

Bazı Nektarin ve Erik Çeşitlerinin Embriyo Kültürleri Üzerine Besin Ortamı ve Genotipin Etkisi

Müge Şahin, Celal Şafak, Andaç Çavdar, Deniz Aaksoy, Selay Doğan

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Menemen, İzmir

e-posta: mugesahin67@hotmail.com

Özet

Çalışmada Armking, Bigtop, Caldesi nektarin (*Prunus persica* var. *nectarine* Maxim.) ve Methley japon eriği (*Prunus salicina*) çeşitlerinde embriyo kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İn vitro şartlarda izole edilen embriyolar BAP (0.5 - 1 - 1.5 mg/l) ve GA₃ (0.1 mg/l)'ün farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Çimlenme oranları, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, kardeşlenme oranları ve rozet bitki oluşumu çeşitler bazında belirlenerek ortamların ve genotipin etkileri incelenmiştir. En yüksek çimlenme oranları; Armking çeşidinde kontrol ve 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ortamında %100, Caldesi ve Methley çeşidinde 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ortamında sırasıyla %100, %86, Bigtop çeşidinde ise besin ortamlarının tamamında %100 oranında çimlenme sağlanmıştır. Armking ve Caldesi çeşitlerinde görülen yoğun bakteriyel kontaminasyondan dolayı bu çeşitlerde sadece çimlenme oranları belirlenmiştir. Bigtop ve Methley çeşitleri sürgün uzunluğu bakımından incelendiğinde, hem sürgün ve kök uzunluğu hem de kardeşlenme oranı bakımından, sırasıyla 1.47 cm, 2.15 cm ve 2.95 adet ile Methley çeşidinden en yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bigtop çeşidinde 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃, Methley çeşidinde ise 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ve 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ içeren ortamlarda rozet bitki oluşumu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler; İn-vitro, embriyo kültürü, *Prunus persica* var. *nectarine*, *Prunus salicina*

Effects of Different MS Medium on Embryo Cultures of Some Plum and Nectarine Varieties

Abstract

In this research embryo culture studies were performed in Armking, Bigtop, Caldesi nectarine varieties (*Prunus persica* var. *nectarine* Maxim.) and Methley japanese plum (*Prunus salicina*) variety. Embryos were isolated in-vitro conditions and were cultured in MS medium which containing different concentrations and combinations of BAP (0.5 to 1 - 1.5 mg/l) and GA₃ (0.1 mg/l). Two weeks after germination, germination rates, shoot and root length, tillering and rosette plant rates were determined on the basis of different medium and genotypes. The highest germination rates were identified in Armking variety with control and 1.5 mg / l BAP + 0.1 mg / l GA₃ medium 100%, Caldesi and Methley varieties with 1.5 mg / l BAP + 0.1 mg / l GA₃ medium respectively 100%, 86% and in Bigtop variety 100% germination were seen at all of the hormone concentrations. Intensive bacterial contamination were seen in Armking and Caldesi varieties for that reason only germination rates were determined in these varieties. When analyzed Methley and Bigtop varieties in terms of shoot and root length as tillering rate, the highest result were obtained in Methley variety respectively 1.47 cm, 2.15 cm and 2.95. Rosette plant formation was observed in Bigtop variety with 0.5 mg / l BAP + 0.1 mg / l GA₃ medium and in Methley variety with 1 mg / l BAP + 0.1 mg / l GA₃ and 1.5 mg / l BAP + 0.1 mg / l GA₃ medium.

Keywords: İn-vitro, Embryo culture, *Prunus persica* var. *nectarine*, *Prunus salicina*

Giriş

Bitkilerin tohumlarından ve/veya tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek in vitro koşullarda kültüre alınması olarak tanımlanan embriyo kültürü yöntemi, sert çekirdekli meyve türlerinin ıslahında önemli bir yer tutmaktadır.

Embriyo kültürü meyve türlerinde görünen dormansinin kırılmasında, erkenci çeşitler ve erkenci çeşitlerin yer aldığı melez kombinasyonları ile türler arası ve farklı ploidi seviyesindeki bitkiler arasında yapılan melezlemelerde görülen embriyo aborsiyonu engelini aşılmasında yaygın olarak

kullanılmaktadır (Ramming 1990; Arbeloa ve ark., 2003; Vilorio ve ark., 2005; Arbeloa ve ark., 2009).

Sert çekirdekli meyve türlerinde yapılan embriyo kültürü çalışmaları bakıldığında ağırlıklı olarak farklı embriyo büyüklükleri, ortamlar, genotip-çeşit, hormon konsantrasyonları ve soğuklanma sürelerinin embriyo kültürü üzerine olan etkilerinin incelendiği görülmektedir (Burgos ve Ledbetter, 1993; Emershad ve Ramming, 1994; Rizzo ve ark., 1998; Küden ve ark., 1999; Anderson ve ark., 2002; Arbeloa ve ark., 2003; Daorden ve ark., 2004; Vilorio ve ark., 2005; Arbeloa ve ark., 2009; Sulusoglu, 2012; Şan ve ark., 2014).

Bu çalışmada ise farklı nektarin ve japon eriği çeşitlerinde, sitokinin ve giberellin hormonlarının embriyo çimlenmesi, sürgün ve kök uzunluğu, kardeşlenme miktarı ve rozet bitki oluşumuna olan etkileri incelenerek, elde edilen sonuçlarının ıslah çalışmalarında kullanımına olanak sağlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali

Çalışmada bitkisel materyal olarak Armking, Bigtop, Caldesi nektarin ve Methley japon eriği çeşitlerinin olgunlaşmış embriyoları kullanılmıştır. Bu çeşitlere ait tohumlar Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen ağaçlardan, her çeşidin olgunlaşma zamanına göre meyveler hasat edilerek elde edilmiştir ve tohumlar meyvelerden çıkartılarak buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Sterilizasyon

Nektarin ve erik tohumlarının endokarpi kırılarak uzaklaştırıldıktan sonra %2'lik sistemik fungusit solüsyonunda 1 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Bu işlem sayesinde hem fungal kontaminasyonların önüne geçilmesi hedeflenmiş hem de embriyonun izolasyonu sırasında tohum kabuğunun daha rahat soyulması sağlanmıştır. Steril kabin içerisine alınan tohumlar %70'lik etanol ile 45 saniye ön sterilizasyona tabi tutulmuş ve ardından steril distile su ile çalkalanmıştır. %25'lik NaOCl (Sodyum Hipoklorit) + Tween 20 (1-2 damla) içeren solüsyon ile 10 dakika yüzey sterilizasyonu uygulanan tohumlar 3 defa 5'er dakika steril distile su ile çalkalanmıştır. Çalışmada kullanılan saf su, kurutma kağıdı, cam malzemeler, pens ve bistüriler otoklavda 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

In Vitro Çimlenme

Denemelerde *in vitro* ortam olarak hazır MS (Murashige&Skoog Medium - Murashige, 1962) besin ortamı, 30 g L-1 sukroz, 7,5 g L-1 agar içerecek şekilde hazırlanmış ve pH 5.7'ye ayarlanmıştır. MS besin ortamları BAP (0.5 - 1 - 1.5 mg/l) ve GA₃ (0.1 mg/l)'ün farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içerecek şekilde; Kontrol, 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃, 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃, 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃, 0.1 mg/l GA₃ hormon dozlarında hazırlanmıştır.

Sterilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra steril kurutma kağıtları arasında nemi aldırılan tohumlardan embriyolar pens ve büstri

yardımlarıyla izole edilmiş ve içerisinde 20 ml MS besin ortamı içeren petri kaplarında kültüre alınmıştır. Kökçük çıkışı meydana gelene kadar +4°C' de karanlık koşullarda bekletilen tohumlardan, kökçük çıkışı başlayan çeşitler 28 ± 1°C sıcaklık, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık ve 3200 lüks ışık yoğunluğu koşullarındaki kültür odasına aktarılmıştır. İki hafta sonra çimlenme oranları, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, kardeşlenme oranları ve rozet bitki oluşumu belirlenmiştir.

Verilerin Değerlendirilmesi

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre, 3 tekrerrür ve her tekrerrürde 10 embriyo olacak şekilde kurulmuştur. Elde edilen ortalamalar varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve sonuçlar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde LSD (P≤0,01) çoklu karşılaştırma testinden faydalanılmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Prunus türlerinin embriyo kültürü yolu ile çimlendirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda, embriyoların farklı boyutları, besin ortamları ve hormon konsantrasyonlarında %3.1-100 arasında değişen oranlarda çimlenme gösterdikleri belirlenmiştir (Arbeloa ve ark., 2003; Daorden ve ark., 2004; Arbeloa ve ark., 2009; Payghamzadeha ve Kazemitabar, 2010; Eroğlu ve ark., 2012; Şan ve ark., 2014). Ortamların, çeşitlerin çimlenme oranlarına olan etkisi incelendiğinde Armking çeşidinde kontrol ve 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ortamında %100, Caldesi ve Methley çeşidinde 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ortamında sırasıyla %100, %86, Bigtop çeşitinde ise besin ortamlarının tamamında %100 oranında çimlenme sağlanmıştır. Caldesi ve Methley çeşitlerinde ortama ilave edilen BAP miktarının artması çimlenmeyi olumlu yönde etkilemiş ve en yüksek sonuçlar BAP'ın en yüksek dozda olduğu koşullardan elde edilmiştir. Bu çeşitlerden elde edilen sonuçlar sitokininlerin embriyo çimlenmesini teşvik ettiği bildirilen çalışmaları destekler niteliktedir (Ramming ve ark., 2003; Liu ve ark., 2007).

Armking ve Caldesi çeşitlerinde %30 oranında görülen bakteriyel kontaminasyondan dolayı bu çeşitlerde sadece çimlenme oranları belirlenmiş bakteriyel kontaminasyon çimlenme üzerine olumsuz etki göstermemiş olmasına rağmen diğer parametreleri etkileyebileceği göz önünde bulundurularak denemelere son verilmiştir. Bigtop ve Methley çeşitlerinde

kontaminasyon görülmemesi, aynı sterilizasyon işlemi uygulanmasına rağmen çeşitler arasında görülen bu farklılığın Armking ve Caldesi çeşitlerine ait ağaçlardaki endofitik bakteriyel hastalık etmenlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Ortam x çeşit interaksiyonunun, sürgün ve kök uzunluğu ile kardeşlenme oranlarına olan etkileri $P \leq 0,01$ önem düzeyinde istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (Çizelge 1). Methley çeşidinde sürgün uzunluğu bakımından 0.1 mg/l GA₃ ortamı en iyi sonucu verirken Bigtop çeşidinde en iyi sonuç 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ortamından elde edilmiştir (Şekil 1a). Kök uzunluğu bakımından Methley çeşidinde 0.1 mg/l GA₃ ve kontrol ortamı en iyi sonucu verirken Bigtop çeşidinde 0.1 mg/l GA₃ ortamı en uygun ortam olarak belirlenmiştir (Şekil 1b). Kardeş sayısı bakımından incelendiğinde ise Methley çeşidinde BAP içeren ortamların tamamında, Bigtop çeşidinde de 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ve 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ortamında en iyi sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 1c).

Sürgün ve kök uzunluğu ($P \leq 0.01$) ve kardeşlenme oranı ($P \leq 0.05$) bakımından incelendiğinde sırasıyla 1.47 cm, 2.15 cm ve 2.95 adet ile Methley çeşidinden en yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 2). Methley çeşidinin embriyo gelişim aşamaları Şekil 2'de görülmektedir.

Ortamların, sürgün ve kök uzunluğu ile kardeşlenme oranlarına olan etkileri istatistiksel olarak ($P \leq 0.01$) önemli bulunmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından 0.1 mg/l GA₃ ortamı, kök uzunluğu bakımından kontrol ve 0.1 mg/l GA₃ ortamı, kardeş sayısı bakımından ise 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃, 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃, 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ortamları en iyi ortamlar olarak belirlenmiştir (Çizelge 3).

Bigtop çeşidinde 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃, Methley çeşidinde ise 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ve 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ içeren ortamlarda rozet bitki oluşumu gözlemlenmiştir. Rozetleşen bitkilerde, boğum arası mesafe, normal gelişen bitkilere göre daha kısa olmuş (Topp ve ark., 2008) ve bitki gelişimi sınırlanmıştır. Yapılan çalışmalarda WPM besin ortamlarında sitokinin miktarının artması ile rozet bitki oluşumu arasında doğru orantı olduğu belirlenmiştir (Rizzo ve ark., 1998; Jeengool ve Boonprakob, 2004). MS besi ortamında gelişen

Methley çeşidi embriyolarından elde edilen bulgular bu sonuçları destekler niteliktedir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda özellikle melez bitkilerin tekerrürlü çoğaltılmasının önemli olduğu durumlarda BAP içeriği yüksek olan ortamların tercih edilebileceği bu şekilde gerekli kardeşlenmenin sağlanabileceği belirlenmiştir. BAP konsantrasyonunun artması ile çimlenme oranının artmasına rağmen rozet bitki oluşumunda doğru orantılı olarak arttığı göz ardı edilmemelidir. Tek bitki eldesinin yeterli olduğu durumlarda ise, çeşitlere göre değişmekle birlikte genel olarak bitki gelişimi için 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA₃ ve 0.1 mg/l GA₃ ortamlarının önerilebileceğini ortaya koymuştur.

Kaynaklar

- Anderson, N., Byrne, D. H., Sinclair, J., Burrell, A. M., 2002. Cooler temperature during germination improves the survival of embryo cultured peach seed. *HortScience*, 37(2):402-403.
- Arbeloa, A., Daorden, M. E., García, E., Andreu, P., Marín, J.A., 2009. In vitro culture of Myrobalan' (*Prunus cerasifera* Ehrh.) embryos. *HortScience*, 44(6):1672-1674.
- Arbeloa, A., Daorden, M. E., García, E., Marín, J. A., 2003. Successful establishment of in vitro cultures of *Prunus cerasifera* hybrids by embryo culture of immature fruits. *Acta Horticulturae*, 616: 375-378.
- Burgos, L., Ledbetter, C.A., 1993. Improved efficiency in apricot breeding: Effects of embryo development and nutrient media on in vitro germination and seedling establishment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35(3):217-222.
- Daorden, M. E., Marín, J. A., Arbeloa, A., 2004. Stratification temperature affects the in vitro germination of immature prunus embryos *Acta Horticulturae*, 658:135-140.
- Emershad, R.L., Ramming, D.W., 1994. Effects of media on embryo enlargement, germination and plant development in early-ripening genotypes of *Prunus* grown.
- Eroğlu, Ö. Z., Fidancı, A., Mısırlı, A., 2012. Erkenci şeftali embriyolarının farklı kültür ortamlarında gelişimi. *Journal of Agricultural Sci.* 18:93-99.
- Jeengool, N., Boonprakob, U. 2004. Rescue of peach embryo in culture media with additional of 6-benzyladenine and gibberellic acid. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 38: 468-474.

- Küden, A.B., Tanriver, E., Gülen, H., Büyükalaca, S., 1999. Embryo rescue of peach hybrids. *Acta Horticulturae* 484: 531-533.
- Liu, W., Chen, X., Liu, G., Liang, Q., He, T., Feng, J., 2007. Interspecific hybridization of *Prunus persica* with *P. armeniaca* and *P. salicina* using embryo rescue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88: 289-299.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Payghamzadeha, K., Kazemitabar, S.K., 2010. The effects of BAP, IBA and genotypes on in vitro germination of immature walnut embryos. *International Journal of Plant Production*, 4(4):309-322.
- Ramming, D., Emershad, R.L., Foster, C., 2003. In vitro factors during ovule culture affect development and conversion of immature peach and nectarine embryos. *HortScience*, 38:424-428.
- Ramming, D.W., 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. *HortScience* 25:393-398.
- Rizzo, M., Bassi, D., Byrne, D., Porte, K., 1998. Growth of immature peach [*Prunus persica* (L.) Batsch.] embryos on different media. *Acta Horticulturae* 465:141-144.
- Sulusoglu, M., 2012. Development of embryo culture protocol for cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.). *Journal of Food, Agric. and Environment*, 10(3-4):347-352.
- Şan, B., Yıldırım, A. N., Yıldırım, F., 2014. An in vitro germination technique for some stone fruit species: The embryo isolated from cotyledons successfully germinated without cold pre-treatment of seeds. *HortScience*, 49(3):294-296.
- Topp, B.L., Sherman, W.B., Raseira, C.B., 2008. Low-chill cultivar development. *The Peach: Botany, Production and Uses*, CAB International, pp. 106-138.
- Viloria, Z., Grosser, J.W., Bracho, B., 2005. Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interloid hybridization. *Plant cell, tissue and organ culture*, 82(2):159-167.

Çizelge 1. Ortam x çeşit interaksyonunun sürgün ve kök uzunluğu ile kardeşlenme oranlarına olan etkileri

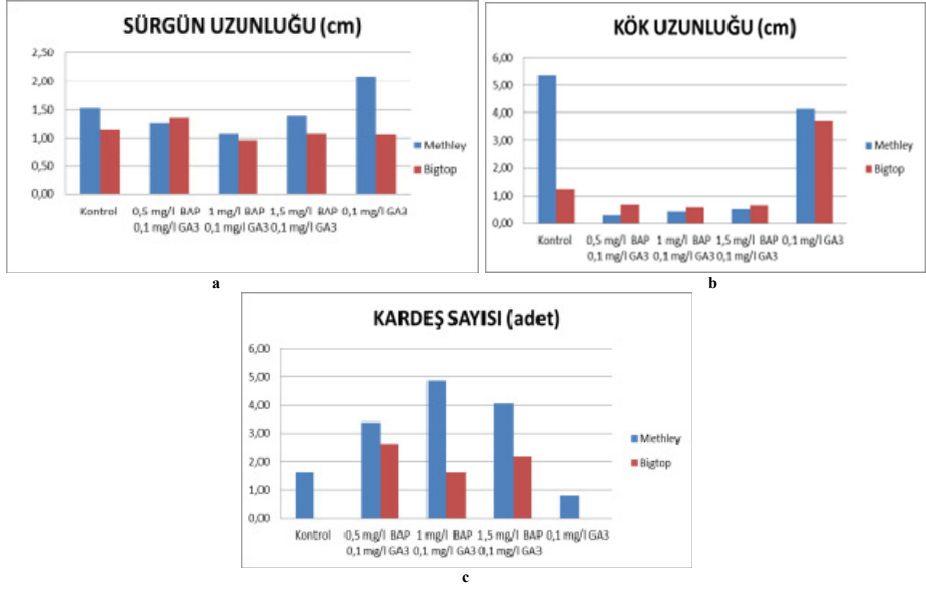
Çeşit	Ortam	Sürgün Uzunluğu (cm) **	Kök Uzunluğu (cm) **	Kardeş Sayısı (adet) **
METHLEY	Kontrol	1.540 b	5.347 a	1.60 b
	0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA ₃	1.253 bc	0.307 b	3.40 a
	1 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA ₃	1.080 c	0.433 b	4.87 a
	1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA ₃	1.380 bc	0.527 b	4.07 a
	0.1 mg/l GA ₃	2.087 a	4.140 a	0.80 b
BİGTOP	Kontrol	1.147 ab	1.253 b	0
	0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA ₃	1.347 a	0.680 b	2.60 a
	1 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA ₃	0.967 b	0.607 b	1.60 b
	1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA ₃	1.080 ab	0.667 b	2.20 a
	0.1 mg/l GA ₃	1.060 ab	3.720 a	0
LSD		0.379	0.647	1.484

Çizelge 2. Bigtop ve Methley çeşitlerinde; sürgün, kök uzunluğu ve kardeşlenme oranları

Çeşit	Sürgün Uzunluğu (cm) **	Kök Uzunluğu (cm) **	Kardeş Sayısı (adet) *
Methley	1.47 a	2.15 a	2.95 a
Bigtop	1.12 b	1.38 b	2.13 b
LSD	0.17	0.56	0.66

Çizelge 3. Ortamların sürgün, kök uzunluğu ve kardeşlenme oranlarına etkileri

Çeşit	Sürgün Uzunluğu (cm) **	Kök Uzunluğu (cm) **	Kardeş Sayısı (adet) **
Kontrol	1.34 b	3.30 a	1.60 ab
0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA ₃	1.30 b	0.49 b	3.00 a
1 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA ₃	1.02 c	0.52 b	3.23 a
1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA ₃	1.23 b	0.56 b	3.13 a
0.1 mg/l GA ₃	1.57 a	3.93 a	0.80 b
LSD	0.19	0.88	2.06



Şekil 1. Ortam x çeşit etkisinin sürgün (a) ve kök uzunluğu (b) ile kardeşlenme oranlarına (c) olan etkileri

