriyo gözlemlemişlerdir.

Bal vd. (2003) çalışmalarında izole mikrospor kültürü tekniği ile biber bitkisinde androgenesis sınırlı kapsamda incelemişlerdir. Donör olarak double haploid bir genotip seçmişlerdir. Erken tek çekirdekli, geç tek çekirdekliye kadar olan aşamalarda mikrosporları ihtiva eden açılmamış çiçek tomurcuklarını hem 10°C'de hem de 35°C'de 7 gün boyunca mannitol ortamında ön uygulamaya tabi tutmuşlardır. Çalışmalarında yüksek sıcaklık uygulamasını denemişler, biberde anter kültüründeki etkinliğine rağmen yüksek sıcaklığın zararlı olduğuna karar vermişler ve bu uygulamaya tabi tutulan çiçek tomurcuklarını kullanmamışlardır. 10°C'de ön uygulamadan sonra mikrosporları izole edip NLN ortamında kültüre almışlardır. Mikrospora 100, 130 ve 170 g/l sükrozla ozmotik basınç dengesi ve karbon sağlamışlardır. Sadece 170 g/l sükroz içeren kültür gelişime devam etmiş ve diğerleri kontamine olmuştur. Araştırmacılar 30. ve 60. günlerde sırasıyla %40.5 ve %67 oranlarında kallus kolonileri elde etmişlerdir. Bu kallus kolonilerini 1 ve 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında alt kültüre almışlar ancak daha ileri bir gelişme elde edememişlerdir.

### 2.3. Shed-Mikrospor Kültürü Tekniği ile İlgili Kaynak Taramaları

Supena vd. (2006) Endonezya'nın acı biber genotipleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında anter ve mikrospor kültür tekniklerine ek olarak daha etkili bir şekilde double haploid üretilebilen yeni bir protokol üretmeyi amaçlamışlardır. Çalışmalarında %50 oranında geç tek çekirdekli evredeki mikrosporları ihtiva eden anterlerin fiziksel özelliklerini belirlemiş ve bu anterleri materyal olarak kullanmışlardır. Çiçek tomurcuklarını ilk olarak bir gün boyunca 4°C'de soğuk stresine maruz bırakmışlar ve sonrasında 1 hafta boyunca 9°C sıcaklıkta inkübe etmişlerdir. Ön uygulamalardan sonra kültürleri 28°C'de tam karanlık koşullarda büyümeye almışlardır. Besin ortamı olarak ilk katmanı katı, ikinci katmanı sıvı NN ortamı kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda kontrol gruplarına göre 4°C'de soğuk uygulamasından sonra 9°C'ye bir hafta alınan kültür çok daha fazla embriyo oluşturduğunu; ayrıca katı ortama eklenen %0-2 oranında aktif kömürün istatistiksel olarak embriyo sayısını arttırdığını ve %2'den yüksek oranlarda embriyo sayısının düştüğünü tespit etmişlerdir. Araştırmalarından farklı aktif kömür, sıvı ortama eklenen farklı bitki büyüme düzenleyiciler ve farklı ön sıcaklık uygulamalarından elde ettikleri sonuçlara göre: %1 oranında aktif kömür içeriği, 1 gün 4°C'yi takiben 1 hafta 9°C ön uygulaması ve sıvı ortama 2.5 µM zeatin ile 5 µM IAA eklenmesinin optimum sonuçları vereceğini öngörmüşlerdir. Toplamda 6 farklı acı biber çeşidinden 168 adet bitkiciğin 104 tanesinin haploid, 61 tanesinin diploid, 2 tanesinin triploid ve 1 tanesinin tetraploid olduğunu belirtmişlerdir..

Supena vd. (2006) başka bir araştırmalarında bazı anter ve mikrospor kültürü denemelerinde acı biber genotiplerinde karşı karşıya kaldıkları donör bitkilerden kaynaklanan enfeksiyonları önlemek ve farklı antibiyotiklerin fitotoksik etkilerini araştırmak için Shed-Mikrospor kültürü tekniği ile antibiyotik kombinasyonlarının etkisi araştırmışlardır. Araştırmalarında kendilerinin optimize ettikleri %1 oranında aktif kömür içeriği, 1 gün 4°C'yi takiben 1 hafta 9°C ön uygulaması ve sıvı ortama 2.5 µM zeatin ile 5 µM IAA eklenmesi protokolünü kullanmış, buna ek olarak sıvı ortama 4 farklı antibiyotik kombinasyonu kullanmışlardır. Kontrol gruplarında %100 oranında enfeksiyon gözlenen Gada, Prabu ve Marathon çeşitlerine 1) 20 mg/l Rifampisin, 2) 100 mg/l Timentin, 3) 10 mg/l Rifampisin + 50 mg/l Timentin, 4) 20 mg/l Rifampisin + 100 mg/l Timentin olmak üzere 4 farklı kombinasyon uygulamışlardır. Bunlardan sırasıyla 1) %64, 2) %27, 3) %73, 4) %82 oranla enfeksiyonsuz ve tamamen sağlıklı embriyolar bulunan petripler elde etmişlerdir. Buna ek olarak çalışmalarında flow-sitometri ve yaprak stomasında kloroplast sayımı ile yöntemleri ile ploidi seviyelerinin belirlenmesi üzerinde çalışmışlardır. Sonuç olarak Shed-Mikrospor kültürü tekniği ile üretilen bitkiciklerin flow-sitometri ve yaprak stomasında kloplast sayımı ile ploidi seviyelerinin %100 doğru ve çok kolay belirlendiğini, donör bitkiden kaynaklı enfeksiyonlara karşı ise en uygun antibiyotik kombinasyonunun 20 mg/l Rifampisin + 100 mg/l Timentin olduğunu belirlemişlerdir.

Supena vd. (2011) çalışmalarında Shed-Mikrospor kültürü ile Endonezya'nın acı biber genotiplerinde oluşan normal embriyo sayısı ile embriyoların kalitesini arttırmayı amaçlamışlardır. Bu amaç doğrultusunda %1 oranında aktif kömür içeriği, 1 gün 4°C'yi takiben 1 hafta 9°C ön uygulaması, sonrasında 28°C'de tam karanlık ve sıvı ortama 2.5 µM zeatin ile 5 µM IAA eklenmesi protokolüne ek olarak 5 farklı bitki büyüme düzenleyici içeriği denemesi ve 4 farklı sıcaklıkta büyüme koşulunu daha denemişlerdir.

Elde ettikleri sonuçlara göre sıvı ortama bitki büyüme düzenleyici olarak kültürün üçüncü haftasında 50 ve 100  $\mu\text{M}$  ekledikleri petrilere toplam embriyo sayısı ve kalitesi gözle görülür şekilde azalmıştır (Anormal embriyo sayısı büyük ölçüde artmıştır). Buna ek olarak 2.5  $\mu\text{M}$  zeatin + 5  $\mu\text{M}$  IAA bileşiminde 6 anter başına 35.3 adet, büyüme düzenleyici eklemedikleri kültürlerde 24.7 adet, sadece 2.5  $\mu\text{M}$  zeatin ile 27.3 adet ve sadece 5  $\mu\text{M}$  18.4 adet normal embriyo elde etmişlerdir. Farklı sıcaklık koşulları üzerine yaptıkları denemelerde ise sonuç olarak 6 anter başına ortalama 28°C sıcaklıkta 20.6 adet, 25°C sıcaklıkta 20.2 adet, 23°C sıcaklıkta 19.5 adet, 21°C sıcaklıkta 17.1 adet ve 18°C sıcaklıkta 7.5 adet normal embriyo elde etmişlerdir. Sonuç olarak normal embriyo oluşturması bakımından en elverişli bitki büyüme düzenleyici uygulamasının sıvı katmanda 2.5  $\mu\text{M}$  zeatin + 5  $\mu\text{M}$  IAA birleşimi olduğunu ve normal embriyo oluşumu için en uygun sıcaklığın 28°C olduğunu belirtmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE METOT

Araştırma için gerekli bitki materyali Kuzey Agripark Bitkisel Araştırma ve Biyolojik Mücadele firması tarafından yetiştirilen biber bitkilerinden sağlanmıştır. Araştırmada yer alan doku kültürü çalışmaları ise Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü doku kültürü laboratuvarında 2015-2017 yılları arasında yapılmıştır.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitkisel materyal

Mikrosporlardan gelişen embriyo oranı, türlere ve tür içinde de genotiplere göre değişiklik gösterir. Şimdiye dek çalışılmış olan tüm bitki türlerinde; aynı kültür koşulları altında, anter ve mikrospor yanıtları bakımından genotipler arasında büyük farklılıklar bulunmuştur.

Araştırmada bitkisel materyal olarak farklı genetik ilerleme seviyesindeki biber bitkisi için; çeşit olarak ilkbahar ve sonbaharda serada yetiştirilen sivri, dolmalık ve kapyra olmak üzere 3 farklı genotipe ait birer adet çeşit kullanılmıştır. Bu genotiplerden ilki dolmalık biber, çeşidi Benino F1; ikincisi kapyra biber, çeşidi Bellisa F1; üçüncüsü ise sivri biber genotipi olup, çeşidi Filinta F1'dir.

##### 3.1.2 Araştırmada kullanılan çeşitlerin özellikleri

**Benino F1:** Yüksek meyve tutumu (High Yielding), güçlü ve gür bitki yapısı, kış aylarında yüksek performans ve soğuğa dayanım, uzun raf ömrü (Long Shelf Life) ve erkencilik özellikleri ile ek olarak meyve şekli ve renginin de mükemmel olması nedeniyle piyasada ticari değeri olan bir dolmalık biber çeşididir.

Dolmalık bir çeşit olması dolayısı ile çiçek tomurcuğu ve anterlerinin büyük olması kültüre alma işlemleri gerçekleştirilirken büyük kolaylık sağlamıştır.

**Bellisa F1:** Yüksek meyve tutumu (High Yielding), güçlü ve gür bitki yapısı, kış aylarında yüksek performans ve soğuğa dayanım, raf ömrü uzun (Long Shelf Life) ve erkenci, hem yeşil hem kırmızı meyve hasatına uygun bir çeşittir.

Çiçek burnu çürüklüğüne, meyvede oluşan çatlamalara yüksek toleranslı olması ve donanımlı çeşit özellikleri nedeniyle piyasada ticari değeri olan bir kapyra biber çeşididir.

**Filinta F1:** Çok ince kabuklu, gevrek, parlak renkli ve uzun meyve yapısı ile %100 tatlılık oranına sahip ve kış aylarına yüksek dayanımı olan bir sofralık sivri biber çeşididir.

Kök ve yaprak hastalıklarına, TMV, ToMV ve TMGMV gibi virüslere dayanıklı olması nedeniyle özellikle sofralık biber ihtiyacı karşılamak ve ilaçlama maliyetlerini azaltmak amacı ile kullanılabilir bir sivri biber çeşididir.

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Dönör bitkilerin yetiştirme koşulları

Büyükalaca vd. (2004) yaptıkları bir çalışmaya göre sera koşullarında yetiştirilen donör bitkilerin, üzeri açık şekilde yetiştirilen donör bitkilere göre daha yüksek embriyo uyartımı oranlarına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan her üç çeşitten donör bitkiler sera koşullarında yetiştirilmiştir.

Çeşitlere ait F1 tohumlar fide yetiştirme serasında 2:1 oranında torf + perlit karışımı harç kullanılarak her çeşitten 60'ar adet tohum olacak şekilde ekilmiştir. Fideler 6-7 gerçek yaprak oluşturdıkları dönemde 50x70 cm aralıklar ile her çeşitten 30'ar adet bitki olacak şekilde hazırlıkları yapılarak ayrılmış 6 metre yüksekliğindeki polietilen seraya dikilmiştir. Farklı zamanlarda yapılan mikrospor gelişim aşamalarının belirlenmesi ve kültüre alma işlemleri için aynı şekilde, aynı serada, aynı sayıda olacak şekilde farklı zamanlarda ekim ve dikim işlemleri yapılmış, bitkiler yetiştirilmiştir.

Çalışmanın her safhasında kullanılmış tüm biber bitkilerinin periyodik kontrol ve gözlemleri yapılmıştır. Dönör bitkiden kaynaklı enfeksiyonlara karşı önlem olarak firmanın kendi ıslah parsellerindeki biber bitkileri ile aynı zamanda ilaçlanmış, gerekli bakım ve bitki besleme işlemleri yapılmıştır.

**Çizelge 3.1.** Bitkilerin yetiştirilme ve tomurcuk alma tarihleri

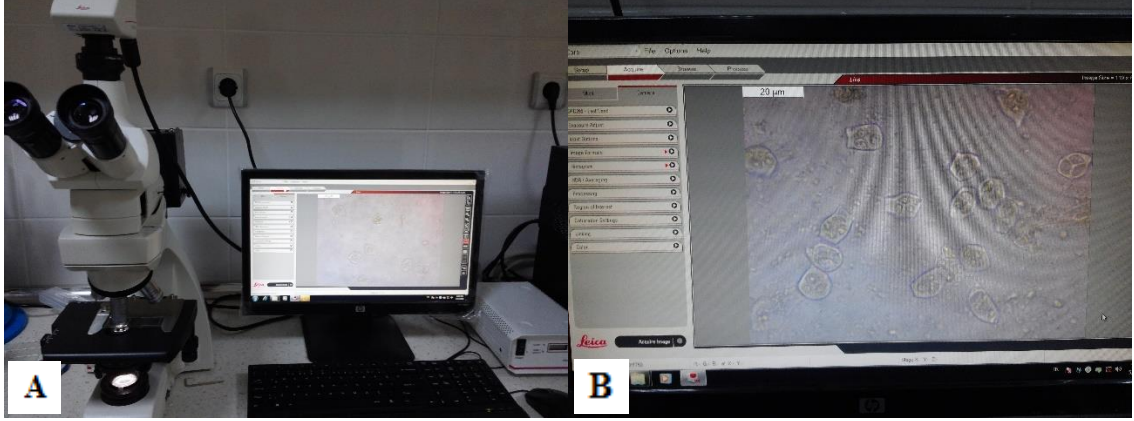
	<b>Tohum ekimi</b>	<b>Fide dikimi</b>	<b>Tomurcuk alma zamanı</b>
<b>Mikrospor gelişim aşamalarının belirlenmesi</b>	01/05/2015	07/06/2015	Temmuz 2015 Ağustos 2015
<b>Kültüre alma işlemleri ve denemelerin kurulması</b>	28/02/2016	02/04/2016	Mayıs 2016 Haziran 2016

#### 3.2.1. Genel laboratuvar ekipmanı ve işlemleri

Araştırmada besi ortamlarının hazırlanmasında 500 ml'lik cam beher kaplar, mezürler, manyetik karıştırıcı ve pH metre kullanılmıştır. Katı ortam sterilizasyonu için 500 mL'lik otoklav şişeleri ve otoklav; sıvı ortam sterilizasyonu için tek kullanımlık 24 mikron düzeyinde mikron filtreli sıvı ortam kapları kullanılmıştır. Karışım olarak hazırlanan katı ortamlar 500 ml'lik cam beherler içerisinde sterilize edilmek üzere 20 dakika süresince 121°C'de 1.2 kg/cm<sup>2</sup> basınç altında otoklavlanmışlardır.

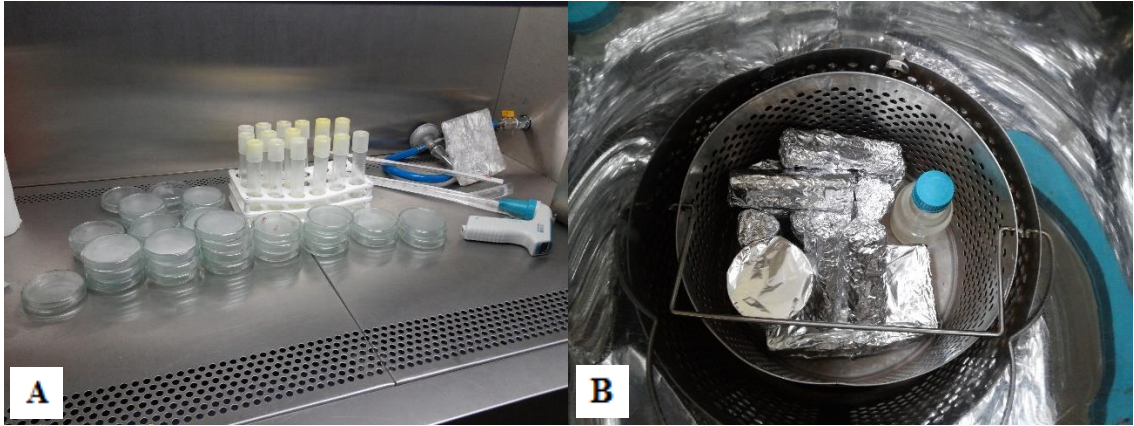


Mikrospor gelişim aşamalarının belirlenmesinde lam, lamel, distile su ve kameralı binoküler laboratuvar mikroskobu kullanılmıştır. Yapılan gözlem ve kaydedilen görüntüler kameralı mikroskop ile entegre çalışan laboratuvar bilgisayarına kaydedilmiştir.



**Şekil 3.1.** A) Entegre bilgisayar sistemi; B) sistemde görülen tetradlar

Kültüre alma işlemleri steril kabinler (HEPA Filter Hood) içerisinde yapılmıştır. Bu işlemlerden önce steril kabin önce %70'lik alkol çözeltisi ile silinip sonrasında ise 20 dakika boyunca UV ışık altında tutulularak steril edilmişlerdir. Bu işlemden sonra aynı UV sterilizasyonuna steril kabin içerisinde kullanılacak diğer ekipmanlar için de uygulanmıştır.



**Şekil 3.2.** A) Kültür kapları ve sıvı ortam enjeksiyon tabancası; B) Otoklav içerisindeki besi ortamı ve laboratuvar ekipmanı

Mikrospor kültür tekniğinin uygulanışı sırasında 60 mm çapındaki cam petri kapları, embriyoları çimlendirmek için 100 mm çapında cam petri kapları ve oluşan bitkiciklerin en son aktarıldığı 140 mm derinliğe ve 20 mm genişliğindeki cam laboratuvar tüpleri kullanılmıştır. 15 cm uzunluğundaki pensler, 10 numara bistüriler, 3 numara bistüri sapları ve bunların kültüre alma işlemleri esnasında dezenfeksiyonlarını sağlamak için sıcak cam boncuk sterilizatör kullanılmıştır. Yine bu petri kapları, pens ve bistüriler steril kabin içerisinde kullanılmadan önce 20 dakika süresince 121°C'de 1.2

kg/cm<sup>2</sup> basınç altında otoklavlanmışlardır. Kültüre alma işlemi tamamlanan petrilerin sıvı ortamlarını eklemek için sıvı ortam enjeksiyon tabancası ve son olarak hava almamalarını sağlamak için parafin kullanılmıştır.

### 3.2.2. Çiçek tomurcuklarının toplanması

Araştırmada kullanılmak üzere çiçek tomurcuklarının alınacağı donör bitkiler ısıtma sistemi olan polietilen seralarda yetiştirilmiştir. Çiçek tomurcukları çiçeklenme döneminin başından itibaren toplanmış olup, kültür denemeleri bitkiler büyümelerini tamamlamadan önce güz ve bahar dönemlerinde kurulmuştur.

Mikrospor kültürü uygulamasının başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri çiçek tomurcuklarının uygun dönemdeyken toplanmasıdır. Daha önce tek çekirdekli mikrosporları ihtiva eden biber anterlerinin petallerin sepallerden biraz daha kısa veya sepal ve petallerin aynı boyda olan tomurcuklar içerisindeki %10-40 renklenme (Antosiyanın) gösteren tomurcuklar olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 3.3.** Sabah erken saatte toplanılmış çiçek tomurcuklarının termal kap içerisindeki bir görünümü

Araştırmada kullanılan bütün çiçek tomurcukları sabah 05.30 ile 07.00 saatleri arasında 50 ml hacmindeki plastik laboratuvar tüpleri içerisine toplanmış ve laboratuvara getirilene kadar serin ve canlı kalmaları için ısı yalıtkan bir kap içerisinde soğutucu jel ile muhafaza edilmişlerdir.

Kültüre alınan ve mikrospor gelişim aşamalarının belirlenmesi işlemlerinde kullanılan tomurcuklar ayrı ayrı toplanıp işleme tabi tutulmuşlardır. Her ikisi de soğuk stresine maruz bırakılmış ve sabahın erken saatlerinde toplanmışlardır.

### 3.2.3. Tomurcukların sınıflandırılması

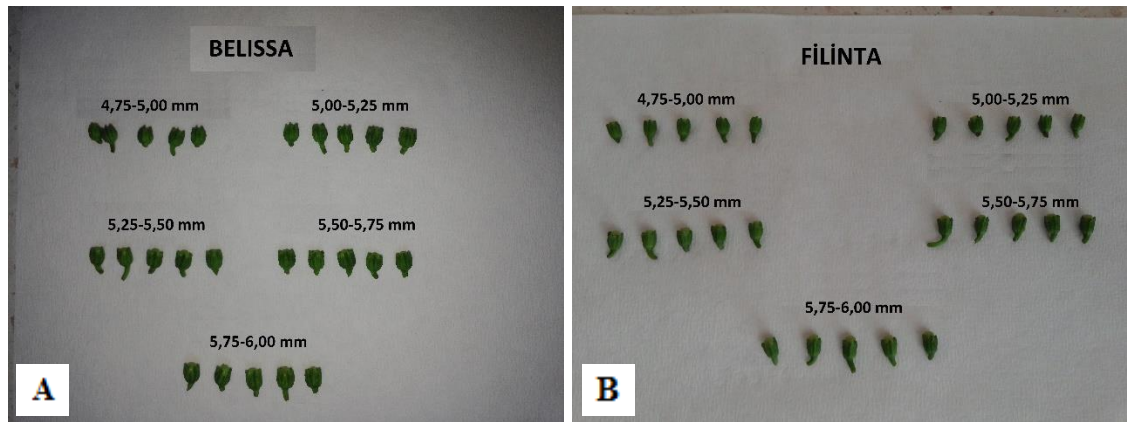
Mikrospor kültürü yoluyla haploid bitki elde etmede yapılması gereken ilk aşama, tek çekirdekli mikrosporları bulunduran tomurcukları seçebilmektir. Tek çekirdekli mikrosporları bulunduran tomurcukları seçebilmek için, her bir genotipte çiçeklenmenin başlamasından itibaren on farklı boy aralığındaki, her aralık için 5'er tomurcuk olmak üzere örnek alınarak tomurcuk uzunluğu, tomurcuk özellikleri (taç ve çanak yaprakların gelişim aşamaları ve anter rengine) göre sınıflandırılmıştır.

Araştırmada kullanılan her bir çeşitin tomurcuk şekil ve yapıları farklı olduğundan her biri için ayrı boy aralıkları belirlenmiştir. BENINO için 3.00-5.50 mm, tomurcukları daha uzun yapıda olan FİLİNTA ve BELLISA için 3.50-6.00 mm uzunluğunda tomurcuklar kullanılmış ve aralıklar tomurcuk boyu 0.25 mm artacak şekilde belirlenip, uygun tomurcuklar dijital kumpas ile tek tek ölçülerek seçilmiştir.

### 3.2.4. Mikrospor gelişim evrelerinin belirlenmesi

Mikrospor kültürünün başarıyla uygulanabilmesi için ilk ve en önemli konulardan birisi; anterlerin alındığı zamanda, içlerinde bulunan mikrosporların gelişme dönemidir. Birçok bitki türünde androgenesis için en elverişli mikrospor gelişim aşamalarının, mitoz bölünmeye başlamadan önceki dönem, mitoz bölünmenin gerçekleştiği aşama veya hemen bu aşamayı izleyen dönem olduğu belirtilmektedir (Sarıkamış vd. 2000). Bu amaçla morfolojik şekillerine ve büyüklüklerine göre sınıflandırılan tomurcukların anterlerindeki mevcut mikrosporların gelişim aşamalarını belirlemek amacıyla sitolojik gözlemler yapılmıştır ve mikrosporların içerisinde rahatça gözlemlenebildiği saf su kullanılmıştır.

Farklı büyüklükteki canlı tomurcuklardan alınan anterler lamlar üzerine yerleştirilerek mikrosporları serbest hale getirildikten sonra üzerine bir iki damla distile su damlatılarak floresan mikroskopu altında gözlem yapılmıştır. Her aralıktan uygun sayıda mikrospor sayılarak ortalamaları alınmış ve yüzdeler halinde anter boyları ile mikrospor gelişim aşamaları ilişkilendirilmiştir.



Şekil 3.4. A) Bellisa çeşidinin tomurcukları; B) Filinta çeşidinin tomurcukları

### 3.2.5. Ön soğuk stresi uygulaması

Tomurcuklar kültüre alınmadan önce anterlerindeki mikrosporların gelişim oranlarının artırılması ve daha fazla sayıda embriyo oluşturmaya teşvik edilmesi amacıyla 24 saat boyunca 4°C’de soğuk stresine tabi tutulmuşlardır.

### 3.2.6. Kültür ortamı ve ortam sterilizasyonu

Shed-mikrospor kültürü tekniği için çift katmanlı (Double layer) kültür ortamı kullanılmıştır. Bunlardan ilk katman olarak %2 maltoz, %1 aktif kömür, %0.6 agar eklenmiş katı NN ortamı kullanılmıştır. Hazır hale getirilen NN ortamı sterilizasyon için 500 mL’lik şişelerde otoklavlanmış ve kültüre alma işleminden önce petrilere dökülüp steril kabinde soğutulularak hazır hale getirilmiştir. Besi ortamının ikinci katmanı olarak %2 maltoz, 2.5 µM Zeatin ve 5 µM IAA eklenmiş sıvı NN ortamı kullanılmıştır. Bu sıvı ortamlar tek kullanımlık mikron filtreli kaplarda süzme işlemi ile sterilize edilmiştir (Supena vd. 2006). Kullanılan mikron filtreler bakteri ve fungus misellerinin geçemeyeceği 24 mikron hassaslığındadır.

**Çizelge 3.2.** NN besi ortamının temel içeriği

<b>I) Mikro Elementler</b>	<b>mg/l</b>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
FeNaEDTA	36.700
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.000
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	18.940
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.000
<b>II) Makro Elementler</b>	<b>mg/l</b>
CaCl <sub>2</sub>	166.000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68.000
KNO <sub>3</sub>	950.000
MgSO <sub>4</sub>	90.270
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	720.000

Araştırmada bitki büyüme düzenleyicilerin etkilerinin görülmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi için kontrol grupları da kurulmuştur. Bu kontrol gruplarında besi ortamı olarak yine çift katmanlı NN ortamı kullanılmıştır. İlk katman olarak %2 maltoz, %1 aktif kömür ve %0.6 agar eklenmiş katı NN ortamı ve ikinci katman olarak sadece %2 maltoz eklenmiş sıvı NN ortamı kullanılmıştır. Katı kontrol ortamı 250 mL’lik şişelerde otoklavlanmış ve kültüre alma işleminden önce petrilere dökülüp steril kabinde soğutulularak hazır hale getirilmiştir. Sıvı kontrol ortamı tek kullanımlık mikron filtreli kaplarda süzme işlemi ile sterilize edilmiştir.

Çift katmanlı besi ortamında mikrospordan oluşan embriyoları daha sonrasında çimlendirilmek için %0.6 agar eklenmiş MS ortamı kullanılmıştır. Aynı şekilde bu embriyolardan oluşan gerçek yaprak ve kök dokularına sahip bitkicikler de %0.6 agar eklenmiş katı MS ortamına alınmıştır. Bu ortamlar 500 mL’lik şişelerde otoklavlanarak

sterilize edilmiş ve kültüre alma işleminden önce petrilere dökülüp steril kabinde soğutulularak hazır hale getirilmiştir.

### Çizelge 3.2. MS besi ortamının temel içeriği

<b>I) Mikro Elementler</b>	<b>mg/l</b>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
FeNaEDTA	36.700
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200
KI	0.830
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.900
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.600
<b>II) Makro Elementler</b>	<b>mg/l</b>
CaCl <sub>2</sub>	332.020
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.000
KNO <sub>3</sub>	1900.000
MgSO <sub>4</sub>	180.540
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.000

#### 3.2.7. Çiçek tomurcuklarının sterilizasyonu

Tomurcuklar, 100 ml'sine bir iki damla Tween-20 damlatılmış %2 ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 10 dakika çalkalanarak bekletilmiş, 10 saniye boyunca %70'lik alkol çözeltisinde bekletilmiş ve sonrasında 3 kez, her seferde birer dakika olmak üzere otoklavlanmış distil su ile çalkalanarak durulanmıştır. Kontrol grupları için kullanılan çiçek tomurcukları tamamı ile aynı yöntemler kullanılarak sterilize edilmişlerdir.

#### 3.2.8. Anterlerin izole edilmesi ve gelişen kültür aşamaları

Sterilizasyonu tamamlanmış çiçek tomurcukları steril kabin içerisinde kurutma kağıtlarının üzerine alınmıştır. Kültüre alınan her farklı çeşit için yeni steril kurutma kağıtları kullanılmıştır. Tomurcuklar filtre kağıtları üzerinde pens ve bistüriler yardımıyla kesilerek içlerindeki yüksek miktarda genç mikrosporları içeren anterler, zedelenmeden ve filamentlerinden ayrılıp bütün olarak izole edilmiştir.

Anterler her bir petri kabında toplamda 5 adet anter olacak şekilde katı ortam üzerine konularak üzerlerine besin ortamının ikinci katmanı olan sıvı katman ilave edilmiştir ve anterler sıvı katmanda yüzer şekilde kültüre alınmıştır. Anterlerin ve sıvı ortamın konulduğu kaplar hava almayacak şekilde parafinlenerek büyüme odasına alınmıştır. Kültüre alma işlemleri mayıs ve haziran aylarında yapılmıştır. Her haftada 3 gün, her gün farklı bir genotipten 5 tanesi kontrol grubu olmak üzere toplamda 25 adet petri kültüre alınmıştır.





**Şekil 3.5.** Steril kabin içerisinde kültüre alma işlemi esnasında alınan bir görüntü

Daha öncesinden kesilerek hazırlanmış ve otoklavlanmış filtre kağıtları üzerlerinde her 4 tomurcuk kesildiğinde değiştirilmiştir ve yine her 2 tomurcukta bir pens ve bistüriler cam boncuklu sterilizasyon cihazında yüksek ısıya tabi tutulup sıra ile kabin yüzeyine değmeden soğumaya bırakılarak kullanılmışlardır.

Kültürler öncelikle bir hafta boyunca 31°C'ye ayarlanmış etüvlerde karanlık ortamda bekletilmiştir. Bir hafta sonrasında kültürler büyüme odasına alınarak 24°C'de 24 saat karanlık ortamda tutulmuşlardır.

Kültürlerde ileriki zamanlarda oluşmaya başlayan embriyolar yeterli boyuta gelince steril kabin içerisinde 100 mm çapındaki petrilere MS ortamına, her bir petride 4 embriyo olacak şekilde alındıktan sonra 24°C'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks aydınlanma şiddeti olan ortama gelişmeye alınmıştır.

Gelişen embriyolar yeterli boyutlara gelip, gerçek kök ve yaprak dokularını oluşturduktan sonra gelişimlerine devam etmeleri için steril kabinde 140 mm derinliğindeki cam tüplerde MS ortamına, her bir tüpte bir bitkicik olmak üzere dikilerek 24°C'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks aydınlanma şiddeti olan ortamda gelişimleri gözlenmiştir.



Şekil 3.6. Cam tüplere dikilmiş bitkiciklerin toplu bir görünümü



Şekil 3.7. Büyüme odasında ışık geçirmeyen kaplarda tutulan kültürler

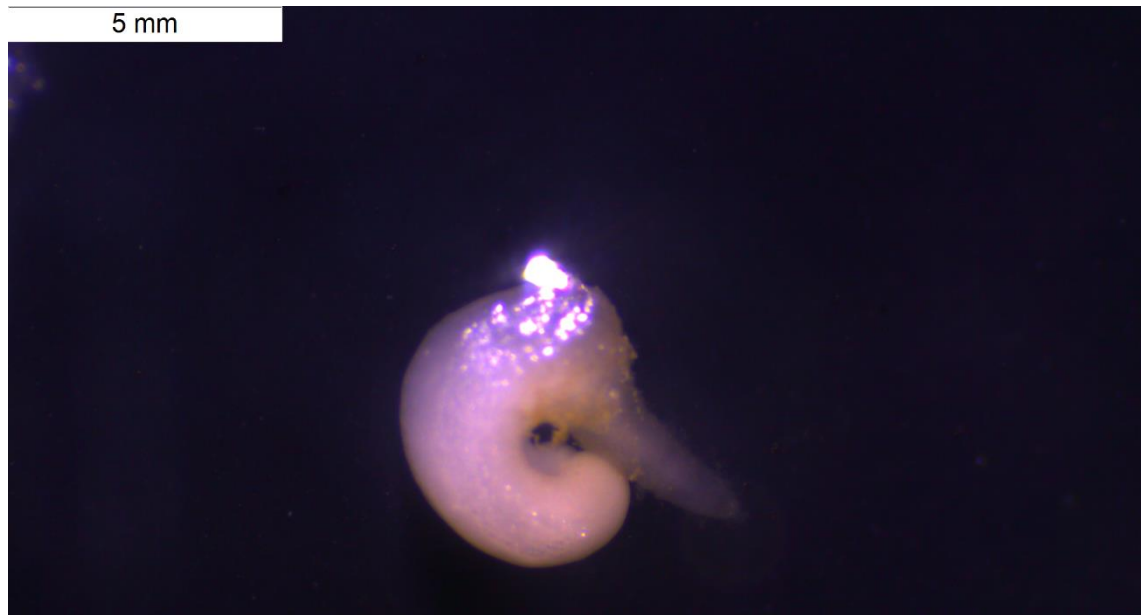
### 3.2.9. Kontrol gruplarının kurulması

Yapılan araştırmada seçilen üç genotipin Shed-Mikrospor kültürü tekniğine verdikleri cevap ve yatkınlıkları ile birlikte besin ortamına bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarının eklenmesinin göstereceği etkiyi de gözlemleyebilmek ve protokol dahilinde alınan kültürlerin sonuçlarıyla karşılaştırmak amaçlı kontrol grupları kurulmuştur.

Bu kontrol grupları için toplanılan tomurcuklar Shed-Mikrospor kültürü tekniği uygulanan tomurcuklar ile aynı donör bitkilerden denk gele toplanmışlardır, tamamı ile aynı ön soğuk (24 saat boyunca 4°C’de) stresine tabı tutulmuş ve kültüre alınmadan önce aynı yöntemlerle sterilize edilmişlerdir.

Kontrol grupları ilk katman olarak %2 maltoz, %0.6 agar eklenmiş, %1 aktif kömür içeren katı NN ortamı ve ikinci katman olarak ise sadece %2 maltoz eklenmiş sıvı NN ortamı kullanılarak 60 mm çapındaki cam petrielerde kültüre alınmışlardır. Kültüre alma işlemleri yine aynı şekilde otoklavlanmış filtre kağıtları üzerlerinde her 4 tomurcuk kesildiğinde kağıtlar değiştirilerek ve yine her 2 tomurcukta bir pens ve bistüriler cam boncuklı sterilizasyon cihazında sterilize edilerek, her bir petride 5 anter olacak şekilde yapılmıştır.

Kontrol gruplarındaki kültürler yine aynı şekilde bir hafta boyunca 31°C’ye ayarlanmış etüvlerde karanlık ortamda bekletilip sonrasında büyüme odasına alınarak 24°C’de 24 saat karanlık ortamda tutulmuşlardır. Kültürlerde ileriki zamanlarda oluşmaya başlayan embriyolar yeterli boyuta gelince steril kabin içerisinde 100 mm çapındaki petrielerde MS ortamına, her bir petride 4 embriyo olacak şekilde alındıktan sonra 24°C’de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks aydınlanma şiddeti olan ortama gelişmeye alınmıştır.



**şekil 3.8.** Kontrol gruplarında Benino çeşidinden elde edilen bir embriyo





**Şekil 3.9.** Kontrol gruplarında Benino çeşidine ait çimlendirmeye alınmış anormal embriyolar

### 3.2.10. Sonuçların değerlendirilmesi

Çalışma sırasında haftada 2 kez olmak üzere gözlemler yapılmış ve meydana gelen gelişimler haftalara göre kaydedilmiştir. Kültüre alınan petri sayısı adet, kültüre alınan anter sayısı adet, oluşan normal ve sağlıklı embriyo sayısı adet ve yüzde (%), oluşan anormal yapıda embriyo sayısı adet ve yüzde (%), oluşan bitkiciklerin sayısı adet ve yüzde (%) olarak kaydedilmiştir.

- Petri sayısı: Anterlerin kültüre alındıkları petriler sterilize edilmiş kutuların içerisinde hiç ışık görmeyecek şekilde büyüme odasına alınmıştır. Haftada iki kez kontrol edilen petrilerden enfeksiyon olanlar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Sağlıklı petrilerdeki gelişimler gözlemlere devam edilerek değerlendirmeye alınmışlardır.
- Anter sayısı: Kültüre alınan anter sayıları her genotip için aynıdır ve kayıt altına alınmıştır. Her petri içerisinde 5 adet uygun anter kültüre alınmış ve değerlendirmesi yapılmıştır.
- Normal ve sağlıklı embriyo sayısı: Kültüre alınan anterlerden sıvı ortama salınarak gelişen embroidler ilk olarak 5. hafta içerisinde globüler embriyo olarak görülmeye başlanmıştır. Gelişim süreleri, çimlendirmeye alınma zamanları ve çimlendirmeye alınan embriyo sayısı her genotip için ayrı ayrı kaydedilmiş ve değerlendirmeye alınmıştır.

- Anormal yapıda embriyo sayısı: Kùltürlerde oluşan anormal yapıda embriyolar her genotip için ayrı ayrı kayıt altına alınıp, sağlıklı embriyo sayısı ile aralarındaki oranlar yüzde olarak belirlenmiş ve değerlendirmeye alınmıştır.
- Bitkicik sayısı: Embriyolardan gelişerek oluşan gerçek kök ve yaprak dokularına sahip bitkiciklerin sayıları her genotip için ayrı ayrı kayıt altına alınmıştır. Bu bitkiciklerin gelişim süreçleri gözlemlenmiş ve normal embriyo sayıları ile karşılaştırılıp embriyolardan oluşan bitkiciklerin yüzdesi kayıt altına alınmıştır.
- Kontrol gruplarında oluşan bitkicikler, normal ve anormal embriyolar diğerlerinden tamamen ayrı kayıt altına alınmış, gözlemlenmiş ve değerlendirmeye alınmışlardır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

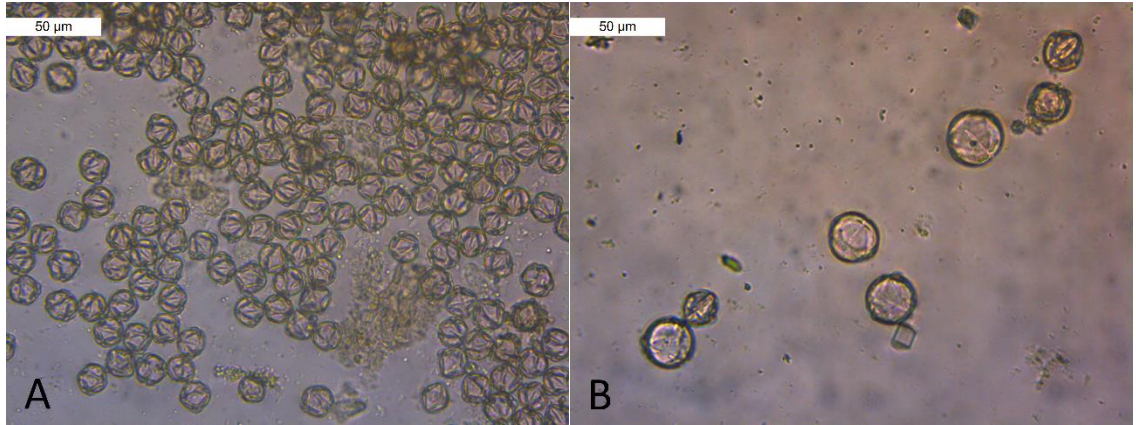
### 4.1. Mikrospor Gelişim Evreleri ve Tomurcuk Boyları

Çalışmada 3 farklı biber genotipine ait birer çeşitlerinin her birinden 10 farklı boyut aralığında tomurcuklar toplanıp, bunların boyları, içlerindeki anterlerin boyları ve anterlerin renklenme (Antosiyanin) durumları kaydedilmiştir. Her aralıktan beşer adet anter ezilip, bunların içerisinde 200'er mikrospor sayılarak ortalaması alınmıştır.

Kültüre alma işlemleri sırasında kullanılacak anterler burada belirlenmiştir. Kültür için en uygun gelişim evresi olan mid mikrospor (MM) oranı en yüksek aralıklar her çeşit için belirlenerek, yüzde olarak mid mikrospor miktarı kaydedilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Benino çeşidine ait bulgularda kültüre alınmaya en uygun boyutlardaki tomurcuklar 3.25 mm ile 5.00 mm arasında olanlarıdır

Tomurcuk Boyu	Anter Boyu	Antosiyanin	Mikrosporlar
3.00 – 3.25 mm	1.53 mm	YOK	%58 T - %22 GM
3.25 – 3.50 mm	1.84 mm	YOK	%78.5 MM
3.50 – 3.75 mm	2.05 mm	YOK	%98 MM
3.75 – 4.00 mm	2.11 mm	YOK	%96.5 MM - %2.5 V
4.00 – 4.25 mm	2.23 mm	YOK	%97 MM - %3 V
4.25 – 4.50 mm	2.70 mm	YOK	%81 MM - %19 V
4.50 – 4.75 mm	2.86 mm	%10	%80.5 MM - %19.5 V
4.75 – 5.00 mm	3.07 mm	%15	%56 MM - %22.5 V
5.00 – 5.25 mm	3.11 mm	%25	%22.5 MM - %30.5 V
5.25 – 5.50 mm	3.35 mm	%45	%53 V - %43 GBP



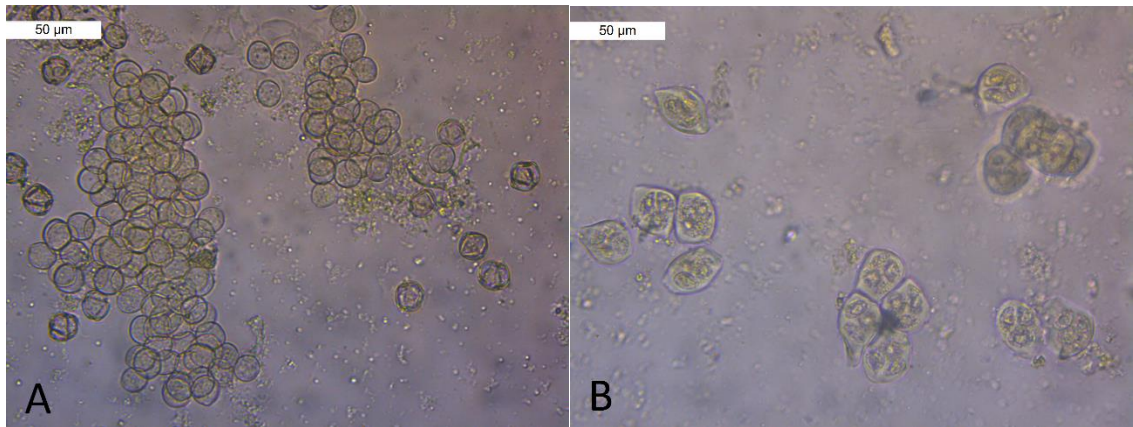
**Şekil 4.1.** A) Benino çeşidine ait bir çok mid mikrosporun mikroskop altında bir görünümü; B) Benino çeşidine ait vakuol ve mid mikrosporların bir arada görünümü

**Çizelge 4.2.** Filinta çeşidine ait bulgularda kültüre alınmaya en uygun boyutlardaki tomurcuklar 3.75 mm ile 5.50 mm arasında olanlardır

Tomurcuk Boyu	Anter Boyu	Antosiyanin	Mikrospor
3.50 – 3.75 mm	1.86 mm	YOK	%5 T - %90 GM
3.75 – 4.00 mm	1.91 mm	YOK	%74 MM - %22.5 GM
4.00 – 4.25 mm	2.15 mm	YOK	%100 MM
4.25 – 4.50 mm	2.35 mm	YOK	%97 MM - %3 V
4.50 – 4.75 mm	2.45 mm	YOK	%90 MM - %10 V
4.75 – 5.00 mm	2.65 mm	%5	%81.5 MM - %18.5 V
5.00 – 5.25 mm	2.74 mm	%15	%69 MM - %31 V
5.25 – 5.50 mm	2.99 mm	%25	%51.5 MM - %27.5 V
5.50 – 5.75 mm	3.14 mm	%45	%51.5 GBP
5.75 – 6.00 mm	3.35 mm	%60	%29 GBP - %60 MP

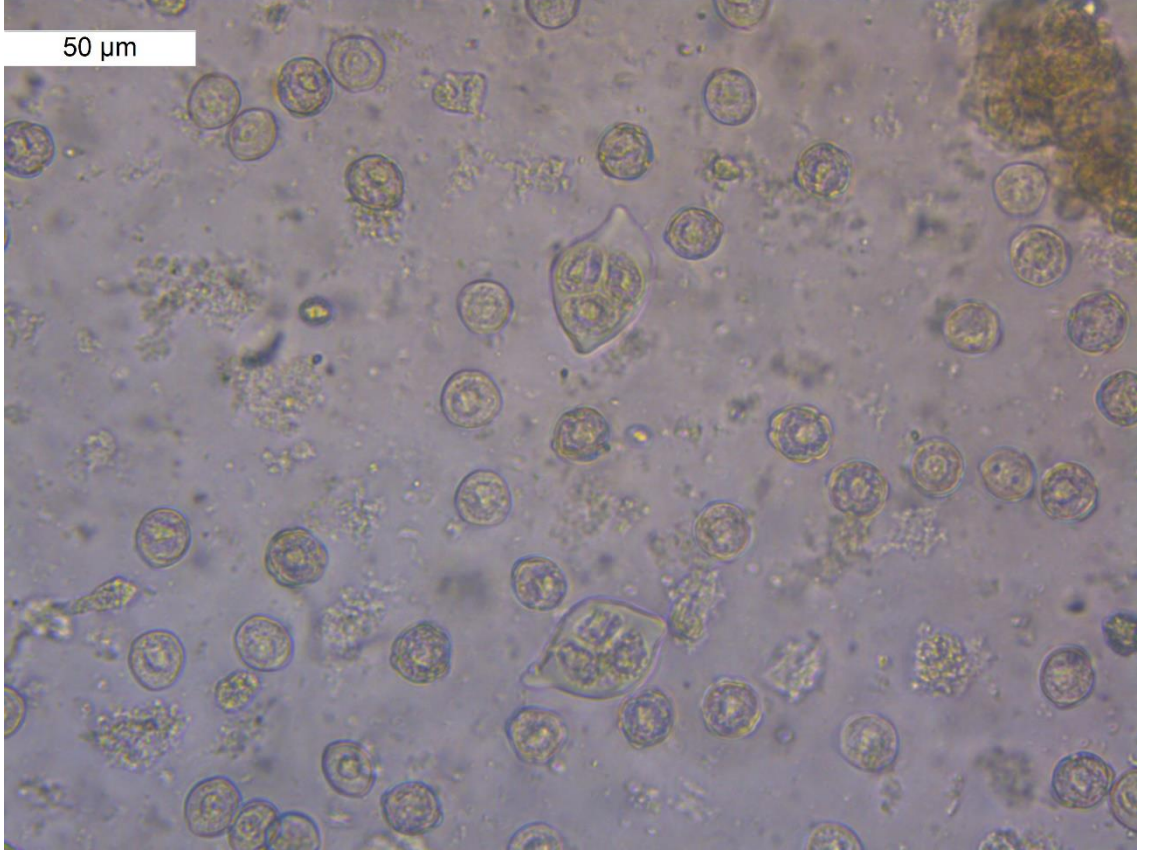
**Çizelge 4.3.** Bellisa çeşidine ait bulgularda kültüre alınmaya en uygun boyutlardaki tomurcuklar 4.00 mm ile 5.50 mm arasında olanlardır

Tomurcuk Boyu	Anter Boyu (Ort.)	Antosiyanin (Ort.)	Mikrospor
3.50 – 3.75 mm	1.79 mm	YOK	%41.5 T - %44.5 GM
3.75 – 4.00 mm	1.94 mm	YOK	%41 T - %43 GM
4.00 – 4.25 mm	2.15 mm	YOK	%95 MM - %5 GM
4.25 – 4.50 mm	2.24 mm	YOK	%100 MM
4.50 – 4.75 mm	2.48 mm	YOK	%92.5 MM - %7.5 V
4.75 – 5.00 mm	2.65 mm	YOK	%67.5 MM - %32.5 V
5.00 – 5.25 mm	2.90 mm	%10	%63.5 MM - 36.5 V
5.25 – 5.50 mm	3.05 mm	%25	%54.5 MM - %30.5 V
5.50 – 5.75 mm	3.13 mm	%35	%39 MM - %43.5 V
5.75 – 6.00 mm	3.28 mm	%60	%59 GBP - %8 MP

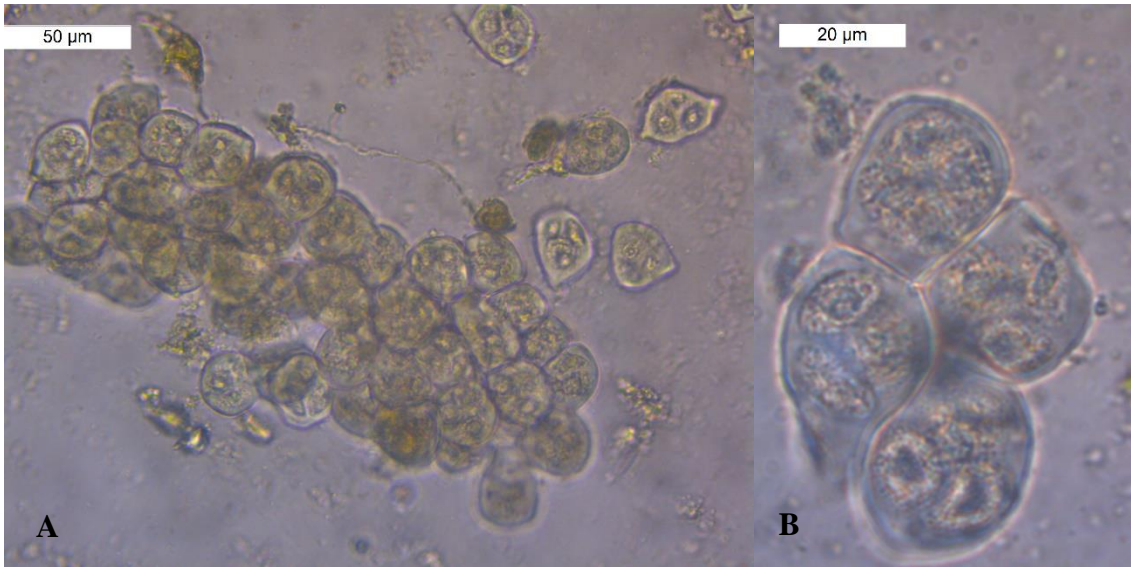


**Şekil 4.2.** A) Bellisa çeşidine ait çok sayıda genç mikrosporun mikroskop altında bir görünümü; B) Bellisa çeşidine ait çok sayıda tetradın mikroskop altında bir görünümü





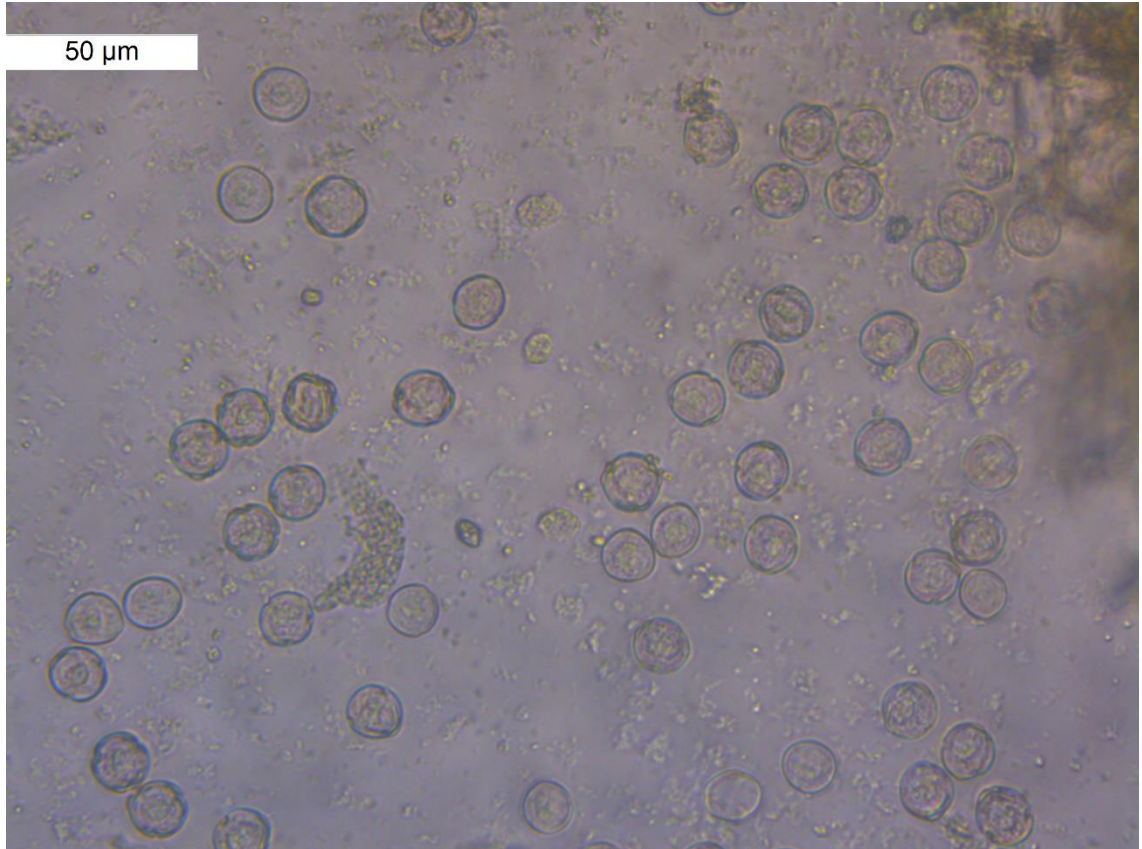
**Şekil 4.3.** Filinta çeşidine ait 3.80 mm boyunda bir tomurcuktaki tetrad, genç mikrospor ve mid mikrosporların bir arada bir görünümü



**Şekil 4.4.** A) Bellisa çeşidine ait 3.65 mm boyunda bir tomurcuk tomurcuktaki çok sayıda tetradın bir arada görünümü; B) Bellisa çeşidine ait 3.50 mm boyunda bir tomurcuktaki 4 adet tetradın yakındn görünümü

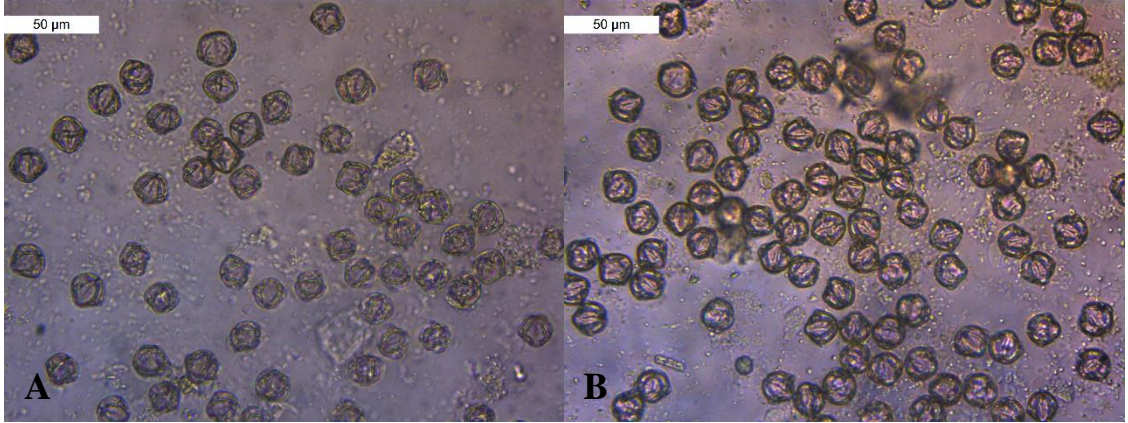


**Şekil 4.5.** Benino çeşidine ait 3.25 mm boyunda bir tomurcuktaki hücre duvarları parçalanmakta olan 2 adet tetrad



**Şekil 4.6.** Filinta çeşidine ait 3.77 mm boyunda bir tomurcuktaki genç mikrospor evresinden mid mikrospor evresine geçiş aşamasında olan mikrosporlar





**Şekil 4.7.** A) Filinta çeşidine ait 4.15 mm boyunda bir tomurcuktaki çok sayıda mid mikrospor; B) Filinta çeşidine ait 4.30 mm boyunda bir tomurcuktaki çok sayıda mid mikrospor

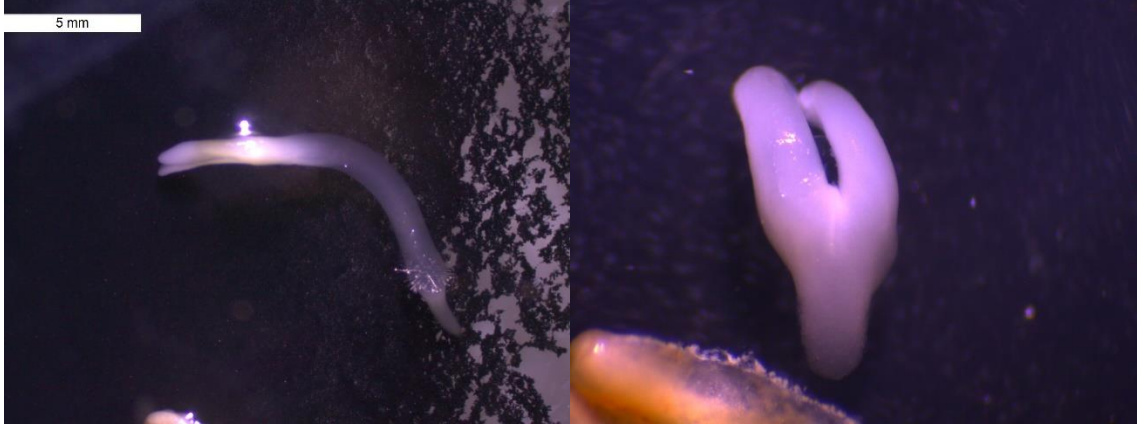
Mikrospor gelişim aşamalarının belirlenmesi işlemlerinden elde edilen bulgular, mikrospor gelişim aşamaları ile antosiyanin (Renklenme) oranı arasındaki ilişkinin sabit olmayıp her genotipe göre farklılık gösterdiğini; kültüre alınmak için uygun kabul edilebilecek anterlerin renksizden-henüz renklenmek üzere olan anterlerden başlayarak, %30-40 oranında renklenmiş anterlere kadar olduğunu göstermektedir.

İçlerinde embriyo oluşturmaya en elverişli olan mikrosporları ihtiva eden boy aralıkları; Benino çeşidi için 3.25-5.00 mm boylarında olan tomurcukları, Filinta çeşidi için 3.75-5.50 mm arasında olan tomurcuklar ve Bellisa çeşidi için 4.00-5.50 mm boylarında olan tomurcuklar olarak belirlenmiştir. Bu boy aralıklarında olan tomurcuklardaki anterler %50 oranının üzerinde mid mikrospor ihtiva ettikleri için embriyo oluşumuna en uygun potansiyele sahip aralıklar olarak kaydedilmiştir.

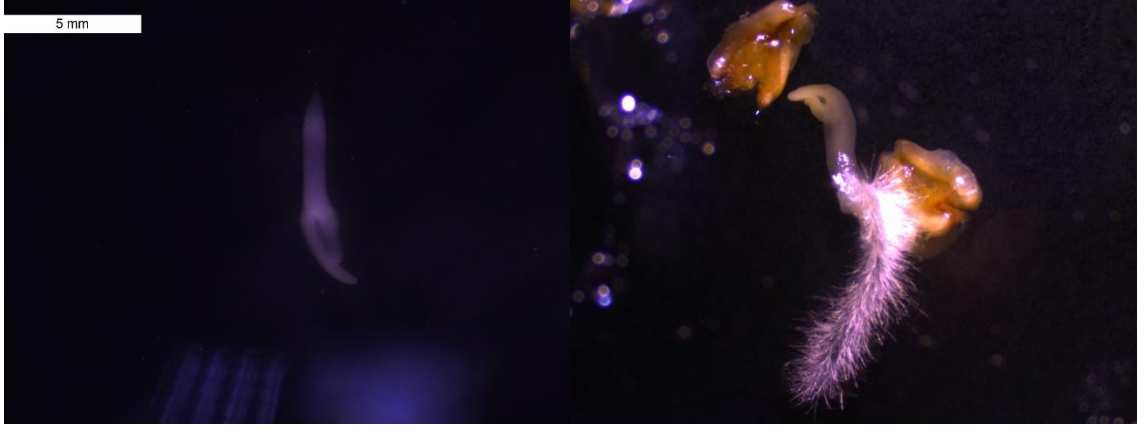
#### 4.2. Kültürlerde Mikrospor ve Embriyoların Gelişim Süreci

Bir gün boyunca 4°C’de soğuk stresine maruz bırakılan tomurcuklar kesilerek, 60 mm çapındaki cam petrielerde, içlerinden 5’er adet anter konulmak üzere kültüre alınmışlardır. Kültür ortamının ilk katı katmanı 5.5 mL, sıvı ortam ise 5 mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

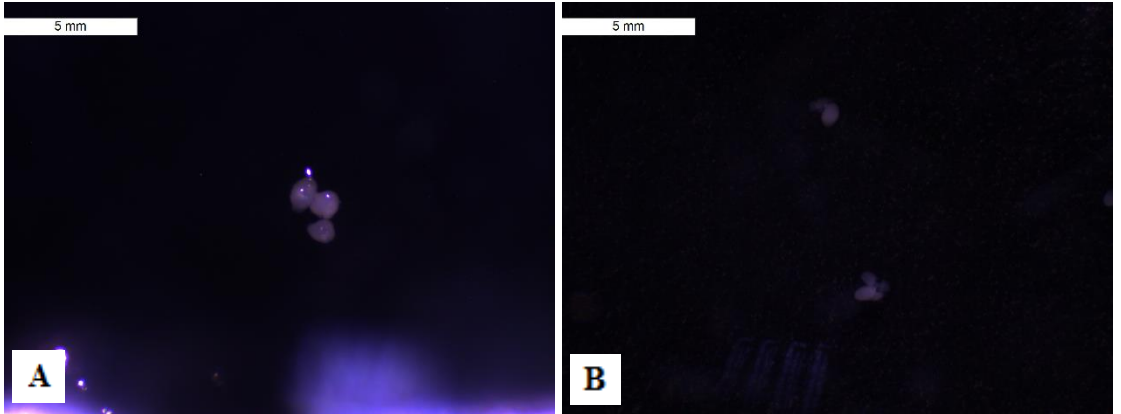
Kültürlerde ilk 4 hafta içerisinde hiç bir gelişime rastlanmamıştır, ancak 5. hafta içerisinde kültürlerde globüler embriyolar ve 6. hafta içerisinde de bunlardan gelişerek oluşan normal ve anormal yapıda embriyolar gözlemlenmiştir. Her 3 genotipe ait çeşitte de ilk 4 hafta içerisinde kültüre alınan petrielerde hiç gelişim görülmemiş, 5. hafta ve sonrasında embriyo gelişim hızları açısından çok benzer bulgulara rastlanmıştır.



**Şekil 4.8.** Bellisa çeşidine ait aynı petrideki iki adet normal görünümlü embriyonun 7. haftanın başında görüntüsü



**Şekil 4.9.** Benino çeşidine ait 7 haftalık iki adet normal görünümlü embriyo

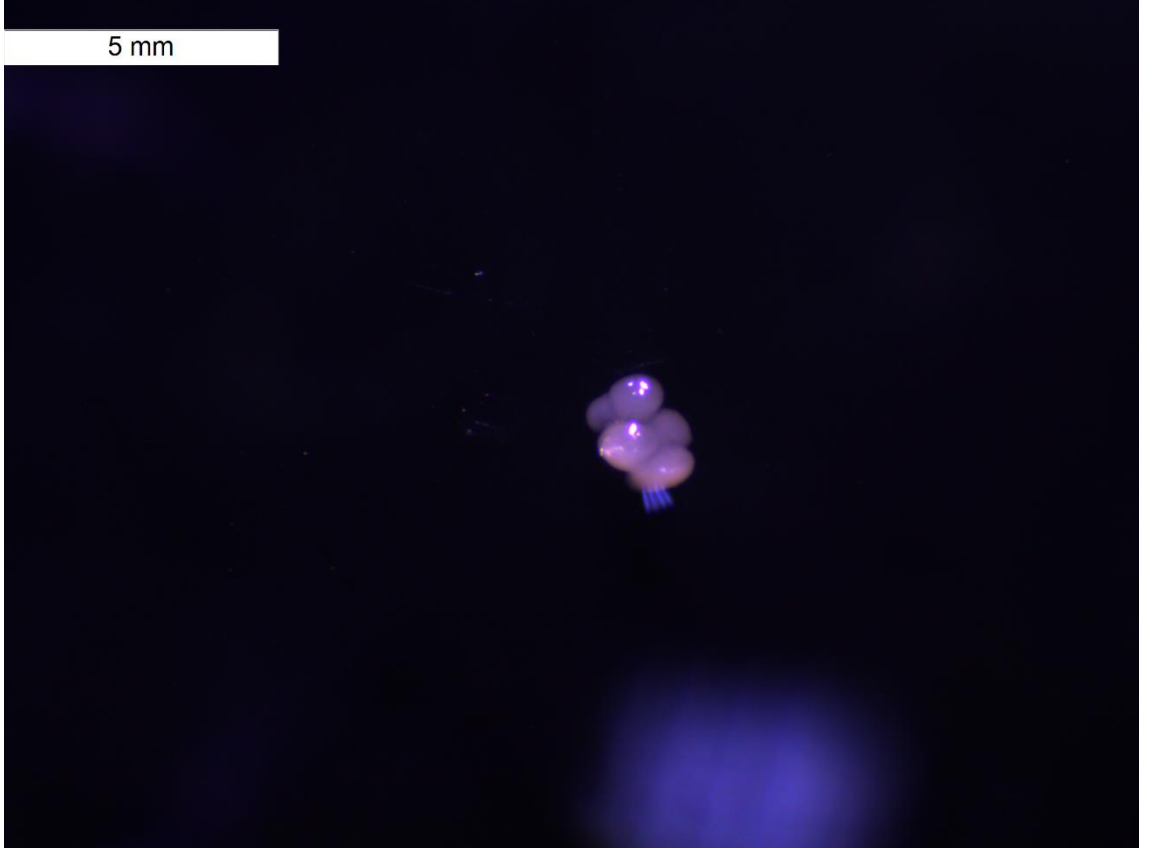


**Şekil 4.10.** A) Benino çeşidine ait 3 adet globüler embriyo; B) Benino çeşidine ait başka bir petrideki 6 adet globüler embriyo

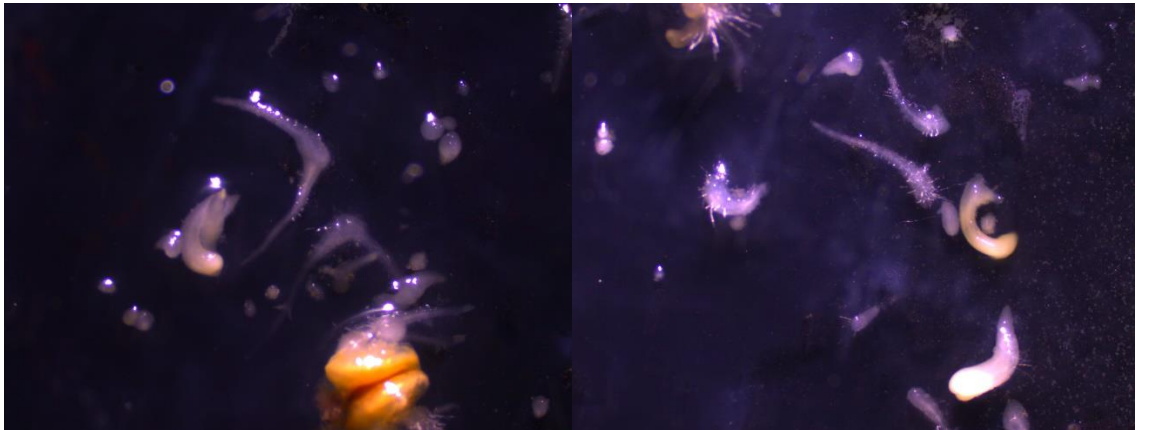
Kültüre alınan petriler içerisinde embriyo oluşumu her bir genotipte 12 ile 13. haftalara kadar devam etmiştir fakat 10. haftaların sonrasında oluşan embriyoların besin ortamının sıvı katmanının yeterli seviyede olmasında veya tükendiğinde yenilenmesine



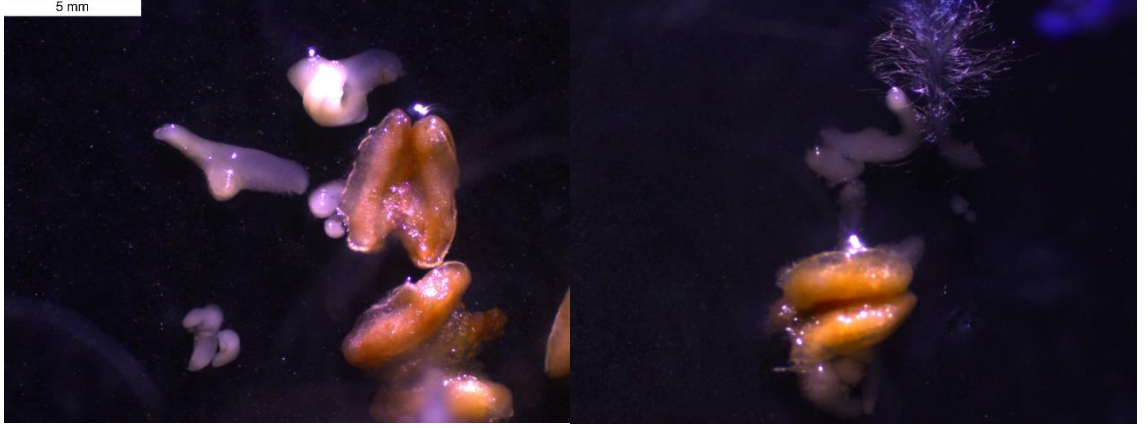
rağmen çimlendirmeye aldığıında hiç bir şekilde gelişimlerini ve canlılıklarını sürdürmedikleri görülmüştür.



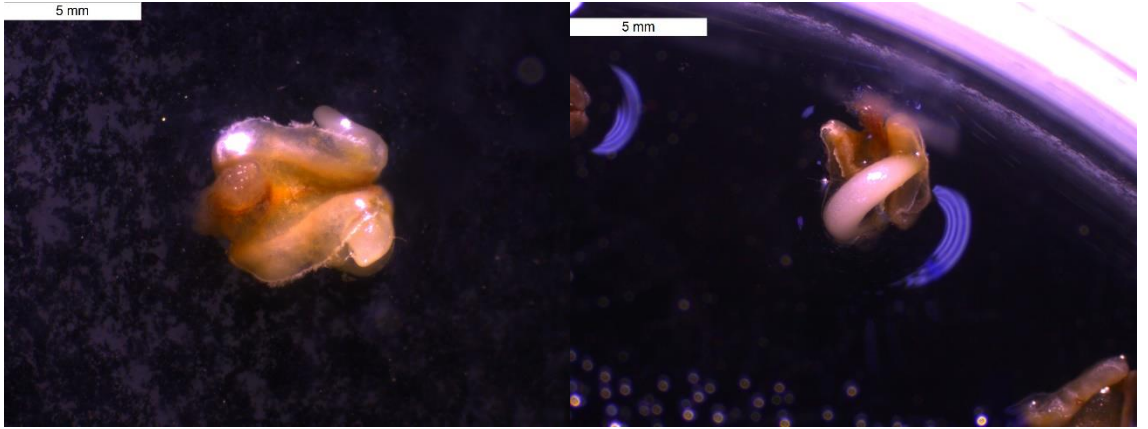
**Şekil 4.11.** Kültüre alınan beşinci hafta içerisindeki bir petrideki Bellisa çeşidine ait 5 adet globüler embriyonun yakından bir görüntüsü



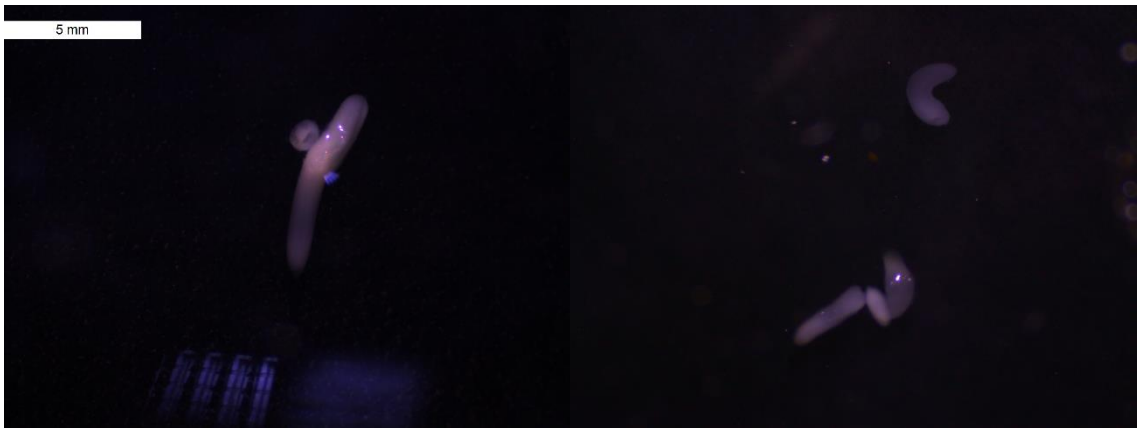
**Şekil 4.12.** Benino çeşidine ait bir çok globüler, normal ve anormal embriyoların farklı karelerde bir arada görünüşleri



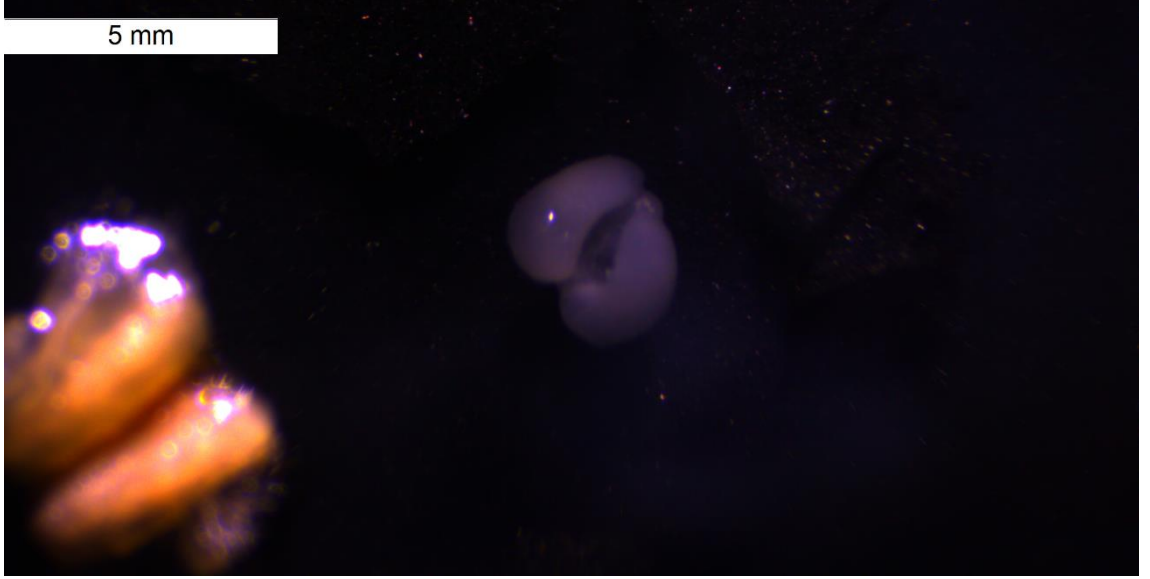
**Şekil 4.13.** Bellisa çeşidine ait bir çok globüler, normal ve bir adet anormal yapıdaki embriyoların farklı karelerde bir arada görüntüleri



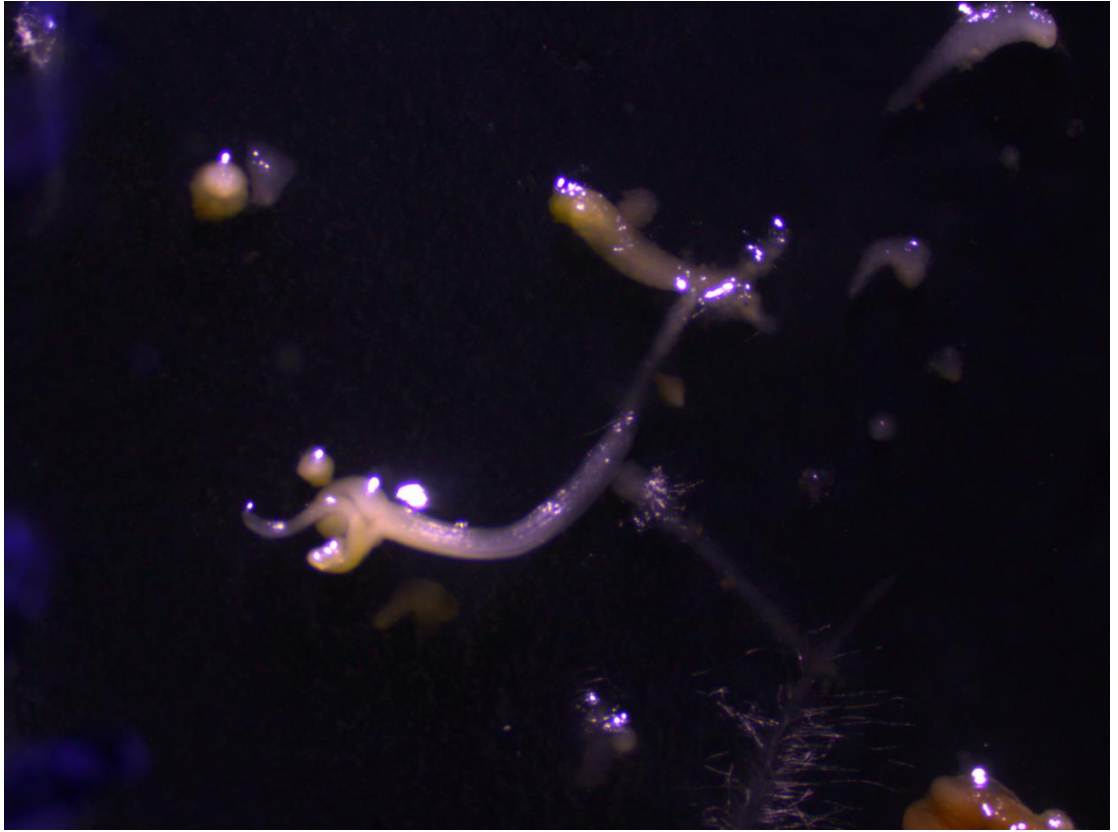
**Şekil 4.14.** Filinta çeşidine ait gelişimlerini anterlerin içinde sürdürmekte olan üç adet embriyonun görüntüleri



**Şekil 4.15.** Benino çeşidine ait 8 haftalık kültürlerde gelişmeye devam eden farklı boyutlardaki embriyolar



**Şekil 4.16.** Benino çeşidine ait kültüre alındıktan 9 hafta sonra oluşan embriyolar

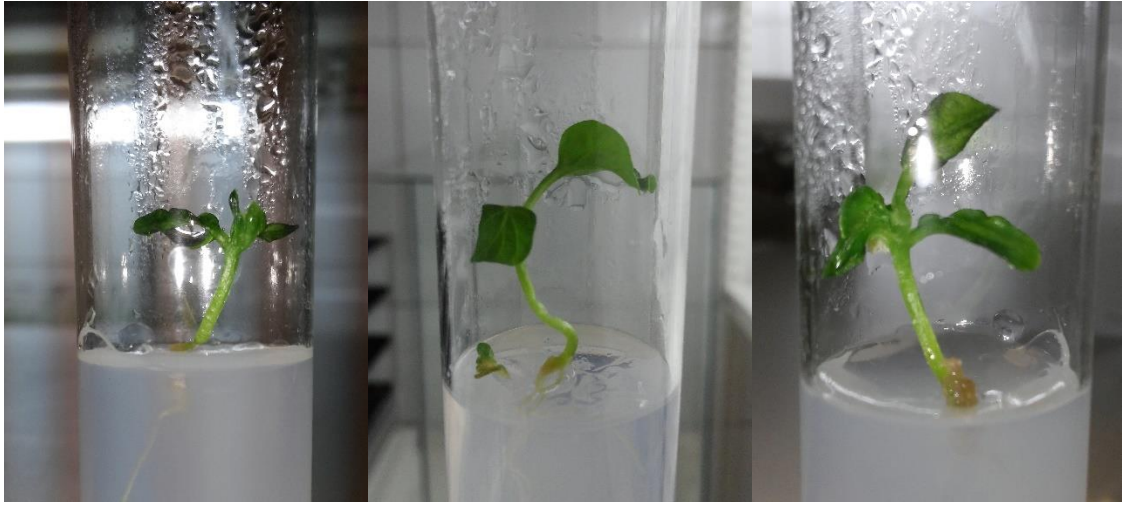


**Şekil 4.17.** Benino çeşidine ait bir kültürde 10. hafta içerisinde gelişmeye devam eden farklı boylardaki embriyoların bir arada görünümü

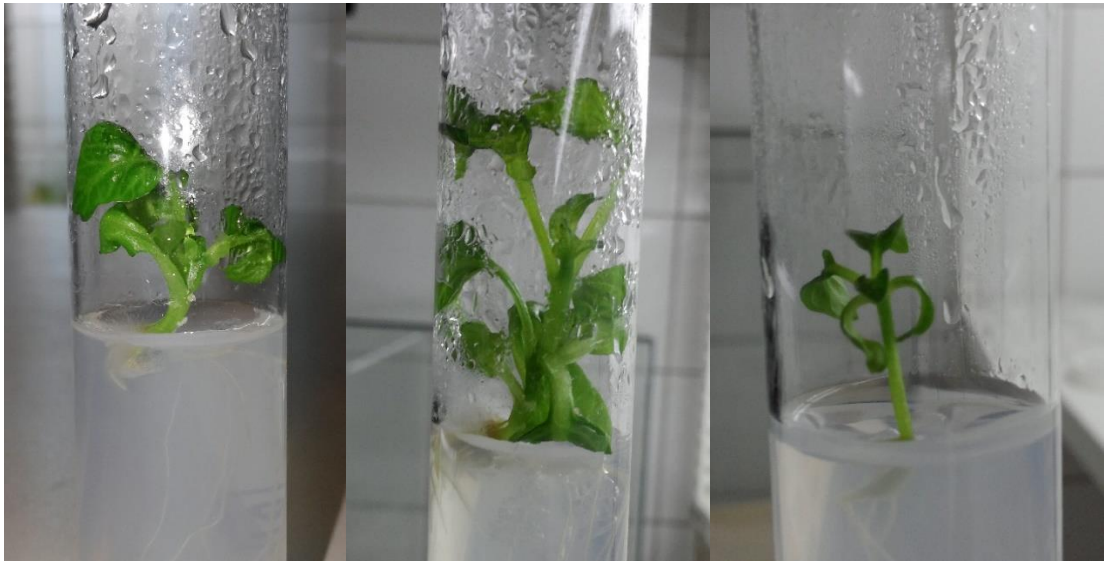
Gelişimlerini anterlerin içerisinde devam ettiren veya sıvı ortama salınmamış embriyolar çoğunlukla Filinta çeşidine ait anterlerde görülmüştür. Bu embriyolar yeteri

kadar geliştikten sonra zedelenmeden anterden çıkarılarak çimlendirmeye alınmaları sağlanmıştır, yapılan bu işlem sırasında özellikle embriyoların kotiledon kısımlarının zedelenmemesine dikkat edilmiştir.

Anterlerden sıvı ortama dökülen mikrosporlardan oluşan bu embriyolar, 7. Hafta içerisinde ve sonrasında uygun boya geldiklerinde 100 mm çapındaki petrilerde, en fazla 4'er adet olmak üzere MS ortamında çimlendirmeye alınmıştır. Çimlendirmeye alınan embriyolar gerçek kök ve yaprak dokuları gözükükten sonra yeterince uzamaları ve bitkiciklere dönüşmeleri için 140 mm uzunluğunda, 20 mm çapındaki tüplerde MS 0 ortamına dikilmişlerdir.



**Şekil 4.18.** Bellisa çeşidinden elde edilen gerçek kök ve yaprak dokuları oluşmuş bitkicikler



**Şekil 4.19.** Benino çeşidinden elde edilen gerçek kök ve yaprak dokuları oluşmuş bitkicikler

Beşinci hafta içerisinde oluşan globüler embriyolar ortalama iki ile üç hafta içerisinde 6-10 mm boya ve çimlendirmeye alınmak için uygun hale gelebildikleri görülmüştür. Bu embriyoların gelişimleri düzenli olarak takip edilerek gerçek kök ve yaprak dokularını oluşturmaları beklenmiştir.

Çalışmada her üç genotip için ayrı ayrı içlerinde 5'er adet anter içeren 100'er tane petri olmak üzere, toplamda 300 adet petri ve 1500 adet anter kültüre alınmıştır. Bunlardan ise toplamda dolmalık biber genotipi olan Benino çeşidinden toplamda 355 adet, kapy biber genotipi olan Bellisa çeşidinden toplamda 73 adet ve sivri biber genotipi olan Filinta çeşidinden ise toplamda 15 adet embriyo elde edilmiştir.

Dolmalık biber genotipinden 60 adet normal embriyo ve bunlardan 18 adet gerçek kök ve yaprak dokularına sahip haploid bitkicik; kapy biber genotipinden 21 adet normal embriyo ve bunlardan 5 adet gerçek kök ve yaprak dokularına sahip haploid bitkicik; sivri biber genotipinden ise 4 adet normal embriyo ve bunlardan 2 adet gerçek kök ve yaprak dokularına sahip haploid bitkicik elde edilmiştir.

Kolşisin uygulanarak kromozom katlaması yapılmak üzere bitkicikler %70 torf + %30 perlit karışımına şaşırtılmışlardır. Bitkicikler şaşırtma işleminden sonra bir hafta içerisinde çökerten (*Phytium spp.*) hastalığına yakalanan bitkicikler kolşisin uygulamasına tabi tutulamamış ve daha ileriki seviyelere ulaştırılamamışlardır.

**Çizelge 4.4.** Genotiplerde oluşan embriyo sayısı, normal ve sağlıklı embriyo sayısı ve yüzdesi, oluşan sağlıklı bitkiciklerin sayısı ve normal embriyo sayısına göre yüzdesi

Çeşit İsimleri	Embriyo Sayısı	Normal Embriyo Sayısı ve Yüzdesi	Bitkicik Sayısı ve Yüzdesi
Benino	355	60 - %17	18 - %30
Bellisa	73	21 - %29	5 - %24
Filinta	15	4 - %27	2 - %50

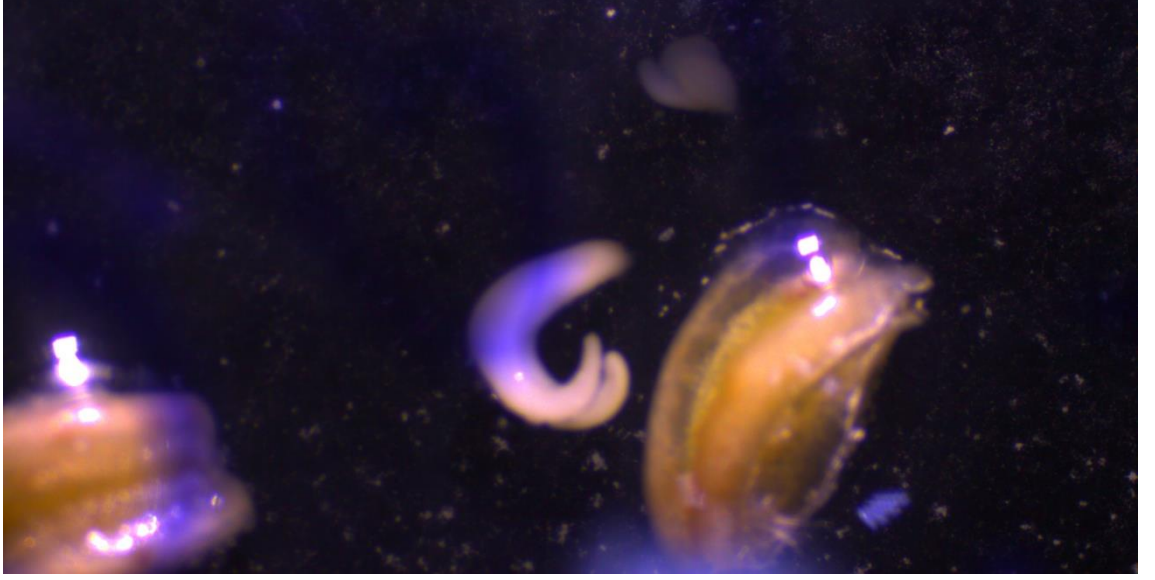
**Çizelge 4.5.** Genotiplerde kültüre alınan petri başına oluşan toplam embriyo ve normal embriyo sayısı ile embriyo oluşan petri yüzdesi

Çeşit İsimleri	Petri Başına Oluşan Ortalama Olarak		
	Toplam Embriyo Sayısı	Normal Embriyo Sayısı	
		Adet	%
Benino	3.55	0.60	17
Bellisa	0.73	0.21	29
Filinta	0.15	0.04	27

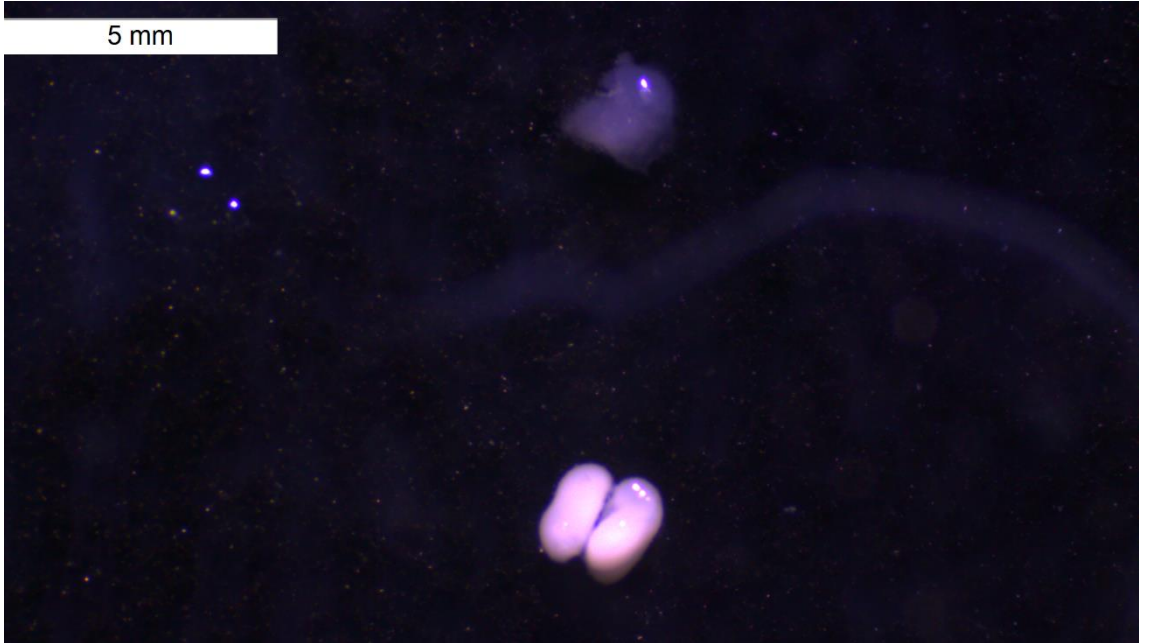


### 4.3. Kontrol Grupları ve Kontrol Gruplarından Elde Edilen Bulgular

Yapılan çalışmada besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarının embriyo sayısı üzerindeki etkisini gözlemlemek amacı ile her üç genotip için de 25'er adet petride ve 125'er adet anter olmak üzere, toplamda 75 petri ve 375 anterden oluşan kontrol grupları oluşturulmuştur.



**Şekil 4.20** Kontrol gruplarından elde edilen Bellisa çeşidine ait 6 haftalık petrilerdeki embriyolar



**Şekil 4.21** Kontrol gruplarından elde edilen Benino çeşidine ait 5 haftalık bir petrideki embriyolar

Kontrol gruplarından sadece 6 tanesi normal olmak üzere toplamda 50 adet embriyo elde edilmiştir. Bu normal embriyolardan gerçek kök ve yaprak dokularına sahip bitkicikler oluşmamıştır.

**Çizelge 4.6.** Kontrol gruplarından elde edilen embriyo sayıları ve petri başına oluşan embriyo sayısı

Çeşit İsimleri	Embriyo Sayısı	Normal Embriyo Sayısı ve Yüzdesi	Petri Başına Embriyo Sayısı
Benino	37	5 - %13.5	1.48
Bellisa	10	1 - %10	0.40
Filinta	3	0 - %0	0.12

**Çizelge 4.7.** Kontrol grupları ile 2.5  $\mu\text{M}$  Zeatin ve 5  $\mu\text{M}$  IAA eklenmiş sıvı besin ortamından elde edilen sonuçların karşılaştırılması

Çeşit İsimleri	Normal Embriyo Yüzdesi		Petri Başına Embriyo Sayısı	
	2.5 $\mu\text{M}$ Zeatin + 5 $\mu\text{M}$ IAA	Kontrol	2.5 $\mu\text{M}$ Zeatin ve 5 $\mu\text{M}$ IAA	Kontrol
Benino	17	13.5	3.55	1.48
Bellisa	29	10	0.73	0.4
Filinta	27	0	0.15	0.12

Kontrol gruplarından elde edilen sonuçlara göre besin ortamının sıvı katmanına 2.5  $\mu\text{M}$  Zeatin + 5  $\mu\text{M}$  IAA ilave edilmesi oluşan normal embriyo oranı açısından her 3 genotipi temsil eden çelitte, özellikle de Bellisa ve Filinta çeşitlerinde önemli derecede artışa sebep olduğu görülmüştür. Sıvı ortama 2.5  $\mu\text{M}$  Zeatin + 5  $\mu\text{M}$  IAA ilavesinin petri başına oluşan embriyo sayısını Benino ve Bellisa çeşitlerinde oldukça arttırdığı ancak Filinta çeşidinde çok yüksek bir artışa neden olmadığı görülmüştür.

#### 4.4. Donör Bitkilerin Gelişiminin Embriyo Oluşumu Üzerine Etkisi

Yapılan bu araştırmada elde edilen bir diğer bulgu ise donör bitkilerin gelişim düzeyleri ilerledikçe toplanılan anterlerin Shed-Mikrospor kültürüne verdikleri tepkinin her genotip için çok büyük miktarda azalmasıdır.

Donör bitkiler ilk çiçek tomurcuklarını vermeye başladıktan sonraki ilk 8 hafta içerisinde kültüre alınan anterlerde 5. haftadan itibaren embriyo oluşumu gözlemlenmiş ve 9-10 hafta kadar embriyo oluşumu devam etmiştir. Aynı donör bitkilerden 9. haftadan sonra toplanıp kültüre alınan 15'er petrideki 75'er adet anterden Filinta çeşidinden hiç; Benino ve Bellisa çeşitlerinden ise sırası ile 5 ve 2 adet embriyo oluştuğu görülmüştür. Oluşan bu embriyoların gelişimleri oluştuklarından itibaren 6. haftadan sonra durmuş ve sonrasında canlılıklarını yitirdikleri görülmüştür.



## 6. SONUÇLAR

Bu çalışmada özellikle Akdeniz Bölgesi için büyük öneme sahip ve bitki ıslahında odak konusu olan biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisine ait en yaygın tüketilip-üretilen üç farklı genotipin shed-mikrospor kültürü tekniğine olan yatkinlikleri, mikrospor gelişim aşamaları ve mikrosporogenesis potansiyelleri araştırılmıştır. Yüksek lisans tezi olarak yapılan bu çalışmada başlıca aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Mikrospor gelişim aşamalarının her genotip için antosiyanin seviyesi ile farklı oranda olduğu ve antosiyanin seviyesinin ortalama olarak %40'ın üstüne çıkmaması gerektiği; daha olgun anterlerin büyük çoğunlukla embriyo oluşturmaya elverişli olmayan genç biselüler polen ihtiva ettikleri ve yeterli miktarda mid polen ile embriyogenesis için uygun kabul edilen vakuol ihtiva etmedikleri görülmüştür.

Mikrospor gelişim aşamalarının her mikrospor için sabit ve düzenli olmadığı, istenilenden fazla olgunlaşmış anterlerin az da olsa uygun ve bir çok farklı evredeki mikrosporları aynı anda ihtiva edebildiği, aynı anterin içerisindeki mikrosporların tümüyle aynı hızda gelişmedikleri görülmüştür.

Embriyo oluşturmaya en uygun olan aşamalar sayılabilecek mid mikrospor ve vakuol içeriği en fazla olan anterlerin renksiz olanlardan, en çok ortalama %30 oranına kadar renklenme gösterenler olduğu tespit edilmiştir. Bu oranların genotiplere göre değişebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Çift katmanlı besin ortamı sayesinde mikrosporların sıvı ortam içerisinde serbestçe ve daha rahat gelişerek embriyolar oluşturdukları gözlemlenmiştir. Buna ek olarak oluşan embriyoların gözlemlenmesi ve çimlendirmeye alınması çok daha kolay olmuştur. Ancak sıvı ortam olmasına rağmen anterin içinde gelişmeye devam eden embriyoların da varlığı gözlemlenmiştir, bu embriyoların sıvı biber genotipini temsil eden Filinta F1 çeşidinde ait olduğu gözlemlenmiştir.

Çift katmanlı besin ortamının katı ortamı sayesinde gelişen mikrospor ve embriyoların şeker kaynağı ihtiyacı karşılanmış ve aktif kömürün faydalarından yararlanılmıştır. Üstteki sıvı katman sayesinde ise yüksek miktarda embriyo görünen özellikle dolmalık biber genotipine ait anterlerin kültüre alındığı petrilere sıvı ortamda meydana gelen eksilmeye kolayca 5. ve 6. haftalardan sonra ilave yapılarak, henüz gelişimlerini tamamlamamış olan embriyolara yeni besin kaynağı başarıyla sağlanmıştır. Çalışma sırasında sıvı kamanın bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımını daha etkin ve kolay kıldığı görülmüştür. Ayrıca donör bitkiden kaynaklı enfeksiyonların fazla görüldüğü hassas genotipler ile yapılan çalışmalarda da sıvı ortama antibiyotik çözeltilerinin eklenmesi kolaylık ve etkinlik açısından yüksek potansiyel taşıdığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Kontrol gruplarından elde edilen sonuçlar ile çift katmanlı besin ortamına 2.5 µM Zeatin ve 5 µM IAA ilave edilmesinin embriyo oluşumu açısından her üç genotip için de önemli avantajlar sağladığı kesin olarak görülmüştür. Ancak diğer bitki büyüme düzenleyicilerin ve farklı dozlardaki kombinasyonlarının etkilerinin görülmesi için daha fazla çalışma yapılmalıdır.

Tüm genotiplerdeki kültürlerde ilk embriyolar kültüre alındıktan sonraki 5. hafta içerisinde globüler embriyolar olarak görülmeye başlanmıştır. Her genotipte embriyo oluşumu kültürlerin 13. haftalarına kadar devam etmiştir. İlk 10 haftadan sonra çimlendirmeye alınan embriyoların hemen hepsinde sararma meydana gelmiş, enfeksiyon olmaksızın gelişimlerini ve canlılıklarını sürdüremedikleri görülmüştür. Bu doğrultuda kültüre alınan anterlerin ilk 10 haftasının büyük öneme sahip olduğu görülmüştür.

Araştırmadan elde edilen bulguların gösterdiği bir diğer sonuç ise donör bitkilerin gövdelerinde odunsu doku ve meyve verimi arttıkça bu bitkilerden alınan anterlerden oluşan embriyoların, bitkiler gençken alınan anterlerden oluşan embriyolara göre daha koyu renkli ve iri yapıda oldukları ancak embriyo oluşumunun çok büyük oranda azaldığı görülmüştür. Bu doğrultuda donör bitkilerin çiçek tomurcuklarını vermeye başlamasından itibaren ilk 9 haftalık sürecin embriyo oluşumu ve oluşan embriyoların gelişim seyri açısından çok daha avantajlı olduğu görülmüştür.

Çalışmada kültüre alınan 3 ayrı genoriptan toplam 300 petrideki anterlerin hiç birinde kallus oluşumu gözlenmemiştir. Yüksek oranda ve kayda değer bir enfeksiyon durumu da gerçekleşmemiştir, 300 petriden toplamda 24 tanesinde enfeksiyon görülmüştür. Doku kültürü tekniklerinde enfeksiyon sebepleri başıca besin ortamından kaynaklı enfeksiyonlar ve donör bitkilerden alınan materyalden kaynaklanan enfeksiyonlardır. Ancak çalışmada görülen enfeksiyonlu petrilerin 22 tanesi, petrilerin mühürlenmesini sağlayan parafinin çatlamasından ve petrinin hava almasından ötürü meydana gelmiş olduğu, sadece 2 adet petride kullanılan materyalden kaynaklanan enfeksiyonların olduğu görülmüştür. Kontrol gruplarında kültüre alınan 3 ayrı genotipten toplam 75 petrideki anterlerde de aynı şekli kallus oluşumu ve kayda değer bir enfeksiyon durumu gözlenmemiştir.

Shed-Mikrospor kültürü tekniği ile 3 genotipten toplamda 443 adet sağlıklı embriyo (Kontrol grupları hariç) elde edilmiştir, bunların 85 tanesi normal yapıdaki embriyolardır. Oluşan embriyoların ve haploid bitkiciklerin büyük çoğunluğu (Toplam embriyo sayısının %80'i ve toplam bitkicik sayısının %72'si) dolmalık biber genotipine (Benino F1) aittir. Shed-mikrospor kültürü tekniği ile embriyo ve bitkicik oluşturmaya en yatkın genotipin dolmalık biber, normal embriyo oranı en yüksek genotipin kopya biber ve Shed-Mikrospor kültürü tekniğine en az cevap veren genotipin ise sivri biber genotipi olduğu görülmüştür. Ancak bu yönde araştırmalar daha ileriki seviyelere taşınmalı ve sofralık genotiplerde daha fazla çalışma yapılmalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

- Arı, E. 2006. Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*’da Anter Kültürü Çalışmaları. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dal, Adana, 169 s.
- Bal, U., Abak, K., Büyükalaca, S., Çömekçiöglu, N. 2003. Development of Callus Colonies From the Isolated Microspore Culture of *Capsicum annuum* L. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 17(2): 28-43.
- Barany, I., Gonzalez-Melendi, P., Fadon, B., Mityko, J., RISUENO, M.C. and TESTILLANO, P.S. 2005. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biol. Cell*, 97: 709-722.
- Biner, Ş.B. 1998. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Eldesi Üzerine Farklı Sıcaklık ve Işık Uygulamalarının Etkileri. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 59 s.
- Collonier, C., Fock, I., Kashyap, V., Rotino, G.L., Daunay, M.C., Lian, Y., Mariska, I.K., Rajam, M.V., Sarvaes, A., Ducreux, G., Sihachakr, D. 2001. Application of biotechnology in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65: 91-100.
- Çağlar, G., Aras, V. ve Bayram, A. 2004. Kurutmalık Kırmızı Biberlerde Androgenesis Yoluyla *In Vitro* Haploid Embriyo Uyartımı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(1): 87-94.
- Dolcet-Sanjuan, R., Clavera, E., Huerta, A. 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L. Effect of Carbonhydrate and Carbon Dioxide Enrichment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122(4): 468-475.
- Dumas De Vault, R., Chambonnet, D., Pochard, E. 1981. *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) Anthers: high rate plant production from different genotypes by +35°C treatments. *Agronomie*, 1(10): 859-864.
- Ellialtıoğlu, Ş. 2000. Haploid Bitkilerin Bitki Islahı Programlarında Kullanımı. Bitki Islahı Kursu, Seminer Notları (Yayımlanmamış), Nisan 2000, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Samsun.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K., 2001. Halploid Bitki Üretimi. Mehmet BABAOĞLU, Ekrem GÜREL ve Sebahattin ÖZCAN, Bitki Biyoteknolojisi Cilt I – Doku Kültürü Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 137-189.
- Ellialtıoğlu, Ş. ve Tıpırdamaz, R. 2002. Soğuk Uygulamaları ve Aktif Kömürün Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Süresince Absisik Asit Miktarındaki Değişim Üzerine Etkisi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1): 9-18.

- Ercan, N. ve Ayar Şensoy, F. 2011. Androgenic Responses of Different Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4(2) : 69-61.
- Irikova, T. and Rodeva, V. 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): The effect of nutrient media. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 23: 101-104.
- Irikova, T., Grozeva, S., Popov, P., Rodeva, V., Todorovska, E. 2011. *In Vitro* Response of Pepper Anther Culture (*Capsicum annuum* L.) Depending on Genotype, Nutrient Medium, and Duration of Cultivation. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 25(4): 2604-2609.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D.I., Lee, K.M. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 77: 63-72.
- Kim, M., Jang, I.C., Kim, J.A., Park, E.J., Yoon, M., Lee, Y. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep*, 27: 425- 434.
- Koleva Gudeva, L. and Trajkova, F. 2012. Anther Culture of Pepper: Morphological Characteristics of Fruits of Androgenetic Pepper Lines (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Research in Agriculture*, 1(2): 136-145.
- Koleva Gudeva, L., Trajkova, F. and Spasenovski, M. 2007. Effectiveness of androgenesis induced in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). M-Ch. Daynay, E. Jullian, A. Whipkey, J. Janick, Eggplant and capsicum peppers: historical texts and images. In: Niemirowicz-Szczytt K. (Ed.), Progress in Research on Capsicum & Eggplant. Warsaw University of Life Sciences Press, Warsaw, pp. 385-392, Poland.
- Kristiansen, K. and Andersen, S.B. 1993. Effects of donor plant temperature, photoperiod and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 67: 105-109.
- Lantos, C., Juhasz, A.G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vagi, P., Mihaly, R., Kristof, Z., Somogyi, N., Pauk, J. 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 97: 285-293.
- Lantos, C., Juhasz, A.G., Vagi, P., Mihaly, R., Kristof, Z., Pauk, J. 2012. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnology Rep*, 6:123-132.
- Luitel, B.P. and Kang, W.H. 2013. *In Vitro* Androgenic Response of Minipaprika (*Capsicum annuum* L.) Genotypes in Different Culture Media. *Horticulture Environment Biotechnology*, 54(2): 162-171.

- Matsubara, S., Yamamoto, M., Jo, M.H. and Murakami, K. 1998. Embriyoid and Callus Formation from Microspores by Anther Culture from July to November in Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University*, 87: 117-122.
- Nowaczyk, P., Kisiala, A. 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *J. Appl. Genet.*, 47(2): 113-117.
- Nowaczyk, P., Olszewska, D., Kisiala, A. 2009. Individual reaction of *Capsicum* F2 hybrid genotypes in anther cultures. *Euphytica*, 168: 225-233.
- Özkum Çiner, D., Tıpırdamaz, R. 2001. A Short Report on the Parameters of a Successful Anther Culture. *G.Ü. Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 2(2): 35-39.
- Özkum Çiner, D., Tıpırdamaz, R. 2002. The Effects of Cold Treatment and Charcoal on the *In Vitro* Androgenesis of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk J. Bot.*, 26: 131-139.
- Parra-Vega, V., 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: 627-633.
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., Segui-Simarro, J.M. 2013. Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 112: 353-360.
- Pickersgill, B. 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96: 129-133
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 344 pages.
- Rodeva, V.N., Irikova, T.P. and Todorova, V.J. 2004. Anther Culture of Pepper (*Capsicum annuum* L.): Comparative Study on Effect of the Genotype. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 18(3): 34-38.
- Supena, E.D.J., Suharsono, S., Jacobsen, E. and Custers, J.B.M. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep*, 25: 1-10.
- Supena, E.D.J., Muswita, W and Suharsono, S. 2006. Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 107: 226-232.

- Supena, E.D.J. and Custers, J.B.M. 2011. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scienta Horticulturae*, 130: 769-774.
- Şalk, A., Arın, L., Deveci, M. ve Polat, S. 2008. Özel Sebzeçilik Ders Kitabı. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Namık Kemal Üniversitesi Basımevi, Tekirdağ, 488 s.
- Taşkın, H., Büyükalaca, S., Keleş, D. and Ekbiç, E. 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 10(75): 17116-17121.
- Terzioğlu, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Abak, K. 2000. İnkübasyon Koşullarının Biber Anter Kültüründe Embriyo Oluşumu Üzerine Etkisi. III. Sebze Tarım Sempozyumu, 11-13 Eylül 2000, ss. 233-237, Isparta.
- Yin, T., Tian, S., Luo, S., Chen, X., Wang, Y., Shen, S. 2010. Studies on isolated microspore embryoid induction of *C. annuum* L. *Front. Agric. China*, 4(4): 438-442.

## ÖZGEÇMİŞ

**Faruk Berkay ERİM**  
erim\_berkay@hotmail.com



## ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2013-2019	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2009-2013	Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya