

## **Capsicum CİNSİ İÇERSİNDE BAZI TÜRLER ARASI MELEZLEMELERDE ÇİM BORUCUĞU İLERLEME ORANLARI ve TÜRLER ARASI MELEZLEMELERDEN SONRA EMBRİYO GELİŞİMİNİN İNCELENMESİ**

A. Naci ONUS

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 07059-ANTALYA

### **Özet**

Bu araştırmada *Capsicum pubescens* ve *Capsicum tovarii* çim borucuklarının *Capsicum chacoense* pistili içerisinde ilerleme oranları tespit edilmeye çalışılmış ve resiprok melezlemelerde tek taraflı uyumsuzluğun meydana gelip gelmediği araştırılmıştır. Araştırmanın ikinci kısmında ise; *in vivo* koşullarda hibrit embriyoların ne kadar sürede ne kadar geliştikleri tespit edilmeye çalışılarak, F<sub>1</sub> hibritlerin *in vitro* koşullarda embriyo kültürü yoluyla elde etme şansı araştırılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Capsicum*, Çim Borucuğu, Polen-Pistil, Embriyo Gelişimi

### **An Investigation on Pollen Tube Growth Ratios in Some Interspecific Hybridisation and Embryo Development After Interspecific Hybridisation in the Genus *Capsicum***

#### **Abstract**

This study was conducted in order to determine how far pollen tubes from *Capsicum pubescens* and *Capsicum tovarii* could grow *Capsicum chacoense* pistil. Second part of the experiment was conducted to determine how far and for how long the hybrid embryos will develop normally *in vivo* to improve the chance of getting F<sub>1</sub> hybrid through *in vitro* embryo culture.

**Keywords:** *Capsicum*, pollen tube, pollen-pistil, embryo development

### **1. Giriş**

*Capsicum* cinsi dünyada gerek sebze ve gerekse baharat olarak oldukça fazla bir alanda yetiştirilmektedir. *Capsicum annuum* türü en çok bilinen ve en fazla yetiştiriciliği yapılan tür olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle de doğal olarak pek çok ıslah programı bu tür üzerinde yoğunlaşmıştır (IBPGR, 1983). *C. annuum* ıslahında kullanılacak pek çok önemli özelliği taşıyan ve *C. annuum*'a yakın akraba olmayan, çoğunluğu Güney Amerika orijinli diğer bazı türlerde vardır. *Capsicum* cinsi içerisinde yaklaşık 20-30 kadar tür olduğu bildirilmiştir (Eshbaugh, 1976). *Capsicum* cinsi içerisinde son zamanlarda yapılmış bir sınıflandırma olmamakla birlikte kültür formları ve bunların yabancı akrabaları

“gerçek chili” biberleri olarak isimlendirilirler. gerçek biberler beyaz ve mor çiçekli türler olarak üzere 2 gruba ayrılırlar. Beyaz çiçekli türler arasında yer alan *C. annuum*, *C. chinense* ve *C. frutescens* birbirlerine oldukça yakın akraba grubunu oluştururlar ve *C. annuum* kompleksi olarak isimlendirilirler. *C. baccatum* ise yukarıda adı geçen *C. annuum* kompleksinden daha farklı olup *C. praetermissum* ile yakın akrabadır. *C. chacoense* ve Galapagos adalarına endemik olan *C. galapogoense* de yine beyaz çiçekli grupta yer almakla birlikte, bu türlerin kültür formları ile olan ilişkileri henüz tam olarak aydınlanamamıştır.

Mor çiçekli grubun başında ise yabancı formu bilinmeyen *C. pubescens*

gelmektedir. Diğer iki tür olan *C. cardenasii* ve *C. eximium* ise yabancı türleri oluştururlar. Son zamanlarda ayrı bir *Capsicum* türü olarak tanımlanan *C. tovarii*'de yine mor çiçekli grup içerisinde yer alır. Ancak bu türün izoenzimik (Bermawie, 1990) ve melezlenebilme kabiliyeti ile ilgili olarak (Onus, 1995) bu grubun içerisinde yer alan diğer türlerden farklı olduğu tespit edilmiştir.

*C. annuum* kompleksi olarak adlandırılan grupta yer alan *C. annuum*, *C. chinense* ve *C. frutescens* kendi aralarında karşılıklı olarak melezlenebilirler (Pickersgill, 1988). Diğer taraftan *C. pubescens*'in *C. baccatum*, *C. annuum*, *C. chinense* ve *C. frutescens*'le olan melezlemeleri son derece zordur (Koompai, 1976). *C. pubescens* ve onun yabancı akrabaları olan *C. cardenasii* ve *C. eximium* ile beyaz çiçekli türler arasında "tek taraflı uyumsuzluk" vardır. Herhangi bir türler arası melezleme bir yönde başarılı olurken resiprok melezleme başarısızlığa uğruyorsa bu olaya tek taraflı uyumsuzluk adı verilir. *Capsicum* cinsi içerisinde, beyaz çiçekli türler ile mor çiçekli türler arasındaki melezlemeler ancak mor çiçekli türlerin erkek form olarak kullanılması ile başarıya ulaşabilir (Molhova, 1977; Onus, 1995) ve bazı durumlarda hibrit tohumların eldesi için embriyo kültürü gerekli olabilir (Koompai, 1976).

Genel olarak *Capsicum* cinsi içerisinde beyaz ve mor çiçekli türler arasında meydana gelen tek taraflı uyumsuzluk ve türler arası melezlemeden sonra hibrit tohum elde edilememesinin nedenleri üzerine yapılan araştırmaların sayısı yok denecek kadar azdır. Bu nedenle bu mevcut çalışmada beyaz çiçekli tür olan *C. chacoense* ve mor çiçekli tür olan *C. pubescens* arasında karşılıklı melezlemeler yaparak çim borucuğu ilerleme oranları tespit

edilmeye çalışılmış ve araştırmanın ikinci kısmında da döllenmeden belirli bir süre sonra hibrit embriyo gelişimi tespit edilerek ileride yapılabilecek embriyo kültürü çalışmalarına zemin hazırlanmaya çalışılmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Araştırmada bitkisel materyal olarak *C. chacoense* SA275 ve 281 ile *C. pubescens* 43 ve 599 türleri kullanılmıştır.

Tozlaşma için anthesizden hemen önce taç ve çanak yapraklar bir pens yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Bu işlemden sonra seçilen bitkilerin yeni açmış çiçeklerinden alınan polenler tozlaşma kombinasyonuna göre gerekli bitkilerin stıgması üzerine konmuş ve her bir kombinasyon için 10 adet pistil tozlaştırılmıştır.

Çim borucuğu gelişimini gözlemlemek için tozlaşmış pistiller 24 saat sonra toplanmış ve, 3-24 saat süre ile 3:1 oranında hazırlanmış etanol:glacial acetic acid içerisinde fikse edilmişlerdir. Fiksasyon işleminden sonra pistiller steril su ile 2 kez durulanmış ve 2 saat süre ile 1 M NaOH içerisinde oda sıcaklığında ve 15 dak. süre ile 60 °C'de tutulmuşlardır. NaOH'i dokudan uzaklaştırmak için pistiller yine steril su ile iki kez durulandıktan sonra "methyl blue" içerisinde 2-24 saat süre ile boyanmışlardır (Martin 1959) ve boyanma işleminin sonunda ultraviyole mikroskop altında incelenmişlerdir.

Çim borucuğu ilerlemesinin kaydedilmesi James (1975)'den modifiye edilmiş bir metoda göre yapılmıştır. Bu metoda göre pistil; stıgma yüzeyi I.nci bölge, stıgmanın hemen altındaki bölge II.nci bölge, pistilin orta kısmı III.ncü bölge, pistilin alt kısmı IV.ncü bölge, pistilin alt kısmı ile ovaryumun temas halinde olduğu

nokta V.nci bölge ve ovaryum VI.nci bölge olmak üzere toplam 6 parçaya bölünmüştür.

İncelenen herhangi bir pistilde çim borucuğunun en uzun ulaştığı bölge kaydedilmiş ve her bir tozlaşma kombinasyonu için polen tüpü ortalama ilerleme bölgesi Hermsen ve ark. (1977) metoduna göre hesaplanmıştır: Buna göre verilen örnekte; incelenen pistillerin çoğunluğunda çim borucukları pistil'in alt kısmı ile ovaryum'un temas halinde olduğu noktaya kadar ilerlemişlerdir.

Embriyo gelişimini incelemek için ise her bir tozlaşma kombinasyonundan beş adet çiçek üzerinde tozlaşma yapılmış ve tozlaşmadan 7, 14, 21, 25 gün sonra çiçekler toplanmıştır. Gelişmekte olan meyveler toplandıktan hemen sonra 1:3 oranında hazırlanmış ve asetik asit:absoloute alkol'dan ibaret olan fiksatif içersine konulmuşlardır. Tozlaşmadan 7 ve 14 gün sonra gelişen

meyveler Stelley ve ark. (1984) metoduna göre işlemlere tabi tutulmuşlardır. Buna karşın tozlaşmadan 21 ve 25 gün sonra gelişen ovuller ise yeterince iri olduklarından dolayı doğrudan mikroskop altına alınarak incelenmişlerdir.

### 3. Bulgular

#### 3.1 Çim borucuğu ilerleme oranları

Çim borucuklarının ilerlemesinde herhangi bir sorun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla her bir türün içerisindeki formlar kendilenmiş ve çim borucukları ilerleme oranları da kaydedilmiştir ve kendileme sonuçları ile türler arası tozlaşmalar sonucu elde edilen çim borucuğu ilerleme oranları aşağıda Tablo 1'de belirtildiği şekilde bulunmuştur.

Çizelge 1. Çim Borucuğu İlerleme Oranları.

| <u>Tozlaşma çeşidi</u>    | <u>Bölgeler</u> |          |          |          |          |          | <u>Ort.</u> |
|---------------------------|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|
|                           | <u>1</u>        | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> |             |
| <b>Kendileme</b>          |                 |          |          |          |          |          |             |
| <i>C. chacoense</i>       |                 |          |          |          |          |          |             |
| SA275 x SA275             | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 10       | 6.0         |
| 281 x 281                 | 0               | 0        | 0        | 0        | 0        | 10       | 6.0         |
| <i>C. pubescens</i>       |                 |          |          |          |          |          |             |
| 43 x 43                   | 0               | 3        | 3        | 4        | 0        | 4.1      |             |
| 599 x 599                 | 0               | 0        | 3        | 2        | 5        | 0        | 4.2         |
| <b>Türler arası</b>       |                 |          |          |          |          |          |             |
| SA275 x 43                | 0               | 0        | 6        | 3        | 1        | 0        | 3.5         |
| SA275 x 599               | 0               | 0        | 4        | 4        | 2        | 0        | 3.8         |
| 281 x 43                  | 0               | 0        | 7        | 3        | 0        | 0        | 3.3         |
| 281 x 599                 | 0               | 0        | 6        | 4        | 0        | 0        | 3.4         |
| <b>Resiprok melezleme</b> |                 |          |          |          |          |          |             |
| 43 x SA275                | 8               | 2        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1.2         |
| 43 x 281                  | 7               | 3        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1.3         |
| 599 x SA275               | 7               | 3        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1.3         |
| 599 x 281                 | 7               | 3        | 0        | 0        | 0        | 0        | 1.3         |

### 3.2 Çim borucuğu ilerleme özellikleri

Kendilenmiş olan çiçeklerde; her bir türün poleni kendi stıgması üzerinde depolandıktan sonra çimlenmiş, pistil içersisinde ilerlemiş ve *C. pubescens* poleni hariç incelenen pistillerde 24 saat içersisinde yumurtalığa kadar ulaşmıştır. *C. pubescens* poleni ise kendi pistili içersisinde yavaş ilerlemiştir. Polen canlılığı yüksek (%80) (Onus, 1995) olduğu halde incelenen pistillerin hiç birisinde yumurtalığın içersisine girememiştir.

Tüm kendine tozlaşmalarda çim borucuğu ilerlemesi boyunca belirli aralıklarla kalloz tıkaçları meydana gelmiştir.

Karşılıklı tozlaşma çalışmalarında çim borucuğu ilerleme özelliği; Mor çiçekli tür *C. pubescens*, tozlaşmalarda erkek form olarak kullanıldığı zaman, polenleri çimlenmiş, çim borucukları stigma yüzeyini geçtikten sonra *C. chacoense* pistili boyunca ilerlemiş ve 24 saat içersisinde yumurtalığa kadar gelmiş ve çim borucukları içersisinde belirli aralıklarla kalloz tıkaçları meydana gelmiştir.

Diğer taraftan resiprok melezlemelerde beyaz çiçekli tür *C. chacoense* tozlaşmalarda erkek form olarak kullanıldığı zaman, polenleri stigma üzerinde çimlenmiş ancak daha sonra çim borucukları ya stigma üzerinde yada stigma'nın hemen altına bulunan bölgede durmuş ve ilerlemelerine devam edememişlerdir. Büyümesi duran çim borucuklarının uç kısımları bazen açık olmuş bazen de uç kısımlarında yoğun kalloz birikimi gözlenmiştir.

### 3.3 Embriyo gelişimi

Tozlaşmadan 7, 14 gün sonra toplanmış meyvelerin mikroskop altında incelenmesinden genellikle uygun kontrast yakalanamadığından dolayı tam bir sonuç alınamamıştır ve bu nedenle 7 ve 14 günü içeren çalışmalar değerlendirme dışı bırakılmıştır. Gerek kendileme gerekse türler arası tozlaşmalar sonucu elde edilen meyvelerde embriyoların tozlaşmadan 21 ve 25 gün sonraki gelişme durumları aşağıda Tablo 2'de özetlenmiştir.

Türler arası tozlaşmadan 21 gün sonra toplanan meyvelerde incelenen tohumların merkezinde ise kahverengi lekeler tespit edilmiştir. Kahverengi leke taşıyan tohumların elde edildiği meyveden elde edilen diğer bazı tohumların ise sağlıklı olduğu ve herhangi bir leke içermedikleri gözlenmiştir. Ancak sağlıklı olan bu tohumlarında içeriklerinin son derece az olduğu da burada özenle vurgulanması gereken bir nokta olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kendilemede 21 gün sonra SA275 ve 281 türlerinden elde edilmiş embriyoların gelişiminin ise hibrit embriyo gelişiminden daha hızlı olduğundan söz etmek mümkündür. Bu durumunda en güzel göstergesi kendilenmiş embriyoların 21 gün sonra globular şekle sahipken, türler arası tozlaşmalar sonucu elde edilen embriyoların çubuk formunda, kısa şekle sahip olmalarıdır. Tozlaşmadan 25 gün sonra ise hibrit embriyoların yaşama kabiliyetinde olmadıkları tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Embriyo Gelişim Durumları.

| Tozlaşma            | İncelenen ovül sayısı |        | İncelenen embriyonun durumu                 |               |
|---------------------|-----------------------|--------|---|---------------|
|                     | 21 gün                | 25 gün | 21 gün                                      | 25 gün        |
| <b>Kendileme</b>    |                       |        |   |               |
| SA275               | 10                    | 10     | globular şekil                              | torpido şekli |
| 281                 | 10                    | 10     | globular şekil                              | torpido şekli |
| <b>Türler arası</b> |                       |        |   |               |
| SA275 x 43          | 36                    | 50     | kahverengi lekeli,<br>birkaç sağlıklı tohum | boş           |
| SA275 x 599         | 30                    | 30     | kahverengi lekeli,<br>birkaç sağlıklı tohum | boş           |
| 281 x 43            | 52                    | 14     | kahverengi lekeli,<br>birkaç sağlıklı tohum | boş           |
| 281 x 599           | 25                    | 19     | kahverengi lekeli,<br>birkaç sağlıklı tohum | boş           |

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Elde edilen sonuçlar *C. pubescens* çim borucuklarının, *C. chacoense* stigmatı üzerinde çimlendiklerini ve pistil boyunca belirli bir noktaya kadar ilerlediklerini göstermektedir. Ancak incelenen pistillerin hiç birinde çim borucukları beşinci bölgeyi geçip yumurtalık içerisine girmemişlerdir. Buna karşın resiprok melezlemelerde ise, *C. chacoense* çim borucukları incelenen pistillerde ya çimlenip büyümesini stigma üzerinde durdurmuş ya da stigmayı geçtikten sonra stigmanın hemen altında boyun kısmında büyümesini durdurmuştur ve ikinci bölgenin ilerisinde hiçbir çim borucuğu ilerlemesi tespit edilememiştir. Bu durum mor çiçekli *C. pubescens* ve beyaz çiçekli *C. chacoense* arasında tek taraflı uyumsuzluğun meydana geldiğini göstermektedir ve elde edilen bu sonuç önceki araştırmacıların bulguları ile uyum içerisindedir (Molhova, 1977; Onus, 1995).

Çim borucuğu ilerleme oranlarının saptanmasında ise, kendine tozlamalarda ve mor çiçekli türlerin erkek form olarak kullanıldıkları melezlemelerde çim

borucuğu ilerlemesi boyunca belirli aralıklarla meydana gelen kallos tikaçları uyum gösteren (uyuşan) tozlaşmaların bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Bermawie, 1990).

Gerek kendine tozlamalarda gerekse beyaz çiçekli türlerle melezlemelerde *C. pubescens* polenleri incelenen pistillerin büyük bir çoğunluğunda yumurtalığın içerisine kadar ilerleyememiştir. Polen canlılığı yüksek (%80) olduğuna göre polen canlılığı dışında başka faktörlerin bu olayda rol oynayabileceği söylenebilir.

*C. pubescens* BP43 anavatanı olan Peru'da deniz seviyesinden yüksek rakımlara adapte olmuştur. Bu nedenle deniz seviyesinden fazla yüksekte olmayan bölgelerde yetiştirilme bitki kompozisyonunda bilinmeyen bazı değişikliklere yol açmış olabilir. Benzer problemlerle karşılaşan Koopai (1976) yaz ve sonbahar aylarında *C. pubescens* türü ile yaptığı çalışmalardan farklı sonuçlar almış ve bu sonuçları açıklarken ya bitki yaşının ya da mevsime bağlı olarak değişen bazı bitki hormonlarının bu olayda rol oynayabileceğini belirtmiştir. *C. pubescens* türünün bu davranışlarının

aydınlatılması amacı ile daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

Embriyo gelişimi ile ilgili olan çalışmalarda ise türler arası hibrit tohumların merkezlerinde tozlaşmadan 21 gün sonra görülen kahverengileşme veya kahverengi lekeler, embriyo ve endosperm kompleksinin be lekeler görünür hale gelmeden önce dejenere olduğunu göstermektedir (Bermawie, 1990). Türler arası melezlemeler sonucu elde edilen birkaç meyvede ise lekesiz birkaç tohum elde edilmekle birlikte bu tohumların embriyolarının oldukça küçük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki; hibrit tohumlarda endosperm ve embriyolarda dejenerasyon ve anormallikler tozlanmadan 7-21 gün sonra meydana gelmektedir. Bu nedenle eğer hibrit tohum eldesinde embriyo kültüründen faydalanılacaksa, embriyonun tozlanmadan hemen sonraki bir hafta içerisinde yapılması gerekmektedir.

#### Kaynaklar

- Bermawie, N. 1990. Isozymic variability and barriers to hybridisation between *C. chacoense* and two purple-flowered species (*C. pubescens* and *C. tovarii*). Ph.D. Thesis. University of Reading.
- Eshbaugh, W.H., 1976. Genetic and systematic studies of chili peppers (*Capsicum-Solanaceae*). Bull. Torrey Bot. Club. 102: 396-403.
- Hermesen, J.G., I. Govaert, S. Hoekstra, C. van Loon and C. Neefjes. 1977 Analyses of the effect of parental genotypes on crossability of diploid *Solanum tuberosum* with *Solanum verrucosum*. A gene for gene relationship? Proc. 8<sup>th</sup>. EUCARPIA Congress on Interspecific Hybr. In Plant Breeding, Madrid. pp. 305-312.
- IBPGR, 1983. Genetic resources of *Capsicum*. IBPGR Secretariat, Rome.
- James, J. 1975. Production of hybrids and haploids with *Fragaria*. Ph.D. Thesis, University of Reading.
- Koompai, P. 1976. Some barriers to interspecific crossing and gene exchange in five species

of *Capsicum*. M.Phil. Thesis. University of Reading.

- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. Stain Technol. 34: 125-128.
- Molhova, E., 1977. Cytoembryologie du genre *Capsicum* In: *Capsicum* 77, C. R., 3eme Congress EUCARPIA. Piment Ed. E. Pochard, pp. 27- 37. INRA, Avignon-Montfavet, France.
- Stelley, D.M., Peloquin, S.J., Palmer, R.G., and Crane, C.F., 1984. Mayer's hemalum-methyl salicylate: A stain clearing technique for observations within whole ovules. Stain Technol. 59:155-161