

## **Bazı *Prunus* spp türlerinin tohumlarından kallus kültürlerinin oluşturulması**

**Birnur Hatice ERDEMEL<sup>1</sup>, Ahmet AYGÜN<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ordu

<sup>2</sup>Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Polatlı Tarım İlçe Müdürlüğü, Polatlı-Ankara

Alınış tarihi: 15 Eylül 2015, Kabul tarihi: 04 Ocak 2016

Sorumlu yazar: Ahmet AYGÜN, e-posta: ayguna70@yahoo.com

### **Öz**

Çalışmada, bazı *Prunus* türlerinde kotiledon explantlarından kallus üretimi için en uygun besin ortamının tespit edilmesine yönelik olarak 0, 1.0, ve 2.0 mg/l benziladenin (BA), 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 ve 5.0 mg/l naftalenasetik asit (NAA) ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit'in (2,4-D) oluşturduğu 30 farklı kombinasyon içeren Murashige and Skoog ortamı denenmiştir. Badem explantlarında en yüksek kallus oluşturma oranı %65.00 ile 2.0 mg/l BA+0.5 mg/l 2,4-D kombinasyonunda, kayısıda ise en yüksek kallus oluşturma oranı % 57.86 ile 1.0 mg/l BA+5.0 mg/l 2,4-D kombinasyonunda elde edilirken, karayemiş explantlarında ise kallus oluşturma oranı sadece %7.5 düzeyinde 1.0 mg/l BA+0.5 mg/l 2,4 D içeren ortamda gözlenmiştir. Kallus büyüklüğü 0-4 puan olarak göreceli olarak değerlendirilmiş ve buna göre en yüksek kallus büyüklüğü bademde 2.39 puan, kayısıda 0.35 puan karayemişte 0.38 puan olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Prunus*, kallus, doku kültürü

### **Callus cultures of some *Prunus* spp. species**

#### **Abstract**

In the study, Murashige and Skoog culture media supplemented with 30 different combinations composed of 0, 1.0 and 2.0 mg/l benzyladenine (BA); 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, and 5.0 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA) and 2,4-diklorofenoksiasetic acid (2,4-D) were evaluated in order to determine the most suitable combination of plant growth regulators for producing callus from cotyledon explants in some *Prunus* species. The highest ratios for callus formation in almond and apricot explants were 65% in the combination of 2.0 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D and 57.86% in 1.0 mg/l BA + 5.0 mg/l 2,4-D

combination, respectively. On the other hand, there was no callus formation in cherry laurel.

**Key words:** *Prunus*, callus, tissue culture

### **Giriş**

Kallus terimi Latince'de Callum kelimesinden gelmektedir. Callum sert veya tıpta termal dokunun kalınlaşması anlamına gelmektedir (Nagata ve Takebe, 1971). Kallus bitki biyolojisinin başlangıcında hücrenin kütsel büyümesini ve yaralanma ile kaloz birikimini ifade etmektedir. Ancak günümüzdeki kullanımı daha geniş anlamda düzensiz hücre yığını olarak ifade edilir. Kallus farklılaşmış bir hücreden üretilebilir ve çoğu kallus hücreleri totipotent özelliindedir (Ikeuchi ve ark., 2013).

Bitkilerde kallus farklılaşmamış parankima hücrelerinin hücre bölünmesi sonucu oluşan hücreler topluluğu olarak da ifade edilebilir. Bu hücreler doğada bitkilerin yara dokularının kapanmasında, iki bitki parçasının birleşmesinde (aşı), çeliklerin kök oluşumunda yer alırlar. Bitki doku kültürlerinde ise kallus oluşumu organ ve somatik embriyo oluşumunun indirekt yollarında, hücre süspansiyon kültürlerinin başlangıç materyalinin oluşumunda, fizyolojik ve sitogenetik çalışmaların deneysel materyalinin oluşumunda, protoplast eldesinde, gen transferi çalışmalarında, aşı uyumsuzluğunun kontrolünde, biyotik ve abiyotik stres koşullarına analiz çalışmalarında ve daha çok sekonder metabolit üretim çalışmalarında kullanılmaktadır. Sekonder metabolitler sayı ve yapı itibarıyla çok fazla çeşitlilikte üretilmeleri bitkilerin kendine özgü özelliklerden birisidir. Kallus kültürleri sınırlı sayıdaki materyali sınırsız yapma avantajına sahiptir. Aynı zamanda mevsimlik kısıtlamalara rağmen üretimde istenilen ürünleri bütün yıl

boyunca üretimine imkan sağlar. Bazı sekonder metabolitler örneğin antisiyonin ekstraksiyonu organize olmuş organ dokulardan daha zor elde edilirken kallus kültürlerinden kolay elde edilir (Sökmen ve Gürel, 2001; Koo ve ark., 2005; Keskin ve Kunter, 2007; Maharik ve ark., 2009; Çetin ve ark., 2011).

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde büyük bir genetik zenginliği olan acı badem (*Prunus dulcis* Mill.), acı kayısı (*Prunus armenica* L.), karayemiş (*Prunus laurocerasus* L.) tohumlarından farklı büyüme düzenleyici madde içeren ortamların kallus oluşumuna etkisinin araştırılmasıdır.

### Materyal ve Yöntem

#### Materyal

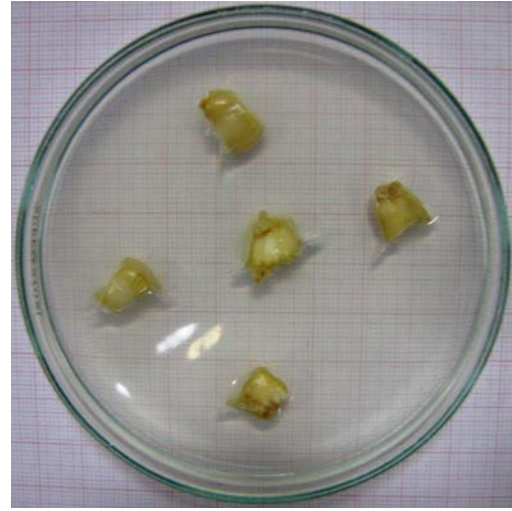
Çalışmada bitkisel materyal olarak *Prunus dulcis* Mill.'e ait tohumlar, Malatyanın Arapgir ilçesinde doğada kendiliğinden yetişmiş acı tada sahip olan bir ağaçtan, *Prunus armenica* L.'a ait tohumlar Kayısı Araştırma İstasyonu'nda (Malatya) yetiştirilen Hacıkız çeşidinden ve *Prunus laurocerasus* L.'a ait tohumlar Fındık Araştırma İstasyonu'nda (Giresun) yetiştirilen 52-06 nolu bir genotipten temin edilmiştir.

#### Yöntem

Kallus oluşumunda explant kaynağı olarak tohumların kotiledonları kullanılmıştır. Tohumların yüzey sterilizasyonu için tohum kabukları çıkarılan iç tohumlar 20 ml sodyum hipoklorit (%15'lik) 100 ml'ye saf su tamamlanması ve içerisine 1 damla tween 20 ilave edilmesi ile hazırlanan solüsyonda 20 dakika süreyle çalkalanmıştır. Sodyum hipokloritin dokulardan uzaklaşması için steril saf su içerisinde 5'er dakika süreyle 3 kez yıkanması ile yapılmıştır (Aygün ve Dumanoğlu, 1999). Steril tohumlar laminar hava akışlı kabin içerisinde penset ve bistüri yardımı ile tohumların dış kabukları (testa) tohumdan uzaklaştırılmış ve tohumun kotiledon yaprakları karayemişte bütün olarak kayısı ve bademde ise her bir kotiledon 2'ye bölünerek hazırlanan besin ortamlarına dikilmiştir (Şekil 1).

İlk dikim aşamasında besin ortamı olarak Benziladenin (BA), Naftalenasetik asit (NAA) ve 2,4-Diklorofenoksiasetik asit ile oluşturduğu (Çizelge 1.) kombinasyonları içeren, pH'sı 5.7'ye ayarlanmış, 30 g/l sakaroz ve 7.0 g/l agar katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır. Ortamların sterilizasyonu otoklav ile 121°C ve 1 atmosfer basınç altında 20 dakika süreyle yapılmıştır.

Dikim, içerisinde 35 ml besin ortamı bulunan 100 x 15 mm boyutlarındaki petri kaplarına yapılmış ve petri kaplarının ağız kısımları streç film ile sarılmıştır. Kültürler 24±1°C sıcaklık karanlık koşullarda 4 hafta gelişmeye bırakılmıştır. Explantlar büyüme düzenleyici madde içermeyen başlangıç ortamıyla aynı özelliklerdeki MS besin ortamına transfer edilerek 4'er hafta arayla 3 kez alt kültüre alınmıştır. Her bir alt kültürde kallus oluşturma oranı (%) oluşan kallusların ortalama ve büyüklüğü (puan) her bir ortam kombinasyonu için belirlenmiştir.



Şekil 1. Besin ortamında kayısı kotiledonları

Kallus oluşturma denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekerrürlü ve her bir tekerrürde 5 explant olacak şekilde kurulmuş ve büyüme düzenleyici kombinasyonları arasındaki kallus oluşturma oranı, kallus büyüklüğü Minitab istatistik paket programı kullanılarak F testi ( $P \leq 0.01$ )'e göre kontrol edilmiş ortaya çıkan önemli farklılıklar Duncan testi ile saptanmış ve farklı gruplar harfler yardımıyla belirlenmiştir. Denemeler 2 kez tekrarlanmıştır.

#### Bulgular ve Tartışma

Araştırmada 3 farklı *Prunus* türünün kotiledonlarının aynı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarında farklı düzeylerde kallus oluşumu gözlenmiştir. Denemede kullanılan kombinasyonlarda badem kotiledonları daha yüksek oranda kallus oluşturmuştur. Nitekim badem tohumlarına ait kotiledonlarda %65.00 oranında kallus oluşumu gözlemlenirken kayısı kotiledonlarında %57.90 olarak belirlenmiştir. Bu oran karayemiş kotiledonlarında ise sadece %7.50 düzeyinde kalmıştır. (Çizelge 1).

Çizelge 1. Farklı BA+Oksin kombinasyonlarının bazı *Prunus* türlerinde kallus oluşturma oranı ve büyüklüğü

No	BA+Oksin Kombinasyonları	Kallus Oluşturma Oranı (%)			Kallus Büyüklüğü (puan)		
		Badem	Karayemiş	Kayısı	Badem	Karayemiş	Kayısı
1.	0 mg/l BA+ 0.0 mg/l NAA	0.00 j	0.00	12.86 fgh	0.00 k	0.00	0.36 g-k
2.	0 mg/l BA+ 0.5 mg/l NAA	0.00 j	0.00	0.00 k	0.00 k	0.00	0.00 k
3.	0 mg/l BA+ 1.0 mg/l NAA	10.00 g-j	0.00	1.43 k	0.25 jk	0.00	0.04 jk
4.	0 mg/l BA+ 2.0 mg/l NAA	12.50 g-j	0.00	10.71 ghı	0.38 h-k	0.00	0.40 g-j
5.	0 mg/l BA+ 5.0 mg/l NAA	2.50 j	0.00	10.71 ghı	0.13 jk	0.00	0.27 h-k
6.	1 mg/l BA+ 0.0 mg/l NAA	0.00 j	0.00	0.00 k	0.00 k	0.00	0.00 k
7.	1mg/l BA+ 0.5 mg/l NAA	10.00 g-j	0.00	0.71 k	0.25 jk	0.00	0.04 jk
8.	1mg/l BA+ 1.0 mg/l NAA	20.00 efg	0.00	37.80 c	0.88 j-g	0.00	0.80 def
9.	1 mg/l BA+ 2.0 mg/l NAA	2.50 j	0.00	18.57 ef	0.13 jk	0.00	0.45 f-i
10.	1 mg/l BA+ 5.0 mg/l NAA	2.50 j	0.00	2.14 jk	0.25 jk	0.00	0.11 jk
11.	2 mg/l BA+ 0.0 mg/l NAA	0.00 j	0.00	0.00 k	0.00 j	0.00	0.00 k
12.	2 mg/l BA+ 0.5 mg/l NAA	7.50 hij	0.00	4.28 ijk	0.13j	0.00	0.08 ijk
13.	2 mg/l BA+ 1.0 mg/l NAA	32.50 d	0.00	2.86 jk	1.27 bc	0.00	0.14 ijk
14.	2 mg/l BA+ 2.0 mg/l NAA	27.50 def	0.00	28.57 d	0.67 f-i	0.00	0.69 d-g
15.	2 mg/l BA+ 5.0 mg/l NAA	37.50 bcd	0.00	18.57 ef	0.83 d-g	0.00	0.58 e-h
16.	0 mg/l BA+ 0.0 mg/l 2,4-D	2.50 j	0.00	1.42 k	0.13 jk	0.00	0.07 ijk
17.	0 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D	17.50 fgh	0.00	50.00 b	0.38 ijk	0.00	1.31 bc
18.	0 mg/l BA+ 1.0 mg/l 2,4-D	0.00 j	0.00	43.57 bc	0.00 k	0.00	1.53 b
19.	0 mg/l BA + 2.0 mg/l 2,4-D	35.00 cd	0.00	17.86 efg	1.00 c-f	0.00	0.90 de
20.	0 mg/l BA + 5.0 mg/l 2,4-D	47.50 b	0.00	57.90 a	1.46 b	0.00	2.16 a
21.	1 mg/l BA+ 0.0 mg/l 2,4-D	0.00 j	0.00	0.71 k	0.00 k	0.00	0.04 jk
22.	1 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D	7.50 hij	7.50	0.00 k	0.38 hk	0.38	0.00 k
23.	1 mg/l BA+ 1.0 mg/l 2,4-D	30.00 de	0.00	10.71 ghı	0.50 gj	0.00	0.24 h-k
24.	1 mg/l BA + 2.0 mg/l 2,4-D	37.50 bcd	0.00	9.29 hij	0.92 c-f	0.00	0.38 g-k
25.	1 mg/l BA + 5.0 mg/l 2,4-D	35.00 cd	0.00	27.14 d	1.04 c-f	0.00	1.23 bc
26.	2 mg/l BA+ 0.0 mg/l 2,4-D	5.00 ij	0.00	0.00 k	0.13 j	0.00	0.00 k
27.	2 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D	65.00 a	0.00	23.57 de	2.39 a	0.00	1.39 b
28.	2 mg/l BA+ 1.0 mg/l 2,4-D	45.00 bc	0.00	50.00 b	1.20 bcd	0.00	2.03 a
29.	2 mg/l BA + 2.0 mg/l 2,4-D	15.00 ghı	0.00	29.29 d	0.75 e-h	0.00	2.35 a
30.	2 mg/l BA + 5.0 mg/l 2,4-D	10.00 g-j	0.00	12.14 fgh	0.38 hk	0.00	0.54 e-h
LSD (p<0.01)			10.25		0.27		0.34

Bu kallus oluşum oranları Yao ve ark. (1990) şeftali nektarin ve yassı saturn şeftalilerinde olgunlaşmamış embriolarından kallus oluşumunu %83.3-100.0 oranında, Ning ve Bao (2007), eriğün yine olgunlaşmamış kotiledonlarından kallus oluşumunu %97 oranında ve Yang ve ark. (2009) bademde gövde, yaprak ve anterlerden kallus oluşumu ve kalluslardan bitki rejenerasyonu için yaptıkları çalışmada her üç explantdanda %100 oranında kallus elde etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim bulgularımızdan yüksektir. Bu farklılığın genotipten kaynaklandığı düşünülmektedir.

Diğer yandan olgunlaşmamış ya da olgunlaşmış explantlar arasında kallus oluşumu yönünden büyük farklılık vardır. Olgunlaşmamış kotiledonlardan alınan explantlarda mitotik aktivite devam ettiğinden kallus oluşumu ve rejenerasyonunun daha fazla olması beklenmektedir (Aygün ve Dumanoglu, 1999; Gürel ve Türker, 2001). Çalışmada kullanılan her üç türde de kallus oluşturma oranları kullanılan oksinlerden NAA' e göre genel olarak 2,4-D de daha fazla olmuştur (Çizelge 1). En yüksek kallus oluşturma oranı bademde; 2 mg/l BA+0.5 mg/l 2,4-D, kayısıda 0 mg/l BA + 5.0 mg/l 2,4-D karayemişde

ise sadece 1 mg/l BA + 0.5 mg/l 2,4-D, kombinasyonunda elde edilmiştir. En yüksek kallus oluşturma oranı farklı dozlar da olsa 2,4 D'li ortamlarda olmuştur. Yang ve ark (2009) bademde gövde, yaprak ve anterlerden kallus oluşumu için 0.2 mg/l BA+0.5 mg/l 2,4-D ve 1.0 mg/l NAA kombinasyonunu, Yao ve ark. (1990) ise şeftali nektarin ve yassı saturn şeftalilerinde olgunlaşmamış embriolarından kallus oluşumu için 5 mg/l BA+ 1 mg/l NAA+ 1 mg/l 2,4-D kombinasyonunu, en iyi kombinasyonlar olarak bildirmişlerdir. Araştırmacıların bildirmiş oldukları bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarında oksin olarak 2,4-D'nin kullanılmış olması bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Kullanılan bitki büyüme düzenleyici miktarı başlangıçta genotipe ve sonrasında ise kullanılan explanta göre değişiklik göstermektedir. Explantların olgunlaşmamış olması kullanılan bitki büyüme düzenleyici madde miktarını azaltırken başarı şansını artırmaktadır. Aynı zamanda kullanılan BA'nında dozu kullanılan explanta ve genotipe göre değişim göstermektedir. Çalışmada yer alan üç türden badem de 2 mg/l BA içeren ortamda en iyi sonuç alınırken karayemişde 1 mg/l BA içeren ortamda kayısıda ise BA'siz ortamda

en yüksek sonuçlar (0 mg/l BA+5.0 mg/l 2,4 D) elde edilmiştir. BA dozları türe göre değişiklik göstermektedir ve bu beklenen bir sonuçtur. Nitekim Terentter ve ark. (1985) Sam ve Schneiders kiraz çeşitlerinin sürgün explantlardan kallus oluşumu 0.2 mg/l BA, Jones ve ark (1988) ticari olarak önemli çilek çeşitlerinde petiol explantlarında veya yaprak parçalarından 0.9 mg/l BA, Yao ve ark. (1990) Şeftali nektarin ve yassı saturn şeftalilerinde olgunlaşmamış embriyolarından kallus oluşumu 0.5 mg/l BA Blando ve ark. (2005) vişnede 0.1 mg/l BA, Ning ve Bao (2007), eriğin (*Prunus mume*) olgunlaşmamış kotiledonlarından kallus oluşumunda 0.5 mg/l BA, Yang ve ark (2009) bademde (*Amygdalus communis*) gövde, yaprak ve anterlerden kallus oluşumunda 0.2 mg/l BA dozlarını aynı bulmuşlardır. Çalışmalardan da görüldüğü gibi kallus oluşumu için kullanılan BA dozları türe ve explanta göre değişiklik göstermektedir. Bizim çalışmamızda kullanılan BA'nın dozları literatürde bildirilen dozlar aralığındadır.

Sonuç olarak *Prunus* türlerinde kallus kültürlerinin oluşturulmasında badem ve kayısıda yeterli sonuç alınırken karayemişte farklı ortam içeriklerinin veya farklı olgunlaşma safhalarındaki kotiledonların explant olarak kullanılması başarıyı artıracak kanaatindeyiz.

### Kaynaklar

- Aygün, A., Dumanoglu, H., 1999. Ayvada (*Cydonia vulgaris* Pers.) Olgunlaşmamış Çenek Yapraklardan Somatik Embriyo Oluşumu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 5 (2): 50-57.
- Blando, F., Scardino, A.P., Bellis, L., Nicoletti, I., Giovinazzo, G. 2005. Characterization of in vitro anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus culture. Food Research International, 38 : 937-942.
- Çetin, E.S., Uzunlar, F., Baydar, N.G. 2011. UV-C Uygulamasının Gamay Üzüm Çeşidine Ait Kalluslarda Sekonder Metabolit Üretimi Üzerine Etkileri. Gıda, (2011) 36 (6): 319-326
- Gürel, E., Türker, U.A. 2001. Organogenesis. Bitki Biyoteknolojisi. Vol. I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler S. Özcan, E. Gürel ve M. Babaoğlu. S.Ü. Basımevi, s.36-70, Konya.

- Jones, O.P., Waller, B.J., Beech, M.G. 1988. The production of strawberry plants from callus cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 12:235-241.
- Keskin, N., Kunter, B., 2007. Erciş Üzüm Çeşidinin Kallus Kültürlerinde UV Işını Etkisiyle Resveratrol Üretiminin Uyarılması. A.Ü Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 13 (4): 379-384.
- Koo, J.Y., Hwang, E.Y., Cho, S., Lee, J.H., Lee, Y.M., Hong, S.P., 2005. Quantitative Determination of Amygdalin Epimers from Armeniaceae semen by Liquid Chromatography. Journal of Chromatography B, 814: 69-73.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, S., Iwase, A. 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression Plant Cell. 2013 Sep; 25(9): 3159-3173.
- Maharik, N., Elgengaih S., Taha H., 2009. Anthocyanin Production in Callus Cultures of *Crateagus sinaica* Boiss. Department of Plant Biotechnology, National Research Center Department of Cultivation and Production of Medicinal and Aromatic Plants, 1(1): 30-34.
- Nagata T., Takebe I., 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta, 99: 12-20
- Ning, G.G., Bao, M.Z. 2007. Plant Regeneration Callus Derived from Immature Embryo Cotyledons of *Prunus mume*. Hort science, 42(3):744. 2007.
- Sökmen, A., Gürel, E. 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi. Vol. I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler S. Özcan, E. Gürel ve M. Babaoğlu. S.Ü. Basımevi, s.211-261, Konya.
- Tretter, D., Galensa, R., Feucht, W., Schmid, P.P.S. 1985. Flavanone glucosides in callus and phloem of *Prunus avium*: Identification and stimulation of their synthesis. Physiologia Plantarum, 65(1): 95-101.
- Yang, N., Ying, L.Y., Teng, G.Z., Kun, S. 2009. Callus Induction and Regenerasyon of *Amygdalus communis*. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica vol.29 no.9. pp 1779-1784.
- Yao, Q.; Wang, D. C.; Wu, J. L., Zhuang, E. J. 1990. Callus induction and plantlet regeneration from immature embryos of peach, nectarine and flat peach. Acta Agriculturae Shanghai 6 (3):23-29.