

Anter Kültürü Tekniği ile Dihaploid Nitelikli Üç Burun ve Dolma Tipli Biber Hatlarının Geliştirilmesi

Atiye Püren Ceyhan¹ , Hakan Aktaş^{1*} 

¹Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri, Isparta, Türkiye

*Corresponding author : hakanaktas@isparta.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0001-0001-8280-5758>

Received : 06/11/2020
Accepted : 06/12/2020

Özet: Çalışmada biberde anter kültürü yoluyla haploid bitki elde edilmesinde genotip ve besin ortamlarında kullanılan antioksidanların etkisinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu kapsamda üç burun ve dolma biberlere ait 4 farklı çeşitte (Üç burun, Buket, B22 ve B23) haploid bitki elde edilmesindeki başarı oranını artırmaya yönelik farklı miktarlardaki çinko, salisilik asit ve C vitaminin besin ortamlarında kullanılmasıyla, anterlerden filamentlerin ayrılmasıyla anter dokusunda oluşacak olan oksidatif stres algısını önleyerek üç burun ve dolma biber tiplerindeki androgenesise etkisi incelenmiştir. Denemede toplanan tomurcuklar 24 saat 4°C’de soğuk uygulamasına tabi tutulduktan sonra, anterler besin ortamı olarak Murashige ve Skoog (1962) temel besin ortamının 7 farklı kombinasyonunda test edilmiştir. Çalışma sonuçları genotiplere göre değerlendirildiğinde Buket genotipi hariç embriyo oluşumu gözlenmiştir. Besin ortamına ilave edilen antioksidan (Çinko, SA ve Vit. C) bileşiklerinin embriyo oluşumu bakımından O6 (50 mg/L Vit. C) B23 ve Üç burun genotiplerinde en yüksek sonuçları vermiş ve bu ortamı O4 (6.4 mg/L Zn), O5 (25 mg/L Vit. C), O3 (1.4 mg/L Zn) besin ortamları izlemiştir.

Çalışmada sadece MS temel besin ortamında 4 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren kontrol ortamından elde edilen (Buket çeşidi hariç) embriyoların tamamı bitkiye dönüşmüştür. Ploidi seviyesine ilişkin bulgular değerlendirildiğinde, gelişen bitkilerin %43’ünün haploid kromozom yapısına sahip oldukları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biber, anter kültürü, besin ortamı, antioksidant, haploid bitki

Development of Three Dihaploid Nose and Bell Pepper Lines with Anther Culture Technique

Abstract: In this study, it was aimed to reveal the effect of antioxidants used in genotype and nutrient media in obtaining haploid plants through anther culture in pepper. In this context, by using different amounts of zinc, salicylic acid and vitamin C in nutrient environments to increase the success rate in obtaining haploid plants in 4 different varieties of three nose and stuffed peppers (Three nose, Buket, B22 and B23), the oxidative By preventing the perception of stress, its effect on androgenesis in three nasal and bell pepper types was investigated. After the buds collected in the experiment were subjected to cold application at 4oC for 24 hours, the anthers were tested as a nutrient medium in 7 different combinations of Murashige and Skoog (1962) basic nutrient media. When the results of the study were evaluated according to the genotypes, embryo formation was observed except Buket genotype. The antioxidant (Zinc, SA and C vit.) Compounds added to the nutrient medium gave the highest results in terms of embryo formation in O6 (50 mg /L C vit.) B23 and Three nasal genotypes, and this medium was O4 (6.4 mg /L Zn), O5 (25 mg /L C vit.), O3 (1.4 mg / L Zn) nutrient media followed.

In the study, all of the embryos obtained from control medium containing 4 mg /L NAA + 0.5 mg /L BAP in MS basic nutrient medium (except Buket variety) were transformed into plants. When the findings regarding the ploidy level were evaluated, it was determined that 43% of the growing plants had haploid chromosome structure.

Keywords: Pepper, anther culture, nutrient medium, antioxidant, haploid plant

1. Giriş

Haploid bitki üretimi, bitkilerde homozigot saf hatların elde edilmesinden dolayı bitki ıslahında önemli bir yere sahiptir. Bu yöntem haploidizasyon ile dihaploidizasyon olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Haploidizasyon aşamasında, gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısına (n) sahip haploid bitkiler elde edilir. Dihaploidizasyon aşamasında ise bu bitkilerin kromozom sayılarının katlanmasıyla iki katına çıkartılarak (2n), dihaploid bitkiler elde edilir. Dihaploid bitkilerde kendileme yapılarak tamamen homozigot bitkiler elde edilir (Heiser 1976; Andrews 1985; Ellialtıoğlu ve ark. 2006; Olszewska ve ark. 2014; Arı ve ark. 2016). Haploidizasyon ve dihaploidizasyon yöntemi ıslah sürecini kısalttığı için sebze ıslahında uzun yıllardır kullanılmaktadır. Islahçılar için de önemli avantajlar sağlamaktadır. En önemli avantajı, kendine uyumsuz türlerde bile tamamen homozigot bitkiyi kısa bir süre içerisinde elde edilmesine olanak sağlamasıdır. Biberde dihaploid hatların elde edilmesinde anter kültürü yönteminin kullanılması 45 yıldan daha uzun zamandır kullanılmakta ve bu alanda başarı oranını artırmaya yönelik araştırmalar geniş kapsamlı şekilde devam etmektedir.

Yapılan araştırmaların sayısının çok olmasına rağmen geçerliliği bildirilmiş kurallar çok azdır (Irikova ve ark. 2011a). Bu nedenle kullanılan teknik ve yöntemdeki başarı türden türe, hatta çeşitler arasında bile farklılık gösterebilmektedir. Bir araştırmada kullanılan başarılı bir yöntem ve teknik, diğer araştırmalarda aynı başarıyı göstermeyebilmektedir. Bu yüzden bitkilere uygulanan doku kültürü tekniklerinin beklenen sonucu verebilmesi için aşılması gereken birden fazla sorun bulunmaktadır. Bu sorunlar; kontaminasyon, hiperhidrisiti ve rekalsitrantlıktır. Rekalsitrantlık, bitkilerde doku kültüründe bütün aşamalarda görülen *in vitro* tekniklerin uygulamalarını önemli ölçüde kısıtlayan bir faktördür. Yani bitkinin doku, hücre ve organlarının doku kültürü tekniklerine yanıtız kalması olayıdır. Rekalsitrantlık, önemli bitki türlerinde biyoteknolojik yöntemlerinin kullanımında sınırlayıcı ve *in vitro* koruma tekniklerinin geniş uygulamalarında kullanımını azaltabilir (Benson 2000). haploid bitki eldesi düşük bitkilerde, bitki hormonu olarak tanımlanamayan poliaminler, jasonatlar, antioksidantlar, salisilatlar gibi bileşiklerin doku kültür ortamına eklenmesi ile de rekalsitrantlık sorununun ortadan kaldırılabilceği araştırmacılar tarafından tartışılmıştır (Joy ve ark. 1988; Ravnika ve ark. 1992; Rey ve ark. 1994).

Bu çalışmanın amacı üç burun ve dolma biber tiplerinin anter kültürü tekniği ile haploid bitki eldesinde antioksidan özelliğine sahip olan salisilik asit, çinko ve askorbik asitin farklı miktarlarının besin ortamlarında kullanılmasıyla, anter dokusunda yaraya bir tepki olarak oksidatif stresin önlenip önlenememesinin tespit edilmesi ile kullanılan genotiplerin androgenik başarı üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışma için gerekli bitki materyalleri Antalya'nın Serik ilçesinde bulunan plastik seralar ve Antalya'da bulunan bir Tohum şirketine ait seralar kullanılarak yetiştirilmiştir. Doku kültürü çalışmaları ise Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait laboratuvarında ve Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait doku kültürü laboratuvarında 2019-2020 yılları arasında yürütülmüştür. Çalışmada bitkisel materyal olarak üç burun tipi biber olan Buket ve Üç burun genotipleri, dolma tipi biber olarak ise bir tohum şirketine ait olan B22 ve B23 genotipleri kullanılmıştır.

Çalışmada anterlerin kültüre alınmasında makro ve mikro besin elementleri ile vitaminleri içeren Murashige ve Skoog (1962) hazır besi ortamı kullanılmıştır. Ayrıca, MS besin ortamına % 0.25 oranında aktif kömür (Alremi ve ark. 2014), büyüme ve düzenleyicilerden oksin hormonu olan NAA (a-naftalin asetik asit) ve sitokin hormonu olan BAP (6-benzilaminopurin) (Çömlekçioğlu ve ark. 1999) besi ortamına Tablo 1.'de belirtilen oranlarda eklenmiştir.

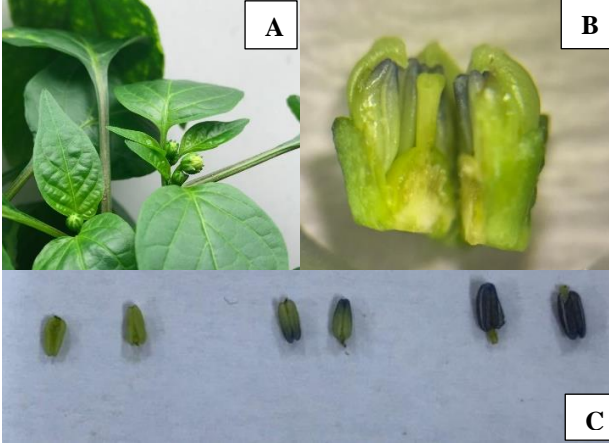
Tablo 1. Çalışmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri (K; kontrol, O; ortamlar)

ORTAMLAR	K	O1	O2	O3	O4	O5	O6
MS	+	+	+	+	+	+	+
4 mg/L NAA	+	+	+	+	+	+	+
0.5 mg/L BAP	+	+	+	+	+	+	+
2.5 g/L Aktif kömür	+	+	+	+	+	+	+
30g/L Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	+
15mg/L AgNO ₃	+	+	+	+	+	+	+
5 mg/L SA	-**	+	-	-	-	-	-
10 mg/L SA	-	-	+	-	-	-	-
1.4 mg/L Zn	-	-	-	+	-	-	-
6.4 mg/L Zn	-	-	-	-	+	-	-
25 mg/L C Vit.	-	-	-	-	-	+	-
50 mg/L C Vit.	-	-	-	-	-	-	+

*(+): Besi ortamına eklenen, **(-): Besi ortamına eklenmeyen

Çalışmada otoklavlama sırasında bozulabilen maddeler hariç tüm kimyasal maddeler ilave edildikten sonra hazırlanan besin ortamlarının pH'sı, 1N'lik HCl ile 1N'lik KOH kullanılarak 5.7-5.8'e ayarlanmıştır. Ortamların tümüne katılaştırıcı olarak 8 g/L agar ilave edilmiştir. Hazırlanmış olan besin ortamları, 121°C sıcaklık ve 1.2 kg/cm² basınçtaki otoklavda 15 dk sterilize edilmiştir. Besin ortamları steril kabin içerisinde salisilik asit ve askorbik asit filtre ile steril edilerek ortamlara eklenmiştir.

Başarılı bir anter kültürü için ilk koşul tomurcukların uygun aşamadayken toplanmasıdır. Androgenesis tekniği ile bitki elde etmede yapılması gereken ilk aşama, tek çekirdekli mikrosporları bulunduran tomurcukları (Kim ve ark. 2008; Lantos ve ark. 2009; Supena ve ark. 2006; Supena ve Custers 2011) seçebilmektir. Anterler, Parra-Vega ve ark. (2013a) belirlediği yönteme göre, tomurcukların taç yaprak uzunluklarını %80 tamamladığı, petallerin sepallerden biraz daha uzun olduğu dönemde ve anter uçlarında hafif morlaşmanın başladığı dönemde alınmıştır. Kültür için toplanan çiçek tomurcukları ve anterler aşağıda belirtilen Şekil 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. A) Bitki üzerinde çiçek tomurcuklarının görünümü B) Uygun anterlerin bulunduğu çiçek tomurcuğunun açılmış görünümü C) Farklı büyüklükteki tomurcuklardan alınan anterler

En uygun gelişme dönemine sahip olan çiçek tomurcukları hasat edildikten sonra 24 saat süreyle 4°C'de buzdolabında soğuk uygulamasına tabii tutulmuştur (Supena ve ark. 2006). Toplanan tomurcukların içlerindeki anterler çıkarılmadan steril koşullarda dezenfekte edilmiştir. Çiçek tomurcukları öncelikle 1 dakika kadar çeşme suyundan geçirildikten sonra Tween-20 % 0.05 (v/v) eklenmiş %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 15 dakika bekletilmiş. Çiçek tomurcukları sterilizasyonun ardından üç kez steril saf su ile 5'er dakika olmak üzere durulanmıştır (Durna 2016).

Anterler, toplanan tomurcukların içerisinden steril bistüri ve pens yardımıyla tomurcuğun diğer parçalarından ve filamentlerinden ayrılarak çıkarıldıktan hemen sonra besin ortamı üzerine, sırt yüzeyleri besi ortamları ile temas edecek şekilde ve besi ortama batırılmaksızın aktarılmıştır. Anterlerin besi ortamlarına aktarılmasında 6 cm'lik steril plastik petripler kullanılmıştır ve her petriye bir çiçek tomurcuğundan çıkarılan 5 anter aynı besin ortamına yerleştirilmesine özen gösterilmiştir. Çalışmada 4 genotip için toplamda 567 petri ve 2835 anter kullanılmıştır.

Anterler, 4 gün +35°C'de karanlık inkübasyonuna tabii tutulan petripler, 4. günün sonunda 16 saat ışık (1000-3000 lux) / 8 saat karanlık olan ortamda, 25°C sıcaklığa sahip olan büyüme odasına alınmıştır. Embriyolar görülmeye başladıktan birkaç gün sonra rejenerasyon ortamı olan hormon ilave edilmemiş, %0.8 agar ve %3 sakkaroz ile desteklenen MS temel besin ortamı 6 cm steril petri kaplarına konulmuş ve embrioidler ortama transfer

edilmiştir. Çimlendirme ortamında 8-10 gün bekletildikten sonra kök gelişimi ve gerçek yaprak oluşumu başlayan bitkiler 2,5 cm çapında 12-15 cm uzunluğundaki deney tüplere aktarılmıştır. Deney cam tüplerdeki embriyolardan gelişen lateral kökleri gelişmiş 4-6 gerçek yapraklı bitkiler, içinde ½ torf+½ perlit karışımı bulunan ortamlara aktarılmıştır. Bu bitkiler 5000 lux ışık yoğunluğuna sahip, %85 hava oransal nem, 22-24°C ortam sıcaklığına 12 saat gece/gündüz koşullarında büyüme odasına aktarılmıştır. Büyüme odasında 8-10 gün bekleyen bitkiler daha sonrasında sera koşullarına alınmıştır. Bu süre zarfında bitkilerde Ploidi düzeylerinin belirlenmesinde fenotipik gözlem ve flow sitometri yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. ploidi testinin sonucunda haploid olan bitkilere, %1'lik in vivo kolhisin uygulaması genç bitkilerin büyüme ucuna mikropipet yardımıyla damlatılmasıyla kromozom katlanması sonucu dihaploid bitkiler oluşturulmuştur.

3. Bulgular ve Tartışma

Alınan anterlerde yapılan denemeler sonucunda üç farklı biber genotipinden farklı antioksidan bileşikler içeren uygulamalardan anormal embriyolar elde edilirken, kontrol uygulamasından da haploid embriyolar elde edilmiştir. Fakat ortamlar arasında genotiplere bağlı olarak embriyo eldesi bakımından önemli farklılık görülmüştür.

Üç burun genotipinde kontrol ortamından embriyo elde edilirken, diğer antioksidan içeren 6 uygulamadan 2 ortamda anormal embriyo ve 4 ortamda ise embriyo elde edilememiştir. Toplamda 2 embriyo, 8 anormal embriyo, 1 haploid bitkicik ve 1 dihaploid bitkicik elde edilmiştir. Besin ortamlarına aktarılan anterlerden gelişerek rejenerasyon ortamlarına aktararak gelişimini sürdüren ve kuruma belirtisi göstermeyerek canlılığını koruyan anterlerin oranını belirten gelişen anter oranı bakımından en yüksek değer, %70 oranı ile 25 mg/L C vitamini (O5) bulunduran kombinasyonda elde edilmiştir.

Buket genotipinde ortamların hepsine diğer 3 genotipten daha fazla anter atılmıştır, fakat buna rağmen embriyo elde edilememesinin en büyük nedeni donör bitkide meydana gelen ve ilaçlanmasına rağmen önlenemeyen batı çiçek tripsi (*Frankliniella occidentalis*) zararlısının olduğu düşünülmektedir. Fakat ortamlara aktarılan anterlerdeki gelişen anter oranlarına bakılacak olursa en yüksek değer %57 oranı ile 5 mg/L SA (O1) ile 6.4 mg/L Zn (O4) ortamlarında bulunmuştur.

B22 olarak kodlanmış dolma tipi biber genotipinden kontrol ortamından embriyo elde edilirken, aynı zamanda kontrol ve 25 mg/L C vitamini (O5) içeren ortamlardan anormal embriyo elde edilmiştir. Bu genotipten 1 embriyo, 2 anormal embriyo ve 1 dihaploid bitkicik elde edilmiştir. B22 genotipinde gelişen anter oranı bakımından en yüksek değer %77 oranı ile 50 mg/L C vitamini (O6) ortamından elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan bitkisel materyallerden sonuncu olan B23 genotipi, önceki üç genotipe (Üç burun, Buket ve B22) göre androgenik yanıtı en yüksek olan genotip olmuştur. B23 genotipinin kontrol ortamından 4 embriyo, kontrol, 50 mg/L C vitamini (O6), 1.4 mg/L ve 6.4 mg/L Zn (O3, O4) ortamlarından toplamda 7 anormal embriyo, 2 haploid

Tablo 2. Genotiplerden farklı antioksidan maddeler içeren ortamlardaki anter kültürlerinden alınan sonuçlar

Genotipler	Ortamlar	Antioksidant madde (mg/L)	Kullanılan anter sayısı (adet)	Gelişen anter sayısı (adet)	Gelişen anter oranı (%)	Embriyo sayısı (adet)	Anormal embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşum oranı (%)	Bitki sayısı (adet)	Bitkiye dönüşüm oranı (%)
Üç burun	K	/	485	179	37	2	5	1.11	2	1.11
	O1	5 SA	30	20	67	0	0	0	0	0
	O2	10 SA	30	19	63	0	1	0	0	0
	O3	1.4 Zn	30	15	50	0	0	0	0	0
	O4	6.4 Zn	30	14	47	0	0	0	0	0
	O5	25 Vit. C	30	21	70	0	0	0	0	0
	O6	50 Vit. C	30	18	60	0	2	0	0	0
Buket	K	/	600	166	28	0	0	0	0	0
	O1	5 SA	40	23	57	0	0	0	0	0
	O2	10 SA	40	22	55	0	0	0	0	0
	O3	1.4 Zn	40	21	52	0	0	0	0	0
	O4	6.4 Zn	40	23	57	0	0	0	0	0
	O5	25 Vit. C	40	22	55	0	0	0	0	0
	O6	50 Vit. C	40	21	52	0	0	0	0	0
B22	K	/	480	194	40	1	1	0.51	1	0.51
	O1	5 SA	30	11	37	0	0	0	0	0
	O2	10 SA	40	13	32	0	0	0	0	0
	O3	1.4 Zn	30	15	50	0	0	0	0	0
	O4	6.4 Zn	40	21	52	0	0	0	0	0
	O5	25 Vit. C	30	12	40	0	1	0	0	0
	O6	50 Vit. C	30	23	77	0	0	0	0	0
B23	K	/	450	160	35	4	2	2.5	4	2.5
	O1	5 SA	30	21	70	0	0	0	0	0
	O2	10 SA	30	21	70	0	0	0	0	0
	O3	1.4 Zn	30	20	67	0	1	0	0	0
	O4	6.4 Zn	40	21	52	0	2	0	0	0
	O5	25 Vit. C	30	24	80	0	0	0	0	0
	O6	50 Vit. C	40	19	47	0	2	0	0	0

bitkicik ve 2 dihaploid bitkicik elde edilmiştir. Gelişen anter oranı bakımından en yüksek değer %80 oranıyla 25 mg/L C vitamini (O5) içeren ortamdan elde edilmiştir.

B23 genotipinde diğer genotiplere göre daha fazla sağlıklı ve anormal embriyo ve bitki gelişimi meydana gelmiştir. Bu durum aynı dönem içerisinde kültüre alınan anterlerin farklı genotiplerde değişik reaksiyonlar göstermesi ile ilgili olup benzer sonuçlar Mityko ve ark. (1995); Dias ve Martins, (1999); Çömlekçioğlu ve ark. (2001); Ercan ve ark. (2001); Çiner ve Tıprıdamaz (2002); Koleva-Gudeva ve ark. (2007) ve Taşkın ve ark. (2011) tarafından bildirilmiştir (Tablo 2).

Embriyo başarısı yüksek genotiplerin yanında düşük başarı gösteren genotipler de olmuştur. Yapılan androgenesis çalışmalarında genotip, besin ortamı ve diğer sebeplere bağlı olarak embriyo oluşumunda ve bitkiye dönüşümünde farklılıkların olduğu belirtilmektedir (Morrison ve ark. 1986; Bajaj 1990; Mityko ve ark. 1995; Dolcet-Sanjuan ve ark. 1997; Dias ve Martins 1999; Rodeva ve ark. 2004; Koleva-Gudeva ve ark. 2007; Ata 2011; Parra- Vega ve ark. 2013b).

Bizim çalışmamızda özellikle ortamlarda kullanılan bazı antioksidantlardan gelişen anter oranı yüksek olmasına rağmen embriyoya dönüş oranları düşük kalmıştır.

Ortamlarda kullanılan antioksidanlara göre genotiplerde gelişen anter oranı %80 (25 mg/L C vitamini) ile %32 (10 mg/L SA) arasında değişmiştir. Her genotip için ortamlarda anter gelişimi sağlanmıştır. Özellikle antioksidanlar içerisinde 25 mg/L C vitamini içeren ortamlara aktarılan genotiplerde gelişen anter oranı bakımından en yüksek sonuç elde edilmiştir. Bunu 50 mg/l C vitamini, 5 mg/l SA, 10 mg/L SA, 1.4 mg/L Zn, 6.4 mg/L Zn ve kontrol ortamları izlemiştir. Fakat anter gelişimi sağlanan antioksidan içeren ortamlardan sağlıklı embriyo ve bitki gelişimi sağlanamamıştır. Irikova ve ark. (2011b), biberde anter kültürü çalışmalarında başarı oranının uygulamalara bağlı olarak değişebildiğini belirtmektedir. Özellikle genotiplere göre değişen kontrol ortamında gelişen anter oranı düşük olmasına rağmen çalışmada sadece bitkiye dönüşüm bu ortamlardan meydana gelmiştir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan biber tiplerinde (üç burun ve dolma) gelişen anter oranları bakımından karşılaştırdığımızda %52 oranıyla

Tablo 3. Genotiplerde kullanılan tomurcuk sayısı, tomurcuk başına embriyo ve tomurcuk başına bitki oranları (%)

Genotip	Ortamlar	Antioksidan madde (mg/L)	Tomurcuk sayısı (adet)	Tomurcuk başına embriyo oranı (%)	Tomurcuk başına bitki oranı (%)
Üç burun	K	/	97	0.021	0.021
	O1	5 SA	6	0	0
	O2	10 SA	6	0	0
	O3	1.4 Zn	6	0	0
	O4	6.4 Zn	6	0	0
	O5	25 Vit. C	6	0	0
	O6	50 Vit. C	6	0	0
Buket	K	/	120	0	0
	O1	5 SA	8	0	0
	O2	10 SA	8	0	0
	O3	1.4 Zn	8	0	0
	O4	6.4 Zn	8	0	0
	O5	25 Vit. C	8	0	0
	O6	50 Vit. C	8	0	0
B22	K	/	96	0.010	0.010
	O1	5 SA	6	0	0
	O2	10 SA	8	0	0
	O3	1.4 Zn	6	0	0
	O4	6.4 Zn	8	0	0
	O5	25 Vit. C	6	0	0
	O6	50 Vit. C	6	0	0
B23	K	/	90	0.044	0.044
	O1	5 SA	6	0	0
	O2	10 SA	6	0	0
	O3	1.4 Zn	6	0	0
	O4	6.4 Zn	8	0	0
	O5	25 Vit. C	6	0	0
	O6	50 Vit. C	8	0	0

dolma tipi biberin, %48 oran ile üç burun biber tipinden daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu durum ise biber tiplerinin tomurcuk boyutlarına, mikrospor içeriğine ve yetiştirildiği koşullara bağlı olarak değişiklik gösterdiği düşünülmektedir.

Aynı zamanda genotiplerde kullanılan tomurcuk sayısı, tomurcuk başına embriyo oranı ve tomurcuk başına bitki oranlarına bakıldığı zaman en fazla çiçek tomurcuğu Buket genotipinden kullanılırken, en az ise B23 genotipi olan dolma tipi biberden kullanılmıştır (Tablo 3).

Ploidi testi için flow sitometri yönteminden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, embriyolardan gelişen bitkilerden %43'ünün haploid kromozom yapısına, %57'sinin ise diploid kromozom yapısına sahip olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Çömlekçioglu ve ark. (2001), androgenesis tekniği ile elde edilen bitkilerin haploid kromozom sayısına sahip olabildiklerinin yanında aynı zamanda kültür koşullarında bitkilerin kendiliğinden (spontan) katlandığı ve spontan dihaploid kromozom sayısına sahip bitkilerin elde edildiğini bildirmektedir. Yaptığımız çalışmada da benzer şekilde haploid bitkilerin yanı sıra dihaploid bitkilerde elde edilmiştir.

4. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda kontrol ortamı olan, 4 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP içeren MS ortamı embriyo oluşumu üzerine olumlu etki yapmıştır. Fakat besin ortamlarına belli dozlarda eklenen SA, Zn ve C vitaminleri bitkicik oluşumuna etkili olmazken, embriyo oluşumuna az da olsa olumlu yönde etkisi görülmüştür. Antioksidan uygulamalarından başarı oranı gelişen anter bakımından C vitamini, SA, Zn ve kontrol olarak sıralanırken, bitkicik oluşumu sadece kontrol ortamından gerçekleşmiştir. Bunun nedeni ise kontrol ortamında kullanılan yüksek miktardaki anter sayısından kaynaklanabilir.

Anter kültürü çalışmalarından embriyogenik başarı üzerine besin ortamı bileşiminin ve genotipin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda embriyo oluşumunun yeterli olmadığı ve gelişen anterlerin embriyoya dönüşüm oranı bakımından yeni çalışmalar yürütülerek kullanılan antioksidan bileşiklerde en uygun şekilde kullanılması gerektiği anlaşılmıştır. Başarı oranının çok yüksek olmamasıyla birlikte, özellikle C vitamini ve/veya Zn ortamlarının seçilerek yine de tek bir ortam üzerinde uygun

dozun belirlenmesiyle istenilen sayıda haploid / spontan dihaploid bitki elde edilebileceği düşünülmektedir.

Açıklama: Bu çalışma APC tarafından hazırlanan “Anter Kültürü Tekniği ile Dihaploid Nitelikli Üç Burun ve Dolma Tipli Biber Hatlarının Geliştirilmesi” isimli Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

Kaynaklar

- Alremi F, Taşkın H, Sönmez K, Büyükalaca S, Ellialtıoğlu Ş. 2014. Biber (*Capsicum annuum* L.)’de genotip ve besin ortamının anter kültürüne etkileri. Turk. J. Agric. Nat. Sci. 2: 108-116. doi: 10.30910/turkjans.160702
- Andrews J. 1985. Peppers, The Domesticated Capsicum, University of Texas Pres, Austin, Texas.
- Arı E, Yıldırım T, Mutlu N, Büyükalaca S, Gökmen Ü, 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. doi:10.3906/biy-1509-36
- Ata A. 2011. Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) Anter kültüründe mevsim etkisi ve mikrospor gelişimi (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- Bajaj YPS. 1990. In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry 12, Haploids in Crop Improvement I. Springer, Berlin, s. 3-44.
- Benson EE. 2000. In vitro plant recalcitrance an introduction. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 36:141-148. doi:10.1007/s11627-000-0029-z
- Çiner D, 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. doi:10.30910/turkjans.
- Çömlekçiöğlü N, Büyükalaca S, Abak K. 1999. Şanlıurfa ve kahramanmaraş biber populasyonlarında anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etme olanakları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ankara, 897-900.
- Çömlekçiöğlü N, Büyükalaca S, Abak K. 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). XI. th. Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, April 9-13, Antalya, 133-136.
- Dias JS, Martins MG. 1999. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different Brassica oleracea morphotypes. Sci. Hort. 82:299-307. doi:10.1016/S0304-4238(99)00052-7
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Huerta A. 1997. Androgenesis (*Capsicum annuum* L.) effects of carbon dioxide enrichment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122:468-475. doi:10.21273/JASHS.122.4.468
- Durna P. 2016. Bazı biber genotiplerinde in vitro androgeensis uygulamalarının dihaploid hat geliştirmeye etkisi ve dihaploid hatların morfolojik karakterizasyonu (Doktora Tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Tokat.
- Ellialtıoğlu Ş, Başay S, Kuşvuran Ş. 2006. Anter kültüründen elde edilen haploid patlıcanların katlanması amacıyla kullanılan in vitro ve in vivo kolhisin uygulamalarının karşılaştırılması. VI. Sebze Tarımı Sempozyumu, Eylül 19-22, Kahramanmaraş, 386-390.
- Ercan N, Boyacı F, Ayar F. 2001. Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine farklı besin ortamlarının etkisi. GAP II. Tarım Kongresi, Ekim 24-26, Şanlıurfa, 1:121-128.
- Heiser CBJR. 1976. Peppers, in evolution of crop plants. Longman Sci. 265-268.
- Irikova T, Grozeva S, Rodeva V. 2011a. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. Acta Phys. Plant. 33:1559-1570. doi:10.3906/biy-1506-79
- Irikova T, Grozeva S, Popov P, Rodeva V, Todorovska E. 2011b. In vitro response of pepper anther culture (*Capsicum annuum* L.) depending on genotype culture medium and duration of cultivation. Biotech. & Biotech. Equip. 25:2604-2609. doi:10.5504/BBEQ.2011.0090
- Joy RW, Patel KR, Thorpe TA. 1988. Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco. Plant Cell. Tiss. Organ Cult. 13:219-228. doi:10.1007/BF00043670
- Kim M, Jang IC, Kim JA, Park EJ, Yoon M, Lee Y. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. Plant. Cell. Rep. 27:425-434. doi:10.1007/s00299-007-0442-4
- Koleva-Gudeva LR, Spasenoski M, Trajkova F. 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture, the effect of incubation treatments and different media. Sci. Hort. 111:114-119. doi:10.1016/j.scienta.2006.10.013
- Lantos C, Juhász AG, Somogyi G, Ötvös K, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Somogyi N, Pauk J. 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. Plant Cell. Tiss. Organ. Cult. 97:285-293. doi:10.1007/s11240-009-9527-9
- Mityko J, Andrasfalv A, Csillery G, Fari M. 1995. Anther-culture response in different genotypes and fl hybrids of pepper *Capsicum annuum* L. Plant Breed. 114:78-80. doi:10.1111/j.1439-0523.1995.tb00764.x
- Morrison R, Koning RE, Evans DA. 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of Capsicum. J. Plant. Phys. 126:1-9. doi:10.1016/S0176-1617(86)80210-3
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Phys. Plant. 15:473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Olszewska D, Kisiala A, Niklas- Nowak A, Nowaczyk P. 2014. Study of in vitro anther culture in selected genotypes of genus Capsicum. Turk. J. Biol. 38:118-124. doi:10.3906/biy-1307-50
- Parra- Vega V, Gonzalez- Garcia B, Segui-Simarro JM. 2013a. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). Acta. Phys. Plant. 35: 627-633. doi:10.1007/s11738-012-1104-x
- Parra- Vega V, Renau- Morata B, Sifres A, Segui-Simarro JM. 2013b. Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult. 112:353-360. doi:10.1007/s11240-012-0242-6
- Ravnikar M, Vilhar B, Gogala N. 1992. Stimulatory effects of jasmonic acid on potato stem node and protoplast culture. J. Plant. Growth. Reg. 11:29-33. doi:10.1007/BF00193840
- Rey M, Díaz-Sala C, Rodriguez R. 1994. Exogenous polyamines improve rooting in hazel microshoots. Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult. 36:303-308. doi:10.1007/BF00046087
- Rodeva VN, Irikova TP, Todorova VJ. 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): comparative study on effect of the genotype. Biotech. & Biotech. Equip. 18(3):34-38. doi:10.1080/13102818.2004.10817117

- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E, Custers JBM. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant. Cell. Rep. 25:1-10. doi:10.1007/s00299-005-0028-y
- Supena EDJ, Custers JBM. 2011. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Sci. Hort. 130:769–774. doi:10.1016/j.scienta.2011.08.037
- Taşkın H, Büyükalaca S, Keleş D, Ekbiç E. 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. Afr. J. Biotech. 10:17116-17121. doi:10.5897/AJB11.2023