

BİBERDE (*Capsicum annuum* L.) FARKLI YÖNTEMLERİN MİKROSPOR EMBRİYOGENESİS ÜZERİNE ETKİSİ

Buse ÖZDEMİR ÇELİK^{1*}, Ahmet Naci ONUS²

¹Dr., Akdeniz Üniversitesi, Elmalı MYO, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Antalya; ORCID: 0000-0002-5108-8124

²Prof. Dr., Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya; ORCID: 0000-0001-8615-1480

ÖZ

Bu çalışmada ‘Erciyes F₁’ ve ‘Benino F₁’ biber çeşitleri kullanılarak ıslah amaçlarına uygun özelliklere sahip double haploid (DH)biber hatları elde edebilmek için etkili androjenik yöntemin belirlenmesi amacıyla üç farklı androjenik yöntem (anter, shed-mikrospor, mikrospor) karşılaştırılmıştır. Anter kültüründe anterler 4 mg l⁻¹ NAA 0.5 mg l⁻¹ BAP, %0.25 aktif kömür, 30 g l⁻¹ sakkaroz ve 15 mg l⁻¹ AgNO₃ içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Shed-mikrospor kültürü protokolünde ise %2 maltoz, %1 aktif kömür, %0.6 agar eklenmiş katı NN ortamı ve %2 maltoz, 2.5 µM Zeatin ve 5 µM IAA eklenmiş sıvı NN ortamından oluşan çift katmanlı kültür ortamı kullanılmıştır. Shed-mikrospor kültüründe petri kapları ilk bir hafta boyunca (1) 9°C (karanlık) ve (2) 32°C (karanlık) olmak üzere iki farklı ön sıcaklık uygulamasına tabi tutulmuştur. Mikrospor kültüründe ise izole edilen mikrosporlar sıvı NLN ortamı içerisinde kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda her iki çeşitten de anter kültürü protokolünden herhangi bir embriyo oluşumu meydana gelmemiştir. Mikrospor kültüründe ise sporofit bölünmeler gözlemlenmiş ancak bunlardan herhangi bir embriyo oluşumu meydana gelmemiştir. Shed-mikrospor kültüründen ise her iki çeşitte de embriyo ve bitki elde edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile bu çeşitlerde haploid embriyo ve bitki gelişimi için shed-mikrospor kültürü yönteminin daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biber, mikrospor kültürü, anter kültürü, shed-mikrospor kültürü, haploid

EFFECTS OF DIFFERENT METHODS ON MICROSPORE EMBRYOGENESIS IN PEPPER (*Capsicum annuum* L.)

ABSTRACT

This study aimed to establish an effective technique by comparing three different androgenic methods (anther, shed-microspore and isolated microspore culture) using ‘Erciyes F₁’ and ‘Benino F₁’ pepper varieties. In anther culture, anthers were cultured in MS medium containing 4 mg l⁻¹ NAA, 0.5 mg l⁻¹ BAP, 0.25% activated charcoal, 30 g l⁻¹ sucrose and 15 mg l⁻¹ AgNO₃. In the shed-microspore culture protocol, a double-layer culture medium consisting of 2% maltose, 1% activated charcoal, 0.6% agar added solid NN medium and 2% maltose, 2.5 µM Zeatin and 5 µM IAA added liquid NN medium was used. In shed-microspore culture, anthers in petri dishes were subjected to two different pre-temperature treatments as (1) 9°C (dark) and (2) 32°C (dark) during the first week. In microspore culture, isolated microspores were cultured in liquid NLN medium. In the anther culture studies embryo development and plant regeneration could not be obtained. In the microspore culture, some microspores were effectively induced to divide by the stress treatment and microspores with three or more cells were determined but these multicellular structures did not show any growth. According to the shed-microspore culture results were evaluated, although there were differences according to the genotypes embryos and plantlets were obtained from all genotypes. As a result, it was determined that the shed-microspore culture method was more successful in embryo and plant development from microspores in these varieties.

Keywords: Pepper, microspore culture, anther culture, shed-microspore culture, haploid

GİRİŞ

Biber (*Capsicum annuum* L.), *Solanaceae* ailesinin *Solanum* cinsine ait diploid (2n=2x=24) bir tür olup; gerek ülkemizde gerekse dünyada ekonomik değeri yüksek olan sebzeler içerisinde yer alan ve üzerinde yoğun ıslah çalışmaları yapılan önemli bir sebze türüdür. Biber geniş bir tip ve çeşit zenginliğine sahip olup, sahip olduğu bu tür ve tip zenginliği sayesinde çiğ, pişmiş, sos, salça, kurutulmuş,

konserve edilmiş olmak üzere farklı şekillerde değerlendirilmektedir [50]. Dünyada üretimi 36 milyon ton üzerinde olan biber, Türkiye’de önemli sebzeler içinde yer almakta ve dünya biber üreticisi ülkeleri arasında ülkemiz üçüncü sırada yer almaktadır. Ülkemizin biber üretimi 2015 yılında 2.191.000 ton iken, 2020 yılında 2.636.905 ton üretim miktarına ulaşmıştır [3]. Biber ıslah çalışmalarında biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı, yüksek verimliliğe ve gelişmiş meyve kalitesine sahip

*Sorumlu yazar / Corresponding author: buse@akdeniz.edu.tr

yeni çeşitler oluşturmak için modern ıslah yöntem ve tekniklerine ihtiyaç duymaktadır.

Double haploid (DH) tekniği ile elde edilen saf hatlar bitki ıslahçıları tarafından tek bir generasyonda homozigot hatlar üretmek için kullanılır ve tamamen homozigot yapıları nedeniyle paha biçilmez bir ıslah materyalidir. DH bitkileri üretmek için farklı teknolojiler arasında biber ıslahında kullanılan *in vitro* teknikler arasında en önemlisi mikrospor embriyogenesis tekniğidir [38]. Mikrospor embriyogenesis henüz olgunlaşmasını tamamlamamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterlerin *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla anter kültürü, bu mikrosporların anterlerden izole edilerek somatik dokular olmaksızın doğrudan sıvı bir ortamda *in vitro* koşullarda kültüre alınmasıyla mikrospor kültürü ve anterlerin çift fazlı besin ortamlarda kültüre alındığı shed-mikrospor kültür yöntemi ile yapılmaktadır. Haploidi çalışmalarının başlangıç yıllarında ağırlıklı olarak anter kültürü kullanılmış olmakla birlikte devam eden yıllarda mikrospor kültürü tercih edilen yöntem haline gelmiştir. Mikrospor kültürü anter kültürüne göre daha karmaşık bir yöntem olmasına karşılık genellikle tercih edilen bir yöntemdir. Mikrospor kültürü anter kültürünün bazı olumsuz özelliklerini ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir ve çeşitli avantajlar sunmaktadır [17].

Capsicum cinsi ile ilgili olarak ilk haploidler *C. annuum* ve *C. frutescens* ait genotiplerin kullanıldığı anter kültürü çalışmalarından bildirilmiştir [18, 34, 66, 44]. Bu erken çalışmalarda anter kültüründen elde edilen bitki rejenerasyonun düşük olması üzerine sonraki araştırmalarda mikrospor embriyogenesis indüksiyonunu etkileyen faktörleri belirlemek üzerine araştırmalar yapılmıştır. Yapılan birçok araştırma sonucunda androjenik yanıtın; donör bitkinin genotipi, büyüme koşulları ve yaşı [2, 14, 20, 33, 43], mikrosporların gelişim aşaması [6, 46, 51], kültür ortamı, büyüme düzenleyicileri, organik ve inorganik katkı maddelerinin konsantrasyonu ve kombinasyonu [7, 48, 56, 64, 68] ve çiçek tomurcuklarının ve/veya anterlerin ön muamelesi [23, 25, 30, 49] gibi birçok faktöre bağlı olduğu bildirilmiştir. Biber anter kültürü ile yapılan çok sayıda çalışmaya rağmen, yöntemin etkinliği hala düşüktür [22]. Bu nedenle günümüzde shed-mikrospor kültürü [62, 63] ve mikrospor kültürü [27, 28] gibi biberde farklı DH bitki üretim yöntemlerini geliştirmeye yönelik birçok araştırma yapılmaktadır.

DH bitkileri elde etmek için alternatif yöntemlerden biri olan shed-mikrospor kültürü çift katmanlı bir ortam ile anter kültür sistemine

dayanmaktadır. Supena vd. [62] tarafında Endonezya acı biberinde geliştirilen bu sistemde, anterler bir süre sıvı faz üzerinde yüzerler ve daha sonra mikrosporlar büyüdükçe ve ayrılmaya uğradıkça, açılıp mikrosporlarını ortama bırakırlar. Bu sistemde mikrosporlar mekanik olmayan bir şekilde izole edilir [58].

Biberde haploid ve DH bitkileri elde etme yöntemlerinden bir diğeri mikrospor kültürüdür. Bu yöntemi kullanarak, Kim vd. [27] daha yüksek embriyo ve bitki rejenerasyonuna (4 bitki/çiçek tomurcuğu) yol açan mikrospor kültürü için bir protokol bildirmiştir. Bu çalışmada biberde mikrosporlardan embriyogenesisi olumlu etkileyen üç temel faktör olarak; 32°C’de sakaroz içermeyen açlık ortamında mikrosporların stress uygulaması, sakaroz ile desteklenmiş NLN ortamından modifiye edilmiş NLNS kültür ortamı ve 8×10^4 - 10×10^4 ml’de optimal mikrospor yoğunluğu bildirilmiştir. Lantos vd. [37], biber anterlerini buğday yumurtalıkları ile birlikte kültüre alarak mikrospor kültürü yöntemini optimize etmişler ancak rejenerasyon sıklığı Kim vd. [27] göre daha düşük (0.0 ila 1.25 bitki/petri kabı) gerçekleşmiştir. Daha sonra tatlı biberde yapılan çalışmalar ile kültür ortamı, bitki büyüme düzenleyicileri ve katkı maddelerinin optimizasyonu yoluyla mikrospor kültürünün etkinliğini arttırmayı amaçlamıştır [8, 38]. Biberde ıslah çalışmalarında double haploid teknolojisinin kullanılmasını kısıtlayan en büyük etken, biberde diğer birçok türe nazaran bu türe özgü ıslah programlarında farklı genotipler için rutin olarak uygulanacak etkin ve güvenilir bir yöntemin hala geliştirilmemiş olmasıdır. Biberde mikrospor embriyogenesis yoluyla haploid ve DH bitkilerin oluşumuna yol açan bu üç yöntem geniş bir genotip yelpazesine uygulanamamaktadır. Niklas-Nowak vd. [43] aynı genotipe ait tek tek bitkilerde bile farklı androjenik yanıt oranları belirlemiştir. Parra-Vega vd. [52] ve Arı vd. [4] anter kültürü ile karşılaştırıldığında, shed-mikrospor yaklaşımıyla daha yüksek bir embriyo yüzdesi elde etmiştir. Kim vd. [28] tarafından yapılan çalışmada ise acı biber genotiplerinde izole edilmiş mikrosporlardan oluşan iki aşamalı bir kültür sisteminin, sıvı ve çift katmanlı kültüre kıyasla kotiledon embriyoları üretmek için daha etkili olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde biberde yapılan çalışmaların çoğunluğunda anter kültürü yöntemi kullanılmakla birlikte, düşük verimlilik ve genotipten bağımsız bir sistem için etkin bir protokolün henüz geliştirilmemiş olması gibi olumsuzluklardan dolayı istenilen düzeyde değildir. Bu amaçla, bu çalışmada iki biber çeşidinde ıslah amaçlarına uygun özelliklere sahip DH biber hatları elde edebilmek için en etkili androjenik yöntemin belirlenebilmesi amacıyla üç

farklı androjenik yöntem (anter, mikrospor, shed-mikrospor) karşılaştırılmıştır.

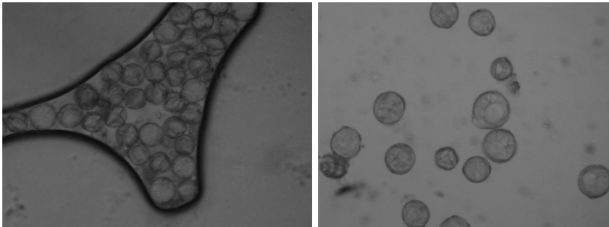
MATERYAL VE METOT

Bitkisel Materyal

Bitkisel materyal olarak örtüaltı yetiştiriciliğine uygun “Erciyes F₁” ve “Benino F₁” biber çeşitleri kullanılmıştır. Bitkiler her genotip için 20 adet olmak üzere serada toprağa dikilmiştir. Yapılan çalışmalarda donör bitkilerde çiçek tomurcuğu oluşumunun başlamasıyla uygun aşamadaki mikrosporları içeren tomurcuklar sabah saatlerinde falkon tüplere toplanarak buz kutusu içerisinde doku kültürü laboratuvarına getirilmiştir.

Metot

•Uygun Tomurcuk Aşamasının Belirlenmesi: Mikrospor embriyogenesis yoluyla haploid bitki elde etmek için ilk olarak sitolojik gözlemlerle uygun aşamadaki mikrosporları bulunduran tomurcuklar seçilmelidir. Çalışmada biberde anter ve mikrospor kültürü çalışmalarında genel kabul gören vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polen aşamalarını içeren tomurcuk ve anterler belirlenmiştir (Şekil 1). Çalışmada kullanılan biber çeşitleri için, doğru aşamadaki mikrosporları içeren tomurcuk büyüklüklerini tanımlayabilmek amacıyla, morfolojik ve sitolojik çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmada Parra-Vega vd. [51] biberde yaptıkları çalışmalardan faydalanılarak mikrospor gelişim aşamaları tetrat, genç mikrospor, mid-mikrospor ve vakuol mikrospor; genç polen, mid-polen ve olgun polen olmak üzere 7 grupta incelenmiştir. Anter, shed-mikrospor ve mikrospor kültürü çalışmalarında bahsedilen mikrospor aşamasındaki anterler kullanılmıştır ve tomurcuklar morfolojik görünümüne göre toplanmıştır.



Şekil 1. Işık mikroskobu altında biberde vakuol mikrosporve genç çift çekirdekli poleneait görünüm

Figure 1. The appearance of vacuolated microspores and young bicellular pollen in pepper under light microscope

•Sterilizasyon: Besin ortamlarının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu: Shed-mikrospor kültürü ve mikrospor kültüründe kullanılacak sıvı besi ortamlarının sterilizasyonu steril kabin içerisinde 0.22 µm poroziteli filtreler kullanılarak yapılmıştır. Anter kültürü ve embriyolardan bitki rejenerasyonu için kullanılan katı besi ortamlarının sterilizasyonu otoklavda 20 dakika boyunca 1.5 atm basınçta 121°C’de tutularak gerçekleştirilmiştir.

•Tomurcukların Dezenfeksiyonu: Uygun mikrospor aşamasını içeren tomurcukların dezenfeksiyonu steril kabin içerisinde ilk olarak %70’lik etil alkolde 30 saniye süreyle bekletildikten sonra %10’luk ticari sodyum hipoklorit içerisinde 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 3 kez steril distil su ile durulanarak dezenfekte edilmiştir. Yıkanan tomurcuklardan steril bistüri ve pens yardımı ile anterler çıkarılmıştır.

•Anter Kültürü Çalışmaları: Gelişimin uygun aşamasındaki anterler belirlendikten sonra anter kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla biberde anter kültüründe Taşkın vd. [65] tarafından önerilen 4 mg l⁻¹ NAA, 0.1 mg l⁻¹ BAP, %0.25 aktif kömür 15 mg l⁻¹ AgNO₃, %3 sakkaroz, pH 5.8, içeren MS [40] ortamında anterler kültüre alınmış ve 35°C’de 2 gün karanlıkta bekletildikten sonra 35 gün boyunca 25°C’de karanlıkta inkübe edilmiştir. 35. gün sonunda anterler %3 sakkaroz içeren MS ortamına transfer edilmiştir.

•Shed-Mikrospor Kültürü Çalışmaları: Shed-mikrospor kültürü çalışmalarında Supena vd. [62] tarafından Endonezya tipi acı biberler için geliştirdiği ve çift fazlı ortam kullanılmıştır. Bu çift fazlı kültür ortamının katı ve sıvı fazının ikisinde de besin ortamı olarak Nitsch ve Nitsch (NN) [42] ortamı kullanılmıştır. Katı besin ortamı NN ortamına, %2 oranında maltoz, %1 oranında aktif karbon ve %0.6 agar (Duchefa) eklenerek, sıvı besin ortamı ise NN ortamına ve %2 oranında maltoz ve 2.5 µM zeatin ile 5 µM indole-3-asetik asit (IAA) büyüme düzenleyici kombinasyonları ilave edilerek hazırlanmıştır. Çalışmada ilk olarak biber tomurcukları 4°C’de bir gün bekletmiştir. Tomurcukların bir günlük ön uygulama işleminden sonra anterler katı ortam üzerine ekildikten sonra, petrinin kenarından sıvı besin ortamı eklenerek çift fazlı ortamda kültüre alınıp bir hafta 9°C ve ardından 28°C sürekli ve karanlık ortamda inkubasyon koşullarına maruz bırakılmıştır. Shed-mikrospor kültürü çalışmalarında ayrıca Lantos vd. [37] tarafından bildirilen 32°C’de 7 günlük ön uygulama yapılmış ve ardından 25°C karanlık ortamda inkubasyon koşullarına maruz bırakılmıştır.

•**Mikrospor Kültürü Çalışmaları:** Mikrospor kültürü için uygun mikrospor gelişim aşamasındaki mikrosporları içeren tomurcuklardan anterler çıkarılarak mikrosporların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Anterler ezilerek mikrosporların serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra elde edilen mikrospor süspansiyonu 40 µm'lik elekten geçirilmiştir. Bu işlem sonunda mikrosporların çok büyük bir bölümü süspansiyon oluşturacak şekilde alttaki beherde toplanmıştır. Mikrosporların izolasyonu esnasında somatik dokuların parçalanmasından dolayı ortama salınan ve mikrospora zarar verebilecek olan fenolik maddelerin bu süspansiyondan uzaklaştırılması amacıyla mikrospor süspansiyonları santrifüj tüplerine alınıp mikrosporların çökmesini sağlamak üzere 870 rpm'de 5 dakika süreyle 3 kez santrifüjleme işlemine tabi tutulmuştur. Her seferinde izolasyon ortamı ve mikrosporların safiyeti yükseltilmiş ve üçüncü yıkama sonrasında mikrosporlar, mikrospor yoğunluğu ve mikrosporların canlılıklarının tespit edilmesi için 3 ml sıvı içine alınmıştır. Mikrosporların belli bir yoğunlukta kültüre alınmaları gerekmektedir. Bu amaçla thoma lamında sayım yapılarak mikrospor yoğunluğu 200.000 mikrospor/ml olarak ayarlanmıştır. Mikrospor kültüründe Kim vd. [27] tarafından bildirilen protokole göre mikrosporlar ilk olarak ön uygulamaya maruz bırakılmış ve daha sonra NLN [35] ortamı içinde kültüre alınmıştır. Petri kapları 25°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir.

•**Sitolojik Gözlemler:** Mikrospor kültüründe çekirdek bölünmeleri ve embriyonik gelişim gösteren mikrosporları incelemek için DAPI boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla mikrospor süspansiyonundan 200 µl alınarak 8000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen mikrospor peletine 10 µl DAPI solüsyonu eklenmiş ve floresans mikroskop altında inceleme yapılmıştır [10].

•**Bitki Rejenerasyonu:** Mikrospordan oluşan embriyoların bitkiye dönüşümünün sağlanması için hormon içermeyen 30 g l⁻¹ sakkaroz içeren MS ortamı kullanılmıştır. Ortam hazırlanırken pH'sı 5.8 olarak ayarlanmıştır ve katılaştırıcı olarak 7 g l⁻¹ agar kullanılmıştır. Embriyo gelişimi gözlemlendikten sonra, oluşan embriyolar hormon içermeyen MS ortamına aktarılmıştır. Petriler 16 saat ışık/8 saat karanlık olan ışık periyodu, 25°C sıcaklık, ortalama 3000 lüks ışık şiddetine sahip iklim odalarında bitki gelişimi gözlenene dek bekletilmiştir.

•**Sonuçların Değerlendirilmesi:** Çalışmada anterlerden elde edilen embriyo sayıları, embriyolardan elde edilen bitkicik sayıları kaydedilmiştir. Embriyo sayıları kültüre alınan anter

sayısına oranlanmış, bitkicik sayıları kültüre alınan anter ve embriyo sayılarına oranlanmış ve yüzde oranları hesaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Anter Kültürü Sonuçları

Çalışmada iki adet F₁ biber çeşidinden alınan çiçek tomurcuklarına ait anterler besin ortamına aktarılmıştır. Anterlerin besin ortamına aktarılmasından sonra anterlerin gelişmesi takip edilmiştir. Çalışmada anter kültürü sonuçlarına göre bu çeşitlerde kültürden yaklaşık 2 aydan itibaren genotip ve kullanılan protokole bağlı olarak androgenik başarı değerlendirilmiştir. Çeşitlerin anter kültürüne verdikleri tepkileri bakımından elde edilen sonuçlara göre her iki çeşitte de Taşkın vd. [65] tarafından bildirilen protokolden embriyo elde edilememiştir.

Anter kültürü çalışmalarında elde edilecek başarı üzerine birçok faktör etkilidir. Biberde anter kültüründe birden fazla faktörün kullanıldığı durumlarda uygulamalara bağlı olarak embriyo ve bitki oluşum oranları farklılıklar göstermiştir [14, 47]. Biberde anter kültürü çalışmalarında genotipe bağlı olarak ve aynı genotipin farklı besin ortamlarında embriyo ve bitkicik oluşum oranlarının farklı olduğu bildirilmiştir. Genotiplere göre değişen bazı uygulamalarda embriyo oluşumu yüksek olmasına rağmen, bitkiye dönüşüm oranları düşük kalmıştır [9, 67, 56, 30, 36]. Biberde anter kültürü çalışmalarında embriyo oluşumu ve haploid bitki elde edilmesinde genotipin önemli etkisi bulunmaktadır. Biber genotiplerinin bir kısmı anter kültürüne yanıt vermezken, yanıt veren genotiplerde de başarı oranının değiştiği araştırmacılar tarafından belirtilmektedir [6, 22, 23, 31, 56]. Mityko vd. [41], 11 biber genotipinin 'C' ortamında kültüre aldıkları çalışmada 2 genotipten herhangi bir embriyo gelişimi gerçekleşmezken diğer genotiplerin başarı düzeyinin değiştiğini, en başarılı genotipte 100 anterden 178.2 embriyo ve 75.8 bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir. Koleva-Gudeva vd. [32], 19 genotipten 12 tanesinin embriyo oluşturduğunu ve embriyo oluşum oranının %3.33 ile 50.55 arasında değiştiğini belirtmektedirler. Biberde 17 genotipin 'C' ortamında androgenik başarısını inceleyen Qin ve Rotino [54], androgenik başarının genotiplere göre farklılıklar gösterdiğini, ayrıca ortam bileşenlerine bağlı olarak genotiplerin tepkilerinin değiştiğini, belirtmektedirler. Bizim denememizde anter kültürü çalışmalarında kullanılan çeşitlerin bu protokole anter kültürüne yanıt vermediği belirlenmiştir.

Shed-mikrospor Kültürü Sonuçları

Shed-mikrospor kültürü çalışmalarında Supena vd. [62] tarafından Endonezya tipi acı biberler için geliştirdiği protokol kullanılmıştır. Çalışmamızda özellikle biberde acı ve tatlı çeşitlerin androgenesise verdiği farklı tepkiler olmasından dolayı Erciyes F₁ çeşidi acı; Benino F₁ tatlı biber çeşidi olarak seçilmiştir. Shed-mikrospor kültürü çalışmasında her bir çeşit için 150 adet anter kültüre alınarak 30'ar adet petride kültüre alma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu protokole kullanılan çeşitlerin her ikisinde de shed-mikrospor kültürü protokolünden embriyo gelişimi ve bitki elde edilmiştir (Çizelge 1). Ayrıca shed-mikrospor kültüründe petri kapları Supena vd. [62] tarafından bildirilen protokole göre 9°C'de 1 hafta karanlık ardından 28°C'de sürekli karanlık ön uygulamasına ilaveten; Lantos vd. [37] tarafından bildirilen protokole göre 32°C'de bir hafta karanlıkta bekletildikten sonra 25°C'de sürekli karanlıkta bekletilerek iki farklı ön sıcaklık uygulamasına tabi tutulmuştur. Kullanılan biber çeşitlerinde embriyojenik yanıtın test edilen iki ön sıcaklık uygulaması için genotipe bağımlı olduğu belirlenmiştir. Her iki çeşitte de 9°C'de 1 hafta karanlık ön uygulamasında %34 oranında embriyo gelişimi gözlenmiştir. Bununla birlikte Erciyes F₁ çeşidinde 32°C'de bir hafta karanlıkta ön uygulamaya maruz bırakıldığında embriyo oluşum oranı %48'e yükselmiştir. Benino F₁ çeşidinde ise 32°C'de bir hafta karanlıkta ön uygulamaya maruz bırakıldığında %10.66 oranında embriyojenik yanıt gerçekleşmiştir. Bu embriyolardan elde edilen bitki oranı ise sırasıyla Erciyes F₁ çeşidinde en yüksek %4.66 oranında 32°C'de bir hafta karanlıkta ön uygulamada elde edilirken; Benino F₁ çeşidinde ise 9°C'de 1 hafta karanlık ön uygulamasından (%7.84) elde edilmiştir.

Mikrosporların embriyogenesise doğru saptırılması stres uygulamalarını gerektirir [1, 5, 24]. Mikrosporları gametofit gelişimden sporofit gelişim aşamasına geçmesini uyarmak için birçok stres faktörü bildirilmiştir [39, 31]. Dolcet-Sanjuan vd. [11], biberde karanlıkta 7°C'de bir hafta boyunca anterlere stres uygulaması ile embriyogenesise uyarmışlardır. Supena vd. [62], kültürün ilk haftasında anterleri 9°C ile muamele ederek embriyojenik potansiyelin artırıldığını bildirirken, Koleva-Gudeva vd. [30], benzer bir etki bildirmemiştir. Sibi vd. [59] anter kültüre alınmasının ardından ilk 2 gün boyunca yüksek sıcaklık (35°C) uygulamasının, çiçek tomurcuklarının soğuk (4°C) ön işlemine kıyasla embriyogenesise daha verimli şekilde uyardığını bildirmiştir. Dumas de Vault vd. [12, 13] tarafından embriyo indüksiyonu için oldukça etkili bir yöntem geliştirilmiştir. Anterleri 8 gün

boyunca karanlıkta ısı şoku stresine (35°C) maruz bırakmışlar ve aynı sıcaklıkta daha kısa bir uygulama ile karşılaştırıldığında daha iyi tepki elde etmişlerdir. Bu ısı şoku uygulamasının anterlerden embriyo elde edilmesi üzerindeki etkinliği daha sonra başka araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır [29]. Literatürlerde bildirilen ve çalışmamızda genotiplere göre aynı protokole farklı sıcaklık ön uygulamalarında mikrospordan farklı oranlarda embriyo ve bitki gelişiminin elde edilmesi ile farklı stres uygulamaları altında optimal androjenik tepkinin genotipe bağlı olduğu düşünülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlardan, biberde mikrospor embriyogenesise indüklemek için kritik olarak tanımlanan faktörlerin, genotip cevabına bağlı olarak yukarıda belirtilen tüm diğer koşullarla dikkatli bir şekilde birleştirilmesi gerektiği açıktır.

Çizelge 1. Shed-mikrospor kültürüne ait sonuçlar

Table 1. Results of shed-microspore culture

Çeşit Genotype	Ön uygulama Pre- treatments	Petri sayısı (adet) Number of petri dishes	A1	E1	B1	E2	B2	B3
Erciyes F ₁	9°C	30	150	51	1	34	0.66	1.96
	32°C	30	150	72	7	48	4.66	9.72
Benino F ₁	9°C	30	150	51	4	34	2.66	7.84
	32°C	30	150	16	1	10.66	0.66	6.25

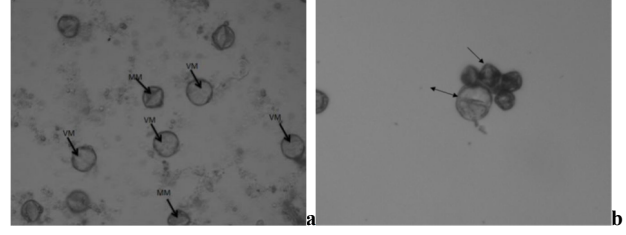
A1: Anter sayısı (Anther number), E2: Embriyo oluşum oranı (%) (Percentage of embryo), E1: Embriyo sayısı (Number of embryo), B2: Bitkicik oluşum oranı (%) (Percentage of embryo), B1: Bitkicik sayısı (Number of plantlets), B3: Embriyodan bitkicik oluşum oranı (%) (Percentage of plantlets from embryo)

Mikrospor Kültürü Sonuçları

Denemede Erciyes F₁ ve Benino F₁ çeşitlerinde Kim vd. [27] tarafından bildirilen protokole göre mikrospor kültürü denemeleri gerçekleştirilmiştir. Mikrospor kültürü yoluyla mikrosporların tüm gelişim süreci ışık ve flüoresans mikroskobu altında incelenmiştir. Gelişim süreçlerinin kullanılan protokole ve tüm çeşitlerde aynı olduğu tespit edilmiştir. Mikrospor kültürünün yapıldığı aşamada kültüre alınan mikrosporların çoğunluğu vakuol mikrospor veya genç çift çekirdekli polen aşamasındaydı. Stres uygulamalarına maruz kalan mikrospordan birçoğu hemen gelişimini durdurur ve/veya ölürken; herhangi bir morfolojik değişim göstermemiş ve başlangıçta kültüre alındığı halde kalmıştır. Diğer bazı mikrosporların ise stres uygulamaları ile etkili bir biçimde bölünmeleri uyarılmıştır (Şekil 3). Stres uygulamasının ardından 25°C'de bekletildiği kültürün ilk ikinci haftasında üç ve daha fazla hücreli mikrosporlar belirlenmiştir (Şekil 3). Denemede kullanılan tüm çeşitlerde ilk dört hafta boyunca bu çok hücreli yapıların mikropsor kültürü için kullanılan her iki protokole de herhangi bir gelişim göstermedikleri belirlenmiştir. Yaptığımız

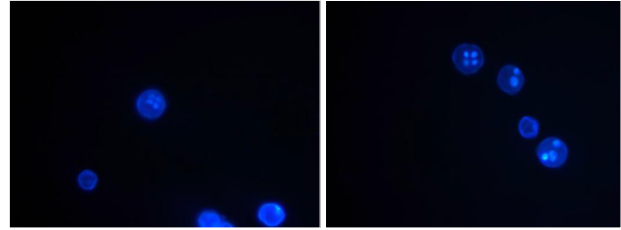
çalışma sonucunda kullanılan biber çeşitlerinde bu protokole göre mikrospor kültüründen embriyo ve bitkicik gelişimi sağlanamamıştır.

Mikrosporun bölünmesi ile oluşan sporofitik yapılar genellikle *B.napus* [68], buğday [21], arpa [52] ve tütünde [60] tespit edilmiştir. Tek çekirdekli mikrosporların gametofitik gelişimde, asimetrik olarak bölünmesiyle vejetatif ve generatif hücre meydana geldikten sonra sporofitlerin vejetatif hücrelerden oluşumu da yaygın olarak bildirilmiştir [16, 55, 61]. Generatif ve vejetatif çekirdeklerden oluşan çok çekirdekli yapılar *B.napus* [16], soya fasulyesi [25], buğday [55, 64], tritikale [19] ve biber [26] dahil olmak üzere çeşitli türlerde bildirilmiştir. Bu farklı gelişim modları genellikle eksplant kaynağı olarak kullanılan erkek gametofitin gelişim evresi ve stres uygulamalarına bağlı olarak türlere göre değişen frekanslarda aynı kültürde bir arada bulunabilir. Bizim çalışmamızda da biberde aynı kültür içerisinde hem generatif hem de vejetatif hücrelerin bölünmesi gözlemlenmiştir. Bu gelişim yollarının tümünün canlı embriyoların oluşumuna yol açıp açmadığı hakkında hala çok fazla bilgi mevcut değildir. Yaptığımız çalışma sonucunda kullanılan biber çeşitlerinde mikrospor kültüründen embriyo ve bitkicik gelişimi sağlanamamıştır. Biberde mikrospor kültürü üzerine yapılan çalışmalarda acı ve tatlı farklı biber genotiplerinde mikrospordan embriyogenesis ve bitki rejenerasyon sonuçları elde etmişler ve biberde ıslah çalışmaları için haploid bitkilerin üretiminde umut verici bir araç gibi görüldüğünü belirtmişlerdir [27, 28, 37, 38]. Ancak bizim çalışmamızda kullanılan biber çeşitlerinde herhangi bir embriyo ve bitki rejenerasyonu sağlanamamasına rağmen mikrospor kültüründe çekirdek bölünmesi ve çok çekirdekli yapıların oluşumunun uyartan bu protokolün haploid embriyo elde etmek ve elde edilen embriyolardan rejenerasyonunu sağlamak amacıyla sistematik olarak incelenmesi faydalı olacaktır. Biberde mikrospor kültürü ile yapılan çalışmalar genelde son yıllarda artmış olmakla birlikte, yeni protokollerin geliştirilmesine ve standart hale getirilmesine halen ihtiyaç duyulmaktadır. Geliştirilecek olan metotların ıslah programlarında farklı genotipler için rutin olarak uygulanacak etkin ve güvenilir bir teknoloji haline getirilmesi gerekmektedir. Böylece gelecek vaat eden bir teknik olan mikrospor kültürü üzerine yapılan çalışmalarda önemli bir boşluk doldurulmuş olacaktır. Bu mevcut çalışmanın da ileride bu yönde yapılacak çalışmalar için önemli bir kaynak olacağı ve diğer araştırmacılara yol göstereceği düşünülmektedir.



Şekil 2. a) Kültüre alınan vakuol mikrospor ve genç çift çekirdekli polen b) Sporofitik gelişim gösteren ve bölünen mikrosporların ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

Figure 2. a) Cultured vacuolated microspore and young bicellular pollen b) Light microscope image of sporophytic growing and dividing microspores



Şekil 3. Sporofitik gelişim gösteren ve bölünen mikrosporda dört ve daha fazla hücreli mikrosporların flouresans mikroskop altındaki görüntüsü

Figure 3. The image of microspores with three or more cells under a fluorescence microscope showing sporophytic development and dividing

Anter, Shed-mikrospor ve Mikrospor Kültürünün Karşılaştırılması

Çalışmamızda iki adet biber çeşidinin haploid performansları üzerine farklı androjenik yöntemlerin; anter kültürü, shed-mikrospor kültürü ve mikrospor kültürü; etkisi belirlenerek biber ıslahına öncülük edecek saf hatların elde edilmesinde etkili yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Deneme sonucunda anter ve mikrospor kültürü çalışmalarında kullanılan biber çeşitlerinden herhangi bir embriyo ve bitkicik gelişimi sağlanamamıştır. Yapılan çalışmalar sonucuna göre Erciyes F₁ ve Benino F₁ çeşitlerinde en yüksek embriyo gelişimi sırasıyla %48 ve %34 olarak shed-mikrospor kültürü protokolünden elde edilmiştir. Genotiplerin androjenik performansları üzerine kullanılan androjenik yöntemin (anter, shed-mikrospor, mikrospor) açık bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda kullanılan biber çeşitlerinde mikrospordan embriyo ve bitki gelişiminde shed-mikrospor kültürü yönteminin anter ve mikrospor kültürü yöntemine göre daha başarılı olduğu saptanmıştır. Supena vd. [62] tarafından bildirilen shed-mikrospor kültürü protokolünden embriyo ve bitki gelişimi farklı

araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [4, 15, 63]. Ari vd. [4] 48 süs biberi genotipinde çift fazlı ortam protokolünün oldukça başarılı olduğunu, Erim [15] yaptığı çalışmada üç farklı biber genotipinin shed-mikrospor kültürü tekniğine yatkınlıklarını incelemişlerdir ve yüksek oranda embriyo gelişimi meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada da biber çeşitlerinde en yüksek anrojenik performans shed-mikrospor kültüründen elde edilmiştir. Ayrıca shed-mikrospor kültürü çalışmasında aynı protokole farklı sıcaklık uygulamalarından genotipe bağlı olarak farklı embriyo ve bitkicik gelişimi elde edilmiştir. Bu mevcut çalışmanın da ileride shed-mikrospor kültürü üzerine biberde yapılacak çalışmalar için önemli bir kaynak olacağı ve diğer araştırmacılara yol göstereceği düşünülmektedir.

SONUÇ

Bu çalışma biberde üstün vasıflı yerli çeşitler elde edebilmek için gerekli ıslah çalışmalarının hızlı ve etkin bir şekilde yapılması için ıslah amaçlarına uygun özelliklere sahip DH biber hatları elde edebilmek için etkili androjenik yöntemin belirlenmesi amacıyla üç farklı androjenik yöntem (anter, shed-mikrospor, mikrospor) karşılaştırılması için yapılmıştır. Sonuç olarak, çalışma sonucunda kullanılan biber çeşitlerinde mikrospor embriyogenesis yoluyla mikrospordan embriyo ve bitkicik gelişimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda kullanılan biber çeşitlerinde embriyo ve bitki oluşumunda shed-mikrospor kültürü yönteminin anter ve mikrospor kültürü yöntemine göre daha başarılı olduğu saptanmıştır. Bu çalışma doğrultusunda biberde embriyo ve bitkicik elde edilmesinin genotipe ve kullanılan mikrospor embriyogenesis yöntemine bağlı olduğu, farklı protokollerle ve farklı biber tiplerinde başarı oranının artırılmasına yönelik yeni araştırmaların yapılması ile uygun protokollerin geliştirilerek ıslah programında yoğun şekilde kullanılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Ahmadian, P., Testillano, P.S., Gonzalez, P., Fadon, B., Prestamo, G., Jimenez-Duran, G., Risueno, M.C., 1998. Cell biology of the pollen developmental program and the induction of microspore embryogenesis in *Capsicum annuum* L. In: X Eucarpia meeting on genetics and breeding of Capsicum and eggplant, Avignon, France, pp:183-186.
2. Alremi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S., Ellialtıoğlu, Ş., 2014. Effect of genotype and nutrient medium on anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). Turk J. Agric. Nat. Sci. 1:108-116.
3. Anonim, 2022. <http://www.fao.com>.
4. Ari, E., Yildirim, T., Mutlu, N., Büyükalaca, S., Gökmen, Ü., Akman, E., 2016. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). Turkish Journal of Biology 40(4):944-954.
5. Barany, I., Gonzalez-Melendi, P., Fadon, B., Mityko, J., Risueno, M.C., Testillano, P.S., 2005. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. Biol Cell 9:709-722.
6. Barroso, P.A., Rêgo, M.M., Rêgo, E.R., Soares, W.S., 2015. Embryogenesis in the anthers of different ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes. Genet Mol Res 14:13349-13363.
7. Büyükalaca, S., Çömlekçioglu, N., Abak, K., Ekbiç, E., 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. 69:206-209.
8. Cheng, Y., Ma, R.L., Jiao, Y.S., Qiao, N., Li, T.T., 2013. Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). S. Afr. J. Bot. 88:306-309.
9. Comlekcioglu, N., Buyukalaka, S., Abak, K., 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). In: 11. Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Antalya, Turkey, pp:133-136.
10. Custers, J.B.M., 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). In: M. Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (Eds.): Doubled haploid production in crop plants: a manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. pp:185-194.
11. Dolcet-Sanjuan, R., Claveira, E., Huerta, A., 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L. effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. J Am. Soc. Hort. Sci. 122:468-475.
12. Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D., Pochard, E., 1981. *In vitro* anther culture in red pepper (*Capsicum annuum* L.): improvement of the rate of plant production in different genotypes by treatments at 35 C. Agronomie 1:859-864.
13. Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D., Sibi, M., 1982. Stimulation of *in vitro* androgenesis in

- pepper (*Capsicum annuum*) by elevate temperature treatments. In: Earle E, Demarly Y (eds) Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger Publication, New York, pp:92-98.
14. Ercan, N., Sensoy, F.A., Sensoy, A.S., 2006. Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). Sci. Hort. Amsterdam 110:16-20.
 15. Erim, F.B. 2019. Farklı biber (*Capsicum annuum* L.) genotipleri üzerinde shed-mikrospor kültürü tekniğinin uygulanması ve mikrospor gelişim aşamalarının belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya, 53s.
 16. Fan, Z., Armstrong, K., Keller, W., 1988. Development of microspores in vivo and in vitro in *Brassica napus* L. Protoplasma, 147:191-199.
 17. Ferrie, A.M.R., Caswell, K.L., 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tiss Organ Cult. 104:301-309.
 18. George, L., Narayanaswamy, S., 1973. Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. Protoplasma 78:467-470.
 19. Gonzalez, J., Jouve, N., 2005. Microspore development during in vitro androgenesis in triticale. Biol Plant, 49:23-28.
 20. Grozeva, S., Todorova, V., Cholakov, T., Rodeva, V., 2013. Effect of temperature and growth period of donor plants on pepper anther culture. In: 3. International Conference Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences. Lozenec, Bulgaria, pp:60-64.
 21. Indrianto, A., Barinova, I., Touraev, A., Heberle-Bors, E., 2001. Tracking individual wheat microspores in vitro: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. Planta, 212:163-174.
 22. Irikova, T., Grozeva, S., Rodeva, V. 2011-a. Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. Acta Physiol Plant 33:1559-1570.
 23. Irikova, T., Grozeva, S., Popov, P., Rodeva, V., Todorovska, E., 2011-b. In vitro response of pepper anther culture (*Capsicum annuum* L.) depending on genotype, culture medium and duration of cultivation. Biotechnol Biotech Eq 25:2604-2609.
 24. Jacquard, C., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Devaux, P., Baillieul, F., Clement, C., 2006. Plant defense mechanisms are triggered in the anther during the pre-treatment process. In: The international conference haploids in higher plants III, Vienna, Austria, 12-15 February 2006, 29p.
 25. Kaltchuk-Santos, E., Mariath, J.E., Mundstock, E., Hu, C.Y., Bodanese-Zanettini, M.H., 1997. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. Plant Cell Tiss Org. Cult., 49:107-115.
 26. Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D.I., Lee, K.M., 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). Plant Cell Tiss Org. Cult., 77:63-72.
 27. Kim, M., Jang, I.C., Kim, J.A., Park, E.J., Yoon, M., Lee, Y., 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Rep 27:425-434.
 28. Kim, M., Park, E.J., Lee, Y., 2013. High-quality embryo production and plant regeneration using a two-step culture system in isolated microspore cultures of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Tiss Org. Cult. 112:191-201.
 29. Koleva-Gudeva, L. 2003. The effect of incubation treatment on the pepper (*Capsicum annuum* L.) androgenesis. Institute of Southern Crops, Strumica, Yearbook, pp:87-94.
 30. Koleva-Gudeva, L., Spasenoski, M., Trajkova, F., 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media. Sci. Hort. 111:114-119.
 31. Koleva-Gudeva, L., Trajkova, F., Dimeska, G., Spasenoski, M., 2009. Androgenesis efficiency in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). Acta Hort. 830:183-190.
 32. Koleva-Gudeva, L., Trajkova, F., 2012. Anther culture of pepper: morphological characteristics of fruits of androgenetic pepper lines (*Capsicum annuum* L.). J. Res. Agric. 1:136-145.
 33. Koleva-Gudeva, L., Gulaboski, R., Janevik-Ivanovska, E., Trajkova, F., Maksimova, V., 2013. Capsaicin inhibitory factor for somatic embryogenesis in pepper anther culture. Electron J. Biol. 9:29-36.
 34. Kuo, J.S., Wang, Y.Y., Chien, N.F., Ku, S.J., Kung, M.L., Hsu, H.C., 1973. Investigations on the anther culture in vitro of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. Acta Bot. Sin. 15:47-52.
 35. Lichter, R., 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 105:427-434.
 36. Liu, F., Zhao, H., Chen, B., Zhang, Y.Y., 2007. Embryogenesis of microspore derived multicells in *Capsicum annuum* L. Fen Zi Xi Bao Cheng Wu Xue Bao 40:371-379.
 37. Lantos, C., Juhász, A.G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., Somogyi, N., Pauk, J., 2009. Improvement of isolated

- microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via coculture with ovary of pepper or wheat. *Plant Cell Tiss Org. Cult.* 97:285-293.
38. Lantos, C., Juhasz, A.G., Vagi, P., Mihaly, R., Kristof, Z., Pauk, J., 2012. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnol Rep.* 6:123-132.
 39. Maraschin, S.F., Priester, W., Spaink, H.P., Wang, M., 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J. Exp. Bot.* 417:1711-1726.
 40. Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
 41. Mityko, J., Andrasfalvy, 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.
 42. Nitsch, J.P., Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163:85-87.
 43. Niklas-Nowak, A., Olszewska, D., Kisiała, A., Nowaczyk, P., 2012. Study of individual plant responsiveness in anther cultures of selected pepper (*Capsicum* spp.) genotypes. *Folia Hort.* 24:141-146.
 44. Novak, F., 1974. Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp. *Z Pflanzenzücht* 72:46-54.
 45. Nowaczyk, L., Nowaczyk, P., Olszewska, D., Niklas-Nowak, A., 2015. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pretreatment of *Capsicum* spp. donor plants on the anther culture efficiency of lines selected by capsaicinoid content. *BTa JBCBB* 96:179-183.
 46. Nowaczyk, P., Kisiała, A., 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *J. Appl. Genet.* 47:113-117.
 47. Ochoa-Alejo, N., Ramirez-Malagon, R., 2001. In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell Dev Biol. Plant* 37:701-729.
 48. Olszewska, D., Kisiała, A., Niklas-Nowak, A., Nowaczyk, P., 2014. Study of *in vitro* anther culture in selected genotypes of genus *Capsicum*. *Turk J. Biol.* 38:118-124.
 49. Özkum, D., Tıpırdamaz, R., 2007. Effects of silver nitrate, activated charcoal and cold treatment on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Hort.* 729:133-136.
 50. Özsoy, B. 2019. Genotip, besin ortamı ve stres uygulamalarının biberde androgenesis üzerine etkileri (Yüksek Lisans Tezi). Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Tokat, 66s.
 51. Parra-Vega, V., González-García, B., Seguí-Simarro, J.M., 2013-a. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiol Plant* 35:627-633.
 52. Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., Seguí-Simarro, J.M., 2013-b. Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Culture* 112:353-360.
 53. Pulido, A., Bakos, F., Castillo, A., Valle's, M., Barnabas, B., Olmedilla, A., 2005. Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. *J. Struct. Biol.* 149:170-181.
 54. Qin, X., Rotino, G.L., 1993. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. *Capsicum Eggplant Newsl.* 12:59-62.
 55. Reynolds, T.L., 1993. A cytological analysis of microspores of *Triticum aestivum* (Poaceae) during normal ontogeny and induced embryogenic development. *Am. J. Bot.* 80:569-576.
 56. Rodeva, V., Irikova, T., Todorova, V., 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): comparative study on effect of the genotype. *Biotechnol Biotechnol Equip* 3:34-38.
 57. Roshany, G., Kalantarai, S., Naderi, R., Hassani, M.E., 2013. Callus formation via anther culture in *Capsicum annuum* L. with differences in genotypes, media and incubation temperature. *Tech. J. Engin. & App. Sci.* 3:3847-3853.
 58. Seguí-Simarro, J.M., P. Corral-Martínez, V. Parra-Vega, B. González-García, 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Rep.* 30:765-778.
 59. Sibi, M., Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D., 1980. Androgenese *in vitro* chez le Piment *Capsicum annuum* L.: Impact des pretraitements sur le taux de plantes regenerees. In: Reunion CR (ed) EUCARPIA application de la culture *in vitro* a l'amelioration des Plantes Potageres, Versailles, 16-18 April, pp:143-149.
 60. Sunderland, N., Wicks, F.M., 1971. Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.* 22:213-226.
 61. Sunderland, N. 1974. Anther culture as a means of haploid induction. In: K.J. Kasha (Eds): Haploids in higher plants: advances and potential. The University of Guelph, Guelph.
 62. Supena, E., Suharsono, S., Jacobsen, E., Custers, J., 2006. Successful development of a shed-

- microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep. 25:1-10.
63. Supena, E., Custers, J., 2011. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Sci. Hortic. 130:769-774.
64. Szakacs, E., Barnabas, B., 1988. Cytological aspects of *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) using fluorescent microscopy. Sex Plant Reprod, 1:217-222.
65. Taşkin, H., Büyükalaca, S., Keleş, D., Ekbiç, E., 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. Afr. J. Biotechnol. 10:17116-17121.
66. Wang, Y.Y., Sun, C.S., Wang, C.C., Chien, N.J., 1973. The induction of pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* anther culture. Sci. Sin 16:147-151.
67. Wang, L.H., Zhang, B.X., 2001. Advancement in the anther culture of *Capsicum annuum* L. China Veg. 3:52-53.
68. Zaki, M.A.M., Dickinson, H.G., 1991. Microspore-derived embryos in Brassica: the significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. Sexual Plant Reproduction, 4:48-55.
69. Zhao, J., Zhou, X., Zhang, Z., Yang, B., Zhou, S., 2010. Effects of culture media on anther culture of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). J. Hunan Agric. Univ. (Nat Sci) 36:181-184.