

FARKLI İRİLİKTEKİ BİBER TOMURCUKLARINDA POLEN GELİŞME DÖNEMİNİN BELİRLENMESİ

Nurgül ERCAN

Ş.Beyza BİNER

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü - Antalya

Özet

Anter kültüründe birçok fizyolojik etmen, ön uygulamalar, inkübasyon koşulları, besin ortamının yapısı ve bileşimi ile genotip gibi çok sayıda faktör elde edilecek başarı üzerinde etkili olmaktadır. Bu etmenlerden birisi de tomurcukların alındığı zaman, mikrosporların içerisinde buldukları gelişme dönemidir. Birçok bitki türünde mikrospor çekirdeğinin mitoz bölünmeye başlamasından hemen önceki dönem, mitoz bölünme aşaması veya hemen bu aşamayı izleyen bölünme sonrası dönem anter kültürüne en iyi cevap veren dönemler olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada biberde anter kültüründe en fazla başarının sağlandığı polen gelişim safhasını içeren anterlerin yer aldığı tomurcuk grubunu saptamak amacıyla biber tomurcuklarında parafin kesitler hazırlanarak fibrin metoduna göre boyanmış ve sitolojik incelemelerde bulunulmuştur. Çalışmada Sirena F1 biber çeşidinin 7.24 mm uzunluk ve 4.53 mm çaplı tomurcuklarında mikrosporların tek çekirdekli ve 1. polen mitozu aşamasında oldukları, bu aşamadaki anter uzunluğunun ise 5.13 mm olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Biber, *Capsicum annuum* L., tomurcuk büyüklüğü, polen gelişim aşaması

Determination of The Microspore Development Stage of Different Sized-Buds in Pepper

Abstract

A series of factors such as culture media, genotypes, explants, pre-treatments and incubation conditions affect the success to be obtained in anther culture. One of these factors is microspore development stage when bud excised from plant. For most species, microspores have been reported to best respond when they are cultured at the uninucleate stage, first pollen mitosis stage or right after this period. In order to determine the microspore stage, which is optimal for the induction of androgenesis, anther specimens were prepared using paraffin method and stained in fibrin method. Preparations examined in light microscope. In this study, buds of Sirena F1 pepper cultivar, which were 7.24 mm length and 4.53 mm diameter, had uninucleate and first pollen mitosis stage microspores. In this size of buds, anthers were 5.13 mm.

Key Words: Pepper, *Capsicum annuum* L., bud size, pollen development stage

1. Giriş

Olgunlaşmamış polen tanelerinden haploid yapıda embriyoların elde edilmesi anter kültürü ile ilgili araştırmaların hızla yoğunlaşmasını sağlamış ve günümüzde pek çok türde bu yöntemle elde edilen bitkiler ıslah çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Karakullukçu ve Abak, 1993).

Gönülşen, (1987) anter kültürünü etkileyen faktörler arasında anterin gelişme devresinin önemli bir rol oynadığını belirterek, polen ana hücrelerinden olgun polenin oluşumuna kadar geçen bütün aşamaları kapsayan mikrosporogenesisin başlıca üç ana devreye ayrılabilirliğini bildirmiştir. Bunlar 1.mayoz bölünme ve tetradların oluşması 2.tetradların ayrılması ve mikrosporların gelişmesi 3.mikrosporların polen taneleri halinde olgunlaşmasıdır. Araştırmacı ikinci devrede polenin tek hücreli

durumda olduğunu, ikinci devrenin sonu ile üçüncü devrenin başında birinci hücre bölünmesinin meydana geldiğini, üçüncü devrenin ise çok hücreli gametofitler veya polen daneleri devresi olduğunu ifade etmiştir.

Ellialtıoğlu ve ark (2001), anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli etmenlerden birisinin tomurcukların alındığı zaman mikrosporların içinde buldukları gelişme dönemi olduğunu bildirmişlerdir.

Solanaceae familyasındaki birçok bitki türünde mikrospor çekirdeğinin mitoz bölünmeye başlamasından hemen önceki dönem, mitoz bölünme aşaması veya hemen bu aşamayı izleyen bölünme sonrası dönem en iyi cevap veren dönemler olarak belirlenmiştir (Vagera, 1990; Kristiansen ve Andersen, 1993; Qin ve Rotino, 1993).

Abak (1983), Türkiye orijinli biber materyalinde anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etmek için yaptığı çalışmada, en elverişli anter gelişme döneminin tomurcukların 3.6-4.0 mm iriliğe ulaştıkları zamana rastladığını belirtmiştir. Araştırmacı 2.0-2.5 mm iriliğindeki tomurcuklardan alınan anterlerde mikrospor hücrelerinin çok genç olduğunu ve tetrat safhasından yeni serbest kaldığını; 2.5-3.0 mm ve 3.1-3.5 mm arasındaki tomurcuklarda ise mikrosporlarda mitoz bölünmenin henüz başlamadığını; 3.6-4.0 mm çaplı tomurcuklardaki mikrosporların çoğunun birinci mitoz bölünmenin profaz safhasında bulunduğunu ve bu safhanın androgenesis için en elverişli aşama olduğunu bildirmiştir.

Novak (1974) biber anter kültüründe 2.6-5.0 mm arasında büyüklüğe sahip ve açık yeşil renkli petalleri olan tomurcuklardan alınan anterlerin, olgunlaşmamış tek çekirdekli mikrosporları içerdiğini ve bu dönemdeki mikrospordan olumlu sonuç alındığını, Sibi ve ark. (1979) ise biberlerde sepal ve patal boylarının eşit olduğu yada biraz daha uzun olduğu dönemin polen mitozu ile aynı dönem olduğu ve anter kültürüne iyi cevap verdiğini bildirmişlerdir.

Çömlekçioğlu ve ark. (2001) Anter kültürü için kaliks ve korollanın aynı seviyede yada korollanın kaliksten biraz daha uzun olduğu aşamadaki tomurcukları almışlardır. Bu aşamada anterlerin hemen hemen yarısında antosiyanin oluştuğunu bildirmişlerdir.

Çiner ve Tıprıdamaz (2002) Malatya isimli lokal bir biber genotipiyle yaptıkları çalışmada parafin ve ezme preparat yöntemlerini kullanarak biberde anter kültürü çalışmaları için en uygun safha olan tek çekirdekli veya 1. polen mitozu aşamasındaki tomurcukların 5 mm çap ve 7 mm uzunlukta olduğunu, bu irilikteki anterlerin yeşil renkli, uçlarında ise mor rengin görüldüğünü açıklamıştır.

Karakullukçu ve Abak (1993), patlıcanda anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etmek için en uygun mikrospor gelişme dönemini araştırmışlardır. Dört farklı çeşidin sekiz farklı büyüklük ve gelişme devresindeki anterleri ile yaptıkları bu çalışmada, en elverişli gelişme dönemi

olan birinci polen mitozundan hemen önceki devredeki tomurcukların, taç yapraklarının seviyesinin çanak yaprakların birleşme noktasında bulunduğunu, anter renginin ise yeşilden yeşilimsi sarı renge dönüştüğünü belirtmişlerdir. Bu devrede tomurcuk uzunluklarının çeşitlere bağlı olarak 22.4-24.7 mm, tomurcuk çaplarının ise 10.8-12.5 mm olduğunu belirlemişlerdir.

Ellialtıoğlu ve ark. (2001) uygun safhadaki mikrosporları bulduran anterlerin ve tomurcukların morfolojik özellikleri tanımlandığında, anter kültürü için tomurcukların seçimi ve toplanmasının, kolay ve amaca ulaşmada zaman kazandıran bir işlem haline geleceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada amaç biberde anter kültürü için elverişli tomurcuk safhası olarak bildirilen tek çekirdekli mikrospor döneminin, tomurcuğun hangi aşamasında olduğunu sitolojik incelemelerle saptamaktır.

2. Materyal ve Yöntem

Araştırmada bitkisel materyal olarak Sirena biber çeşidi kullanılmıştır. Denemede yer alan bitkilerin tohumları Ağustos ayının ilk haftasında torf, perlit ve vermikulit karışımından oluşan harçla doldurulmuş tohum ekim kaplarına ekilmişlerdir, Eylül ayının ilk haftasında dikim aşamasına gelen fideler cam serada 100-50x50 aralık ve mesafe ile hazırlanan esas yerlerine dikilmiştir. Bitkiler 3 gövdeli olarak yetiştirilmiş ve gerekli bakım ve kültürel uygulamalar yapılmıştır. Bitkilerden kasım ayı başında çiçek tomurcukları toplanmaya başlamıştır.

Farklı irilikteki çiçek tomurcuklarının içinde bulunan anterlerin gelişme aşamalarını saptayabilmek amacıyla, donör bitkilerden çeşitli irilikte toplanan tomurcuklar laboratuvara getirilmiş, önce kendi aralarında morfolojik özelliklerine göre 6 gruba ayrılmışlardır. Her gruptan 40 tomurcuğun eni ve boyu ölçülüp 20 tanesi sitolojik çalışmalar için ayrılmış geri kalan 20 tanesinde ise tomurcuklar açılarak anter boyları ölçülmüştür (Çizelge 1). Alınan çiçek tomurcukları 6 hacim etil alkol + 3 hacim kloroform + 1 hacim glacial

Çizelge 1. Altı Gruba Ayrılmış Olan Biber Tomurcuklarının Ebatları ve Morfolojik Özellikleri.

Gruplar	Tom.Uzun. (mm)	Tom.Çapı (mm)	Anter Uzun. (mm)	Tomurcukların morfolojik özellikleri
I	5.07	3.64	3.35	Taç ve çanak yapraklar aynı hizada, taç yapraklar yeşil renkli, anterler yeşil-krem renğinde
II	5.72	4.05	4.11	Taç ve çanak yaprak aynı hizada veya çok az geçmiş taç yaprak yeşil renkli, anterler krem-beyaz, uçlarda erguvan renkli
III	6.52	4.28	4.46	Taç yaprak seviyesi çanak yaprak seviyesini geçmiş, taç yapraklar yeşil-krem renğinde, anterler beyaz-erguvan renkli
IV	7.24	4.53	5.13	Taç yaprakların seviyesi çanak yaprakların seviyesini geçmiş, taç yapraklar yeşil-krem renğinde, anterler erguvan renkli
V	8.13	4.83	5.57	Taç yapraklar çanak yaprak seviyesini geçmiş, taç yapraklar krem renğinde, anterler erguvan-mor renkli
VI	10.11	5.14	6.09	Taç yapraklara hafif bir baskı yapıldığında açılacak durumda, taç yapraklar açık krem renkli, anterler daha koyu renk almış.

asetik asit şeklinde hazırlanan Carnoy çözeltisinde 16 saat bırakıldıktan sonra 3 kez çeşme suyu ile yıkanmıştır (Ray ve Tokach, 1992).

2.1. Örneklerin parafine hazırlanması

Örneklerin parafine hazırlanması Brooks (1950) tarafından bildirilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. Bu yönteme göre ilk olarak dokulardaki suyun alınması gerekmektedir. Dehidratasyon adı verilen bu işlemde örnekler bir alkol serisinden geçirilmektedir. Alkol oranının giderek arttığı bu seri sonunda dokulardaki su ile alkolün yer değiştirmesi sağlanmış olur. Bu amaçla Carnoy (6:3:1)'dan çıkarılarak takip kaplarına yerleştirilen örnekler 2 saat süreyle % 80, 90, 96 ve 100'lük etil alkol serisinden geçirilerek, örneklerden su alma işlemi tamamlanmıştır.

Daha sonra alkolle ksilolün yer değiştirmesini sağlamak amacı ile ksilol alkol serisine başlanmıştır. Ksilol serisinde absole alkol içindeki örneklere sırasıyla %25, 50, 75 ve 100 ksilol eklenmiştir. Ksilol serisinin son safhası olan %100 ksilol iki kez yenilenmiştir.

İnfiltrasyon adı verilen diğer safhada ise ksilol içindeki örneklerin parafine doyurulması işlemi yer almıştır. Ksilol ile parafinin yer değiştirmesi için ksilol yavaş yavaş eksiltilecek, yerine parafin eklenmekte ve parafinin dokular tarafından emilmesi

sağlanmaktadır. Oda sıcaklığında yapılan bu işlem sırasında parafin %50'ye ulaşıncaya kadar (parafin artık erimez olunca), etüv sıcaklığı 35°C'ye yükseltilmekte ve parafinin erir durumda tutulması sağlanmıştır. %100 parafine ulaşmaya kadar parafin ekleme işlemine devam edilmiştir. Bu arada etüv sıcaklığı da kademeli olarak artırılmış ve saf parafin safhasına gelindiğinde kullanılan parafinin erime derecesi olan 62°C'ye kadar çıkarılmıştır. Örneklerdeki ksilol kokusu tamamen kaybolunca örnekler parafin bloklara gömülmüşlerdir. Sonra soğutularak kalıplardan çıkartılan parafin küplerden Leitz marka kızaklı mikrotomda 6 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan seri kesitler sıcaklığı 35-40°C'ye ayarlanmış benmari içine bırakılarak, büzülen parafin kesit yüzeyinin açılması sağlanmıştır. Daha sonra kesitler üzerine Albümin -Gliserin (1 kısım taze yumurta akı + 1 kısım gliserin) karışımı sürülmüş lamalar üzerine aktarılmış ve sabitleştirmek üzere 60°C'deki etüvde 2-3 saat bekletilmişlerdir.

2.2. Boyama

Kesitlerin mikroskop altında incelenebilmesi için boyanmaları gerekmektedir. Bu amaçla fibrin metodu kullanılmıştır (Luna, 1984). Fibrin boyama metodunda aşağıdaki sıra izlenmiştir;

1. Örnekler saf su ile yıkanır

2. Zenker solüsyonunda 1 gece bekletilir

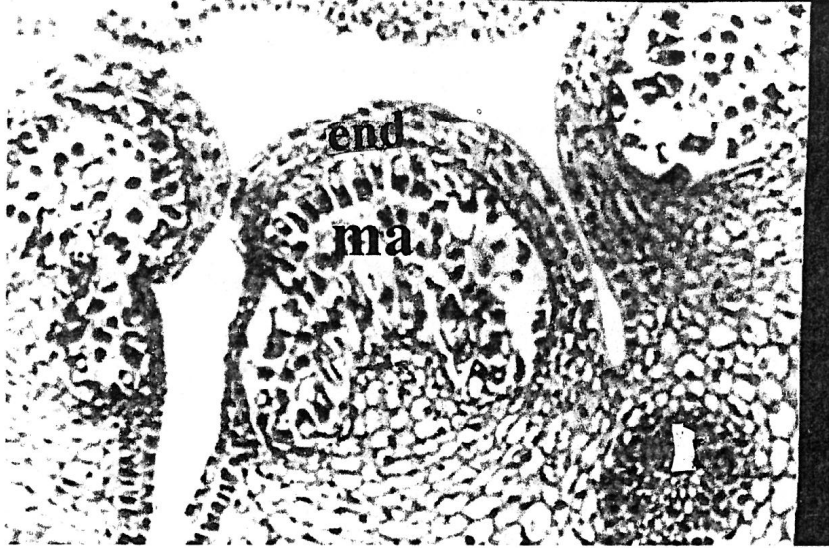
3. Akar suda yıkanır
4. İyot ile civa klorid kristali uzaklaştırılır ve sodyum tyosülfat ile renk gidene kadar temizlenir.
5. Çeşme suyunda 15 dakika yıkanır.
6. Celestin Blue solüsyonunda 5 dakika bekletilir.
7. Çeşme suyunda yıkanır.
8. Mayer Hematoksilen solüsyonunda 5 dakika bekletilir.
9. Çeşme suyunda 5 dakika yıkanır.
10. Orange G-pikrik asit solüsyonunda 5 dakika bekletilir.
11. Çeşme suyunda 1 dakika yıkanır.
12. Asit fuksin solüsyonunda 5 dakika bekletilir.
13. Çeşme suyunda yıkanır.
14. Diferensiyal solüsyonda 10-15 dakika bekletilir.
15. Çeşme suyunda yıkanır.
16. MacFarlane çalışma solüsyonunda 5 dakika bekletilir.
17. Çeşme suyunda yıkanır.
18. Light green solüsyonunda 1 dakika bekletilir.
19. Çeşme suyunda yıkanır.
20. % 95' lik ve saf alkolde dehidrat yapılır ve ksilolle temizlenir (Her birinde 2 kez).
21. Hazırlanan preparatlar entellan ile kapatılır.

3. Bulgular ve Tartışma

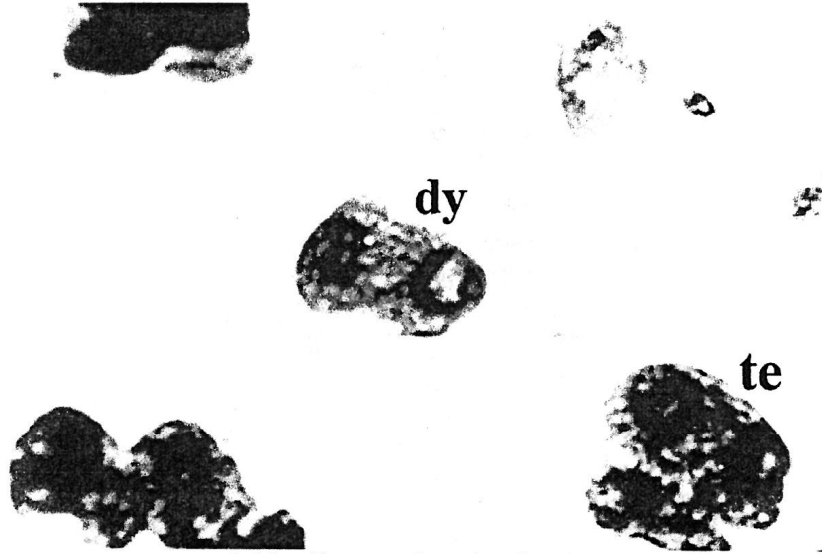
Morfolojik özelliklerine göre 6 grupta toplanan ve tanımları materyal ve metot bölümünde verilen tomurcuk gelişme aşamalarından, 1 no'lu aşamaya ait anterlerde yapılan gözlemlerde sadece mikrospor ana hücrelerine rastlanmıştır. Diploid yapıdaki bu hücrelerin, koyu bir hücre çeperine ve yine koyu renkli boyanan iri bir hücre çekirdeğine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 1). İkinci aşamadaki tomurcukların anterlerinde mikrosporların dyad ve tetrat döneminde bulunduğu görülmüştür (Şekil 2). Üçüncü aşamadaki tomurcukların anterlerinde ayrılmak üzere olan dört adet mikrospor içeren gelişmiş tetratlar ve tetrattan ayrılmak üzere olan fakat henüz serbest hale geçmemiş polenler görülmüştür (Şekil 3). Dördüncü aşamadaki

tomurcukların anterlerinden hazırlanan örneklerde henüz serbest hale geçmemiş genç polenlerin tek çekirdekli aşamada veya 1. polen mitozunda oldukları saptanmıştır (Şekil 4). Beşinci ve altıncı gruptaki anterlerde serbest hale geçmiş genç polen tanelerinin bulunduğu görülmüştür (Şekil 5). Abak (1983) biberde 3.6-4.0 mm çapındaki tomurcuklarda yer alan anterleri kullandığını, Novak (1974) 4.5 mm çapındaki, Çiner ve Tıprıdamaz (2002) ise 5 mm çapındaki tomurcukların anterlerini kullandıklarını bildirmektedir. Bu çalışmada IV. grupta yer alan 4.53 mm çapındaki tomurcukların polen mitozu aşamasında olduğu saptanmıştır. Tomurcuk büyüklüğünün çeşitler, yetiştirme koşulları ve bitki yaşına göre değişiklik gösterebileceği bildirilmekte ise de elde edilen sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Buradan biber bitkisi için tomurcuk çapının iyi bir kriter olduğu sonucu da çıkarılabilir. Oysa domateste Summers ve ark. (1992) mikrospor gelişim safhasını belirlemede, tomurcuk uzunluğunun, seçimden önce herhangi bir kesim işlemi gerektirmediği için, kullanımının daha kolay olduğunu ancak anter uzunluğunun tomurcuk uzunluğuna göre daha iyi bir kriter olduğunu açıklamışlardır. Biberde anterler domateste olduğu gibi tüp halinde olmadığı için anter uzunluğunu almak pek kullanışlı bir yöntem olarak görünmemektedir.

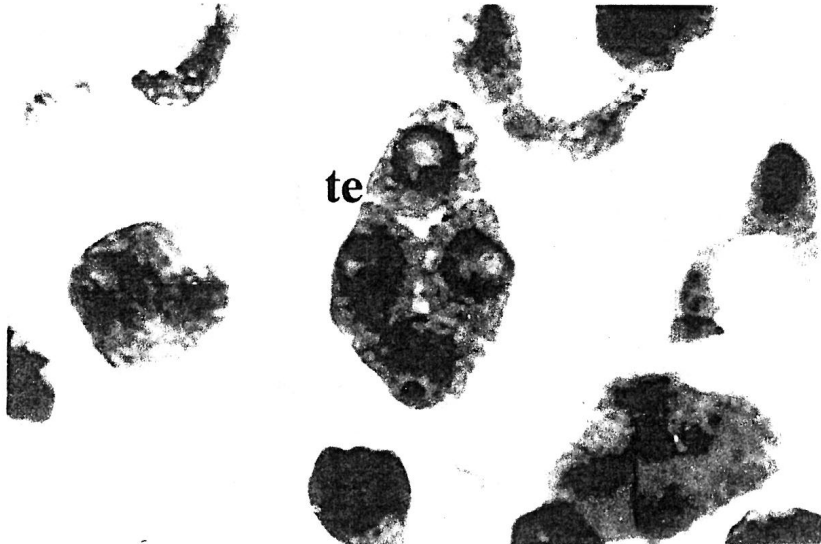
Dunwell ve Perry (1973) bitkilerin yaşlanmasıyla birlikte uygun dönemde görünen tomurcuklardaki anterlerde mikrospor ve genç polen taneciklerinin heterojen bir karışım halinde bulunduğu söz etmektedir. Genotip, bitki yaşı, tomurcuğun bitki üzerinde bulunduğu yer ve mevsimin etkisi sonucu tomurcuk büyüklüğü ile mikrospor gelişim safhası arasında ilişki kurmaya yönelik çabaların sınırlı başarı sağlamasına sebep olmaktadır. Bu nedenle polen gelişim aşamalarını incelemek ve tomurcuk morfolojisi ile polen gelişim safhası arasında ilişki kurabilmek için sitolojik gözlemler yapmak gerekmektedir. Bu amaçla asetokarmin ile boyama, ethidium bromid, DAPI gibi çekirdek DNA'sını boyama, parafin kesitlerin hematoksilen, fibrin gibi boyalarla boyanarak sitolojik olarak inceleme



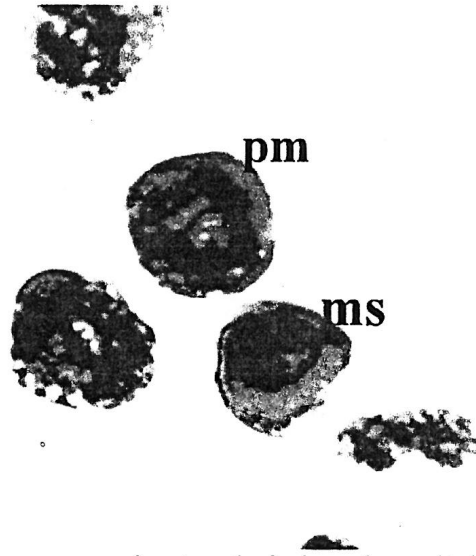
Şekil 1. Mikrospor ana hücreleri. k:konnectif, end: endothecium, ma: mikrospor ana hücresi (x10, orijinal).



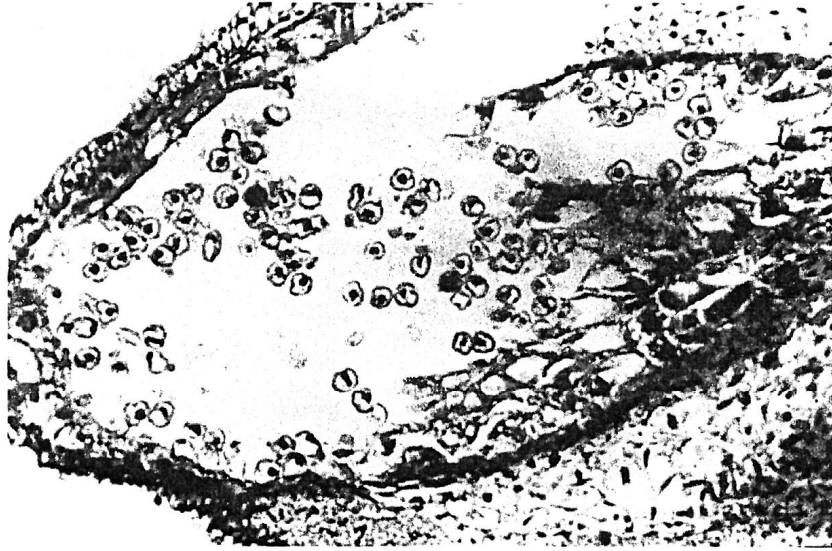
Şekil 2. Dyad ve tetrat aşamasındaki mikrosporlar. dy: dyad te: tetrat safhasındaki mikrosporlar. (X20, orijinal).



Şekil 3. Tetrat aşamasındaki mikrosporlar. te:tetrat ((X20, orijinal).



Şekil 4. Henüz serbest hale gelmemiş genç polen tanelerinde polen mitozu aşaması.ms:Tek çekirdekli genç polen tanesi pm: polen mitozu. (X40, orijinal).



Şekil 5. Serbest hale geçmiş polenler (X10, orijinal).

yöntemleri kullanılabilir. Bu yöntemlerin herbirinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Asetokarmin ve DNA boyama yöntemleri oldukça hızlı hazırlanabildiğinden zaman açısından oldukça avantajlıdır (Samancı ve ark, 1998). Ancak Ellialtıoğlu ve ark. (2001) bu boyaların insan sağlığı açısından dikkatle kullanılması gereken maddeler olduğunu vurgulamışlardır. Parafin yöntemi ile elde edilen görüntüler net ve güvenilir sonuçlar vermesine karşın uygulamada preparatların hazırlanmasının uzun zaman alması yöntemin dezavantajıdır. Nitekim Ellialtıoğlu ve ark. (2001) herhangi bir bitki türü ile ilk kez anter kültürü çalışması yapılacak ise parafin yöntemi kullanılarak

mikrosporogenesis aşamalarının saptanması işlemini faydalı bulmakta, laboratuvar çalışmaları sırasında ise taze anter materyalinin kontrol edilmesi amacıyla asetokarmin ile boyayarak ezme preparat yapılmasının pratik bir yol olacağını bildirmektedirler.

Kaynaklar

- Abak, K. 1983. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid bitki Elde Etme Üzerinde Araştırma. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı, 33 (1-4):155-163.
- Brooks, M.R. 1950. Plant Microtechnique Manual. Depart.Pom.Univ. California, Davies, 65s.
- Çiner, D:Ö. ve Tıpırdamaz, R., 2002. The Effects of Cold Treatment and Charcoal on the In Vitro Androgenesis of Pepper (*Capsicum annuum*

- L.).Turk J.Bot.26:131-139.
- Çömlekçioğlu, N., Büyükalaca, S and Abak, K. 2001. Effect of Silver Nitrate on haploid Embryo Induction by Anther Culture in pepper (*Capsicum annuum* L.).XIth Meeting on genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant.)-9-13 April, 2001, Antalya Turkey.
- Dunwell, J.M. and Perry, E. 1973. The Influence of in vivo Growth Conditions of N. Tabacum Plants on the in vitro Embryogenetic Potential of Their Anthers. John Innes Inst. Rep., 64:69-70.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K., 2001. Haploid Bitki Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi I. Ed.Babaoğlu, M.; Gürel, E.; Özcan, S. S.Ü. Vakıf Yayınları, 137-189.
- Gönülşen, N. 1987. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Uygulama Alanları. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enst. Müd. Yayın No:78, 116s.
- Karakullukçu, Ş. ve Abak, K. 1993. Patlıcanda Anter Kültürü Üzerinde Araştırmalar: I. Elverişli Tomurcuk Gelişim Döneminin Belirlenmesi. Doğa-Tr.J.of Agricultural and Forestry, 17(1993):801-810.
- Kristiansen, K. and Andersen, S.B., 1993. Effects of Donor Plant Temperature, Photoperiod and age on Anther Culture Response of *Capsicum annuum* L. Euphytica. 67:105-109.
- Luna, L.G. 1984. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. American Registry of Pathology. 235s.
- Novak, F.J., 1974. Induction of Haploid Callus in Anther Cultures of *Capsicum* sp. 2.pflanzenzücht 72:46-54.
- Qin, X. And Rotino, G.L., 1993. Anther Culture of Several Sweet and Hot Pepper Genotypes. Capsicum and Eggplant Newsletter. 12:59-62.
- Ray, I.M. and Tokach, M.K., 1992. Cytology of 2n pollen formation in diploid crested wheatgrass, *Agropyron cristatum*. Crop Science. 32:1361-1365.
- Samancı, E.N., Kurum, R., Boyacı, F. ve Biner, B. 1998. Anter Kültürü Çalışmaları İçin Elverişli Tomurcuk Safhasının Saptanmasında Kullanılacak Boyama Yöntemi.2 Sebze Tarımı Sempozyumu, 28-30 Eylül, Tokat1998. 157-162.
- Sibi, M., Dumas De Vaul, R. and Chambonnet, B., 1979. Obtention De Plantes Haploides Par Androgenese İn Vitro Chez Le Piment (*Capsicum annuum* L.). Ann. Amel. Plantes 29:583-606.
- Summers, W.L., Jaramillo, J and Bailey, T., 1992. Microspore Development Stage and Anther Length Influence the Induction of Tomato Anther Callus. HortScience 27(7):838-840.
- Vagera, J., 1990. Pepper (*Capsicum* spp.): In Vitro Induction of haploids. Biotechnology in Agriculture and Forrestry. 12:374-392. Berlin: Springer Verlag.