



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY BİBERİ'NDE SAF HATLARIN ÜRETİLMESİ AMACIYLA
UYGUN ANDROGENESİS YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

PINAR ÇOKLUK

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
NİSAN 2022**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY BİBERİ'NDE SAF HATLARIN ÜRETİLMESİ AMACIYLA
UYGUN ANDROGENESİS YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

PINAR ÇOKLUK
ORCID: 0000-0002-4325-8445

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. SEBAHATTİN ÇÜRÜK
ORCID: 0000-0003-0542-3363

HATAY
NİSAN-2022

25/04/2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Pınar ÇOKLUK

ÖZET

HATAY BİBERİ'NDE SAF HATLARIN ÜRETİLMESİ AMACIYLA UYGUN ANDROGENESİS YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Hatay biberinin bilhassa meyve özellikleri bakımından farklı tiplere sahip, karışık genotiplerden oluşması ve çok sayıda hastalık ve zararlıya karşı olan duyarlılığı, üreticilerin en önemli sorunlarından biridir. Araştırmanın amacı, Hatay biberi köy popülasyonunun androgenesis yöntemiyle saflaştırılmasını sağlayabilecek bir protokol geliştirmektir. Bu çalışmada; Hatay biberi popülasyonlarından seçilen 4 biber hattı ile iki aşamalı ve çift katmanlı anter/mikrospor (shed-mikrospor) kültürü yöntemleri kullanılmıştır.

İki aşamalı yöntemde anterler, aktif kömür (AC) (%0.0 veya 0.5) ve sefotaksim (0.0 veya 250 mg/L) içeren DDV-C C (Dumas de Vault temel ortamı, 0.01 mg/L 2,4-D, 0.01 mg/L kinetin) ortamında inkübe edilmiş, 12. günde DDV-R (Dumas de Vault temel ortamı, 0.1 mg/L kinetin) ortamına aktarılmışlardır. Bu çalışmalardan embriyo elde edilememiştir.

Çift katmanlı sistemde rejenerasyon ortamı olarak %2 maltoz, %1 AC ve %0.6 agar içeren yarı katı alt tabaka ile %2 maltoz, 2.5 µM zeatin ve 5 µM IAA içeren sıvı üst tabakadan oluşan NN ortamı kullanılmıştır. Farklı biber hatlarında androgenesis etkinliğini arttırmak için rejenerasyon ortamına eklenen farklı sefotaksim (0 veya 250 mg/L), agar miktarı (%0.6 veya %0.8) ve agar kaynağı (Sigma, Duchefa) ile sıvı ortam miktarı (1.5 mL veya 3 mL), sıvı ortamın çalkalanması (0 veya 100 rpm), katı ortam miktarı (3 mL veya 5 mL) gibi faktörlerin etkisi incelenmiştir. Rejenerasyon ortamında oluşan embriyolar, 0.1 µM BA, %2 sakkaroz ve %0.6-0.9 agar içeren MS ortamında çimlendirilmiş ve aynı ortamda köklendirilmiştir.

Çift katmanlı kültür ortamının katı tabakasına eklenen %0.8 agar (36.81 embriyo/100 anter), %0.6 agara (19.54 embriyo/100 anter) kıyasla daha yüksek embriyo üretmiş ve her iki uygulamada 3 genotipten toplam 12 bitki gelişerek saksılara dikilmiştir. Ortamlara eklenen 250 mg/L'lik sefotaksim konsantrasyonunun kontaminasyonları azalttığı ve dolayısıyla embriyo üretimini arttırdığı, sıvı ortam miktarı ile çalkalama kombinasyonu uygulamalarından çalkalanmayan ve 1.5 mL sıvı ortam kullanılan kültürlerden embriyo (33.74 embriyo/100 anter) ve ÜçHat1 hattından 1 bitki elde edilmiştir. Farklı katı ve sıvı ortam miktarı ile farklı agar kaynağının kombine edildiği çalışmada, Duchefa agarı embriyo oluşumunda önemli bir fark yaratmamış, bitki üretiminde ise daha olumlu sonuçlar vermiştir. ÜçHat1 hattında oluşan 4 bitkinin tümü Duchefa agarı kullanılan uygulamalardan üretilmiştir.

Çift katmanlı androgenesis yöntemi ile üretilen toplam 18 androjenik bitkinin stoma bekçi hücrelerinde yapılan kloroplast sayımları ile bitki çiçek, yaprak, meyve ve tohum gözlemleri sonucu 5 bitkinin haploid, 13 bitkinin ise diploid/dihaploid (DH) olduğu tespit edilmiştir. Haploid bitkilerin sürgün ucu ve tomurcuklarına 22.2 µM BAP içeren MS ortamında %0.04, 0.2 veya 0.4 kolhisin dozlarının 3 veya 6 gün süreyle uygulanması DH bitkilerin üretilmesini sağlayamamıştır.

2022, 67 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Capsicum annuum*, Hatay biberi, androgenesis, shed-mikrospor kültürü, haploid

ABSTRACT

DEVELOPMENT of APPROPRIATE ANDROGENESIS METHOD for PURE LINES BREEDING in HATAY PEPPER

The most important problems for growers of Hatay local pepper are the non-uniform fruit production and sensitivity to some diseases and pests. The objectives of this investigation are improving an efficient androgenesis protocol for Hatay local pepper, and producing some pure lines. In this research, 4 pepper lines selected from Hatay pepper, two-stage anther culture and shed-microspore culture methods were used.

In the two-stage anther culture, the anthers were incubated in the DDV-C medium (Dumas de Vault basal medium, 0.01 mg/L 2,4-D, 0.01 mg/L kinetin) supplemented with active coal (AC) (0.0 or 0.5%) and cefotaxime (0.0 or 250 mg/L), and transferred to the DDV-R medium on the 12th day. Embryo was not obtained in these experiments.

In shed-microspore culture, NN medium consisting of semi-solid lower layer containing 2% maltose, 1% (AC) and 0.6% agar and liquid top layer containing 2% maltose, 2.5 μ M zeatin and 5 μ M IAA were used as regeneration medium. In order to increase the efficiency of androgenesis in different pepper lines, the effects of cefotaxime (0 or 250 mg/L), agar (0.6 or 0.8%) and agar source (Sigma or Duchefa) added to the regeneration medium, and of the factors such as amount of liquid medium (1.5 or 3 mL), agitation of liquid medium (0 or 100 rpm) and amount of solid medium (3 or 5 mL) were examined. The embryos obtained in the regeneration media were germinated in MS medium containing 0.1 μ M BA, 2% sucrose and 0.6-0.9% agar, and rooted in the same medium.

The 0.8% agar in the solid layer of the shed-microspore culture medium produced more embryo (36.81 embryo/100 anther) than that of 0.6% agar (19.54 embryo/100 anther), and 12 plants were obtained from 3 genotypes in both agar concentration. It was determined that the 250 mg/L cefotaxime added to the media reduced contamination and thus increases embryo production. Embryos (33.74 embryo/100 anther) were obtained from the 1.5 mL liquid medium that not agitated among the applications created by combination of agitation with different amounts of liquid media, and 1 plant was regenerated in ÜçHat1. In the other experiment in which different solid medium (solidified with different agar sources) amounts and liquid medium amounts have been combined, Duchefa agar has not made a significant effect on embryo formation; however, it had positive effects on plant production. All the 4 androgenic plants of ÜçHat1 were produced from the media with Duchefa agar.

As a result of chloroplast counting made in the stomatal guard cells and observation of plant flower, leaf size, fruit and seed formation of 18 androgenic plants obtained from the shed-microspore culture, it was determined that 5 plants were haploid and 13 plants were diploid/dihaploid (DH). Application of the 0.04, 0.2 or 0.4% colchicine concentrations in MS medium containing 22.2 μ M BAP to shoot tips and lateral buds of haploid pepper plants for 3 or 6 days failed to produce DH plants.

2022, 67 pages

Key Words: *Capsicum annuum*, Hatay local pepper, androgenesis, shed-microspore culture, haploid

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında değerli görüşlerini esirgemedi, sahip olduğu bilgi ve tecrübeyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sebahattin ÇÜRÜK'e sabrı ve hoşgörüsü için saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecim boyunca gösterdikleri olumlu katkılardan dolayı Araştırma Görevlisi İlknur KÜLAHLIOĞLU ÇEĞİL'e ve Yüksek Ziraat Mühendisi Betül Merve BAYIROĞLU'na teşekkürü borç bilirim. İhtiyaç duyduğum her an yanımda olduğunu hissettiren, desteği ve içtenliğiyle tez sürecimi kolaylaştıran Araştırma Görevlisi Özge KAYA DEMİRKESER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek Lisans Tezimin yürütülmesi için maddi destek sağlayan Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim. Hayatım boyunca varlıklarıyla bana güç veren sevgili aileme gösterdikleri fedakarlık ve duydukları güven için en içten minnet ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.2. Yöntem	17
3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	17
3.2.2. Uygun Tomurcukların Seçimi ve Dezenfeksiyonu	18
3.2.3. Kullanılan Besin Ortamları ve Kültür Koşulları.....	19
3.2.4. Elde Edilen Haploid Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi	24
3.2.5. Kolhisin Uygulaması	26
3.2.6. Yapılan Ölçümler ve İzlenen Parametreler	27
3.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	28
4.1. İki aşamalı <i>In vitro</i> Anter Kültürü ile Androgenesis Çalışmaları.....	28
4.2. Çift Katmanlı <i>In vitro</i> Anter/Mikrospor Kültürü ile Androgenesis Çalışmaları	31
4.3. Çift Katmanlı <i>In Vitro</i> Anter/Mikrospor Kültürü ile Üretilen Bitkilerde SSR Testleri	48
4.4. Stoma Bekçi Hücrelerinde Kloroplast Sayımı	51
4.5. Androgenesis Çalışmalarında Üretilen Bitkilerin Bazı Morfolojik ve Pomolojik Özellikleri	53
4.6. Kolhisin Uygulamalarından Elde Edilen Bulgular	57
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	58
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 100 gr taze biberin besin maddesi içeriği (Liu ve ark., 2013)	2
Çizelge 1.2. Dünyada biber üretiminde öne çıkan ülkelerin üretim değerleri (ton) (FAO, 2021).....	2
Çizelge 1.3. Türkiye’de üretilen salçalık, dolmalık, sivri ve çarliston tipi biber çeşitleri üretim değerleri (ton) (TÜİK, 2021)	2
Çizelge 1.4. Türkiye tarım bölgelerinin biber üretim değerleri (ton) (TÜİK, 2021)	3
Çizelge 1.5. Akdeniz Bölgesi’nde biber üretimi yapan iller ve üretim değerleri (ton) (TÜİK, 2021).....	3
Çizelge 1.6. Hatay’da yetiştirilen salçalık, dolmalık ve sivri biber çeşitleri üretim değerleri (ton) (TÜİK, 2021).....	4
Çizelge 3.1. Araştırma süresince serada kaydedilen ortalama sıcaklık ve oransal nem değerleri.....	18
Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri ve Özellikleri	24
Çizelge 4.1. ÜçHat1 ve GüHat2 biber hatlarında %0.0 ve 0.5’lik aktif kömür içeren DDV ortamlarında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	28
Çizelge 4.2. ÜçHat1 ve AvHat3 biber hatlarında %0.0 ve 0.5’lik aktif kömür içeren DDV ortamlarında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	29
Çizelge 4.3. YeHat3 biber hattında DDV ortamında kullanılan farklı aktif kömür ve sefotaksim konsantrasyonlarında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	30
Çizelge 4.4. ÜçHat1 ve YeHat3 biber hatlarında 0.0 veya 10.0 mg/L gümüş nitrat eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamlarında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	31
Çizelge 4.5. ÜçHat1 ve YeHat3 hatlarında 0 veya 10 mg/L gümüş nitrat eklenen çift katmanlı ortamlarda oluşan embriyoların çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma ve bitkiye dönüşme oranları.....	32
Çizelge 4.6. ÜçHat1 ve YeHat3 biber hatlarında 0.0 veya 10.0 mg/L gümüş nitrat ile 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	33
Çizelge 4.7. ÜçHat1 ve YeHat3 hatlarında 0 veya 10 mg/L gümüş nitrat ile 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı ortamlarda oluşan embriyoların çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma ve bitkiye dönüşme oranları	33
Çizelge 4.8. ÜçHat1 biber hattında 0.0 veya 10.0 mg/L gümüş nitrat ile 0 veya 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	34
Çizelge 4.9. ÜçHat1 hattında 0 veya 10 mg/L gümüş nitrat ile 0 veya 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı ortamlarda oluşan embriyoların çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma ve bitkiye dönüşme oranları	35
Çizelge 4.10. YeHat3 hattında 0.0 veya 10.0 mg/L gümüş nitrat ile 0 veya 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	36

Çizelge 4.11. YeHat3 hattında 0 veya 10 mg/L gümüş nitrat ile 0 veya 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı ortamlarda oluşan embriyoların çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma ve bitkiye dönüşme oranları	37
Çizelge 4.12. GüHat2 hattında 0.0 veya 10.0 mg/L gümüş nitrat ile 0 veya 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	38
Çizelge 4.13. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatlarında %0.6 veya 0.8 agar ve 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	39
Çizelge 4.14. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatlarında %0.6 veya 0.8 agar ve 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter, embriyo ve gelişen embriyo oranları	40
Çizelge 4.15. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatlarında %0.6 veya 0.8 agar ve 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan embriyoların %0.8 agar içeren çimlendirme ortamında kontaminasyon, kararma, bitkiye dönüşme ve saksıya aktarma oranları	41
Çizelge 4.16. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatlarında %0.6 veya 0.8 agar ve 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	43
Çizelge 4.17. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatlarında %0.6 veya 0.8 agar ve 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan embriyoların %0.8 agar içeren çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma, bitkiye dönüşme ve saksıya aktarma oranları	43
Çizelge 4.18. ÜçHat1 hattında 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde farklı sıvı ortam miktarı ile çalkalama uygulamalarında rejenerasyon ortamında belirlenen kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	44
Çizelge 4.19. ÜçHat1 hattında 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde farklı katı ve sıvı ortam miktarı ile iki agar kaynağı kombinasyonlarında, rejenerasyon ortamında belirlenen kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları	46
Çizelge 4.20. ÜçHat1 hattında 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde farklı katı ve sıvı ortam miktarı ile iki farklı agar kaynağı uygulamalarında, rejenerasyon ortamında oluşan embriyoların çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma, bitkiye dönüşme ve saksıya aktarma oranları	47
Çizelge 4.21. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 donör hatlarının bitkileri ve androgenesis çalışmaları ile bu hatlardan elde edilen <i>in vitro</i> androjenik bitkilerin stoma bekçi hücrelerindeki ortalama kloroplast sayıları	51
Çizelge 4.22. Androgenesis çalışmaları sonucu elde edilen bitkilerden alınan meyvelerin sayısı, ortalama meyve boyu ve tohum sayısı	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde sıvı üst faza alınan anterler	20
Şekil 3.2. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde sıvı ortamda bulunan anterlerden salınan mikrosporelerden gelişen embriyolar	21
Şekil 3.3. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde çimlendirme ortamındaki embriyolar	21
Şekil 3.4. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde embriyodan geliştikten sonra tüpe alınan bitkicikler	23
Şekil 3.5. Tüpteki gelişimini tamamladıktan sonra 0.5 L'lik saksılara aktarılarak dış koşullara alıştırılmış bitki.....	23
Şekil 4.1. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde kararan veya kontamine olan (a), büyüme ucu bulunmayan (b), yalnızca kök (c), yaprak (ç) veya hipokotil (d) oluşturan kalitesiz embriyoların gelişimi	37
Şekil 4.2. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde önemli aşamalar. a) Anterlerin rejenerasyon ortamında sıvı fazdaki görüntüsü, b) Sıvı fazda oluşan embriyolar, c) Çimlendirme ortamında gelişen embriyolar, ç) Tüpe alınan bitkicikler, d) 0.5 L'lik saksılara aktarılmış bitkiler, e) Aklimatize edildikten sonra 16 L'lik saksılara alınarak serada yetiştirilen bitkiler	47
Şekil 4.3. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 donör hatları ile <i>in vitro</i> androgenesis denemelerinden elde edilen bitkilerin DNA'ları kullanılarak 29-30 primer çifti ile yapılan PCR sonucu çoğaltılan DNA'nın jel elektroforez görüntüsü. Leader: 100 bç. G: GüHat2, 2: 3/III-A-1, 3: 4/IV-1, Y: YeHat3, 1: 2/III-1, 6: 2/II-A-1, 7: 2/III-A-1, Ü: ÜçHat1, 8: 6/I-A-2, 10: 6/I-A-4, 11: 6/I-A-5, 12: 6/I-D1	48
Şekil 4.4. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 donör hatlarının DNA'ları kullanılarak 45-46, 51-52, 43-44 ve 47-48 primer çiftleri ile yapılan PCR sonucu çoğaltılan DNA bantlarının jel görüntüsü. L: 100 bç leader, G: GüHat2, Y: YeHat3, Ü: ÜçHat1	49
Şekil 4.5. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 donör hatlarının DNA'ları kullanılarak 31-32 ve 37-38 primer çiftleri ile yapılan PCR sonucu çoğaltılan DNA bantlarının jel görüntüsü. L: 100 bç leader, G: GüHat2, Y: YeHat3, Ü: ÜçHat1	50
Şekil 4.6. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 donör hatlarının DNA'ları kullanılarak 33-34, 39-40, 29-30 ve 49-50 primer çiftleri ile yapılan PCR sonucu çoğaltılan DNA bantlarının jel görüntüsü. L: 100 bç leader, G: GüHat2, Y: YeHat3, Ü: ÜçHat1	50
Şekil 4.7. ÜçHat1 donör bitkisinin (a) ve bu hattan elde edilen haploid 6/I-E (b) ve diploid/dihaploid 6/I-A-5 (c) bitkilerin stoma bekçi hücrelerindeki kloroplastların mikroskop görüntüleri.....	52
Şekil 4.8. GüHat2 donör bitkisinin (a) ve ondan elde edilen haploid 4/IV-1 (b) bitkisinin stoma bekçi hücrelerindeki kloroplastların mikroskop görüntüleri	53
Şekil 4.9. YeHat3 donör bitkisinin (a) ve diploid/dihaploid 2/III-A (b) bitkilerin stoma bekçi hücrelerindeki kloroplastların mikroskop görüntüleri	53
Şekil 4.10. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde üretilen haploid (a) ve diploid/DH (b) bitkilerin genel görüntüsü.....	54
Şekil 4.11. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde gelişen haploid (solda) ve diploid/DH (sağda) bitkilerin boğum araları	54

Şekil 4.12. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminden elde edilen haploid (solda) ve diploid/DH (sağda) bitkilere ait yaprak ve çiçekler	55
Şekil 4.13. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminden elde edilen haploid PÇ8-6/III-A-1 (a) ve diploid/DH PÇ8-1/IV-A (b) bitkilerden alınan olgun meyveler.	57



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Derece Celsius
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: gram
L	: litre
m	: metre
mm	: milimetre
mM	: milimolar
mg	: miligram
mL	: mililitre
ppm	: part per million (milyon birimde bir birim)
rpm	: rotation per minute (dakikadaki devir sayısı)
sn	: saniye
µg	: mikrogram
µL	: mikrolitre
µM	: mikromolar

KISALTMALAR

ABA	: Absizik Asit
AgNO ₃	: Gümüş Nitrat
B5	: Gamborg ve ark. (1968) B5 ortamı
BA veya BAP	: N ⁶ -Benzil Adenin veya 6-Benzil Amino Purin
bç	: Baz Çifti
CP	: Chambonnet (1988)
CTAB	: N-Cetyl-N, N, N-Trimetil Amonyum Bromid
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DDV	: Dumas de Vault ve ark. (1981)
DH	: Doubled Haploid (Dihaploid)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleozit Trifosfat
EDTA	: Etilen Dinamin Tetra Asetik Asit
FAO	: Food and Agriculture Organization
HCl	: Hidroklorik Asit
HSD	: Honestly Significant Difference

IAA	: Indol-3-asetik asit
IDT	: Integrated DNA Technologies
ISSR	: Inter-Simple Sequence Repeat (Basit Tekrarlı Diziler Arası)
LS	: Linsmaer ve Skoog (1965)
MS	: Murashige ve Skoog (1962)
N	: Nitsch (1969)
NAA	: α -Naftalen Asetik Asit
NN	: Nitsch ve Nitsch (1969)
Ö.D.	: Önemli Değil
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi)
SSR	: Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
TBE	: Tris-Borate-EDTA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
2,4-D	: 2-4 Diklorofenoksi Asetik Asit

1. GİRİŞ

Solanaceae familyasına ait olan ve genellikle biberler olarak bilinen *Capsicum* cinsinin türleri, dünyadaki en önemli sebzelerdendir (Rubatzky ve Yamaguchi, 1997). Anavatanı Orta Amerika ve Meksika olmakla birlikte biber, Antartika hariç tüm kıtalarda yetiştirilebilmektedir. Ancak ılıman, tropik ve subtropik iklime sahip bölgelerde yetiştirildiğinde verim ve kalite artmaktadır (Göçmen, 2006).

Yaklaşık 30 tür içeren *Capsicum* cinsinin kültüre alınmış 5 türü (*C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L. ve *C. pubescens* Ruiz & Pav.) ve bu türlere ait yüzlerce çeşit bulunmaktadır (Kaplan, 2012).

Biber çeşitleri, birçok araştırmacı tarafından meyve özelliklerine (renk, şekil, irilik, tat vb.) ve kullanım durumlarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır (Özalp, 2010). Ülkemizde yaygın olarak kullanılan sınıflandırmaya göre biber çeşitleri; sivri, çarliston, dolmalık, konik (salçalık, Maraş biberi, kapy vb.), iri kare kesitli (California Wonder, Yolo Wonder vb.) ve süs biber çeşitleri (konik meyveliler, yuvarlak meyveliler, domates meyveliler)'dir (Öntürk, 2018).

Türkiye sebze tüketim kültüründe çok eski bir yere sahip olan biber, taze-sofralık kullanımının yanı sıra bölgelere özgü salça, turşu, baharat ve konserve yapımında, ayrıca gıda, ilaç ve boya sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Binbir, 2010; Bozolkalfa ve Eşiyok, 2010).

İnsan sağlığı açısından da çok önemli olan biber, antioksidan özelliğe sahip renk maddeleri ile A, B, C ve E vitaminleri içeren, yüksek besin değeri olan bir sebze olarak bilinir. Bibere acılık veren kapsaisin ($C_{18}H_{27}O_3N$) alkaloidi mide ve bağırsak hareketlerini arttırır, hazmı kolaylaştırır, emilimi teşvik eder ve peristaltisi hızlandırır (Binbir, 2010; Şeker, 2018). 100 g yenilebilir taze biberin besin değeri Çizelge 1.1'de verilmiştir (Liu ve ark., 2013).

FAO verilerine göre biber üretiminde Çin ve Meksika'nın ardından üçüncü sırada yer alan ülkemizde 2015-2019 yılları üretim ortalaması 2 487 705 tondur (Çizelge 1.2) (FAO, 2021).

Çizelge 1.1. 100 gr taze biberin besin maddesi içeriği (Liu ve ark., 2013)

Besin Maddesi	Besin İçeriği
Enerji (kcal)	20.0 – 40.0
Protein (g)	0.8 – 2.0
Yağ (g)	0.2 – 0.6
Karbonhidrat (g)	5.4 – 9.5
Magnezyum (mg)	0.0 – 25.0
Vitamin A, RAE (µg)	10.0 – 157.0
Vitamin B6 (mg)	0.22 – 0.51
Vitamin C (mg)	44.3 – 183.5
Vitamin E, alfa-tokoferol (mg)	0.37 – 0.69
Niasin (mg)	0.05 – 1.2
Kalsiyum (mg)	7.0 – 18.0
Fosfor (mg)	20.0 – 46.0
Demir (mg)	0.3 – 1.2

Çizelge 1.2. Dünyada biber üretiminde öne çıkan ülkelerin üretim değerleri (ton) (FAO, 2021)

Ülke	2015	2016	2017	2018	2019	Ortalama
Çin	17207774	17654347	18105908	18557347	19007248	18106525
Meksika	2389829	2737028	3296875	3379289	3238245	3008253
Türkiye	2191888	2457822	2608172	2554974	2625669	2487705
Endonezya	1915016	1961598	2359441	2542332	2588633	2273404
İspanya	1102522	1175635	1277908	1275460	1402380	1246781

TÜİK verilerine göre Türkiye’de 2016-2020 yılları arasında yapılan biber üretiminin yaklaşık %44’ü salçalık, %36’sı sivri %15’i dolmalık, ve %5’i çarliston tipi çeşitlerden oluşmaktadır (Çizelge 1.3) (TÜİK, 2021).

Çizelge 1.3. Türkiye’de üretilen salçalık, dolmalık, sivri ve çarliston tipi biber çeşitleri üretim değerleri (ton) (TÜİK, 2021)

Yıl	Salçalık (Kapy)	Dolmalık	Sivri	Çarliston	Toplam
2016	957030	418435	967466	114891	2457822
2017	1107713	420904	945361	134194	2608172
2018	1128060	397175	930349	99390	2554974
2019	1234423	371918	902203	117125	2625669
2020	1291091	389957	838890	116967	2636905
Ortalama	1143663	399678	916854	116513	2576708

Son beş yılın (2016-2020) verilerine göre Türkiye biber üretiminin yaklaşık %41’lik kısmını oluşturan Akdeniz Bölgesi, 1 043 114 tonluk ortalamasıyla ilk sırada yer almaktadır. Bunu Ege Bölgesi ve Marmara Bölgesi takip etmektedir (Çizelge 1.4) (TÜİK, 2021).

Çizelge 1.4. Türkiye tarım bölgelerinin biber üretim değerleri (ton) (TÜİK, 2021)

Tarım Bölgesi	2016	2017	2018	2019	2020	Ortalama
Akdeniz Bölgesi	909593	1038081	1052063	1117384	1098449	1043114
Ege Bölgesi	627957	661735	641621	664845	741790	667590
Karadeniz Bölgesi	271117	249993	159289	156546	152222	197833
Marmara Bölgesi	215628	226814	268743	219607	212667	228692
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	167348	161008	164312	187849	138851	163874
Orta Doğu Anadolu Bölgesi	133745	140808	130773	129323	131869	133304
Orta Kuzey Anadolu Bölgesi	58869	57253	63124	65450	69748	62889
Orta Güney Anadolu Bölgesi	63048	62901	63266	71466	75980	67332
Doğu Anadolu Bölgesi	3707	3405	3712	4183	4337	3869
Türkiye	2451012	2601998	2546903	2616653	2625913	2568496

Akdeniz Bölgesi üretim verileri incelendiğinde, Hatay 64 572 tonluk ortalaması ile Antalya, Mersin, Adana ve Kilis’in ardından beşinci sırada yer almaktadır (Çizelge 1.5) (TÜİK, 2021).

Çizelge 1.5. Akdeniz Bölgesi’nde biber üretimi yapan iller ve üretim değerleri (ton) (TÜİK, 2021)

İl	2016	2017	2018	2019	2020	Ortalama
Antalya	390072	447791	439255	501213	533435	462353
Mersin	273792	294952	308892	312034	217590	281452
Adana	53748	115833	124061	120723	139793	110832
Kilis	75223	59850	62250	64578	67297	65840
Hatay	66333	66006	61538	60272	68712	64572
K.maraş	21026	20534	22673	21267	20968	21294
Gaziantep	18593	18731	19039	19536	32533	21686
Osmaniye	10806	14384	14355	17761	18121	15085
Toplam	909593	1038081	1052063	1117384	1098449	1043114

Hatay ilimizde 2016-2020 yıllarında yapılan ortalama biber üretiminin yaklaşık %73’ü salçalık, %2’si dolmalık ve %25’i sivri çeşitlerden oluşmaktadır (Çizelge 1.6) (TÜİK, 2021).

Çizelge 1.6. Hatay’da yetiştirilen salçalık, dolmalık ve sivri biber çeşitleri üretim değerleri (ton) (TÜİK, 2021)

Yıl	Salçalık (Kapyra)	Dolmalık	Sivri	Toplam
2016	43655	2189	20489	66333
2017	45728	1676	18602	66006
2018	46861	1568	13109	61538
2019	44054	1834	14384	60272
2020	55116	701	12895	68712
Ortalama	47083	1594	15896	64572

Ülkemizde yetiştirilen yöresel biberlerin çeşit niteliğinde olmayıp, genetik bakımdan karışık popülasyonlar halinde olması, yetiştiricilikteki en önemli sorunlardan biridir (Çağlar ve ark., 2004). Hatay’da yetiştirilen biber genotipleri de bilhassa meyve özellikleri bakımından farklı tiplerin bulunduğu karışık popülasyonlardan oluşmaktadır (Öntürk, 2018). Ayrıca bu popülasyonların çok sayıda hastalık ve zararlıya karşı duyarlı olması, üreticilerin karşılaştıkları bir diğer önemli sorundur.

Genetik saflaştırma ile elde edilecek hatlar, farklı özelliklere (acılık, kuru madde, meyve eti kalınlığı, asitlik vb.) sahip, bazı hastalık ve zararlılara toleranslı, standart ve hibrit biber çeşitlerinin geliştirilmesinde kullanılabilecekleri için çok değerli ıslah materyalleridir. Androgenesis, klasik ıslahta yapılan saflaştırma işlemine kıyasla zaman kazandırması ve düşük maliyetli olması nedeniyle, saf hat elde etmede kullanılması gereken bir *in vitro* yöntemdir. Androgenesis ile elde edilen haploid bitkiler çeşitli kimyasal maddelerle (kolhisin, orizalin vb.) “doubled haploid (DH)” hale getirilebilmekte, böylece %100 homozigot hatlara 1-2 yıl gibi kısa bir sürede ulaşılabilmektedir (Çağlar ve ark., 2004).

Androgenesis, haploid embriyonun yalnızca erkek gamet hücresinden meydana gelmesi ile gerçekleşir. Androgenez sırasında, polen tanesini normal koşullarda iki çekirdekli bir yapıya dönüştüren gametik gelişme yönü (mayoz bölünme ile başlayıp, gamet oluşumuyla devam eden süreç); henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmektedir ve böylece *in vitro* koşullarda haploid embriyolar elde edilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001; Badiger, 2017).

Anter kültürü, anterlerin binlerce mikrospor içermesi sebebiyle çok sayıda haploid bitki üretimine olanak sağlar ve biber androgenesis çalışmalarında en çok tercih edilen yöntemdir (Çömlekçioğlu ve Ellialtıoğlu, 2018). Biberde androgenesis, *in vitro* anter veya izole edilmiş mikrospor kültürleri kullanılarak yapılabilmektedir. Bu yöntem esas

olarak, henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları içeren anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarında inkübe edilmesi veya anterlerden izole edilen mikrosporların uygun ortamda kültüre alınması sonucu haploid bitki elde edilmesi olarak tanımlanabilir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001; Lantos ve ark., 2009). Bu amaçla geliştirilmiş olan, shed-mikrospor kültürü olarak da adlandırılan çift katmanlı (fazlı) anter/mikrospor kültürü sistemi, başarılı bir yöntem olması sebebiyle araştırmacılar tarafından tercih edilen bir sistemdir. İlk olarak 1997 yılında Dolcet-Sanjuan ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve modifiye edilerek başka araştırmacılar tarafından da kullanılan bu sistemde yarı katı alt tabaka ve sıvı üst tabaka olmak üzere çift katmanlı bir ortam kullanılmaktadır. Ortama alınan anterler bir süre sıvı üst tabakada yüzer, içerisindeki mikrosporlar büyüdükçe bu anterler yarıp açılır ve mikrosporları ortama salınmış olur. Mikrosporların mekanik olmayan bir biçimde izole edilip sıvı besi ortamında ayrı ayrı büyümesine olanak sağlaması nedeniyle, bu sistemde elde edilen rejenerantların genellikle mikrospor kökenli olduğu kabul edilir (Arı ve ark., 2016).

Biber anter kültüründe başarı; genotip başta olmak üzere, donör bitki yaşı ve yetiştirme koşulları, ortam, ortama eklenen büyüme düzenleyicileri, ön uygulamalar (düşük veya yüksek sıcaklık vb.) ve süresi gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Hatay'da yetiştirilen popülasyonlarda kullanılabilecek bir anter kültürü protokolü literatürde henüz rapor edilmemiştir. Bu çalışmanın amacı, Hatay biber popülasyonlarından seçilmiş olan bazı hatların anter kültürü ile saflaştırılmasını sağlayabilecek etkin bir protokolün geliştirilmesi ve saf hatların üretilmesi olarak belirlenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

George ve Narayanaswamy (1973), biber anter kültürü çalışmalarında LS (Linsmaer ve Skoog (1965) ortamı) bazal ortamına, hindistan cevizi sütü (CM), yeast ekstraktı (YE), kazein hidrolizat (CH) ile oksinler ve sitokinler gibi bitki büyüme takviyelerini, farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda dahil ettiklerini, karbon kaynağı olarak %2 sakkarozu kullandıklarını bildirmişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre aşağıdaki üç ortamda, hücrelerde sürekli bölünme gözlemlediklerini belirtmişlerdir; 1) LS, 0.3 ppm kinetin, 3.0 ppm IAA (Indol-3-asetik asit), 2) LS, 3.0 ppm kinetin, 1.0 ppm IAA ve 3) LS, 400 ppm CH, 0.5 ppm IAA, 100 ppm inositol. Embriyoid taşıyan anterlerin 3. ortama sık sık transfer edilmesi ile embriyoidin kalp ve torpido aşamalarında daha fazla farklılaşması sağlanmıştır. Çalışma sonucunda, IAA'nın, haploid morfogenez oluşumunda polen içinde hücre bölünmesinin indüklenmesi için gerekli olduğu, ancak kültüre alınan yüzlerce anterden elde edilen canlı bitkicik oranının %0.1'den fazla olmadığı rapor edilmiştir.

Dumas de Vault ve ark. (1981) tarafından geliştirilen iki aşamalı anter kültürü sistemi; kültürün ilk 8 günü boyunca karanlıkta 35°C'lik ısı şoku uygulanan anterlerin büyüme düzenleyici içeren ortamlarda [C ortamı: Dumas de Vault ve ark. (1981)'nın temel ortamında 0.01 mg/L 2,4-D (2-4 Diklorofenoksi Asetik Asit) ve 0.01 mg/L kinetin] inkübe edilmesinin ardından, rejenerasyon ortamında [R ortamı: Dumas de Vault ve ark. (1981)'nin temel ortamında 0.1 mg/L kinetin] alt kültüre alınmasını esas almaktadır. Bu sistemde %5-40 oranında embriyo elde edildiği bildirilmiştir (Dumas de Vault ve ark., (1981); Supena ve ark., (2006a)'dan).

Abak (1983) tarafından, yerel biber populasyonlarında iki aşamalı kültür sistemi uygulanmış, aynı laboratuvar koşulları altında Türkiye orijinli biberlerde başarı elde edilemediği rapor edilmiştir. Araştırmacı, 'İnce Sivri 35 X Pm217' melezlemesinde İnce Sivri 35 ile ikinci geriye melez sonucu oluşan bitki anterlerini kullanarak yaptığı çalışmada, C ortamına (Dumas de Vault ve ark. (1981)'nin temel ortamı) 5 mg/L kinetin, 5 mg/L 2,4-D, sakkarozun 4 dozu (30, 60, 90, 120 g/L) ve demiri de tek-çift dozlar (18.65-37.3 mg/L Na₂EDTA, 13.9-27.8 mg/L FeSO₄7.H₂O) şeklinde değiştirerek eklemiştir. Araştırmaya göre en başarılı sonuçlar; "5 mg/L kinetin, 5 mg/L 2,4-D, 120 g/L sakkaroz, çift doz demir eklenmiş" ortamdan alınmıştır. Çalışmada 100

anterden ortalama 18.56 embriyo ve 10.38 bitki elde edilmiştir (Abak (1983); Çömlekçioğlu ve Ellialtıoğlu (2018)'dan).

Qin ve Rotino (1995), 3 biber donör bitkisinden elde ettikleri 17 androgenik bitkinin bekçi hücrelerindeki kloroplast sayılarını belirlemiş ve stoma uzunluklarını ölçmüşlerdir. Bu amaçla, büyüme ucundan (tepesinden) aldıkları ilk 3 yaprakçığın alt epidermisini soymuş ve %1'lik gümüş nitrat çözeltisi damlatılmış lam üzerine yerleştirdikten 5 dk sonra bir faz kontrast mikroskopunda 1000 büyütmede incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda haploid bitkilerin, diploid bitkilerden önemli ölçüde daha az kloroplast ve daha kısa stoma uzunluğu gösterdiğini tespit etmişlerdir. Her iki karakter ploidi seviyesi ile pozitif korelasyon göstermekle birlikte, üretilen *in vitro* bitkiciklerin ploidi seviyelerini belirlemek (haploid veya diploid olarak tespit etmek) için kloroplast sayısının, stoma uzunluğuna kıyasla daha güvenilir veri sağladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, yaptıkları gözlem sonucunda 8 haploid bitkinin kloroplast sayıları ortalamasının 8.3 ila 11.0 arasında, 9 diploid bitkide ise bu ortalamanın 16.5 ila 19.8 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir.

Dolcet-Sanjuan ve ark. (1997)'nin geliştirdiği çift katmanlı anter/mikrospor (shed-microspore) kültüründe kullandıkları ortamın; %2 maltoz, %0.5 aktif kömür ve %0.3 Gelrite içeren yarı katı alt tabaka ile %2 maltoz içeren sıvı üst tabakadan oluşan (çift katmanlı) modifiye edilmiş bir NN ortamı (Nitsch ve Nitsch (1969)'ın temel ortamı: 0.1 mM FeEDTA, 20 g/L maltoz, pH 5.8) olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu yöntemi kullanarak dolmalık biberlerde yaptıkları çalışmada, anterleri bir hafta boyunca 7°C'de karanlık koşullarda inkübe ederek embriyogenezi uyarmış, ardından 28°C'de 8 hafta boyunca kültüre alarak haploid bitkicikler elde etmeyi başarmışlardır. Genotiplere bağlı olarak her 100 tomurcuktan üretilen embriyo sayısının 3 ila 750, bitki sayısının ise 0.25 ila 8 aralığında olduğunu bildirmişlerdir.

Matsubara ve ark. (1998), temmuzdan kasım ayına kadar elde ettikleri anterlerin kültürü ile altı çeşit biber (*Capsicum annuum* L.) mikrosporlarından embriyoid ve kallus rejenere ettiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmaya göre, tek çekirdekli aşamada mikrosporlar içeren anterler, 0.004 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L kinetin, 30 g/L sakkaroz ve 2 g/L Gelrite ile desteklenmiş MS (Murashige ve Skoog (1962) temel ortamı) ortamında kültüre alınmışlardır. Anterler, 24 saat boyunca 35°C'de tutulmuş ve daha sonra 40 gün boyunca 16 saat gün uzunluğunda 25°C'de inkübe edilmiştir. Embriyoid ve kallus

oluşum oranının çeşitlere ve anterlerin alındığı döneme (aylara) bağlı olarak değiştiği; yüksek embriyoid oluşumu için eylül ve ekim aylarında 15°C ila 25°C arası bitki yetiştirme ortam sıcaklığının etkili olduğu belirtilmiştir. Embriyoidlerin hormonsuz MS ortamına aktarılaraq bitkiciğe dönüştüğü, ardından aklimatize edildiği ve tüm bitkiciklerin normal olarak büyüdüğü belirtilmiştir. Kök ucu hücrelerindeki kromozom sayısına göre 19 bitkinin haploid ($2n = x = 12$), bir bitkinin diploid ($2n = 2x = 24$) ve 3 bitkinin aneuploid ($2n = 2x = 20-23$) olarak tespit edildiği bildirilmiştir.

Gémesné Juhász ve ark. (2001), farklı tatlı biber hatlarını kullanarak yaptıkları çalışmada, Dumas de Vaulx ve ark. (1981)'nin besi ortamını kullanarak anterleri (15 anter/Petri) kültüre almışlardır. Çalışmaya göre anterler, inkübasyon süresinin 4. ila 8. haftasında doğrudan embriyo gelişimi göstermişlerdir. Bitki gelişim oranı %1-11 olarak belirlenmiştir. Flow Sitometri analizine göre DH-R1 rejenerantlarının ortalama %68.5'i haploid ($1C = n = 12$), %29.8'i spontan DH (dihaploid, $2C = 2n = 24$), %0.7'si tetraploid ($4C = 4n = 48$), %1'i haploid ve diploid genomların genetik mozaizmine sahip bir kimerayı içeren aneuploid bitkiden oluşmuştur. Çalışmada, haploid bitkiler, 4-6 gün boyunca 50-400 mg/L kolhisin içeren ortama yerleştirilerek %50 ila %95 oranında DH bitki elde etmişlerdir. Anter alınan donör bitkilerin ($2n$), haploid rejenerantların (n), spontan ($2n$) ve kolhisin uygulaması ile indüklenmiş DH ($2n$) bitkilerin moleküler polimorfizmi RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA: Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi), SSR (Simple Sequence Repeats: Basit Dizi Tekrarları) ve ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat: Basit Tekrarlı Diziler Arası) ile analiz edilmiştir. Donör bitkilerin analizi, DH-R2 jenerasyonu ile karşılaştırıldığında beklenmedik bir şekilde geniş bir moleküler polimorfizm olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar, mayotik rekombinasyon sırasında meydana gelen genetik değişikliklerin, kolhisine bağlı genomik katlama sırasında meydana gelenlerden daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Özkum ve Tıpırdamaz (2002), MS ortamına NAA (α -Naftalen Asetik Asit)/BA (Benzil Adenin) hormon kombinasyonlarının eklenmesinin androgenik embriyo oluşumunu arttırabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yapılan çalışmada, *Capsicum annuum* L. tomurcuklarının 4°C'de 48 veya 96 saat inkübe edilmesinin (soğuk şoku uygulaması) ve ortama %0.25 aktif kömür eklenmesinin embriyo oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Sitolojik çalışmalarla, tomurcuk ve anterlerin büyüklüğü ile morfolojik özellikleri

tanımlanmış ve mikrospor aşamaları belirlenmiştir. Çalışmaya göre 5 mm çapında ve 7 mm uzunluğunda olan tomurcukların, 1. polen mitoz aşamalarında ve tek çekirdekli mikrosporları içerdikleri bu aşamada, taç yaprakların uzunluğunun, çanak yapraklar ile aynı boyda veya biraz daha uzun olduğu gözlenmiştir. Çalışmada MS temel besin ortamı “4 mg/L NAA ve 1 mg/L BA” veya “1 mg/L NAA ve 4 mg/L BA” kombinasyonları ile desteklenmiştir. Araştırmaya göre en yüksek embriyo sayısı, soğuk muamelelere tabi tutulmayan 4 mg/L NAA ve 1 mg/L BA ile aktif kömür ihtiva eden ortam üzerinde kültüre alınan kontrol anterlerinden elde edilmiştir. Ortalama androjenik embriyo üretimi yaklaşık %12.5 (25 embriyo/200 anter) olarak bulunmuştur. Büyüme düzenleyicileri ve aktif kömürün ortama eklenmesinin, biber anter kültüründe embriyo oluşumu üzerinde, soğuk ön uygulamadan daha büyük bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Tıprıdamaz ve Ellialtıoğlu (2002), çift fazlı (katmanlı) sistemde aktif kömür ve soğuk şoku uygulamalarının anterlerdeki içsel ABA (Absizik Asit) miktarı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Araştırmada biber tomurcukları, kültür öncesi 4°C’de 80, 90 ve 100 saat ya da 9°C’de 5 ve 9 günlük sürelerde soğuk şokuna tabi tutulmuşlardır. Ortamın agar ile jelleştirilen fazına %1 aktif kömür filtre edilerek eklenmiştir. Çalışma sonucunda, denemelerde uygulanan soğuk şokları ve aktif kömürün anterlerdeki ABA miktarını azalttığı, en düşük ABA miktarının 9°C’de 9 gün tutulan ve ortamlarında aktif kömür bulunan anterlerde ortaya çıktığı belirtilmiştir. Ancak, uygulanan aktif kömür ve soğuk şokları ile ABA’nın azalmış olmasına bağlı olarak çalışmada embriyo oluşumunun artmadığı rapor edilmiştir.

Büyükalaca ve ark. (2004), biber anter kültüründe farklı bitki yetiştirme koşulları ile rejenerasyon ortamına eklenen farklı gümüş nitrat (AgNO_3) konsantrasyonlarının haploid embriyo üretimi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Lokal bir kırmızı biber popülasyonundan seçilen U-247 ve U-238 genotipleri bitki materyalleri olarak kullanılmıştır. Çiçek tomurcukları ya serada ya da açık tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerden alınmıştır. Çalışmada, 4 mg/L NAA, 0.1 mg/L BAP (Benzil Amino Purin), %0.25 aktif kömür, 30 g/L sakkaroz ve dört farklı AgNO_3 konsantrasyonu (5, 10, 15 ve 20 mg/L) içeren MS ortamları kullanılmıştır. Anterler, 2 gün boyunca 35°C’de karanlık koşullarda inkübe edildikten sonra 28°C’de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot uygulamasında kültüre alınmıştır. Çalışmaya

göre kombinasyonların tümünde haploid embriyo elde edilmiş, en çok embriyoyu 15 mg/L AgNO₃ (100 anterden 45.7 embriyo) içeren ortamında U-247 genotipi vermiştir. Serada yetiştirilen bitkilerden alınan anterler, açık alan koşullarında yetiştirilenlerden 4 kat daha fazla embriyo üretmiştir.

Çağlar ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada MS besin ortamına; %0.25 aktif kömür, 10 mg/L AgNO₃, oksinlerden NAA (2.0, 4.0, 6.0 mg/L) veya 2,4-D (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L) ile sitokininlerden BAP (0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L) veya kinetin (0.1, 1.0, 5.0 mg/L) ilave ederek farklı ortamlar oluşturmuşlardır. Farklı bitki büyüme düzenleyecisi içeriğine sahip besi ortamları üzerinde kültüre alınan anterlere karanlıkta 7 gün süre ile 4°C, 29°C veya 35°C olmak üzere 3 farklı ön sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Toplam 37 uygulamadan yalnızca “0.1 mg/L BAP, 4 mg/L NAA, %0.25 aktif kömür ve 10 mg/L AgNO₃” kombinasyonunda doğrudan embriyogenez meydana geldiği belirtilmiştir. Embriyo oluşturma oranı %2.8 (9 embriyo/327 anter) olarak bildirilmiştir.

Supena ve ark. (2006a), çift katmanlı (fazlı) sistemi Endonezya acı biber genotiplerine uygulamışlardır. Araştırmacılar, %2 maltoz ve %0.5 aktif kömür (Duchefa) içeren Nitsch bileşenlerinden (Nitsch ve Nitsch 1969) oluşan ve %0.6 Bitki Agarı (Duchefa) kullanılarak jelleştirilen alt katman ile; %2 maltoz ve Nitsch bileşenlerini içeren agarsız üst sıvı fazından olmak üzere iki ortamdan oluşan çift katmanlı bir ortam kullanmışlardır. Sıvı üst faza 2.5 µM zeatin ve 5 µM IAA eklenmiştir. Her iki katmanın ortamları, otoklav edilerek sterilize edilmeden önce pH değerleri 5.8'e ayarlanmıştır. Yaklaşık 1.5 ml katı ortam ve 1 ml sıvı üst faz bulunan 3 cm çapındaki Petri kapları kullanılmıştır. Araştırmacılara göre protokolün kritik faktörleri şunlardır: %50'den fazla geç tek hücreli mikrosporları içeren çiçek tomurcuklarının seçimi, tomurcukların 4°C'de 1 gün bekletilmesi, ardından anterlerin 9°C'de 1 hafta boyunca çift katmanlı ortam sisteminde ve daha sonra 28°C'de sürekli karanlıkta kültüre alınmasıdır. Test edilen acı biberin 10 genotipi bu protokole cevap vermiş, en iyi genotipler çiçek tomurcuğu başına 4 ila 7 bitki üretmiştir.

Supena ve ark. (2006b) bu protokolü geliştirerek aynı yıl yaptıkları bir diğer çalışmada, kültür ortamında sırasıyla 200 ve 10 mg/L'lik timentin ve rifampisin antibiyotik konsantrasyonlarını sağlayarak donör eksplantlarından kaynaklanan kontaminasyonu önlemişlerdir. Ayrıca, çalışma sonuçlarına göre kültürün ilk haftası

boyunca *in vitro* kolhisin (100 μ M) uygulaması, DH bitkilerin yüzdesini arttırmada oldukça etkili olmuştur.

Koleva-Gudeva ve ark. (2007), biber anter kültüründe somatik haploid embriyoların elde edilebilmesi için inkübasyon uygulamasıyla bitki büyüme düzenleyicilerinin (özellikle oksinler ile desteklenmiş besin ortamı) önemli faktörler olduğunu bildirmişlerdir. Bu bağlamda üç ayrı inkübasyon uygulaması ile MS, N (Nitsch (1969) temel ortamı), LS, NN ve CP (Chambonnet (1988) indüksiyon ortamı) ortamları üzerinde biber anter kültürü çalışmaları yapmışlar ve aşağıdaki sonuçları elde etmişlerdir. 1) Anterler LS ve NN ortamlarında, soğuk (7°C'de) ve karanlık koşullarda 7 gün boyunca inkübe edildikten sonra, eksplantlar 4 hafta boyunca ışık koşullarına (25°C'de 12 saat fotoperiyot) transfer edilince kallus üretmiştir. 2) Anterler MS ve N ortamlarında, 25°C'de ve karanlık koşullarda 7 gün inkübe edildikten sonra, eksplantları 4 hafta boyunca ışık koşullarına (25°C'de 12 saat fotoperiyot) transfer etmek, kallus oluşumunu sağlamıştır. 3) Anterlerin CP ortamında, 8 gün karanlıkta ve 35°C'de, sonraki 4 gün boyunca ışık koşullarında (25°C'de 12 saat fotoperiyot) inkübe edilmesi ve ardından eksplantların 4 hafta boyunca R1 (Chambonnet rejenerasyon ortamı (1988); Irikova ve ark., (2011)'den) ortamına aktarılması ile anterlerden embriyolar elde edilmiştir.

Supena ve Custers (2011), çalışmalarında çift katmanlı anter/mikrospor kültürü yöntemini kullanarak Endonezya acı biber genotiplerinde elde edilen normal görünümlü embriyo oranını arttırmayı amaçlamışlardır. Diğer androjenik yöntemler için de geçerli olan bu sorunun çözümü için yapılan bu çalışmada protokol geliştirilerek, %50'nin üzerinde normal görünümlü embriyo elde edilmesi sağlanmıştır. Araştırma bulgularına göre bu başarıyı sağlayan faktörler, sıvı üst katmana 2.5 μ M zeatin ve 5 μ M IAA eklenmesi ve 3 haftalık kültürden sonra 28°C olan inkübasyon sıcaklığının 21°C'ye düşürülmesi olmuştur. Çift katmanlı anter/mikrospor yönteminde katı besin ortamına eklenen %1 oranındaki aktif kömürün toplam embriyo üretimini olumlu yönde etkilediği, absizik asit ve artan ozmolalitenin embriyo üretimini olumsuz etkilediği rapor edilmiştir.

Genotip, donör bitki, tomurcuk veya anterlere yapılan ön uygulamalar, mikrospor gelişme aşaması ve inkübasyon koşulları gibi faktörlerin androjenik yanıtı etkilediğini belirten Ercan ve Şensoy (2011), bu faktörlerden genotipin etkisini ortaya koymak

amacıyla yaptıkları çalışmada 11 farklı biber çeşidi (4 uzun, 1 paprika, 2 dolmalık, 2 kapy, 2 uzun yeşil) kullanmışlardır. Araştırmaya göre taç yaprakları, çanak yaprakları ile aynı uzunlukta veya biraz daha uzun olan çiçek tomurcukları toplandıktan sonra 24 saat 4°C’de ve karanlıkta tutulmuştur. Dört mg/L NAA ve 1 mg/L BA içeren, 30 g/L sakkaroz ve 8 g/L agar eklenen MS ortamı hazırlanmış ve her Petri kutusuna (6 cm çapında) bir tomurcuğun anterleri yerleştirilmiştir. Petri kapları 8 gün boyunca 35°C’de karanlıkta inkübe edilmiş ve ardından 3000 lüks ışık şiddeti ile 16/8 saat karanlık/ışık periyodu ile 25°C’ye aktarılmışlardır. İyi gelişmiş embriyolar, daha fazla gelişim gösterebilmeleri için 30 g/L sakkaroz ve 8 g/L agar içeren hormonsuz MS ortamına transfer edilmiş; embriyo, kallus ve bitkicik sayısı ve yüzdeleri belirlenmiştir. Araştırma sonuçları, biber tiplerinin farklı androjenik tepkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmada, androjenik yanıtın genotipe göre değiştiği ve 11 genotipin 2398 anterinin *in vitro* kültüründen toplam 44 embriyonun (%1.83) ve 12 bitkiciğin (%0.5) elde edildiği rapor edilmiştir. .

Shrestha ve ark. (2011), F₁ biber çeşidini kullanarak yaptıkları anter kültürü çalışmaları sonucunda gelişen bitkilerden hasat ettikleri meyvelerin verim ve kalite değerlerini incelemişlerdir. Buna göre haploid meyvelerin uzunluğunun 1.7 cm ile 6.8 cm arasında değiştiği ve ortalama değerin 3.3 cm olduğu rapor edilmiştir. Diploid rejenerantlarda ise bu sonuçların 3 cm ile 8.4 cm arasında değiştiği ve ortalama değerin 5 cm olduğu belirtilmiştir. Birkaçı dışında tüm haploid meyvelerin tohumuz olduğunu belirten araştırmacılar, diploid meyvelerden aldıkları ortalama tohum sayısının 0 ile 163 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Keleş ve ark. (2015) yaptıkları anter kültürü çalışmasında, farklı biber tiplerinde meydana gelen spontan dihaploid bitki oranını belirlemişlerdir. Bitki materyali olarak 7 çarliston, 6 dolmalık, 8 kapy ve 7 yeşil biber genotipini ve ortam olarak 4 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP, %0.25 aktif kömür, 30 g/L sakkaroz ve 15 mg/L gümüş nitrat içeren MS besi ortamını kullanmışlardır. Anter kültürü ile elde edilen bitkilerin ploidi düzeylerini, hem Flow Sitometri hem SSR markörlerini kullanarak tespit etmişlerdir. Sonuçlar, farklı biber çeşitlerinden farklı spontan dihaploid oranlarının elde edildiğini göstermiştir. Araştırmaya göre kromozom sayısı spontan olarak ikiye katlanan en yüksek bitki oranı, %53.4 ile dolmalık biber çeşitlerinde (altı genotipin ortalaması)

gözenmiştir. Bunu sırasıyla %31.9 ve %30.4 ile çarliston ve kopya çeşitleri izlemiştir. En düşük spontan dihaploid oranını ise %22.2 ile yeşil biber tipi göstermiştir.

Arı ve ark. (2016), DH bitki üretimi amacıyla F₂ veya F₃ jenerasyonuna ait 48 kırmızı süs biberi genotipini, üç farklı kültür ortamında (çift katmanlı sistem, MS ve B5 (Gamborg ve ark., 1968)) denemişlerdir. Tomurcuklar, tüm protokollerde 1 gün boyunca 4°C'de ön uygulamaya tabi tutulmuşlardır. MS ve B5 ortamlarına 1 mg/L BAP, 4 mg/LNAA, 15 mg/L gümüş nitrat ve %0.25 aktif kömür eklemişler ve bu ortamlarda 2 gün boyunca karanlıkta 35°C'de, ardından 16 saat fotoperiyot ve 25°C sıcaklık koşullarında kültüre almışlardır. Çift katmanlı sistemde ise %2 maltoz, %1 aktif kömür ve %0.6 Bitki Agarı içeren katı alt tabaka ile %2 maltoz içeren sıvı üst tabakadan oluşan Nitsch ve Nitsch (1969) (NN) besi ortamının kullanıldığı belirtilmiştir. Anterler, Petri kaplarında çift katmanlı (her biri 4 mL) ortamın üstteki sıvı ortamına yerleştirilmiş, kültürler 9°C'de 1 hafta bekletilmiş, ardından 3 hafta boyunca 28°C'de inkübe edilmişlerdir. Daha sonra, filtre ile sterilize edilmiş zeatin ve IAA hormonları kültürlerin üst katmanına eklenerek (sırasıyla 2.5 µM ve 5 µM konsantrasyonlarında) 3-5 hafta boyunca karanlıkta 21°C'de bekletilmiştir. Denenen 3 protokolden tomurcuk başına üretilen ortalama embriyo sayısı; MS'te 0.13, B5'te 0.70 ve çift katmanlı kültür sisteminde ise 6.50 olarak gerçekleşmiştir. En başarılı sonucu veren çift katmanlı kültür sisteminde, 18578 embriyodan normal görünümlü 5587 embriyo oluşmuş, bu embriyoların birçoğu çimlendirilmiştir. Dış ortama alıştırılan toplam 204 *in vitro* bitkicikten %59.8'i hayatta kalmış ve sonuçta 16 genotipten 122 bitki üretilmiştir. Rejenere edilen 122 süs biberi bitkisinin ploidi seviyeleri Flow Sitometri ile belirlenmiş, bunların 63'ünün (%51.6) DH, 52'sinin (%42.6) haploid ve 7'sinin (%5.73) miksploid olduğu saptanmıştır.

Hegde ve ark. (2017), aseptik koşullarda yetiştirdikleri iki F₁ hibrit çeşidinin (Bharat ve Indra) fidelerinden aldıkları kotiledonları eksplant olarak kullanmış ve bunlardan rejenere ettikleri sürgünleri, 0.5 mg/L IBA içeren MS ortamında köklendirmişlerdir. Her iki çeşidin bu ortamda %100 oranında köklendiğini belirtmişlerdir.

Benli (2019), sivri (Lumbard RZ F₁) ve üç burun (Üç burun F₁) olmak üzere 2 ticari biber çeşidinden haploid ve DH bitki elde edebilmek için anter kültürü ve çift katmanlı anter/mikrospor kültür yöntemlerini kullanmıştır. Anter kültüründe, anterler

0.1 mg/L BAP, 4 mg/L NAA, 15 mg/L AgNO₃ ve 2.5 g/L aktif kömür ilave edilmiş MS besin ortamında kültüre alınarak, 35°C’de karanlıkta 48 saat inkübatörde tutulmuş, ardından 25°C’de 33 gün karanlıkta bekletilmiştir. Kültüre alındıktan 35 gün sonra hormonsuz MS ortamına transfer edilmiş ve 25°C’de 3000 lüks aydınlatmada, 16 saat ışık/8 saat karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü yönteminde ise biber tomurcuklarına 4°C’de 24 saat ön uygulama yapılmış ve %2 maltoz, 2.5 µM zeatin, 5 µM IAA, %1 aktif kömür ve 6 g/L agar ilave edilen NN besin ortamı kullanılmıştır. Anterlerin üzeri NN ortamına %2 maltoz eklenerek oluşturulan sıvı katmanla kapatılmıştır. Anterler bir hafta 4°C’de karanlıkta muhafaza edilmiş, ardından 27°C’de mikrospordan kallus, embriyo veya embriyo benzeri yapılar elde edilene kadar bekletilmiştir. Oluşan bu yapılar hormonsuz MS ortamına transfer edilerek büyüme odasında tutulmuştur. Çalışma sonuçlarına göre, anter kültürü uygulamasında çeşitlerin her ikisinden de yanıt alındığı, çift katmanlı anter/mikrospor yönteminde ise yalnızca Lumbard RZ F₁ çeşidinden %11.11 oranında embriyo oluşturduğu ve bu embriyoların %7.87’sinin bitkiye dönüştüğü bildirilmiştir.

Doğan ve Arı (2019), çift katmanlı anter/mikrospor kültürlerinde çalkalayıcı kullanımının embriyo verimi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, toplam 29 süs biberi genotipini kullandıklarını ve her genotipin çalkalanan ve çalkalanmayan kültürlerini karşılaştırdıklarını bildirmişlerdir. Çift katmanlı kültür sisteminde, katı alt tabakada NN bileşenleri ile birlikte %2 maltoz, %1 aktif kömür ve %0.6 Bitki Agarı, sıvı üst tabaka ise NN bileşenleri ile %2 maltoz, 2.5 µM zeatin ve 5 µM IAA kullanmışlardır. Dört mL katı, 5-6 mL sıvı ortam ekledikleri Petri kaplarına (6 cm çapında) bir tomurcuktan alınan 5-7 anteri yerleştirmişler ve bir hafta boyunca 9°C’de inkübe etmişlerdir. Araştırmacılar, Supena ve Custers (2011) protokollerinin aksine hormonları 3 hafta sonra değil, inkübasyon öncesi ekleyerek kontaminasyon riskini önlemeyi amaçladıklarını rapor etmişlerdir. Çalkalama uygulamasında, anter içeren Petrileri, 50 rpm’de orbital karıştırıcıda 3 hafta boyunca 28°C’de karanlıkta bırakmışlardır. Son olarak çalkalanan ve çalkalanmayan kültürleri, 21°C karanlık koşullarda 3-5 hafta süreyle kültüre almışlardır. Çalkalanan kültürlerin toplam ve globular embriyo oluşturma bakımından daha başarılı androjenik performans gösterdiği rapor edilen çalışmada, en başarılı embriyojenik performansı gösteren genotipin çalkalanan kültürlerinin, çalkalanmayanlara kıyasla 4.5 kat daha fazla embriyo

oluşturduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak çalkalayıcı kullanımının, genotipe bağlı olmakla birlikte süs biberi çift katmanlı anter/mikrospor kültürlerinde embriyo verimini olumlu etkilediği bildirilmiştir.

Bat ve ark. (2020), biber anter kültüründe farklı şeker kaynakları ve dozlarının androgenez verimi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. Çalışmada şeker kaynağı olarak %1.5, %3 ve %6 dozlarında maltoz, kontrol uygulaması olarak da %3 sakkaroz kullanılmıştır. Haploid embriyo oluşumu üzerindeki genotipik etkileri tespit etmek için 3 biber ıslah hattı ile MS ortamı ve %0.25 aktif kömür, 15 mg/L gümüş nitrat, 4 mg/L NAA ve 2 farklı miktarda BAP (0.5 ve 1 mg/L) kullanılmıştır. Ortama eklenen %1.5, %3 ve %6 maltoz, %3 sakkaroz ile karşılaştırıldığında, embriyo oluşumunun maltoz konsantrasyonu ile arttığı belirtilmiştir. Anter kültürü için karbonhidrat kaynağı olarak genellikle sakkaroz ile maltozun karşılaştırıldığını belirten araştırmacılar, kendi çalışmalarından farklı maltoz konsantrasyonlarında embriyo yanıtının önemli ölçüde etkilendiği sonucunu çıkarmışlardır. Anter kültüründen embriyo elde etmek için kullandıkları deneme parametreleri arasında en iyi etkiye sahip kombinasyonun, 30 g/L maltoz ve 0.5 mg/L BAP olduğunu belirtmiş ve ayrıca biber anter ve mikrospor kültüründe başarıyı etkileyen temel faktörlerden birinin genotip olduğunu bildirmişlerdir.

Grozeva ve ark. (2021); 17 Balkan biber genotipinde anter kültürü ile mikrospor embriyogenezis etkinliğini analiz etmişler ve üretilen DH hatların agronomik özelliklerini karakterize etmişlerdir. Kullandıkları mikrospor embriyogenez indüksiyon ortamının (MS0), Murashige ve Skoog (1962)'un makro-mikro tuzlarını, Gamborg ve ark. (1968)'nin vitaminlerini ve 0.1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L kinetin, 0.005 mg/L biotin, 0.1 mg/L glisin, 0.04 mg/L vitamin B₁₂, 30 g/L sakkaroz ve %0.7 agar içerdiğini belirtmişlerdir. Her genotip için dört farklı tomurcuktan alınan 20 anteri, bir Petri kabına (6 cm çapında) yerleştirmişlerdir. Anterler 8 gün boyunca 35±1°C'de karanlıkta, ardından gündüz 26±1°C ve gece 18 ± 1°C'de kültüre alınmıştır. Kültür odası ışık koşulları olarak 200 µmol/m²s'lik fotosentetik foton akı yoğunluğu ve 14/10 saat (ışık/karanlık) fotoperiyot uygulanmıştır. Bu koşullarda 12 gün kalan anterler, bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan aynı kültür ortamı üzerinde inkübe edilmiştir. Rejenerantlar, 1/2 MS0 ortamı, 20 g/L sakkaroz, %0.7 agar içeren köklendirme ortamına aktarılmış ve 2 cm uzunluğa ulaştıklarında büyütme odasında

büyütölmüşlerdir. Araştırma sonuçlarına göre incelenen tüm genotipler, doğrudan embriyogenez için uygulanan koşullara yanıt vermiş ve bu yanıt %0.17 ila %13 arasında değişmiştir. Rejenere olan bitkiler, %79.03'lük hayatta kalma oranı ile başarılı bir şekilde dış koşullara adapte olmuşlardır. Flow sitometri analizi ile rejenerantların haploid:diploid oranının 1.5:1 olduğu saptanmış ve tüm diploid bitkilerin androjenik kökenli olduğu bildirilmiştir. Diploid hatlar (R1 rejenerantlar) arasında uzunluk, genişlik, ağırlık, perikarp ağırlığı, perikarp kalınlığı ve bitki başına verim gibi kantitatif meyve özellikleri açısından önemli farklılıklar olduğunun belirlendiğı bildirilmiştir. Araştırmacılar bu sonuçların, geliştirilmiş özelliklere sahip Balkan biber ıslah hatlarının oluşturulması için anter kültürünün umut verici bir yöntem olduğunu gösterdiğini rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırma 2019 ve 2021 yıllarında, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait ısıtma sistemi bulunan bir cam sera ve Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Öntürk (2018) tarafından yapılan çalışma sonuçlarına göre Hatay biberinde öne çıkan 4 biber hattı (ÜçHat1, GüHat2, AvHat3 ve YeHat3) bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Tez kapsamında androgenesis oluşturularak biber hatlarının saflaştırılmasında kullanılabilecek bir protokolün belirlenmesi için anter kültürü (iki aşamalı) ve çift katmanlı anter/mikrospor (shed-microspore) kültürü yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Biber hatlarının bitkilerini yetiştirmek amacıyla, yukarıda belirtilen hatların tohumları, içerisinde %0.5'lik sodyum hipoklorid çözeltisi bulunan beher içerisinde, manyetik karıştırıcı kullanılarak 15 dk süreyle karıştırılmış ve ardından 3 kez saf sudan geçirilerek dezenfekte edilmiştir. Bu tohumlar Petri kapları içerisinde nemli filtre kâğıdı üzerine alınarak 30°C'ye ayarlanmış etüvde çimlendirilmiştir. Çimlenen tohumlar, 2:1 oranında torf (Klasmann-Deilmann, GmbH, Geeste, Germany): perlit (Ultraper, Tarsus) karışımı ile doldurulan viyol hücrelerine (yaklaşık 75-100 mL) dikilerek fideler elde edilmiştir. Fideler 6-7 gerçek yapraklı aşamada iken 5 veya 16 L'lik saksılara aktararak 60 x 40 cm'lik aralıklarla seraya yerleştirilmişlerdir.

Serada sıcaklık ve nem değerleri, veri kaydedici (HOBO U14) ile 30 dakikada bir ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Araştırma süresince serada kaydedilen aylık ortalama sıcaklık ve oransal nem değerleri, Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırma süresince serada kaydedilen ortalama sıcaklık ve oransal nem değerleri

Yıl	Ay	Sıcaklık (°C)			Oransal Nem (%)		
		Maksimum	Minimum	Ortalama	Maksimum	Minimum	Ortalama
2019	Ocak	20.09	13.48	16.07	66.70	54.85	60.76
	Şubat	22.82	14.56	17.62	68.87	53.15	61.93
	Mart	25.37	15.85	19.57	67.88	50.55	60.33
	Nisan	28.03	16.93	21.34	72.90	47.97	62.18
	Mayıs	30.81	17.73	23.70	81.49	41.45	61.44
	Haziran	32.04	21.85	26.66	83.99	51.57	67.88
	Temmuz	33.43	23.17	29.53	82.62	49.16	65.60
	Ağustos	34.85	24.27	28.82	83.19	52.16	68.21
	Eylül	33.51	21.67	26.71	83.43	47.04	66.78
	Ekim	29.96	18.90	23.61	81.78	48.92	67.30
	Kasım	26.64	17.44	21.38	63.51	43.71	54.90
2020	Aralık (1-27)	21.99	13.52	16.38	77.75	61.07	71.78
	Mayıs (17-31)	31.53	19.50	25.24	75.47	38.20	56.26
	Haziran	30.65	19.77	25.17	83.51	48.80	66.43
	Temmuz	34.51	24.09	28.84	83.24	53.08	68.77
	Ağustos	34.87	23.98	29.11	81.09	47.48	63.92
	Eylül	35.78	23.64	28.93	78.30	44.61	62.79
	Ekim	31.33	19.46	24.88	71.48	39.06	57.35
	Kasım	26.40	18.32	21.54	64.39	47.99	57.28
2021	Aralık	24.07	13.69	17.56	69.63	51.45	61.98
	Ocak	24.53	13.38	17.13	65.52	44.84	57.12
	Şubat	29.02	14.64	20.05	61.71	40.31	53.02
	Mart	30.37	16.51	21.58	59.45	37.24	49.88
	Nisan	30.69	17.32	22.88	66.97	38.30	54.81

3.2.2. Uygun Tomurcukların Seçimi ve Dezenfeksiyonu

Her iki yöntemde, taç yaprakları çanak yapraklarıyla eşit uzunlukta veya biraz daha uzun olan biber tomurcukları kullanılmıştır (Özkum ve Tıpırdamaz, 2002; Nowaczyk ve Kisiala, 2006; Ercan ve Şensoy, 2011). Sabah 8-9 saatleri arasında alınan tomurcuklar Biyoteknoloji Laboratuvarına getirilmiş ve dezenfeksiyon amacıyla steril kabin içerisinde 10 sn boyunca %70'lik etil alkol uygulamasına maruz bırakılmışlardır. Ardından steril saf su ile 3 kez durulanmıştır. Daha sonra içerisinde 1-2 damla Tween

20 bulunan %0.5 sodyum hipoklorid çözeltisinde 15 dk bekletilmiş ve 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir. Bu uygulamada yüksek kontaminasyon görülmesi sebebiyle, tomurcukların etil alkolde bekletilme süresi 15 sn'ye; sodyum hipoklorid çözeltisinde bekletilme süresi ise 20 dk'ya çıkarılmıştır.

3.2.3. Kullanılan Besin Ortamları ve Kültür Koşulları

İki aşamalı anter kültür çalışmalarında Dumas de Vault ve ark. (1981) tarafından geliştirilen anter kültürü sistemi kullanılmıştır. Bu sisteme göre anterler öncelikle “C ortamı” adı verilen, DDV-C ortamında (Dumas de Vault ve ark., (1981)'nin temel ortamı, 0.01 mg/L 2,4-D, 0.01 mg/L kinetin) inkübe edilmiş, 12. günde ise rejenerasyon ortamı olan DDV-R ortamına (Dumas de Vault ve ark., (1981)'nin temel ortamı, 0.1 mg/L kinetin) aktarılmışlardır. Kültürün ilk 8 günü karanlık koşullar altında 35°C'de rejenerasyon ortamı üzerinde bekletilen anterler, ışık yoğunluğunun ortalama 920 lüks (yaklaşık 12 $\mu\text{mol/m}^2\text{sn}$) olduğu, yaklaşık 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot ve 28°C sıcaklık koşullarının sağlandığı inkübatörde bekletilmiştir.

Tez kapsamında kullanılan diğer yöntem, “shed-microspore” kültürü olarak da adlandırılan ve birçok araştırmacının başarı elde ettiği çift katmanlı (fazlı) anter/mikrospor kültürü sistemidir. Bu sistem, 1997 yılında Dolcet-Sanjuan ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Endonezya acı biber genotiplerinde değiştirilerek uygulanmış ve en iyi genotiplerde çiçek tomurcuğu başına 4 ila 7 bitki üretmiştir (Supena ve ark., 2006a). Buna göre denemelerde rejenerasyon ortamı olarak; %2 maltoz, %1 aktif kömür ve %0.6 Bitki Agarı içeren yarı katı alt tabaka ile %2 maltoz, 2.5 μM zeatin ve 5 μM IAA içeren sıvı üst tabakadan oluşan Nitsch ortam bileşenleri (Nitsch ve Nitsch (1969)'ın temel ortamı) kullanılmıştır. Hazırlanan ortamlar, 6 cm çapında Petri kaplarına 5 mL katı ortam üzerine ilk 2 denemede 4 mL; sonraki denemelerde 3 mL sıvı ortam olacak şekilde dökülmüştür. Bir gün süreyle 4°C'de bekletilen tomurcuklardan alınan anterler, çift katmanlı ortamdaki sıvı üst fazına alınmış (Şekil 3.1), 1 hafta boyunca 9°C'de sürekli karanlıkta ve daha sonra 28 $\pm$ 1°C sıcaklıkta ve karanlıkta olacak şekilde bitki büyütme odasında kültüre alınmışlardır.

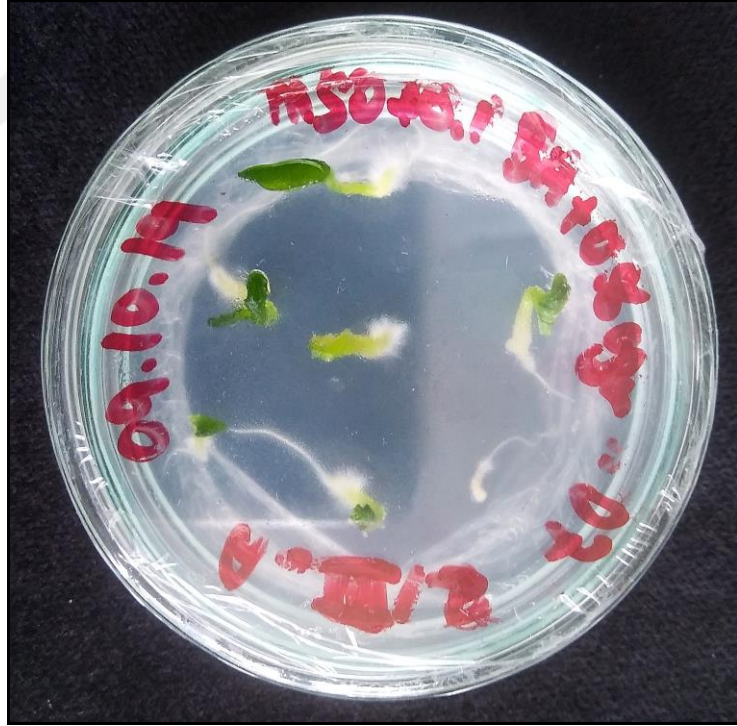


Şekil 3.1. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde sıvı üst faza alınan anterler

Oluşan embriyoların (Şekil 3.2) çimlendirilmesi 0.1 μ M BA, %2 sakkaroz ve %0.6 Bitki Agarı (Duchefa) içeren yarı-katı MS ortamında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Bunun için yaklaşık 10 mL çimlendirme ortamı bulunan 6 cm çapındaki Petri kapları kullanılmıştır. Bu ortamda bakterilere bağlı olarak oluşan kontaminasyonu önlemek için daha sonraki çalışmalarda ortama 250 mg/L sefotaksim antibiyotiği eklenmiştir. Sefotaksim, otoklavın ardından ortam sıcaklığı yaklaşık 50°C'ye indikten sonra steril kabin içerisinde ilave edilmiştir. Vitrifikasyon görüldüğü durumlarda, vitrifikasyonu azaltmak amacıyla ortamdaki agar miktarı %0.8 veya %0.9 olarak değiştirilmiştir. Ayrıca denemelerde öncelikle Merck marka agar (1.01614.1000) kullanılmış, ancak oluşan vitrifikasyonları önlemek için sonraki ortamlarda farklı agar kaynakları (Sigma (A1296) ve Duchefa (B010856.01)) kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde sıvı ortamda bulunan anterlerden salınan mikrosporelerden gelişen embriyolar



Şekil 3.3. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde çimlendirme ortamındaki embriyolar

Çimlenen embriyoların büyütülmesi için 0.1 µM BA, %2 sakkaroz ve %0.6 Bitki Agarı içeren yaklaşık 10 mL yarı-katı MS ortamı bulunan cam kültür tüpleri (150 X 25 mm) kullanılmıştır (Şekil 3.4).

İki aşamalı anter kültürü ve çift katmanlı anter/mikrospor kültürünün uygulandığı her iki yöntemde ortamlar, 1.05 kg/cm² basınç altında ve 121°C’de 15 dk süreyle otoklav edilerek sterilize edilmiştir. Gerektiğinde ön uygulaması gerçekleştirilen ve dezenfeksiyon işlemi yukarıda belirtildiği şekilde tamamlanan tomurcuklar, steril kabinde dikkatlice kesilerek anterleri alınmış ve zedelenmeden, çoğunlukla filamentleri alındıktan sonra ortama yerleştirilmiştir. Her uygulama 4 tekerrürden oluşmuş ve her tekerrürde 3 tomurcuktan alınan 15-18 anter kullanılmıştır.

In vitro koşullarda köklenen bitkilerin içinde bulunduğu tüplerin kapakları kademeli olarak açılmış ve yaklaşık 1 hafta içinde büyütme odası koşullarına alıştırmışlardır. Dış koşullara kısmen adapte olan bitkiler uzun pens yardımıyla tüplerden çıkarılmış, kökler musluk suyu altında yıkanarak besin ortamı kalıntılarından temizlenmiştir. Bu bitkiler, torf:perlit (2:1) karışımı bulunan 0.5 L’lik plastik saksılara dikildikten sonra plastik torbalar içinde yaklaşık 1 hafta bitki büyütme odasında bekletilmişlerdir. Ardından plastik torbalar, kademeli olarak delindikten sonra açılarak bitkilerin sera koşullarına alışmaları sağlanmıştır. Aklimatize edilen bitkiler (Şekil 3.5), 5 veya 16 L’lik saksılara aktararak seraya alınmışlardır.



Şekil 3.4. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde embriyodan geliştikten sonra tüpe alınan bitkicikler



Şekil 3.5. Tüpteki gelişimini tamamladıktan sonra 0.5 L'lik saksılara aktarılarak dış koşullara alıştırılmış bitki

3.2.4. Elde Edilen Haploid Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen bitkilerin haploid olup olmadığını belirlemek amacıyla toplam 12 SSR primer çifti kullanılmıştır. Kullanılan SSR primerleri ve özellikleri, Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri ve Özellikleri

Primer	Primer Dizisi (Forward/Reverse) (5'→3')	Beklenen Uzunluk (bp)	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Kaynak
Hpms1-117 (29-30)	ACCCAAATTTGCCTTGTTGAT AATCCATAACCTTATCCCATAAA	189	57.0	Keleş ve ark., 2015
CP10060 (31-32)	TCTCTCGTTTCTTTTCCG CCGAAGTTGTAGTGCCTG	Bilinmiyor	49.0	Mueller ve ark., 2005
Hpms1-143 (33-34)	AATGCTGAGCTGGCAAGGAAAG TGAAGGCAGTAGGTGGGGAGTG	221	59.0	Lee ve ark., 2004
CA517699 (35-36)	ACGCCAAGAAAATCATCTCC CCATTGCTGAAGAAAATGGG	147	51.4	Penuela ve ark., 2021
Hpms1-165 (37-38)	GGCTATTTCCGACAAACCCTCAG CCATTGGTGTTTTCACTGTTGTG	Bilinmiyor	58.0	Lee ve ark., 2004
CA523558 (39-40)	AATCCTCCAAATCCACCCTC ATTCGATTGCTTGCTCCTTG	176	52.4	Mueller ve ark., 2005
GP1102 (41-42)	GAACCCTTCATTCTGTATGT TTTGCCCGCATTATGTAAATC	Bilinmiyor	51.5	Mueller ve ark., 2005
AA840739 (43-44)	CCCTCTCTCTTCCCTTCACC AGTGCTACGATGGCTTAGGG	95	56.5	Lee ve ark., 2004
EPMS419 (45-46)	TTCAGGTGCAGGTATCATCG GGGTACTTGTCCATTTATCCAG	224-248	54.4	Nagy ve ark., 2007
CA516439 (47-48)	GACAGTCTTTCAAGAACTAGAGAGAG TGGAGCAAACACAGCAGAAC	158	56.5	Mueller ve ark., 2005
EPMS331 (49-50)	AACCCAATCCCCTTATCCAC GCATTAGCAGAAGCCATTTG	92-107	52.4	Nagy ve ark., 2007
GP1127 (51-52)	CACCACCAGTCACAAAGTTAC CCCTTCAAATACATCCCATGC	Bilinmiyor	54.4	Mueller ve ark., 2005

SSR analizlerinde çift katmanlı anter/mikrospor kültüründen elde edilen bitkiler ile birlikte ebeveyn bitkilerden izole edilen DNA’lar kullanılmıştır. DNA izolasyon işlemi, Doyle ve Doyle (1987)’nin modifiye edilmiş ekstraksiyon yöntemine göre yapılmıştır (Bayıroğlu, 2018). İzole edilen DNA’ların kalitesi ve tahmini konsantrasyonu %1’lik agaroz jel elektroforez (5 volt/cm, 45 dk) yardımıyla belirlenmiştir. DNA konsantrasyonu yaklaşık 50 ng/μL olacak şekilde ayarlanarak PCR

yapılmıştır. Her örnek için 1x PCR bafırı, 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTP (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP için), 0.2 µM primer (her iki primer), 1 u *Taq* DNA polimeraz içerecek şekilde 15 µL PCR reaksiyonu çözeltisi hazırlanmıştır. DNA amplifikasyonu, Eppendorf PCR cihazı (Mastercycler gradient) ile gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları; 94°C’de 180 sn ön denatürasyon için bir döngü, 94°C’de 30 sn denatürasyon, kullanılan primer çiftinin bağlanma sıcaklığına göre 49°C ila 59°C’de 45 sn primerlerin bağlanması ve 72°C’de 60 sn uzama olarak 3 adımdan oluşan 35 döngü ve 72°C’de 600 sn son uzama için 1 döngü şeklinde uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin ayrıştırılmasında %2 agaroz, ve 1x TBE (Tris-Borate-EDTA) bafırı kullanılmıştır (Asif ve ark., 2008). Hazırlanan 1x TBE bafırı yaklaşık 1 saat 4°C’de bekletildikten sonra, steril erlen içerisine alınarak üzerine agaroz yavaş yavaş eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda 200 rpm’de 10 dk boyunca karıştırılıp iyice çözülmesi sağlanmıştır. Ardından mikrodalga fırına alınarak tam kaynamaya başladığı anda çıkarılıp, alüminyum folyo ile erlenin ağzı kapatılarak yavaşça çalkalanıp yeniden mikrodalgaya alınmıştır. Bu işlem 3-4 kez tekrarlanarak agarozun tamamen çözülmesi sağlanmıştır ve ağzı kapalı bir şekilde soğumaya bırakılmıştır. Agaroz jelin sıcaklığı yaklaşık 50°C’ye düştüğünde 15 mL 1x TBE bafırına 1 µL RedSafe (20000x) DNA boyama solüsyonu eklenmiştir. Jel elektroforez tankına dökülüp 30 dk donması beklenmiş ve ardından 4°C’de 10 dk soğutulmuştur. Yatay elektroforez (5 volt/cm, 225 dk.) ile ayrıştırılan PCR ürünlerinin jel görüntüleri, Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Print, Vilber Lourmat, Fransa) ile elde edilmiştir (Bayıroğlu, 2018).

SSR analizleriyle, haploid ve spontan dihaploid bitkiler ile diploid bitkilerin ayırt edilmesi amaçlanmıştır. Ancak kullanılan bu primer çiftleri, YeHat3 dışındaki donör genotiplerde tek bant vermesi nedeniyle haploid ve spontan dihaploid bitkiler ile diploid bitkilerin ayırt edilmesini sağlayamamıştır. Dolayısıyla ploidi seviyelerinin belirlenebilmesi için stoma bekçi hücrelerinde kloroplast sayımı yapılmıştır. Ana bitkilerin ve bunlardan androgenesis çalışmaları sonucu elde edilen *in vitro* bitkilerin her birinden 3 yaprak alınmış ve her yaprağın 2 ayrı bölgesinden, 10 stoma bekçi hücrelerindeki kloroplastlar sayılmıştır. Qin ve Rotino (1995)’e uygun olarak yapılan bu işlemde, yaprakların alt yüzeyinden soyularak alınan epidermis, lam üzerine alınmış ve üzerine 1-2 damla %1’lik gümüş nitrat çözeltisi damlatılmıştır. Lamel ile kapatılan epidermis örneği, 5 dk bekletildikten sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir.

3.2.5. Kolhisin Uygulaması

Morfolojik ve pomolojik gözlemler ile kloroplast sayıları göz önünde bulundurularak haploid olduğu belirlenen bitkilerde kromozom katlaması için *in vitro* kolhisin uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla, bitki büyütme odasında veya serada saksıda yetiştirilen haploid bitkilerden alınan dal çelikleri, ilk olarak dezenfekte edilmiştir.

Dezenfeksiyon işlemi: Tomurcuk barındıran çeliklerin dezenfeksiyon işlemi steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çelikler, öncelikle %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dk tutulmuş, ardından 3 kez steril saf sudan geçirilmiştir. 100 ml'sinde 1-2 damla Tween 20 bulunan %0.5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dk çalkalandıktan sonra 3 kez steril saf su ile yıkanarak dezenfeksiyon işlemi tamamlanmıştır.

Uygulama konsantrasyonu ve süresi: Denemede üç ayrı kolhisin konsantrasyonu (%0.04, %0.2 ve %0.4) ve iki ayrı muamele süresi (3 gün ve 6 gün) uygulanmıştır. Kolhisin her deneme öncesi taze hazırlanmış olup, ortama otoklav sonrası steril kabin içerisinde filtre sterilizasyonu yapılarak eklenmiştir. Kolhisinin daha hızlı ve homojen olarak çözünmesi amacıyla saf suya 1 mL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiştir. Neticede 63 mL saf su ve 1 mL DMSO içerisinde 1.28 g kolhisin (%97 saflıkta) çözündürülerek stok çözeltisi hazırlanmış ve her ortamda elde edilmesi istenen orana göre seyreltilmiştir.

Uygulama yöntemi: Eksplant olarak, bitkilerden alınan sürgün ucu ve yan tomurcuklar; rejenerasyon ortamı olarak ise, kolhisinin yukarıda belirtilen konsantrasyonları ile 22.2 µM BAP ve 30 g/L sakkaroz bulunan, %0.8 agar ile jelleştirilmiş MS ortamı kullanılmıştır. Her uygulama 4 tekerrürden oluşmuş ve her tekerrür için 6 eksplant kullanılmıştır. Bu eksplantlar 3 veya 6 gün süreyle, 28±1°C sıcaklıkta ve karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Uygulama süresinin tamamlanmasının ardından bu eksplantlar 4.9 µM IBA ve 30 g/L sakkaroz içeren, %0.8 agar ile jelleştirilmiş kolhisinsiz MS ortamına aktarılmışlardır. Daha sonra 28±1°C sıcaklık ve 25-30 µmol/m²sn ışık yoğunluğuna (16 saat ışık, 8 saat karanlık) sahip iklim odasında kültüre alınmışlardır.

3.2.6. Yapılan Ölçümler ve İzlenen Parametreler

İki aşamalı anter kültürü sisteminde dört farklı genotip, sefotaksim ve aktif kömür konsantrasyonlarının, çift katmanlı anter/mikrospor kültürü denemelerinde ise genotip, gümüş nitrat, sefotaksim, agar oranı ve kaynağı, sıvı ortam miktarı, katı ortam miktarı ve çalkalayıcı kullanımının, aşağıda belirtilen gözlemler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Buna göre her iki sistem için de ilk 3 hafta içinde kontamine olan ve ilk 4 hafta içinde kararan anter oranları (%) belirlenmiş, kontamine olanlar dışında kalan anterler sağlıklı olarak nitelendirilmiştir. Oluşan embriyo oranı (%) da bu sağlıklı anter sayısı üzerinden hesaplanmıştır. Çimlendirme ortamında zamanla kontamine olan ve gelişen embriyo oranları (%) tespit edilmiştir. Gelişen embriyolar yine çimlendirme ortamı bulunan tüpe alınmış ve bu aşamadan sonra kontamine olan, kararan ve bitkiye dönüşen embriyo oranları (%) belirlenmiştir. Sonuçta sağlıklı bir şekilde gelişen bitkiler saksıya aktarılmış ve bu bitkilerin oranları (%) da tüpe alınan embriyolar üzerinden hesaplanmıştır.

Çift katmanlı anter/mikrospor kültüründen elde edilerek serada yetiştirilen gelişmiş bitkilerin yaprak ve çiçek irilikleri, gövde üzerindeki boğum aralıkları ve meyve oluşumu gözlenmiş, olgun meyve uzunluğu (cm) ve varsa tohum sayısı (adet) belirlenmiştir.

3.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Denemeler, tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine uygun olarak kurulmuş ve denemelerden elde edilen verilere varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi, yüzde olarak ifade edilen değerlerin açı transformasyon değerleri, 100 adet anterden elde edilen embriyo sayılarının ise karekök transformasyon değerleri (verilere 0.5 eklenerek) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerçek değeri “0” olan yüzdelere 0.25 eklenerek, “100” olan yüzdelere 0.25 çıkarılarak ve 0 ile 100 arasındaki yüzdelere ise değiştirilmeden açı transformasyon değerleri hesaplanmıştır (Bek ve Efe, 1989). Varyans analiz sonucu önemli çıkan uygulamaların çoklu karşılaştırmaları, Tukey HSD (Honestly Significant Difference) testine göre %5 önem seviyesinde yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. İki aşamalı *In vitro* Anter Kültürü ile Androgenesis Çalışmaları

İki aşamalı anter kültürü sisteminde, Dumas de Vaulx ve ark. (1981) esas alınarak kurulan ilk denemeden elde edilen veriler, Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu denemede aktif kömürün etkisini incelemek üzere %0.0 ve 0.5’lik aktif kömür içeren DDV ortamları ile ÜçHat1 ve GüHat2 hatlarının anterleri kullanılmıştır. İncelenen özellikler üzerine, denemede kullanılan farklı hatların ve ortama eklenen aktif kömürün etkisinin önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Tüm uygulamalar arasında yalnızca “ÜçHat1 x %0 aktif kömür” kombinasyonunda, kullanılan anterlerin %50’si sağlıklı olarak belirlenmiş ancak bu anterlerden embriyo oluşumu gözlenmemiştir.

Çizelge 4.1. ÜçHat1 ve GüHat2 biber hatlarında %0.0 ve 0.5’lik aktif kömür içeren DDV ortamlarında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Hat	Aktif Kömür (%)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)
ÜçHat1	0.5	100.00	0.00	0.00	
	0.0	50.00	1.47	50.00	0.00
GüHat2	0.5	100.00	0.00	0.00	
	0.0	100.00	0.00	0.00	
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Hat					
ÜçHat1		75.00	0.74	25.00	0.00
GüHat2		100.00	0.00	0.00	
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Aktif Kömür (%)					
	0.5	100.00	0.00	0.00	
	0.0	75.00	0.74	25.00	0.00
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Varyasyon Katsayısı		32.99	400.00	230.94	

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

Yukarıda sonuçları verilen birinci denemede karşılaşılan yüksek kontaminasyon nedeniyle, ikinci ve sonraki denemelerin tümünde etil alkolün uygulama süresi 10

sn'den 15 sn'ye; sodyum hipoklorid çözeltisinin uygulama süresi ise 15 dk'dan 20 dk'ya çıkarılmıştır. Belirtildiği gibi sterilize edilen eksplantlar kullanılarak kurulan denemede hatlardan biri değiştirilmiştir. Denemede incelenen gözlemlerden kontamine olan anter oranı ve dolayısıyla sağlıklı anter oranının, hatlara ve aktif kömür oranına bağlı olarak değişimi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2). Buna göre ÜçHat1'de %0.5 aktif kömür uygulandığında belirlenen sağlıklı anter oranı (%69.35) diğer kombinasyonlara göre daha yüksek bulunmuştur. Uygulamaların çoğunda kontaminasyonun yüksek olması nedeniyle, sağlıklı anter sayısının düşük olmasının da etkisiyle, denenen hatlar ve ortamlarda embriyo oluşumu tespit edilememiştir.

Çizelge 4.2. ÜçHat1 ve AvHat3 biber hatlarında %0.0 ve 0.5'lik aktif kömür içeren DDV ortamlarında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Hat	Aktif Kömür (%)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)
ÜçHat1	0.5	30.65 ^{b*}	0.00	69.35 ^a	0.00
	0.0	95.83 ^a	0.00	4.17 ^b	0.00
AvHat3	0.5	100.00 ^a	0.00	0.00 ^b	
	0.0	90.95 ^a	0.00	9.05 ^b	0.00
Tukey HSD değeri		20.70	Ö.D.	20.76	
Hat					
ÜçHat1		63.24 ^b	0.00	36.76 ^a	0.00
AvHat3		95.48 ^a	0.00	4.52 ^b	0.00
Tukey HSD değeri		14.64	Ö.D.	14.68	
Aktif Kömür (%)					
	0.5	65.33 ^b	0.00	34.67 ^a	0.00
	0	93.39 ^a	0.00	6.61 ^b	0.00
Tukey HSD değeri		14.64	Ö.D.	14.68	
Varyasyon Katsayısı		15.94	0.00	61.30	

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır.

*Aynı sütun içinde farklı harfle gösterilen ortalamalar, %5 önem düzeyinde Tukey HSD (Honestly Significant Difference) çoklu karşılaştırma testine göre birbirinden farklıdır

Dezenfeksiyon protokolü değiştirilmesine rağmen, denemenin başarısını etkileyecek düzeyde kontaminasyon oluşması, endojenik bakteri infeksiyonu olabileceği ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Dolayısıyla ortama eklenen sefotaksim kontaminasyon ve embriyo oluşumu üzerine etkisini belirlemek üzere yeni denemeler kurulmuştur.

Yapılan 3. denemede sefotaksim ve aktif kömürün haploid embriyo oluşumuna etkisi incelenmiştir (Çizelge 4.3). YeHat3 hattının kullanıldığı bu denemenin sonuçlarına göre, yapılan gözlemlerin hiçbirinde uygulamalar arasındaki farklar, istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.3. YeHat3 biber hattında DDV ortamında kullanılan farklı aktif kömür ve sefotaksim konsantrasyonlarında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Sefotaksim (mg/L)	Aktif Kömür (%)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)
0	0.0	62.87	0.00	37.13	0.00
	0.5	95.83	0.00	4.17	0.00
250	0.0	55.56	0.00	44.44	0.00
	0.5	72.18	0.00	27.82	0.00
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Sefotaksim (mg/L)					
0		79.35	0.00	20.65	0.00
250		63.87	0.00	36.13	0.00
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Aktif Kömür (%)					
0		59.21	0.00	40.79	0.00
0.5		84.01	0.00	15.99	0.00
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Varyasyon Katsayısı		46.51	0.00	117.31	0.00

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

Farklı biber hatlarında farklı aktif kömür ve sefotaksim içeren DDV ortamları kullanılarak yapılan denemelerde embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Bunun üzerine tezde öncelikle denenmesi planlanan ancak gerekli kimyasalların elde edilme sürecinin uzun sürmesi nedeniyle ertelenen çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminin araştırılmasına başlanmıştır.

4.2. Çift Katmanlı *In vitro* Anter/Mikrospor Kültürü ile Androgenesis Çalışmaları

Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sistemi ile yapılan ilk denemede (PÇ1), iki farklı hattın ve *in vitro* kültürde etilen inhibitörü olarak kullanılan gümüş nitratin etkisi araştırılmıştır. Deneme boyunca anterlerde oluşan değişimler gözlenmiş ve üst ortam sıvı olduğu için kontaminasyon görülen Petriler olduğu gibi deneme dışı bırakılmıştır. Denemede uygulanan faktörlerin etkileri, istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.4), ancak üç uygulama kombinasyonunda embriyo oluşumu gözlenmiştir. Uygulamalar arasında 100 anterden gelişen embriyo sayısı en fazla (147.54 adet), gümüş nitrat bulunmayan rejenerasyon ortamında YeHat3 hattından elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. ÜçHat1 ve YeHat3 biber hatlarında 0.0 veya 10.0 mg/L gümüş nitrat eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamlarında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Hat	Gümüş Nitrat (mg/L)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)	Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)
ÜçHat1	0.0	0.00	0.00	100.00	0.00	
	10.0	0.00	0.00	100.00	5.88	0.00
YeHat3	0.0	0.00	0.00	100.00	147.54	5.92
	10.0	0.00	0.00	100.00	4.90	0.00
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Hat						
ÜçHat1		0.00	0.00	100.00	2.94	0.00
YeHat3		0.00	0.00	100.00	76.22	2.96
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Gümüş Nitrat (mg/L)						
0.0		0.00	0.00	100.00	73.77	5.92
10.0		0.00	0.00	100.00	5.39	0.00
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Varyasyon Katsayısı		0.00	0.00	0.00	278.77	

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

Bu denemede rejenerasyon ortamında oluşan embriyolar, çimlendirilmek üzere 0.1 µM BA, %2 sakkaroz ve %0.6 Bitki Agarı içeren MS ortamına transfer edilmiştir. Gelişen embriyolar, olası kontaminasyonlara karşı daha sonra 250 mg/L sefotaksim

içeren çimlendirme ortamına alınmışlardır. Gelişmeyen embriyoların Petri içerisinde vitrifiye olmaları nedeniyle, ortamdaki agar (Sigma) %0.8-0.9'a yükseltilerek hazırlanan ortama aktarılmıştır. Kontamine olmayan ve kararmayan sağlıklı embriyolar, daha iyi gelişebilmeleri için çimlendirme ortamı bulunan tüplere transfer edilmiştir. Ancak bu uygulamalar sonucunda sadece gümüş nitrat içermeyen rejenerasyon ortamından gelen YeHat3 embriyoları çimlendirme ortamında gelişmiştir (Çizelge 4.5). Gelişen embriyolar, tüpe alınmalarının ardından bir kısmı kararma bir kısmı da kontaminasyon sonucu ölmüş ve neticede sağlıklı bitkiler elde edilememiştir.

Çizelge 4.5. ÜçHat1 ve YeHat3 hatlarında 0 veya 10 mg/L gümüş nitrat eklenen çift katmanlı ortamlarda oluşan embriyoların çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma ve bitkiye dönüşme oranları

Hat	Gümüş Nitrat (mg/L)	Gelişen Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kararan Embriyo Oranı (%)	Bitkiye Dönüşen Embriyo Oranı (%)
ÜçHat1	0				
	10	0.00			
YeHat3	0	3.62	18.18	6.82	0.00
	10	0.00			

Çift katmanlı sistemin kullanıldığı 2. deneme (PÇ2) ilk denemenin tekrarı şeklinde planlanmış, ancak kontaminasyonların önlenmesi amacıyla tüm uygulamalara 250 mg/L sefotaksim ilave edilmiştir. Bu denemede ortamlar önceden hazırlandığı için sefotaksim, Petrillerdeki ortamın sadece üst sıvı fazına eklenmiştir. Çalışmada yapılan gözlemlerde uygulamalar arasındaki farklar istatistik olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.6). Bununla birlikte en yüksek embriyo oluşumu (56.67 embriyo/100 anter), YeHat3 hattında gümüş nitrat bulunmayan rejenerasyon ortamından elde edilmiştir.

Rejenerasyon ortamında elde edilen embriyolar 250 mg/L sefotaksim içeren MS çimlendirme ortamı bulunan Petrilere transfer edilmişlerdir. Petride büyüyen embriyolar aynı ortamı içeren tüplere alınmış ve vitrifiye olanlar yüksek agarlı (%0.9) ortama aktarılmışlardır. Tüplere alındıktan sonra zamanla embriyolarda kallus oluşumu, kahverengileşme ve kararma gözlenmiştir. Bu kısımlar temizlenerek embriyolar taze ortamlara aktarılmışlardır. Çalışmada embriyo gelişim oranı bakımından uygulamalar arasında, istatistiksel açıdan önemli farklar tespit edilmemiştir (Çizelge 4.7). Gümüş

nitrat uygulanmayan ortamlarda ÜçHat1 ve YeHat3 hatlarında embriyo gelişimi gözlenirken, gümüş nitrat içeren ortamlarda embriyo gelişmemiştir. Ancak kontaminasyon ve kararma nedeniyle hiçbir embriyo tam bitki oluşturmamıştır.

Çizelge 4.6. ÜçHat1 ve YeHat3 biber hatlarında 0.0 veya 10.0 mg/L gümüş nitrat ile 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Hat	Gümüş Nitrat (mg/L)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)	Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)
ÜçHat1	0	0.00	0.00	100.00	27.84	15.91
	10	0.00	0.00	100.00	13.61	0.00
YeHat3	0	0.00	0.00	100.00	56.67	0.00
	10	0.00	0.00	100.00	14.71	0.00
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Hat						
ÜçHat1		0.00	0.00	100.00	20.73	7.95
YeHat3		0.00	0.00	100.00	35.69	0.00
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Gümüş Nitrat (mg/L)						
0		0.00	0.00	100.00	42.25	7.95
10		0.00	0.00	100.00	14.16	0.00
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Varyasyon Katsayısı		0.00	0.00	0.00	147.84	400.00

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

Çizelge 4.7. ÜçHat1 ve YeHat3 hatlarında 0 veya 10 mg/L gümüş nitrat ile 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı ortamlarda oluşan embriyoların çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma ve bitkiye dönüşme oranları

Hat	Gümüş Nitrat (mg/L)	Gelişen Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kararan Embriyo Oranı (%)	Bitkiye Dönüşen Embriyo Oranı (%)
ÜçHat1	0	14.29	18.75	0.00	0.00
	10	0.00			
YeHat3	0	7.14	12.50	12.50	0.00
	10	0.00			
Tukey HSD değeri		Ö.D.			

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

Kurulan 3. denemede (PÇ3), ÜçHat1 hattında gümüş nitrat ve sefotaksim kombinasyonlarının çift katmanlı sistemdeki etkileri incelenmiştir (Çizelge 4.8). İlk iki

denemedeki sıvı ortam miktarının Petri hacmine göre fazla olduğu ve bu durumun vitrifikasyona da sebep olabileceği değerlendirilerek, bu ve bundan sonraki denemelerde aksi belirtilmediği sürece sıvı faz olarak 4 mL yerine 3 mL kullanılmıştır. Bu denemede de oluşan embriyolar önce çimlendirme ortamı içeren Petrilere, daha sonra da sağlıklı kalanlar gelişip bitkiye dönüşebilmeleri için tüplere alınmışlardır. Bu aşamada kontaminasyon ve kararmalar görülen bitkilerin kurtarılması amacıyla, temizlenerek alt kültüre alınmıştır. Çizelge 4.8 incelendiğinde sefotaksim eklenen ortamda (136.49 embriyo/100 anter), eklenmeyen ortama (2.08 embriyo/100 anter) kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek oranda embriyo oluştuğu ve aynı gözlem açısından gümüş nitratın etkisinin önemli olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.8. ÜçHat1 biber hattında 0.0 veya 10.0 mg/L gümüş nitrat ile 0 veya 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Gümüş Nitrat (mg/L)	Sefotaksim (mg/L)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)	Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)
0	0	33.33	0.00	66.67	4.17	0.00
	250	0.00	0.00	100.00	222.98	0.00
10	0	0.00	0.00	100.00	0.00	
	250	33.33	0.00	66.67	50.00	20.83
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Gümüş Nitrat (mg/L)						
0		16.67	0.00	83.33	113.58	0.00
10		16.67	0.00	83.33	25.00	20.83
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Sefotaksim (mg/L)						
0		16.67	0.00	83.33	2.08 ^{b*}	0.00
250		16.67	0.00	83.33	136.49 ^a	20.83
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	7.20	
Varyasyon Katsayısı		244.95	0.00	48.99	180.12	

ÖD: Varyans analizine göre aynı sütundaki ortalamalar arasındaki farklar, %5 önem düzeyinde önemli değil.

*Aynı sütun içinde farklı harfle gösterilen ortalamalar, %5 önem düzeyinde Tukey HSD (Honestly Significant Difference) çoklu karşılaştırma testine göre birbirinden farklıdır

Rejenerasyon ortamında oluşan embriyolar, çimlendirme ortamı bulunan tüplere transfer edildiğinde, gümüş nitrat ve sefotaksim bulunmayan ortam dışında embriyo

geliştiren uygulamaların tümünde kontaminasyonlar (%4.76 ila 33.73) gözlenmiştir. (Çizelge 4.9). Embriyolarda kararmaların da oluşması sebebiyle bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir.

Çizelge 4.9. ÜçHat1 hattında 0 veya 10 mg/L gümüş nitrat ile 0 veya 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı ortamlarda oluşan embriyoların çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma ve bitkiye dönüşme oranları

Gümüş Nitrat (mg/L)	Sefotaksim (mg/L)	Gelişen Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kararan Embriyo Oranı (%)	Bitkiye Dönüşen Embriyo Oranı (%)
0	0	33.33	0.00	33.33	0.00
	250	35.57	33.73	66.27	0.00
10	0				
	250	9.72	4.76	23.81	0.00

Dördüncü deneme (PÇ4), 3. deneme ile aynı şekilde planlanmış yalnızca ÜçHat1 yerine YeHat3 anterleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, oluşan embriyo sayısı bakımından gümüş nitrat, sefotaksim ve bu iki faktörün interaksiyon uygulamaları arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Gümüş nitrat ve sefotaksim içermeyen ortamda embriyo oluşmazken, en yüksek embriyo oluşumu (189.76 embriyo/100 anter) gümüş nitrat bulunmayan ancak 250 mg/L sefotaksim içeren ortamda tespit edilmiştir. Önceki denemede (PÇ3) de en yüksek embriyo oluşumu aynı ortam içeriğinden elde edilmiş, ancak oran daha yüksek (222.98 embriyo/100 anter) olmuştur. Bu değerlere bakılarak aynı koşullar ve ortam içerikleri söz konusu olduğunda, ÜçHat1'den daha yüksek oranda embriyo elde edildiği ve bu embriyoların tüpteki kontaminasyon oranının YeHat3'ten gelen embriyolardaki kontaminasyon oranından (Çizelge 4.11) daha az olduğu sonucuna varılmıştır. Gümüş nitrat ve sefotaksimin etkileri ayrı ayrı değerlendirildiğinde, gümüş nitrat eklenmeyen ortamdan, eklenen ortama kıyasla daha yüksek sayıda embriyo elde edilmiştir (sırasıyla 94.88 embriyo/100 anter ve 11.09 embriyo/100 anter). Sefotaksim ise gümüş nitratın aksine kullanıldığı uygulamalarda embriyo oluşumunu arttırmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. YeHat3 hattında 0.0 veya 10.0 mg/L gümüş nitrat ile 0 veya 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Gümüş Nitrat (mg/L)	Sefotaksim (mg/L)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)	Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)
0	0	33.33	0.00	66.67	0.00 ^{d*}	
	250	0.00	0.00	100.00	189.76 ^a	17.50
10	0	33.33	0.00	66.67	9.26 ^c	33.33
	250	33.33	0.00	66.67	12.92 ^b	0.00
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	3.50	
Gümüş Nitrat (mg/L)						
0		16.67	0.00	83.33	94.88 ^a	17.50
10		33.33	0.00	66.67	11.09 ^b	16.67
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	2.48	
Sefotaksim (mg/L)						
0		33.33	0.00	66.67	4.63 ^b	33.33
250		16.67	0.00	83.33	101.34 ^a	8.75
Tukey HSD değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	2.48	
Varyasyon Katsayısı		200.00	0.00	66.66	40.85	

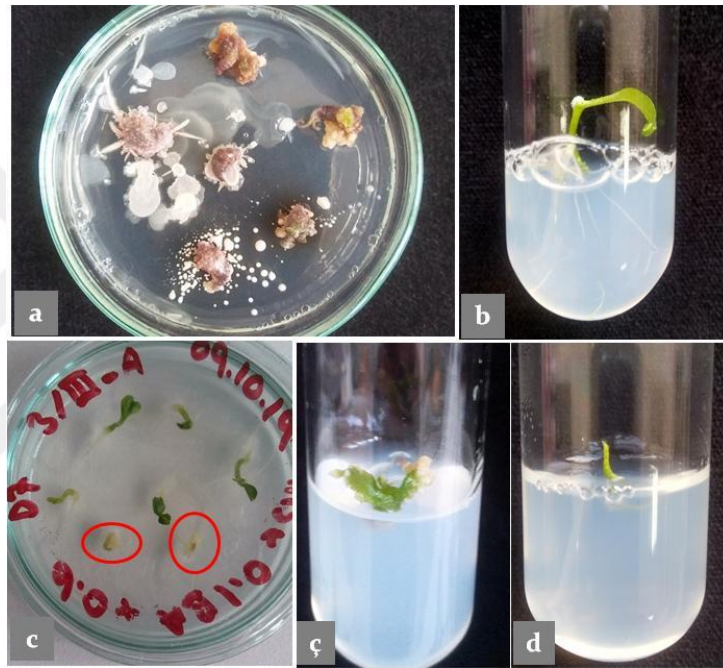
ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

*Aynı sütun içinde farklı harfle gösterilen ortalamalar, %5 önem düzeyinde Tukey HSD (Honestly Significant Difference) çoklu karşılaştırma testine göre birbirinden farklıdır

Çizelge 4.11 incelendiğinde, YeHat3 hattında rejenerasyon ortamında bazı uygulamalarda oluşan embriyoların (Çizelge 4.10) çimlendirme ortamında geliştiği, ancak bu embriyoların bitki oluşturmadağı görülmektedir. Bunun nedenleri arasında; kontaminasyon ve kararmaların (Şekil 4.1a) yanısıra bazı embriyoların büyüme ucuna sahip olmaması (Şekil 4.1b), yalnızca kök (Şekil 4.1c), yaprak (Şekil 4.1ç) veya hipokotil (Şekil 4.1d) oluşturmaları (kalitesiz embriyo olmaları) sayılabilir. Biber anter kültüründe (*Capsicum annuum* L.) en ciddi problemin düşük embriyo kalitesi olduğunu belirten Supena ve Custers (2011), bu durumun kültür koşullarından, ortam içeriğinden ve donör bitkinin fizyolojik durumunu etkileyen yetiştirme koşullarından (özellikle ışık ve sıcaklık) kaynaklı olabileceğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.11. YeHat3 hattında 0 veya 10 mg/L gümüş nitrat ile 0 veya 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı ortamlarda oluşan embriyoların çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma ve bitkiye dönüşme oranları

Gümüş Nitrat (mg/L)	Sefotaksim (mg/L)	Gelişen Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kararan Embriyo Oranı (%)	Bitkiye Dönüşen Embriyo Oranı (%)
0	0				
	250	13.13	66.67	0.00	0.00
10	0	0.00			
	250	11.11	0.00	33.33	0.00



Şekil 4.1. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde kararan veya kontamine olan (a), büyüme ucu bulunmayan (b), yalnızca kök (c), yaprak (ç) veya hipokotil (d) oluşturan kalitesiz embriyoların gelişimi

Üçüncü ve 4. deneme ile aynı şekilde kurulan PÇ5 denemesinde ise GüHat2 hattı kullanılarak gümüş nitrat ve sefotaksim kombinasyonlarının çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sistemindeki etkileri araştırılmıştır (Çizelge 4.12). Diğer tüm denemelerin aksine burada çok fazla sayıda anter ilk 4 haftada kararmış ve bu gözlem açısından interaksiyon uygulamaları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Buna göre, gümüş nitrat ve sefotaksim bulunmayan ortam ile 10 mg/L gümüş nitrat ve 250 mg/L sefotaksim bulunan ortamda, diğer ortamlara göre daha yüksek kararma gözlenmiştir. Aynı deneme daha önce ÜçHat1 ve YeHat3 hatları

kullanılarak gerçekleştirildiğinde denemelerde oluşan en yüksek embriyo oranları sırasıyla 222.98 embriyo/100 anter (Çizelge 4.8) ve 189.76 embriyo/100 anter (Çizelge 4.10) olmuştur. Ancak GüHat2 hattının kullanıldığı bu denemede hiçbir uygulamadan embriyo elde edilmediği ve bu hattın, ÜçHat1 ve YeHat3 hatlarına kıyasla anter/mikrospor kültürü denemelerinde embriyo oluşumu bakımından başarısız olduğu değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.12. GüHat2 hattında 0.0 veya 10.0 mg/L gümüş nitrat ile 0 veya 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Gümüş Nitrat (mg/L)	Sefotaksim (mg/L)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)
0	0	25.00	75.00 ^a	75.00	0.00
	250	25.00	0.00 ^b	75.00	0.00
10	0	0.00	0.00 ^b	100.00	0.00
	250	0.00	100.00 ^a	100.00	0.00
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	12.50	Ö.D.	Ö.D.
Gümüş Nitrat (mg/L)					
0		25.00	37.50	75.00	0.00
10		0.00	50.00	100.00	0.00
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Sefotaksim (mg/L)					
0		12.50	37.50	87.50	0.00
250		12.50	50.00	87.50	0.00
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Varyasyon Katsayısı		282.84	57.14	40.41	0.00

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

Deneme sonuçları arasında oluşan bu farklılıklar üzerinde hatların etkisini belirleyebilmek amacıyla, yeni kurulan denemede (PÇ6) ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatları karşılaştırılmıştır. Ayrıca önceki denemelerden elde edilen embriyolarda meydana gelen vitrifikasyon probleminin de sebebini anlayabilmek ve azaltmak amacıyla kurulan bu denemede, ilk aşamada kullanılan çift katmanlı ortamların katı tabakalarında %0.6 veya %0.8 agar (Duchefa, Plant Agar) kullanılmıştır (Çizelge 4.13). Ortamlar, 250 mg/L sefotaksim eklenerek hazırlanmıştır. Bu ve bundan sonraki denemelerde elde edilen embriyolar, diğer denemelerde karşılaşılan vitrifikasyon problemini azaltmak için erken embriyo aşamasında çimlendirme ortamına

aktarılmışlardır. Yüzde 0.6 veya 0.8 agar içeren çift katmanlı rejenerasyon ortamlarında üretilen embriyolar, aynı oranda agar içeren çimlendirme ortamlarına aktarılmıştır. Deneme sonuçları değerlendirildiğinde, hiçbir gözlem istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.13). Kullanılan hatlar embriyo oluşumu açısından kıyaslandığında, aralarındaki farklar istatistik olarak önemli olmamakla birlikte, en iyi sonucu ÜçHat1 hattı verirken, en düşük oran GüHat2'den alınmıştır. Agar miktarlarının etkisi değerlendirildiğinde ise %0.8 agar uygulamalarında gözlenen ortalama embriyo sayısı 20.28 adet/100 anter iken, %0.6 agar kullanılan uygulamada bu sayı 13.58 embriyo/100 anter olmuştur. “GüHat2 x %0.6 agar” kombinasyonu dışında tüm uygulamalardan embriyo elde edilmiş, bunlar arasında en yüksek embriyo oluşumu (32.42 embriyo/100 anter), “ÜçHat1 x %0.6 agar” interaksiyonunda gözlenmiştir. Ancak yaşanan pandemi süreci denemenin takibini olumsuz etkilemiş ve embriyodan bitkiye dönüşüm ile ilgili veriler elde edilememiştir.

Çizelge 4.13. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatlarında %0.6 veya 0.8 agar ve 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, karama, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Hat	Agar (%)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)	Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)
YeHat3	0.6	0.00	50.00	100.00	8.33	4.17
	0.8	0.00	25.00	100.00	25.73	0.00
GüHat2	0.6	25.00	0.00	75.00	0.00	
	0.8	0.00	0.00	100.00	27.75	0.00
ÜçHat1	0.6	0.00	25.00	100.00	32.42	28.85
	0.8	25.00	25.00	75.00	7.35	25.00
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Hat						
YeHat3		0.00	37.50	100.00	17.03	2.08
GüHat2		12.50	0.00	87.50	13.87	0.00
ÜçHat1		12.50	25.00	87.5	19.89	26.92
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Agar (%)						
0.6		8.33	25.00	91.67	13.58	16.51
0.8		8.33	16.67	91.67	20.28	8.33
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Varyasyon Katsayısı		346.41	203.96	31.49	137.22	

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

Eylül 2019 tarihinde kurulan bir diğer denemede (PÇ7) kullanılan bitkilerin tohumları, 2019 yılının Nisan ayında çimlendirilmiş ve oluşan fideler Mayıs ayında saksılara dikilmiştir. Deneme sonuçları değerlendirildiğinde hiçbir gözlem istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.14). Sağlıklı anterlerden elde edilen embriyo oranları incelendiğinde, en yüksek sonucu 106.17 embriyo/100 anter ile “ÜçHat1 x %0.8 agar” uygulaması vermiştir. Bunu sırasıyla 61.15 embriyo/100 anter ile “YeHat3 x %0.8 agar” ve 54.78 embriyo/100 anter ile “GüHat2 x %0.8 agar” kombinasyonları takip etmiştir. Farklı agar oranlarının genel ortalamaları karşılaştırıldığında istatistik açıdan önemli bir fark bulunmamakla birlikte, %0.8 agar ortamında 74.03 embriyo/100 anter oluşumu gözlenirken, %0.6 agar ortamında bu oranın 29.15 embriyo/100 anter olduğu görülmektedir. Bu verilere göre her üç hat için %0.8 agar uygulamasının daha iyi sonuç verdiği değerlendirilebilir.

Çizelge 4.14. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatlarında %0.6 veya 0.8 agar ve 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter, embriyo ve gelişen embriyo oranları

Hat	Agar (%)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)	Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)
YeHat3	0.6	0.00	0.00	100.00	52.87	38.89
	0.8	25.00	0.00	75.00	61.15	29.44
GüHat2	0.6	25.00	0.00	75.00	11.67	0.00
	0.8	25.00	0.00	75.00	54.78	9.375
ÜçHat1	0.6	0.00	0.00	100.00	22.91	25.00
	0.8	0.00	0.00	100.00	106.17	49.00
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Hat						
YeHat3		12.50	0.00	87.50	57.01	34.17
GüHat2		25.00	0.00	75.00	33.22	4.69
ÜçHat1		0.00	0.00	100.00	64.54	37.00
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Agar (%)						
0.6		8.33	0.00	91.67	29.15	21.30
0.8		16.67	0.00	83.33	74.03	29.27
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Varyasyon Katsayısı		282.84	0.00	40.41	134.02	141.60

ÖD: Varyans analizine göre aynı sütundaki ortalamalar arasındaki farklar, %5 önem düzeyinde önemli değil

Çizelge 4.14'te görülen %0.6 veya 0.8 agar içeren ortamlarda kontamine olmamış ve kararmayan sağlıklı embriyoların, vitrifikasyonunu azaltarak daha iyi gelişebilmelerini sağlamak amacıyla tamamı, %0.8 agar içeren çimlendirme ortamı tüplere aktarılmışlardır (Çizelge 4.15). Çizelgede 4.15'te verilen sonuçlara göre yapılan bütün gözlemler açısından, hatlar ve rejenerasyon ortamında uygulanan agar oranları arasındaki farklar, istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bununla birlikte, tüplere alınan embriyo oranları incelendiğinde, rejenerasyon ortamında oluşan embriyo oranında elde edilen sonucun aksine, %0.6 agar uygulamalarından gelen embriyoların daha yüksek oranda bitkiye dönüştüğü görülmektedir (Çizelge 4.14 ve 4.15). Bitkiye dönüşen embriyo ve saksıya aktarılan bitki oranı bakımından, YeHat3 hattından diğer hatlara göre daha yüksek değerler (sırasıyla %23.88 ve %16.67) elde edilmiştir. Saksıya aktarılan bitki oranı açısından ise agar oranları birbirine yakın olmuştur.

Çizelge 4.15. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatlarında %0.6 veya 0.8 agar ve 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan embriyoların %0.8 agar içeren çimlendirme ortamında kontaminasyon, kararma, bitkiye dönüşme ve saksıya aktarma oranları

Hat	Agar (%)	Gelişen Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kararan Embriyo Oranı (%)	Bitkiye Dönüşen Embriyo Oranı (%)	Saksıya Aktarılan Bitki Oranı (%)
YeHat3	0.6'dan 0.8	47.22	0.00	29.29	32.14	25.00
	0.8'den 0.8	37.22	37.50	19.79	15.63	8.33
GüHat2	0.6'dan 0.8	25.00	3.57	7.14	10.71	0.00
	0.8'den 0.8	65.63	5.00	58.33	8.33	5.00
ÜçHat1	0.6'dan 0.8	66.67	16.67	58.33	25.00	0.00
	0.8'den 0.8	26.00	2.38	39.88	5.36	13.89
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Hat						
		42.22	18.75	24.54	23.88	16.67
YeHat3		45.31	4.29	32.74	9.52	2.50
GüHat2		46.33	9.52	49.11	15.18	6.94
ÜçHat1		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Agar (%)						
		46.30	6.75	31.59	22.62	8.33
0.6'dan 0.8		42.95	14.96	39.34	9.77	9.07
0.8'den 0.8		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Varyasyon Katsayısı		91.39	211.45	112.89	197.51	283.35

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

Bu denemede (PÇ7) elde edilen toplam 29 bitkiden en iyi gelişim gösteren 9'u, yapılacak olan kolhisin uygulamalarında karşılaşılabilecek muhtemel sorunlar göz önünde bulundurularak kardeşlendirilmiştir. Bitkilerin kök bulundurmamayan üst kısmından alınan kardeşler, kök oluşturabilmeleri amacıyla 0.5 mg/L IBA içeren MS ortamına (Hegde ve ark.. 2017); köklü olan kardeşler ise büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamına aktarılmışlardır. Çalışmamızda 0.5 mg/L IBA ortamına alınan kardeşlerde, birkaç defa alt kültüre alınmalarına rağmen köklenme gözlenmemiş, bu bitkiler zamanla kararmış ve ardından ölmüşlerdir. Köklü olan kardeşler arasında ise kontamine olan ve kararanlar çıkarıldığında, 2 kardeş bitki dış ortama alıştırılarak saksıya aktarılmıştır. Hiç kardeşlendirilmeyen 20 bitkiden 7'si saksıya alınmıştır. Sonuç olarak tüpe alınan toplam 29 bitkiden 9'u sağlıklı bir biçimde gelişmiş ve toprağa aktarılmıştır.

Yapılan *in vitro* çift katmanlı anter/mikrospor kültürü çalışmalarından bir diğeri olan PÇ8 denemesi, yukarıda sağlıklı bitkiler elde edilen denemenin (PÇ7) tekrarı şeklinde planlanmış olup, bu sistemin tez çalışmasının ana amacına uygun olarak Hatay biberinde saf hatlar elde edebilmek için kullanılabilecek etkin bir yöntem olup olmadığı incelenmiştir. Deneme, Eylül 2019'da dikilmiş olan 2 aylık bitkilerin tomurcukları kullanılarak Kasım ayında kurulmuştur. Çalışmadan elde edilen veriler, oluşan embriyo sayısı üzerinde, kullanılan hatlar arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.16). Buna göre, en yüksek değeri veren YeHat3 hattından ortalama 32.22 embriyo/100 anter meydana gelirken, ÜçHat1 hattından 15.83 embriyo/100 anter oluşmuş, GüHat2 hattından ise embriyo elde edilmemiştir. Yapılan gözlem değerlerinin, ortama eklenen agar oranına bağlı olarak istatistiksel açıdan önemli düzeyde değişmediği, %0.6 ile %0.8 agar kullanılan uygulamalar arasında embriyo oluşumu açısından gözlenen farkın, önceki iki denemede olduğu gibi belirgin olmadığı tespit edilmiştir.

Rejenerasyon ortamında PÇ8'de farklı uygulamalarda oluşan embriyoların çimlendirme ortamına aktarılması sonucu elde edilen gözlem verileri Çizelge 4.17'de verilmiştir. YeHat3 hattında rejenerasyon ortamında her iki agar konsantrasyonunda (%0.6 ve %0.8) oluşan embriyoların %0.8 agarlı çimlendirme ortamında gelişirken, ÜçHat1'de sadece %0.8 agarda oluşan embriyolar çimlendirme ortamında gelişmiştir. Ayrıca, bitkiye dönüşen embriyo oranının ÜçHat1'e kıyasla YeHat3'te daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.16. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatlarında %0.6 veya 0.8 agar ve 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Hat	Agar (%)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)	Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)
YeHat3	0.6	0.00	0.00	100.00	47.70	0.00
	0.8	0.00	0.00	100.00	16.73	20.00
GüHat2	0.6	0.00	0.00	100.00	0.00	
	0.8	25.00	0.00	75.00	0.00	
ÜçHat1	0.6	0.00	0.00	100.00	0.00	
	0.8	0.00	0.00	100.00	31.67	0.00
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Hat						
YeHat3		0.00	0.00	100.00	32.22 ^a	10.00
GüHat2		12.50	0.00	87.50	0.00 ^b	
ÜçHat1		0.00	0.00	100.00	15.83 ^{ab}	0.00
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	3.53	
Agar (%)						
0.6		0.00	0.00	100.00	15.90	0.00
0.8		8.33	0.00	91.67	16.13	10.00
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Varyasyon Katsayısı		489.90	0.00	21.30	182.45	

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

Çizelge 4.17. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 hatlarında %0.6 veya 0.8 agar ve 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı rejenerasyon ortamında oluşan embriyoların %0.8 agar içeren çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma, bitkiye dönüşme ve saksıya aktarma oranları

Hat	Agar (%)	Gelişen Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kararan Embriyo Oranı (%)	Bitkiye Dönüşen Embriyo Oranı (%)	Saksıya Aktarılan Bitki Oranı (%)
YeHat3	0.6'dan 0.8	9.82	0.00	25.00	50.00	25.00
	0.8'den 0.8	5.00	25.00	0.00	0.00	0.00
ÜçHat1	0.8'den 0.8	12.83	25.00	10.00	10.00	25.00

Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde sıvı ortam miktarının ve bu sıvı fazın çalkalanmasının embriyo oluşumu üzerindeki etkilerinin, ÜçHat1 hattında

araştırıldığı çalışmanın (PÇ9) sonuçları Çizelge 4.18’de verilmiştir. Bu çalışma, bir önceki denemede olduğu gibi 2019’un Eylül ayında dikilen 2 aylık bitkilerin tomurcukları kullanılarak aynı yılın Kasım ayında kurulmuştur. Bütün uygulamalarda sıvı üst fazda bulunan anterler gerekli ön uygulamalardan sonra, karanlık koşullarda çalkalamalı inkübatörde 100 devir/dk’da çalkalanmıştır. Bu çalışmada uygulanan faktörlerin, yapılan gözlemler üzerinde istatistiksel açıdan önemli düzeyde etkili olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.18). Bununla birlikte embriyo oluşumu, yalnızca “0 devir/dk x 1.5 mL sıvı ortam” interaksiyonunda 33.74 embriyo/100 anter olarak gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.18. ÜçHat1 hattında 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde farklı sıvı ortam miktarı ile çalkalama uygulamalarında rejenerasyon ortamında belirlenen kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Sıvı Ortam Miktarı (mL)	Çalkalama Hızı (Devir/dk)	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)	Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)
1.5	0	25.00	0.00	75.00	33.74	5.00
3		25.00	0.00	75.00	0.00	
1.5	100	0.00	0.00	100.00	0.00	
3		0.00	0.00	100.00	0.00	
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Sıvı Ortam Miktarı (mL)						
1.5		12.50	0.00	87.50	16.87	5.00
3		12.50	0.00	87.50	0.00	
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Çalkalama Hızı (Devir/dk)						
0		25.00	0.00	75.00	16.87	5.00
100		0.00	0.00	100.00	0.00	
Tukey HSD Değeri		Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	
Varyasyon Katsayısı		282.84	0.00	40.41	295.44	
ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır						

Bu denemede rejenerasyon ortamında çalkalanmayan 1.5 mL sıvı ortamda oluşan embriyolardan %13.95’i çimlenme ortamında gelişmiş ve tüplere alınanların %8.33’ü bitkiye dönüşmüştür (veriler gösterilmemiştir). Sonuç olarak bitkiye dönüşenlerin %25.00’i saksıya aktarılmış ve denemeden bir adet bitki elde edilmiştir. Fakat, çalkalanan kültürlerde hiç embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Ancak Doğan ve Arı

(2019) süs biberinde, çift katmanlı anter/mikrospor kültürlerinde çalkalanan kültürlerin, çalkalanmayanlara göre 4.5 kat daha fazla embriyo ürettiğini ve çalkalayıcı kullanımının embriyo verimini arttırdığını rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar ile bizim çalışmamızın sonuçları paralellik göstermemiştir. Bunun nedenleri, söz konusu çalışmada kullanılan katı ve sıvı ortam miktarları ile çalkalama hızlarının çalışmamızdan farklı olması ve karıştırıcı kullanımının etkilerinin genotipe bağlı olarak değişiklik göstermesi olabilir.

Mart 2020 tarihinde kurulan bir başka denemede (PÇ10) kullanılan tomurcuklar, 2019'un Ekim ayında dikilmiş olan 5 aylık bitkilerden alınmıştır. Çalışmada, 2 farklı katı ortam (5 ve 3 mL) ve sıvı ortam (3 ve 1.5 mL) miktarı ile katı ortama eklenen 2 değişik agar kaynağının (Sigma ve Duchefa) çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminin başarısı üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır (Çizelge 4.19). Çalışmada etkisi incelenen faktörlerin, yapılan gözlemler üzerinde istatistiksel açıdan önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ancak bütün uygulamalarda embriyo oluşumu gerçekleşmiş olup, 62.50 embriyo/100 anter ("5 mL katı ortam x 3 mL sıvı ortam x Sigma agar" kombinasyonu) ile 7.50 embriyo/100 anter ("3 mL katı ortam x 3 mL sıvı ortam x Sigma agar" kombinasyonu) arasında değişmiştir. Ayrıca sağlıklı anter oranının yüksek olmasına bağlı olarak kontamine olan embriyo oranının %0.0 ile 12.8 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Çalışma neticesinde gelişme göstererek tüplere alınan embriyoların tümü Duchefa agar kullanılan uygulamalardan elde edilmiştir (Çizelge 4.20). Duchefa agar kullanılan uygulamalar arasında "5 mL katı ve 3 mL sıvı ortam" uygulaması, diğer uygulamalara göre daha yüksek oranda embriyo gelişimi sağlanmıştır. Denemede Duchefa agar kullanılan "5 mL katı ve 3 mL sıvı ortam", "3 mL katı ve 1.5 mL sıvı ortam" ile "3 mL katı ve 3 mL sıvı ortam" kombinasyonlarında %25.00 oranında bitkiye dönüşüm gözlenmiştir. Söz konusu uygulamalarda saksıya aktarılan bitki oranlarının ise aynı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.19. ÜçHat1 hattında 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde farklı katı ve sıvı ortam miktarı ile iki agar kaynağı kombinasyonlarında, rejenerasyon ortamında belirlenen kontaminasyon, kararma, sağlıklı anter ve embriyo oranları

Katı Ortam Miktarı (mL)	Sıvı Ortam Miktarı (mL)	Agar Kaynağı	Kontamine Olan Anter Oranı (%)	Kararan Anter Oranı (%)	Sağlıklı Anter Oranı (%)	Embriyo Sayısı (adet/100 anter)	Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)
5	1.5	Duchefa	0.00	0.00	100.00	24.48	12.08
	3		0.00	0.00	100.00	29.69	2.27
3	1.5		0.00	0.00	100.00	15.63	5.00
	3		25.00	0.00	75.00	14.06	8.33
5	1.5	Sigma	0.00	0.00	100.00	19.44	0.00
	3		0.00	0.00	100.00	62.50	1.39
3	1.5		0.00	0.00	100.00	11.32	0.00
	3		25.00	0.00	75.00	7.50	0.00
Tukey HSD Değeri			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Katı Ortam Miktarı (mL)							
5			0.00	0.00	100.00	34.03	3.94
3			12.50	0.00	87.50	12.13	3.33
Tukey HSD Değeri			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Sıvı Ortam Miktarı (mL)							
1.5			0.00	0.00	100.00	17.72	4.27
3			12.50	0.00	87.50	28.44	3.00
Tukey HSD Değeri			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Agar Kaynağı							
	Duchefa		6.25	0.00	93.75	20.96	6.92
	Sigma		6.25	0.00	93.75	25.19	0.35
Tukey HSD Değeri			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Varyasyon Katsayısı			400.00	0.00	26.67	166.03	269.55

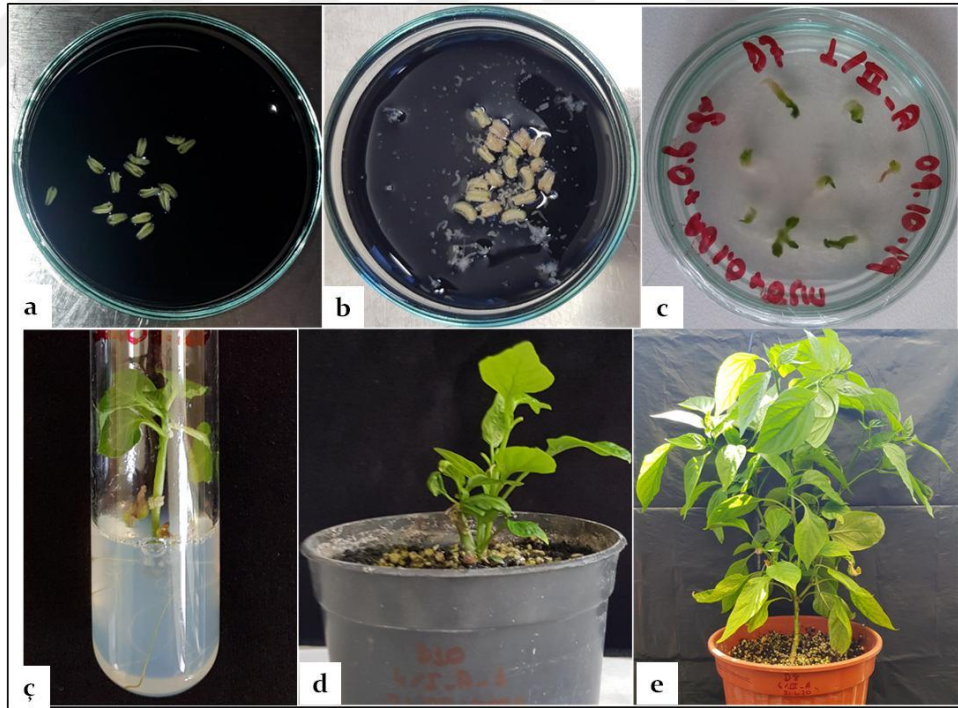
ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü ile ilgili olarak kurulan bütün denemelerden elde edilen veriler beraber değerlendirildiğinde, Hatay biberi popülasyonlarından YeHat3 ve ÜçHat1 genotiplerinde androjenik bitkilerin üretilmesini sağlayan çalışmalardan alınan fotoğraflar ile bu kültür sisteminin önemli aşamaları Şekil 4.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.20. ÜçHat1 hattında 250 mg/L sefotaksim eklenen çift katmanlı anter/mikropor kültürü sisteminde farklı katı ve sıvı ortam miktarı ile iki farklı agar kaynağı uygulamalarında, rejenerasyon ortamında oluşan embriyoların çimlendirme ortamında gelişme, kontaminasyon, kararma, bitkiye dönüşme ve saksıya aktarma oranları

Katı Ortam Miktarı (mL)	Sıvı Ortam Miktarı (mL)	Agar Kaynağı	Gelişen Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kontamine Olan Embriyo Oranı (%)	Tüpte Kararan Embriyo Oranı (%)	Bitkiye Dönüşen Embriyo Oranı (%)	Saksıya Aktarılan Bitki Oranı (%)
5	1.5	Duchefa	0.00				
	3		4.55	0.00	0.00	25.00	25.00
3	1.5		2.50	0.00	0.00	25.00	25.00
	3		2.78	0.00	0.00	25.00	25.00
5	1.5	Sigma	0.00				
	3		0.00				
3	1.5		0.00				
	3		0.00				
Tukey HSD Değeri			Ö.D.				
Varyasyon Katsayısı			338.87				

ÖD: Aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki fark, %5 önem düzeyinde anlamlı bulunmamıştır

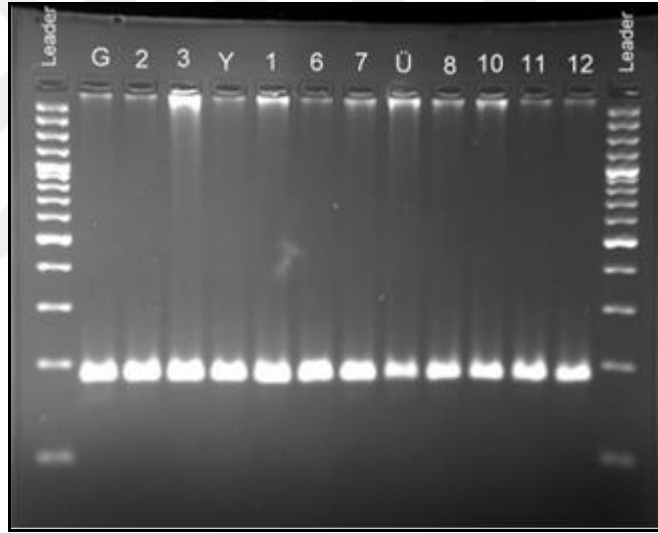


Şekil 4.2. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde önemli aşamalar.

a) Anterlerin rejenerasyon ortamında sıvı fazdaki görüntüsü, b) Sıvı fazda oluşan embriyolar, c) Çimlendirme ortamında gelişen embriyolar, ç) Tüpe alınan bitkicikler, d) 0.5 L'lik saksılara aktarılmış bitkiler, e) Aklimatize edildikten sonra 16 L'lik saksılara alınarak serada yetiştirilen bitkiler

4.3. Çift Katmanlı *In Vitro* Anter/Mikrospor Kültürü ile Üretilen Bitkilerde SSR Testleri

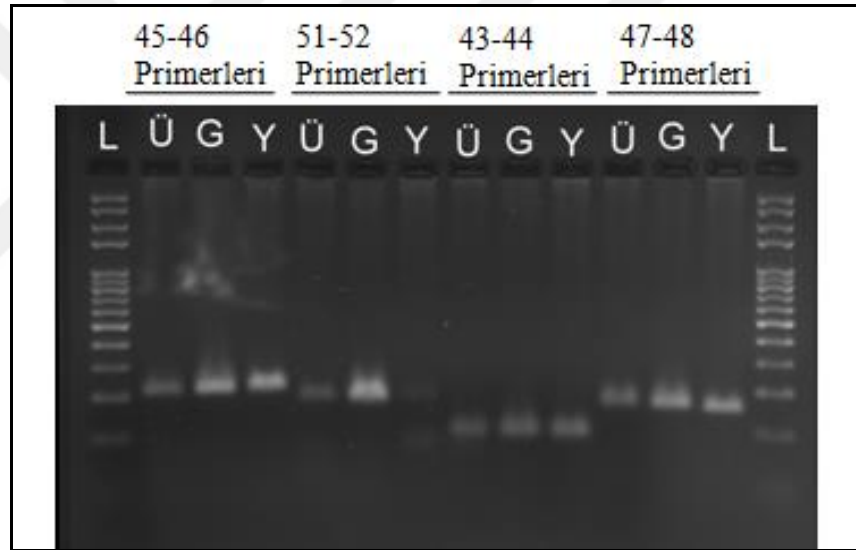
ÜçHat1, GüHat2, YeHat3 bitkilerinden ve bu hatlardan androgenesis çalışmaları sonucunda elde edilen *in vitro* bitkilerden izole edilen DNA'lar, Keleş ve ark. (2015)'nın haploid ve DH biber bitkilerini ayırt etmede kullandıklarını bildirdikleri Hpms1-117 (29-30) primer çifti (L: 5'-ACCCAAATTTCCTTGTGAT-3', R: 5'-AATCCATAACCTTATCCCATAAA-3') kullanılarak PCR'da çoğaltılmıştır. Bu DNA'nın jel görüntüsü Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekil 4.3'te görüldüğü üzere bu primer çiftiyle PCR ile çoğaltılan DNA, polimorfik özellik göstermemiş ve diploid (donör) kaynak hatların çoğaltılan bitki DNA'larından elde edilmesi beklenen çift DNA bandı üretilmemiştir.



Şekil 4.3. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 donör hatları ile *in vitro* androgenesis denemelerinden elde edilen bitkilerin DNA'ları kullanılarak 29-30 primer çifti ile yapılan PCR sonucu çoğaltılan DNA'nın jel elektroforez görüntüsü. Leader: 100 bç. G: GüHat2, 2: 3/III-A-1, 3: 4/IV-1, Y: YeHat3, 1: 2/III-1, 6: 2/II-A-1, 7: 2/III-A-1, Ü: ÜçHat1, 8: 6/I-A-2, 10: 6/I-A-4, 11: 6/I-A-5, 12: 6/I-D1

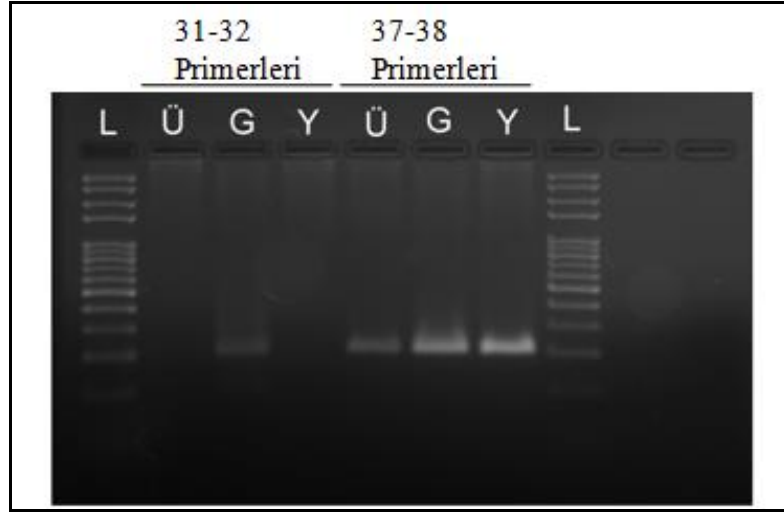
Keleş ve ark. (2015)'nın haploid ve DH biber bitkilerini ayırt etmede kullandıklarını bildirdikleri primer çiftinin (29-30), araştırmada kullandığımız biber hatlarında söz konusu ayrımı yapamaması üzerine, farklı kaynaklardan yararlanılarak yeni primer çiftleri belirlenmiştir. Bu primer çiftleri belirlenirken Integrated DNA Technologies web sitesi (IDT, <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) kullanılarak primerlerin bağlanma sıcaklıkları, kendi üzerlerine katlanma sıcaklıkları (Hairpin ve

self-dimer oluşturmaları) ve eşlerine yapışma (Heterodimer oluşturma) olasılıkları gibi detaylar incelenerek çalışmaya uygunlukları tespit edilmiştir. Ayrıca bazı primer çiftlerinin muhtemel ürün uzunlukları belirlenmiş (<https://solgenomics.net/search/markers>) ve bunların farklı kromozomlardaki SSR bölgelerini çoğaltıyor olmasına zen gösterilmiştir. Çizelge 3.2’de detayları verilen bu primer çiftlerinin, *in vitro* bitkilerin ploidi seviyelerinin tespitinde kullanılabilmeleri için öncelikle diploid donör hatların DNA’larının PCR ile çoğaltılması sonucu çift bant üretmeleri gerekmektedir. şekil 4.4, 4.5 ve 4.6’da bu primer çiftleriyle yapılan PCR alışmaları sonucu çoğaltılan DNA’ların jel elektroferez sisteminde oluşan görüntüleri verilmiştir. Denenen primer çiftlerinden sadece 51-52 primer ifti YeHat3 hattında istenilen çift bantı üretmiştir (şekil 4.4).

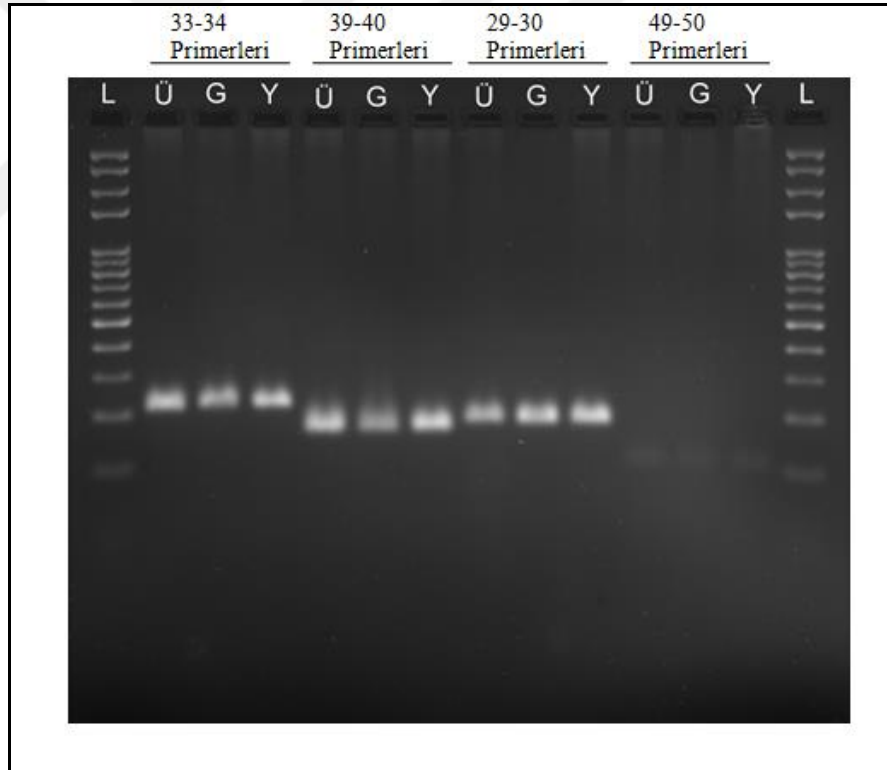


şekil 4.4. ÜHat1, GüHat2 ve YeHat3 donör hatlarının DNA’ları kullanılarak 45-46, 51-52, 43-44 ve 47-48 primer çiftleri ile yapılan PCR sonucu çoğaltılan DNA bantlarının jel görüntüsü. L: 100 b leader, G: GüHat2, Y: YeHat3, Ü: ÜHat1

Diğer primer çiftleri için dnr hatların DNA’ları, tek bant oluşturmuşlardır (şekil 4.4, 4.5 ve 4.6). Dolayısıyla ÜHat1 ve GüHat2 hatlarında yapılan androgenesis çalışmalarından elde edilen bitkilerin ploidi seviyeleri, SSR düzeyinde analiz edilememiştir.



Şekil 4.5. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 donör hatlarının DNA'ları kullanılarak 31-32 ve 37-38 primer çiftleri ile yapılan PCR sonucu çoğaltılan DNA bantlarının jel görüntüsü. L: 100 bp leader, G: GüHat2, Y: YeHat3, Ü: ÜçHat1



Şekil 4.6. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 donör hatlarının DNA'ları kullanılarak 33-34, 39-40, 29-30 ve 49-50 primer çiftleri ile yapılan PCR sonucu çoğaltılan DNA bantlarının jel görüntüsü. L: 100 bp leader, G: GüHat2, Y: YeHat3, Ü: ÜçHat1

4.4. Stoma Bekçi Hücrelerinde Kloroplast Sayımı

Stoma bekçi hücrelerinde yapılan kloroplast sayım çalışmaları sonucunda diploid oldukları bilinen ana bitkilerin ortalama kloroplast sayılarının ÜçHat1 için 20.02, GüHat2 için 20.55 ve YeHat3 için 19.15 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.21). *In vitro* androgenesis denemelerinden elde edilen bitkilerin kloroplast sayıları ise 10.03 ila 19.95 arasında değişmiştir. Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9’da donör bitkiler ile birlikte onlardan elde edilen bazı *in vitro* androjenik bitkilerin kloroplast sayımı sırasında çekilen mikroskop görüntüleri verilmiştir.

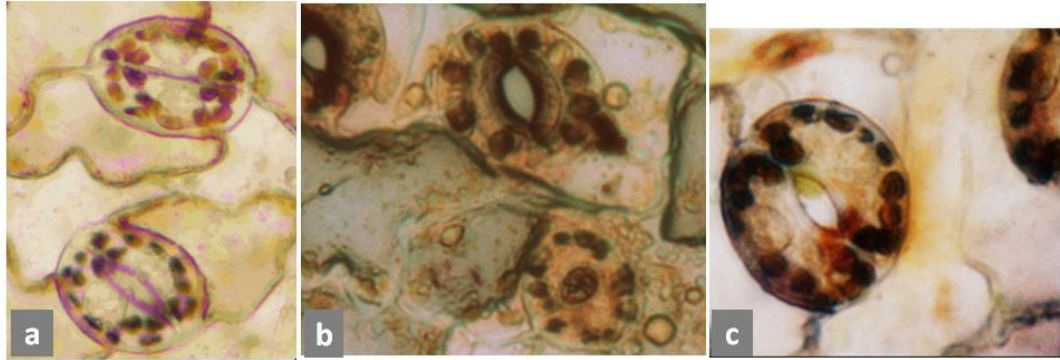
Çizelge 4.21. ÜçHat1, GüHat2 ve YeHat3 donör hatlarının bitkileri ve androgenesis çalışmaları ile bu hatlardan elde edilen *in vitro* androjenik bitkilerin stoma bekçi hücrelerindeki ortalama kloroplast sayıları

Bitki	Ortalama Kloroplast Sayısı	Bitki	Ortalama Kloroplast Sayısı
ÜçHat1 (Donör)	20.02	YeHat3 (Donör)	19.15
PÇ10- 2/II-A-1	16.75	PÇ7- 1/III-A	18.43
PÇ10- 2/II-A-2	16.71	PÇ8- 1/IV-A	16.97
PÇ9- 2/III-A	18.90	PÇ7- 2/III-A	17.95
PÇ10- 3/I-A-1	10.23*	PÇ7- 2/II-A-1	17.20
PÇ10- 4/I-A-1	10.03*		
PÇ7- 6/I-A-1-1.k	17.96	GüHat2 (Donör)	20.55
PÇ7- 6/I-A-5	18.60	PÇ7- 4/IV-1	10.05*
PÇ7- 6/I-C-1	19.56		
PÇ7- 6/I-C-2	18.12		
PÇ7- 6/I-D-1	18.72		
PÇ7- 6/I-E	12.32*		
PÇ8- 6/III-A-1	12.15*		
PÇ8- 6/III-A-2	19.95		

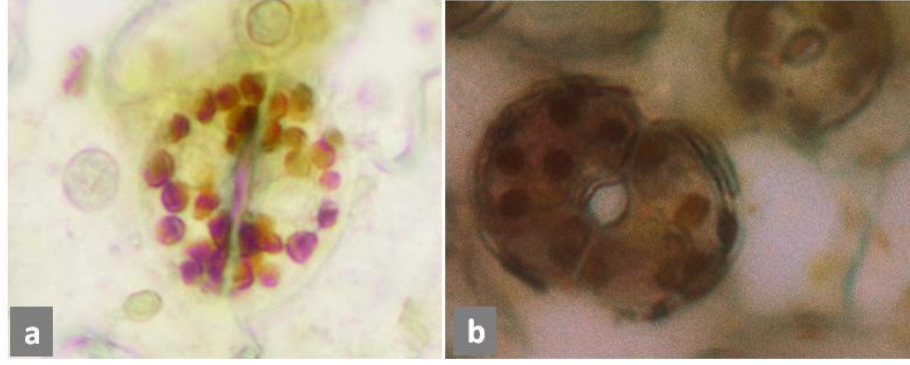
* Ortalama kloroplast sayısına göre haploid olduğu değerlendirilen *in vitro* bitkiler

Çizelge 4.21’de verilen kloroplast sayıları incelendiğinde toplam 18 *in vitro* androjenik bitkiden 5’inin haploid olduğu ve ortalama kloroplast sayılarının 10.03 ile 12.32 arasında değiştiği belirlenmiştir. Kalan 13 *in vitro* bitkinin (%72.22) ise yüksek olasılıkla dihaploid veya diploid oldukları değerlendirilmektedir. Veriler değerlendirildiğinde, 18 bitkiden 13’ünün yüksek olasılıkla spontan DH olduğu, dolayısıyla fertil ve saf oldukları değerlendirilmiştir. Nitekim Keleş ve ark. (2015),

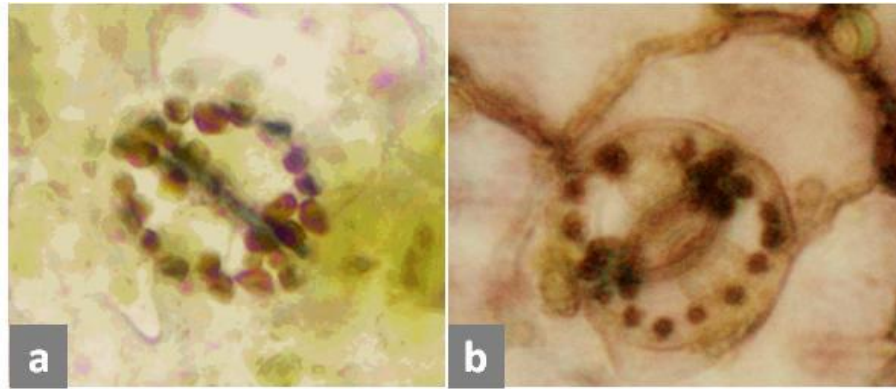
farklı biber çeşitlerinde anter kültürü ile elde ettikleri androjenik bitkilerde, spontan DH oranının %53.4 ila %22.2 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Çift katmanlı sistemde çoğunlukla mikrosporlar, sıvı ortam içerisinde dağılarak farklılaştığı için bu bitkilerin yüksek olasılıkla dihaploid oldukları değerlendirilebilir. Bu sonuçlar Qin ve Rotino (1995)'in biberde yaptıkları çalışmayı destekler niteliktedir. Araştırmacılar, çalışmalarında hiçbir haploid bireyin ortalama kloroplast sayısının diploid bir bireyinki ile aynı olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca haploid bitkilerin aralarında ve benzer şekilde diploid bitkilerin kendi aralarında ploidi seviyeleri bakımından önemli farklılıkların bulunmadığını da rapor etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara dayanarak kloroplast sayımının, bitkinin genetik geçmişine bakılmaksızın haploidleri diploidlerden ayırabildiğini ve bu sebeple anter kaynaklı dihaploidlerin kullanıldığı ıslah çalışmalarını hızlandırabilmek için erken ploidi tahmininde güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Qin ve Rotino, 1995). Bizim çalışmamızda da elde edildikleri donör bitkilere bağlı olmaksızın, hem haploid hem diploid/dihaploid bitkilerin ortalama kloroplast sayıları kendi içlerinde benzer sonuçlar vermiş, haploidler ve diploid/dihaploidler arasında tereddüt yaratacak herhangi bir yakın değer elde edilmemiştir.



Şekil 4.7. ÜçHat1 donör bitkisinin (a) ve bu hattan elde edilen haploid 6/I-E (b) ve diploid/dihaploid 6/I-A-5 (c) bitkilerin stoma bekçi hücrelerindeki kloroplastların mikroskop görüntüleri



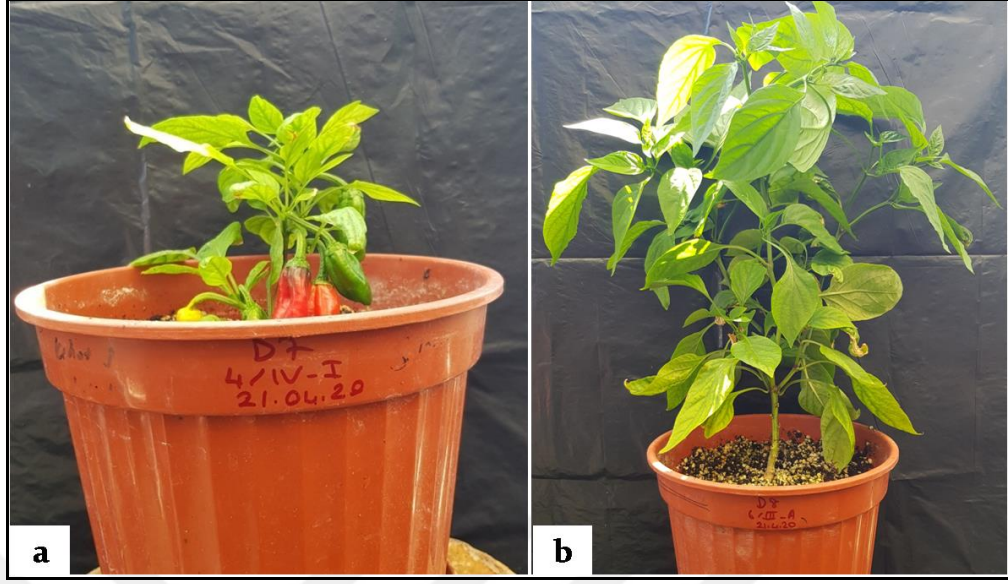
Şekil 4.8. GüHat2 donör bitkisinin (a) ve ondan elde edilen haploid 4/IV-1 (b) bitkisinin stoma bekçi hücrelerindeki kloroplastların mikroskop görüntüleri



Şekil 4.9. YeHat3 donör bitkisinin (a) ve diploid/dihaploid 2/III-A (b) bitkilerin stoma bekçi hücrelerindeki kloroplastların mikroskop görüntüleri

4.5. Androgenesis Çalışmalarında Üretilen Bitkilerin Bazı Morfolojik ve Pomolojik Özellikleri

Elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerinin belirlenmesinde, androjenik biber bitkilerinde yapılan morfolojik ve pomolojik gözlemlere dayalı veriler de kullanılabilmektedir (Kisiala ve ark., 2011; Shestra ve ark., 2011; Grozeva ve ark., 2021; Olszewska ve Tomaszewska-Sowa, 2021). Çalışmamızda, üretilen androjenik bitkilerin pomolojik özelliklerine ait veriler, yukarıda sonuçları verilen stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayımı sonuçlarını desteklemektedir. Nitekim üretilen androjenik bitkilerde yapılan gözlemler sonucunda haploid bitkilerin boyu (Şekil 4.10) ve boğum arası uzunluğu (Şekil 4.11), diploid/DH olarak belirlenen bitkilerden daha kısa, yaprak ve çiçeklerinin (Şekil 4.12) ise daha küçük oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde üretilen haploid (a) ve diploid/DH (b) bitkilerin genel görüntüsü



Şekil 4.11. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde gelişen haploid (solda) ve diploid/DH (sağda) bitkilerin boğum araları



Şekil 4.12. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminden elde edilen haploid (solda) ve diploid/DH (sağda) bitkilere ait yaprak ve çiçekler

Haploid bitkiler kısa boyları, küçük yaprakları ve çiçek tomurcukları, kısa yaprak sapı ve boğum arası uzunlukları ile karakterize edilirler ve sterildirler. Haploidlerin steril olmasının sebebi, homolog kromozom bulundurmamaları nedeniyle mayoz bölünmenin normal bir şekilde gerçekleşmemesi ve canlı gamet oluşturmamasıdır (Luitel ve ark., 2012). Dolayısıyla androgenesis sonucu oluşan bitkilerin oluşturdıkları meyvelerin özellikleri ve tohum üretim durumu, bu bitkilerin haploid olup olmadıkları konusunda yapılan diğer gözlemleri destekleyebilecektir. Çalışmamızda saksıya aktarılan bitkilerden gelişen olgun meyveler toplandıktan sonra uzunlukları ölçülmüş ve tohum oluşturmaları durumunda tohum sayıları tespit edilmiştir (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. Androgenesis çalışmaları sonucu elde edilen bitkilerden alınan meyvelerin sayısı, ortalama meyve boyu ve tohum sayısı

Deneme	Donör Hat	Androjenik Bitki	Meyve Sayısı (adet)	Ortalama Meyve Boyu (cm)	Ortalama Tohum Sayısı (adet)
PÇ7	YeHat3	1/III-A	14	6.39	8.07
PÇ7	YeHat3	2/III-A	11	12.05	58.82
PÇ7	YeHat3	2/III-2	17	11.56	41.71
PÇ7	GüHat2	4/IV-1*	9	3.22	0.00
PÇ7	ÜçHat1	6/I-A-1-1.k	8	6.57	7.57
PÇ7	ÜçHat1	6/I-C-1	8	11.31	41.38
PÇ7	ÜçHat1	6/I-C-2	14	7.75	9.93
PÇ7	ÜçHat1	6/I-D-1	20	9.48	16.15
PÇ7	ÜçHat1	6/I-E*	11	3.64	0.00
PÇ8	YeHat3	1/IV-A	24	7.57	27.17
PÇ8	ÜçHat1	6/III-A-1*	25	3.88	0.00
PÇ8	ÜçHat1	6/III-A-2	20	7.48	3.70
PÇ9	ÜçHat1	2/III-A	9	4.77	4.55
PÇ10	ÜçHat1	2/II-A-1	2	9.00	11.50
PÇ10	ÜçHat1	2/II-A-2	3	16.66	37.33
PÇ10	ÜçHat1	3/I-A-1*	0		
PÇ10	ÜçHat1	4/I-A-1*	0		

* Pomolojik gözlemlere göre haploid olduğu değerlendirilen *in vitro* bitkiler

Üretilen androjenik bitkilerin Çizelge 4.22’de verilen meyve ve tohum özellikleri hakkındaki veriler incelendiğinde; 17 bitkiden 2’sinin hiç meyve oluşturmadığı, 3 bitkiden ise ortalama 9, 11 ve 25 adet meyve elde edildiği, küçük ve tohumlu olan bu meyvelerin ortalama uzunluklarının sırasıyla 3.22, 3.64 ve 3.88 cm olduğu görülmektedir. Kalan 12 bitkinin tümünden meyve elde edildiği ve ortalama meyve sayısının en düşük 2, en yüksek 24 adet olduğu tespit edilmiştir. Meyvelerin ortalama uzunlukları 4.77 ila 16.66 cm arasında değişmiştir. Bu meyvelerin tamamından tohum elde edilmiş ve bu ortalama değerler de 3.70 ila 58.82 adet aralığında olmuştur. Meyve ölçümlerinde gözlenen tüm veriler, stoma sayımlarından elde edilen sonuçları da destekler nitelikte olup, *in vitro* bitkiler arasında 5’inin haploid, 12’sinin ise diploid/DH oldukları sonucuna varılmıştır. Şekil 4.13’te bu tez çalışması sonucunda elde edilen haploid ve diploid/DH bitki meyvelerinin fotoğrafları verilmiştir.



Şekil 4.13. Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminden elde edilen haploid PC8-6/III-A-1 (a) ve diploid/DH PC8-1/IV-A (b) bitkilerden alınan olgun meyveler.

4.6. Kolhisin Uygulamalarından Elde Edilen Bulgular

Çift katmanlı anter/mikrospor kültür çalışmalarından elde edilen haploid bitkilerin kromozom katlamalarını sağlamak için uygulanması gereken kolhisin dozu ve süresini belirlemek amacıyla kurulan denemelerden bitki elde edilememiştir. Kontamine olan eksplantlar dışında kalan sağlıklı tomurcuklar, kolhisinsiz ortama alındıktan yaklaşık 2 hafta sonra yalnızca kallus oluşturmuş, zamanla kararmış ve gelişme göstermemiştir. Sonuç olarak üç ayrı denemede kullanılan diploid/DH (kontrol) ve haploid bitkilerden alınan toplam 1151 eksplantın hiçbirinde sürgün oluşumu gerçekleşmemiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada, Hatay biber popülasyonlarından seçilmiş olan bazı hatların anter kültürü ile saflaştırılmasını sağlayabilecek etkin bir protokolün geliştirilmesi ve ıslah çalışmalarında kullanılabilecek saf hatların üretilmesi amaçlanmıştır. Bunu sağlayabilmek için Dumas de Vaulx ve ark. (1981) tarafından geliştirilen iki aşamalı anter kültürü sistemi ve Dolcet-Sanjuan ve ark. (1997) tarafından geliştirilip, Supena ve ark. (2006a) tarafından değiştirilerek kullanılan shed-mikrospor kültürü yöntemi olarak adlandırılan çift katmanlı anter/mikrospor kültürü çalışmaları yapılmıştır.

İki aşamalı anter kültürü çalışmalarında, DDV-C ortamlarına eklenen %0.5 oranında aktif kömürün uygulandığı iki ayrı denemede kullanılan ÜçHat1, GüHat2 ve AvHat3 biber hatlarından embriyo elde edilememiştir. Ancak ÜçHat1 hattı, GüHat2 ve AvHat3 hatlarına kıyasla kültür ortamında daha yüksek sağlıklı anter oranına sahip olduğundan, sonraki çalışmalarda kullanımı açısından ümit var bir hat olarak değerlendirilmiştir. Bu denemelerde karşılaşılan yüksek kontaminasyonu azaltmak için ortama 250 mg/L sefotaksim eklenmesi, istatistik açıdan önemli olmasa da YeHat3 hattında kontaminasyonu nispeten azaltarak sağlıklı anter oranında artış sağlamıştır. Buna rağmen sağlıklı anterler üzerinden embriyo oluşumu gerçekleşmemiştir. Anter kültürünün başarısı üzerinde genotipin etkisi göz önünde bulundurularak, bu yöntemin tez çalışmasında kullanılan hatlar için yeterince etkin olmadığı belirtilebilir.

Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü sisteminde katı ve sıvı ortamlara 10 mg/L gümüş nitratın eklenmesinin embriyo oluşumu üzerinde olumlu bir etkisinin bulunmadığı değerlendirilmiştir. Bu uygulamalarda YeHat3 hattı, ÜçHat1 hattına göre daha yüksek oranda embriyo oluşturmakla birlikte, sonraki aşamalarda karşılaşılan kontaminasyon ve kararmaların da etkisiyle kullanılan iki genotipte bitki oluşumu gerçekleşmemiştir. Tüm uygulamalara 250 mg/L sefotaksim eklenmesi iki hat arasındaki embriyo oluşum oranlarındaki farkı azaltmıştır. Embriyo oluşumundaki artışın sefotaksime bağlı olup olmadığının anlaşılabilmesi amacıyla uygulanan 0 veya 10 mg/L gümüş nitrat ve 0 veya 250 mg/L sefotaksim kombinasyonları arasında gümüş nitrat eklenmeyen ortamlardaki embriyo gelişimi, eklenenlere göre ÜçHat1 hattında yaklaşık 4.5 kat; YeHat3 hattında ise yaklaşık 14 kat daha fazla olmuştur. Her iki genotip için en yüksek embriyo oluşum oranı, gümüş nitrat bulunmayan ancak 250

mg/L sefotaksim içeren rejenerasyon ortamında belirlenmiştir. GüHat2 genotipinde ise hiçbir uygulamadan embriyo gelişmemiştir. Sonuçlar, bu tez çalışması kapsamında ortama ilave edilen 10 mg/L gümüş nitrat konsantrasyonunun embriyo gelişiminde olumlu etkisinin bulunmadığını veya azalttığını, 250 mg/L sefotaksim dozunun ise artış sağladığını göstermektedir. Bu embriyo artışının, sefotaksimin anter kontaminasyonunu azaltmasından kaynaklanabileceği sonucuna varılabilir.

Çift katmanlı sistemde embriyo oluşum oranı üzerine, katı ortama eklenen %0.8 agar oranının, %0.6 oranına kıyasla genelde daha olumlu sonuç verdiği gözlenmiştir. Tüplere alınan ve sağlıklı bir şekilde gelişerek saksılara aktarılan bitki oranları bakımından, agar uygulamaları arasında genelde önemli fark oluşmamıştır. Bu sonucun, tüplere alınma sırasında elde edildiği uygulamaya bakılmaksızın her embriyonun %0.8 agar ile katılaştırılan ortamlara transfer edilmesinden kaynaklı olabileceği belirtilebilir. Üç hat ile yapılan 3 denemede oluşan 12 bitkiden 7'si ÜçHat1, 4'ü YeHat3 ve 1'i GüHat2 genotiplerinden elde edilmiştir.

Yine çift katmanlı sistemde 1.5 mL ve 3 mL olmak üzere iki farklı sıvı ortam miktarı ile dakikada 100 devir yapan çalkalayıcı kullanıldığında, sadece 1.5 mL sıvı ortam ile hazırlanan ve çalkalanmayan kültürlerde embriyo üretilmiştir. Yüz anter başına 24 embriyo oluşturan bu uygulamadan yalnızca 1 bitki elde edilebilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarla beraber, çalkalayıcı kullanımının genotipe bağlı olarak embriyo oluşumu üzerinde olumlu etkileri olduğunu bildiren çalışmalar dikkate alındığında, ÜçHat1 hattının çalkalayıcı uygulamaları için uygun bir genotip olmadığı belirtilebilir.

İki ayrı katı ortam (3 mL ve 5 mL) ve sıvı ortam (3 mL ve 1.5 mL) miktarı ile iki farklı agar kaynağının (Sigma ve Duchefa) kullanıldığı çift katmanlı anter/mikrospor kültürü çalışmasında, tüm uygulamalardan embriyo elde edilmiştir. Beş mL katı ortam içeren uygulamalar embriyo oluşturma potansiyeli açısından daha yüksek bir değere sahip olmasına rağmen, 3 mL katı ortamda oluşan embriyoların bitkiye dönüşme ve saksıya aktarılma oranları yaklaşık 2 kat daha fazla olmuştur. Üç mL sıvı ortam kullanıldığında embriyo oluşumunda ve bitkiye dönüşmede daha yüksek değerler alındığı tespit edilmiştir. Agar kaynakları arasındaki karşılaştırma, Sigma agarının daha fazla embriyo oluşturduğu ancak bu embriyoların gelişmediği, Duchefa agar kullanıldığında ise 5 mL katı ortam ve 1.5 mL sıvı ortam kombinasyonu hariç tüm uygulamaların bitki oluşturduğu saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen 4 androjenik

biber bitkisi, bu uygulamalardan üretilmiştir. Agar kaynaklarının embriyo veriminde istatistik açıdan önemli bir fark yaratmadığı, fakat Duchefa agarının bitki oluşturma bakımından daha olumlu sonuçlar verdiği saptanmıştır.

Üç farklı kaynak (donör) genotip ve dört ayrı denemeden elde edilen toplam 18 androjenik bitkinin ploidi seviyelerini belirlemek için 12 primer çifti kullanılarak yapılan SSR markör analizleri sonucunda, 51 (5'-CACCACCAGTCACAAAGTTAC-3') /52 (5'-CCCTTCAAATACATCCCATGC-3') primer çifti, kaynak bitkiler arasından yalnızca YeHat3 genotipinde çift bant oluşturmuştur. Bu sonucun tez çalışmasının tamamlandığı dönemde alınmış olması sebebiyle, bu primer çifti anter kaynaklı bitki DNA'larının analizi ile DH bitkilerin tespitinde kullanılamamıştır.

Ploidi seviyelerinin tespitinde kullanılan bir diğer uygulama, stoma bekçi hücrelerindeki kloroplastların sayısıdır. Bu amaçla ana bitki ve *in vitro* bitkilerden alınan yaprakların stoma bekçi hücrelerinde yapılan inceleme sonucunda, ortalama kloroplast sayıları 10.03 ile 12.32 arasında değişen 5 bitkinin haploid, 16.71 ile 19.95 arasında değişen 13 bitkinin ise diploid veya yüksek olasılıkla dihaploid oldukları belirlenmiştir.

Çift katmanlı anter/mikrospor kültürü denemelerinden elde edilerek saksılara aktarılan bitkilerde yapılan yaprak, çiçek, meyve ve tohum incelemeleri sonucunda 5 adet bitkide yaprak ve çiçeklerin daha küçük, meyve uzunluğunun 3.22 ile 3.88 cm arasında değiştiği ve hiç tohum oluşturmadıkları belirlenmiştir. Oniki adet bitkide ise yaprak ve çiçeklerin daha iri, meyve uzunluğunun 4.77 ile 16.66 cm ve tohum sayısının 3.70 ile 58.82 adet arasında değiştiği saptanmıştır. Dolayısıyla 5 bitkinin haploid, 12 bitkinin ise diploid/DH olduğu tespit edilmiştir. Burada elde edilen sonuçlar, stoma bekçi hücrelerinde yapılan kloroplast sayımı sonuçlarını desteklemiştir.

Haploid bitkilerde kromozom katlama çalışmaları için kolhisinin %0.04, 0.2 veya 0.4 olmak üzere 3 ayrı konsantrasyonu, 3 veya 6 günlük sürelerle *in vivo* bitkilerden alınan sürgün ucu ve yan tomurcuklarına 22.2 µM BAP, 30 g/L sakkaroz ve %0.8 agar içeren MS ortamında *in vitro* koşullarda uygulanmıştır. Bu koşullarda tomurcuklardan sürgün gelişimi gerçekleşmemiş ve zaman içinde kararıp canlılıklarını yitirmişlerdir.

Elde edilen bütün sonuçlar değerlendirildiğinde, bazı Hatay biberi hatlarının anter kültürü çalışmalarında çift katmanlı sistemin, DDV ortamları kullanılan iki aşamalı yöntemden daha başarı olduğu görülmektedir. Çift katmanlı sistemde yaşanan

kontaminasyonlar, anterlerin sıvı ortam üzerinde gelişmeleri sebebiyle tüm tekerrürü etkilemekte ve sağlıklı anter oranını düşürmektedir. Özellikle endojenik bakteri infeksiyonu olduğu bilinen genotiplerle yapılacak anter kültürü çalışmalarında, ortama sefotaksim benzeri antibiyotiklerin eklenmesi çalışmada yaşanacak kayıpların önüne geçebilecektir. Çalışmada kullanılan Hatay biber genotipleri arasında, elde edilen bitki sayıları da dikkate alınarak androgenesis çalışmalarına en iyi yanıt ÜçHat1 genotipinin verdiği görülmektedir. Bunu sırasıyla YeHat3 ve GüHat2 takip etmekte, AvHat3'ün ise denenen anter kültürü uygulamalarına olumlu yanıt vermediği anlaşılmaktadır.

Tez çalışmasından alınan sonuçlar doğrultusunda, bazı Hatay biberi hatlarında saf hatlar elde etmek amacıyla uygulanabilecek protokolün genel aşamaları ve protokolü geliştirebilecek bazı öneriler aşağıda özetlenmiştir.

- 1) Taç yaprakları çanak yapraklarından yaklaşık 2 mm daha uzun olan çiçek tomurcukları tercih edilmelidir.
- 2) Tomurcuklar, 4°C'de karanlıkta 1 gün bekletilmelidir.
- 3) Kültür öncesi tomurcuklar uygun bir dezenfeksiyon yöntemi ile dezenfekte edilmelidir.
- 4) Rejenerasyon ortamı olarak; %2 maltoz, %1 AC ve %0.8 Duchefa agar (Plant Agar) içeren 5 mL katı alt tabaka ile %2 maltoz, 2.5 µM zeatin ve 5 µM IAA, 250 mg/L sefotaksim içeren 3 mL'lik sıvı üst tabakadan oluşan NN ortamı kullanılmalıdır.
- 5) Anterler, kültürün ilk haftası rejenerasyon ortamının sıvı üst tabakasında 9°C'de karanlıkta durağan (çalkalanmayan) koşullarda inkübe edilmeli ve ardından 28±1°C'de sürekli karanlık koşullarda kültüre alınmalıdır.
- 6) Rejenerasyon ortamında oluşan sağlıklı embriyoların (kontamine olmamış kök ve sürgün taslağı olan) çimlendirilmesinde; 0.1 µM BA, %2 sakkaroz, 250 mg/L sefotaksim, %0.8 Duchefa agar içeren 10 mL katı MS ortamı, çimlenen embriyoların büyütülmesi için aynı içerikte ve miktarda ortam bulunan cam tüpler kullanılmalıdır.

Bu protokolün uygulanmasında karşılaşılabilecek sorunların en önemlileri vitrifikasyon ve düşük embriyo kalitesidir. Bu iki problemin önlenmesi için çalışmalar yapılmalıdır.

Kromozom katlamasının *in vitro* koşullarda yapılabilmesi için öncelikle biber hatlarından üretilecek haploid bitkilerin çoğaltılmasında başarıyla kullanabilecek kardeşlendirme ve rejenerasyon protokolleri geliştirilmelidir. Zira literatürde bildirilen ve tez kapsamındaki kromozom katlamaları denemelerinde kullanılan rejenerasyon yöntemi, Hatay biberi hatlarında başarılı olamamıştır.

Her genotipte çalışmalardan elde edilen androjenik bitkiler arasında haploid/spontan dihaploid olanlar ile diploid olanların ayırt edilmesi için farklı SSR primer çiftleri denenmelidir ve donör genotiplerde çift bant oluşturanlar söz konusu ayrımı yapmak amacıyla kullanılmalıdır. Ayrıca bu bitkilerde Flow Sitometri ve kök hücrelerinde kromozom sayımı yapılarak ploidi düzeyi belirlenebilir.

KAYNAKLAR

- Arı, E., Yıldırım, T., Mutlu, N., Büyükalaca, S., Gökmen, Ü. and Akman, E., 2016. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). **Turk. J. Biol.**, 40: 944-954.
- Asif, M., Rahman, M., Mirza, J.I. and Zafar, Y., 2008. “High-resolution metaphor agarose gel electrophoresis for genotyping with microsatellite markers”, **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, 45 (1), 75–79.
- Badiger, B.G., 2017. Basic principles and recent advances in anther/pollen culture for crop improvement. **Plant Biotechnology**, Volume 1, Chapter 5.
- Bat, H., Shidfar, M., Çömlekçioğlu, N. and Ellialtıoğlu, Ş., 2020. *In vitro* androgenesis in pepper and the affecting factors on success: I. Carbon source and concentrations. **Biotech Studies**, 29(2): 62-68.
- Bayıroğlu, B.M., 2018. Yarıyol materyali oluşturulması amacıyla farklı patlıcan türlerinin melezlenebilirliğinin araştırılması. **Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Hatay. 78 s.
- Bek, Y. ve Efe, E., 1989. **Araştırma ve Deneme Metodları I**, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ders kitabı No:71, Adana.
- Benli, Y., 2019. Bazı biber (*Capsicum annuum* L.) genotiplerinin farklı androgenesis yöntemlerine verdiği tepkiler üzerine bir araştırma. **Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Antalya. 43 s.
- Binbir, S., 2010. Bazı yerel biber (*Capsicum annuum* L.) populasyonlarında karakterizasyon çalışmaları. **Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın. 100 s.
- Bozolkalfa ve Eşiyok, 2010. Biber (*Capsicum annuum* L.) aksesyonlarında genetik çeşitliliğin agronomik özellikler ile belirlenmesi. **Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.**, 47 (2): 123-134.
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu N., Abak, K., Ekbiç, E. and Kılıç, N., 2004. Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. **Europ. J. Hort. Sci.**, 69 (5): 206–209.
- Chambonnet, D., 1988. Production of haploid pepper plants. In: Bulletin interne de la Station d'Amelioration des Plantes Maraicheres d'Avignon, Montfavet, France, pp 1–10
- Çağlar, G., Aras, V. ve Bayram, A., 2004. Kurutmalık kırmızı biberlerde androgenesis yoluyla *in vitro* haploid embriyo uyartımı. **Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fak. Derg.**, 17 (1): 87-94.
- Çömlekçioğlu, N. and Ellialtıoğlu, Ş., 2018. Review on the research carried out on *in vitro* androgenesis of peppers (*Capsicum annuum* L.) in Turkey. **Research Journal of Biotechnology**, 13 (6): 75-84.

- Doğan, S. and Arı. E., 2019. Effect of shaker use on embryo yield in shed-microspore cultures of ornamental peppers. **Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi**, 5(2):299-307.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E. and Huerta, A., 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L.-Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 122 (4): 468-47.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19, 11-15.
- Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D. and Pochard, E., 1981. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes des traitements à + 35°C. **Agronomie** 1: 859-864.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K., 2001. **Haploid Bitki Üretimi** (Editörler: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan, Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulamaları.) S.Ü. Basım Evi, ISBN: 975-6652-03-9. 137-189, Konya.
- Ercan, N. ve Şensoy., F.A., 2011. Androgenic responses of different pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. **Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi**, 4 (2): 59-61.
- FAO, 2021. (Food and Agriculture Organization of the United Nations), <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Son Erişim Tarihi: 02.10.2021
- Gamborg, O.L., Miller, R. and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp Cell Res**, 50: 151-158.
- Gémesné Juhász, A., Petus, M., Gyulai, G., Cséplö, M., Venczel, G. and Zatykó, L., 2001. Genetic variability of anther donor versus spontaneous doubled haploid descendents and colchicine induced doubled haploid sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) Lines. **Acta Hort.** 560: 149-152.
- George, L. and Narayanaswamy, S., 1973. Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. **Protoplasma**. 4: 467-470. (<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01275781>)
- Göçmen, M., 2006. Biberlerde *Phytophthora capsici*'ye karşı dayanıklılıkta genotip x izolat interaksiyonu ve farklı dayanıklılık kaynaklarının karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana. 175 s.
- Grozeva, S., Tringovska, I., Nankar, A.N., Todorova, V. and Kostova, D., 2021. Assessment of fruit quality and fruit morphology in androgenic pepper lines (*Capsicum annuum* L.). **Crop Breeding, Genetics and Genomics**, 2(1).
- Hedge, V., Partap, P.S. and Yadav R.C., 2017. *In vitro* regeneration of Capsicum (*Capsicum annuum* L.) from cotyledon explants. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, 6(5): 225-237.
- Irikova T.P., Kintzios, S., Grozeva, S. and Rodeva, V., 2011. Pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture: fundamental research and practical applications. **Turkish Journal of Biology**, 40: 719-726.
- Kaplan, F.N., 2012. Biber (*Capsicum annuum* L.) ıslah materyallerinden dihaploid hatların üretimi. **Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi. 77s.
- Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S. and Büyükalaca, S., 2015. Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. **Hortscience**, 50(11): 1671-1676.

- Kisiala, A., Olszewska, D., Niklas-Nowak, A. and Nowaczyk, P., 2011. Biometrical characteristics of R₂ generation of anther-derived pepper (*Capsicum* spp.) plants. **Acta Agrobotanica**, 64(3): 53-58.
- Koleva-Gudeva L.R., Spasenoski, M. and Trajkova, F., 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. **Scientia Horticulturae**, 111(2): 114-119.
- Lantos, C., Juhasz, A.G., Somogyi G., Ötvös, K., Vagi, P., Mihaly R., Kristof, Z., Somogyi N. and 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 Tiss Organ Cult**, 97: 285-293.
- Lee, J.M., Nahm, S.H., Kim, Y.M. and Kim, B.D., 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. **Theor. Appl. Genet.** 108:619–627.
- Linsmaer, E.M. and Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**. 18: 100-127.
- Liu, W.Y., Kang, W.H. and Kang, B.C., 2013. Basic information on pepper (B.C. Kang, C. Kole, Editors). In: **Genetics, genomics and breeding of peppers and eggplants**. CRC Press, 1-15, Clemson, USA.
- Liutel, B.P., Adhikari, P.B., Shrestha, S.L. and Kang, W.H., 2012. Morphological characterization of anther derived plants in Minipaprika (*Capsicum annuum* L.). **Kor. J. Breed. Sci.** 44(4): 450-461
- Matsubara, S., Yamamoto, M., Jo, M.H. and Murakami, K., 1998. Embryoid 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.
- Mueller, L.A., T.H. Solow, N. Taylor, B. Skwarecki, R. Buels, J. Binns, C. Lin, M.H. Wright, R. Ahrens, Y. Wang, E.V. Herbst, E.R. Keyder, N. Menda, D. Zamir, and S.D. Tanksley., 2005. The SOL Genomics Network. A comparative resource for *Solanaceae* biology and beyond. **Plant Physiol**, 138:1310-1317.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plantarum**, 15: 473-497.
- Nagy, I., Stigel, A., Sasvari, Z., Röder, M. and Ganai, M., 2007. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Genome**, 50: 668–688.
- Nitsch, J.P. and Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. **Science**. 163: 85-87.
- Nitsch, J.P., 1969. Experimental androgenesis in nicotiana. **Phytomorph.** 19: 389-404.
- Nowaczyk, P. and Kisiala, A., 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. **J Appl Genet**, 47(2): 113–117.
- Olszewska, D. and Tomaszewska-Sowa, M., 2021. Androgenesis—Technology for Obtaining Genetically Stable Breeding Material of *Capsicum annuum* L. **Agriculture**, 12(19).

- Öntürk, G., 2018. Hatay biberi köy popülasyonlarında bitki, çiçek, meyve özelliklerinin belirlenmesi ve teksele bitki seleksiyonu ile farklı hatların oluşturulması. **M.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi**, Hatay. 92 s.
- Özalp, R., 2010. Ülkemizde biber üretimi ve örtüaltı biber yetiştiriciliği. **Tarım Türk Dergisi**, 24: 29-32.
- Özkum, D. and Tıprıdamaz, 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.
- Penuela, P., Arias, L.L., Viafara-Vega, R., Franco, N.R. and Cardenas, H., 2021. Morphological and molecular description of three commercial *Capsicum* varieties: a look at the correlation of traits and genetic distancing. **Genet Resour Crop Evol**, 68:261–277.
- Qin, X. and Rotino, G.L., 1995. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of *in vitro*-grown androgenic pepper plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 41: 145-149.
- Rubatzky, V.E. and Yamaguchi, M., 1997. Tomatoes, peppers, eggplants, and other *Solanaceous* vegetables. In: **World Vegetables: Principles, Production, and Nutritive Values**. Chapman & Hall, 2nd edition, 532-575. New York.
- Shestra, S.L., Lutiel, B.P. and Kang, W.H., 2011. Agro-morphological characterization of anther derived plants in Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Boogie). **Hort. Environ. Biotechnol.** 52(2):196-203.
- 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.). **Scientia Horticulturae**, 130 (2011): 769–774.
- Supena, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E. and Custers, J. B. M., 2006a. 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., Suharsono, S. and Custers, J. B. M., 2006b. Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, 107: 226–232.
- Şeker, A., 2018. Bazı biber (*Capsicum annuum* L.) çeşitlerinin SSR markerlar ile moleküler karakterizasyonu. **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi**, Ankara. 48 s.
- Tıprıdamaz, R. ve Ellialtıoğlu, Ş., 2002. Soğuk uygulamaları ve aktif kömürün biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü süresince absizik asit miktarındaki değişim üzerine etkisi. **Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**. 15(1): 9-18.
- TÜİK, 2021. Türkiye İstatistik Kurumu, <http://tuik.gov.tr/PreTabloArama.do?metod=search&araType=vt> Son Erişim Tarihi: 16.09.2021