



Artvin Hurması (*Diospyros lotus* L.) Üzerine Aşılantmış Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) Çeşitlerinin Peroksidaz Enzim Aktiviteleri Arasındaki Farklılıkların İncelenmesi

Mehmet Ali GÜNDOĞDU^{1*} Engin GÜR¹ Neslihan EKİNCİ¹ Murat ŞEKER¹

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 17020 Çanakkale
(orcid.org/0000-0002-5802-5505); (orcid.org/0000-0002-4668-1206); (orcid.org/0000-0001-7022-5289); (orcid.org/0000-0002-6886-0547)

* e-posta: magundogdu@comu.edu.tr

Alındığı tarih (Received): 25.10.2017

Kabul tarihi (Accepted): 14.11.2018

Online Baskı tarihi (Printed Online): 05.12.2018

Yazılı baskı tarihi (Printed): 31.12.2018

Öz: Türkiye’de Trabzon hurması yetiştiriciliği çok eski tarihlerden beri yapılmasına karşın yeterli gelişme sağlanmamıştır. Bunun başlıca nedeni buruk olmayan çeşitlere yeterli ilgi gösterilmemesidir. Ekonomik açıdan önemli buruk olmayan çeşitlerin (PCNA ve PVNA grubu çeşitler) önemli bir sorunu fidancılık aşamasından itibaren görülmeye başlanan anaç ve kalem uyumsuzluğudur. Buruk olmayan çeşitlerin yetiştiriciliğinin artması için uyuma açısından sorun göstermeyen anaçlara gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışma *Diospyros lotus* anaçı üzerine aşılantmış bazı Trabzon hurması çeşitlerinin aşı uyuma durumları peroksidaz enzim profilleri incelemek suretiyle ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada O’Gosho, Matsumoto Wase Fuyu, Jiro, Hachiya ve Harbiye çeşitleri yonga göz aşısı yapılarak aşılantmıştır. Peroksidaz profillerinin araştırılması için aşılantmadan 4, 8 ve 12 hafta sonra aşı noktasından, aşılantmamış *Diospyros lotus* anaçlarından ve 5 Trabzon hurması çeşidinin yıllık sürgünlerinden kabuk örnekleri toplanmıştır. Alınan örneklerin peroksidaz aktiviteleri nişasta jel elektroforezi ile ortaya çıkarılmıştır. Buruk olan ve olmayan çeşitlerin peroksidaz aktiviteleri arasında farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Diospyros*, uyumsuzluk, elektroforez

Investigation of Peroxidase Activity Differences of Persimmon (*Diospyros kaki* L.) Varieties Grafted on Caucasian Persimmon (*Diospyros lotus* L.)

Abstract: Persimmon growing is not well developed in Turkey although it is ancient fruit species. The main reason for unsuccessful growing is limited knowledge for non astringent varieties. One of the main problem in PCNA and PVNA persimmon growing is rootstock / scion graft incompatibility. Compatible rootstocks are needed for improvement of non astringent persimmon varieties. In this experiment peroxidase enzyme profiles were investigated for determination of rootstock incompatibility between *Diospyros kaki* grafted on *Diospyros lotus* seedlings. For this purpose O’Gosho, Matsumoto Wase Fuyu, Jiro, Hachiya and Harbiye varieties from different groups of commercial persimmon varieties were grafted by chip budding. Bark samples were collected from the varieties 4, 8 and 12 weeks later from grafting union. Also ungrafted caucasian persimmon and shoots of persimmon varieties were used. According to the obtained results, peroxidase profiles were changed among astringent and non-astringent varieties.

Keywords: *Diospyros*, incompatibility, electrophoresis

1. Giriş

Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) ılıman ve subtropik iklim kuşaklarında yetiştiriciliği yapılabilen ve ülkemizin meyvecilik bölgelerinde önemi giderek artan bir türdür. Ülkemizde, son yıllarda başta Akdeniz bölgesi olmak üzere kapama Trabzon hurması bahçeleri yıldan yıla artış göstermekte ve üreticiler tarafından ilgi

görmektedir. Yapılan çalışmalarla, Trabzon hurması çeşitlerinin çoğaltılmasında en uygun yöntemin uygun bir anaç üzerine aşı olduğu görülmüştür. Trabzon hurması fidanı yetiştiriciliğinde 5 değişik *Diospyros* türü anaç olarak kullanılabilmesine karşın, uyumsuzluklar ve farklı anaç performansları nedeniyle D. kaki, D.

lotus ve *D. virginiana* türleri en sık kullanılan anaçlar durumundadır (Yonemori ve ark., 2000).

Trabzon hurması anaç kullanımını gerektiren bir tür olmasına karşın, anaç uyumsuzlukları nedeniyle çeşitler arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır. Günümüzde hurma çeşitleri için sadece çöğür anaçları (*D. kaki*, *D. lotus* ve *D. virginiana*) kullanılmaktadır. Japonya başta olmak üzere çoğu ülkede kullanılan *D. kaki* çöğürleri bu tür bakımından günümüzde yeterli görülmektedir. Ancak, İtalya başta olmak üzere Akdeniz ülkelerinde sıklıkla kullanılan *D. lotus* anacı uyumsuzluklar ve kök kanserine (*Agrobacterium tumefaciens*) yüksek duyarlılık nedenleriyle sorunlu bir anaç görünümündedir. Bu anaç, PCNA grubunda (buruk olmayan kararlı çeşitler) yer alan bazı çeşitlerle uyumsuzluk sorunu yaşamakta ve çeşitlerden beklenen performans sağlanamamaktadır. A.B.D. de kullanılan *D. virginiana* üzerine aşılanan ağaçların da bir örnek olmaması ve sıklıkla dip sürgünü üretmesi gibi sorunları bulunmaktadır. Çin’de süs bitkisi olarak kullanılan *D. rhombifolia* türünün *D. kaki* çeşitlerinde bodurlaştırıcı etkisinin belirlenmiş olmasına karşın, üzerine aşıl原因an çeşitlerin çok zayıf kalmaları ve sadece 4-6 yıl süresince yaşabilmeleri nedeniyle kullanım alanı bulunmamaktadır. Ancak yakın bir gelecekte gelişmiş özelliklere sahip (bodurluk, yüksek verimlilik, çevre koşullarına dayanıklılık ve bir örnekliklik) klonal anaçların kullanılmasının daha doğru bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir (Şeker, 2004).

Bitki peroksidazları, izoenzimlerin çok geniş bir grubunu oluşturmakta ve hidrojen peroksit varlığında yüksek bitkilerde ligninleşme, suberinleşme, tepe tomurcuğu baskınlığı, soğuk toleransı, dinlenme, büyüme ve gelişme gibi birçok fizyolojik olayda doğrudan veya dolaylı olarak rol oynamaktadır. Bunların yanında peroksidazlar, indol-3 asetik asit parçalanması, hücre duvarı oluşumu, patojenlere karşı savunma mekanizması ve çeşitli stres faktörlerinde (tuz stresi, yaralanma) biyokimyasal süreçte yer almaktadırlar. Her bitki, substrat spesifikliğı ve bitkideki yerleşimi farklı

olan çok sayıda peroksidaz izoenzimlerine sahiptir. Bitkilerdeki peroksidazlar lignin sentezindeki görevleri nedeniyle aşı kaynaşmasında önemlidirler. Lignin, bitkilerde selülozdan sonra bilinen doğal organik maddelerin içinde en bol bulunan organik maddedir (Gülen ve ark., 2002; Güçlü, 2010).

Peroksidaz enzim aktivitesi anaç-kalem uyumsuzluğunun anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Anaç ve kalem peroksidazları benzer bir profile sahipse uyuşma yeteneğinin yüksek olduğu bilinmektedir. Peroksidaz profili farklılık taşınması durumunda aşı bölgesinde kallus oluşumu zayıflamakta ve iletim demetlerinin devamlılığı bozulmaktadır.

Bu çalışmada, Artvin hurması anacı üzerine aşıl原因mış bazı Trabzon hurması çeşitlerinin peroksidaz izoenzim profilleri incelenerek aşı uyuşma durumları değerlendirilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada Artvin hurması (*Diospyros lotus*) çöğürleri üzerine aşıl原因mış PCNA (Pollination Constant Non Astringent, Meyve Eti Kararlı Buruk Olmayan Çeşitler) grubuna giren ‘Matsumoto Wase Fuyu’, ‘Jiro’ ve ‘O’Gosho’ çeşitleri, PVNA (Pollination Variant Non Astringent, Meyve Eti Kararsız Buruk Olmayan Çeşitler) grubunda yer alan ‘Harbiye’ çeşidi ve PVA (Pollination Variant Astringent, Meyve Eti Kararsız Buruk Çeşitler) grubuna giren ‘Hachiya’ çeşidi kullanılmıştır. Aşıl原因ma yonga göz aşısı tekniğı ile sürgün aşı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Peroksidaz (EC 1.11.1.7) profillerinin araştırılması için aşıl原因madan 4, 8 ve 12 hafta sonra aşı noktasından, aşıl原因mamış Artvin hurması anaçlarından ve 5 Trabzon hurması çeşidinin yıllık sürgünlerinden kabuk örnekleri toplanmıştır. Alınan örneklerin peroksidaz aktiviteleri nişasta jel elektroforezi ile ortaya çıkarılmıştır. Şeker (1999) ve Nurdan (2006) tarafından bildirilen yöntem aşağıda kısaca açıklanmıştır:

Nişasta jeli elektroforez işleminden 1 gün önce hazırlanmıştır. 1000 ml lik erlenmayer içerisine nişasta, elektrolitik tampon çözeltisi ve dH₂O

eklenerek yaklaşık 300 0C lik manyetik karıştırıcı üzerinde yarı saydam bir görüntü kazanıncaya kadar karıştırılarak kaynatılmıştır. Bu karışımın içerisindeki gaz bir musluk vakumu yardımıyla alınmış ve elektroforez küvetine boşaltılarak soğumaya bırakılmıştır.

Bitki ekstraksiyonu daha önceden 0 oC de soğutulmuş porselen havanlar içerisinde hazırlanmıştır. Trabzon hurması çeşitlerine ait yaklaşık 200 mg doku örneği porselen havan içerisine konularak üzerine antioksidantlar (Merkapto ethanol, L-sistein), ekstraksiyon tampon çözeltisi, PVPP (Polivinil polipirrolidon) ve deniz kumu eklenmiştir. Havaneli yardımıyla hızlı bir şekilde doku parçaları homojen olarak ezilmiş ve bu ekstraksiyon 1,5 ml lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Her çeşide ait ekstraksiyon bu şekilde hazırlandıktan sonra 15 dakika süreyle 13000 d/dak lık hızda ve +4 0C sıcaklıkta santrifüjlenerek saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

İzoenzim ekstraksiyonundan yaklaşık 50 µl alınarak 10 x 5 mm boyutlardaki Whatman filtre kağıtlarına emdirilmiş ve bu filtre kağıtları 5 mm aralıklarla jel üzerine dizilmiştir.

Elektroforez işlemi bir buzdolabının +4 0C lik bölmesinde yaklaşık 5 – 6 saat sürecinde gerçekleştirilmiştir. Jele elektrik enerjisi verilmeden önce elektroforez anot ve katot küvetlerinin içerisine yaklaşık 150 ml elektrolitik tampon çözeltisi konulmuş ve bu küvetlerin üzerine de bitki ekstraksiyonlarına ait filtre kağıtlarının dizili bulunduğu tarafın katot yönüne gelmiş olmasına dikkat edilmiştir. Jel küveti

plastik film ve cam ile kapatılarak en üste ısınmayı önlemek amacıyla soğutma kutuları yerleştirilmiştir. Jellere 45 mA ve 150 V doğru gerilim (DC) verilmiş ve bu işlem yaklaşık 5 ya da 6 saat süresince devam ettirilmiştir. Jel üzerindeki soğutucu kutular 1'er saat aralıklarla yenilenmiştir.

Elektroforez işleminin tamamlanmasının ardından jel özel bir kesici yardımıyla yaklaşık 1 mm kalınlıkta kesitlere ayrılmış ve bu jel kesitleri peroksidaz enzim sisteminin çalışılacağı boyama kaplarına konulmuştur.

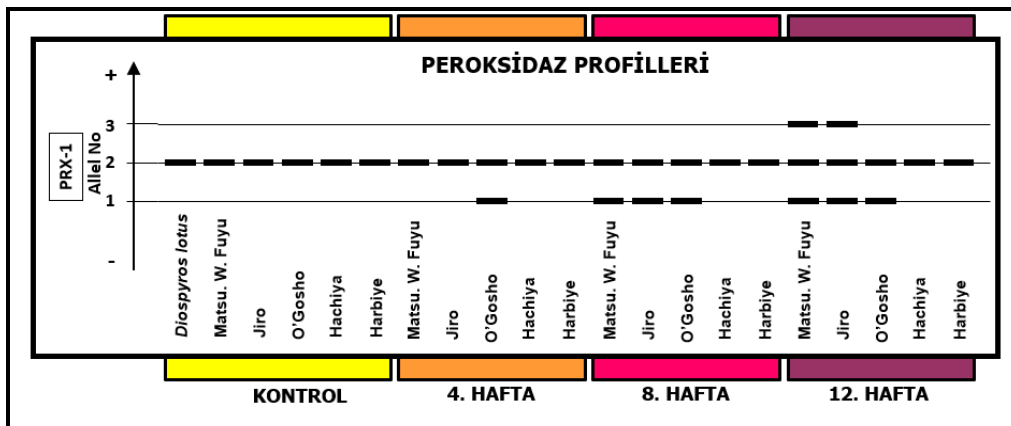
Bu jellerin üzerine 50'er ml özel tampon çözeltileri konulmuş ve üzerleri ışıktan zarar görmelerini engellemek için kapatılarak yaklaşık 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tampon çözeltileri kaplardan boşaltılmış ve jellerin üzerine boyama solüsyonları konulmuş ve üzerleri kapatılarak 38 °C'lik etüvde inkübe edilmiştir.

Boyama işlemleri bittikten ve peroksidaz bantlarının net bir şekilde görünmesinden sonra boyama solüsyonu temizlenmiş ve üzerine % 5 lik asetik asit çözeltisi konularak fiksasyonları sağlanmıştır.

3. Sonuçlar ve Tartışma

Artvin hurması çöğürleri ile kontrol dallarından alınan kabuk dokularında tek bant peroksidaz profili oluşmaktadır.

Aşılardan 4 haftalık bir süre sonunda ise peroksidaz enzim profilinde farklılıklar meydana gelmiştir. Şekil 1. de oluşturulan elektroforez profilinde peroksidaz izoenzim profilleri ile elde edilen bantlar şematize edilmiştir.



Şekil 1. Peroksidaz izoenzim profilleri ile elde edilen bantlar

Figure 1. Bands obtained by peroxidase isoenzyme profiles

PCNA grubuna giren (Matsumoto Wase Fuyu, Jiro ve O'Gosho çeşitlerinde peroksidaz aktivitesi hızla değişmesine karşın PVNA grubunda yer alan Harbiye çeşidinde ve PVA grubuna giren Hachiya çeşidinde başlangıçta izlenen peroksidaz aktivitesi değişmemiştir. Peroksidaz enzim profilinde gerçekleşen farklılıklar aşı uyumsuzluğunu ortaya koymuştur. Peroksidaz profilinde gerçekleşen farklılıklar dışında aşı noktasında bazı sekonder metabolitlerin de değişiminin incelenmesi gerekir.

Diospyros lotus / Diospyros kaki aşı kombinasyonlarında gallik asit, p-kumarik asit, kateşin ve kuarsetin gibi bazı fenolik bileşikler üzerinde durulması aşı uyumsuzluğu hakkında detaylı bilgiler elde edilmesine faydalı olabilir. Güçlü (2010) tarafından Prunus cinsinde yapılan bir çalışmada aşı bölgesinde fenolik madde birikiminin yüksek olduğu bildirilmiştir.

Gülen (2000) tarafından yapılan çalışmada armut/ayva aşı uyumsuzluğunun belirlenmesinde

farklı izoenzim sistemleri değerlendirilmiş ve peroksidaz enzim sisteminin uyumsuzlukların anlaşılmasında önemli bir yeri bulunduğu belirtilmiştir.

Peroksidazların çoklu formları bütün yüksek bitkilerde bulunmaktadır. Peroksidazlar, fenolik bileşik oksidasyonu, IAA oksidasyonu, ligninleşme ve polisakkaritlerin parçalanması gibi çok önemli hücrel reaksiyonlarda rol oynamaktadırlar. Bununla birlikte patojenlere karşı savunma mekanizmasında ve tuz, hava kirliliği gibi bitki için stres oluşturacak koşullarda da görev almaktadırlar. Peroksidazlar, ligninleşmede de dolaylı olarak rol oynayarak aşı uyumsuzluğu kapsamında incelenen enzimler haline gelmişlerdir.

Buruk olmayan Trabzon hurması çeşitlerinin fidanlarının üretiminde özellikle Diospyros kaki klonal anaçlarına gereksinim bulunmaktadır.

Kaynaklar

- Güçlü SF (2010). Kirazlarda Anaç/Kalem İlişkilerinin Biyokimyasal Yöntemlerle İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 103s, Isparta.
- Gülen H (2000). Ayva ve Armutlarda Anaç/Kalem İlişkilerinin İzoenzim Analizleriyle Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 135s, Adana.
- Gülen H, Küden A, Kreps SL, Arora R (2002). Armut ve Ayvada Nişasta Jel Elektroforez Tekniğine Göre Peroksidaz İzoenzim Analizleri İçin En Uygun Yöntemin Belirlenmesi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16, 191-200.
- Nurdan E (2006). Çanakkale Koşullarında Diospyros lotus Anaçı Üzerine Aşılınmış Değişik Hurma (Diospyros kaki L.) Çeşitlerinin Fenolojik Özellikleri, Klorofil Düzeyleri ile Peroksidaz Enzim Aktivitelerinin Ölçülmesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 63 s, Çanakkale.
- Şeker M (1999). Aurantioideae Alt-familyasındaki Önemli Turunçgil Genotiplerinin Tanılanmasında Genom Büyüklükleri ve İzoenzim Analizlerinden Yararlanma Olanakları. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi, 206 s, Adana.
- Şeker M (2004). Dünya'da Trabzon Hurması ıslahı üzerinde yapılan çalışmalar ve hedefleri. I. Trabzon Hurması Yetiştirme ve Pazarlama Sempozyumu, 6-13, Ordu.
- Yonemori K, Sugiura A and Masahiko Y (2000) Persimmon Genetics and Breeding. In: Plant Breeding Reviews (Ed. J. Janick). 19: 191-225.