

KURUTMALIK KIRMIZI BİBERLERDE ANDROGENESİS YOLUYLA *IN VITRO* HAPLOİD EMBRİYO UYARTIMI*

Gülat ÇAĞLAR

KSÜ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü – Kahramanmaraş- Türkiye

Veysel ARAS

Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü - İçel-Türkiye

Arife BAYRAM

Tarımsal Araştırma Enstitüsü - Adana – Türkiye

Özet

Kahramanmaraş kırmızı biberlerinde (*Capsicum annuum* L.) yürütülen bu çalışmada androgenesis yoluyla *in vitro* haploid embriyo oluşturma amaçlanmıştır. Taç yaprakları açmamış biber çiçek tomurcukları içerisinden çıkarılan tek çekirdekli polen aşamasındaki anterler önceden hazırlanmış MS besin ortamlarına dikilerek belirli sıcaklık ve ışık rejimi altında kültüre alınmışlardır. Anterlerden doğrudan embriyogenesinin sağlanması amacıyla besin ortamlarına büyüme düzenleyicilerden oksinlerden NAA (2.0, 4.0, 6.0 mg/l) ve 2,4-D (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) ile sitokininlerden BAP (0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mg/l) ve kinetin (0.1, 1.0, 5.0 mg/l) ilave edilmiştir. Ayrıca besin ortamlarına aktif kömür (% 0.25) ve AgNO₃ (10 mg/l) ilave edilerek denenmiştir. Farklı hormonal içerikli besin ortamları üzerinde kültüre alınan anterlere yedi gün süre ile (1) 4 °C (karanlıkta), (2) 29 °C (karanlıkta), (3) 35 °C (karanlıkta) olmak üzere 3 farklı ön sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmada anterlere farklı oksin-sitokinin, aktif kömür ve AgNO₃ içeren besin ortamları ile değişik ön sıcaklık uygulamalarından oluşan toplam 37 uygulama yapılmıştır. Araştırma süresince toplam 9750 anter dikilmiş ve bazı ortamlarda anterlerde yalnızca kallus gelişimi olurken, MS + 0.1mg/l BAP + 4 mg/l NAA + % 0.25 aktif kömür + 10 mg/l AgNO₃ bileşimli besin ortamına dikilen anterlerde hiç kallus gelişimi olmadan % 2.8 oranında haploid embriyo gelişimi sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biber, *Capsicum annuum* L., *In vitro*, Androgenesis, Haploid embriyo.

In vitro Haploid Embryo Induction via Androgenesis in Hot Pepper

Abstract

The aim of this study was to obtain *in vitro* haploid embryos within the Kahramanmaraş red peppers (*Capsicum annuum* L.) via androgenesis. The anthers, at the stage of uninucleate microspore excised from the unopened buds, placed onto the MS media and kept under the certain temperature and light. In order to induct direct embryogenesis through the anthers, a range of oksin (2.0, 4.0, 6.0 mg/l NAA and 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l 2,4-D) and cytokinin (0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mg/l BAP and 0.1, 1.0, 5.0 mg/l kinetin) were added. Activated charcoal (0.25 %) and AgNO₃ (10 mg/l) were also included in the media. The following three different temperature pre-treatments were applied to cultured anthers for a week: control, 4 °C, 29 °C and 35 °C (without illumination). During the course of this research, a total of 37 treatments including different concentrations of oksin-cytokinin, activated charcoal and temperature pre-treatments were applied. A total of 9750 anthers were cultured and some did produce callus. The anthers (327 in number) cultured on a media composed of MS+0.1mg/l BAP +4mg/l NAA + 0.2 % aktivated charcoal + 10 mg AgNO₃ did not produce callus; however 9 embryos were developed from 3 anthers. With this media, the embryo/anther rate was 2.8 %.

Keywords: Pepper, *Capsicum annuum* L., androgenesis, *in vitro*, haploid embryo

1. Giriş

Toz ve pul biber yapımında kullanılan, ülkenin iç gereksinimini sağladığı gibi dışsattımı da yapılan ve adını aldığı il ile adeta özdeşleşmiş olan Kahramanmaraş kırmızı biberinin yetiştiriciliğindeki en önemli sorunlardan biri yetiştirilen biberlerin çeşit niteliğinde olmayıp genetik

bakımdan karışık populasyon halinde bulunmasıdır. Bu durum göz önüne alınarak mevcut materyalden yola çıkılıp standart çeşitlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Klasik yolla yapılacak bir ıslah çalışmasında bu amaca ulaşılabilmesi çok uzun süre almaktadır. Biberde *in vitro* anter

*: Bu araştırma TÜBİTAK-TOGTAĞ / TARP-2024 No'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

veya mikrospor kültürleri kullanılarak androgenesis yoluyla haploid bitkiler elde edilmekte ve bazı kimyasallarla bu haploidler “doubled haploid” duruma getirilerek, 2-3 yıl gibi kısa bir sürede, ıslah programlarında yer alacak olan mutlak homozigot hatlar sağlanabilmektedir. Abak (1986), biberde ıslah süresinin kısaltılması için anter kültürü yöntemini önermiş ve klasik yöntemlerle 5-6 yıl süren kendilenmiş hat elde etme süresinin bir yıla indirilebileceğine dikkat çekmiştir.

Biberde anter kültürü ve bitki regenerasyonu ile ilgili ilk çalışmayı yapan Wang ve ark. (1973), tek çekirdekli, mikrosporlu safhadaki anterleri, bazı mikroelementler ve vitaminlerle modifiye edilmiş ve kinetin ile NAA veya 2-4 D ilave edilmiş MS ortamında *in vitro* kültüre alarak kallustan haploid bitkicikler geliştirmişlerdir. Biber türlerinde *in vitro* anter kültürü yoluyla haploid bitkilerin rejenerasyonu ile ilgili araştırmalar günümüze kadar uzanmaktadır (George ve Narayanaswamy, 1973; Kao ve ark. 1973; Sibi ve ark., 1979; Dumas de Vault ve ark., 1981; Abak, 1984; Morrison ve ark., 1986a; Mityko ve ark. 1995; Ochoa-Alejo ve Ramirez Malagon, 2001).

Çeşitli araştırmacılar biberde *in vitro* androgenesisin başarısını etkileyen başlıca faktörlerin donör bitkilerin yaşı (Mityko ve ark. 1995), yetiştirme koşulları (Kristiansen ve Andersen, 1993), tomurcuk ve mikrosporların gelişim safhası (Saccardo ve Devreux 1974; Sibi ve ark., 1979; Gonzales-Melendi ve ark., 1996), ön inkubasyon uygulaması (Dumas de Vault ve ark., 1982; Morrison ve ark., 1986b; Munyan ve ark., 1989), besin ortamlarının bileşimi (Novak, 1974; Wang ve ark., 1981; Abak, 1984; Vagera ve Havranek, 1985; Munyan ve ark., 1989; Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Gyulai ve ark., 2000) ve genotipler (Wang ve ark., 1981; Abak, 1984; Morrison ve ark., 1986b; Mityko ve ark. 1995; Dolcet-Sanjuan ve ark., 1997; Ochoa-Alejo ve Ramirez Malagon, 2001) olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde yerli biber genotipleri üzerinde ilk kez Abak (1984) tarafından başlatılan anter kültürü çalışmaları halen sürdürülmektedir (Boyacı, 2001; Tıpırdamaz ve Ellialtıoğlu, 2002; Ercan ve Biner, 2002;

Çiner ve Tıpırdamaz, 2002). Çömlekçiöğlü ve ark. (1999), bazı yerli biber populasyonlarında yaptığı anter kültürü çalışmalarında, bitki gelişimini düzenleyicilerden NAA ve BAP'ın besin ortamlarında birlikte kullanılmasının ve kültürün ilk haftasında +35°C sıcaklık uygulamasının olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Çömlekçiöğlü ve ark. (2001)'nin Urfa ve Kahramanmaraş biberlerinde yaptıkları anter kültürü çalışmasında, 4 mg/l NAA, 0.1 mg/l BAP, % 0.25 aktif kömür içeren MS temel besin ortamına AgNO₃ ilave edildiğinde androgenik embriyolar elde edilebildiğini, tomurcukların embriyo oluşturma oranının genotiplere göre değiştiğini ve Urfa genotiplerinde tomurcukların % 50'sinin, buna karşın Kahramanmaraş genotiplerinde tomurcukların ancak % 7.5'inin embriyo oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ellialtıoğlu ve ark. (2001a), Kahramanmaraş biber genotiplerinde yaptıkları anter kültürü çalışmasında iki farklı besin ortamının ve ortamlara eklenen aktif kömür ile havuç ekstraktının embriyogenesis üzerine önemli bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, Kahramanmaraş kırmızı biberlerinde (*Capsicum annuum* L.) androgenesis yoluyla *in vitro* haploid embriyo oluşturma üzerine farklı oksin ve sitokin kombinasyonlarının etkisi araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak Kahramanmaraş kırmızı biberi olarak bilinen ve pul biber yapımında kullanılan populasyon niteliğindeki biber (*Capsicum annuum* L.) bitkilerinin anterleri kullanılmıştır. Araştırma 1999-2001 yılları arasında üç yıl sürmüştür.

Açık tarla koşullarında yetiştirilen ve mayıs ayının ortalarından itibaren çiçeklenmeye başlayan bitkilerden çiçek tomurcukları henüz açmadan toplanarak laboratuvara getirilmiştir. Burada taç yaprakları açmamış ve kaliks ile korolla aynı seviyede ya da korollanın kaliksden 1-2 mm uzun olduğu safhada bulunan tomurcuklar ayrılarak denemede kullanılmış, bu

dönemden daha erken ya da daha geç gelişme safhasında olan tomurcuklar atılmıştır.

Çiçek tomurcukları, 1-2 damla Tween-20 ilave edilmiş % 15'lik NaOCl içerisinde 15 dakika bekletilerek yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. NaOCl içerisinde steril kabine alınan tomurcuklar 15 dakikalık dezenfeksiyon süresi sonunda üç kez steril saf sudan geçirilerek dezenfektanın tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Steril kağıt havlu arasına alınan tomurcuklar hafifçe kurulandıktan sonra pens ve bistüri yardımıyla açılmış ve içerisinde anterler dikkatlice, zedelenmeden çıkarılmıştır. Anterlerden açık yeşil (kültür için erken safhada) veya koyu mor (kültür için geç safhada) renk almış olanlar ayrılarak atılmış, uç kısımları çok hafif menekşe rengi (eflatun) alan anterler ayrılarak filamentleri bir bistüri yardımıyla kesilip uzaklaştırıldıktan sonra önceden hazırlanıp sterilize edilmiş besin ortamları üzerine dorsal kısmı besin ortamlarına temas edecek şekilde dikilmişlerdir. Dikimden sonra hemen kapakları kapatılan petriyelerin kenarları şeffaf folyo ile sarılarak dışardan herhangi bir bulaşıklık olması önlenmiştir.

Petri kapları içerisindeki ortamlara dikilen anterler, ön sıcaklık şoku uygulandıktan sonra, 3600 Lux cool day light floresan ile aydınlatılan, 16/8 saat aydınlık/karanlık olmak üzere ışık rejiminde, 25±1°C sıcaklıkta iklim odasında 8-10 hafta bekletilmişlerdir.

Eksplantların kültüre alınmasında makro ve mikro besin elementleri ile vitaminleri içeren Murashige ve Skoog (1962) (MS) temel besin ortamı kullanılmıştır. Ayrıca MS ortamına 100 mg/l myo-inositol, karbon kaynağı olarak 30 g/l sakkaroz ve ortam katılaştırıcı olarak da 8 g/l agar ilave edilmiştir. Anterlerden doğrudan embriyogenesinin sağlanması amacıyla büyüme düzenleyicilerden oksin ve sitokinler kullanılmıştır. Oksinlerden NAA (2.0, 4.0, 6.0 mg/l) ve 2,4-D (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l) ile sitokinlerden BAP (0.1, 1.0, 2.0, 3.0 mg/l) ve kinetin (0.1, 1.0, 5.0 mg/l) denenmiştir. Oksin ve sitokinlerin farklı kombinasyonları oluşturularak besin ortamlarına katılmıştır. Ayrıca aktif kömür

(% 0.25) ve çalışmanın son aşamasında 10 mg/l AgNO₃ besin ortamlarına ilave edilmiştir.

Hazırlanan besin ortamlarına agar ilave edilmeden önce ortamın pH'sı 5.8'e ayarlanmıştır. Besin ortamları otoklavda 121°C'de, 1.5 Atm. basınç altında 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra steril kabin içerisinde petri kaplarına dökülmüştür. Kapakları kapatılarak kenarları şeffaf folyo ile sarılan bu petriyeler, kullanılıncaya kadar kısa süreli olmak üzere (8-10 gün) buzdolabında muhafaza edilmişlerdir.

Kültür aşamasında eksplantların gelişimleri her hafta periyodik olarak incelenerek anterlerdeki kallus oluşumu ile doğrudan embriyogenes belirlenmiştir.

3. Bulgular

Mayıs ayının ikinci yarısından ekim ayı sonuna kadar sürdürülen I. yıl çalışmalarında başlangıçta MS temel besin ortamına oksin ve sitokinlerden BAP (1-2-3mg/l) ve NAA (2-4 mg/l)'nın farklı kombinasyonları ve % 0.25 gr/l aktif kömür ilave edilerek denenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda oksin-sitokin kombinasyonları ilave edilen MS besin ortamı üzerinde kültüre alınan anterlere yedi gün süre ile (1) 4°C (karanlıkta), (2) 29°C (karanlıkta), (3) 35 °C (karanlıkta) olmak üzere ön sıcaklık şokları uygulanmış, ön uygulama yapılmayanlar kontrol olarak kullanılmıştır. Ön uygulama sonrası anterlerin içinde bulunduğu petriyeler 25 ± 1°C olan iklim odasına alınırken ön sıcaklık uygulaması yapılmayan anterler doğrudan iklim odasına alınmıştır.

Farklı besin ortamı kompozisyonları, ön sıcaklık şokları, her uygulamada kullanılan anter sayıları ve anterlerin *in vitro* kültürde verdiği tepkiler Çizelge 1'de sunulmuştur. Çizelge 1'de görüldüğü gibi bu gelişme dönemi içerisinde toplam 3153 adet anter *in vitro* kültüre alınmış ve yapılan ön uygulamalar ile besin ortamlarına ilave edilen farklı oksin ve sitokin kombinasyonlarının doğrudan embriyogenesiste başarı sağlayamadığı gözlenmiştir. Ancak 56 anterde kallus oluşumu gözlenmiştir. Steril koşullarda

Çizelge 1. Farklı Hormon Kombinasyonları İçeren Besin Ortamlarına Dikilen ve Farklı Ön Uygulamalar Yapılan Anterlerin Kallus veya Doğrudan Embriyo Oluşturmaları.

Kullanılan Besin Ortamı + Hormon Kombinasyonları + Ön Uygulamalar	Dikilen anter sayısı (adet)	Kallus oluşturan anter sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Toplam embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturma oranı (%)
1- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA +	227	37		-	-
2- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + 4 °C ön sıcaklık şoku	185	1		-	-
3- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + 29°C ön sıcaklık şoku	174	17	-	-	-
4- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + 35°C ön sıcaklık şoku	652	-	-	-	-
5- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + % 0.25 aktif kömür + Ön uygulamasız	306	-	-	-	-
6- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + % 0.25 aktif kömür+ 4°C ön sıcaklık şoku	171	-	-	-	-
7- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + 29°C ön sıcaklık şoku	558	1	-	-	-
8- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + % 0.25 aktif kömür + 35°C ön sıcaklık şoku	364	-	-	-	-
9- MS + 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA + 35°C ön sıcaklık şoku	225		-	-	-
10- MS + 3 mg/l BAP + 2 mg/l NAA + 35°C ön sıcaklık şoku	291	-	-	-	-
TOPLAM	3153	56	-	-	-

anterlerden bir bistüri yardımıyla alınarak bitkiye dönüştürülmek üzere MS ortamına aktarılan bu kalluslar gelişmelerine bir süre devam etmiş daha sonra kahverengileşerek sürgün oluşturma özelliğini kaybetmişlerdir.

Yukarıda belirtilen ön uygulama ve besin ortamlarında anterlerden haploid embriyo ve bitki eldesi sağlanamaması üzerine önceki besin ortamlarına ilave edilen oksin ve sitokinlerde değişiklikler yapılarak NAA yanında 2,4-D de denenmiş, kültürler sadece 35 °C ön sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Kullanılan oksin ve sitokin konsantrasyonlarına göre 14 farklı ortam hazırlanmıştır. Bu ortam kompozisyonları, dikilen anter sayıları, embriyo ve kallus oluşumu ile ilgili bulgular Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelge 2'den de görüleceği gibi toplam 3367 adet anter *in vitro* kültüre alınmıştır. Anterlerden 284'ü kallus oluştururken doğrudan embriyogenesiste olumlu tepki alınamamıştır.

Bu kalluslar oluşumlarından yaklaşık 30 gün sonra, steril koşullarda anterlerden bir bistüri yardımıyla alınarak bitkiye dönüştürülmek üzere MS ortamına

aktarılmışlardır. Kallusların MS ortamı üzerindeki gelişmeleri bir süre devam etmiştir. Bunlardan 3 tanesinde bitki oluşumu başlangıcına benzer yapıda tüysü gelişmeler görülmüş, ancak tam bir bitkiye dönüşmeden kahverengileşme-kararma başlamış ve bir süre sonra canlılıklarını yitirmişlerdir.

1999 yılı çalışmalarında MS temel besin ortamına ilave edilen oksinlerden NAA ve 2,4-D'nin doğrudan embriyogenesiste başarı sağlayamadığı, ön sıcaklık uygulamalarından da bu yolda net bir tepki alınmadığı, aktif kömür ilavesinin kallus oluşumunu baskı altına aldığı ancak embriyogenesis üzerine olumlu bir etki sağlamadığı gözlenmiştir.

Çalışma 2000 yılında yinelenmiş ancak önceki dönemlerde kullanılan besin ortamlarında anterlerden doğrudan embriyogenesis sağlanamaması nedeniyle bu dönemde daha önceki besin ortamlarına ilave edilen oksin ve sitokinlerde değişiklikler yapılmıştır. Besin ortamlarına daha önce kullanılmamış olan kinetin (0.5-0.1-5mg/l) ilave edilerek, NAA (0.1-1-4 mg/l) ve 2,4-D (0.1-1-4mg/l) ile farklı

Çizelge 2. Farklı Hormon Kombinasyonları İçeren Besin Ortamlarına Dikilen Anterlerin Kallus veya Doğrudan Embriyo Oluşturmaları.

Kullanılan besin ortamı + Hormon kombinasyonları	Dikilen anter sayısı (adet)	Kallus oluşturan anter sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Toplam embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturma oranı (%)
1- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA	562	53	-	-	-
2- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA+ % 0.25 aktif kömür	143	-	-	-	-
3- MS + 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA	246	18	-	-	-
4- MS + 3 mg/l BAP + 2 mg/l NAA	291	23	-	-	-
5- MS + 2 mg/l BAP + 6 mg/l NAA	155	20	-	-	-
6- MS + 3 mg/l BAP + 6 mg/l NAA	152	20	-	-	-
7- MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D	231	-	-	-	-
8- MS + 1 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D	314	9	-	-	-
9- MS + 1 mg/l BAP + 3 mg/l 2,4-D	251	54	-	-	-
10- MS + 1 mg/l BAP + 4 mg/l 2,4-D	170	-	-	-	-
11- MS + 2 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D	247	23	-	-	-
12- MS + 2 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D	112	17	-	-	-
13- MS + 2 mg/l BAP + 3 mg/l 2,4-D	331	30	-	-	-
14- MS + 2 mg/l BAP + 4 mg/l 2,4-D	162	17	-	-	-
TOPLAM	3367	284	-	-	-

Kombinasyonları denenmiştir. MS ortamlarına 3 farklı kinetin konsantrasyonunun tek başına veya NAA ya da 2, 4-D'nin değişik konsantrasyonları ile kombine edilerek katılmasıyla 21 farklı besin ortamı oluşturulmuştur (Çizelge 3).

Farklı hormon kombinasyonları içeren besin ortamları ve yedi gün süre ile 35°C ön sıcaklık uygulaması yapıldıktan sonra bu ortamlara dikilen anterlerin sayısı, embriyo ve kallus oluşturmaları ile ilgili bulgular Çizelge 3'de verilmiştir.

Kültüre alınan anterlerin *in vitro* koşullardaki gelişmelerinde anterlerden doğrudan embriyo oluşumu gözlenmemiştir. Kinetin ile birlikte NAA ve 2,4-D'nin kombine edildiği ortamlarda yine kallus oluşturma eğilimi gözlenirken, kinetin tek başına kullanıldığı ortamlarda kallus meydana gelmemiştir (Çizelge 3). NAA ve 2,4-D'nin kombinasyonlarında düşük ya da yüksek konsantrasyonda olmalarının anterlerden kallus oluşturulmasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Yüksek konsantrasyonlarda kallus oluşturma

eğiliminde olan bu oksinlerin kinetin tarafından dengelenerek bu etkinin ortaya çıkmasını engellediği söylenebilir.

2001 yılında yinelenen çalışmada, önceki iki yılda elde edilen sonuçlar ve bu konuda başka araştırmacılar tarafından yapılan son araştırmalar da dikkate alınarak tüm kültürlerde, 0.1 mg/l BAP ve 4 mg/l NAA içeren MS temel besin ortamına 10 mg/l AgNO₃, 2 g/l aktif kömür ilave edilerek hazırlanmış ortamlar kullanılmıştır.

Bu dönem içerisindeki çalışmada kullanılan ortamlar, dikilen anter sayıları, kallus oluşumu, doğrudan embriyogenesis ile ilgili bulgular Çizelge 4'de sunulmuştur.

Toplam 327 adet anter besin ortamı üzerine dikilmiştir. Petriler içerisinde kültüre alınan anterler 25 ±1 °C 'de 5-6 gün iklim odasında tutulduktan sonra 5 gün süreyle 35 °C' lik yüksek sıcaklık şokuna maruz bırakılmıştır. Anterler daha sonra yeniden iklim odasında 25±1°C'de tutulmuşlardır. Anterlerin *in vitro* gelişmelerinde ilk kez doğrudan embriyo oluşumu sağlanırken kallus oluşturma eğilimi gözlenmemiştir.

Kültüre alınan anterlerin 3'ünde doğrudan embriyo oluşumu izlenmiş ve bu anterlerden toplam 9 adet embriyo gelişmiştir. Embriyoların birinde kısa bir kökcük ve hipokotil gelişmiş, ancak hormonsuz MS ortamına aktarılmasına rağmen sürgün geliştirememiş ve tam bir bitkiye dönüşmede başarısız olmuştur.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada denenen tüm oksin ve sitokin kombinasyonlarında anterlerin uzun süre canlılığını muhafaza etmesi,

anterlerin uygun gelişme safhasında (tek çekirdekli polen gelişme döneminin sonu I. mitoz başlangıcı) kültüre alındığını ve bu dönemin tomurcukların ve anterlerin dış görünüşlerine bakarak tespit edilebileceğini göstermektedir. Bu durum Abak (1984), Çömlekçioğlu ve ark. (1999) ile Ercan ve Biner (2002) tarafından da belirtilmiştir.

Ön sıcaklık uygulamalarının ve oksin-sitokin kombinasyonlarının genotiplere göre optimize edilmesi gerektiği, bunun özellikle kallus oluşturmada, doğrudan embriyogenesis için önemli olduğu görülmüştür. Bu bulgu Dumas de Vaultx ve

Çizelge 3. Farklı Hormon Kombinasyonları İçeren Besin Ortamlarına Dikilen Anterlerin Kallus veya Doğrudan Embriyo Oluşturmaları.

Kullanılan besin ortamı + Hormon kombinasyonları	Dikilen anter sayısı (adet)	Kallus oluşturan anter sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Toplam embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturma oranı (%)
1- MS + 0.5 mg/l kinetin	133	-	-	-	-
2- MS + 1 mg/l kinetin	149	-	-	-	-
3- MS + 5 mg/l kinetin	137	-	-	-	-
4- MS + 0.5 mg/l kinetin + 0.1mg/l NAA	179	-	-	-	-
5- MS + 0.5 mg/l kinetin + 1 mg/l NAA	294	25	-	-	-
6- MS + 0.5 mg/l kinetin + 4 mg/l NAA	189	-	-	-	-
7- MS + 1 mg/l kinetin + 0.1 mg/l NAA	140	-	-	-	-
8- MS + 1 mg/l kinetin + 1 mg/l NAA	155	5	-	-	-
9- MS + 1 mg/l kinetin + 4 mg/l NAA	139	12	-	-	-
10- MS + 5 mg/l kinetin + 0.1 mg/l NAA	131	-	-	-	-
11- MS + 5 mg/l kinetin + 1 mg/l NAA	115	4	-	-	-
12- MS + 5 mg/l kinetin + 4 mg/l NAA	120	-	-	-	-
13- MS+ 0.5 mg/l kinetin +0.1mg/l 2,4-D	126	15	-	-	-
14- MS + 0.5 mg/l kinetin + 1 mg/l 2,4-D	155	4	-	-	-
15- MS + 0.5 mg/l kinetin + 4 mg/l 2,4-D	151	-	-	-	-
16- MS + 1 mg/l kinetin + 0.1 mg/l 2,4-D	130	15	-	-	-
17- MS + 1 mg/l kinetin + 1 mg/l 2,4-D	129	27	-	-	-
18- MS + 1 mg/l kinetin + 4 mg/l 2,4-D	124	-	-	-	-
19- MS + 5 mg/l kinetin + 0.1 mg/l 2,4-D	115	9	-	-	-
20- MS + 5 mg/l kinetin + 1 mg/l 2,4-D	122	1	-	-	-
21- MS + 5 mg/l kinetin + 4 mg/l 2,4-D	104	-	-	-	-
TOPLAM	2903	117	-	-	-

Çizelge 4. Farklı Hormon Kombinasyonları İçeren Besin Ortamlarına Dikilen Anterlerin Kallus veya Doğrudan Embriyo Oluşturmaları.

Besin ortamları + hormon kombinasyonları	Dikilen anter sayısı (adet)	Kallus oluşturan anter sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Toplam embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturma oranı (%)
MS + 0.1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + % 0.2 aktif karbon + 10 mg AgNO ₃	327	-	3	9	2.8
TOPLAM	327	-	3	9	2.8

ark. (1980)'ları ile uyumludur. Ayrıca, sürekli yüksek sıcaklıkta tutulan anterlerde embriyo gelişim oranının yüksek olduğuna Terzioğlu ve ark. (2000) dikkat çekmektedir.

Etilen inhibitörü olarak bilinen AgNO₃'ün bu çalışmada da olumlu sonuç vermesi etilen üretiminin Kahramanmaraş biberinde doğrudan embriyogenesiste önemli rol oynadığını göstermektedir. Birçok araştırmacı da AgNO₃'ün bu etkisine işaret etmiştir (Evans ve Batty, 1994; Hyde ve Phillips, 1996; Çömlekçiöğlü ve ark. 2001).

Anter kültürlerinde genotip etkisinin kültüre tepki vermede en önemli faktörlerden biri olduğuna bu konuda çalışma yapan tüm araştırmacılar dikkat çekmektedir (Pierik, 1987; Veilleux, 1994; Trigiano ve Gray, 1996; Reynolds, 1997). Yerli genotiplerde anter kültürü çalışması yapan Çömlekçiöğlü ve ark. (2001) ile Ellialtıoğlu ve ark. (2001a) da anter kültürüne tepkilerinin Kahramanmaraş genotiplerinde öteki genotiplere göre oldukça düşük olduğunu belirtmektedirler. Terzioğlu ve ark. (2000) Kahramanmaraş biber genotiplerinde en yüksek embriyo oluşum oranının 4.8 olduğunu belirterek elde edilen embriyoların bitkiye dönüşüm oranlarının çok düşük düzeyde kaldığını bildirmişlerdir. Ellialtıoğlu ve ark. (2001b) besin ortamları ve inkubasyon koşullarının optimize edilmesinin androgenetik başarıda genotipten kaynaklanan olumlu ya da olumsuz tepkiyi ortadan kaldıramayacağını vurgulamıştır.

Sonuç olarak Kahramanmaraş kırmızı biberlerinde doğrudan embriyogenesiste sadece 0.1 mg/l BAP + 4 mg/l NAA + % 0.2 aktif karbon + 10 mg AgNO₃ bulunduran MS ortamına dikilen anterlerde meydana gelmiş ve embriyo oluşturma oranı % 2.8 olmuştur. Bu oranın yükseltilmesindeki başarının artırılması için, anter kültürüne kolay tepki vermeyen genotipler olduğu bu araştırmada da ortaya konulmuş olan Kahramanmaraş kırmızı biber genotipleri için yöntemin optimize edilmesi çalışmalarına devam edilmesi gerekmektedir. Ayrıca, bu araştırma kapsamında denenmemiş olan, ortamın CO₂ ile periyodik olarak zenginleştirilmesi, anterlerin ön sıcaklık uygulanmaksızın

sürekli yüksek sıcaklıkta tutulması, etilen üretiminin inhibe edilmesinde Ag₂(SO₃)'ın da denenmesi, kültür başlangıcında kısa süreli "starvation" kültürü yapılması, çift fazlı kültürlerin kullanılması gibi bazı uygulamaların araştırılması, standart biber anter kültürü prosedürüne kolay tepki vermeyen Kahramanmaraş kırmızı biberi genotipinde yararlı olabilir.

Kaynaklar

- Abak, K. 1984. Biberde (*Capsicum annuum* L.) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Bitki Elde Etme Üzerinde Araştırma. *Ank Üniv. Zir Fak. Yıllığı-1983*, Cilt:33, Fasikül 1-2-3-4'den Ayrı Basım.155-163.
- Boyacı, H.F. 2001. The Effects of Different Culture Media Added Activated Charcoal on Production of Haploid Plant via Anther Culture of Pepper. (*Capsicum annuum* L.). XI.th Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant, April 9-13, Antalya, Turkey, 137-141.
- 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, 14-17 Eylül 1999, Ankara, 897-901.
- 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, 2001, Antalya, Turkey, 133-136.
- Dolcet-Sanjuan, R., Clavera, E., Huerta, A. 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L. – Effect of Carbohydrate and Carbon Dioxide Enrichment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122(4): 468-475.
- Dumas De Vault, R., Chambonnet, D., Porchard, E. (1981). Culture *in vitro* D'anthères De Piment (*Capsicum Annuum*): Amelioration Des Taux D'obtention De Plantes Chez Différents Genotypes Par Traitments A +35 °C. *Agronomie*, 1:859-864.
- Ellialtıoğlu, Ş., Kaplan, F., Abak, K. 2001a. The Effects of Carrot Extract and Activated Charcoal on The Androgenesis of Pepper. XI.th. Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant, April 9-13, 2001, Antalya, Turkey, 142-145.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K. 2001b. Haploid Bitki Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi, Cilt 1, Ed.: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., S.Ü.Vakfi Yayınları, 137-189.
- Ercan, N., Biner, Ş. B. 2002. Farklı Irilikteki Biber Tomurcuklarında Polen Gelişme Döneminin Belirlenmesi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, Cilt:15, Sayı:1, 53-59.

- Evans, J.M., Batty, N.P. 2002. Ethylene Precursors and Antagonists Increase Embryogenesis of *Hordeum vulgare* L. Anther Culture. *Plant Cell Reports*, 13:676-678.
- George, L., Narayanaswamy, S. 1973. Haploid *Capsicum* Through Experimental Androgenesis. *Protoplasma*, 78:467-470.
- Gyulai, G., Gemesne, J. A., Sagi, Zs., Venezel, G., Pinter, P., Kristof, Z., Törjek, O., Heszky, L., Bottka, S., Kiss, J., Zatyko, L. 2000. Doubled Haploid Development and PCR-Analysis of F1hybrid Derived Dh-R2 Paprika (*Capsicum annuum* L.) Lines. *J. Plant Physiol.* 156:168-174.
- Hyde, C., Phillips, G.C. 1996. Silver Nitrate Promotes Shoot Development and Plant Regeneration of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.) via Organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 32:72-80.
- Kristiansen, K., Andersen, S.B. 1993. Effects of Donor Plants Temperature, Photoperiod, and Age on Anther Culture Response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 67:105-109.
- Kuo, J.S., Wang, Y.Y., Chien N.F., Ku, S.J., Kung, M.L., Hsu, H.C. 1973. Investigation on The Anther Culture *in vitro* of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. *Acta Bot Sinica*, 15:43-47.
- Morrison, R.A., Koning, R.E., Evans, D.A. 1986a. Pepper. In: Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.E. (Eds.), *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol.4., New York Macmillan, 552-575.
- Morrison, R.A., Koning, R.E., Evans, D.A. 1986b. Anther Culture of Interspecific Hybrid of *Capsicum*. *J. Plant Physiol.* 126:1-9.
- Munyon, I.P., Hubstenberger, J.F., Phillips, G.C. 1989. Origin of Plantlets and Callus Obtained from Chile Pepper Anther Cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 25:293-296.
- Mytiko, J., Andrasfalv, A., Csillery, G., Fari, M. 1995. Anther-Culture Response in Different Genotypes and F1 Hybrids of Pepper *Capsicum annuum* L. *Plant Breed.*, 114: 78-80
- Novak, F.J. 1974. Induction of a Haploid Callus in Anther Cultures of *Capsicum spp.* *Z.Pflanzenzüchtg*, 72:46-54.
- Ochoa-Alejo, N., Ramirez-Malagon, R. 2001. *In vitro* Chili Pepper Biotechnology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37(6):701-729.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhof Publishers, Netherlands, P.344.
- Reynolds, T. L. 1997. Polen Embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33: 1-10.
- Saccardo, F., Devreux, M. 1974. *In vitro* Production of Plantlets from Anther Culture of *Capsicum annuum* L. Proc. of Eucarpia: Genetics and Breeding of *Capsicum*, Budapest, 45-49.
- Sibi, M., Dumas De Vault, R., Chambonnet, D. 1979. Obtention De Plantes Haploides Par Androgenese *in vitro* Chez Le Piment (*Capsicum annuum* L.). *Ann Amelior. Plantes*, 29:583-606.
- Terzioğlu, Ş., Elialtoğlu, Ş. Abak, K. 2000. İnkubasyon Koşullarının Biber Anther Kültüründe Embriyo Oluşumu Üzerine Etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu 11-13 Eylül 2000, Isparta, 223-238.
- Tıprıdamaz, R., Elialtoğlu, Ş., 2002. Soğuk Uygulamaları ve Aktif Kömürün Biberde (*Capsicum annuum* L) Anther Kültürü Süresince Absizik Asit Miktarındaki Değişim Üzerine Etkisi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt:15, Sayı:1, 9-18.
- Trigiano, R. N., Gray, D. 1996. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, New York.
- Vagera, J., Havranek, P.1985. *In vitro* Induction of Androgenesis in *Capsicum annuum* L. and Its Genetic Aspects. *Biol Plant*, 27:10-21.
- Vagera, J. 1990. Pepper (*Capsicum spp.*). *In vitro* Induction of Haploides. In: Bajaj, Y.P.S., Ed., *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 12374-392, Springer.
- Veilleux, R.E. 1994. Development of New Cultivars via Anther Culture. *Hortscience*, Vol.29(11), 1238-1241.
- Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C., Chien N.F. 1973. The Induction of The Pollen Plantlets of *Triticale* and *Capsicum annuum* L. from Anther Culture. *Sci. Sinica*, 16:147-151.
- Wang, Y.Y., Kuo, J.S., Li, C.L., Chiang, C.R. A 1981. Preliminary Report on The Study of Pollen Plants of Sweet Peppers (*Capsicum annuum* L. var. Grossum Bell.) Proc. Symposium on Plant Tissue Culture. Boston., p 243.