

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatıra TAŞKIN

**BAZI BİBER GENOTİPLERİNDE ANTER KÜLTÜRÜ İLE HAPLOİD
EMBRİYO UYARTIMINDA EMBRİYO KALİTESİNİN ARTIRILMASINA
YÖNELİK BAZI UYGULAMALAR**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2005

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI BİBER GENOTİPLERİNDE ANTER KÜLTÜRÜ İLE HAPLOİD EMBRİYO UYARTIMINDA EMBRİYO KALİTESİNİN ARTIRILMASINA YÖNELİK BAZI UYGULAMALAR

Hatıra TAŞKIN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
Yıl : 2005, Sayfa :72
Jüri : Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
Prof. Dr. Kazım ABAK
Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU

Araştırma, 2003-2005 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Sebzeçilik Araştırma ve Uygulama Alanı ile Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür. Denemede Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü ve bölümümüz tarafından ortak olarak yürütülen bir çalışmada üç defa kendilenmiş düşük sıcaklığa tolerant olarak belirlenen A71, A269, A313 nolu genotipler, orta derecede tolerant olarak belirlenen A109 nolu genotip ve duyarlı olarak belirlenen A74 nolu genotip kullanılmıştır. Araştırmada dört farklı kültür ortamı kullanılmıştır. Denenen 5 farklı genotip için en yüksek embriyo uyartımı ve bitkiye dönüşümün belirlenmesi amacıyla anterler farklı zamanlarda kültüre alınmıştır. Ayrıca kültüre alınan ortamlarda gelişmesini tamamlayamayan embriyolar 10 gün süresince 0.5 mg/l absisik asit içeren besin ortamına alınarak absisik asitin embriyo olgunlaşmasına etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

Denemenin sonucunda gerek embriyo oluşumu gerekse oluşan embriyoların bitkiye dönüşümü genotiplere, anter alma dönemlerine ve besin ortamlarına göre değişmiştir. Genotipler arasında en yüksek embriyo verimi soğuğa tolerant olarak belirlenmiş olan 269 nolu genotipten elde edilmiştir. Anter alma dönemlerinden ise en başarılı sonuçlar Nisan ve Mayıs aylarından elde edilmiştir. Besin ortamları arasında ise III nolu besin ortamı (Murashige and Skoog + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l naftalen asetik asit + 1 mg/l benzil amino purin) ve IV nolu besin ortamından (modifiye edilmiş Murashige and Skoog + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l gümüş nitrat + 4 mg/l naftalen asetik asit + 0.1mg/l benzil amino purin) diğer ortamlara göre daha fazla sayıda embriyo elde edilmiştir. Olgunlaşmamış embriyolara absisik asit uygulamasından olumlu bir sonuç alınamamıştır. Bitkiye dönüşüm, hormonsuz Murashige and Skoog ortamına alınan olgun embriyolardan sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Biber, anter kültürü, embriyo kalitesi

ABSTRACT

MSc THESIS

DIFFERENT APPLICATIONS TO IMPROVE THE EMBRYO QUALITY ON STIMULATION OF EMBRYO BY ANTHER CULTURE IN SOME PEPPER GENOTYPES

Hatıra TAŞKIN

**DEPARTMENT OF HORTICULTURE
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisor : Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
Year : 2005, Page :72
Jury : Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA
Prof. Dr. Kazım ABAK
Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU

This study was carried out at the Vegetable Research and Application Area and the Tissue Culture Laboratory of the Department of Horticulture, the Faculty of Agriculture, the University of Çukurova from 2003 to 2005. Three times self-pollinated five pepper genotypes tolerant genotypes (A71, A269, and A313), medium-tolerant one (A109), and intolerant one (A74) to lower temperatures derived from a joint study between our department and Alata Horticultural Research Institute were employed in the present study. The four different culture media were studied. The anthers were cultured at different periods in order to determine the highest embryo stimulation and haploid plant regeneration in the studied five genotypes. Moreover, the embryos which were not able to complete their growth in the culture medium were placed in a medium containing 0.5 mg/l abscisic acid for 10 days in order to determine the effect of abscisic acid on embryo maturation.

At the end of the study, it was determined that both embryo development and haploid plant development varied based on genotype, anther cultivation period, and culture medium. The highest embryo yield was obtained from A269, one of the tolerant genotypes to low temperature. The anthers cultured from April to May gave the most yielding results compared to the other periods. The more embryos were obtained from the third medium (Murashige and Skoog + 30 g/l sakaroz + 0.25 % active coal + 15 mg/l silver nitrate + 4 mg/l naphthalene acetic acid + 1 mg/l benzyl amino purin) and the forth medium (modified Murashige and Skoog + 30 g/l sakaroz + 0.25 % active coal + 15 mg/l silver nitrate + 4 mg/l naphthalene acetic acid + 0.1mg/l benzyl amino purin) compared to the others. There was no positive effect of abscisic acid on the mature embryos. Haploid plants were recovered in the Murashige and Skoog medium having no hormone.

Key words : Pepper, anther culture, embryo quality

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve yazım aşamasında yönlendirici katkılarıyla desteğini bulduğum Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Saadet BÜYÜKALACA'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yürütülmesi aşamasında bilgi, deneyim ve önerileri ile her zaman yardımını gördüğüm Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı, Sayın Hocam Prof. Dr. Kazım ABAK' a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yürütülmesi sırasında bölümümüzün tüm olanaklarını kullanmama izin veren Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Önder TUZCU'ya, tezimde kullandığım bitkisel materyali temin eden Alata Tarımsal Araştırma Merkezinden Ziraat Yüksek Mühendisi Davut KELEŞ'e, tezimin her aşamasında sınırsız destek ve yardımını gördüğüm, her zaman yanımda olan Araştırma Görevlisi Mehtap YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yazım aşamasında benden desteğini esirgemeyen Ar. Gör. Songül ÇÖMLEKÇİOĞLU'na, Ziraat Yüksek Mühendisi Ercan EKBİÇ'e, Ar. Gör. Okan ÖZKAYA' ya ve Ziraat Mühendisi Kader ERÇİK' e teşekkürlerimi sunarım.

Serada bitkilerin yetiştirilmesi aşamasında desteklerini gördüğüm arazi çalışanlarımız Hacı TÜRKMEN ve Şükrü TÜRKMEN'e, laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen emekli laborantımız Meryem PUSLU'ya teşekkür ederim.

Ayrıca eğitimimin her aşamasında bana maddi-manevi destek sağlayan ve her zaman sabır gösteren aileme teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGE VE KISALTMALAR

MS	:	Murashige and Skoog
MMS	:	Modifiye edilmiş Murashige and Skoog
2,4-D	:	2,4-Dikloro fenoksi asetik asit
AgNO ₃	:	Gümüş nitrat
NAA	:	Naftalen asetik asit
BAP	:	Benzil amino purin
BA	:	Benzil adenin
ABA	:	Absisik asit
Kn	:	Kinetin
HCl	:	Hidrojen klorür
KOH	:	Potasyum hidroksit
mm	:	Milimetre
kg/cm ²	:	Kilogram/santimetre kare
ml	:	Mililitre
g	:	Gram
mg	:	Miligram
l	:	Litre
mg/l	:	Miligram/litre
mg	:	Mikrogram
µM	:	Mikromol
G.E.S.	:	Globular Embriyo Sayısı
O.E.S.	:	Olgun Embriyo Sayısı

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
SİMGE VE KISALTMALAR	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	6
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Denemede Kullanılan Genotipler ve Özellikleri.....	19
3.2. Metod	24
3.2.1. Bitki Yetiştirme ve Tomurcuk Alma	24
3.2.2. Uygun Anterlerin Seçimi.....	26
3.2.3. Çiçek Tomurcuklarının Dezenfeksiyonu ve Anterlerin Ayrılması	28
3.2.4. Kültür Sırasında Kullanılan Malzemeler.....	29
3.2.5. Kullanılan Besin Ortamları ve Besin Ortamlarının Hazırlanması.....	29
3.2.6. Kültür Koşulları ve Ön Uygulamalar	32
3.2.7. Embriyoların Çimlendirilmesi	32
3.2.8. Dış Ortama Aktarma.....	32
3.2.9. Anter Kültürü Yöntemiyle Elde Edilen Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	35
4.1. Farklı Zamanlarda Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu.....	35
4.1.1. Nisan Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu.....	35
4.1.2. Mayıs Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu.....	40
4.1.3. Haziran Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu.....	43

4.1.4. Temmuz Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu.....	46
4.1.5. Ağustos Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu.....	47
4.1.6. Eylül Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu.....	48
4.1.7. Kasım Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu.....	51
4.1.8. Aralık Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu.....	53
4.1.9. Ocak Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu.....	55
4.2. Denenen Ortam ve Genotiplerin Embriyo Oluşturma Oranları.....	57
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Biberin besin değeri (100g yenilebilen kısımdaki miktar)...	2
Çizelge 3.1.	Bitkilerin yetiştirilme dönemleri ve çalışma programı.....	25
Çizelge 3.2.	Kullanılan besin ortamının bileşimi.....	31
Çizelge 4.1.	Nisan döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları.....	38
Çizelge 4.2.	Mayıs döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları.....	41
Çizelge 4.3.	Haziran döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları.....	44
Çizelge 4.4.	Ağustos döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları.....	48
Çizelge 4.5.	Eylül döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları.....	50
Çizelge 4.6.	Kasım döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları.....	52
Çizelge 4.7.	Aralık döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları.....	54
Çizelge 4.8.	Ocak döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları.....	56
Çizelge 4.9.	Kullanılan besin ortamlarının embriyo oluşumuna etkisi...	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1.	71 nolu genotip.....	20
Şekil 3.2.	74 nolu genotip.....	21
Şekil 3.3.	109 nolu genotip.....	22
Şekil 3.4.	269 nolu genotip.....	23
Şekil 3.5.	313 nolu genotip.....	24
Şekil 3.6.	Denemenin donör bitkilerinin yetiştirildiği cam seradan bir görüntü.....	25
Şekil 3.7.	2004 yılının aylara göre maksimum, minimum ve ortalama sıcaklık değerleri.....	26
Şekil 3.8.	Denemede kullanılan genotiplerin anter kültürüne alınan tomurcuklarının ve anterlerinin görünümü (74 , 269, 109, 71, 313 nolu genotipler.....	27
Şekil 3.9.	Steril kabinde tomurcukların açılarak anterlerin alınması....	28
Şekil 3.10.	Dış ortama alıştırılmış bir bitki.....	33
Şekil 4.1.	IV nolu besin ortamında 269 nolu genotipten oluşmuş olgun bir embriyonun görünümü.....	39
Şekil 4.2.	I nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş globular embriyoların görünümü.....	39
Şekil 4.3.	Farklı besin ortamları ve farklı genotiplerden elde edilmiş bitkicikler.....	40
Şekil 4.4.	III nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş olgun bir embriyonun görünümü.....	42
Şekil 4.5.	IV nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş olgun ve globular embriyoların görünümü.....	42
Şekil 4.6.	III nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş bir bitki görünümü.....	43
Şekil 4.7.	II nolu besin ortamında 109 nolu genotipten oluşmuş olgun bir embriyonun görünümü.....	45

Şekil 4.8.	IV nolu besin ortamında 71 nolu genotipten oluşmuş olgun bir embriyonun görünümü.....	45
Şekil 4.9.	III nolu besin ortamında 269 nolu genotipten oluşmuş bir bitki görünümü.....	46
Şekil 4.10.	I nolu besin ortamında 109 nolu genotipten oluşmuş embriyoların görünüm.....	51
Şekil 4.11.	I nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş embriyoların görünümü.....	53
Şekil 4.12.	III nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş embriyoların görünümü.....	55
Şekil 4.13.	Genotiplerden elde edilen embriyo sayısının ve toplam embriyo sayısının aylara göre dağılımı.....	57

1. GİRİŞ

Solanaceae familyasının *Capsicum* cinsi, yaklaşık 30 türü kapsamaktadır (Greenleaf, 1986). Bunlardan 5 tür (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. frutescens* ve *C. chinense*) ekonomik olarak kültüre alınmıştır.

Biberin anavatanı Orta ve Güney Amerika' dır. *Capsicum annuum*'un geniş bir çeşitlilik gösterdiği Meksika ve Orta Amerika, biberin birincil gen merkezidir. Güney ve Orta Avrupa, Afrika, Asya ve Latin Amerika'nın bazı kesimleri ikincil gen merkezi olarak bilinmektedir (IBPGR, 1983). 16. yy'a kadar Avrupa'da bilinmeyen biber, 1493 yılında Kolombo'nun Amerika'yı keşfinden sonra Portekiz'e İspanya'ya getirilmiş ve 16. yy'ın ortalarında Orta ve Kuzey Avrupa'ya yayılmıştır (Greenleaf, 1986). Bazı ülkelerde karabiberden (*Piper nigrum*) ayırmak için İspanyol biberi olarak adlandırılmaktadır (Somos, 1984).

Tüm *Capsicum* türlerinin temel kromozom sayısı $n=12$ ve diploiddir ($2n=2x=24$). Tek yıllık otsu bir bitki olmasına karşın uygun ekolojilerde çok yıllık da olabilmektedir.

Capsicum cinsi dünyanın değişik bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Uzun sivri, dolma, çarliston, iri kare ve konik olmak üzere değişik çeşit tipleri vardır. Acılık meyvenin "capsaicine" içeriğine ve bileşimine bağlıdır ve yüksek oranda plesenta kısmında bulunur (IBPGR, 1983). Besin değeri yüksek bir sebze türüdür. Özellikle C vitamini açısından oldukça zengindir (103 mg/ 100 g) (IBPGR, 1983). Biberler mineral besin maddeleri açısından da oldukça zengindir (Çizelge 1.1).

Biberin değişik şekillerde kullanımı vardır. Ülkemizde kırmızı toz ve pul biber, turşu, biber salçası, taze ve dondurulmuş olarak kullanımı mevcuttur. Ayrıca, ilaç yapımında ham madde ve süs bitkisi olarak ta kullanılmaktadır.

Çizelge 1.1. Biberin besin değeri (100 g yenilebilen kısımdaki miktar)
(Büyükalaca, 1993)

İçerdiği maddeler	<i>Capsicum annuum</i> (Tatlı biber)		<i>Capsicum frutescens</i> (Acı biber)		<i>Capsicum spp.</i> (Biberler)
	Yeşil meyve	Kırmızı meyve	Taze meyve	Kuru meyve	Yapraklar
Su (ml)	86	87	74	8	82
Kalori	48	45	94	291	53
Protein (g)	2.0	2.0	4.1	15.0	5.8
Yağ (g)	0.8	0.8	2.3	11.0	1.0
Karbonhidrat (g)	10	9	18	33	8
Lif (g)	2.6	1.7	6.0	25.0	1.9
Kalsiyum (mg)	29	11	58	150	246
Fosfor (mg)	61	47	101	-	56
Demir (mg)	2.6	0.9	2.9	9.0	1.4
β -karoten (μ g)	180	4770	7140	1000	6210
Tiamin (mg)	0.12	0.09	0.25	0.60	0.40
Riboflavin (mg)	0.25	0.12	0.20	0.50	0.33
Niasin (mg)	2.2	0.4	2.4	12.0	1.2
Askorbik asit (mg)	140	86	121	10	68

Bitki biyoteknolojisi; bitkinin organ, doku ve hücrelerinin steril yapay besi ortamlarında kültürü, çoğaltılması ve bunların genetik olarak değiştirilmesi tekniklerinden oluşan bir bütündür. Bitki biyoteknolojisinin amacı, bitkisel üretimde bilinen klasik yöntemlerle çözilemeyen veya çözümü güç olan problemlere çözüm getirerek, daha ekonomik, kalite ve kantite yönünden daha yüksek bitkisel üretimin gerçekleştirilmesine yardımcı olmaktır (Hatipoğlu, 1997). Bitkilere uygulanan biyoteknolojik yöntemler:

- a) Doku Kültürü Teknikleri
- b) Genetik Manipulasyon Teknikleri (Genetik Mühendisliği)
- c) DNA Teknikleri

olarak üç grupta incelenebilirler.

Doku kültürü teknikleri içerisine giren haploid bitki üretimi bitki ıslahında

önemli bir yere sahiptir (**Heiser, 1976; Andrews, 1985**). Haploidi tekniği ıslah sürecini kısalttığı için sebze ıslahında geniş uygulama alanı bulmuştur. Haploid bitkilerin en önemli kullanım alanı kendine uyuşmaz türlerde bile tamamen homozigot katlanmış dihaploid hatların hızlı üretimidir. Geleneksel yöntemlerle de saf hatlar elde edilebilir. Fakat bu işlem yabancı tozlanan bitkilerde 10-12, kendine tozlanan bitkilerde 6-7 yıl sürer. Dioik türlerde ise kendileme olanaksızdır. Haploidi yöntemleri ile bu süre 1-2 yıla indirgenmektedir. Anter kültürü yöntemiyle birkaç ay içinde haploid bitkiler ve bunların kromozomlarının katlanmasıyla tek bir generasyonda homozigot dihaploid bitkiler elde edilebilir. Bu fertil homozigot bitkiler hibrit çeşitlerin geliştirilmesi için gerekli olan saf hatların elde edilmesinde çok önemlidir. Dihaploid bitkiler normal mayoz açılımı gösterirler ve açılımla istenilen özelliklerini kaybetmezler (**Reinert ve Bajaj, 1977**). Dihaploid hatlar mutlak homozigot olduklarından resesif mutasyonların tespit edilmesi ve izolasyonunu kolaylaştırır. Dominansi etkisi kalkar ve eklemeli gen etkisi ikiye katlanır. Yetiştiriciliği yapılan karışık çeşitlerin veya populasyonların kısa sürede saflaştırılabilmesi haploidizasyonun diğer bir avantajıdır.

Haploid bitki elde etme yöntemleri:

a) Erkek gametten haploid uyartımı (Androgenesis)

- Anter Kültürü
- Mikrospor kültürü

b) Dişi gametten haploid uyartımı (Gynogenesis ve Partenogenesis)

- Ovül ve ovaryum kültürleri
- Kromozom eliminasyonu
- Eksik veya yetersiz polenle tozlama

Anter kültürü tekniği haploid bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan tekniklerden birisidir. Bu tekniğin diğer *in vitro* haploid bitki elde etme tekniklerine göre avantajı; bir anter içerisinde binlerce mikrosporun bulunması ve bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir. Anter kültürünün temel prensibi; normal olarak erkek gameti oluşturacak olan polen hücresinin gelişimini durdurmak ve somatik hücrelerde olduğu gibi polen hücresini direkt olarak embriyo oluşturmaya zorlamaktır.

Türkiye 1.4 milyon ton biber üretimiyle (**Anonymous, 2002**) Çin ve Meksika'dan sonra dünyada en çok biber yetiştiren üçüncü ülke konumundadır. Türkiye'de biber üretimi hem açıkta hem de örtü altında olmak üzere pek çok bölgede yapılmaktadır. Düşük sıcaklıklar, yüksek sıcaklıklar, hastalık ve zararlılar gibi sorunlar biber üretiminde verim ve kaliteyi etkilemektedir. Birim alandan verimi artırmanın en önemli yolu bu gibi sorunlara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesidir. Klasik ıslah yöntemleri ile yeni çeşitlerin geliştirilmesi konusunda pek çok çalışma yapılmakla birlikte yeni hibrit çeşitlerin geliştirilmesi oldukça uzun zaman almaktadır. Gerek klasik ıslah yöntemlerinde ıslah süresini kısaltmak gerekse klasik ıslah yöntemlerine ıslah materyali sağlamak için çeşitli *in vitro* yöntemlerden yararlanılmaktadır. Günümüzde bu teknikler arasında en yaygın olarak kullanılan ve en fazla başarının sağlandığı yöntemlerden birisi de anter kültürü tekniğidir. Anter kültürü yöntemi ile ilk haploid bitki, **1964** yılında **Guha ve Maheswary** tarafından elde edilmiştir. Daha sonra anter kültürü haploid bitki elde etmek amacı ile birçok araştırmacı tarafından birçok türde çalışılmıştır (**Kaloo, 1986**). Kolza, arpa, patlıcan (**Veilleux, 1994**) ve karpuz, lahanagiller (**Cao ve ark., 1995**) 'de androgenetik dihaploidler, çeşitli ıslah programlarında çeşit geliştirmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Anter kültürü ile ilk haploid biber bitkisi **Wang ve arkadaşları, (1973)** tarafından elde edilmiştir. Bunu takiben **George ve Narayanswamy (1973)**, **Saccardo ve Devreux (1974)**, **Novak (1974)**, **Harn ve arkadaşları, (1975)**, **Abak (1983)** gibi bazı araştırmacılarla çalışmalara devam edilmiştir (**Bajaj, 1990**). Anter kültürü homozigot hatların elde edilmesinde önemli bir metottur. Fakat haploid bitkilerin oluşum sıklığı çoğu türde düşüktür (**Kristiansen ve Andersen, 1993**). Kültür ortamı androgenesis etkileyen ana faktörlerden birisidir. Bunun yanında androgenik embriyo oluşum oranı genotipe bağlı olarak ta değişmektedir (**Çömlekçioğlu ve ark., 2001**).

Bu çalışmanın amacı, biberlerde soğuğa tolerant olarak tespit edilen genotiplerden anter kültürü yöntemi ile yüksek oranda kaliteli haploid embriyo elde etmek olmuştur. Bu amaçla daha önce bölümümüzde yapılan çalışmalarda olumlu bulunan ortam üzerine değişiklikler yapılarak, farklı ortamlar ve buna ilaveten en uygun anter alma döneminin belirlenmesi amacıyla farklı dönemler incelenmiştir.

Denenen farklı ortamlarda elde edilecek embriyo sayısının ve kalitesinin artırılmasına çalışılmıştır. Embriyo oluşturma ortamında tam olarak olgunlaşmayan embriyolar ABA içeren ortama alınarak gelişmelerini tamamlamaları ve bitkiye dönüşümleri sağlanmaya çalışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Capsicum cinsinde androgenik embriyogenesis ilk kez **Wang ve ark., (1973)**, **George ve Narayanaswamy, (1973)** tarafından, daha sonra da **Saccardo ve Devreux (1974)**, **Novak, (1974)** ve **Harn ve ark., (1975)** tarafından yapılmıştır. Bu çalışmalardan alınan sonuçlarda, kültüre alınan anter sayısına oranla elde edilen haploid bitki sayısının çok düşük olduğu görülmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalarda tek çekirdekli mikrospor aşamasının androgenesisin teşviki için daha uygun olduğu bulunmuştur ve elde edilen embriyolar 2,4-D içermeyen 0.1 mg/l kinetin içeren yeni ortamlara aktarılmıştır (**Sibi ve ark., 1979**). Anter kültürünün ilk safhalarında sıcak uygulamasının (**Vaulx ve ark., 1981**), aktif karbon ve havuç ekstraktı içeren ortamların (**Vagera ve Havránek, 1983, 1985; Vagera, 1984a**) anter kültüründe başarıyı yükselttiği görülmüştür. Biberde (**Abak, 1983**) ve patlıcanda (**Chambonnet ve Vaulx, 1983**) yapılan anter kültürü çalışmalarında sakkaroz seviyesinin yükselmesi ile birlikte ortamın osmotik seviyesinin arttığı ve bu durumun androgenesis olumlu bir şekilde etkilediği bulunmuştur. Mikrosporların sporofitik gelişimi, yüksek sıcaklık ve ortamda bulunan aktif kömür gibi bazı faktörlerden etkilenmiştir. Farklı türlerde yapılan denemeler de bu bulguyu desteklemiştir (**Vagera ve Havránek, 1985**). Androgenesis de daha ileriki aşamaların besinsel ve fitohormonsal faktörlerin etkisi altında olduğu, yeterli miktarda FeEDTA eklenmesinin başarıyı etkilemede çok önemli rolü olduğu bildirilmiştir (**Vagera ve Jílek, 1984; Vyskot ve Bezděk, 1984**). Ortam içerisindeki aktif kömür androgenesisini teşvik eder. Ancak aynı ortamda tam bir bitki elde etmek çok zordur. Tam bir bitki elde edebilmek için embriyolar aktif kömürsüz ortama transfer edilmelidir. Androgenik bitkilerin sitolojik ve morfolojik analizleri ile (**Sibi ve ark., 1979; Vaulx ve ark., 1981; Vagera ve Havránek, 1985**) haploid, diploid, triploid ve kimerik bitkilerin varlığı tanımlanmıştır. **Sibi ve ark., (1979)** %80 haploid, % 10 diploid ve %10 triploid bitkiler elde etmişlerdir. **Vaulx ve ark., (1981)** çeşitlere ve kültür ortamına bağımlı olarak %50'nin üzerinde diploid ve dihaploid bitkiler elde etmişlerdir (**Bajaj, 1990**).

Dunwell (1976), tütünün anter kültüründe embriyo teşviki ve olgunlaşmasında ebeveyn bitkinin yaşının, ebeveyn bitkinin yetiştirildiği çevre koşullarının ve polen gelişimi aşamasının etkilerini araştırmıştır. Farklı çevre koşullarında yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerin tepkisi karşılaştırıldığında, her anterde üretilen bitkilerin sayısında beş kat varyasyon bulunmuştur. Bitki yaşı ikincil öneme sahip olmuştur. Araştırılan faktörler arasında polen aşaması en az öneme sahip olan faktör olmuştur. Polenler mitoz bölünme esnasında optimum tepki verirken, daha geç aşamada daha düşük tepki vermişlerdir

Dumas de Vaulx ve ark (1981), *Capsicum annuum*'da anter kültürünün başlangıç döneminde yüksek sıcaklığın (35°C) androgenesise tepkiyi teşvik ettiğini bulmuşlardır.

Abak (1983), tarafından yapılan bir araştırmada Türkiye orijinli biber materyalinde anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etmeye olanak verecek uygun bir besin ortamı ve yöntemi bulmak amaçlanmıştır. Bu amaçla, anter kültürü için en elverişli tomurcuk gelişme dönemini saptamaya; kültüre alma işlemi öncesinde uygulanan bazı işlemlerin etkisini incelemeye; besin ortamına katılan büyümeyi düzenleyici maddeler (kinetin ve 2,4-D), sakkaroz ve demir bileşiklerinin değişik dozlarının etkilerini araştırmaya yönelik denemeler yapılmıştır. Elde edilen bulgular ince uzun meyveli yerli biber materyali için en elverişli anter gelişme döneminin (mayoz bölünmeyi izleyen birinci mitoz başlangıcı), tomurcukların 3.5-4.0 mm iriliğine ulaştıkları zamana rastladığını göstermiştir. Anterlerin dikim öncesi nemce doymuş atmosferde, 25°C ve 35°C sıcaklıklarda tutulması herhangi bir olumlu etki meydana getirmemiştir. En başarılı sonuçlar, besin ortamına 5 mg/l kinetin, 5 mg/l 2,4-D, 120 g/l sakkaroz, 37.3 mg/l Na₂EDTA+27.8 mg/l FeSO₄7H₂O katılması ile elde edilmiştir. Bu yolla oluşan haploid bitkiler kolhisin yardımıyla diploid hale getirilebilmiş ve saf hatlar üretilenmiştir.

Chuong ve Beversdorf (1985), *Brassica napus*'un 6 ve *Brassica carinata*'nın 1 çeşidinden izole edilen mikrosporları % 13 (W/V) sakkaroz, 0.05 mg/l BA ve 1.00 mg/l NAA eklenerek modifiye edilmiş Nitsch ve Nitsch (NN) ortamında kültür etmişlerdir. 22-32°C arasındaki sıcaklıklarda embriyogenik tepkiler görülmüştür. En yüksek embriyo yoğunluğu 30°C' de olmuştur ve her anterde 7-54 embriyo

gelişmiştir. 30°C’de en yüksek embriyo yoğunluğuna karşın, daha düşük sıcaklıklardaki kültürlerde embriyo kalitesi daha iyi olmuştur. 32°C’de 3 gün inkübasyonu takiben 25°C’de inkübasyon da hem yüksek embriyo verimi hem de yüksek normal embriyo yüzdesi sağlanmıştır. Mikrosporlardan bitkiciklerin gelişimi hem ortamdan hem de genotipten etkilenmiştir.

Abak (1986), biberde partenogenetik haploid oluşum oranının genelde % 0.05 olmakla birlikte genotiplere göre değiştiğine, bazı çeşitlerde sıfıra yaklaşırken, bazı çeşitlerde %0.1’e kadar çıkabildiğine dikkat çekmiştir. Ayrıca tohumun alındığı bitkinin içinde yetiştiği ortam koşullarının da haploid oluşum oranını etkilediğine değinmiş, bu durumun partenogenetik haploidlerin biber ıslahında kullanımını güçleştirdiğini bildirmiştir. *In vitro* androgenetik yolla haploid bitki oluşum oranının oldukça yüksek olduğunu ve her 100 anterden ortalama 5-10 arasında haploid bitki elde edildiğini bildirmiştir.

Morison ve ark (1986), *Capsicum annuum*’ un farklı genotiplerinde yapılan anter kültüründe elde edilen embriyo sayısının ve bunların bitkiye dönüşüm oranlarının farklı olduğunu bildirmişlerdir. Oluşan embriyoların çoğunun bitkiye dönüşmediği, embriyonun bir ucundan kök diğer ucundan kallus oluşumu şeklinde anormal bitki oluşumu gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Dunstan ve ark (1988), beyaz ladinin somatik embriyo kültüründe, beyaz ladini ABA’lı ortamda büyütmüşlerdir ve 3 analog olarak bilinen (±)-methyl abscisate (MeABA); (±)-ethyl (2E, 4E) ve -(2E, 4Z)-5-(1’,2’-epoxy-2’,6’,6’-trimethylcyclohexyl)-3-methylpentadienoate (epoxyester, EE); and (±)-(2E, 4E) and -(2E,4Z)-5-(1’,2’-epoxy-2’,6’,6’-trimethylcyclohexyl)-3-methylpentadienocic acid (epoxyacid, EA) kullanmışlardır. 8 ve 12 µM arasındaki ABA embriyo olgunlaşmasını ilerletmede daha etkili olmuştur ve sitokinin veya oksin yokluğunda maksimum embriyoya ulaşmayı sağlamıştır. Oksin veya sitokinin yokluğunda MeABA embriyo olgunlaşmasını ilerletmiştir. EE sadece olgunlaşmanın erken aşamasında ilerleme sağlamıştır ve EA somatik embriyoların olgunlaşmasında hiçbir ilerleme sağlamamıştır. Fitohormonsuz ortam EA’ ya benzer sonuçlar vermiştir. Ne ABA ne de analoglarında 9µM 2,4-D’nin 4.4µM N6-BA ile kombinasyonu embriyo olgunluğunu ilerletmemiştir.

Li ve ark (1988), 6 adet Kanada orijinli yazlık buğday genotipinde anter kültüründe sıcak ve soğuk denemelerinin etkisi üzerinde çalışmışlardır. Anterlerin 26°C de kültüre alınmasından önce 6 gün 32°C sıcaklık uygulaması kallus verimini yükseltmiştir.

Reynolds (1989), *Solanum carolinense* L'nin anter kültüründe 10µM 2-4 D'li ortamda polenden kallus oluşumunu teşvik etmek için yaptığı bir çalışmada oksin içermeyen ortamda alt kültür yapıldığında kallusun organogenik yollardan rejenera olduğunu bulmuştur. Etilen ve etilen polenden kallus rejenerasyonunu veya polen androgenesisini uyarmamıştır. Üstelik polen morfogenezisi ve bunu izleyen kallus rejenerasyonu esnasında kültürdeki etilen konsantrasyonu önemli bir birikim göstermemiştir.

Fujii ve ark (1990), yonca bitkisinde somatik embriyoların ABA içeren ortamda olgunlaştırıldığında bitkiye dönüşümün % 0' dan % 80'e yükseldiğini bildirmişlerdir. Somatik embriyolar ABA içeren ortamda olgunlaştırıldığında nişasta seviyesi ve kuru madde içeriği, embriyo yaş/kuru ağırlığı ve dönüşüm sıklığının yükselmesinde pozitif korelasyon bulmuşlardır. ABA ile olgunlaştırılan somatik embriyoların ekseninde ve kotiledonlarda nişasta taneleri bulmuşlardır ve nişasta tanelerini ABA içermeyen ortamlardaki embriyolarda bulamamışlardır. Dönüşüm için gerekli olan yedek depo birikimini ABA'nın başlatıyor olabileceğini düşünmüşlerdir.

Karakullukçu ve Abak (1992), dört değişik patlıcan genotipinin anter kültürüne verdikleri yanıtı incelemişlerdir. En iyi sonuç Halep Karası çeşidinden %7.8 oranında embriyo verimi, % 4.4 oranında haploid bitki ile elde edilmiştir. Adana Topağı, Birecik Yerlisi ve Black Beauty çeşitlerinin anterlerinde irileşme olmuş, kallus gelişmiş, ancak embriyo ve haploid bitki gelişmemiştir.

Tiainen (1992), patateste yapmış olduğu anter kültürü çalışmasında Ağustos ayından Temmuz ayına kadar her ay anterleri kültüre almıştır. Ayrıca tomurcuklar +6°C ve +30°C ön sıcaklık uygulamalarına tabi tutulmuştur. Çalışmada hiçbir ön uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu ve +6°C'lik ön uygulamanın iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Sonuçlar aylar bazında değerlendirildiğinde, Eylül ve Ekim aylarında yüksek sonuçlar (%15-20) elde edilmiştir. Ancak bu embriyolardan sadece

%6-8 oranında bitkiye dönüşüm sağlanmıştır. Şubat-Mayıs arasındaki aylarda alınan anterlerde embriyo oluşum oranı %1-3 oranında olmuştur.

Büyükalaca (1993)'nın yaptığı somatik embriyogenesis çalışmasında biberlerde somatik embriyogenesis için nitrojen kaynağı olarak nitrat:amonyum oranının önemli olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca ABA'nın somatik embriyoların olgunlaşmasında önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Karakullukçu ve Abak (1993), besin ortamına değişik düzeylerde katılan bazı organik maddelerin (sakkaroz, glukoz), aktif kömür ve büyümeyi düzenleyicilerin (kinetin, zeatin, 2,4-D, NAA) patlıcan anter kültüründe haploid bitki oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlardır. İlk 12 gün boyunca % 12 sakkaroz; % 3 glikoz veya % 6 sakkaroz + % 6.3 glukoz uygulamalarından daha iyi sonuç vermiştir. Aktif kömürün embriyo oluşumuna olumlu bir etkisi gözlenmemiştir. Anterler, "kinetin + 2,4-D" kombinasyonlarında, "zeatin + 2,4-D" veya "kinetin + NAA" kombinasyonlarına göre daha iyi cevap vermişlerdir. Çalışmanın değişik aşamalarında 5 mg/l kinetin + 5 mg/l 2,4-D ve %12 sakkaroz kullanılan ortamlarda %12.1 (Baluroi F1 cv.), % 1.5 (Kemer cv.) ve %3.8 (Halep Karası cv.) oranlarında embriyo elde edilmiştir.

Kristiansen ve Andersen (1993), biberde yaptıkları anter kültürü çalışmalarında, bitki yaşı, ışıklandırması ve sıcaklığın etkisini araştırmışlardır. Denemede üç farklı fotoperiyod (11, 15 ve 19 saat), üç farklı sıcaklık (22°C, 26°C ve 30°C) ve üç farklı çeşit kullanılmıştır. Bitkiler için en uygun gelişme sıcaklığı 26°C (%2) bulunmuştur. Anterlerin kültüre alınması haftalık olarak tekrarlanmıştır. Genç bitkilerden alınan anterlerde % 2-3 oranında embriyo oluşurken, 12-14 haftalık bitkilerde embriyo oluşumu gözlenememiştir. Fotoperiyod ise önemsiz bulunmuştur.

Lentini ve ark (1995), pirinçte yaptıkları anter kültürü çalışmalarında besin ortamına gümüş nitrat eklediklerinde ve sakkaroz yerine maltoz kullanıldığında anter başına kallus oluşumu % 6.3'den % 20.6'ya yükselmiştir. Maltoz oranı 29 mM'dan 351 mM'a yükseltildiğinde bitki oluşumu 15 kat artmıştır. Glikoz ise kallus oluşumunu düşürmüştür. Maltoz ve mannitol kombinasyonu ise maltoz kullanılan ortamdaki daha az teşvik etmiştir.

Mityko ve ark (1995), biberde 4 ıslah hattı, 7 kültür çeşidi ve bunların melezlerinin anter kültürüne tepkisini incelemişlerdir. Korolla ile kaliksin aynı uzunlukta olduğu ya da bir parça geçtiği aşamada toplanan tomurcuklar ilk 8 gün karanlıkta bekletilmiştir. Anterlerin kültüre alınmasından 30-40 gün sonra embriyo oluşumları gözlenmiştir. 2 kültür çeşidi dışındaki bütün genotiplerde bitkiye dönüşüm sağlanabilmiştir. Flow sitometri ile ploidi seviyeleri belirlenen androgenik bitkilerden, haploid ve spontan dihaploidler elde edilebilmiştir. Bitkiye dönüşüm oranları kullanılan genotiplere göre değişmiştir. En iyi sonuç Feherözön çeşidinden elde edilmiştir.

Zagorska ve ark (1998), 85 adet *Lycopersicon esculentum* Mill. genotiplerinin androgenetik kabiliyetlerini test etmişlerdir. Toplam 53 hibrid ve genotiplerin anterlerinden kallus teşvik edilmiştir. Sadece 15 genotipin kalluslarından bitki rejenerasyonu gözlemlenmiştir. Bu data açık olarak domateste androgenesisin teşvikinde genotip etkisini açıkça ortaya çıkarmıştır. Domateste erkek kısırlığından sorumlu ms 1035 geni içeren Roma, Pearson, San Marzano, Par, Sar, Vigapol, Day, David ve Start çeşitlerinden alınan anterler, bu genin homozigot ve heterozigot durumlarında hem kallus teşvikinde hem de organogenetik potansiyele bağımlılığının güçlü olduğu gözlenmiştir. Kallus teşviki, organogenesis ve bitki rejenerasyonunun protokolü geliştirilmiştir. Gözlenen 6000'den fazla bitkiciğin çoğunun kromozom sayısında (n, 2n, 4n) farklı morfolojik değişimler ve varyasyonlar belirlemişlerdir. Bazıları domates ıslahı için ilginç kaynak materyal olmuşlardır.

Çömlekçioğlu ve ark (1999), Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber popülasyonlarından anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde edilmesine olanak sağlayacak uygun besin ortamını ve kültür koşullarını belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada; 4 farklı besin ortamı ve 2 ön sıcaklık uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Denenen ortamlar içerisinde en yüksek embriyo verimi 4 mg/l NAA ve 0.1mg/l BAP içeren besin ortamından alınmıştır.

Dias ve Martins (1999), *Brassica oleracea* 'nın 27 genotipinde, anter kültürü yöntemi ile embriyo elde edilmesinde gümüş nitratın 3 farklı konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır. Besin ortamına gümüş nitrat ilave edilmesiyle embriyo verimi genotiplerin büyük bir kısmında önemli derecede yükselmiştir. En iyi

sonuçlar 10 mg/l AgNO₃ eklenmesi ile elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar *Brassica oleracea* genotiplerinde anter kültürü ortamına gümüş nitrat ilavesinin embriyo retmini artıracasını göstermiştir.

Ayar ve ark (2000), brokkolide yaptıkları anter kültürü çalışmalarında farklı sıcaklık, ortam ve kesim uygulamalarının etkisini araştırmışlardır. Henüz anak yaprakları amamış tomurcuklardan alınan anterler filamentli, filamentsiz ve filamentsiz-ucu kesilmiş olarak 3 farklı formda kültüre alınmışlardır. Filamentli anter kesiminin bitki oluşumu üzerine olumlu sonuçlar verdiği bulunmuştur. Kullanılmış olan 2 ortam arasında hiçbir farklılık gözlemlenememiştir. Araştırmada kullanılan 3 farklı n sıcaklık uygulamalarından 35°C’de bir gün bekletildikten sonra 1 günde 30°C’de bekletmenin olumlu sonuçlar verdiği bulunmuştur.

Guzmn ve Arias (2000), eltikte (*Oryza sativa* L.) Taiper 309 eşidinde yaptıkları bir çalışmada anterleri 0, 2, 5 ve 10 mg/l ABA içeren sıvı N6 ortamına yerleştirmişlerdir. 5 gün sonra anterler bu ortamdan alınmış ve ABA’sız N6 ortamına konulmuştur. En yüksek embriyo oluşumu 5 ve 10 mg/l ABA içeren N6 ortamında gerçekleşmiş ve ABA uygulamasının yapılması ile bitkiye dönüşüm %30’dan %70’e yükselmiştir.

Madakadze ve Senaratna (2000), sardunyanın somatik embriyolarının olgunlaşmasında polietilen glikol ve büyümeyi düzenleyicilerin interaksyonu araştırmışlardır. Somatik embriyolar 3 gün 20 M thidiazuronlu ortamda tutulmuştur. İndüksiyonun başlamasının 21. gününde 1M ABA, jasmonik asit, NAA ve BAP kullanılmıştır. BAP ve NAA olgunlaşmada ABA etkisini artırmamıştır. Sadece PEG varlığında olgunlaşma artmıştır. PEG varlığında ABA protein içeriğini artırmada önemli bulunmuştur. Somatik embriyoların protein tipleri sadece PEG yokluğunda ABA ve jasmonik asit ile BAP ve NAA kombinasyonundan geliştirilmiştir. Bu alışma yapay tohum üretimi için somatik embriyo kalitesinin geliştirilmesinde önemli gelişmeler göstermiştir.

Samsudeen ve ark (2000), tek çekirdekli mikrospor aşamasında toplanan zencefil anterlerini 7 dakika 0°C’de soğuk uygulamasına tabi tutmuşlardır ve kallus gelişimini teşvik etmek için 2-3 mg/l 2,4-D’li MS ortamına almışlardır . 5-10 mg/l BAP’lı MS ortamında bu kalluslardan rejenerasyonla bitkicikler elde edilmiştir. Bu

bitkicikler eşit oranlarda bahçe toprağı, kum ve vermikulit içeren saksılara dikilip 22-30 dakika boyunca nemli ortamda tutulduktan sonra toprağı aktarıldığında %85'lik bir başarı elde edilmiştir.

Sayılır ve Özzambak (2000), brokkolide yapmış oldukları anter kültürü çalışmalarında, besin ortamına katılan NAA, 2,4-D'nin ve AgNO_3 ' ın, tomurcuk büyüklüğünün ve sıcaklık şokunun androgenesis üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Araştırmada 0.1 mg/l NAA+0.5 mg/l 2,4-D kombinasyonu içeren modifiye besin ortamında diğer kombinasyonlara göre daha fazla embriyo elde edildiğı bildirilmiştir. AgNO_3 uygulamalarından ise en iyi sonucu 2 mg/l'lik dozun verdiğı bildirilmiştir. 35°C'de 8 gün karanlıkta bekletmenin, 25°C'de 8 gün karanlıkta bekletmekten daha olumlu sonuçlar verdiğı tespit edilmiştir. 4-6 mm uzunluğundaki tomurcukların en uygun mikrospor aşamasını içeren tomurcuklar olduğı bildirilmiştir.

Terzioğlu ve ark (2000), Kahramanmaraş biber populasyonunda anter kültüründe farklı inkubasyon koşulları ve besin ortamlarının embriyo oluşumuna etkilerini araştırmışlardır. Ortama aktif kömür ilave edilmesinin embriyo oluşumu üzerine olumlu etkide bulunduğı belirlenmiştir. Aynı çalışmada iki farklı inkübasyon koşulu denenmiştir. Birinci inkübasyon uygulamasında anterler 35°C sıcaklık da 16/8 saat fotoperiyodik koşullarda 8 gün tutulduktan sonra 25°C sıcaklıktaki iklim odasına aktarılmıştır. İkinci inkübasyon uygulamasında ise anterler sürekli 2000 lüks ışık şiddetinde aydınlatılan 29°C sıcaklıktaki büyütme dolabında 3 ay süreyle tutulmuştur. En yüksek embriyo oluşum oranı 29°C'de sürekli ışıklandırılan koşullarda inkübe edilen anterlerde görülmüştür.

Biner ve ark (2001), biberde yaptıkları anter kültürü çalışmasında farklı sıcaklık ve ışık uygulamalarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada 2 farklı çeşit, +4°C'de 24 saat ve 48 saat olmak üzere 2 farklı süre uygulaması yapılmıştır. Taç yaprağın çanak yaprağı biraz geçtiğı aşamada alınan anterler 5 mg/l kinetin, 5 mg/l 2,4-D içeren %30 sakkaroz ve %1 aktif kömür içeren MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Kültüre alınan anterler ayrıca 3 farklı uygulamaya tabi tutulmuşlardır. 25°C'de 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyodda, 1 hafta süre ile 25°C'ye ayarlanmış etüvde karanlık koşullarda ve 1 hafta süre ile 35°C'ye ayarlanmış etüvde

karanlık koşullarda tutulmuştur. En iyi yanıt 1 hafta süre ile 25°C'ye ayarlanmış etüvde karanlık da elde edilmiştir. Soğuk uygulaması denemelerinde ise çeşitler arasında farklılık göstermekle beraber her iki uygulamadan da olumlu sonuçlar alınmıştır.

Çömlekçioğlu ve ark (2001), şanlıurfa ve Kahramanmaraş yerel biber popölasyonunda AgNO₃'ın embriyo oluşumuna etkisini araştırmışlardır. Araştırıcılar bitki doku költüründe eksplantların kesimi esnasında strese girmesi sonucu, költür ortamı içerisinde de oksin bulunması ile etilen üretimi olduğunu, etilenin somatik embriyogenesi ve sürgün rejenerasyonu ile kallus gelişimine karşı engelleyici olduğunu ifade etmiş; AgNO₃'ın etilen etkisine karşı engelleyici etki yarattığını bildirmişlerdir. Çalışmada korollanın kalikse eşit olduğu yada bir parça geçtiği aşamada alınan anterlerde, hemen hemen anterlerin yarısında renk oluşumu olduğu ve bu aşamanın uygun bir aşama olduğu rapor edilmiştir. Anterlerin %15 kalsiyum hipokloritte 15 dakika süre ile sterilizasyon işleminin yapıldığı çalışmada, MS temel besin ortamına 4 mg/l NAA, 0.1 mg/l BAP, % 0.25 aktif kömür, 30 g/l sakkaroz ve 10 mg/l AgNO₃ eklenmiştir. Kahramanmaraş ve şanlıurfa çeşitlerinin kullanıldığı araştırmada, AgNO₃ eklenmemiş ortamda embriyo oluşumu gözleyemediklerini belirten araştırıcılar, yaptıkları bir sonraki denemede sadece AgNO₃'lı ortam kullanmışlar ve genotiplerin verdikleri cevaplar arasındaki farklılıkların daha belirgin ortaya çıktığını ifade etmişlerdir. şanlıurfa yerel çeşidinin % 51.6 oranında embriyo oluşumu gösterdiği, Kahramanmaraş yerel çeşidinin ise % 35.7 oranında embriyo oluşumu gösterdiği çalışmada, AgNO₃'ın biberde anter költüründe haploid frekansını artırdığını ve farklı genotiplerde farklı AgNO₃'ın dozlarının denenmesinin gerektiğini bildirmişlerdir.

Ellialtıoğlu ve ark (2001), biberde yaptıkları bir çalışmada anterlerin költürün ilk sekiz gününde 35°C ve sürekli karanlık koşullarda geliştirilmesinin embriyo oluşumunu teşvik ettiğini bulmuşlardır. Anterlerin 29°C ve sürekli aydınlık koşullarda inkübe edilmesi de başarılı sonuçlar vermiştir. Ayrıca Kahramanmaraş biber popölasyonunda anter költüründe iki farklı inkübasyon koşulu ile aktif kömür ve havuç ekstraktı içeren farklı besin ortamlarının etkileri de araştırılmıştır. En yüksek embriyo oluşumu ve bitki gelişimi 29°C ve sürekli aydınlık koşullarda

inkübe edilen, % 1 aktif kömür ve havuç ekstraktı içeren MS ortamında kültüre alınan anterlerden elde edilmiştir.

Ercan ve ark (2001), 5 adet biber çeşidinde yaptıkları anter kültürü çalışmasında 3 farklı besin ortamının Kinetin, BA, NAA, 2,4-D ve aktif kömür içeren toplam 11 farklı versiyonunu kullanmışlardır. Araştırmada, %1 aktif kömür+5 mg/l 2,4-D+5 mg/l Kinetin içeren ortamlar ile aktif kömür+4 mg/l NAA+0.1 mg/l BA içeren MS besin ortamında, 35°C’de 8 gün karanlıkta bekletilen anterlerden embriyo elde edilebilmiştir.

Gemesne Juhasz ve ark (2001) tarafından yapılan biberde anter kültürü çalışmasında genotipe bağlı olarak test edilen rejenerantların % 70’inin haploid olduğu rapor edilmiş ve değişik sürelerde kolhisin uygulamaları ile kromozom sayısındaki değişimler incelenmiştir. Flow sitometri ile ploidi seviyeleri belirlenen haploid bitkiler bir ay sonra % 0.04 kolhisin içeren ortama aktarılmıştır. Bitkiler bu ortamda 2, 4 ve 6 gün süre ile tutulmuşlardır. En yüksek oranı % 75.8 ile 6 gün bekletme vermiştir. Çalışmanın sonunda muamele edilmiş bitkilerde canlılık oranı % 90’dan fazla olmuştur.

Çiner ve Tıprıdamaz (2002), Malatya bölgesine özgü yerel biber popülasyonunda aktif kömür ve soğuk uygulamalarının androgenesis üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çapı 5 mm, uzunluğu 7 mm olan korolla seviyesinin kaliks ile aynı veya biraz daha uzun olduğu gelişme dönemindeki tomurcukların (birinci polen mitozu) biberde anter kültürü için en uygun tomurcuk büyüklüğü olduğu saptanmıştır. Besin ortamı olarak % 0.8 agar, % 3 sakkaroz, % 0.25 aktif kömür, 4 mg/l naftalen asetik asit (NAA) ve 1 mg/l benzil adenin (BA) veya 1 mg/l NAA ve 4 mg/l BA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Tomurcuklar +4°C’ de 48 ve 96 saat süre ile bekletilmişlerdir. En yüksek embriyo oluşumu 4 mg/l NAA, 1 mg/l BA ve aktif kömür içeren ve ön uygulamaya tabi tutulmayan tomurcuklardan elde edilmiştir.

Sayılır ve Özzambak (2002), Ege Acı Sivri, Demre Sivrisi, Kandil Dolma, Çarliston Bağcı, Tatlı Sivri Kıl, Acı Sivri Ilıca 256 olmak üzere 6 biber çeşidinde uygun tomurcuk büyüklüğü, besin ortamı karışımları ve soğuk uygulama sürelerinin embriyo oluşumuna etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, anterler 3 farklı grupta toplanmış ve asetokarmin yöntemi ile en uygun tomurcuk büyüklüğü saptanmaya

alışılmıştır. 5-6 mm uzunluğundaki tomurcukların en uygun tomurcuk büyüklüğü olduğu belirlenmiştir. Besin ortamı olarak 4 mg/l NAA, 0.1 mg/l BA, havuç ekstraktı, ve aktif kömürün içeren Murashige ve Skoog ve Nitsch'in 6 farklı kombinasyonu kullanılmıştır. Havuç ekstraktı ve aktif kömürün herhangi bir olumlu etkisi görülmemiştir. En iyi sonuç 4 mg/l NAA, 0.1 mg/l BA içeren MS temel besin ortamından elde edilmiştir. +4°C'de farklı sürelerde bekletilen tomurcuklarda ise, 0 ve 25 saat uygulamalarından sonuç alınmıştır. arliston biber çeşidi diğerlerine göre anter kültürüne daha olumlu tepkiler vermiştir.

Ayar (2003), biberde Kekova ve Sera-Demre 8 çeşitlerini kullanarak haploid bitki elde edilmesinde, mevsimin ve bitki yaşının etkisini araştırmıştır. Çalışmada kullanılan biber çeşitlerinde mevsim etkisi yaz ve kış, bitki yaşının etkisi ise aylık olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, yaz döneminde Kekova eşidi %4.97'lik embriyo oluşum oranı ile Sera-Demre 8 çeşidinden (%1.49) daha iyi sonuç verirken, kış döneminde Sera-Demre 8 (%4.26) eşidi, Kekova (%2.69) eşidinden daha yüksek oranda embriyo oluşturmuştur. Yaz döneminde Kekova eşidinde çiçeklenmenin 2. ayı olan Haziran ayı (%7.3), Sera-Demre 8 eşidinde ise çiçeklenmenin 3. ayı olan Ağustos ayı (%3.96) en yüksek embriyo oluşumunun sağlandığı ay olarak tespit edilmiştir. Kış döneminde hem Kekova (%7.70) hemde Sera-Demre 8 (8.75) eşidinde çiçeklenmenin 4. ayı olan şubat ayında en yüksek embriyo oluşum oranları elde edilmiştir.

Kumar ve ark (2003), hıyarın Gren Long ve Calypso eşitlerinde *in vitro* kültürde anterlerin tepkisi, büyümeyi düzenleyicilerin etkisi ve anterlere sıcaklık uygulamalarını çalışmışlardır. 2,4-D ve NAA'li B5 ortamında ve BAP/Kinetin/Thidiazuron ile 2,4-D kombinasyonunda Calypso ve Green Long eşitlerinde direk ve indirek embriyogenesis teşvik edilmiştir. Optimal embriyogenik kallus 2 μ M 2,4-D ve 1 μ M BAP içeren B5 ortamında teşvik edilmiştir. iek tomurcuklarına 4°C' de 0-10 gün ve aynı zamanda 32°C'de 1 gün sıcaklık n uygulamaları denenmiştir ve en iyi cevap 4°C' de 2 günde elde edilmiştir. Embriyo farklılaşması 0.25 μ M KN, 0.25 μ M NAA, 0.09 M sakkaroz içeren B5 ortamından elde edilmiştir. Embriyo olgunlaşması 5 μ M ABA içeren B5 ortamında sağlanmıştır. Embriyo imlenmesi 0.09 M sakkaroz içeren B5 ortamında sağlanmıştır. Oluşan

bitkicikler kontrollü bir şekilde dış koşullara alıştırılmıştır. Her 2 çeşidinde, 24 adet rejenere olmuş bitkilerinin kökleri ploidi seviyesi için analiz edilmiştir. Calypso'da 21, Green Long' da 17 tanesi haploid bulunmuştur.

Kumria ve ark (2003), pamukda bitki parçacıklarının rejenerasyonu ile yüksek oranda somatik embriyo üretimi ve olgunlaşması için yöntem geliştirmişlerdir. Embriyogenik kalluslar 0.1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin ve % 3 maltoz içeren MS ortamında hipokotil veya kotiledon yaprak parçalarından oluşmuştur ve üretilen globular aşamadaki somatik embriyolar yüksek konsantrasyonlarda nitrat eklenmiş hormonsuz MS ortamına transfer edilmiştir. Globular embriyoların hormonsuz MS ortamında alt kültürü, embriyoların çoğunluğunun ileri aşamalara geçememesi ya da tekrar farklılaşma aşamalarına girmesi ile torpedo veya kotiledon aşamadaki embriyo gelişiminin düşük yoğunlukta olmasıyla sonuçlanmıştır. Embriyogenesisde önemli gelişmeler kalluslar 1/5 MS ortamında kültür edildiğinde başarılmıştır. Globular embriyolardan bitkilerin geliştirilmesi MS ortamına filtre kağıdı yerleştirildiğinde önemli derecede artmıştır (her petride 20-24). Bu yöntemde sadece globüler embriyoların kotiledon aşamaya geçmesiyle kalmamış aynı zamanda ayrı bir köklenme aşaması elemine edilerek köklenme gerçekleştirilmiştir. 0.05 mg/l GA içeren MS ortamında kültür edildiğinde kotiledon embriyoların % 70'den fazlası normal bitkilere dönüşmüştür.

Nair ve Gupta (2003), çimlendirilmiş kara biber dokularından somatik embriyoların teşvik edilmesi, çimlenmesi ve olgunlaşması için bir protokol geliştirmişlerdir. Eksplantlar büyümeyi düzenleyici içeren katı SH ortamında karanlıkta kültür edilmişlerdir. İlk somatik embriyolar kültürün altmışıncı gününde direk eksplanttan oluşmuştur. Ortamın sakkaroz konsantrasyonu somatik embriyogenesisin teşvik edilmesi için çok önemli bulunmuştur ve 30 g/l sakkaroz optimum olarak bulunmuştur. Somatik embriyoların çimlenmesi ve olgunlaşması da aynı ortamda sağlanmıştır. Süspansiyon kültür somatik embriyoların çimlenmesi ve olgunlaşmasını iletmiştir. Rejenere olan bitkiler toprağa aktarılmıştır. Büyümeyi düzenleyicilerin somatik embriyogenesisin teşvik edilmesini engellediği bulunmuştur. Sitolojik analizler rejenere olan bitkilerin normal kromozom sayısına ($2n=52$) sahip olduğunu göstermiştir.

Büyükalaca ve ark (2004), biber bitkisinde *in vitro* 'da anter kültürü yöntemi ile haploid embriyo üretimi için farklı konsantrasyonlarda gümüş nitrat çalışmışlardır. Lokal kırmızı biber populasyonundan selekte edilen U-247 ve U-267 genotipleri bitki materyali olarak kullanılmıştır. Tomurcuklar hem açık alandan hem de serada yetiştirilen bitkilerden toplanmıştır. Dört farklı gümüş nitrat konsantrasyonu (5, 10, 15, 20 mg/l) test edilmiştir. Test edilen bütün konsantrasyonlarda farklı üretim oranlarıyla haploid embriyo oluşumu gözlemlenmiştir. Serada yetiştirilen bitkilerden alınan anterler, açık alanda yetiştirilen bitkilerden alınan anterlere göre daha fazla embriyo vermişlerdir. En yüksek embriyo üretimi (her 100 anterde 45.7 embriyo) 15 mg/l gümüş nitrat içeren ortamda U-247 genotipinde gözlemlenmiştir.

Zagorska ve ark (2004), domateste anter kültüründen elde edilen rejenerantların genetik, biyokimyasal ve sitolojik karakteristiklerine bakmışlardır. Androgenesisin teşvikinin bir sonucu olarak, 6000'den fazla köklenmiş rejenerantlar elde edilmiştir. Sitolojik analizler, elde edilen bitkilerin hücrelerinde kromozom sayısında büyük bir farklılığı ortaya çıkarmıştır. Rejenerantların çoğu miksoploid iken, hücrelerin çoğunluğu haploid kromozom sayısına sahip çıkmıştır. R1 ve R2 döller *C.michiganense* subsp. *michiganense* (Cmm 7)' ye dayanıklılık için test edilmiştir. Rejenerantların bazıları dayanıklı çıkmıştır. Serada büyütülen hibrid rejenerantların değerleri tarlada büyütülen hibrid rejenerantlardan yaklaşık 1.5 kat daha yüksek çıkmıştır ve bu eğilim bütün hibrid rejenerantlarda açık bir şekilde görülmüştür. Bu sonuçlardan androgenesisin teşvikinde somaklonal varyasyonların geniş oranda yeni formların yaratılmasında kullanılabileceğini göstermiştir. Böylece ıslah programlarında kullanılmak için hastalıklara dayanıklı, daha verimli ve aromalı domates hatlarının ve varyetelerinin gelişmesi hızlandırılabilmiştir.

3. MATERİYAL VE METOD

Çalışma 2003-2005 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Sebzecilik Araştırma ve Uygulama Alanı ile Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür. Materyal olarak Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü ve Ç.Ü.Z.F. Bahçe Bitkileri Bölümü tarafından ortak olarak yürütülen bir çalışmada yer alan biber genotiplerinden düşük sıcaklıklara tolerans yönünden farklı tepkiler gösteren 5 değişik genotip seçilerek kullanılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Denemede Kullanılan Genotipler ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan bitkisel materyal, Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü ve Ç.Ü.Z.F. Bahçe Bitkileri Bölümü tarafından ortak olarak yürütülen bir çalışmada üç defa kendilenmiş ve düşük sıcaklığa toleranslı olarak belirlenen A71, A269, A313 nolu genotipler, orta derecede toleranslı olarak belirlenen A109 nolu genotip ile duyarlı olarak belirlenen A74 nolu genotip kullanılmıştır.

71 nolu genotip: Düşük sıcaklığa toleranslı olarak belirlenmiştir. Kahramanmaraş x Perennial melezidir. Gövde uzunluğu ortalama 28 cm'dir. Gövde de yoğun tüy oluşumu vardır. Yaprak rengi koyu yeşildir ve yapraklar mızrak şeklindedir. Yaprakta tüy oluşumu azdır. Taç yaprak rengi beyazdır. Çanak yaprakta renklenme yoktur. Anter rengi mavi, filament rengi beyazdır. Meyve şekli uzundur. Şekil 3.1' de 71 nolu genotipe ait görünüm yer almaktadır.



Şekil 3.1. 71 nolu genotip

74 nolu genotip: Düşük sıcaklığa duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Sivri biber tipindedir. Gövde uzunluğu yaklaşık 28 cm'dir. Gövde de yoğun tüy oluşumu vardır. Yaprak rengi koyu yeşildir ve yapraklar mızrak şeklindedir. Yaprakta tüy oluşumu azdır. Taç yaprak rengi beyazdır. Taç yapraklar çan şeklindedir. Çanak yaprakta renklenme yoktur. Anter rengi mavi, filament rengi beyazdır. Meyve şekli yuvarlağa yakındır. Şekil 3.2' de 74 nolu genotipe ait görünüm yer almaktadır.



Şekil 3.2. 74 nolu genotip

109 nolu genotip: Düşük sıcaklığa orta derecede tolerans gösterdiği gözlemlenmiştir. Kahramanmaraş tipidir. Gövde uzunluğu ortalama 27 cm'dir. Gövde de yoğun tüy oluşumu vardır. Yaprak rengi yeşildir ve yapraklar mızrak şeklindedir. Yaprakta tüy oluşumu azdır. Taç yaprak rengi beyazdır. Taç yapraklar çan şeklindedir. Çanak yaprakta renklenme yoktur. Anter rengi mavi, filament rengi beyazdır. Meyve şekli üçgendir. Şekil 3.3' de 109 nolu genotipe ait görünüm yer almaktadır.



Şekil 3.3. 109 nolu genotip

269 nolu genotip: Düşük sıcaklığa toleranslı olduğu belirlenmiştir. Süs tipidir. Gövde uzunluğu yaklaşık 23 cm'dir. Gövde de yoğun tüy oluşumu vardır. Yaprak rengi koyu yeşildir ve yaprak şekli ovaldir. Yapraklar tüylüdür. Taç yaprak rengi beyazdır. Taç yapraklar çan şeklindedir. Çanak yaprakta renklenme yoktur. Anter rengi açık mavi, filament rengi sarıdır. Meyve şekli uzundur. Şekil 3.4'de 269 nolu genotipe ait görünüm yer almaktadır.



Şekil 3.4. 269 nolu genotip

313 nolu genotip: Düşük sıcaklığa toleranslı olduğu saptanmıştır. Carliston benzeri tiptedir. Gövde uzunluğu yaklaşık 16 cm'dir. Gövde de yoğun tüy oluşumu vardır. Yaprak rengi yeşildir ve yaprak şekli ovaldir. Yapraklar tüylüdür. Taç yaprak rengi beyazdır. Taç yapraklar çan şeklindedir. Çanak yaprakta renklenme yoktur. Anter rengi açık mavi, filament rengi sarıdır. Meyve şekli üçgendir. Şekil 3.5' de 313 nolu genotipe ait görünüm yer almaktadır.



Şekil 3.5. 313 nolu genotip

3.2. Metod

3.2.1. Bitki Yetiştirme ve Tomurcuk Alma

Bölümümüzde daha önce yapılan bir çalışmada anterlerin alınacağı bitkiler hem serada hem de açıkta yetiştirilmiş ve bunun embriyo oluşumuna etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada serada yetiştirilen bitkilerden alınan tomurcuklarda embriyo uyartımı açıkta yetiştirilenlere göre çok daha yüksek bulunmuştur (**Büyükalaca ve ark., 2004**). Bu nedenle, çalışmada kullanılan biber bitkileri Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü deneme alanındaki cam serada yetiştirilmiştir. Çizelge 3.1’de bitkilerin yetiştirilme dönemleri ve çalışma programı verilmiştir. Tohum ekimleri içerisinde fide harcı (2 hacim torf:1 hacim perlit) bulunan viyollere yapılmıştır. Fideler seraya 50x50x100 cm sıra üzeri ve sıra arası mesafelerle çift sıra olacak şekilde dikilmişlerdir (Şekil 3.6). Dikim sırasında taban gübresi olarak 15:15:15 ticari gübresi kullanılmıştır. Bitki gelişimi boyunca gerekli

kültürel işlemler yapılmıştır. Tomurcuklanma döneminde birer ay arayla bitkilerden uygun anter safhasındaki tomurcuklar alınarak anterler kültür ortamına ekilmiştir.

Çizelge 3.1. Bitkilerin yetiştirilme dönemleri ve çalışma programı

Tohum ekimi	Fide dikimi	Tomurcuk Alınma Zamanı
2003-14 Ekim	2003-16 Kasım	2004-Ocak 2004-Şubat 2004-Mart
2004-08 Ocak	2004-13 Mart	2004-Nisan 2004-Mayıs 2004-Haziran 2004-Temmuz 2004-Ağustos 2004-Eylül
2004-01 Eylül	2004-15 Ekim	2004-Kasım 2004-Aralık 2005-Ocak

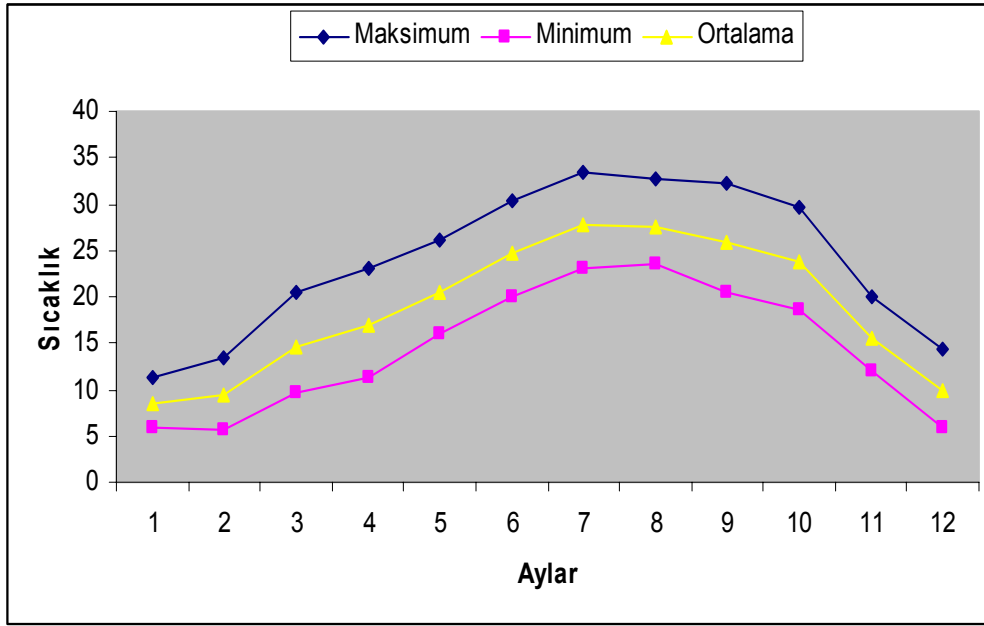


Şekil 3.6. Denemenin donör bitkilerinin yetiştirildiği cam seradan bir görüntü

2004 Ocak, Şubat ve Mart ayında alınan tomurcukların ekiminin yapıldığı besin ortamında bölümümüze kurulan yeni saf su cihazından kaynaklanan bir

problemden dolayı bu aylarda alınan anterlerden embriyo oluşumu gözlemlenmemiştir. Embriyo oluşmamasının nedeninin saf sudaki yüksek tuzdan kaynaklanmış olabileceği düşünüldüğünden o aylara ait veriler değerlendirmeye alınmamıştır.

Denemenin yapıldığı ayların maksimum, minimum ve ortalama hava sıcaklık değerleri Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7. 2004 yılının aylara göre maksimum, minimum ve ortalama hava sıcaklık değerleri

3.2.2. Uygun Anterlerin Seçimi

Kültüre alınan anterlerin bulunduğu gelişme aşaması haploid embriyo elde edilmesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Bunun için en uygun aşama, mikrosporların tek çekirdekli aşamanın sonunda ve/veya iki çekirdekli aşamanın başında olduğu (I. mitoz bölünmesinin başladığı) dönemdir. Daha önce yapılan çalışmalarda biber çiçek tomurcuklarında, çanak yaprak ve taç yaprak boylarının eşit olduğu veya taç yaprakların çanak yapraklardan biraz daha uzun olduğu, anterlerin yaklaşık yarı boyuna kadar antosiyan oluşumunun görüldüğü gelişme aşamasında mikrosporların I. mitoz aşamasında olduğu bildirilmiştir (**Chambonnet, 1988**).

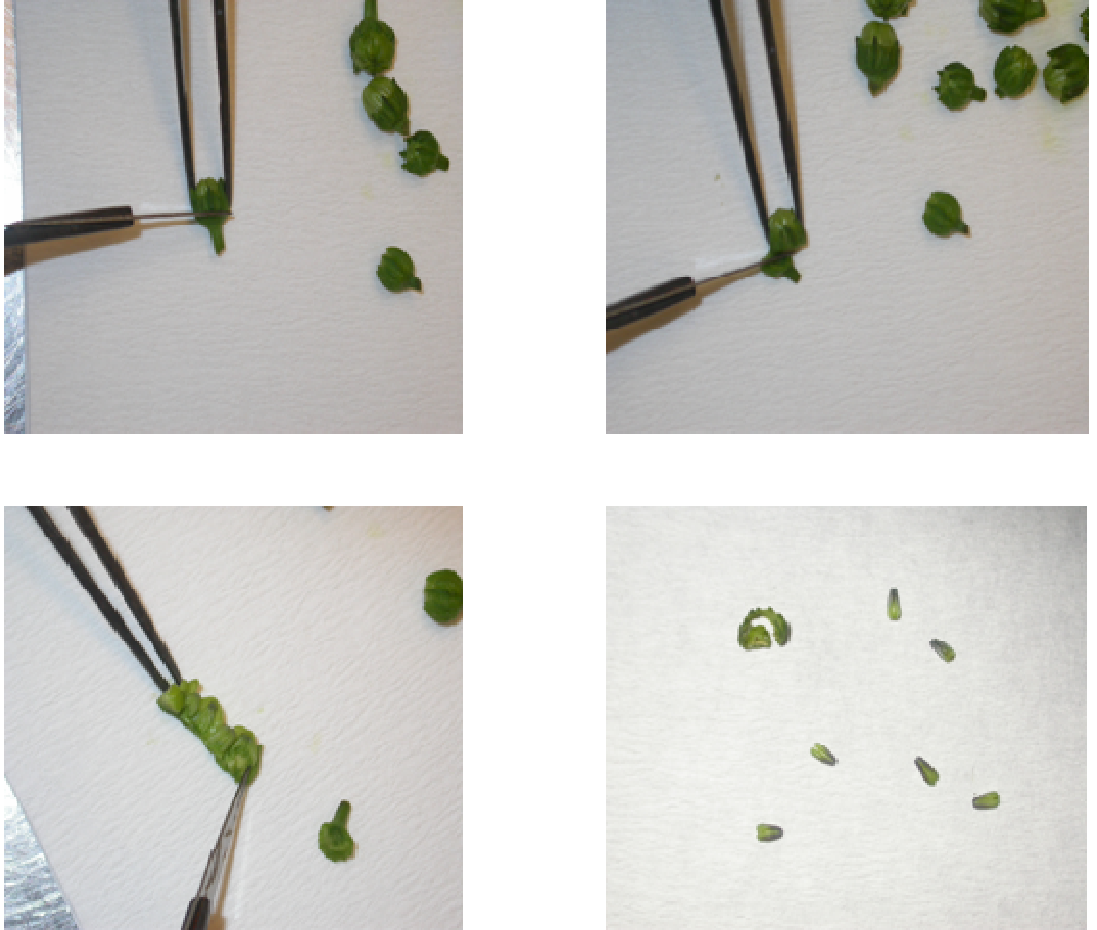
Bölümümüzde de yapılan çalışmalarda bu aşamanın anter kültürü için en uygun aşama olduğu belirlenmiştir ve bu çalışmada da tomurcuklar Şekil 3.8.'de gösterilen aşamalarda alınmıştır.



Şekil 3.8. Denemede kullanılan genotiplerin anter kültürüne alınan tomurcuklarının ve anterlerinin görünümü (74 , 269, 109, 71, 313 nolu genotipler)

3.2.3. Çiçek Tomurcuklarının Dezenfeksiyonu ve Anterlerin Ayrılması

Toplanan çiçek tomurcukları, laboratuvara getirildikten sonra steril kabin içerisinde 1-2 damla Twin-20 içeren %15'lik sodyum hipokloritte 15 dakika tutulmuştur ve en az 3 kez steril saf su ile çalkalanarak durulanmıştır. Sterilizasyon işlemi tamamlanan tomurcuklar steril kabin içerisinde açılmış (Şekil 3.8.) ve anterler filamentlerinden ayrılarak petri kaplarında hazırlanan besin ortamlarına ekilmişlerdir. Her bir tomurcuğa ait anterler (5-7 adet) 1 petri kabına yerleştirilmiştir. Deneme her bir uygulamada 3 tekerrür ve her tekerrürde 5 petri olacak şekilde kurulmuştur.



Şekil 3.9. Steril kabinde tomurcukların açılarak anterlerin alınması

3.2.4. Kùltür Sırasında Kullanılan Malzemeler

Anter kùltürü çalışmaları esnasında değişik aşamalarda değişik kùltür kapları kullanılmıştır. Kùltür esnasında kullanılan malzemelerin (besin ortamları, petri kapları, steril su şişeleri, pens-bistüriler, kurutma kağıtları ve boş kavanozlar) 121°C’ de sıcaklık ve 1.2 kg/cm² basınç altında 15 dakika süre ile otoklavlanarak sterilizasyonları yapılmıştır. Otoklav işlemi tamamlandıktan sonra malzemeler steril kabine alınmış ve kùltür aşamalarına geçilmiştir.

Embriyo uyartım aşamasında 6 cm çapında cam petriler kullanılmıştır. Oluşan embriyolar ise, içerisinde besin ortamı bulunan 2.5 cm çapında, 25 cm uzunluğunda cam tüplere aktarılmıştır. Gelişmelerini tamamlayan bitkicikler, içerisinde otoklavlanmış torf/perlit (2 hacim/1 hacim) bulunan plastik saksılara aktarılmıştır.

3.2.5. Kullanılan Besin Ortamları ve Besin Ortamlarının Hazırlanması

Araştırmada **Murashige ve Skoog (1962)**’un makro ve mikro elementleri, vitaminleri ve Fe-Na EDTA kompozisyonu sırasıyla embriyo oluşumu, olgunlaştırılması ve köklendirme aşamalarında değiştirilmeden ve modifiye edilerek kullanılmıştır.

Büyümeyi düzenleyicilerden, embriyo oluşumunun teşviki için 0.1-0.5-1 mg/l BAP, 4 mg/l NAA ve 15 mg/l AgNO₃ (**Büyükalaca ve ark, 2004**) konsantrasyonları kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Embriyoların olgunlaştırılması için 0.5 mg/l ABA konsantrasyonu ve embriyoların çimlendirilmesi ve bitkiye dönüşümü aşamasında ise bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamları kullanılmıştır (**Büyükalaca, 1993**).

Ortam hazırlanırken bütün kimyasallar eritildikten sonra hacim tamamlanmış ve 1 N’lik HCl ve 1 N’lik KOH kullanılarak pH 5.8’e ayarlanmıştır. Katılaştırıcı olarak agar kullanılmıştır. Hazırlanan ortamlar, ısıtıcı üzerinde kaynamaya başlayınca kadar tutulmuş, 2.5 cm çapında ve 25 cm uzunluğundaki deney tüplerinde 10 ml/tüp olacak şekilde dağıtılarak ya da kaynatılmadan 6 cm çapındaki

petrilerle birlikte 121°C sıcaklık ve 1.2 kg/cm² basınç altındaki otoklavda 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra steril kabin içerisinde ortamlar petrilere 15 ml/petri olacak şekilde dağıtılmıştır. Olgunlaştırma ve köklenme aşamasında da yine 2.5x25 cm boyutlarındaki tüpler kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılmış olan 4 farklı besin ortamı aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

I No'lu Ortam: MS + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 0.1 mg/l BAP

II No'lu Ortam: MS + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP

III No'lu Ortam: MS + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 1 mg/l BAP

IV No'lu Ortam: MMS + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 0.1mg/l BAP

Not: MMS ortamı modifiye edilmiş MS ortamı olup yapılan değişiklik Nitrat:Amonyum oranının 40:20 den 55:5 şeklinde düzenlenmesidir (**Büyükalaca, 1993**).

Çizelge 3.2. Kullanılan besin ortamının bileşimi

Makro Elementler	(MURASHIGE ve SKOOG, 1962) (mg/l)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	(MURASHIGE ve SKOOG, 1962) (mg/l)
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Vitaminler	(MURASHIGE ve SKOOG, 1962) (mg/l)
Pyrodoxine HCl	0.5
Glycine	2.0
Nicotinic Acid	0.5
Thiamine-HCl	0.4
Myo-inositol	100
Büyüme, Düzenleyiciler(mg/l)	
6-Benzyladenin pürin	0.1-0.5-1
Naftalen asetik asit	4
Gümüş nitrat	15
Absisik asit	0.5
Karbonhidratlar(g/l)	
Sakkaroz	30
Diğer Maddeler	
Aktif Karbon	2.5 g/l
Agar	8 g/l

3.2.6. Kültür Koşulları ve n Uygulamalar

Besin ortamına yerleştirilen anterler inkübatörde +35°C’de ve karanlık koşullarda 2 gün n uygulamaya tabi tutulmuşlardır. Inkbatrden ıkarılan petriler 25±1°C sıcaklığa, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyod koşullarına sahip büyütme odasında tutulmuştur.

3.2.7. Embriyoların imlendirilmesi

Oluşan embriyolardan gelişimini tamamlamış olanlar hormonsuz MS ortamına alınırken gelişimini tamamlayamamış olan embriyolar 0.5 mg/l ABA içeren MS ortamına aktarılmıştır, 10 gün sonra bu ortamdan alınarak hormonsuz MS ortamına transfer edilmiştir (**Büyükalaca, 1993**).

3.2.8. Dış Ortama Aktarma

Köklenen bitkiciklerin dış ortama adaptasyonlarını sağlamak amacıyla, tüplerin kapaklarında bulunan şeffaf folyo çıkarılmış bunu takip eden 3-4 gün içerisinde de tüplerin kapakları tamamen açılmıştır. Adaptasyon süresi tamamlanan bitkicikler dış ortama aktarılmadan önce, kökleri musluk altında yıkanarak temizlenmiş ve kökler fungusite daldırıldıktan sonra torf-perlit (2 hacim/1 hacim) karışımı bulunan saksılara aktarılmıştır. Dikimden sonra can suyu verilmiştir. Bitkicikler yaklaşık 1 hafta süre ile % 90-100 nem içeren plastik tüneller altında bekletilmiş, daha sonra tünellerin örtüleri kademeli olarak açılarak dış ortama alışmaları sağlanmıştır. şekil 3.10’da büyütme odasından çıkarılarak dış ortama alıştırılmış bir bitki görülmektedir.



Şekil 3.10. Dış ortama alıştırılmış bir bitki

3.2.9. Anter Kültürü Yöntemiyle Elde Edilen Bitkilerin Ploidi Seviyelerinin Belirlenmesi

Anter kültürü yöntemiyle elde edilen ve dış koşullara alıştırılan bitkilerde ploidi seviyelerinin belirlenmesi amacıyla kök uçlarından kromozom sayımı yapılmıştır.

Kromozom sayımları kök ucu hücrelerinde yapılmış ve ezme preparat yöntemi kullanılmıştır. Feulgen (**Darlington ve La Cour, 1963**) yöntemi kök uçlarının boyanmasında yetersiz olduğu için asetokarminle kombine edilmiştir (**Elçi, 1982**). Buna göre boyama işlemi şu şekilde yapılmıştır:

- a-** Kökler α monobromonaftalin çözeltisinde 2-3 saat tutulmuştur.
- b-** 3:1 glasiyal asetik asit: ethanol içerisine alınmış ve 16-24 saat tutulmuştur.
- c-** 1 N HCL içerisinde 60°C’de 10 dakika hidrolize edilmiştir (**Büyükalaca, 1993**).
- d-** Hidrolizden çıkarılan kök uçları 5 saat feulgen içerisinde bekletilmiştir ve daha sonra 10-15 dakika saf su ile yıkanmıştır.
- e-** Kök uçlarından 1-1.5 mm’lik kısım kesilerek lam üzerine alınmıştır ve

jilet yardımıyla küçük parçalara ayrılarak üzerine 1 damla asetokarmin damlatılmış ve üzerine lamel kapatılmıştır.

- f-** Preparat kurutma kağıdı arasına konularak baş parmakla lamel üzerine bastırılmıştır.
- g-** Preparatlar ışık mikroskopunda 10x100 büyütmeyle immersiyon yağı kullanılarak sayılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Deneme boyunca yapılan kültürlerden elde edilen bulguların aylık dilimler halindeki durumları aşağıda ayrı ayrı sunulmuştur.

4.1. Farklı Zamanlarda Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu

4.1.1. Nisan Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu

Nisan döneminde ortamlara dikilen anterlerden oluşan globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Embriyo oluşumu bakımından en iyi sonuç (67 adet) IV nolu besin ortamından elde edilmiştir. IV nolu besin ortamına dikilen 269 nolu genotipe ait anterlerden 51 adet, 313 nolu genotipe ait anterlerden 12 adet, 109 nolu genotipe ait anterlerden 4 adet embriyo elde edilmiştir. Bu embriyolardan sadece 269 nolu genotipe ait anterlerden elde edilen embriyolarda bitkiye dönüşüm (% 5.88) olmuştur. 71 ve 74 nolu genotiplerde embriyo oluşumu sağlanamamıştır. IV nolu besin ortamını toplam 45 adet embriyo ile II nolu besin ortamı takip etmiştir. Bu ortamda en yüksek embriyo oluşumu (21 adet) 269 nolu genotip ile 74 nolu genotipten (14 adet) elde edilmiştir. II nolu besin ortamında en yüksek bitkiye dönüşüm (%20) 313 nolu genotipte olmuştur. III nolu besin ortamında 37 adet embriyo elde edilmiştir. Bitkiye dönüşüm sadece (% 7.69) 269 nolu genotipe ait embriyolardan (26 adet) elde edilmiştir. Bu ortamda 71 nolu genotipten 6 adet, 74 nolu genotipten 1 adet, 109 nolu genotipten 4 adet embriyo elde edilmiş ancak bunlar bitkiye dönüşmemiştir. 313 nolu genotipten embriyo oluşumu sağlanamamıştır. Embriyo oluşumu bakımından en düşük değer (27 adet) I nolu besin ortamından elde edilmiştir. Ancak diğer ortamlardan farklı olarak tüm genotiplerden embriyo oluşumu sağlanmıştır. 313 nolu genotipte 11 embriyonun % 9.09’u, 74 nolu genotipte 5 embriyonun % 60’ı, 109 nolu genotipte 5 embriyonun %20’si bitkiye dönüşmüştür. 269 ve 71 nolu genotipten 3’er adet embriyo elde edilmesine rağmen bunlardan hiçbiri bitkiye dönüşmemiştir. Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’ de Nisan

ayında kültüre alınan anterlerden elde edilen globular embriyo, olgun embriyo ve bitki resimleri görülmektedir.

Nisan ayında kültüre alınan tüm genotiplerin anterlerinden denenen tüm ortamlar üzerinde toplam 94 adet globular embriyo ve 82 adet olgun embriyo elde edilmiştir. Olgun embriyoların tamamı hormonsuz MS ortamına alınırken globular aşamadaki embriyolar gelişmelerini tamamlamaları için 0.5 mg/l ABA içeren MS ortamına alınmıştır. Bölümümüzde daha önce yapılan biberde anter kültürü çalışmalarında, anormal embriyo oluşumu ve buna bağlı olarak da bitkiye dönüşüm oranının düşük olduğu belirlenmiştir. Birçok türde yapılan çalışmalar da ABA uygulamasının embriyo kalitesini ve bitkiye dönüşüm oranını attırdığı tespit edilmiştir. (Ammirato, 1977; Senaratna ve ark., 1989; Attree ve ark., 1990, Lecouteux ve ark., 1993; Capuana ve Debergh, 1997; Li ve ark., 1997; Dunstan ve ark., 1988, Fuiji ve ark., 1990, Büyükalaca, 1993; Guzmán ve Arias, 2000). Bu nedenle denemede gelişimini tamamlayamamış olan embriyolar ABA içeren ortama alınmıştır. Ammirato (1977), ABA kullanıldığında embriyolarda görülen normal dışı oluşumların kontrol altına alındığını belirtmiştir. Attree ve ark., (1990)'nın yaptığı çalışmada olgunlaşma aşamasında uygulanan 16 µM ABA uygulamasının yüksek çimlenme ve bitkiye dönüşüm oranı sağladığı bildirilmiştir. Yoncada yapılan çalışmalarda ise 5 gün süreyle 20 µM ABA uygulamasının bitkiye dönüşümü artırdığı bildirilmiştir (Senaratna ve ark., 1989; Lecouteux ve ark., 1993). ABA uygulamasının daha uzun olması durumunda ise hem çimlenmede azalma hem de anormal gelişimler gözlenmiştir (Lecouteux ve ark., 1993).

Bizim bu çalışmamızda 0.5 mg/l ABA içeren MS ortamında tutulduktan sonra hormonsuz MS ortamında alınan globular embriyoların hiçbirinde bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Hormonsuz MS içeren ortama alınan olgunlaşmış embriyolarda ise % 8.52 oranında bitkiye dönüşüm sağlanmıştır. ABA'in etkisinin görülememesinin nedeni olarak kullanılan konsantrasyonun düşük olması akla gelen ilk olasılıktır. ABA'in embriyo olgunlaşmasına ve bitkiye dönüşümüne etkili olabilmesi için yapılan çalışmalarda kullanılan genotipler için konsantrasyonun çok önemli olduğu, kritik konsantrasyonun altında ya da üstündeki değerlerde ABA'in etkisinin olmadığı veya olumsuz yönde olduğu bildirilmiştir (Johansson 1983; Pullman ve ark.,

2005). Ayrıca kullanılan ortamda aktif karbon bulunması durumunda ABA'nın etkisinin görülebilmesi için konsantrasyonun 10-40 mg/l arasında olması gerektiği fakat bu değerin genotipe ve ABA uygulamasının süresine bağlı olduğu bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (**Li ve ark., 1997,1998; Capuana ve Debergh, 1997; Pullman ve ark, 2005**). Yapılan bazı çalışmalarda ise ABA'nın etkisinin ortaya çıkabilmesi için osmotik ayarlayıcı olarak PEG ile birlikte kullanılması gerektiği rapor edilmiştir (**Attree ve ark., 1995; Robichaud ve ark., 2004**). ABA'nın farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı bazı çalışmalarda ise denenen konsantrasyonların hiçbirinde ABA'nın etkisi görülmemiştir (**Vieitez, 1995; Xing ve ark., 1999, Robichaud ve ark., 2004**).

Nisan ayında alınan anterlerden 71 nolu genotip için gerek olgun embriyo oluşturma miktarı ve gerekse oluşan embriyoların bitkiye dönüşüm oranları göz önüne alındığında en uygun ortamın III nolu besin ortamı olduğu belirlenmiştir. 74 ve 109 nolu genotipler için ise en uygun ortam I nolu besin ortamı olarak görülmektedir. II nolu besin ortamı ise 269 ve 313 nolu genotiplerde başarılı bulunmuştur. Aynı dönemde kültüre alınan farklı genotiplere ait anterlerin farklı besin ortamlarında değişik tepkiler göstermesi ile ilgili bulgularımız, **Karakullukçu ve Abak, (1992), Mityko ve ark., (1995), Dias ve Martins, (1999), Çömlekçioğlu ve ark., (1999), Çömlekçioğlu ve ark., (2001), Ercan ve ark., (2001), Sayılır ve Özzambak, (2002), Çiner ve Tıprıdamaz, (2002), Büyükalaca ve ark., (2004)**'nın bulguları tarafından da desteklenmektedir.

Çizelge 4.1. Nisan döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları

Ortam No	Genotip	Globular embriyo sayısı (adet)	Olgun embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Bitkiye Dönüşüm. Oranı (%)
I	71	2	1	2	0
	74	4	1	1	60
	109	1	4	4	20
	269	3	0	1	0
	313	5	6	2	9.09
Toplam		15	12	10	18.52
II	71	0	0	-	0
	74	7	7	6	0
	109	0	0	-	0
	269	17	4	5	9.52
	313	1	9	3	20
Toplam		25	20	14	8.89
III	71	4	2	2	0
	74	0	1	1	0
	109	3	1	3	0
	269	11	15	8	7.69
	313	0	0	-	0
Toplam		18	19	14	8.11
IV	71	0	0	-	0
	74	0	0	-	0
	109	0	4	2	0
	269	34	17	16	5.88
	313	2	10	2	0
Toplam		36	31	20	4.48
Genel Toplam		94	82	58	8.52



Şekil 4.1. IV nolu besin ortamında 269 nolu genotipten oluşmuş olgun embriyoların görünümü



Şekil 4.2. I nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş globular embriyoların görünümü



Şekil 4.3. Farklı besin ortamları ve farklı genotiplerden elde edilmiş bitkicikler

4.1.2. Mayıs Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu

Mayıs döneminde ortamlara dikilen anterlerden elde edilen embriyolar ve bunların bitkiye dönüşüm oranları Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Embriyo (95 adet) oluşumu bakımından Mayıs ayında III nolu besin ortamından iyi sonuç alınmıştır. 74 nolu genotipte 52 adet embriyonun % 7.69'u, 313 nolu genotipte 38 adet embriyonun % 7.89'u bitkiye dönüşmüştür. Sözü edilen ortamda diğer genotiplerden embriyo elde edilememiştir. IV nolu besin ortamından ise 69 adet embriyo elde edilmiştir. 74 nolu genotipte 36 adet embriyonun % 22.22'si, 313 nolu genotipte 33 embriyonun % 9.09'u bitkiye dönüşmüştür. Diğer genotiplerde embriyo oluşumu sağlanamamıştır. I nolu besin ortamında 71 nolu genotipte 12 adet embriyo elde edilmiştir. II nolu besin ortamında embriyo oluşumu sağlanamamıştır. Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da Mayıs ayında kültüre alınan anterlerden elde edilen globular embriyo, olgun embriyo ve bitki resimleri görülmektedir.

Mayıs ayında kültüre alınan tüm genotiplerin anterlerinden denenen tüm ortamlardan toplam 54 adet globular embriyo ve 122 adet olgun embriyo elde edilmiştir. Oluşan bu embriyoların % 10.23'ü bitkiye dönüşmüştür. Tüm bitkiler hormonsuz MS içeren ortamlardan elde edilmiştir.

Mayıs ayında alınan anterlerden 313 nolu genotip için olgun embriyo oluşturma miktarı ve oluşan embriyoların bitkiye dönüşüm oranları bakımından en uygun ortamın III nolu besin ortamı olduğu belirlenmiştir. 109 ve 269 nolu genotiplerden ise hiçbir ortamda sonuç alınamamıştır. IV nolu besin ortamına en olumlu tepkiyi 74 nolu genotip vermiştir. 71 nolu genotip için ise II nolu besin ortamı başarılı bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Mayıs döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları

Ortam No	Genotip	Globular embriyo sayısı (adet)	Olgun embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Bitkiye Dönüşüm. Oranı (%)
I	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
II	71	4	8	4	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		4	8	4	0
III	71	0	5	2	0
	74	24	28	12	7.69
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	14	24	10	7.89
Toplam		38	57	24	7.37
IV	71	0	0	0	0
	74	9	27	14	22.22
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	3	30	14	9.09
Toplam		12	57	28	15.94
Genel Toplam		54	122	56	10.23



Şekil 4.4. III nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş olgun bir embriyonun görünümü



Şekil 4.5. IV nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş olgun ve globular embriyoların görünümü



Şekil 4.6. III nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş bir bitki görünümü

4.1.3. Haziran Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu

Çizelge 4.3.'de Haziran döneminde ortamlara dikilen anterlerin oluşturduğu globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları verilmiştir. Haziran ayında alınan anterlerde en yüksek embriyo (59 adet) oluşumu I nolu besin ortamından elde edilmiştir. Bu ortamda 269 nolu genotip en yüksek embriyo sayısını (26 adet) vermesine rağmen bitkiye dönüşüm oranı (%3.84) düşük olmuştur. 109 nolu genotipten 3 embriyonun tamamı, 71 nolu genotipten elde edilen 9 embriyonun 6'sı bitkiye dönüşmüştür. III nolu besin ortamında sadece 269 nolu genotipte 37 adet embriyo oluşumu sağlanmış, ancak bitkiye dönüşüm olmamıştır. IV nolu besin ortamında 71 nolu genotip en yüksek embriyo sayısını (10 adet) vermiş ve bu genotipte % 20 oranında bitkiye dönüşüm sağlanmıştır. II nolu besin ortamında ise 109 nolu genotipten 16, 269 nolu genotipten 3 adet embriyo elde edilmiş ancak bunların hiçbirinden de bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Diğer genotiplerden embriyo elde edilememiştir. Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da Haziran ayında kültüre alınan anterlerden elde edilen olgun embriyo ve bitki resimleri görülmektedir.

Haziran ayında kültüre alınan tüm genotiplerin anterlerinden denenen tüm ortamlardan toplam 80 adet globular embriyo ve 59 adet olgun embriyo elde edilmiştir. Oluşan bu embriyoların % 8.63'ü bitkiye dönüşmüştür ve bitkilerin hepsi hormonsuz MS ortamından elde edilmiştir.

Haziran ayında alınan anterlerden 71, 74, 109 ve 269 nolu genotiplerden I nolu besin ortamında daha fazla sayıda olgun embriyo ve bitki elde edilmiştir. 313 nolu genotip ise hiçbir ortama herhangi bir tepki vermemiştir.

Çizelge 4.3. Haziran döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları

Ortam No	Genotip	Globular embriyo sayısı (adet)	Olgun embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Bitkiye Dönüşüm. Oranı (%)
I	71	2	7	3	66.66
	74	13	8	9	0
	109	0	3	1	100
	269	18	8	10	3.84
	313	0	0	0	0
Toplam		33	26	23	16.95
II	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	16	3	0
	269	1	2	3	0
	313	0	0	0	0
Toplam		1	18	6	0
III	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	35	2	5	0
	313	0	0	0	0
Toplam		35	2	5	
IV	71	7	3	3	20
	74	3	3	3	0
	109	0	2	1	0
	269	1	5	4	0
	313	0	0	0	0
Toplam		11	13	11	8.33
Genel Toplam		80	59	45	8.63



Şekil 4.7. II nolu besin ortamında 109 nolu genotipten oluşmuş olgun bir embriyonun görünümü



Şekil 4.8. IV nolu besin ortamında 71 nolu genotipten oluşmuş olgun bir embriyonun görünümü



Şekil 4.9. III nolu besin ortamında 269 nolu genotipten oluşmuş bir bitki görünümü

4.1.4. Temmuz Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu

Temmuz döneminde hiçbir genotip ve ortamdan embriyo oluşumu sağlanamamıştır. Anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerden birisi de çevresel faktörlerdir. Çevresel faktörler içerisinde hava sıcaklığı çok önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle anter kültüründe çiçek tomurcuklarının bitkiden alındığı dönemdeki sıcaklık değerleri haploid embriyo oluşumunu etkilemektedir (**Tiainen, 1992, Kristiansen ve Andersen, 1993**). Temmuz ayında hava sıcaklıkları çok yükselmiştir. Maksimum sıcaklık değeri 33.4°C, ortalama sıcaklık değeri ise 27.8°C olmuştur (Şekil 3.6). Bu dönemde kültüre alınan anterlerde, hiçbir ortam ve genotipte embriyo elde edilememesinin nedeninin yüksek sıcaklıktan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu düşünce literatürler bulguları ile uyum içerisindedir. Ayrıca temmuz ayında hiçbir ortam ve genotipten tepki alınamamasının bir nedeninin de bitki yaşı olduğu düşünülmüştür. **Dunwell, (1976)** tütünde yapmış olduğu anter kültürü çalışmasında embriyo oluşumu ve olgunlaşmasında ebeveyn bitki yaşının önemli olduğunu bulmuştur. Bu da çalışmada elde edilen sonuçlarla uyum içerisindedir.

4.1.5. Ağustos Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu

Ağustos döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Bu dönemde sadece 313 nolu genotipten alınan anterlerden II nolu besin ortamında 4 adet embriyo elde edilmiştir. Embriyolardan bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Şekil 4.10'da Ağustos ayında kültüre alınan anterlerden elde edilen globular embriyo, olgun embriyo ve bitki resimleri görülmektedir.

Ağustos ayında kültüre alınan tüm genotiplerin anterlerinden, denenen tüm ortamlardan toplam 4 adet globular embriyo elde edilmiştir. Olgun embriyo oluşumu gözlemlenememiştir. Ağustos ayında hava sıcaklıkları yine yüksek olmuştur. Maksimum sıcaklık değeri 32.7°C, ortalama sıcaklık değeri ise 23.6°C olmuştur. **Tiainen, (1992)** patatesta Ağustos ayından Temmuz ayına kadar her ay anterleri kültüre almıştır. Çalışmanın sonucunda ayların embriyo veriminde etkili olduğunu bulmuştur. Düşük embriyo elde edilmesinin nedeninin yüksek sıcaklıktan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu embriyolardan bitki oluşumu da sağlanamamıştır.

Çizelge 4.4. Ağustos döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları

Ortam No	Genotip	Globular embriyo sayısı (adet)	Olgun embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Bitkiye Dönüşüm. Oranı (%)
I	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
II	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	4	0	1	0
Toplam		4	0	1	0
III	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
IV	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
Genel Toplam		4	0	1	0

4.1.6. Eylül Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu

Eylül döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Eylül ayında alınan anterlerden en yüksek embriyo (17 adet) oluşumu I nolu besin ortamından elde edilmiştir. 109 nolu genotipten 6 adet, 313 nolu genotipten 5 adet, 74 nolu genotipten 3 adet, 269 nolu genotipten 2 adet ve 71

nolu genotipten 1 adet embriyo elde edilmiş, ancak bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. II nolu besin ortamında 74 nolu genotipten 7 adet ve 269 nolu genotipten 6 adet embriyo elde edilmiş fakat bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. III nolu besin ortamı ve IV nolu besin ortamlarında başarı elde edilememiştir. Şekil 4.11’de Eylül ayında kültüre alınan anterlerden elde edilen embriyoya ait görüntüler yer almaktadır.

Eylül ayında kültüre alınan tüm genotiplerin anterlerinden, denenen tüm ortamlardan toplam 9 adet globular embriyo ve 21 adet olgun embriyo elde edilmiştir. Hormonsuz MS ve ABA içeren MS ortamında bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Bitkiye dönüşüm oranı hem ortamdan hem de genotipten etkilenmektedir (**Chuong ve Beversdorf, 1985, Morrison ve ark., 1988, Karakullukçu ve Abak, 1992, Mityko ve ark., 1995**).

Çizelge 4.5. Eylül döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları

Ortam No	Genotip	Globular embriyo sayısı (adet)	Olgun embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Bitkiye Dönüşüm. Oranı (%)
I	71	1	0	1	0
	74	0	3	1	0
	109	3	3	1	0
	269	0	2	1	0
	313	3	2	1	0
Toplam		7	10	5	0
II	71	0	0	-	0
	74	0	7	4	0
	109	0	0	-	0
	269	2	4	3	0
	313	0	0	-	0
Toplam		2	11	7	0
III	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
IV	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
Genel Toplam		9	21	12	0



Şekil 4.10. I nolu besin ortamında 109 nolu genotipten oluşmuş embriyoların görünümü

Ekim ayında yaz periyodunu geçirmiş olan bitkilerde yaşlanma nedeniyle anter alınacak tomurcuk elde edilememiştir. Kasım ayından itibaren Çizelge 3.1.'de de belirtildiği gibi 15 Ekimde dikimi yapılan bitkilerden tomurcuk alımı yapılmıştır.

4.1.7. Kasım Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu

Kasım döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları Çizelge 4.6'da verilmiştir. Bu dönemde alınan 313 nolu genotipe ait anterlerde I nolu besin ortamında 22 adet embriyo oluşumu sağlanmış ancak bitkiye dönüşüm olmamıştır. Ayrıca IV nolu besin ortamında 269 nolu genotipte 1 adet embriyo oluşumu sağlanmış, bu da bitkiye dönüştürülememiştir. Şekil 4.12'de Kasım ayında kültüre alınan anterlerden elde edilen embriyonun görünümü yer almaktadır.

Kasım ayında kültüre alınan tüm genotiplerin anterlerinden, denenen tüm ortamlardan toplam 19 adet globular embriyo ve 4 adet olgun embriyo elde edilmiştir.

Çizelge 4.6. Kasım döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları

Ortam No	Genotip	Globular embriyo sayısı (adet)	Olgun embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Bitkiye Dönüşüm. Oranı (%)
I	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	18	4	3	0
Toplam		18	4	3	0
II	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
III	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
IV	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	1	0	1	0
	313	0	0	0	0
Toplam		1	0	1	0
Genel Toplam		19	4	4	0



Şekil 4.11. I nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş embriyoların görünümü

4.1.8. Aralık Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu

Aralık döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları Çizelge 4.7’de verilmiştir. III nolu besin ortamında 74 ve 313 nolu genotiplerden sırasıyla 7 ve 14 adet embriyo elde edilmiştir ancak bunların bitkiye dönüşümü sağlanamamıştır. Diğer genotiplerden embriyo elde edilememiştir. I nolu, II nolu ve IV nolu besin ortamlarında hiçbir genotipten embriyo elde edilememiştir.

Aralık ayında kültüre alınan tüm genotiplerin anterlerinden denenen, tüm ortamlardan toplam 9 adet globular embriyo ve 12 adet olgun embriyo elde edilmiştir. Oluşan bu embriyolarda bitkiye dönüşüm olmamıştır.

Çizelge 4.7. Aralık döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları

Ortam No	Genotip	Globular embriyo sayısı (adet)	Olgun embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Bitkiye Dönüşüm. Oranı (%)
I	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
II	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
III	71	0	0	0	0
	74	6	1	4	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	3	11	3	0
Toplam		9	12	7	0
IV	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
Genel Toplam		9	12	7	0



Şekil 4.12. III nolu besin ortamında 313 nolu genotipten oluşmuş embriyoların görünümü

4.1.9. Ocak Ayında Alınan Anterlerde Embriyo Oluşumu

Çizelge 4.8’de Ocak döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları verilmiştir. Ocak döneminde yapılan çalışmada sadece I nolu besin ortamından embriyo elde edilebilmiştir. Bu ortamda 313 nolu genotipten 2 adet, 269 nolu genotipten 2 adet, 74 nolu genotipten 1 adet ve 109 nolu genotipten de 1 adet olmak üzere toplam 6 embriyo elde edilebilmiştir.

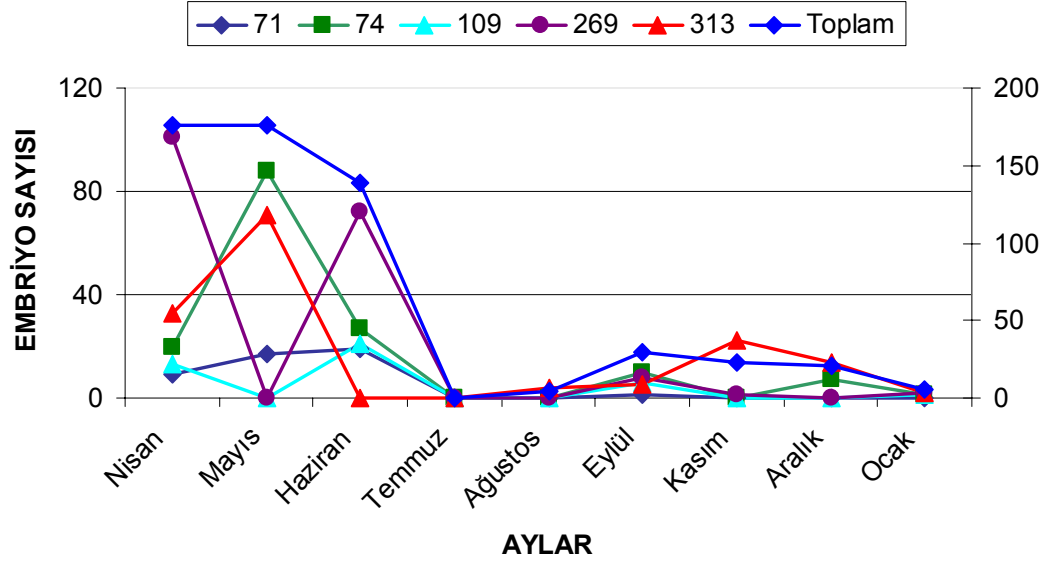
Ocak ayında kültüre alınan tüm genotiplerin anterlerinden, denenen tüm ortamlardan toplam 1 adet globular embriyo ve 5 adet olgun embriyo elde edilmiştir.

Çizelge 4.8. Ocak döneminde ortamlara dikilen anterlerin globular embriyo sayısı, olgun embriyo sayısı, embriyo oluşturan anter sayısı ve bitkiye dönüşüm oranları

Ortam No	Genotip	Globular embriyo sayısı (adet)	Olgun embriyo sayısı (adet)	Embriyo oluşturan anter sayısı (adet)	Bitkiye Dönüşüm. Oranı (%)
I	71	0	0	-	0
	74	0	1	1	0
	109	1	0	1	0
	269	0	2	2	0
	313	0	2	1	0
Toplam		1	5	5	0
II	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
III	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
IV	71	0	0	0	0
	74	0	0	0	0
	109	0	0	0	0
	269	0	0	0	0
	313	0	0	0	0
Toplam		0	0	0	0
Genel Toplam		1	5	5	0

Şekil 4.13’ de genotiplerin aylara göre toplam embriyo sayıları ve genotiplerin hepsinin toplamı olan embriyo sayısının aylara göre dağılımı görülmektedir. Şekil, toplam embriyo sayısının ve genotiplerin durumunun daha rahat görülebilmesi için çift eksenli olarak çizilmiştir. Şekil 4.14.’ de de görüldüğü gibi Nisan, Mayıs, Haziran aylarında embriyo sayısı fazlayken, Temmuz ayında embriyo elde edilememiştir. Ağustos ve Eylül aylarında da çok az embriyo elde edilmiştir. Bu dönemde hava sıcaklıklarının çok yüksek olmasının embriyo oluşumunu olumsuz etkilediği düşünülmüştür (Tiainen, 1992, Kristiansen ve

Andersen, 1993). Kasım, Aralık ve Ocak aylarında ise embriyo oluşumu sağlanmıştır. Fakat Nisan, Mayıs ve Haziran aylarındaki gibi fazla sayıda embriyo elde edilememiştir.



Şekil.4.13. Genotiplerden elde edilen embriyo sayısının ve toplam embriyo sayısının aylara göre dağılımı

4.2. Denenen Ortam ve Genotiplerin Embriyo Oluşturma Oranları

I nolu besin ortamında en fazla embriyo 313 nolu genotipten elde edilmiştir (40 adet). En az embriyo (13 adet) ise 71 nolu genotipten alınmıştır. 269 nolu genotipte 33 adet, 74 nolu genotipte 30 adet, 109 nolu genotipte ise 14 adet embriyo oluşumu gözlemlenmiştir. Hem globular embriyo (26 adet) hem de olgun embriyo (14 adet) oluşturma açısından en başarılı genotip 313 nolu genotip olmuştur. I nolu besin ortamında 74 adet globular ve 56 adet olgun olmak üzere toplam 130 adet embriyo elde edilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü gibi aynı besin ortamında genotiplerin anter kültürüne tepkisi farklı olmuştur. Bu sonuçlar değişik türlerde anter kültürü çalışmaları yapan **Abak (1986), Morrison ve ark, (1986), Li ve ark,**

(1988), Mityko ve ark, (1995), Zagorska ve ark, (1998), Gemesne Juhasz ve ark, (2001)'nın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

II nolu besin ortamında 36 adet globular ve 57 adet olgun embriyo alınmıştır (toplam 93 adet). En az embriyo (12 adet) 71 nolu genotipten elde edilirken, en fazla embriyo (30 adet) 269 nolu genotipte gözlemlenmiştir. 74 nolu genotipten 21 adet, 109 nolu genotipten 16 adet, 313 nolu genotipten ise 14 adet embriyo elde edilmiştir. En fazla globular embriyo 269 nolu genotipte gözlemlenirken, en fazla olgun embriyo 109 nolu genotipte gözlemlenmiştir.

III nolu besin ortamında en fazla globular embriyo (46 adet) 269 nolu genotipten elde edilmiştir. En fazla olgun embriyo (35 adet) ise 313 nolu genotipten elde edilmiştir. En az embriyo (4 adet) 109 nolu genotipte gözlemlenirken, en fazla embriyo (63 adet) 269 nolu genotipte gözlemlenmiştir. 74 nolu genotipte 60 adet, 313 nolu genotipte 52 adet , 71 nolu genotipte ise 11 adet embriyo oluşmuştur. Bu ortamda 100 adet globular ve 90 adet olgun embriyo olmak üzere toplam 190 adet embriyo elde edilmiştir.

IV nolu besin ortamında en fazla olgun embriyo (40 adet) 313 nolu genotipten elde edilmiştir. En fazla globular embriyo (36 adet) ise 269 nolu genotipten alınmıştır. 313 nolu genotipten 45 adet, 74 nolu genotipten 42 adet, 71 nolu genotipten ise 10 adet embriyo elde edilmiştir. En fazla embriyo (58 adet) 269 nolu genotipten alınırken, en az embriyo (6 adet) 109 nolu genotipten alınmıştır. Bu ortamdan 161 adet embriyo elde edilmiştir

Kullanılan besin ortamları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise en fazla embriyo (190 adet) III nolu besin ortamından alınmıştır. Anter kültüründe genel olarak ilk aşamada gametofitik dokuları sporofitik gelişmeye dönüştürme yönünde uyuracak oksinler gerekli iken; bitkiciğe dönüşüm aşamasında sitokininlerin varlığına gerek duyulur (Ellialtıoğlu ve ark., 2002). Bizim değişik düzeylerde BAP içeren ortamlar arasında 1.0 mg/l BAP içeren MS besin ortamının olumlu sonuçlar vermesi literatür bilgileri ile uyum içerisinde olmuştur. En az embriyo (93 adet) ise II nolu besin ortamından elde edilmiştir. IV nolu besin ortamında 161 adet, I nolu besin ortamında 130 adet embriyo oluşumu sağlanmıştır. En fazla globular embriyo (100 adet) III nolu besin ortamında sağlanırken, En az globular embriyo (36 adet) ise II

nolu besin ortamında sağlanmıştır. En fazla olgun embriyo (101 adet) IV nolu besin ortamından elde edilmiştir. En az olgun embriyo (56 adet) ise III nolu besin ortamında gözlemlenmiştir.

71 nolu genotipten tüm besin ortamlarında benzer sonuçlar alınmıştır. I nolu besin ortamında 13 adet, II nolu besin ortamında 12 adet, III nolu besin ortamında 11 adet ve IV nolu besin ortamında 10 adet olmak üzere toplam 46 adet embriyo oluşumu sağlanmıştır.

74 nolu genotipten en fazla embriyo (60 adet) III nolu besin ortamında sağlanmıştır. En az embriyo (21 adet) ise II nolu besin ortamından elde edilmiştir. IV nolu besin ortamından 42 adet, I nolu besin ortamından 30 adet embriyo elde edilmiştir. Bu genotipten toplam 153 adet embriyo oluşumu sağlanmıştır.

En az embriyo 109 nolu genotipten elde edilmiştir. I nolu besin ortamında 14 adet, II nolu besin ortamında 16 adet, III nolu besin ortamında 4 adet, IV nolu besin ortamında 6 adet olmak üzere toplam 40 adet embriyo oluşumu sağlanabilmiştir. Aynı genotip değişik besin ortamlarına çok değişik tepkiler göstermiştir. Anter kültüründe besin ortamı çok önemlidir. **Büyükalaca, (1993), Çömlekçiöğlu ve ark, (1999) ve Terzioğlu ve ark, (2000)**’ da yaptıkları çalışmalarda besin ortamının önemli olduğunu bulmuşlardır.

En fazla embriyo oluşumu 269 nolu genotipte olmuştur. I nolu besin ortamında 33 adet, II nolu besin ortamında 30 adet, III nolu besin ortamında 63 adet, IV nolu besin ortamında 58 adet olmak üzere toplam 184 adet embriyo elde edilmiştir.

313 nolu genotipte en fazla embriyo (52 adet) III nolu besin ortamında elde edilmiştir. En az embriyo (14 adet) ise II nolu besin ortamında sağlanmıştır. IV nolu besin ortamında 45 adet, I nolu besin ortamında 40 adet embriyo gözlemlenmiştir. Bu genotipten toplam 151 adet embriyo elde edilmiştir.

Embriyo oluşumu (184 adet) bakımından en başarılı genotip 269 nolu genotip olmuştur. En az embriyo (40 adet) ise 109 nolu genotipten alınmıştır. 313 nolu genotip (151 adet embriyo) ile 74 nolu genotipten (153 adet embriyo) yaklaşık sayıda embriyo elde edilmiştir. 71 nolu genotipten ise 46 adet embriyo oluşumu sağlanabilmiştir.

Çizelge 4.9. Kullanılan besin ortamlarının embriyo oluşumuna etkisi

Genotip	I nolu ortam		II nolu ortam		III nolu ortam		IV nolu ortam		Toplam	
	G. E. S. (adet)	O. E. S. (adet)	G. E. S. (adet)	O. E. S. (adet)	G. E. S. (adet)	O. E. S. (adet)	G. E. S. (adet)	O. E. S. (adet)	G. E. S. (adet)	O. E. S. (adet)
71	5	8	4	8	4	7	7	3	20	26
74	17	13	7	14	30	30	12	30	66	87
109	5	9	0	16	3	1	0	6	8	32
269	21	12	20	10	46	17	36	22	123	61
313	26	14	5	9	17	35	5	40	53	98
TOPLAM	74	56	36	57	100	90	60	101	270	304

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Biber anter kültüründe genotip, besin ortamı ve mevsimin embriyo verim ve kalitesine etkisini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada düşük sıcaklığa tolerant olarak belirlenen 71, 269, 313 nolu genotipler, orta derecede tolerant olarak belirlenen 109 nolu genotip ve hassas olarak belirlenen 74 nolu genotip olmak üzere 5 adet genotip, 4 adet besin ortamı (0.1 mg/l BAP içeren MS ortamı, 0.5 mg/l BAP içeren MS ortamı, 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamı ve modifiye edilmiş MS ortamı) kullanılmıştır. Bu genotiplerde ve besin ortamlarında anter kültürü yöntemi ile haploid embriyo elde edilmesi, elde edilen haploid embriyoların bitkiye dönüşümünün arttırılması amacıyla da MS ortamına eklenen 0.5 mg/l ABA'nın etkisinin belirlenmesine çalışılmıştır. Çalışma farklı zamanlarda (Nisan, Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül, Kasım, Aralık, Ocak) tekrarlanarak değişik dönemlerin embriyo verim ve kalitesine etkileri araştırılmıştır.

Araştırmadan elde edilen bulgular aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- 1) Deneme sonucunda, 269 nolu genotip (184 adet embriyo) ile 313 nolu genotip (151 adet embriyo) en yüksek embriyo oluşturan genotipler olarak bulunmuştur. Elde edilen embriyoların % 67'si spontan diploid olarak oluşmuştur. Biber anter kültüründe spontan diploid oluşumu diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Sibi ve ark., 1979, Vaultx ve ark., 1981, Mityko ve ark., 1995, Gemesne Juhasz ve ark., 2001). Düşük sıcaklığa orta derecede tolerant olarak belirlenen 109 nolu genotip ise en az embriyo (40 adet embriyo) veren genotip olmuştur.
- 2) Besin ortamları içerisinde ise en başarılı sonuçlar III nolu besin ortamı (MS + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 1 mg/l BAP) ile IV nolu besin ortamından (modifiye edilmiş MS + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 0.1mg/l BAP) alınmıştır. En az embriyo (109 adet embriyo) ise II nolu ortamdan (MS + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP) elde edilmiştir.
- 3) Genotip ve besin ortamları birlikte değerlendirildiği zaman en yüksek embriyo verimi (63 adet embriyo) III nolu ortamda (MS + 30 g/l sakkaroz + % 0.25 aktif kömür + 15 mg/l AgNO₃ + 4 mg/l NAA + 1 mg/l BAP) düşük sıcaklığa tolerant

olarak belirlenen 269 nolu genotipten elde edilmiştir. Bu genotipin düşük sıcaklığa toleranslı olması yapılan çalışmanın daha ileri aşamalara taşınabilmesi açısından önem kazanmıştır. Soğuğa toleranslı genotiplerden elde edilen homozigot saf hatlar kolhisinle dihaploid hale getirilerek, düşük sıcaklığa toleranslı çeşitlerin geliştirilmesi ile ilgili ıslah çalışmalarında kullanılabilecektir.

4) Değişik zamanlarda yapılan anter ekimlerinde ise en başarılı sonuçlar Nisan (176 adet embriyo) ve Mayıs (176 adet embriyo) aylarından alınmıştır. Donör bitkinin yetiştirme koşulları anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler arasında önemli bir yere sahiptir. Sıcaklık, ışık yoğunluğu, CO₂ konsantrasyonu, günlük ışıklandırma süresi gibi çevresel faktörler donör bitkilerden alınan anterlerdeki embriyo verim ve kalitesinde önemli derecede etkilidir. Nisan ve Mayıs aylarında çevresel faktörler optimum olduğu için bu aylarda alınan anterlerdeki embriyo veriminin yüksek olduğu düşünülmüştür. Değişik mevsimlerin ve bu mevsimlerdeki hava sıcaklığı değerlerinin embriyo oluşumuna etkisi ile ilgili bulgularımız **Tiainen, (1992), Kristiansen ve Anderson, (1993)**' un bulguları ile uyum içerisindedir.

5) Nisan ayında oluşan 80 adet olgun embriyonun %8.52'si bitkiye dönüşebilirken, Mayıs ayında 54 adet olgun embriyonun %10.23'ü bitkiye dönüşebilmiştir. Haziran ayında ise 80 adet olgun embriyonun %8.63'ü bitkiye dönüşebilmiştir. Nisan ve Haziran aylarında yaklaşık aynı sayıda olgun embriyo elde edilmiştir ve bunların bitkiye dönüşüm oranı birbirine çok yakın olmuştur. Mayıs ayında ise daha az sayıda olgun embriyo oluşumu sağlanırken bitkiye dönüşüm daha yüksek olmuştur. Diğer aylarda bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. **Mityko ve ark, (1995)** biberde 4 ıslah hattı, 7 kültür çeşidi ve bunların melezlerinin anter kültürüne tepkilerini incelemişlerdir. İki kültür çeşidinde bitkiye dönüşüm sağlayamamışlardır.

6) Çalışmamızda kültüre alınan ortamlarda gelişmesini tamamlayamayan embriyolar 10 gün süresince 0.5 mg/l ABA içeren besin ortamına alınarak ABA'in embriyo olgunlaşmasına etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. 10 gün sonra embriyolar ABA'li ortamdan alınarak hormonsuz MS ortamında transfer edilmişlerdir. ABA uygulamasından olumlu bir sonuç alınamamıştır. ABA'in etkisinin görülememesinin nedeni olarak kullanılan konsantrasyonun düşük olması akla gelen ilk olasılıktır. ABA'in embriyo olgunlaşmasına ve bitkiye dönüşümüne etkili olabilmesi için

yapılan çalışmalarda, kullanılan genotipler için konsantrasyonun çok önemli olduğu bildirilmiştir (**Johansson 1983; Pulman ve ark., 2005**). Ayrıca kullanılan ortamda aktif karbon bulunması durumunda ABA'ın etkisinin görülebilmesi için konsantrasyonun 10-40 mg/l arasında kullanılmasının gerektiği fakat bu değerin genotipe ve ABA uygulamasının süresine bağlı olduğu bazı araştırıcılar tarafından belirtilmiştir (**Li ve ark., 1997,1998; Capuana ve Debergh, 1997; Pulman ve ark., 2005**). Yapılan bazı çalışmalarda ise ABA'ın etkisinin ortaya çıkabilmesi için osmotik ayarlayıcı olarak PEG ile birlikte kullanılması gerektiği rapor edilmiştir. (**Attree ve ark., 1995; Robichoud ve ark., 2004**). ABA'ın farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı bazı çalışmalarda ise denenen konsantrasyonların hiçbirinde ABA'nın etkisi görülmemiştir (**Vieitez, 1995; Xing ve ark., 1999, Robichaud ve ark., 2004**). Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda değişik ABA konsantrasyonları ve uygulama süreleri kullanıldığında daha başarılı sonuçlar alınabileceği dşnlmştir. Ayrıca diğer bazı türlerde ABA ile PEG'in birlikte kullanılması durumunda, embriyo olgunlaşması ve bitkiye dönüşüm oranı artmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda ABA ile PEG'in birlikte kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Araştırmadan elde edilen bulgulara dayanarak, denemede kullanılan genotiplerde haploid embriyo uyartımının sağlanabilmesi ve embriyo kalitesinin artırılabilmesi için, her genotip için uygun besin ortamının, dönemin, ABA konsantrasyonunun ve ABA ile muamele sresinin saptanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- ABAK, K., 1983.** Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki elde etme üzerinde araştırma. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı. Cilt: 33, Fasikül 1-2-3-4'den ayrı basım, 155-163.
- ABAK, K., 1986.** Biber ıslahında anter kültüründen yararlanma. Tubitak Bitki Islahı Sempozyumu Bildiri Özetleri, 15-17 Ekim, İzmir.
- AMMİRATO, P.V., 1977.** Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. *Plant Physiology*, 59: 579-586.
- ANDREWS, J., 1985.** Peppers. The Domesticated Capsicum. University. of Texas Pres, Box 7819 Austin, Texas 78713.
- ANONYMOUS, 2002.** <http://www.fao.org>.
- ATTREE, S.M., TAUTORUS, T.E., DUNSTAN, D.J., and FOWKE, L.C., 1990.** Somatic embryo maturation, germination and soil establishment of plants of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). *Can J Bot*, 68:2583-2589.
- ATTREE, S.M., POMEROY, M.K., and FOWKE, L.C., 1995.** Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. *J Exp Bot*, 46:433-439.
- AYAR, F., 2003.** Bazı biber (*Capsicum annuum* L.) çeşitlerinde anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde edilmesinde mevsimin ve bitki yaşının etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 82.
- AYAR, F., KURUM, R., ERCAN, N., ONUS, A.N., ve POLAT, E., 2000.** Brokkolide (*Brassica oleraceae* var. *Italica*) haploid bitki eldesi için yapılan anter kültüründe farklı sıcaklık, ortam ve kesim uygulamalarının etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu, 11-13 Eylül, Isparta, 223-227.
- BAJAJ, Y.P.S., 1990.** Haploids in crop improvement. I. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol: 12, Berlin, Germany; Springer-Verlag.

- BİNER, B., ERCAN, N., ve AKILLI, M., 2001.** Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine farklı sıcaklık ve ışık uygulamalarının etkileri. GAP II. Tarım Kongresi, 24-26 Ekim, Şanlıurfa, Cilt 1:47-54.
- BÜYÜKALACA, S., 1993.** Somatic embryogenesis of *Capsicum annuum* L. (Sweet pepper). Doctor of Phil. Thesis, Univ. of Manchester, Fac. of Technology, Dept. of Chemical Engineering, 265.
- BÜYÜKALACA, S., ÇÖMLEKÇİOĞLU, N., ABAK, K., EKBİÇ, E., and KILIÇ, N., 2004.** Effect of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. Europ. J. Hort. Sci., 69 (5):206-209.
- CAO, M.Q., LI, Y., LIU, E., JIANG, T., LIU, G.S., NISHIO, T., and DORE, C., 1995.** Application of anther culture and isolated microspore culture to vegetable crop improvement. Acta Horticulturae, 392:27-28.
- CAPUANA, M., and DEBERGH, P.C., 1997.** Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. Plant Cell Tissue Organ Culture, 48:23-29.
- CHAMBONNET, D., 1988.** Production of haploid pepper plants. Bulletin interne de la station d'Amelioration des Plantes Maraicheres d'Avignon-Montfavet, France, 1-10.
- CHUONG, P.V., and BEVERSDORF, W.D., 1985.** High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* braun. Plant Science, Volume 39, 3:219-226.
- ÇİNER, D. ve TIPIRDAMAZ, R., 2002.** The effects of cold treatment and charcoal on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turkish Journal of Botany*, 26:131-139.
- ÇÖMLEKÇİOĞLU, N., BÜYÜKALACA, S., ve ABAK, K., 1999.** Şanlıurfa ve Kahramanmaraş biber populasyonlarında anter kültürü yöntemiyle haploid bitki elde etme olanakları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ankara, 897-900.

- ÇÖMLEKÇİOĞLU, N., BÜYÜKALACA, S., and ABAK, K., 2001.** Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum*). XIth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant, 2001, Antalya-Turkey.
- DARLINGTON, C.D. and LA COUR, L.F., 1963.** Methoden der chromosomen untersuchungen. Frankische Verlagshandlung. W. Kellerund Ca. Stuttgart.
- DIAS, J.S., and MARTINS, M.G., 1999.** Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *Brassica oleracea* morphotypes. Scientia Horticulturae 82:299-307.
- DUMAS DE VAULX, R., CHAMBONNET, D., and SIBI, M., 1981.** Culture *in vitro* d'antheres de piment (*Capsicum annuum* L.): amelioration des taux d'obtention de plantes chez differents genotypes par de traitements A+35°C. Agronomie, 11:859.
- DUNSTAN, D.I., BEKKAOUİ, F., PILON, M., FOWKE, L.C., and ABRAM, S.R., 1988.** Effects of abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. Plant Science, 58:77-84.
- DUNWELL, J.M., 1976.** A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction an growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. Enwironmental and Experimental Botany, 16:109-118.
- DUNWELL, J.M., 1981.** Influence of genotype and environment on growth of barley embryos *in vitro*. Ann. Bot, 48:535-542.
- ELÇİ, Ş., 1982.** Research methods and observation in cytogenetic. Yüzüncü Yıl Unv., 8:66-70.
- ELLİALTIOĞLU, Ş., KAPLAN, F., and ABAK, K. 2001.** The effect of carrot extract and activated charcoalon the androgenesis of pepper. XIth EUCARPIA Meeting on Genetic and Breeding of Capsicum and Eggplant, Antalya-Turkey, 142-145.
- ELLİALTIOĞLU, Ş., SARI, N., ve ABAK,K., 2002.** Haploid Bitki Üretimi. (M. BABALOĞLU, E. GÜREL ve S. ÖZCAN editörleri). Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 137-189.

- ERCAN, N., BOYACI, F., ve AYAR, F., 2001.** Biberde (*Capsicum annuum* L.) anter kültürü yoluyla haploid bitki eldesi üzerine farklı besin ortamlarının etkisi. GAP II. Tarım Kongresi, 24-26 Ekim, Şanlıurfa, Cilt 1,121-128.
- FUJİİ, J.A.A., SLADE, D., OLSEN, R., RUZİN, S.E, and REDENBAUGH, K., 1990.** Alfaalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. Plant Science, 72:93-110.
- GEMESNE JUHASZ, A., PETUS, M., VENZCEL, H., SAGI, Z.S., and ZATYKO, L., 2001.** Colchicine, an efficient genome doubling agent for anther derived haploid paprika (*Capsicum annuum* L.) plants. XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Caosicum&Eggplant, Antalya, 146.
- GREENLEAF, W.H., 1986.** Pepper Breeding. Breeding Vegetable Crops. A.V.I., 67-127.
- GUHA, S., and MAHESWARI, S.C. 1964.** *In vitro* production of embryos from anthers of datura. Nature, 204-497.
- GUZMAN, M., and ARIAS, F.J.Z., 2000.** Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants. Plant Science, 151:107-114.
- HATİPOĞLU, R., 1997.** Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190. Ders Kitapları Yayın No: A-58.
- HEISER, C.B.JR., 1976.** Peppers, In Evoluation of Crop Plants. (Edited by N. W. Simmands, 1986). Longman Sci.& Tech. Report, 265-268.
- IBPGR, 1983.** Genetic resources of *Capsicum*, IBPGR Secretariat, Rome, 49.
- JOHANSSON, L., 1983.** Effects of activated carbon in anther cultures. Physiol Plant, 59:397-403.
- KALLOO, D., 1986.** Vegetable Breeding Volume III. CRC Press. Inc. Boca raton, Florida, 136-140.
- KARAKULLUKÇU, Ş., ve ABAK, K., 1992.** Bazı patlıcan çeşitlerinin anter kültürüne tepkileri. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yıllığı. Vol:42, Fasikül no: 1-2-3-4.
- KARAKULLUKÇU, Ş., ve ABAK, K., 1993.** Patlıcanda anter kültürü üzerinde araştırmalar. I. Şeker ve büyümeyi düzenleyicilerin etkileri. *Doğa- Turkish Journal of Agricultural and Forestry*, 17:811-820.

- KRISTIANSEN, K., and ANDERSEN, B., 1993.** Effect of donor plant temperature, photoperiod and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphatica* 67:105-109.
- KUMAR, H.G.A., MURTHY, H.N., and PAEK, K.Y., 2003.** Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia Horticulturae*. 98:213-222.
- KUMRIA, R., SUNNICHAN, V.G., DAS, D.K., GUPTA, S.K., REDDY, V.S., BHATNAGAR, R.K., and LEELAVATHI, S., 2003.** High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. *Plant Cell Rep.*, 21:635-639.
- LECOUTEUX, C.G., LAI, F.M., and MCKERSIE, B.D., 1993** Maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos by abscisic acid, sucrose and chilling stress. *Plant Sci*, 94:207-213.
- LENTINI, Z., REYES, P., MARTÍNEZ, C.P., and ROCA, W.M., 1995.** Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Science*, Volume 110, 1:127-128.
- LI, H., QURESHI, J.A., and KARTHA, K.K., 1988.** The influence of different temperature treatments on anther culture response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.*, 57:55-61.
- LI, X.Y., HUANG, F.H., EDWARD, E., and GBUR, J., 1997.** Polyethylene glycol-promoted development of somatic embryos in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 33:184-189.
- LI, X.Y., HUANG, F.H., MURPHY, B.J., and GBUR, J., 1998.** Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 34:22-26.
- MADAKADZE, R.M., and SENARATNA, T., 2000.** Effect of growth regulators on maturation of geranium (*Pelargonium x hortorum*) somatic embryos. *Plant Growth Regulation*, 30:55-60.
- MITYKO, J., ANDRASZALVY, A., CSILLERY, G., and FARI, M., 1995.** Anther culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding*, 114:78-80.

- MORRISON, R., KONING, R.E., and EVANS, D.A., 1986.** Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. J. Plant Physiol, 126:1-9.
- MURASHIGE, T., and SKOOG, F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15:473-497.
- NAIR, R.R., and GUPTA, S.D., 2003.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in black pepper (*Piper nigrum* L.): I. Direct somatic embryogenesis from tissues of germinating seeds and ontogeny of somatic embryos. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 78:416-421.
- PULLMAN, G.S, GUPTA, P.K., TIMMIS, R., CARPENTER, C., KREITINGER, M., and WELTY, E., 2005.** Improved norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. Plant Cell Reports,
- ROBİCHAUD, R.L., LESSARD, V.C., and MERKLE, S.A., 2004.** Treatments affecting maturation and germination of American chestnut somatic embryos. Journal of Plant Physiology, 161:957-969.
- REINERT, J., and BAJAJ, Y.P.S., 1977.** Anther Culture: Haploid Production and Its Significance In: Bajaj (Ed) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture.
- REYNOLDS, T.L., 1989.** Ethylene effects on pollen callus formation and organogenesis in anther cultures of *Solanum carolinense* L. Plant Science, 61:131-136.
- SAMSUDEEN, K., BABU, K.N., DIVAKARAN, M., and RAVINDRAN, P.N., 2000.** Plant regeneration from anther derived callus cultures of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Journal of Horticultural Science&Biotechnology, 75(4):447-450.
- SAYILIR, A., ve ÖZZAMBAK, E., 2000.** Brokkolide anter kültürü denemeleri. III. Sebze Tarımı Sempozyumu, Isparta, 218-222.
- SAYILIR, A., ve ÖZZAMBAK, E., 2002.** Biber anter kültüründe uygun tomurcuk büyüklüğü tespiti ile besin ortamları karışımlarının ve soğuk uygulama sürelerinin embriyo verimine etkisi üzerine bir araştırma. IV. Sebze Tarımı Sempozyumu, Bursa.

- SENARATNA, T., MCKERSİE, B.D., and BOWLEY, S.R., 1989.** Desiccation tolerance of alfaalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos, influence of abscisic acid, stress pretreatment and drying rates. *Plant Sci.*, 65:253-259.
- SIBI, M., VAULX, D.R., and CHAMBONNET, B., 1979.** Obtention de plantes haploides par androgenèse *in vitro* chez le Piment (*Capsicum annuum* L.). *Ann Amel Plantes*, 29: 583-606.
- SOMOS, A., 1984.** The paprika. Akademia Kiado, Budapest, 302.
- TERZİOĞLU, Ş., ELLİALTIOĞLU, Ş., ve ABAK, K., 2000.** İnkübasyon koşullarının biber anter kültüründe embriyo oluşumu üzerine etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu, Isparta, 233-238.
- TIAINEN, T., 1992.** The influence of culture conditions on anther culture response of commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30:211-219.
- VAULX, D.R., CHAMBONNET, D., and POCHARD, E., 1981.** Culture *in vitro* d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à +35°C. *Agronomie*, 1:859-864.
- VEILLEUX, R.E., 1994.** Development of new cultivars via anther culture. *Hortscience*, Vol 29 (11):1238-1241.
- VİEİTEZ, F.J., 1995.** Somatic embryogenesis in chestnut. In: Jain S, Gupta P, Newton R, editors. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 375-407.
- WANG, Y.Y., SUN, C.S., WANG, C.C. and CHIEN, N.J., 1973.** The induction of pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. *Sci. Sin* 16: 147-151.
- ZAGORSKA, N.A., SHTEVERA, L.A., KRULEVA, M.M., SOTİROVA, V.G., BARALİEVA, D.L., and DİMİTROV, B.D., 2004.** Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). III. Characterization of the regenerants. *Plant Cell Rep.*, 22:449-456.

- ZAGORSKA, N.A., SHTEVERA, L.A., DIMITROV, B.D., and KRULEVA, M.M., 1998.** Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). I. Influence of genotype on androgenetic ability. Plant Cell Rep. 17: 968-973.
- XING, Z., POWELL, W.A., and MAYNARD, C.A., 1999.** Development and germination of American chestnut somatic embryos. Plant Cell Tissue Organ Culture, 57:47-55.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Malatya’da tamamladım. 1997 yılında Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne girdim ve 2001 yılı Haziran ayında Birincilikle mezun oldum. Aynı yıl Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Programına başladım. 2002 yılında Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nın açmış olduğu Araştırma Görevliliği sınavını kazanarak göreve başladım. Halen aynı bölümde Yüksek Lisans programını sürdürmekte ve Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.