

SÜRGÜN ÇOĞALTILMASI İLE İN VİTRO'DA ELDE EDİLEN KİVİ (*Actinidia chinensis* Planch.) SÜRGÜNLERİNİN FARKLI YÖNTEMLERLE KÖKLENDİRİLMESİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Ali Ömer ÜÇLER Zeki YAHYAOĞLU İhsan GÜNEŞ
Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi Orman Mühendisliği Bölümü
Trabzon-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmada in vitro'da elde edilen Hayward kökütvarına kivi sürgünlerinin tekrar çoğaltılması ve in vitro ve in vivo'da köklendirilmesi amaçlanmıştır.

Bunun için; sürgün elde etmek üzere başlangıç kökütvarlarında Kivi'nin nodal parçaları kullanılmıştır. Daha sonra bu sürgünler, tekrar nodal parçalara bölünerek yeni sürgünler elde edilmiştir. Bu parçalar MS ve WPM adlı iki temel besin ortamına 1.0 mg/l BAP eklenerek kökütvara alınmışlardır. Yapılan ölçümler; sürgün oluşumu ve çoğaltması bakımından MS ortamının daha etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Yeniden çoğaltma yoluyla elde edilen çok sayıda sürgün köklendirme denemelerinde kullanılmıştır. In vitro'da köklendirme için IBA'nın dört farklı dozu (0.5, 1.0, 3.0, 5.0mg/l) 1/2 MS ortamına eklenmiştir. En iyi köklenme 5.0 mg/l IBA dozunda olmuştur. İn vivo'da köklendirme için iki farklı toprak karışımı test edilmiştir. Her iki karışım da %90'ın üzerinde köklenme ve yaşama başarısına ulaşılmıştır. Böylece in vivo'da köklendirmenin in vitro'da köklendirmeye göre daha başarılı olduğu ortaya konmuştur.

A STUDY ON ROOTING IN THE DIFFERENT METHODS OF OBTAINED SHOOTS WITH SHOOT MULTIPLICATION IN VITRO OF KIWI (*Actinidia chinensis* Planch.)

Abstract: In this study, it was aimed rooting Kiwifruit cv. Hayward obtained shoots in vitro in vivo and again in vitro.

Therefore, nodal explants have been used to obtain the shoots at the beginning of culture. After that, these shoots were used again as explant recourses for obtaining new shoots. These nodal explants were cultured into two media known as MS and WPM supplemented 1.0 mg/l BAP. It was concluded that MS medium had been more effective for shoot formation and shoot multiplication.

A great number of shoots, which were obtained with remultiplication, were used for rooting trials. It was supplemented four different concentrations of IBA (0.5, 1.0, 3.0, 5.0mg/l) for rooting in vitro in 1/2 MS medium. The best rooting occurred with 5.0 mg/l IBA concentration. Two different soil mixtures were tested for rooting in vivo. Two of them were also obtained rooting and survival success more than ninth percent. Finally, the rooting in vivo was found to be more successful than in vitro.

GİRİŞ

Türkiye gerek coğrafi konumu, gerekse iklim yapısı nedenleriyle, çok farklı ekoloji ve mikroklimalara sahip ender ülkelerden birisidir. Bu özellikleri itibarıyla de, ülkemizde çok değişik bitki türlerinin yetiştirilmesi söz konusu olabilmektedir.

Türkiye'de halen üretimi olmayan veya yetersiz olan bazı türler dış ülkelerden sağlanmaktadır. Kivi ya da kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) da bu türlerden birisidir. Anavatanı Doğu Çin olan kivi'nin kendiliğinden yetiştiği yerler orman eteklerinde, oransal nemin yüksek olduğu (%70-80) deniz seviyesinden en az 300, çoğunlukla 800-1400m. yüksekliği olan yörelerdir. Ülkemizde yetiştirilmeye yeni başlanılan bu türün de bir çok yöremize iyi uyum sağlaması ve önümüzdeki yıllarda üretiminin gelişmesi beklenmelidir (1).

Türün, Doğu Karadeniz Bölgesinde yetiştirilmesi ile ilgili olarak Tarım İl Müdürlükleri ve Çay Araştırma Enstitüsü tarafından yapılan adaptasyon çalışmalarında çok başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle Doğu Karadeniz Bölgesinde Fındık, Çay ve Kızılağaç ile birlikte Tarımsal Ormancılık (Agroforestry) faaliyetleri içerisinde değerlendirilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

Geleneksel yöntemler kullanılarak yapılan çoğaltma tekniklerine kıyasla, in vitro'da mikrovegetatif üretim tekniğinin en önemli avantajlarından birisi de başlangıç materyali olarak alınan eksplantndan, kısa bir sürede çok sayıda mikrosürgünün elde edilerek, bunların in vitro ve in vivo'da köklendirilmesi ve bu şekilde çok sayıda bitkinin elde edilebilmesidir.

Bu araştırmada, Kivi sürgünlerinin in vitro'da yeniden çoğaltma ile elde edilmesi ve bunun in vitro ve in vivo'da köklendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Bu araştırmada başlangıç materyali olarak, aktif olarak büyüyen bir adet dişi kividenden elde edilen yeşil sürgünlerin nodları kullanılmıştır. Daha sonra bu nodlardan gelişen sürgünler steril koşullarda tekrar nodal parçalara ayrılarak, yeni sürgünleri elde etmek amacıyla kültüre alınmışlardır.

Metot

Aktif olarak büyüyen Kivi'den kesilen yeşil sürgünler nodal parçalara ayrılarak %70 lik alkolle 3 dakika süreyle ve sonra %3 lük sodyum hipokloritle 10 dakika süreyle yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuşlardır. Bundan sonra steril saf su ile üç kez yıkanmışlardır.

Kültür ortamı olarak; Murashige ve Skoog (MS) (2) makro ve mikro elementleri ve vitaminleri (100 mg/l myo-inositol, 0.5 mg/l thiamine-HCl, 0.5 mg/l nicotinic acid, 0.5 mg/l pyridoxine HCl ve 2.0 mg/l glycine), Woody Plant Medium (WPM) (3) makro ve mikro elementleri ve vitaminleri (100 mg/l myo-inositol, 1.0 mg/l thiamine-HCl, 0.5 mg/l nicotinic acid, 0.5 mg/l pyridoxine HCl ve 2.0 mg/l glycine) olmak üzere iki temel besin ortamı kullanılmıştır.

Kültür ortamlarının pH'sı 0.1 N KOH ve 0.1 N HCL eklenerek 5.8'e ayarlanmıştır. Kültür ortamlarını katılaştırmak için, ortamlara 7 g/l agar ilave edilmiştir. Kültür kabı olarak 15x15 mm lik kültür tüpleri ve 60x180 mm lik kültür kapları kullanılmıştır. Kültür tüpleri ve kaplarındaki ortamlar 1.05 kg/cm² basınç altında 121°C'de 15-20 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

Yüzeysel sterilizasyon işlemine tabi tutulmuş nodlu parçalar daha sonraki çoğaltma denemelerine materyal sağlamak üzere, ön denemelerde iyi sonuç verdiği anlaşılan 5.0 mg/l kinetin+0.5mg/l IAA (indole-3-acetic acid)ekli MS ortamında kültüre alınmışlardır. Nodlarda oluşan sürgünler tekrar nodlu parçalara ayrılarak, bu kez 1.0 mg/l BAP (6-Benzylaminopurine)'in eklendiği MS ve WPM ortamlarında kültüre alınmaya devam edilmiştir.

Kültürlerden 4 hafta sonra, 1.0 mg/l BAP'lı MS ve WPM ortamlarındaki nodlarda oluşan sürgünlerin boyları, sayıları ve nod sayıları tespit edilerek elde edilen veriler kültür ortamının etkisini belirlemek üzere basit varyans analizi ile denetlenmiştir.

Kültürlerden elde edilen sürgünler kesilip mikroçelik olarak köklendirme denemelerinde kullanılmıştır. In vitro'da köklendirme için mikroçelikler; 1/2 MS ortamına IBA (indole-3-butyric acid)'nın dört farklı dozu (0.5, 1.0, 3.0 ve 5.0 mg/l) eklenerek kültüre alınmıştır. In vivo'da köklendirmede ise mikroçelikler; yaprak çürüğü : perlit : kum (4 : 1 : 1 oranında) ve yapraklı orman toprağı : kum (2 : 1 oranında)'dan oluşan sterilize edilmemiş iki farklı toprak karışımına hiç bir hormonal işlem yapılmaksızın şaşırtılmışlardır. Bu karışımlar 30x30x10 cm ebadında hazırlanmış ahşap kasalara

yerleştirilmiştir. Şaşırtma sonrası mikroçelikler; 20-22 °C sıcaklık, normal gün ışığı ve %80-90 rutubet içeren kontrollü çevre şartlarına alınmıştır.

SONUÇLAR

Başlangıçta MS+5.0 mg/l kinetin+1.0mg/l IAA ortamında kültüre alınan kivi nodlarında, kültürden bir hafta sonra, nodların did kısımlarında bol miktarda beyaz renkli kallus oluşumu ve sürgün farklılaşması gözlenmiştir. Kültürden altı hafta sonra, nodlarda farklılaşan sürgünler, daha sonraki çoğaltma aşamalarına materyal sağlamak üzere nodlu parçalara ayrılarak 1.0 mg/l BAP'ın eklendiği MS ve WPM temel besin ortamlarında kültüre alınmışlardır.

WPM+1.0 mg/l BAP ortamında steril kültürlerden elde edilerek kültüre alınan nodlarda tüm tekraralarda, her bir nod yalnızca bir sürgün oluşturduğu halde (Şekil 1), MS+1.0 mg/l BAP ortamında, çok sayıda sürgün olduğu, bir başka söyleyişle kardeşlenme olduğu gözlenmiştir (Şekil 2). MS ortamında sürgün oluşumu, daha çabuk gerçekleşmiş ve daha az kallus oluşumu görülmüştür. Bu şekilde kültüre alma işlemlerine devam edilerek çok sayıda sürgün sağlanmıştır. Kültürden 4 hafta sonra her iki ortamda nodlar üzerinde oluşan sürgünlerin boyları, nod ve sürgün sayıları belirlenerek ortalama değerler elde edilmiştir (Tablo 1). Yeterli uzunluğa ulaşmış sürgünler köklendirme denemelerinde kullanılmak üzere mikroçelik olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 1. WPM+1.0 mg/l BAP Ortamında Kültüre Alınan Nodlardaki Sürgün Oluşumu
(Kültürden 3 Hafta Sonra)

Tablo 1'deki değerlerle ilgili olarak yapılan basit varyans analizleri sonucunda; MS ortamının ortalama sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından WPM temel besin ortamına göre 0.05 düzeyinde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Nod sayısı bakımından ise anlamlı bir farklılık ortaya çıkmamıştır.

Tablo 1. 1.0 mg/l BAP İlaveli MS ve WPM Ortamlarında Kültüre Alınan Kivi Nodlarındaki Gelişme Durumu

Ortamın Adı	Bir eksp. için nod. say.(adet)			Bir eksp. için sürg. say.(adet)			Bir eksp. için sürg. uz.(mm)		
	Maks.	Min.	Ort.	Maks.	Min.	Ort	Maks.	Min.	Ort
MS	4	1	2.045	5	3	3.33*	30	5	13.78*
WPM	3	1	2	1	1	1	12	2	5.85

*: 0.05 düzeyinde önemli farklılık vardır

Şekil 2. MS+1.0 mg/l BAP Ortamında Kültüre Alınan Nodlardaki Sürgün Oluşumu (Kültürden 4 Hafta Sonra)

İn vitro'da köklenmeyi sağlamak için, 4 farklı IBA dozu (0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/l) 1/2 MS ortamına eklenerek mikroçelikler kültüre alınmıştır. Dört ortamda da mikroçeliklerin kültüre alınmasından 6-7 gün sonra dip kısımlarda yoğun bir kallus oluşumu gözlenmiş olmasına karşın kök oluşumu yalnızca 5.0 mg/l IBA'nın eklendiği ortamda kültüre alınan mikroçeliklerde gerçekleşmiştir. Bu ortamda 7.günden itibaren kök oluşumu başlamış ve 14-15.günlerde bazal kısımlarda yoğun bir kallus oluşumu ile birlikte mikroçeliklerin %80-85'i köklenmiştir (Şekil 3). Diğer üç IBA dozunda ise kallus oluşumu devam etmekle birlikte köklenme olmamıştır. Köklenen mikroçelikler, 1 : 1 oranındaki orman toprağı kum karışımı içeren saksılara şaşırtıldıktan sonra 20-22° C ve yüksek rutubette dış ortama alıştırıldıktan sonra sera koşullarına alınmışlardır (Şekil 4).

Şekil 3. 1/2 MS+5.0 mg/l IBA Ortamında Kültüre Alınan Mikroçeliklerdeki Köklenme Durumu

Şekil 4. İn Vitro'da Köklendirilerek Saksıya Şaşırtılmış ve Doğal Koşullara Uyum Sağlamış Bir Kivi Bitkisi

İn vivo'da köklenmeyi sağlamak için, iki farklı toprak karışımı kullanılmıştır. Birinci ortam olarak mikroçelikler, yaprak çürüğü : kum : perlit (4 : 1 : 1) karışımına şaşırtılmıştır. Mikroçeliklerin karışıma şaşırtılmasından (Şekil 5) 7-10 gün sonra dip kısımlarda kallus oluşumu ile birlikte bu bölgelerde köklenmeler gözlenmiştir. 15 gün sonunda ise çeliklerin %90'ndan daha fazlasında köklenmenin gerçekleşmiş olduğu belirlenmiştir. İn vivo'da köklendirilmede ikinci ortam olarak mikroçelikler, yapraklı orman toprağı : kum (2 : 1) karışımına şaşırtılmıştır. Bu ortamdaki mikroçeliklerde kallus oluşumu ve köklenme birinci ortama göre daha geç başlamış (şaşırtmadan 14-15 gün sonra) ve çeliklerin köklenmesi ise üç hafta gibi daha uzun bir sürede gerçekleşmiştir. Bu ortamda da %90'ın üzerinde köklenme olmuştur.

Şekil 5. İn Vivo'da Köklendirme İçin Kasaya Şaşırtılmış Kivi Mikroçeliklerinin Genel Görünüşü

TARTIŞMA

Çeşitli bitki dokularının çoğaltılmasında sürgün oluşumunu sağlamak için, çoğunlukla sitokininler kullanılmaktadır. BAP ve kinetin en çok kullanılan sitokninlerdir. Bazı durumlarda ise zeatin de etkili olmaktadır (4). Kivinin farklı doku parçaları kullanılarak, organ kültürü ile sürgün çoğaltılması için, değişik konsantrasyonlarda olmak üzere BAP, ya tek başına (5, 6, 7) ya da oksin kombinasyonlarıyla birlikte kullanılmaktadır (9, 10). Bu çalışmada sürgün oluşumu için başlangıçta, kinetin ve IAA birlikte kullanılmış, daha sonraki sürgün çoğaltılması denemelerinde BAP, ortamlara yalnız başına eklenerek test edilmiştir.

Bitki doku kültürlerinde dikkate dikkate alınması gereken faktörlerden bir tanesi de çeşitli mineral besin elementleri ve vitaminleri içeren besin ortamlarıdır. Başlangıç kültürlerinin elde edilmesinde MS ortamı kullanılmıştır. Sürgün çoğaltma ve bunların tekrar çoğaltılması aşamalarında MS ve WPM besin ortamları kullanılarak, iki temel besin ortamının sürgün çoğaltılması ve uzamasındaki etkileri araştırılmıştır. Sonuçta MS besin ortamının WPM besin ortamına göre; sürgün çoğaltılması ve sürgün uzaması bakımından daha etkili olduğu istatistiksel olarak ortaya konmuştur. Kivi üzerine yapılan çalışmalarda da genel olarak MS besin ortamının kullanıldığı görülmektedir. Nitekim Shen ve ark.

(8)'nin yaptığı çalışmada nodal parçalar MS ortamında kültüre alınarak sürgün çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Yaprak eksplantlarının kullanıldığı bir başka çalışmada, kültür ortamı olarak MS besin ortamı kullanılmıştır (9). Yine Spasenoski ve ark. çalışmalarında, in vitro çoğalmayı sağlamak için MS temel besin ortamını kullanmışlardır (5).

Sürgün oluşumu ve çoğalması teşvik edilerek belli boya ulaşmış olan sürgünler kesilerek, in vitro'da kök oluşumunu sağlamak amacı ile IBA adlı oksinin dört farklı konsantrasyonda eklendiği, 1/2 MS ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. Kültüre alınan sürgünlerden 5.0 mg/l IBA'nın eklendiği ortamda bulunanların %80-85'inde farklı uzunluk ve sayıda köklenme olurken, diğer üç konsantrasyonda kültüre alınan sürgünlerde köklenme gerçekleşmemiştir. Yalnızca 3.0 mg/l IBA'lı ortamdaki sürgünlerin bazılarında çok küçük kök oluşumları gözlenmiş ancak tam bir köklenme olmamıştır. yapılan tekrarlar da bunu doğrular sonuçlar alınmıştır. Kivinin in vitro'da köklendirilmesi için yapılan araştırmalarda; ortama IBA eklenmesinin köklenmeyi artırdığı ve zenginleştirdiği (7), 3-4 hafta içerisinde mikroçeliklerin %60-90'ının köklendiği (8) yine MS ortamına 1.0 mg/l IBA eklenmesiyle köklenmenin olduğuna işaret edilmektedir (9). Bu çalışmada da in vitro'da köklenme IBA eklenerek sağlanmış, ancak, (9)'da olduğu gibi köklenme IBA'nın düşük dozunda görülmemiştir. Bunun, bireyden ya da temel besin ortamının konsantrasyonunun aynı olmamasından kaynaklandığını söylemek mümkündür. Nitekim Turna (11) tarafından çayın doku kültürü ile üretilmesi çalışmalarında, sürgünlerin in vitro'da köklenmesinin, 1/4 MS ortamında aynı IBA konsantrasyonunda klonla bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir.

In vivo'da köklendirme için mikroçelikler, iki farklı toprak karışımına şaşırtılmışlardır. Her iki ortamda da mikroçeliklere önceden herhangi bir hormonal işlem uygulanmamıştır. Her iki ortamda da %90'ın üzerinde köklenme ve yaşama başarısı elde edilmiştir. Köklenme hızı bakımından; yaprak çürüğü : kum : perlit karışımından oluşan ortamın daha iyi olduğu gözlenmiştir.

In vivo'da köklendirmenin, in vitro'da üretim süresini kısaltması, ekonomik açıdan maliyeti düşürmesi ve bitkilerin çevre koşullarına uyum sağlaması bakımından tercih edilmesi gereken bir yöntem olduğu vurgulanmaktadır (12). Aynı çalışmada; in vitro'da elde edilen titrek kavak mikroçeliklerinin in vivo'da %100 oranında köklendiği ve in vitro'da köklendirmeden daha başarılı ve ekonomik olduğu da bildirilmektedir. Kataoka ve ark. (13) tarafından kivi'de yapılan çalışmada sürgünlerin IBA ile işleme tabi tutularak, steril olmayan şartlarda in vivo'da köklendirilebildiği belirtilmektedir. Yapılan bu çalışmada ise mikroçeliklerin, herhangi bir hormonal işleme tabi tutulmaksızın in vivo'da kısa sürede köklendirilebileceği ortaya konmuştur.

In vitro'daki üretim süresini kısaltması, böylece fidan maliyetinin düşmesi ve fideciklerin dış ortama intibaklarının daha kolay olması gibi nedenler göz önünde bulundurulduğunda, in vivo'da köklendirme şeklinin kivide de uygulanmasını tavsiye etmek mümkün görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen fidanlar, belli bir süre sonra polietilen tüplere şaşırtılarak sera dışına alınmışlar ve burada büyümelerine devam etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Samancı, H., Kivi (*Actinidia*) Yetiştiriciliği, TAV Yayınları, Yayın No: 22, Yalova, 112s., 1990.
2. Murashige, T., Skoog, F., A Revised Medium for Rapid Growth and Biossays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497, 1962.

3. Llyod, G., McCown, B., Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia* by Use of Shoot-tip Culture, *Comb. Intern. Plant. Prob. Sco.*, 30, 421-427, 1981.
4. Minocha, S.C., Plant Growth Regulators and Morphogenesis, Cell and Tissue Culture in Forestry, J.M. Bonga and Don J. Durzan (Eds.), Volume 1, Martinus Nijhoff Publishers, the Netherlands, 1987.
5. Spasenoski, M., Neskoviç, M., In vitro Vegetative Propagation of *Actinidia chinensis* Planch. from Juvenile and Adult Plant Segments., *Glasnik Instituta za Botanicu i Botanicke Baste Univerziteta u Beogradu*, 19, 7-13, 1985.
6. Piagnani, C., Eccher, T., Castelli, S., Micropropagation of *Actinidia chinensis*: Effect of Growth Regulators on Proliferation Rate, *Acta Horticulturae*, 179, 887-890, 1986.
7. Marino, G., Bertazza, G., Micropropagation og *Actinidia deliciosa* cvs. 'Hayward' and 'Tomuri', *Scientia Horticulturae*, 45(1-2), 65-74, 1990.
8. Shen, X.S., Wan, J.Z., Luo, W.Y., Propagation in vitro of Chinese Gouseberry (*Actinidia chinensis*) through the Development of Axillary Buds, *Scientia Horticulturae*, 42 (1-2), 45-54, 1990.
9. Canhoto, J.M., Cruz, G.S., In vitro Multiplication of *Actinidia chinensis* Planch. by Culture of Young Leaves, *Boletim da Sociedade Broteriana*, 60, 239-252, 1987.
10. Kamenicka, A., Rypak, M., The Gegeneration of *Actinidia chinensis* Planch. Culruted in vitro, *Pol'nohospodarstvo*, 35 (9), 811-818, 1989.
11. Turna, T., Türkiye'de Seleksiyonla Bulunan Üç Çay Klonunun (Fener-3, Muradiye-10, Derepazarı-7) Doku Kültürü Yöntemi İle Çoğaltılması Olanakları, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi), Trabzon, 104s., 1993.
12. Üçler, A.Ö., Titrek Kavak (*Populus tremula* L.) ve Kafkas Ihlamuru (*Tilia rubra* DC.)'nun Doku Kültürü Teknikleri İle Üretilmesi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi), Trabzon, 113s., 1994.
13. Kataoka, I., Nakahira, M., Inoue, H., Active Shoot Regeneration in Callus Culture of Kiwi fruit (*Actinidia chinensis* Planch.), *Kagawa University Technical Bulletin of the Faculty of Agriculture*, 39 (1), 21-26, 1987.