

SOĞUK UYGULAMALARI VE AKTİF KÖMÜRÜN BİBERDE (*Capsicum annuum* L.) ANTER KÜLTÜRÜ SÜRESİNCE ABSİZİK ASİT MİKTARINDAKİ DEĞİŞİM ÜZERİNE ETKİSİ^(*)

Rukiye TIPIRDAMAZ

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Beytepe Ankara, Türkiye

Şebnem ELLİALTIOĞLU

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Ankara, Türkiye

Özet

Demre sivrisi ve 11 B 14 biber çeşitlerine ait çiçek tomurcuklarına yapılan soğuk şoku uygulamalarının ve çift fazlı sistemde besin ortamına katılan aktif kömürün; anter kültüründe anterlerdeki içsel absizik asit (ABA) miktarı üzerine etkileri incelenmiştir. Soğuk şoku uygulamaları için 4°C'de 80, 90 ve 100 saat, ya da 9°C'de 5 veya 9 günlük süreler kullanılmıştır. Aktif kömür ise, çift faz halinde hazırlanan ortamın agar ile katılaştırılan katında % 1 konsantrasyonda olacak şekilde filtre edilerek ortama ilave edilmiştir. Soğuk şokları ve besin ortamına aktif kömür katılması, biber anterlerindeki ABA miktarını azaltıcı yönde etki yapmıştır. Bu etki, 9°C'de 9 gün tutulan ve şaşırtma ortamlarında aktif kömür bulunan anterlerde en fazla ortaya çıkmıştır. Denemelerde uygulanan soğuk şokları ve aktif kömür katkısı, anterlerdeki ABA miktarını azaltırken; embriyo oluşturma yönünde olumlu bir etki yapmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Capsicum annuum* L., Androgenesis, *In vitro*, Absizik Asit

The Effect of Cold Pretreatments and Activated Charcoal on the Changes in Abscisic Acid Amount During Anther Culture of Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Abstract

The effects of cold shock treatment on pepper buds and additions of activated charcoal to double layered nutrient medium on the abscisic acid (ABA) content of the anthers in pepper (Demre Sivrisi and 11 B 14 cvs.) anther cultures were investigated. These effects of these treatments 80, 90, 100 hours at 4°C, and 5 to 9 days at 9°C period were used. Activated charcoal is added to the agar solidified layer of the double layered medium at 1% concentration after been filtered. Cold shock treatment and addition of activated charcoal to nutrient medium decreased the ABA content of the anthers. The decrease was most apparent in anthers grown within the regeneration medium contains activated charcoal in an environment 9°C for 9 days. In the experiments cold shock and addition activated charcoal decreased ABA content in anthers but had no positive effect on embryo formation.

Keywords: *Capsicum annuum* L., androgenesis, *In vitro*, abscisic acid

1. Giriş

Doğada çeşitli şekillerde kendiliğinden ortaya çıkan haploidi uzun yıllardan beri bilinmekle birlikte, spontan haploidlerin ortaya çıkış oranı ve sıklığı çok azdır. Bu nedenle ıslah programlarında kullanım şansları çok sınırlıdır. *In vitro* teknikler kullanarak haploid bitkilerin elde edilmesi ve bunların kromozom sayılarının kimyasal maddeler yardımıyla iki katına çıkartılması olarak özetlenebilecek dihaploidizasyon tekniği, haploid bitkilerin ıslahçılara

sunduğu kolaylıklardan yararlanabilmeyi sağlamaktadır.

Solanaceae familyasına giren sebze türlerinden biri olan biber, önceki yıllarda yapılan araştırmalarda anter kültürüyle haploidlerin elde edilebilmesi için olumlu yanıtlar veren bir tür olarak bilinmektedir (Sibi ve ark., 1979; Dumas de Vaulux ve ark., 1981). Ülkemizde konu ile ilgili araştırmalardan ilki Abak (1983) tarafından gerçekleştirilmiş, Türkiye orijinli biber

* Bu araştırma TÜBİTAK-TOGTAĞ 87 No'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

genotiplerinden uygun besin ortamı ve kültür koşullarında %10.38'e kadar ulaşan haploid bitki oluşumu elde edilmiştir. Bu yöntemle oluşan haploid bitkilerin kromozom sayıları katlanarak elde edilen saf hatlar, çeşit geliştirmeye yönelik ıslah programlarında kullanılmıştır (Abak ve ark., 1992).

Anter kültürü yoluyla haploidlerin elde edilmesinde donör bitkiden kaynaklanan fizyolojik etmenler, mikrosporların gelişme evreleri ve buna bağlı olarak anterlerin alınma zamanı, kültür sırasındaki fiziksel etmenler ve kültürün inkübasyon koşulları ile bitkinin genotipik özellikleri gibi faktörler etki ettiği gibi; tomurcuklara yapılan ön uygulamalar ile besin ortamının yapısı ve bileşimi de androgenetik bitki eldesinde son derece önemli faktörler arasında yer almaktadır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Yukarıda belirtilen faktörlerin yanısıra çeşitli araştırmacılar mikrospor kültürünün anter kültürüne göre üstün yanlarını belirtirken anter dokusu içerisinde bulunan Absizik asit (ABA) ve diğer toksik maddelerin anterle birlikte uzaklaştırıldığını ve böylece sadece polen tanelerinin kültüre alınarak anter dokusunun inhibitör etkisinden kurtarıldığını ifade etmektedirler (Bajaj, 1983; Pierik, 1989).

ABA'nın anter kültürü üzerindeki olumsuz etkisinden kurtulmanın bir başka yolu, besin ortamına aktif kömür katılmasıdır. Bilindiği gibi aktif kömür, besin ortamının otoklavlanması sonucu ortaya çıkan veya kültüre alınan dokular tarafından salınan toksik bileşikler adsorbe etmektedir (Wernicke ve Kohlenbach, 1976; Fridborg ve ark., 1978; Kohlenbach ve Wernicke, 1978; Weatherhead ve ark., 1978). Johansson ve Eriksson (1977), aktif kömürün yalnızca anterlerdeki kahverengileşmeyle birlikte ortaya çıkan toksik maddeleri değil, aynı zamanda embriyogenezisi engelleyen ABA'yi de adsorbe edebileceğini rapor etmişlerdir.

Aktif kömürün anter kültüründe ABA'yi adsorbe ederek gametik embriyogenezisi arttırmaya yönelik etkisini ortaya koymak için araştırmalar yapan Johansson ve ark.

(1982), aktif kömür katkılı çift fazlı ortamlarda kültüre aldıkları *Anemone*, *Clematis*, *Papaver* ve *Nicotiana* anterlerinde ABA miktarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Morrison ve ark. (1986) da %2 oranında aktif kömür katılan agarla katılaştırılmış ortamın üzerine aynı bileşimde aktif kömürsüz sıvı ortam ilave edilmiş çift fazlı sistemde kültüre aldıkları biber anterlerinde çok yüksek oranda embriyo oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu yöntem sayesinde hem anter duvarındaki engelleyici maddelerin aktif kömür tarafından adsorbe edildiği, hem de serbest hale geçen mikrosporların sıvı ortamda rahatlıkla embriyoya dönüşebildikleri ileri sürülmektedir.

Anterlere uygulanan soğuk şoklarının etkisi ile ilgili olarak Sunderland ve Roberts (1979), sıcaklık derecesi ve sürenin önemli olduğunu vurgulamış; çok soğuk olmayan 7 ila 15°C gibi sıcaklıklarda uzun süre (7-14 gün) yapılan şoklamanın, daha düşük derecelerde kısa süre yapılan uygulamalardan daha etkili olduğunu ileri sürmüştür. Biberle yapılan bir diğer çalışmada ise (Morrison ve ark., 1986) tomurcuklarına 4°C'de 24, 48, 100 ve 120 saat sürelerle soğuk uygulanan Emerald Giant çeşidinin anterlerinden en yüksek embriyo oluşum frekansı 4°C'de 100 saat tutulan uygulamada ortaya çıkmış, 120 saat uygulaması ise kallus oluşumunu artırırken embriyo oluşumunu olumsuz yönde etkilemiştir.

Öte yandan kültürün ilk günlerinde uygulanan yüksek sıcaklık şoku da anter kültürü üzerinde olumlu etki yapmaktadır. Biber (Dumas de Vaulx ve ark., 1981) ve patlıcanda (Dumas de Vaulx ve Chambonnet, 1982) anter kültürünün ilk 8 günü 35°C'de ve karanlıkta bekletilen anterlerden yüksek oranda embriyo elde edilebileceğini ilk kez bildiren Fransız araştırmacıların ardından pek çok araştırmacı kültürün ilk günlerinde yüksek sıcaklık uygulamalarını kullanmışlardır (Morrison ve ark., 1986; Rotino ve ark., 1987; Qin ve Rotino, 1993; Chunling, 1992; Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz, 2000).

Biberde anter kültürü yaptığımız bu

Çizelge 1. Kültüre Alınmadan Önce, Soğuk Uygulamasının Ardından Biber Anterlerinde Bulunan ABA Miktarları (ng/g taze ağırlık).

Çeşitler	Kontrol	+4°C			+9°C	
		80 h	90 h	100 h	5 gün	9 gün
Demre Sivrisi	0.23205 a	0.15658 c	0.18612 b	0.18612 b	0.08891 d	0.02742 e
11 B 14	1.01251 a	0.11457 b	0.21033 b	0.31409 b	0.31228 b	0.24362 b

(Her çeşit kendi içerisinde istatistik analize tabi tutulmuş ve uygulamalar arasındaki farklılıklar %1 hata sınırları içerisinde belirlenerek harflendirilmiştir. LSD (Demre): 0.02091; LSD (11 B 14): 0.2223)

Çizelge 2. +35°C Sıcaklık Şoku Sonrasında Biber Anterlerindeki ABA Miktarları (ng/g taze ağırlık).

Çeşitler	Kontrol	+4°C			+9°C	
		80 h	90 h	100 h	5 gün	9 gün
Demre Sivrisi	0.81067	0.32368	0.59108	0.57611	0.30677	0.26876
11 B 14	1.93063	1.69932	1.16612	1.07023	0.75362	0.44239

(Her çeşidin kendi içerisinde değerlendirildiği istatistik analizlerine göre % 1 hata sınırları içerisinde uygulamalar arasında önemli farklılık görülmemiştir.)

sıcaklık şoku sonrasında çeşitler bazında uygulamalar arasında ABA miktarı bakımından önemli farklılık görülmemekle beraber, her iki çeşitte de ABA miktarında en düşük artış 9°C'de 5 veya 9 gün tutulan anterlerin *in vitro* koşullarında yüksek sıcaklıkta bekletilmeleri sonucunda belirlenmiştir.

Çeşitler bazında; farklı soğuk uygulamaları ve farklı örnek alım zamanları ve farklı soğuk şoklarından sonra transfer aşamasında aktif kömürsüz ve aktif kömürlü ortamların kullanım durumu dikkate alınarak, ABA miktarındaki değişimler Demre sivrisi çeşidi için Çizelge 3 ve Şekil 1.a ve b'de, 11 B 14 çeşidi için ise Çizelge 4 ve Şekil 2.a ve b'de gösterilmiştir.

Demre sivrisi çeşidinde, örnek alma zamanları ile soğuk şoku uygulamaları arasında herhangi bir interaksiyon ortaya çıkmamıştır. Çizelge 3'te ve Şekil 1a ve b'de görüldüğü gibi bu çeşide ait anterlerde, uygulama yapılmaksızın (kontrol) bitkiden

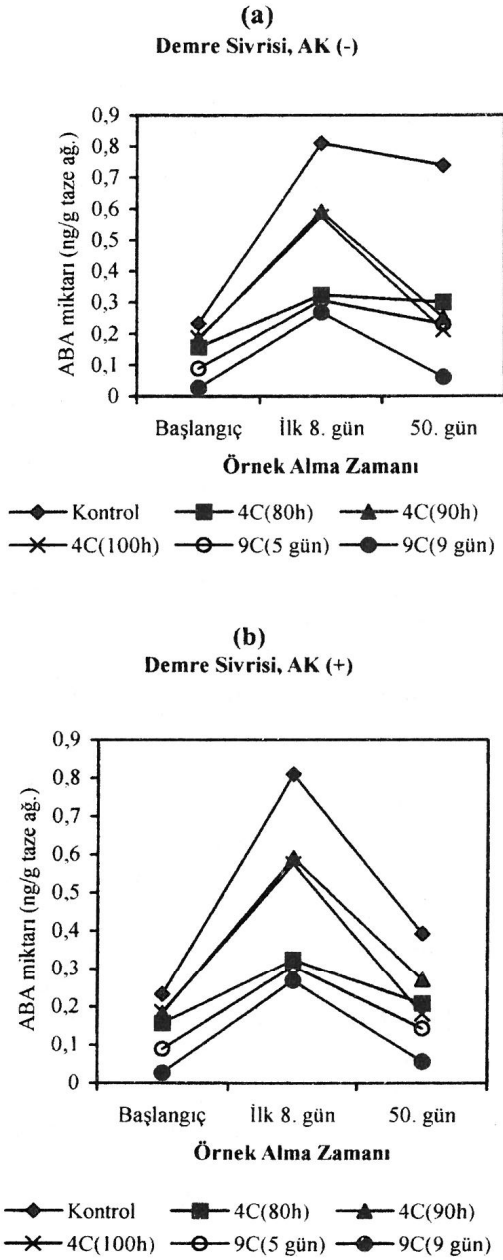
alınır alınmaz ölçülen ABA değerleri, soğuk uygulamaları yapılmış anterlere göre kültürün ilerleyen tüm aşamalarında daha yüksek olmuştur. 4°C'de değişik sürelerde soğuğa maruz bırakılan anterlerin ve 9°C'de 5 gün tutulan anterlerin ABA miktarları bakımından ortaya çıkan farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur. 9°C'nin farklı süre uygulamaları kendi aralarında önemsiz görülen bir farklılığa sahip olduğu halde, 9°C'de 9 gün soğuk şoku uygulaması diğer tüm soğuk şokları ve kontrol grubundan %1 hata sınırları içinde farklı bulunmuştur.

Kontrol grubu, tüm soğuk şoku uygulamaları ve örnek alma zamanları karşılaştırıldığında (Çizelge 3) Demre sivrisi anterleri 35°C sıcaklık şokundan sonra en yüksek ABA değerlerini vermiştir. Aktif kömür içermeyen ortamlara transfer edilen anterlerden kültürün 50. günü alınan örneklerde yapılan ABA ölçümü sonuçları

Çizelge 3. Demre Sivrisi Biber Çeşidinde Farklı Soğuk Uygulamaları ve Farklı Örnek Alım Zamanlarında Anterlerde Belirlenen ABA Miktarları (ng/g taze ağırlık).

Örnek Alma Zamanı	Kontrol	+4°C			+9°C		Duncan Testi
		80h	90h	100h	5 gün	9 gün	
Başlangıç	0.23205	0.15658	0.18612	0.18612	0.08891	0.02742	c
35°C şok sonrası	0.81067	0.32368	0.59108	0.57611	0.30677	0.26876	a
Kültürün 50.günü AK(-)	0.73963	0.30122	0.25161	0.21107	0.23161	0.06122	ab
Kültürün 50.günü AK(+)	0.39269	0.20903	0.27055	0.18056	0.14318	0.05658	bc
Duncan testi	a	de	bcde	cde	ef	f	

(Faktörlerin kendi içlerindeki farklılıklar istatistiksel olarak %1 hata sınırları içinde önemlidir.)



Şekil 1. a. Demre Sivrisi Biber Çeşidinde, Aktif Kömür Katkısı İçermeyen Ortamda ve b. Aktif Kömür Katkılı Ortamda Farklı Uygulama Gruplarındaki Anterlerde Üç Değişik Örnek Alma Zamanındaki ABA Miktarları (ng/g taze ağırlık).

da istatistiksel anlamda kontrol grubuna ve %1 aktif kömür katkılı ortamlara göre önemsiz farklılık göstermiştir. 35°C sıcaklık şoku sonrası ölçülen ABA miktarları ile aktif kömür katkılı ortamlara şaşırtılan anterlerde kültürün 50. günü ölçülen ABA

miktarları arasındaki fark %1 hata sınırları içinde önemli bulunurken; bu son ölçümler ile başlangıç ölçümleri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Yüksek ABA değerlerine sahip aktif kömürsüz ortamlar ile başlangıç anterlerindeki fark ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sonuç olarak Demre sivrisi çeşidinde; yüksek sıcaklık şoku nedeniyle ortaya çıkan ABA miktarındaki artışın aktif kömürsüz ortamlarda etkin bir biçimde azaltılamadığı, ancak ortama aktif kömür ilave edilince anterlerin kültür öncesindeki ABA miktarlarına geri dönüşü sağlayan bir azalma elde edilebileceği ortaya çıkmıştır. 11 B 14 dolmalık biber çeşidinde de örnek alma zamanları ile soğuk şoku uygulamaları arasında herhangi bir interaksiyon ortaya çıkmamıştır.

Soğuk uygulamaları bakımından diğer çeşidin sonuçlarına benzer bir sonuç elde edilmiştir. Çizelge 4 ve Şekil 2a ve b'de görüldüğü gibi bu çeşide ait anterlerde, uygulama yapılmaksızın bitkiden alınır alınmaz ölçülen ABA değerleri, soğuk uygulamasından geçirilmiş anterlere göre kültürün ilerleyen tüm aşamalarında daha yüksek olmuştur. 4°C'de değişik sürelerde soğuğa maruz bırakılan anterlerin ve 9°C'de 5 gün tutulan anterlerin ABA miktarları bakımından ortaya çıkan farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur. 9°C'nin farklı süre uygulamaları kendi aralarında önemsiz görülen bir farklılığa sahip olduğu halde, 9°C'de 9 gün soğuk şoku uygulaması diğer tüm soğuk şokları ve kontrol grubundan %1 hata sınırları içinde önemli farklılık göstermiştir (Çizelge 4).

Farklı örnek alım zamanları içerisinde en yüksek ABA değeri 11 B 14 çeşidinde de Demre sivrisinde olduğu gibi 35°C sıcaklık şoku sonrasında belirlenmiş, aktif kömür katkısız ortamlarda kültürün 50. günü alınan örnekler ikinci sırada yer alırken ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kültürün 50. günü aktif kömür katkılı ortamlardan elde edilen ABA değerleri yine önemli farklılık göstererek üçüncü sıraya yerleşmiş, ancak başlangıç anterleri ile arasında ortaya çıkan farklılık önemsiz olmuştur (Çizelge 4). Sonuç olarak

Cizelge 4. 11 B 14 Biber Çeşidinde Farklı Soğuk Uygulamaları ve Farklı Örnek Alım Zamanlarında Anterlerde Belirlenen ABA Miktarları (ng/g taze ağırlık).

Örnek Alma Zamanı	Kontrol	+4°C			+9°C		Duncan Testi
		80h	90h	100h	5 gün	9 gün	
Başlangıç	1.01251	0.11457	0.21033	0.31409	0.31228	0.24362	cd
35°C şok sonrası	1.93063	1.69932	1.16612	1.07023	0.75362	0.44239	a
Kültürün 50.günü AK(-)	1.26406	0.98577	0.72116	0.70092	0.61225	0.50314	b
Kültürün 50.günü AK(+)	0.60159	0.19585	0.32042	0.32034	0.40704	0.15543	d
Duncan testi	a	bcde	cdef	def	ef	f	

(Faktörlerin kendi içlerindeki farklılıklar istatistiksel olarak %1 hata sınırları içinde önemlidir)

11B14 çeşidinde 35°C sonrasında yükselen ABA miktarını başlangıçtakine yakın değerlere indirmek için aktif kömür katkısının gerekli olduğu ortaya çıkmıştır.

Çift faz halinde hazırlanan ve alta kalan aktif kömür ile agar katılan jel halindeki ortamın üzerine, her iki maddenin de konulmadığı sıvı ortamdan oluşan rejenerasyon ortamlarına aktarılan anterlerde kültürün 50. günü ABA miktarı oldukça azalmıştır. 11 B 14 çeşidi yine Demre sivrisine göre kültürün 50. gününde de genel olarak daha yüksek ABA değerleri vermiştir. Her iki çeşitte de soğuk şoku uygulanmayan ve şaşırtma ortamlarına aktif kömür katılmayan uygulamalar dışındaki hemen hemen tüm uygulamalardan elde edilen sayısal değerler birbirine yakın sonuçlar vermiştir. Denemede kullanılan çift fazlı sistemde, aktif kömürün varlığı; kültürün sonuna yaklaşmış anterlerdeki ABA miktarı üzerinde kayda değer bir farklılık ortaya çıkartmamıştır. Ancak buradan ulaşılan önemli bir bulgu, tomurcuklara soğuk şoku uygulaması veya ortama aktif kömür katkısının tek başına anterlerdeki ABA miktarını azaltıcı etki yaptığı; bu iki faktör birlikte kullanıldığında ABA miktarını azaltıcı etkinin daha güçlü olarak ortaya çıktığıdır. Ayrıca bu maddenin katılmadığı ortamlara göre her iki çeşitte de 35°C şoku sonrası ile kültürün 50. günü değerleri arasındaki farkın daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum da aktif kömürün ABA'ı tutucu etkisinin mutlak göstergesidir.

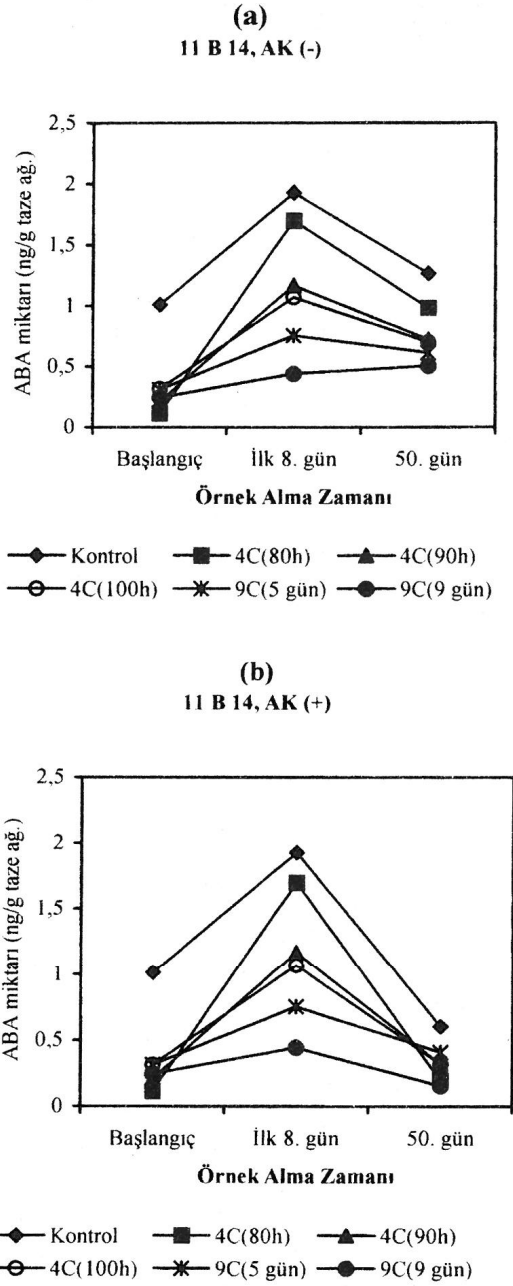
Anter kültürleri sırasında yapılan gözlemler, çift fazlı ortam sisteminin bizim koşullarımızda anter gelişmesi üzerinde pek olumlu etki yapmadığı yönünde bir görüş

oluşturmuştur. Anterler kültürün ilerleyen günlerinde tamamen kararak canlılıklarını yitirdikleri kanısını uyandırmışlardır. Sıvı faz her ne kadar az miktarda kullanılsa da, yine de anterlerde asfiksiye neden olduğu düşünülmüştür. Dolayısıyla biber anterlerindeki ABA miktarı ve değişimleri ile polen embriyogenezisi arasında bir ilişki olup olmadığını incelemek mümkün olamamıştır.

4. Tartışma ve Sonuç

Biber anterlerine kültür öncesi yapılan soğuk şoklarının ve kültür sırasında besin ortamına katılan aktif kömürün anterlerdeki içsel absizik asit miktarında neden olduğu değişimler belirlenmiştir. ABA tayinlerinde elde edilen ilk önemli bulgu, genotipler arasında anterlerdeki içsel ABA miktarı bakımından farklılıklar bulunduğunun belirlenmiş olmasıdır. 11 B 14 çeşidi, Demre sivrisi çeşidine göre daha yüksek ABA değerleri vermiştir. Bu iki biber çeşidinden, denemelerimizde androjenetik embriyo elde edilemediğinden, anterlerdeki içsel ABA miktarının çeşitler bazında yüksek olup olmamasının embriyo oluşumu ile bağlantısını ortaya koymak mümkün olamamıştır. Çalışma anterlerdeki içsel ABA miktarındaki değişimler üzerinde soğuk uygulamalarının ve ortama katılan aktif kömürün etkisini ortaya koyması bakımından önemli bilgiler vermiştir.

Biber tomurcuklarının kültür öncesi 4°C ve 9°C'de değişik sürelerde soğuk şokuna tabi tutulması, anterlerdeki ABA miktarını azaltıcı etki yapmıştır. Tüm uygulamalar dikkate alındığında 9°C'de 5 ve



Şekil 2. a. 11 B 14 Biber Çeşidinde, Aktif Kömür Katkısı İçermeyen Ortamda ve b. Aktif Kömür Katkılı Ortamda Farklı Uygulama Gruplarındaki Anterlerde Üç Değişik Örnek Alma Zamanındaki ABA Miktarları (ng/g taze ağırlık).

9 gün süreyle yapılan soğuk uygulamalarının 4°C'de 80, 90 ve 100 saat süreyle yapılan uygulamalara göre ABA miktarında daha fazla azalmaya neden

olduğu belirlenmiştir. Genel olarak 4°C'de uygulanan süreler, kendi aralarında istatistiksel olarak önemli farklılıklar göstermemiştir. Ancak 9°C'de 9 gün tutulan anterlerde ABA miktarında belirlenen azalma, 5 gün süreyle tutulanlara göre daha fazla olmuştur. Bu durum kültürün sonuna doğru da etkisini korumuş, 9°C'de 9 gün süreyle tutulan anterler kültürün 50. gününde de en düşük ABA içeriklerine sahip olmuştur. *Anemone canadensis* bitkisi üzerinde çalışan Johansson ve ark. (1982) da tomurcuklara yapılan soğuk uygulamalarının anterlerdeki ABA miktarı üzerinde azaltıcı etki yaptığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, kontrol anterlerine göre soğuk uygulanan anterlerde ABA miktarında %70 oranında bir azalmanın kaydedildiğini ve bunun polen embriyogenezisi ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Soğuk uygulamasıyla anterlerdeki ABA miktarının tamamen ortadan kaldırılamayacağını, ancak kalan bu miktarın embriyo oluşumunu engelleyebilecek düzeyde olamayacağını ileri sürmüşlerdir. Uzun süreli soğukta bekletmenin daha olumlu etki yapabileceğini bildiren araştırmacılar, bu uzun sürenin bitkiden ayrılan tomurcuklar ve içerisindeki anterlerde kurumaya neden olabileceğine de dikkat çekmişler ve soğuk şoklarını kültür öncesi uygulamaktansa kültüre alınan anterlerin soğukta bekletilmesinin daha avantajlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Denemede kullanılan 11 B 14 ve Demre sivrisi biber çeşitlerinde, yapılan soğuk şokları, embriyo oluşumunu sağlayamamıştır. Oysa Morrison ve ark. (1986), Emerald Giant biber çeşidinde tomurcukları 4°C'de 24, 48, 100 ve 120 saat beklettikten sonra yapılan anter kültürlerinde 100 saat uygulamasının embriyo verimi bakımından iyi bulunduğunu, %47 oranında embriyo oluşumu sağlandığını ifade etmektedirler. Bizim çalışmamızda tomurcuklara 4°C'de 80, 90 ve 100 saat yapılan soğuk şokları, embriyo oluşturma yönünden etkisiz kalmıştır. Kontrol uygulamalarında da embriyo oluşmadığı gibi 9°C'de 5 veya 9 gün bekletilen anterlerden de embriyo

oluşmamıştır. Oysa Sunderland ve Roberts (1979) 4°C'ye göre daha yüksek olan 7-14°C'de ve daha uzun sürelerde yapılan soğuk şoklarının kısa süreli daha düşük sıcaklıkta yapılanlara göre daha etkili olabileceğini belirtmektedirler. Bu durum bizim çalışmamızda anterlerdeki ABA miktarını azaltma etkisi bakımından ortaya çıktığı halde embriyo oluşumu bakımından pozitif yönde bir farklılık oluşturamamıştır.

Çift fazlı sistem kullanılan bu çalışmada besin ortamına aktif kömür ilave edilmesi de embriyo oluşumunu artırıcı yönde bir etki yapmamıştır. Ancak anterlerdeki ABA miktarını azaltma yönünde, aktif kömürün çok belirgin bir etkisinin olduğu ortaya konmuştur. Polen embriyogenezisi üzerinde etkili olduğu belirtilen (Johansson ve Eriksson, 1977) absizik asit, aktif karbon tarafından tutulan bir hormondur (Johansson, 1983). Bizim çalışmamızda da besin ortamına katılan aktif kömür, anterlerde bulunan ABA miktarını azaltıcı yönde etki yapmıştır. Bu etki aktif kömürün ABA'yi adsorbe etme özelliğinden kaynaklanmıştır.

Sonuç olarak biber anter kültüründe kültür öncesi tomurcuklara yapılan soğuk uygulamalarının ve çift fazlı sistemde besin ortamına katılan aktif kömürün bizim kullandığımız çeşitlerde ve uygulama koşullarımızda embriyo oluşturma üzerinde olumlu etki yapmadığı görülmüştür. Ancak hem soğuk uygulaması, hem de ortama aktif kömür katkısı, anterlerdeki ABA miktarında azalmaya yol açmıştır. Araştırma sonuçlarımız, anterlerdeki ABA miktarının az veya çok olmasının anter kültüründeki başarı üzerinde tek başına etkili bir faktör olmadığını göstermiştir.

Kaynaklar

- Abak, K., 1983. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki elde etme üzerinde Araştırma. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı, Cilt: 33, Fas.: 1-2-3-4'den ayrı basım.
- Abak, K., İşbeceren, A. ve Güler, Y. A., 1992. Bazı Haploid Biber Hatları ile Bunların F1 Melezlerinin Verim, Erkencilik ve *Phytophthora capsici*'ye direnç bakımından karşılaştırılması. Türkiye 1. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildiriler 13-16 Ekim 1992, İzmir, Cilt II: 293-296.
- Bajaj, Y.P.S., 1983. *In vitro* Production of Haploids. in: Handbook of Plant Cell Culture (eds: D.A. Evans, V.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada) Mc Millan Publ. Co. Vol. I Chapter 6, 228-287.
- Chunling, L., 1992. Successful Development of New Sweet (hot) Pepper Cultivars by Anther Culture. Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology (APAB), August 20-24, Beijing, China.
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D. and Pochard, E., 1981. Culture *In vitro* de Antheres de Pigment (*Capsicum annuum* L.): Amelioration des Taux de Obtention de Plantes Chez Différents Genotypes par des Traitements a +35°C. *Agronomie* 1(10), 859-864.
- Dumas de Vault, R. and Chambonnet, D., 1982. Culture *In vitro* D'anthers D'aubergine (*S. melongena* L.): Stimulation de la Production de Plantes qu Moyen de Traitements a +35 C Associes a de Faibles Teneurs en Substances de Croissance. *Agronomie* 2(10), 983-988.
- Ellialtıoğlu, Ş. ve Tıprıdamaz, R., 1997. Soğuk Uygulamaları ve Aktif Kömürün Patlıcan ve Biberde *In vitro* Androgenesis Üzerine Etkileri. TÜBİTAK-TOGTAG 87 No'lu proje Sonuç Raporu, 70s. Ankara.
- Ellialtıoğlu, Ş. ve Tıprıdamaz, R., 2000. Patlıcan Anter Kültüründe İçsel Absizik Asit Miktarını Azaltıcı Uygulamaların Androgenetik Embriyo Oluşumuna Etkisi. *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi* 24 (1), 23-32.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K. 2001. Haploid Bitki Üretimi. In: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan (Editörler), *Bitki Biyoteknolojisi (Doku Kültürü ve Uygulamaları)* Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları; Konya, s: 137-189.
- Fridborg, G., Pedersen, M., Landström, L.E. and Eriksson, T., 1978. The Effect of Activated charcoal on Tissue Cultures Adsorption of Metabolites Inhibiting Morphogenesis. *Physiol. Plant* 43, 104-106.
- Johansson, L. and Eriksson, T., 1977. Induced Embryo Formation in Anther Cultures of Several *Anemone* species. *Physiol. Plant* 40, 172-174.
- Johansson, L., Andersson, B. and Eriksson, T., 1982. Improvement of Anther Culture Technique: Activated Charcoal Bound in Agar Medium in Combination With Liquid Medium and Elevated CO₂ Concentration. *Physiol Plant*. 54, 24-30.
- Johansson, L., 1983. Effects of Activated Charcoal in Anther Cultures. *Physiol Plant*. 59, 397-403
- Kohlenbach, H.W. and Wernicke, W., 1978. Investigations on the Inhibitory Effect of Agar and the Function of Activated Carbon in Anther Culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 86, 189-198.
- Morrison, R.A., Köning, R.F. and Evans, D.A., 1986. Anther Culture of An Interspecific Hybrid of *Capsicum*. *J. of Plant Physiol.* 126: 1, 1-9.
- Pierik, R.L.M., 1989. *In vitro* Culture of Higher Plants. Marthinus Nijhoff Publ. Dordrecht, Boston, Lanchaster, 344 pp.
- Qin, X. and Rotino, G.L., 1993. Anther Culture of

Soğuk Uygulamaları ve Aktif Kömürün Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anther Kültürü Süresince Absizik Asit Miktarındaki Değişim Üzerine Etkisi

- Several Sweet and Hot Pepper Genotypes. *Capsicum* and Eggplant Newsletter 12, 59-62.
- Rotino, G., Falavigna, A. and Restaino, F., 1987. Production of Anther-derived Plantlets of Eggplant. *Capsicum* Newsletter 6, 89-90.
- Sibi, M., Dumas de Vault, R. and Chambonnet, D., 1979. Obtention de Plantes hHaploides par Androgenese *In vitro* Chez le Pigment (*Capsicum annuum* L.). *Ann. Amelior. Plant.* 29 (5), 583-606.
- Sunderland, N. and Roberts, M., 1979. Cold-pretreatment of Excised Flower Buds in Float Culture of *Tobacco* Anther. *Ann. Bot.* 43, 405-414.
- Weatherhead, M.A., Burdon, J. and Henshaw, G.G., 1978. Some Effects of Activated Charcoal as an Additive to Plant Tissue Culture Media. *Z. Pflanzenphysiol.* 89, 463-472.
- Wernicke, W. and Kohlenbach, H.W., 1976. Investigations on Liquid Culture Medium as a Means of Anther Culture in *Nicotiana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 79, 189-198.