

Bakır Sülfatın Biberde (*Capsicum annuum* L.) Embriyogenesis Üzerine Etkisi

Tuğçe Özsan, Ahmet Naci Onus

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü 07058 Antalya

e-posta: tugceozsan@akdeniz.edu.tr

Özet

Biber bitki doku kültürü teknikleri ve biyoteknoloji çalışmaları aracılığı ile geliştirilmeye uygun olup, ekonomik anlamda ülkemizde ve dünyada önemli bir yere sahiptir. Biber doku kültürü çalışmaları kapsamında anter ve mikrospor embriyogenesisi de içine alan androgenesis çalışmaları sıklıkla yapılmaktadır. Ancak biberin inatçı olarak tabir edilen genetik yapısından ötürü elde edilen haploid embriyo ve bitki rejenerasyonu frekansları düşük seviyelerde kalmaktadır. Bu çalışmada bitki fizyolojisinde oldukça önemli bir rol oynadığı bildirilen ve monokot bitkilerde androgenesis üzerine olumlu etkileri bildirilen bakırın biberde embriyogenesis yoluyla haploid embriyoların ve bitkiciklerin oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda (3, 5, 10, 15 μ M) bakır sülfat anterlerin ön uygulama ortamlarına eklenmiştir. Daha sonra ön uygulama ortamındaki bakır sülfat oranlarının aynıısı kültüre alma ortamı olarak kullanılan MS besisi ortamlarına da ilave edilmiş ve embriyogenesis üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Biber, haploid, anter kültürü, CuSO_4

Influence of Copper Sulphate on Embryogenesis in Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Abstract

Pepper is a suitable plant to grow through plant tissue culture methods and biotechnological studies and also it has great importance in economic terms both in Turkey and all across the world. Within the scope of pepper tissue culture studies, androgenesis studies, anther and microspore embryogenesis, are frequently carried out. However, plant regeneration frequencies and haploid embryo ratio are still low due to the recalcitrance structure of pepper plants. In this study, influence of copper, which positive effects are reported on monokot plants, on obtaining haploid embryos and plantlets through androgenesis in pepper was investigated. To serve the purpose, copper sulphate (CuSO_4) in different concentrations (3,5,10,15 μ M) was added to media and its effects were recorded. Experiment results revealed that copper sulphate might have a positive impact on induction of embryogenesis in pepper but further studies are required.

Keywords: Pepper, haploid, anther culture, CuSO_4

Giriş

Biberde uygulanan geleneksel ıslah programları oldukça zaman ve iş gücü gerektiren yöntemleri kapsamaktadır. Bu bağlamda ıslah süresinin kısaltılmasındaki yeteneği bakımından haploidi tekniğinin bitki ıslahında tartışmasız bir değeri vardır. Haploid bitki üretiminde en önemli uygulamalardan birisinin homozigot dihaploid hatlar elde etmek olduğu bilinmektedir. Elbette geleneksel ıslah yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda da homozigot hatlar elde edilebilmektedir. Ancak bu süreç hem kendine tozlanan hem de yabancı tozlanan bitkilerde oldukça uzun zaman gerektirmektedir. Bu noktada sürecin kısaltılması amacıyla haploidi tekniklerinden yararlanılmakta ve geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilen çalışmalarda en iyi ihtimalle 6-7 yıl süren bu süreç 1-2 yıla kadar kısaltılabilmektedir. Günümüzde en etkili yöntemlerden biri olan androgenesis tekniği kullanılarak haploid bitki ve homozigot dihaploid

bitki eldesi birkaç ay gibi kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Elde edilen bu homozigot bitkiler hibrid çeşitleri geliştirmek için gerekli olan homozigot hatların eldesinde ve genetik çeşitlilik yaratarak yüksek kaliteli yeni çeşitler geliştirmede oldukça önem kazanmaktadır.

Monokot bitkilerde yapılan birçok çalışmaya bakıldığında, bu bitkilerden alınan çeşitli eksplantların *in vitro* kültürleri süresince besin ortamlarına uygulanan bakır sülfatın pozitif etkileri bildirilmiştir. Yine yapılan çalışmalara bakıldığında, kültür ortamının içerisindeki bakır sülfat oranı artırıldığında, genetik açıdan inatçı olarak tabir edilen bitki çeşitlerinin rejenerasyonundaki verimin ve bu bitkilerden bitkiciklerin üretiminin arttırıldığı gözlenmiştir (Wojnarowiez ve ark. 2002). Bugüne kadar bildirilen anter ve mikrospor kültürlerini kapsayan androgenesis çalışmalarında biberin inatçı olarak tabir edilen genetik yapısından ötürü elde edilen haploid embriyoların ve bitki rejenerasyonu

frekanslarının düşük seviyelerde kaldığı görülmektedir.

Bu çalışmada bitki fizyolojisinde oldukça önemli bir rol oynadığı bilinen ve monokot bitkilerde androgenesis üzerine olumlu etkileri bildirilen bakırın $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ biberde embriyogenesis yoluyla haploid embriyo ve bitkicik oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışma, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup, Gento Tohum A.Ş.'nin seralarında yetiştirilen biber bitkilerine ait tomurcuklar kullanılarak yürütülmüştür.

Bitkisel materyal olarak Erciyes, Filinta ve Belissa F_1 çeşitleri kullanılmıştır. Çiçeklenmeye başlayan bitkilerden anter kültürü için en uygun aşamada olan tomurcuklar sabah saatlerinde toplanmıştır. Daha önceki androgenesis çalışmaları baz alındığında, en uygun tomurcuk aşamasının mikrosporların geç tek çekirdekli veya erken çift çekirdekli yapıya sahip olduğu I. mitoz bölünmenin başladığı safha olduğu gözlemlenmiştir (Chambonnet, 1988). Bu dönemdeki çiçek tomurcuklarının morfolojisine bakıldığında ise çanak ve taç yaprakların boylarının eşit veya taç yaprakların çanak yapraklardan hafifçe uzun olduğu, aynı zamanda anterlerin yaklaşık yarısına kadar renk pigmenti olan antosiyanin oluşumu gözlenmiştir.

Araştırmada hem ön uygulama ortamına hem de besin ortamı kombinasyonuna farklı konsantrasyonlarda (0.1 'kontrol', 3, 5, 10, 15 μM) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ eklenmiştir. Bu amaçla anter kültürü için en uygun aşamada olan tomurcukların %10'luk, 1-2 damla Tween-20 damlatılan sodyum hipoklorit solüsyonunda 15 dakika yüzey sterilizasyonları yapılmış daha sonra %70'lik alkolde 1 dakika bekletilmiştir. Tomurcuklar bu işlemlerden sonra 3-4 kez steril distile saf su ile yıkanmıştır. Tomurcukların sterilizasyonundan sonra anterler izole edilerek filamentlerinden ayrılmıştır. İzole edilen anterler öncelikle ön uygulama ortamı olan, yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 62 g/l mannitol içeren ortamlarda ve 32°C 'de 3 gün boyunca bekletilmiştir. Ön uygulama süresinin sonunda anterler bu ortamlardan alınarak asıl kültür ortamlarına aktarılmıştır. Besin ortamı olarak Taşkın ve ark. (2011)'nin yapmış oldukları

çalışmada kullandıkları besin ortamlarından embriyogenesis bakımından en iyi tepkiyi verdiği gözlenen 3 nolu ortam modifiye edilerek kullanılmıştır. Yapılan modifiye işlemi diğer eklentiler sabit kalmak suretiyle 30g/l süktroz yerine 60 g/l maltoz eklenmesini ve 32 g/l mannitol ilave edilmesini kapsamaktadır. Bunun yanı sıra ön uygulama ortamlarına eklenen farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ kültür ortamlarına da eklenmiştir. Böylece kontrol ortamı dahil olmak üzere 5 farklı besin ortamı kombinasyonu denenmiştir. Taşkın ve ark. (2011)'nin yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri en yüksek embriyo oluşum oranı kullanılan 3 nolu ortamda çıkmasından ötürü bu çalışmadaki besin ortamları için bu ortam bileşenleri esas alınarak bazı modifikasyonlar yapılmıştır.

Kültüre alınan anterler 28°C 'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks aydınlatmaya sahip olan büyüme odasına transfer edilmiş ve burada anter gelişme durumları (farklılaşması, şişmesi gibi), embriyo ve bitkicik oluşturma durumları gözlemlenmiş ve kaydedilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Androgenesis çalışmaları için en uygun tomurcuk büyüklükleri ve anter özellikleri saptandıktan sonra, bu tomurcuklardan alınan anterlere 5 farklı ön uygulama ortamı bileşeni uygulanıp yine 5 farklı besin ortamı kombinasyonunda kültüre alınmış olup meydana gelen değişimler gözlenmiştir. Başarılı bir androgenesis çalışması için, daha önce yapılan çalışmalarda da olduğu gibi öncelikle çiçek tomurcuklarının morfolojisi göz önünde tutularak en uygun tomurcuk aşaması belirlenmiştir. Buna göre, çanak ve taç yaprakların boylarının eşit ya da taç yaprakların çanak yapraklardan biraz daha uzun olduğu ve anterlerde uç kısımdan başlayarak hemen hemen yarısına kadar renk farklılığı gözlemlendiği, buna bağlı olarak da antosiyanin birikiminin gerçekleştiği, aynı zamanda bu aşamadaki anterlerin içerisinde bulunan mikrosporların ise I. mitoz aşamasında olduğu bildirilmiştir (Chambonnet, 1988; Çağlar ve ark. 2004; Çiner ve Tıpırdamaz, 2002; Kim ve ark. 2004, 2008; Lantos ve ark. 2009; Parra-Vega ve ark. 2013a; Terzioğlu ve ark. 2000). Bu aşamada seçilen tomurcuklar bu çalışmada da ideal bulunmuştur. Yine daha önce yapılmış olan anter ve mikrospor kültürü çalışmalarında geçen ön

uygulama sıcaklıkları bakımından biber için ideal olanın yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmak olduğu ve embriyogenesi pozitif yönde etkilediği bildirilmiş olup (Dumas de Vaulx ve ark. 1981, Lantos ve ark. 2009, 2012, Parra-Vega ve ark. 2013b) bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda önceki çalışmalarla uyum içerisinde.

Çeşitler bazında çalışmada denenen her uygulama için dikilen anter sayıları, gelişme gösteren anter sayıları ve bunların yüzde değerleri, oluşan embriyo ve bitkicik sayıları ile bunların yüzde değerlerine ait değerler Çizelge 3, 4 ve 5'te verilmiştir.

Kültüre alınan anterlerin inkübe edildikleri ilk birkaç günde karanlık koşullarla kombine edilen yüksek sıcaklık ön uygulamalarının biber anter kültüründe embriyogenesi çalışmaları için önemli bir kez daha görülmüştür.

Çalışmada kullanılan besin ortamı kombinasyonlarına ilave edilen $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ oranları bakımından tepkiler değerlendirilecek olursa, çeşide de bağlı olarak embriyogenesi bakımından farklılıklar gözlemlenmiş olup $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ oranı arttıkça hem anterlerin gelişme durumlarında hem de embriyo oluşturmada azalmalar görüldükçe, en iyi sonuçlar $3 \mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ilave edilen 2 nolu ortam kombinasyonundan elde edilmiştir. Yine çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, test edilen üç farklı çeşit içerisinde embriyogenesi açısından $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'a en iyi tepki veren çeşidin Belissa çeşidi olduğu belirlenmiştir.

Sonuç

Dikot bitkilerle monokot bitkiler ön uygulama ortamına ve besin ortamı kombinasyonuna eklenen bakır sülfat konsantrasyonları bakımından karşılaştırıldığında, dikot bitkiler için embriyogenesi frekansını arttırmak amacıyla daha düşük seviyedeki bir konsantrasyonun yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Bakır sülfat konsantrasyonu arttıkça embriyogenesi olumsuz etkilediği görülmüştür. Buna göre en yüksek embriyo ve bitkicik oluşum oranları çalışmada test edilen 2 nolu ortamda elde edilmiştir. Ancak ortamlar arasında, çeşitlere bağlı olarak embriyo ve bitkicik oluşturma bakımından önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Göz önünde bulundurulacak kriterler bakımından incelendiğinde Filinta çeşidinde en başarılı anter gelişim oranları gözlemlenirken, embriyo oluşturma ve bitkicik gelişimi yönünden ise Belissa çeşidi oldukça

başarılı bulunmuştur. Şaşırtıcı bir şekilde 5 nolu ortamda üç çeşitten ikisinde anter gelişmesi dikkate değer bulunurken, Erciyes çeşidinde gelişim oranı %45'lerde kalmıştır.

Kaynaklar

- Chambonnet, D., 1988. Production of haploid pepper plants. Bulletin interne de la station d'Amelioration des Plantes Maraicheres d'Avignon - Montfavet, France, 1-10.
- Çağlar, G., Aras, V., Bayram, A., 2004. Kurutmalık kırmızı biberlerde androgenesis yoluyla *In Vitro* haploid embriyo uyartımı. Akdeniz Üniv. Zir. Fak. Dergisi, 17(1): 87-94.
- Dumas De Vaulx, R., Chambonnet, D., Pochard, E. 1981. *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) anthers: High rate plant production from different genotypes by +35°C treatments. Agronomie, 1(10):859-864.
- Kim, M., Jang, I.C., Kim, J.A., Park, E.J., Yoon, M., Lee, Y., 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Rep., 27: 425-434.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D., Lee, K.M. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Tissue Org Cult, 77: 63-72.
- Lantos, C., Juhász, A.G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., Somogyi, N., Pauk, J., 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. Plant Cell Tiss Organ Cult, 97: 285-293.
- Lantos, C., Juhász, A.G., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., Pauk, J., 2012. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Biotechnol Rep., 6:123-132.
- Özkum Çiner, D., Tıpırdamaz, R., 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the *In Vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). Turk J. Bot., 26: 131-139.
- Parra-Vega, V., González-García, B., Seguí-Simarro, J.M., 2013a. Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). Acta Physiol Plant, 35: 627-633.
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., Seguí-Simarro, J.M., 2013b. Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum*

- annuum* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult, 112: 353-360.
- Taşkın, H., Büyükalaca, S., Keleş, D., Ekbiç, E., 2011. Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. African Journal of Biotechnology 10: 17116-17121.
- Terzioğlu, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Abak, K., 2000. İnkübasyon koşullarının biber anter kültüründe embriyo oluşumu üzerine etkisi. III. Sebze Tarımı Sempozyumu, 11-13 Eylül 2000, 233-237, Isparta.
- Wojnarowicz, G., Jacquard, C., Devaux, P., Sangwan, R.S., Clément, C., 2002. Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science, 162: 843-847.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan ön uygulama ortamlarının içeriği

Ortam Kodu	Mannitol dozu (g/l)	CuSO ₄ .5H ₂ O dozu (μM/l)
1 (kontrol)	62	0.1
2	62	3
3	62	5
4	62	10
5	62	15

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan besin ortamlarının içeriği

Ortam Kodu	Temel bileşim	Akt f Kömür dozu (%)	AgNO ₃ dozu (mg/l)	NAA dozu (mg/l)	BAP dozu (mg/l)	Şeker dozu (maltoz) (g/l)	Mannitol dozu (g/l)	CuSO ₄ .5H ₂ O dozu (μM/l)
1 (kontrol)	MS	0.25	15	4	1	60	32	0.1
2	MS	0.25	15	4	1	60	32	3
3	MS	0.25	15	4	1	60	32	5
4	MS	0.25	15	4	1	60	3	0
5	MS	0.25	15	4	1	60	32	15

Çizelge 3. Erciyes biber çeşidinde anter kültürlerinden alınan sonuçlar

Ortamlar	Dikilen anter sayısı (adet)	Gelişen anter sayısı		Oluşan embriyo sayısı		Oluşan bitkicik sayısı	
		adet	%	adet	%	adet	%
1	117	112	95.72	-	-	-	-
2	125	120	96.00	-	-	-	-
3	122	122	100.00	-	-	-	-
4	93	92	98.92	-	-	-	-
5	124	56	45.16	-	-	-	-

Çizelge 4. Filinta biber çeşidinde anter kültürlerinden alınan sonuçlar

Ortamlar	Dikilen anter sayısı (adet)	Gelişen anter sayısı		Oluşan embriyo sayısı		Oluşan bitkicik sayısı	
		adet	%	adet	%	adet	%
1	102	97	95.09	-	-	-	-
2	109	107	98.16	-	-	-	-
3	107	105	98.13	-	-	-	-
4	127	126	99.21	-	-	-	-
5	116	116	100.00	-	-	-	-

Çizelge 5. Belissa biber çeşidinde anter kültürlerinden alınan sonuçlar

Ortamlar	Dikilen anter sayısı (adet)	Gelişen anter sayısı		Oluşan embriyo sayısı		Oluşan bitkicik sayısı	
		adet	%	adet	%	adet	%
1	106	88	83.01	-	-	-	-
2	91	91	100.00	11	12.08	5	45.45
3	106	103	97.16	-	-	-	-
4	104	90	86.53	-	-	-	-
5	103	102	99.02	-	-	-	-