



Biber (*Capsicum annuum* L.)'de Genotip ve Besin Ortamının Anter Kültürüne Etkileri

^aFaten ALREMI, ^bHatira TAŞKIN, ^cKenan SÖNMEZ, ^aSaadet BÜYÜKALACA, ^dŞebnem ELLİALTIÖĞLU*

^aÇukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana

^bNiğde Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümü, Niğde

^cEskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Eskişehir

^dAnkara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara

*Sorumlu yazar: ellialti@agri.ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 10.12.2013

Düzeltilme Geliş Tarihi: 13.02.2014

Kabul Tarihi: 15.02.2014

Özet

Biberde anter kültüründe besin ortamı ve genotipin etkilerini araştırmak için yapılan bu çalışmada 3 farklı genotip (B, 151 ve 171 no'lu ıslah hatları) ve 1 adet Suriye'de kullanılan biber çeşidi (Alfajer) ile 16 farklı besin ortamı kombinasyonu test edilmiştir. Besin ortamı olarak Dumas de Vault ve ark. (1981) tarafından önerilen besin ortamının 8 farklı kombinasyonu (C serisi, C1-C8) ve Murashige ve Skoog (1962) temel besin ortamının 8 farklı kombinasyonu (B serisi, B1-B8) kullanılmıştır. Değerlendirmeler genotip bazında yapılmış; her uygulama için dikilen anter sayısı, gelişerek transfer ortamlarına alınan anter sayıları, embriyogenik anter sayısı, gelişen anter başına elde edilen embriyo sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları hesaplanmıştır. Alfajer ve B hattı biber genotiplerinde Kinetin + 2,4-D içeren C serisi ortamlardan daha olumlu sonuçlar alınmıştır. 151 ve 171 no'lu yerel genotiplerde ise en başarılı sonuçları MS temelli ve NAA+BAP içeren B serisi ortamları vermiştir. Besin ortamına %0.25 oranında ilave edilen aktif kömür, embriyo oluşumunu genotipe bağlı olarak artırmıştır. Embriyo oluşumu bakımından gümüş nitrat içermeyen B5 ortamı en yüksek sonuçları vermiş ve bu ortamı C6, B3, B2, B7 besin ortamları izlemiştir. Elde edilen embriyoların tamamı (B3 ortamında elde edilenler hariç olmak üzere) bitkiye dönüşmüştür. Alfajer çeşidi ve B ıslah hattı, 151 ve 171 no'lu genotiplerden daha başarılı sonuçlar vermiştir. Ploidi düzeyine ilişkin bulgular değerlendirildiğinde, elde edilen embriyolardan gelişen bitkilerin %94'ünün haploid kromozom yapısına sahip oldukları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Capsicum annuum*, androgenesis, besin ortamı, genotip, haploid

Effect of Genotype and Nutrient Medium on Anther Culture of Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Abstract

Three different pepper genotypes (B, 151 and 171 breeding lines) and one pepper variety from Syria (Alfajer variety) as plant material and 16 different nutrient media combinations were tested to figure out effects of nutrient medium and genotype on anther culture of pepper. Eight different combinations (C series, C1-C8) of nutrient medium found by Dumas de Vault ve ark. (1981) and eight different combinations of Murashige ve Skoog (1962) nutrient medium (B series, B1-B8) were used as nutrient medium. Evaluation of experiments were performed according to genotypes and in per application, planted anther number, developed and transferred anther number, embryogenic anther number, obtained embryo number per developed anther and plant transformation ratio were calculated. The best results in Alfajer variety and B breeding line were obtained from C series nutrient media contained Kinetin + 2,4-D. B series MS nutrient media with NAA + BAP were found to be more successful than C series in genotypes 151 and 171. Activated charcoal added to the nutrient medium (0.25%) increased embryogenesis depending on genotype. B5 nutrient medium without silver nitrate gave the highest results in terms of embryo number and this medium was followed by C6, B3, B2, B7 nutrient media. All of the obtained embryos (except embryos obtained from B3 medium) converted to plants. In terms of genotypes; Alfajer variety and B breeding lines gave more successful results than genotypes 151 and 171. It was found that 94% of plants developed from embryos had haploid chromosome number.

Key Words: *Capsicum annuum*, androgenesis, nutrient medium, genotype, haploid

Giriş

Biber hem dünyada hem de ülkemizde yoğun olarak tüketilen sebzeler arasında yer almaktadır. Ülkemizin hemen hemen her bölgesinde biber üretimi yapılmakta ve çeşitli şekillerde (taze olarak, salça şeklinde, toz ve pul biber şeklinde, turşu olarak, sos olarak, közleme şeklinde, yemeklerin içerisinde vb.) sofralarımızdaki yerini almaktadır. Anavatanı Orta ve Güney Amerika olarak bilinen biber, Solanaceae familyasında yer almaktadır ve yaygın olarak kullanılan türü *Capsicum annuum* L. olarak adlandırılmaktadır. *Capsicum* cinsi, yaklaşık 30 türü kapsamaktadır (Greenleaf, 1986). Bunlardan 5 tür (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. frutescens* ve *C. chinense*) ekonomik olarak kültüre alınmıştır. Besin değeri yüksek bir sebze olan biber, özellikle C vitamini (103 mg/100 g) açısından zengindir (IBPGR, 1983). Aynı zamanda potasyum, fosfor, kalsiyum, magnezyum, sodyum, demir, çinko, bakır ve bor gibi mineral maddeler açısından da zengindir (Rubio ve ark., 2002). 100 g taze yeşil tatlı biberde 29 kalori, 1.1 g protein, 0.2 g yağ, 92.6 g su, 4.2 g karbonhidrat, 1.4 g selüloz bulunmaktadır. 16. yüzyıla kadar Avrupa’da bilinmeyen biber, 1493 yılında Kolomb’un Amerika’yı keşfinden sonra Portekiz’e ve İspanya’ya getirilmiş ve 16. yüzyılın ortalarında da Orta ve Kuzey Avrupa’ya yayılmıştır (Greenleaf, 1986). Türkiye yaklaşık 2 milyon ton biber üretimi ile (Anonim, 2012) Çin ve Meksika’dan sonra dünyada en çok biber yetiştiriciliği yapan ülkedir. Türkiye’de hem açıkta hem de örtü altında yaygın bir şekilde biber yetiştiriciliği yapılmaktadır. Düşük sıcaklıklar, yüksek sıcaklıklar, hastalık ve zararlılar gibi sorunlar biber üretiminde verim ve kaliteyi olumsuz etkilemektedir. Birim alandan verimi artırmanın en önemli yolu bu gibi sorunlara dayanıklı/tolerant çeşitlerin geliştirmesidir.

Klasik ıslah yöntemleri ile yeni çeşitlerin geliştirilmesi uzun yıllar gerektirmekte ve çok fazla zamana ve emeğe ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde bu süreyi kısaltmak ve daha kalıcı sonuçlar elde etmek için doku kültürü tekniklerinden faydalanılmaktadır. Bu tekniklerden birisi olan haploid bitki üretimi bitki ıslahında önemli bir yere sahiptir (Heiser, 1976; Andrews, 1985). Haploidi tekniği ıslah sürecini kısalttığı için sebze ıslahında geniş uygulama alanı bulmuştur. Anter kültürü tekniği haploid bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan tekniklerden birisidir. Biberde anter kültürü ile ilgili bugüne kadar yürütülen çalışmalar daha çok genotip, besin ortamı, büyüme düzenleyicileri, besin ortamına ilave edilen farklı maddeler (aktif kömür, gümüş nitrat ve havuç ekstraktı gibi), farklı ön uygulamalar, donör bitkilerin yetiştirme koşulları ve

farklı anter alma zamanları üzerine yoğunlaşmıştır (Wang ve ark., 1973; George ve Narayanswamy, 1973; Saccardo ve Devreux, 1974; Novak, 1974; Harn ve ark., 1975; Dumas de Vaulx ve ark., 1981; Mityko ve ark., 1995; Gemesne Juhasz ve ark., 2001). Ülkemizde de bu tekniğin biberde uygulanmasında ortaya çıkan sorunların çözümüne yönelik oldukça başarılı sonuçlar ortaya konulmuştur (Abak, 1983; Çömlekçioğlu ve ark., 1999; Ellialtıoğlu ve ark., 2001; Çömlekçioğlu ve ark., 2001; Büyükalaca ve ark., 2004; Ata, 2011; Taşkın ve ark., 2011). Anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörleri anter verici bitkiden kaynaklanan faktörler (genotip ve donör bitkinin yetiştirme koşulları) ve anter kültürü tekniğinden kaynaklanan faktörler (anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı ve inkübasyon koşulları) olarak iki grupta değerlendirmek mümkündür (Ellialtıoğlu ve ark., 2002). Bu faktörler içerisinde besin ortamı ve genotip büyük önem arz etmektedir. Anter kültüründe başarı genotiplere göre değişmekte ve her genotipin tepki verdiği besin ortamları da farklılaşabilmektedir. Sunulan bu çalışmada biber anter kültüründe genotip ve besin ortamının etkisi ve ıslah hattı genotiplerin anter kültürüne tepkileri ortaya konulmuştur.

Materyal ve Metot

Çalışma, 2012-2013 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Sebzeçilik Araştırma ve Uygulama Alanı ile Dikmen Tarım Ürünleri Sanayii ve Ticaret Limited Şirketi’nin, Bilecik Söğüt ilçesi Borçak Köyü’ndeki tesislerinde yer alan Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür. Bitkisel materyal olarak Alfajer çeşidi, B ıslah hattı, 151 (Çankırı biberi) ve 171 (Yağlık biber) no’lu yerel genotiplerden elde edilen ıslah hatları kullanılmıştır (Şekil 1). Tohumlar, içerisinde fide harcı (2 hacim torf:1 hacim perlit) bulunan vıyollere ekilmişlerdir. Fideler 6-7 gerçek yapraklı dönemde iken 60 x 25-40 cm aralıklarla plastik seraya, her genotipten 20 bitki olacak şekilde dikilmiş (Şekil 1) ve bitki gelişimi boyunca gerekli kültürel işlemler yapılmıştır. Haziran ayının ortalarından itibaren çiçeklenmeye başlayan bitkilerden anter kültürü için I. mitoz bölünmenin başladığı, yani mikrosporların tek çekirdekli aşamanın sonunda veya iki çekirdekli aşamanın başında olduğu uygun safhadaki tomurcuklar sabah saatlerinde toplanmışlardır. Bu dönem; biber çiçek tomurcuklarında çanak yaprak ve taç yaprak boyları eşit veya taç yapraklar çanak yapraklardan biraz daha uzun, anterlerin yaklaşık yarı boyuna kadar antosiyen oluşumunun gözlenmesi ile saptanmıştır. Doku kültüründe yapılan işlemler ve koşulları Alremi (2013)

tarafından detaylı olarak açıklanmıştır. Deneme konularından birisi genotip diğeri besin ortamı içeriğidir. Araştırmada kullanılmış olan 30 g l⁻¹ sakkaroz içeren 8 farklı MS (Murashige ve Skoog,

1962) besin ortamlarının (B serisi) içeriği ve 8 farklı DDV (Dumas de Vaulx ve ark., 1981) ortamının (C serisi) içeriği Çizelge 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Denemelerde kullanılan biber genotiplerine ait meyvelerin görünüşü; (A) Alfajer çeşidi, (B) B hattı, (C) 151 no’lu Çankırı yerel biberi, (D) 171 no’lu yerel genotip, (E) Denemede kullanılan biberlerin yetiştirildiği seradan bir görünüş

Çizelge 1. B serisi ve C serisi besin ortamlarının içeriği

Ortam Kodu	Temel bileşim	Aktif Kömür dozu (g L ⁻¹)	AgNO ₃ dozu (mg L ⁻¹)	NAA dozu (mg L ⁻¹)	BAP dozu (mg L ⁻¹)
B1	MS	2.5	0	4	1.0
B2	MS	2.5	5	4	1.0
B3	MS	2.5	10	4	1.0
B4	MS	2.5	15	4	1.0
B5	MS	2.5	0	4	0.1
B6	MS	2.5	5	4	0.1
B7	MS	2.5	10	4	0.1
B8	MS	2.5	15	4	0.1

Ortam Kodu	Temel bileşim	Aktif Kömür dozu (g L ⁻¹)	AgNO ₃ dozu (mg L ⁻¹)	Kinetin dozu (mg L ⁻¹)	2,4-D dozu (mg L ⁻¹)
C1	DDV	0	0	0.5	0.5
C2	DDV	0	5	0.5	0.5
C3	DDV	0	10	0.5	0.5
C4	DDV	0	15	0.5	0.5
C5	DDV	0	0	0.01	0.01
C6	DDV	0	5	0.01	0.01
C7	DDV	0	10	0.01	0.01
C8	DDV	0	15	0.01	0.01

Elde edilen haploid bitkilerin kromozom sayısının katlanarak dihaploid hale getirilmesi için bitkilere kolhisin uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla haploid biber bitkileri dış koşullara alıştırıldıktan sonra tepe kısmında 1-3 adet yaprak kalacak şekilde budanmış ve yaprak koltuklarındaki tomurcukların üzerine %0.5’lik kolhisin çözeltisi emdirilmiş pamuklar yerleştirilerek 2 saat süreyle bekletilmiştir. Ploidi analizleri Flow Sitometri kullanımıyla yapılmıştır. Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Her petri kabına 3 tomurcuktan çıkan toplamda 14-15 adet anter dikilmiştir. Her uygulama grubunda 7 tekerrür yer almıştır. Anter gelişme oranlarına ait

% değerlere açı transformasyonu uygulanmış, istatistikler bu açı değerleri üzerinden yapılmıştır. Çizelgede açı değerleri gerçek değerlerle birlikte parantez içinde verilmiştir. Anter gelişme oranları bakımından ortaya çıkan %5 düzeyindeki farklılık Duncan testi ile gruplandırılmıştır. Bu amaçla Statistica 7.0 paket programından yararlanılmıştır. Anterlerden gelişen embriyo ve bitki sayılarının değerlendirilmesinde ise sonuçlar birbirinden belirgin farklılıklar gösterdiği için ve bazı uygulamalarda sadece hatta var/yok düzeyinde gözlemlenebilmesi dolayısıyla istatistiksel olarak bir değerlendirme yapılmamıştır.

Sonuçlar

Genotip bazında her uygulama için dikilen anter sayıları, gelişerek transfer ortamlarına alınan anter sayıları, embriyogenik anter sayısı ve gelişen anter başına elde edilen embriyo sayısı ile bitkiye dönüşüm oranlarına ilişkin değerler Çizelge 2-3-4-

5'te verilmiştir. DDV ve MS ortamlarının temel olarak kullanıldığı kombinasyon gruplarının her ikisinde de, denemede kullanılan dört farklı biber genotipinden anter kültürü yoluyla embriyo elde etmek mümkün olmuştur. Ancak ortamlar arasında, genotiplere bağlı olarak embriyo oluşturma bakımından önemli farklılık görülmüştür.

Çizelge 2. Alfajer biber çeşidinde anter kültürlerinden alınan sonuçlar

Ortam Kodu	Dikilen anter sayısı (adet)	Gelişen anter sayısı (adet)	Gelişen anter Oranı (%) ^(*)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşum oranı (%)	Bitki sayısı (adet)	Bitkiye dönüşüm oranı (%)
B1	135	120	88.9 (70.5) ^{cd}	0	0	0	0	0
B2	90	90	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
B3	105	105	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
B4	135	120	88.9 (70.5) ^{cd}	0	0	0	0	0
B5	165	150	90.9 (72.5) ^c	0	0	0	0	0
B6	165	135	81.8 (64.8) ^e	3.70	0	0	0	0
B7	165	150	90.9 (72.5) ^c	0	0	0	0	0
B8	165	165	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
C1	105	89	84.8 (67.0) ^{de}	6.7	1	1.12	1	1.12
C2	105	105	100 (90.0) ^a	9.52	2	1.9	0	0
C3	60	60	100 (90.0) ^a	3.3	1	1.7	0	0
C4	45	45	100 (90.0) ^a	6.7	1	2.2	1	2.2
C5	90	89	98.9 (84.0) ^b	2.25	10	11.24	8	8.99
C6	75	45	60.0 (50.8) ^f	0	4	8.9	3	6.70
C7	103	90	87.4 (69.2) ^{cd}	1.1	3	3.33	2	2.22
C8	120	105	87.5 (69.3) ^{cd}	0.95	0	0	0	0
Önemlilik			MS %5: 4.2436					

(*)Ortalamalar arasında %5 (Duncan testi) düzeyindeki farklılıklar ayrı harflerle gösterilmiştir.

Çizelge 3. B biber genotipinde anter kültürlerinden alınan sonuçlar

Ortam Kodu	Dikilen anter sayısı (adet)	Gelişen anter sayısı (adet)	Gelişen anter Oranı (%) ^(*)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşum oranı (%)	Bitki sayısı (adet)	Bitkiye dönüşüm oranı (%)
B1	120	105	87.5 (69.3) ^b	0	0	0	0	0
B2	120	90	75.0 (60.0) ^d	1.11	0	0	0	0
B3	90	90	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
B4	75	75	100 (90.0) ^a	1.3	0	0	0	0
B5	135	120	88.9 (70.5) ^b	0	1	0	1	0
B6	105	105	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
B7	105	90	85.7 (67.8) ^b	0	2	2.22	2	2.22
B8	105	90	85.7 (67.8) ^b	0	1	1.11	0	0
C1	90	90	100 (90.0) ^a	14.4	8	8.9	7	7.70
C2	135	105	77.8 (61.9) ^{cd}	42.86	1	0.95	1	0.96
C3	70	60	85.7 (67.8) ^b	41.7	1	1.7	1	1.70
C4	76	60	79.0 (62.7) ^c	73.3	1	1.7	1	1.70
C5	105	90	85.7 (67.8) ^b	2.2	0	0	0	0
C6	90	90	100 (90.0) ^a	2.2	0	0	1	1.11
C7	75	75	100 (90.0) ^a	1.3	1	1.3	0	0
C8	105	105	100 (90.0) ^a	2.86	2	1.9	3	2.86
Önemlilik			MS %5: 2.2857					

(*)Ortalamalar arasında %5(Duncan testi) düzeyindeki farklılıklar ayrı harflerle gösterilmiştir.

Çizelge 4. 171 no'lu biber genotipinde anter kültürlerinden alınan sonuçlar

Ortam Kodu	Dikilen anter sayısı (adet)	Gelişen anter sayısı (adet)	Gelişen anter Oranı (%) ^(*)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşum oranı (%)	Bitki sayısı (adet)	Bitkiye dönüşüm oranı (%)
B1	90	75	83.3 (65.9) ^{cd}	0	0	0	0	0
B2	90	90	100 (90.0) ^a	1.1	1	1.11	1	1.11
B3	105	105	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
B4	75	60	80.0 (63.4) ^d	0	0	0	0	0
B5	90	60	66.7 (57.7) ^g	0	0	0	0	0
B6	120	89	74.2 (59.5) ^f	0	0	0	0	0
B7	120	90	75.0 (60.0) ^{ef}	0	0	0	0	0
B8	120	105	87.5 (69.3) ^b	0	2	1.90	1	0.95
C1	105	105	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
C2	45	15	33.3 (35.3) ^h	6.7	0	0	0	0
C3	135	120	88.9 (70.5) ^b	1.7	0	0	0	0
C4	60	60	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
C5	90	90	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
C6	90	90	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
C7	90	90	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
C8	105	90	85.7 (67.8) ^{bc}	0	0	0	0	0
Önemlilik	MS %5: 3.3521							

^(*)Ortalamalar arasında %5(Duncan testi) düzeyindeki farklılıklar ayrı harflerle gösterilmiştir.

Çizelge 5. 151 no'lu biber genotipinde anter kültürlerinden alınan sonuçlar

Ortam Kodu	Dikilen anter sayısı (adet)	Gelişen anter sayısı (adet)	Gelişen anter Oranı (%) ^(*)	Kallus oluşumu (%)	Embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşum oranı (%)	Bitki sayısı (adet)	Bitkiye dönüşüm oranı (%)
B1	120	105	87.5 (69.3) ^{cd}	0.95	0	0	0	0
B2	135	105	77.8 (61.9) ^e	2.86	1	0.95	1	0.95
B3	120	120	100 (90.0) ^a	0	2	1.7	0	0
B4	90	60	66.7 (54.8) ^f	0	0	0	0	0
B5	90	60	66.7 (54.8) ^f	0	2	3.33	2	3.33
B6	105	105	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
B7	120	105	87.5 (69.3) ^{cd}	0	1	0.95	1	0.95
B8	135	135	100 (90.0) ^a	0	0	0	0	0
C1	45	15	33.3 (35.3) ^g	6.7	0	0	0	0
C2	180	165	91.7 (73.2) ^b	0.61	0	0	0	0
C3	150	135	90.0 (71.6) ^{bc}	6.7	1	0.01	1	0.01
C4	105	90	85.7 (67.8) ^d	11.1	0	0	0	0
C5	75	60	80.0 (63.4) ^e	0	0	0	0	0
C6	90	90	100 (90.0) ^a	0	1	1.11	1	1.11
C7	105	90	85.7 (67.8) ^d	0	0	0	0	0
C8	105	75	71.4 (57.7) ^f	0	0	0	0	0
Önemlilik	MS %5: 4.1219							

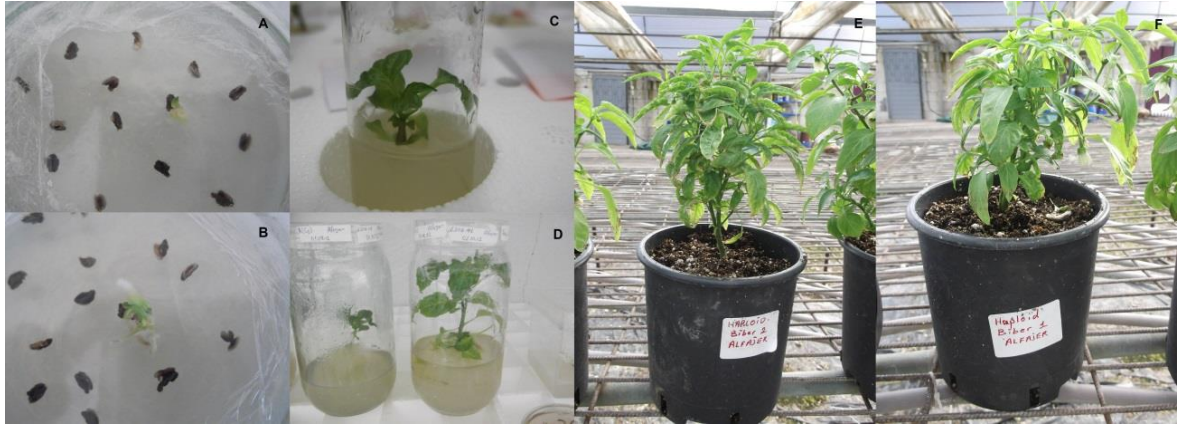
^(*)Ortalamalar arasında %5(Duncan testi) düzeyindeki farklılıklar ayrı harflerle gösterilmiştir.

Çalışmada anter gelişme oranları genel olarak yüksek bulunmuştur. Gelişme oranlarının yüksek oluşu, anter alınma zamanlarının uygun olduğunu gösteren bir durum olarak düşünülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda biber çiçek tomurcuklarında, çanak yaprak ve taç yaprak boylarının eşit olduğu veya taç yaprakların çanak yapraklardan biraz daha uzun olduğu, anterlerin yaklaşık yarı boyuna kadar antosiyan oluşumunun görüldüğü gelişme aşamasında

mikrosporların I. mitoz aşamasında olduğu bildirilmiştir (Chambonnet, 1988). Benzer biçimde Reinert ve Bajaj (1977), Karakullukçu (1991), Karakullukçu ve Abak (1992), Chunling (1992), Çömlekçioğlu ve ark. (1999, 2001), Büyükalaca ve ark. (2004), Taşkın ve ark. (2011), Ata (2011) da biberde anter kültürü için I. polen mitozunun ve tek çekirdekli mikrospor döneminin elverişli olduğunu belirtmişlerdir. Anter gelişme oranı canlılığın ve uygun mikrospor gelişme döneminde

alınan anterlerin bir göstergesi olarak kabul edilmekle birlikte, androgenik yanıt değerlendirmesi açısından güvenilir bir ifade olarak görülmemiştir. Nitekim gelişme oranı %100 olan birçok besin ortamı bileşiminde embriyo oluşumu ortaya çıkmadığı halde, gelişme oranının sadece %60 olduğu Alfajer+C6 kombinasyonunda %8.9 oranında embriyo oluşumu gerçekleşmiştir (Çizelge 2). Suriye orjinli acı bir biber çeşidi olan Alfajer, MS bileşimi ve NAA+BA kombinasyonlarına sahip B serisi ortam bileşimlerine androgenik yanıt vermemiş, bununla birlikte C serisi olarak gruplandırılan DDV besin ortamı ve 2,4-D+Kin kombinasyonları içeren bileşimlerde 1-10 adet embriyo (%1.12-11.24 oranında) meydana getirmiştir (Şekil 2). Kinetin ve 2,4-D'nin 0.01 mg L⁻¹ dozlarında bulunduğu ve gümüş nitrat içermeyen

C5 ortamında kültüre alınan Alfajer anterlerinden %11.14 oranında embriyo elde edilmesi mümkün olmuştur. Bunu aynı büyüme düzenleyici bileşimi ile birlikte 5 ve 10 mg L⁻¹ gümüş nitrat katkılı ortamlar izlemiş, C6 ve C7 ortamlarında %8.9 ve %3.3 oranlarında embriyo oluşumu sağlanmıştır. Kinetin dozunun 0.5 mg L⁻¹'ye yükseltildiği C serisi ortamlarındaki embriyo verimi düşmüş, %1.1-2.2 arasında embriyo oluşum frekansı elde edilebilmiştir. Oluşan embriyolardan önemli bir kısmı bitkiye dönüşmüştür. Anter kültüründen sağlıklı bitki elde etme oranı bakımından C5 ve C6 ortamları, Alfajer çeşidi için ilk iki sırayı almıştır. Bu ortamlar sırasıyla %8.99 ve %6.70 oranlarında androgenik bitki oluşturma oranına sahip olmuştur.



Şekil 2. Alfajer çeşidinde; (A-B) anter kültüründen embriyoların elde edilmesi ve çimlenmesi (C-D) *in vitro*'da bitkilerin gelişmesi (E-F) bitkilerin dış koşullara alıştırılması ve gelişmesi

B ıslah hattında da Alfajer'de olduğu gibi MS bileşimi ve NAA+BA kombinasyonlarına sahip B serisi ortam bileşimlerinde androgenik yanıt alınması güç olmuş, bununla birlikte C serisi olarak gruplandırılan DDV besin ortamı ve 2,4-D+Kin kombinasyonları içeren bileşimlerde daha yüksek oranlarda embriyo meydana gelmiştir. En yüksek embriyo oluşumu B genotipi için C1 ortamından elde edilmiş bulunmaktadır (%8.9). Bu ortam bileşiminde gümüş nitrat bulunmamakta, Kinetin ve 2,4-D ise 0.5'er mg L⁻¹ dozunda kullanılmış durumdadır. Bununla birlikte gümüş nitratin 10 mg L⁻¹ dozunda kullanıldığı ve aktif kömür içeren B serisinden B7 ortamında %2.22 oranında embriyo elde edilebilmiştir. B8, C2, C3, C4, C7 ve C8 ortamlarından da düşük oranlarda da olsa (%0.95-1.9) embriyo oluşumu sağlanmıştır (Çizelge 3). Anterlerden elde edilen embriyoların bir kısmı bitkiye dönüştürülebilmiş, ancak az bir bölümü normal bir gelişim göstererek bitki oluşturmamıştır.

171 no'lu yerel genotipe ait ıslah hattı, önceki iki genotipe (Alfajer ve B hattı) göre androgenik yanıtı daha düşük olmuştur. Diğer iki

genotipin tersine, C serisinde embriyo oluşumu meydana getirmemiş, çok düşük oranda oluşan embriyolar da B serisindeki ortamlar üzerinde gerçekleşmiştir. Embriyo oluşumu bakımından istenen yanıtın alınmadığı bir genotip olarak görülen 171 no'lu yerel populasyonun anterlerinden sadece MS ortamı kullanılan B2 ve B8 ortamlarında düşük düzeyde embriyo ve bitki elde edebilmek mümkün olmuştur (B2: %1.11 ve 1.11; B8: %1.90; 0.95). C serisinden hiçbir ortamda embriyo ve bitki gelişimi meydana gelmemiştir. Aynı dönemde kültüre alınan anterlerin farklı genotiplerde değişik tepkiler göstermesi ile ilgili sonuçlar Karakullukçu ve Abak (1992), Mityko ve ark. (1995), Dias ve Martins (1999), Çömlekçioğlu ve ark. (1999), Çömlekçioğlu ve ark. (2001), Ercan ve ark. (2001), Sayılır ve Özzambak (2002), Çiner ve Tıpırdamaz (2002), Büyükalaca ve ark. (2004), Koleva-Gudeva ve ark. (2007) ile Taşkın ve ark. (2011)'nin bulguları tarafından da desteklenmektedir.

151 no'lu genotip, çeşitli ortamlara düşük düzeylerde de olsa yanıt vermiş, androgenik

embriyo üretimine yatkınlığı 171 no'lu genotipe göre daha yüksek bulunmuştur. Embriyo oluşumu bakımından gümüş nitrat içermeyen B5 ortamı en yüksek oranı (%3.33) vermiş, diğer ortamlardan C6, B3, B2, B7 ve C3'ten de düşük te olsa yanıt alınmıştır (sırasıyla %1.11, 1.7, 0.95, 0.95 ve 0.01). Elde edilen embriyoların tamamı, (B3 ortamında elde edilenler hariç olmak üzere) bitkiye dönüşmüştür. Bitkiye dönüşüm hem ortam, hem de genotiplerden etkilenmektedir (Morrison ve ark., 1986; Mityko ve ark., 1995; Taşkın ve ark., 2011). Nitekim anter kültüründe başarının genotip (Bajaj, 1990; Karakullukçu ve Abak, 1992; Mityko ve ark., 1995; Rodeva ve ark., 2004; Taşkın ve ark., 2011) ve besin ortamları (Karakullukçu ve Abak, 1993; Dias ve Martins, 1999; Çömlekçioğlu ve ark., 1999; Ercan ve ark., 2001; Büyükalaca ve ark., 2004; Koleva-Gudeva ve ark., 2007; Taşkın ve ark., 2011; Ata, 2011) faktörlerinden önemli düzeyde etkilendiği bildirilmektedir. Mityko ve ark. (1995) biberde 4 adet ıslah hattı, 7 adet çeşit ve bunların melezlerini anter kültürüne tepki açısından incelemiş ve 2 adet çeşit dışında tüm çeşit, genotip ve melezlerden olumlu tepkiler alabilmişlerdir. Ercan ve ark. (2001) 5 adet biber çeşidi ve kinetin, BA, NAA, 2,4-D, aktif kömürün farklı dozlarını içeren 11 farklı besin ortamı ile çalışmışlar; %1 aktif kömür, 5 mg L⁻¹ 2,4-D, 5 mg L⁻¹ kinetin içeren %1 aktif kömür, 4 mg L⁻¹ NAA ve 0.1 mg L⁻¹ BA içeren MS ortamlarından en iyi sonuçları almışlardır. Büyükalaca ve ark. (2004) tarafından biberde yapılan bir anter kültürü çalışmasında besin ortamına eklenen değişik dozlardaki gümüş nitrat (AgNO₃)'ün etkisi test edilmiştir ve denenen değişik dozlar arasında 15 mg L⁻¹ gümüş nitrat dozu en iyi sonuçları vermiştir. Taşkın ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada ise MS besin ortamına eklenen farklı dozlardaki BAP'ın, MS yanında modifiye edilmiş MS'in ve genotiplerin etkisi denenmiştir. Genotipler içerisinde ise en olumlu sonuçlar düşük sıcaklığa tolerant olarak belirlenmiş olan A269 no'lu genotipten alınmıştır. Besin ortamları içerisinde ise 1 mg L⁻¹ BAP içeren MS ve modifiye MS ortamı başarılı bulunmuştur. Yine Ata (2011) farklı genotiplerin, besin ortamına ilave edilen 2 farklı BAP dozunun ve farklı kültüre alma zamanlarının etkilerini araştırmış ve önemli farklılıklar elde etmişlerdir.

Ploidi düzeyine ilişkin bulgular değerlendirildiğinde, elde edilen embriyolardan gelişen bitkilerin %94'ünün haploid kromozom yapısına sahip oldukları, geri kalanın ise diploid yapıda belirlendiği sonucuna ulaşılmaktadır. Anter kültürü yoluyla elde edilen bitkilerin haploid kromozom sayısına sahip olabileceği gibi, bazılarının kültür koşullarında kendiliğinden (spontan) katlandığı ve spontan dihaploid

bireylerin de elde edildiği bilinmektedir (Çömlekçioğlu, 2001). Bu çalışmada da haploid bitkilerin yanı sıra dihaploid bireyler elde edilmiştir. Haploid bitkiler katlandıktan sonra, dihaploid bitkiler çiçeklendikleri dönemde kendilenerken elde edilen bitkilerden tohum alınmış ve daha sonraki çalışmalarda değerlendirilmek üzere sınıflandırılmıştır.

Çalışmamızda, 4 mg L⁻¹ NAA + 0.1mg L⁻¹ BAP katkılı MS ortamı, androgenik embriyo oluşumu üzerinde olumlu etki yapmıştır. Ancak yukarıda belirtilen hormon kombinasyonunu içeren besin ortamına aktif kömür ve gümüş nitrat ilavesi yapıldığında bazen düşüşler yaşanırken, bazı genotiplerde ise artışlar meydana gelmiştir. Besin ortamına verilen yanıt tamamen genotipe bağlı olarak ortaya çıkmış, genel bir yorum ve değerlendirme yapmak bu çalışma kapsamında olanaksız görülmüştür. Dolayısıyla denemede kullanılan faktörlerin tek başlarına etkilerinden ziyade interaksyon kapsamında etki ettikleri fark edilmiştir. Çalışmamızda besin ortamına %0.25 oranında ilave edilen aktif kömürün, embriyo oluşumunu genotipe bağlı olarak artırıcı yönde bir etki yaptığı belirlenmiştir. Ancak biber anter kültürünü ilk başarılı uygulamalarla dünyaya duyuran ekibin geliştirmiş olduğu Dumas de Vaulx ve ark. (1985) ortamı da hala geçerliliğini korumakta olup özellikle Alfajer çeşidinde yüksek performans sergilemiştir. Bu ortam üzerinde de aktif kömür ve gümüş nitrat kombinasyonları ile yapılacak yeni çalışmalar ilginç sonuçlar verebilir.

Sonuç olarak biber anter kültüründe embriyo oluşum oranı üzerinde besin ortamı bileşiminin ve genotipin önemli derecede etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında embriyo oluşumunun yeterli olmadığı ve embriyodan bitkiye dönüşüm oranı bakımından da yeni araştırmalar yapılarak yöntemin optimize edilmesi gerektiği ortaya konmuştur. Başarı oranı çok yüksek olmamakla birlikte, yine de tek bir ortamın seçilerek fazla sayıda anter dikilmesi halinde istenen sayıda haploid bitki elde edilebileceği görülmüştür.

Teşekkür

Yazarlar; başta Serdar Dikmen olmak üzere, çalışmanın yapıldığı Dikmen Tarım Ürünleri Sanayii ve Ticaret Limited Şirketi yöneticilerine ve tüm çalışanlarına teşekkür ederler.

Kaynaklar

Abak, K., 1983. Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırma. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı*. Cilt: 33, Fasikül 1-2-3-4'den ayrı basım, 155-163.

- Alremi, F., 2013. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültüründe Genotip ve Besin Ortamının Etkisi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, Adana, 89s.
- Andrews, J., 1985. Peppers. The Domesticated *Capsicum*. University. of Texas Pres, Box 7819 Austin, Texas 78713.
- Anonim, 2012. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001.
- Ata, A., 2011. Biberlerde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültüründe Mevsim Etkisi ve Mikrospor Gelişimi. *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, Adana, 89s.
- Bajaj, Y.P.S., 1990. Haploids in Crop Improvement. I. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol: 12, Springer-Verlag, Berlin, New York.
- Büyükalaca, S., Çömlekçioğlu, N., Abak, K., Ekbiç, E. ve Kılıç, N., 2004. Effect 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. Bulletin interne de la station d'Amelioration des Plantes Maraicheres d'Avignon-Montfavet, France, 1-10.
- Chunling, L., 1992. Successful development of new sweet (hot) pepper cultivars by anther culture, Asia- Pasific Conference on Agricultural Biotechnology (APAB), August 20-24 Beijing, China.
- Çiner, D. ve Tıprıdamaz, R., 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turkish Journal of Botany*, 26: 131-139.
- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S. ve Abak, K., 1999. Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber popülasyonlarında anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etme olanakları. *Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, Ankara, 897-900.
- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S. ve Abak, K., 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum*). *XIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant*, 2001, Antalya-Turkey.
- Dias, J.S. ve Martins, M.G., 1999. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *Brassica oleracea* morphotypes. *Scientia Horticulturae*, 82: 299-307.
- Dumas De Vaulx, R., Chambonnet, D. ve Sibi, M., 1981. Culture *in vitro* d'antheres de piment (*Capsicum annuum* L.): amelioration des taux d'obtention de plantes chez differents genotypes par de traitements a +35°C. *Agronomie*, 11: 859.
- Ellialtroğlu, Ş. ve Tıprıdamaz, R., 1997. Soğuk Uygulamaları ve Aktif Kömürün Patlıcan ve Biberde *in vitro* Androgenesis Üzerine Etkileri, *TOGTAG 87 No'lu Proje Sonuç Raporu*, Ankara, 98s.
- Ellialtroğlu, Ş., Kaplan, F. ve Abak, K., 2001. The effect of carrot extract and activated charcoal on the androgenesis of pepper. *XIth EUCARPIA Meeting on Genetic and Breeding of Capsicum and Eggplant*, Antalya-Turkey, 142-145.
- Ellialtroğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K., 2002. Haploid Bitki Üretimi. (M. Babaoğlu, E. Gürel ve S. Özcan editörleri). *Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları*. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s:137-189.
- Ercan, N., Boyacı, F. ve Ayar, F., 2001. Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine farklı besin ortamlarının etkisi. *GAP II. Tarım Kongresi*, 24-26 Ekim, Şanlıurfa, Cilt 1: 121-128.
- Gemesne Juhasz, A., Petus, M., Venzcel, H., Sagi, Z.S. ve Zatyko, L., 2001. Colchicine, an efficient genome doubling agent for anther derived haploid paprika (*Capsicum annuum* L.) plants. *XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum&Eggplant*, Antalya, 146.
- George, L. ve Narayanaswamy, S., 1973. Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 78: 467–470.
- Greenleaf, W.H., 1986. Pepper Breeding. *Breeding Vegetable Crops. A.V.I.*, 67-127.
- Harn, C., Kim, M.Z., Choi, K.T ve Lee, Y.I., 1975. Production of haploid callus and embryoid from the cultured anther of *Capsicum annuum*. *Sabrao J*, 7: 71-77.
- Heiser, C.B.J.R., 1976. Peppers, In: Evolution of Crop Plants. (Edited by N. W. Simmonds, 1986). *Longman Sci. & Tech. Report*, 265-268.
- IBPGR, 1983. Genetic resources of *Capsicum*, IBPGR Secretariat, Rome, 49.
- Karakullukçu, Ş., 1991. Değişik Patlıcan Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerinde Araştırmalar, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi*, Ankara, 139s.
- Karakullukçu, Ş. ve Abak, K., 1992. Patlıcanda anter kültürü üzerinde araştırmalar: I. Elverişli tomurcuk döneminin belirlenmesi. *Doğa-*

- Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 17: 801-810.
- Karakullukçu, Ş. ve Abak, K., 1993. Patlıcanda anter kültürü üzerinde araştırmalar. II. Şeker ve büyümeyi düzenleyicilerin etkileri. *Doğa-Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 17: 811-820.
- Koleva-Gudeva, L.R., Spasenovski, M. ve Trajkova, F., 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae*, 111: 114–119.
- Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G. ve Fari, M., 1995. Anther culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding*, 114: 78-80.
- Morrison, R., Koning, R.E. ve Evans, D.A., 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *Journal of Plant Physiology*, 126: 1-9.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Novak, F.J., 1974. Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp., *Z. Pflanzenphysiol*, 68: 97-114.
- Reinert, J. ve Bajaj, Y.P.S., 1977. Anther Culture: Haploid Production and Its Significance. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S, Eds) Springer-Verlag, Berlin, pp. 251-267.
- Rodeva, V.N., Irikova, T.P. ve Todorova, V.J., 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) Comparative study on effect of the genotype. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq*, 18/2004/3.
- Rubio, C., Hardisson, A., Martín, R.E., Báez, A., Martín, M.M. ve Álvarez, R., 2002. Mineral composition of the red and green pepper (*Capsicum annuum*) from Tenerife Island. *Eur Food Res Technol*, 214: 501-504.
- Saccardo, F. ve Devreux, M., 1974. *In vitro* production of plantlets from anther culture of *Capsicum annuum* L. *Proc. of Eucarpia: Genet. Breeding of Capsicum. Budapest*, pp. 45-49.
- Sayılr, A. ve Özzambak, E., 2002. Biber anter kültüründe uygun tomurcuk büyüklüğü tespiti ile besin ortamları karışımlarının ve soğuk uygulama sürelerinin embriyo verimine etkisi üzerine bir araştırma. *IV. Sebze Tarımı Sempozyumu*, Bursa.
- Taşkın, H., Büyükcalaca, S., Keleş, D. ve Ekbiç, E., 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 10(75): 17116-17121.
- Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C. ve Chien, N.J., 1973. The induction of pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. *Sci. Sin*, 16: 147-151.