



Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Farklı Orijinli Kayın (*Fagus orientalis* Lipsky.) Tohumlarının *In Vitro* Çimlenmeleri Üzerine Etkileri

Fethi Ahmet ÖZDEMİR^{1*} Sevil SAĞLAM² Mehmet Uğur YILDIRIM³
¹ Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bartın
² Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kırşehir
³ Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Ankara

*Sorumlu yazar:
e-posta: ozdemirfethiahmet23@yahoo.com

Geliş Tarihi: Mayıs 02, 2014
Kabul Tarihi: Haziran 18, 2014

Özet

Bu çalışma farklı orijinli doğu kayını (*Fagus orientalis* Lipsky.) tohumları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada %3 sakkaroz ilave edilmiş ve % 0.8 agar ile katılaştırılmış Murashige Skoog (MS) besin ortamı olarak kullanılmıştır. Besin ortamı içerisine 2 mg/L BAP, 2 mg/L Zeatin, 2 mg/L Kinetin, 2 mg/L Gibberellik asit, 2 mg/L 2,4-D, 2 mg/L IAA, 2 mg/L IBA, 2 mg/L NAA, 2 mg/L Thidiazuron hormonları ilave edilerek bu hormonların farklı orijine sahip kayın tohumlarının *in vitro* çimlenmeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda *in vitro* çimlenme üzerine en etkili hormonun 2 mg/L Gibberellik asit; en az etkili hormonların ise oksin grubu (2 mg/L 2,4-D, 2 mg/L IAA, 2 mg/L IBA, 2mg/L NAA) hormonlar olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Doğu kayını (*Fagus orientalis* Lipsky.), Bitki doku kültürü, *In vitro* çimlenme.

Effect of Some Plant Growth Regulators on *In Vitro* Germination of Different Origins Beech (*Fagus orientalis* Lipsky.) Seeds.

Abstract

This study was carried out using seeds of different origins oriental beech. In this study Murashige Skoog (MS) was used culture medium supplemented with 3% sucrose and solidified with 0.8% agar. 2 mg/L BAP, 2 mg/L Zeatin, 2 mg/L Kinetin, 2 mg/L Gibberellin acid, 2 mg/L 2,4-D, 2 mg/L IAA, 2 mg/L IBA, 2 mg/L NAA, 2 mg/L Thidiazuron was added into Murashige Skoog (MS) medium and effects of these hormones on *in vitro* germination of different origins beechs seeds were investigated. As a research result 2 mg/L Gibberellin acid; the most effective hormone and auxin group hormones (2 mg/L 2,4-D, 2 mg/L IAA, 2 mg/L IBA, 2 mg/L NAA) as the least effective hormones were determined on *in vitro* germination.

Key words: Oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky.), Plant tissue culture, *In vitro* germination.

GİRİŞ

Fagus orientalis Lipsky. (doğu kayını) ülkemiz için önemli bir orman ağacıdır. Ülkemiz ormancılığında önemli yer tutan doğu kayını gerek yayılış alanı ve gerekse fonksiyonel özellikleri nedeniyle üzerinde çalışılması gerekli bir türümüzdür. Ülkemiz ormanlarının % 53.92'si ibrelili, % 46.08'i yapraklı ormanlardır. Kuzey yarımkürede 10 tür ile temsil edilen kayın, yapraklı ormanların en önemli türlerinden birisidir.

Türkiye'de Doğu kayını (*Fagus orientalis* Lipsky.) ve Avrupa kayını (*Fagus sylvatica* L.) olmak üzere iki tür vardır. Bunlardan doğu kayını diğer türe nazaran daha geniş bir yayılışa sahiptir [1,2]. Doğu kayını ülkemizde; 1 373 244.7 ha normal koru, 378 239.2 ha bozuk koru olmak üzere toplam 1 751 483.9 ha'lık bir yayılış göstermektedir [3]. Doğu kayını tohumlarının ortalama 1000 tanesinin ağırlığı 278 gramdır [4]. Kayında zengin tohum yılları tekerrürü yetişme muhitine, yüksekliğe, bakıya göre değişmektedir [5]. Zengin tohum yıllarının tahmininde, genel olarak haziran ayının önceki yıllara kıyasla daha sıcak ve kurak geçmesi önemli bir kriterdir [6]. Kayın, diğer orman ağaçlarına göre zengin tohum yılları seyrek, ağır tohumlu bir orman ağacıdır [4]. Bol tohum yıllarının seyrek olması

ve doğada çok sayıda zararlısının bulunması, kayının tohum yoluyla gençleştirilmesinde fidanlık çalışmalarını ve ağaçlandırma faaliyetlerini daha da önemli bir hale getirmektedir [7]. Kayın tohumu sonbaharda, toplandıktan hemen sonra ekilmelidir. Sonbahar ekimlerinin mümkün olmadığı durumlarda tohumlar, soğuk-ıslak katlamaya alındıktan sonra erken ilkbaharda ekilmelidir. Çünkü kayın tohumunda embriyosunun dinlenme ihtiyacından dolayı çimlenme engeli bulunmaktadır [5]. Yüksek bitkilerin tohumlarından ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek belli ortamlarda kültüre alınması embriyo kültürü olarak tanımlanmaktadır. Tohum dormansisi ve tohum sterilitesi embriyo kültürü ile kırılabilir. Bazı türlerdeki tohum dormansisi embriyoyu çevreleyen yapıda var olan kimyasal engelleyciler veya mekanik dayanıklılık nedeniyle. Böyle durumda embriyoların izole edilip besin ortamında kültüre alınması ile dormansi ortadan kaldırılmaktadır. Tohum sterilitesi embriyoyu çevreleyen yapıların uyumsuzluğu nedeni ile olabilir. Böyle durumlarda da embriyo kültürü ile canlı fideler elde edilmektedir. Çimlenme için parazitlerin gerekli olduğu durumlarda da *in vitro* da parazite gerek olmadan çimlenme gerçekleştirilmektedir. [8].

Literatüre bakıldığında kayının *in vitro* üretimi ile ilgili çalışmalar [9,10] bulunmakla birlikte, kayın tohumlarının *in vitro* da çimlenmeleri üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri ile ilgili literatür çalışmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda bitki doku kültürü tekniği kullanılarak, bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin, çimlenme engeli bulunan kayın tohumlarının *in vitro* çimlenmeleri üzerine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Çalışmamız şu ana kadar ülkemizde yapılmamış olup, ilk defa tarafımızca gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın literatür bilgisine de önemli derecede katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

MATERYAL ve METOD

Bitki Materyali

Bu çalışmada Bartın (1. orijin), Zonguldak (2. Orijin), Karabük (3. Orijin), Kastamonu (4. Orijin), Sinop (5. Orijin), Düzce (6. Orijin), Bolu (7. Orijin), Giresun (8. Orijin), Ordu (9. Orijin) ve Artvin (10. Orijin), olmak üzere 10 farklı yetiştirme ortamından toplanmış olan *Fagus orientalis* Lipsky. türüne ait tohumlar, bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

Sterilizasyon

Çalışmada kullanılan, magenta, erlen gibi malzemeler ile besin ortamının sterilizasyonu otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121 °C de, 20 dakika tutularak yapılmıştır. Pens, bistüri gibi aletlerin sterilizasyonu ise pasteur fırınında 160 °C de 5 saat tutularak gerçekleştirilmiştir. Kayın tohumlarının sterilizasyonu ticari çamaşır suyu (ACE, Türkiye) içerisinde 20 dakika bekletilerek sağlanmıştır. Daha sonra tohumlar steril saf su içerisinde 5 er dakika bekletilerek 3 kez durulanmıştır. Çalışmada kullanılan Zeatin, Kinetin, Gibberellik asit, IAA, IBA ve Thidiazuron hormonları besin ortamları steril edildikten sonra, filtre sterilizasyonuna tabi tutularak besin ortamına ilave edilmiş; BAP, 2,4-D ve NAA'nın yapıları sıcaklık ile bozulmayacağından bu hormonların sterilizasyonu besin ortamı ile birlikte otoklavda gerçekleştirilmiştir.

Besin Ortamları ve Kültür Koşulları

Tohumların çimlendirilmesinde MS [11] besin ortamı (Duchefa; Netherland) kullanılmıştır. 2 mg/L BAP, 2 mg/L Zeatin, 2 mg/L Kinetin, 2 mg/L Gibberellik asit, 2 mg/L 2,4-D, 2 mg/L IAA, 2 mg/L IBA, 2 mg/L NAA, 2 mg/L Thidiazuron içeren MS besin ortamında her magentadaki tohumların çimlenme oranları % olarak belirlenmiş, ardından bunların ortalamaları hesaplanmıştır (Çizelge 1). Besin ortamlarına %3 sakkaroz ilave edilmiş ve %0.8 agar kullanılarak katılaştırılmıştır. Ortam hazırlandığında çift distile saf su kullanılmış ve besin ortamının pH'sı 1N NaOH ve

1N HCl kullanılarak pH metre aracılığı ile 5.8 e ayarlanmıştır. Hormonlar uygun çözücülerde çözdürüldükten sonra istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonlar +4°C de saklanmıştır.

In vitro' dan Elde Edilen Fidelerin Çevre Şartlarına Uyumu

In vitro ortamda steril olarak yetiştirilen kayın fideleri saksılara aktarıldıktan sonra çevre şartlarına uyumu sağlanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada farklı yetiştirme ortamlarından toplanan kayın tohumları kullanılarak, *in vitro* ortamda, farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile çimlenme gücünü aşılmaya çalışılmıştır. Tohumlara uygulanan bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi ile *in vitro* çimlenme başarılmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirilen kayın tohumlarından her magentaya 5 adet ekilmiş ve her çalışma 3 defa tekrarlanmıştır. Çimlenme oranları dört hafta sonunda % olarak hesaplanmış ve bu oranların ortalama değerleri bulunmuştur (Çizelge 1). Elde edilen ortalama çimlenme oranları % cinsinden Çizelge 1 de gösterilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; en yüksek oranda çimlenme; toplanma bölgelerine göre farklılık göstermekle birlikte 2mg/L Gibberellik asit içeren MS besin ortamında gerçekleşmiştir. Çimlenmenin en az olduğu ortamlar ise oksin grubu hormonları (2 mg/L 2,4-D, 2 mg/L NAA, 2 mg/L IAA ve 2 mg/L IBA) ihtiva eden MS besin ortamlarıdır. Sitokinin grubu hormonları içeren MS besin ortamlarında ise farklı oranlarda çimlenmenin gerçekleştiği gözlenmiştir.

Çalışma sonrasında gelişen bitkiler, hormon içermeyen MS besin ortamına aktarılarak bitkilerin belirli bir büyüklüğe gelmeleri sağlanmıştır. Belirli bir büyüklüğe ulaşan bitkiler 3:1 oranında toprak:kum içeren saksılara aktararak dış ortama adaptasyonları gerçekleştirilmiştir. Günümüzde insanlar için önem taşıyan bitkilerin, verimini, hastalık ve zararlılara karşı dirençlerini arttırmak amacı ile kullanılan klasik ıslah metotlarının yanı sıra, doku kültürü ve biyoteknoloji yöntemleri ile her yönü ile istenen özelliklere sahip bitki türlerinin üretimi çok daha kısa sürelerde ve kontrollü koşullarda elde edilerek bu bitkilerin doğa koşullarına uygun hale getirilmesi mümkündür.

Daha önce kayın ile ilgili yapılmış çalışmalara baktığımızda; doğu kayınında, çimlenme üzerine, bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak, herhangi bir *in vitro* çalışmanın yapılmadığını görmekteyiz. Bu nedenle kayın tohumlarına *in vitro* da bazı bitki büyüme düzenleyicilerini uygulayarak, tohumların çimlenmeleri üzerine yeni bir metod geliştirme ihtiyacı hissedilmiştir.

Çizelge 1. Bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin; dört hafta sonunda farklı orijinli kayın tohumlarının çimlenmeleri üzerine etkileri.

Hormonlar (2mg/L)	Ortalama çimlenme oranları (%)									
	1. Orijin	2. Orijin	3. Orijin	4. Orijin	5. Orijin	6. Orijin	7. Orijin	8. Orijin	9. Orijin	10. Orijin
BAP	10	7	11	17	13	21	19	8	29	15
Zeatin	15	18	19	23	27	24	19	21	18	17
2,4-D	7	10	14	6	18	2	19	17	1	8
IBA	2	7	5	9	1	0	14	17	15	11
Kinetin	36	27	43	38	19	11	9	24	16	19
Giberellik Asit	78	82	91	64	59	72	69	54	49	58
IAA	12	19	26	24	14	18	25	32	19	21
NAA	16	15	23	17	13	21	23	27	17	28
Thidiazuron	35	41	29	36	28	37	45	53	49	47

Genel olarak; absisik asidin dormansinin kırılmasını ve tohum çimlenmesini inhibe ettiği; Gibberellik asidin ise dormansiyi kırdığı ve tohumun çimlenmesini teşvik ettiği görülmektedir. [12,13,14]. Çalışmamızda da en fazla çimlenmenin 2 mg/L Gibberellik asit içeren MS besin ortamında olması literatür bulguları ile örtüşmektedir.

Fagus sylvatica L. ile yapılan bir çalışmada [15] çimlenme üzerine eksojen gibberellik asit, absisik asit miktarı ve sıcaklığın etkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda da 2 mg/L gibberellik asit içeren MS besin ortamında en fazla çimlenmenin olması, gibberellik asidin tohum içerisine girerek tohumların çimlenmesini sağladığı şeklinde yorumlanabilir. Bu bulgumuz *Fagus sylvatica* L. ile yapılan çalışma bulgusu ile birbirini desteklemektedir.

Labisia pumila (Bl.) F. Vill. tohumlarının *in vitro* çimlenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada [16] BAP'ın bu bitki tohumlarının çimlenmeleri üzerine önemli bir etkisinin olduğu, en fazla çimlenmenin %90 oranında 2 µM BAP içeren MS besin ortamında 2 hafta sonra gerçekleştiği gözlenmiştir. Her ne kadar bahsettiğimiz çalışmada kullanılan bitki farklı olsa da çalışmamızda 2mg/L gibberellik asit içeren MS besin ortamının ardından en fazla çimlenmenin sitokin grubu (2mg/L BAP, 2mg/L Zeatin, 2mg/L Kinetin) içeren MS besin ortamlarında olması, bahsedilen çalışma bulguları ile örtüşmektedir. Çalışmada kullandığımız hormonlar, çalışılan genotiplerde, *in vitro* çimlenme üzerine güçlü bir protokol oluşturmaktadır.

Bitki doku kültürü ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında *in vitro* üretim çalışmalarının genotip ve hormon konsantrasyonlarından etkilendiği görülmektedir [8]. Doku kültürü çalışmalarında kullanılan hormonların konsantrasyonları, fiziksel şartlar, bitkilerin genotipi yanında kültür ortamına alındıkları esnada bitkilerin içerdikleri endojen hormonların metabolizmadaki görevleri göz önünde bulundurulduğunda özellikle sitokinlerin, kısmen oksinlerin ve bu iki büyüme düzenleyicisinin etkileşimlerinin adventif sürgün oluşumu üzerine en etkili maddeler oldukları belirlenmiştir. [17].

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde edilen bulgular kullanılarak; ileride sürgün rejenerasyonu üzerine çalışmalar yapılabilir, farklı hormon konsantrasyonları ve kombinasyonları denererek *in vitro* çimlenme ile ilgili çalışmalar planlanabilir. Farklı sitokin ve oksin hormon tipleri ve kombinasyonları kullanılarak yeni denemeler planlanabilir. Çalışmadan elde edilen yeni bulgular ışığında daha fazla deneme yapılarak kayın (*Fagus orientalis* Lipsky.) tohumlarının çimlenmeleri esnasındaki fizyolojik ve moleküler olaylar aydınlatılabilir. Sonuç olarak bu çalışma kayının *in vitro* çimlenmesi üzerine yapılmış ilk çalışmadır.

Teşekkür

Bu çalışma Bartın Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje No: BAP-2012-2-73). Vermiş oldukları destekten dolayı Bartın Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Carus, S., 1998. Aynı Yaşlı Doğu Kayını (*Fagus orientalis* Lipsky.) Ormanlarında Artım ve Büyüme. Doktora Tezi, İ.Ü. Fen.Bil. Enst. 360s.
- [2] Yaltırık, F., 1993. Dendroloji I (Gymnospermae). İ.Ü. Orman Fakültesi Yayını, 3443/386, İstanbul.
- [3] Anonim, 2006. Anonim, 2006. Orman Varlığımız, T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, Ankara.
- [4] Gezer, A., 1986. Doğu kayını tohum ve fidan üretimi ve Ağaçlandırma Dairesi, Gelişim Yayınları, Ankara, 603-606.
- [5] Anonim, 1985. Kayın, Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, El Kitabı Dizisi:1 Ankara, 88s.
- [6] Suner, A., 1978. Düzce, Cide ve Akkuş mntıklarında saf Doğu Kayını meşcerelerinin doğal gençleştirme sorunları üzerine araştırmalar. Orm. Ar. Enst. Tek. Bül. No:107, 60s.
- [7] Yılmaz, M., 2005. Doğu kayını (*Fagus orientalis* Lipsky.) tohumlarının fizyoloji üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, İ.Ü. Fen.Bil. Enst. 4s.
- [8] Mansuroğlu, S., Gürel, E., 2001. Bitki biyoteknolojisi I doku kültürü ve uygulamaları, Selçuk üniversitesi basımevi. Konya
- [9] Cuenca, B., Vieitez, A.M., 1999. Histological study of *in vitro* development of adventitious buds on leaf explants of oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky.). In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant,35:326-332.[10] Cuenca, B., Ballester, A., Vieitez, A.M., 2000. *In vitro* adventitious bud regeneration from internode segments of beech. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 213-220.
- [11] Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- [12] Bewley JD, Black M. 1994. Dormancy and the control of germination. In: Seeds physiology of development and germination,199-267. Plenum Press. New York and London.
- [13] Szczotka Z. 1999. Fizjologia Nasion. In: Bugała W [ed.], Klony Acer campestre, Acer platanoides, Acer pseudoplatanus, 127-146. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań.
- [14] Kucera B, Cohn MC, and Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Science Research, 15: 281-307.
- [15] Krawiarz, K., Szczotka, Z. 2008. Influence of temperature and abscisic and gibberellic acids on polyamine biosynthesis in european beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds during dormancy breaking. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 50(1): 73-78.
- [16] Hartnie, M., Jualang G.A. 2007. In vitro germination and plantlet establishment of *Labisia pumila* (Bl.) F. Vill. Scientia Horticulturae, 115: 91-97.
- [17] Mariashibu, TS., Anbazhagan, VR., Jiang, SY., Ganapathi, A., Ramachandan, S., 2013. *In Vitro* Regeneration and Genetic Transformation of Soybean, Edited by James E. Board, Published: January 2.