

Ceviz Çeliklerinde Köklenme Kofaktörleri

Murat İSFENDİYAROĞLU¹ Elmas ÖZEKER²

Summary

Rooting Cofactors in Walnut Cuttings

In this study, the effect of methanolic extracts obtained from softwood and hardwood cuttings of mature walnut, on the rooting of mung bean (*Vigna radiata*) cuttings were examined. Significant promotive activity was predicted on Rf 1.0 zones of chromatograms in both types of cuttings. At the presence of auxin (IBA), synergistic effect was observed especially at the specific Rf zone of hardwood cuttings. As a result of two dimensional paper chromatography, more than one phenolic compounds may be responsible from the cofactor activity at Rf zones was concluded. However, no marked differences generally predicted among the cutting types in relation with the composition and relative amounts of phenolic compounds.

Key words: Walnut, cutting, rooting cofactors, phenolics.

Giriş

Ceviz (*Juglans regia* L.), dünya üzerinde geniş bir alanda yetiştiriciliği yapılan önemli meyve türlerinden birisidir. Dünya toplam sert kabuklu meyve üretiminde, bademden sonra ikinci sırada gelmektedir (1). Ceviz yetiştiriciliğinde ileri düzeyde bulunan ülkeler üretimlerini standart çeşitlerle yapmaktadır. Bu çeşitler günümüzde aşıyla çoğaltılmaktadır. Ancak aşılama, cevizin kendinden kaynaklanan önemli sorunlar vardır. (17). Cevizin yapraklı ya da odun çelikleriyle çoğaltılmasında bugüne kadar ticari düzeyde başarı sağlanamamıştır (4, 7, 11). Halbuki, bazı zor

¹ Araş. Gör. Dr.E. Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 35100 Bornova, İzmir.
e-mail: isfendiyar@ziraat.ege.edu.tr

² Yrd. Doç. Dr. E. Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 35100 Bornova, İzmir.
e-mail: elmas@ziraat.ege.edu.tr

köklenen meyve türleri yapraklı çeliklerle ticari boyutta çoğaltılabilmektedir (8). Cevizin kendi kökleri üzerinde çoğaltılması, ekonomikliğinin yanısıra, gecikmiş uyuşmazlık probleminin ortadan kalkması ve klonal anaç kullanımı açısından önem taşımaktadır (17). Temelde, *Juglans* çeliklerinin köklenme yeteneğinin tür ve klonlar arasında önemli düzeyde farklılık gösterdiği ve bazı *J. regia* klonlarının orta derecede köklenebilir olduğu bildirilmiştir (16). Ceviz yumuşak odun çeliklerinin köklenebildiği, ancak şaşırtmadan sonraki yaşama oranının düşük olduğu ileri sürülmektedir (5). Bunun yanısıra, Paradox (*J. hindsii* x *J. regia*) anacının genç ana bitkilerinden alınan yarı odun ve odun çelikleri, bazı özel koşullar sağlanarak yeterli düzeyde köklendirilebilmektedir (18).

Çeliklerde kök oluşumu, birçok iç ve dış faktörün etkisi altındadır. Adventif köklenme üzerinde içsel ve dışsal oksin belirleyici rol oynasa da, zor köklenen türlerin çelikleri oksin uygulamalarına istenen yanıt vermemektedir (8). Oksin dışındaki bazı içsel köklenme faktörlerinin de yalnız başına veya oksinle interaksiyona girerek köklenmeyi uyardığı saptanmıştır (9). Genelde, fenolik karakterdeki bu maddelerin içeriğiyle çeliklerin köklenme yetenekleri arasında pozitif ilişki bulunmaktadır (9, 15) Nitekim, *Juglans* türlerinin vegetatif çoğaltılmasını sınırlayan en önemli etken gibi görünen doku yaşlanmasında, belli bazı fenolik maddelerin fizyolojik marker rolü oynadıkları bildirilmiştir (2, 10).

Bu çalışmada, yaşlı ceviz ağaçlarının yumuşak odun ve odun çelikleri arasında, köklenme kofaktörlerinin aktivitesi açısından fark olup olmadığı ve bu faktörlerin hangi fenolik madde grubuna ait olabileceği araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Ceviz yumuşak odun ve odun çeliklerindeki köklenme kofaktörlerinin biyolojik aktiviteleri, mung fasulyesi (*Vigna radiata*) testi ile belirlenmiştir (9). Analizlerde, İzmir-Bayındır ilçesine bağlı, deniz seviyesinden yaklaşık 1000 m yükseklikteki Ovacık köyünde bulunan Yalova-3 çeşidinin 10 yaşındaki ağaçlarının uç çelikleri kullanılmıştır. Odun çelikleri 5.3.2000, yumuşak odun çelikleri 14.6.2000'de alınmış (100'er adet) ve yaklaşık 1 cm'lik alt bölgeleri (odun+kabuk) analiz edilmiştir. Örneklerin hazırlanması, ekstraksiyonu, kromatografik analiz ve biyolojik test Rao et al. (14)'a, saflaştırma ve kofaktörlerin tanımlanması Karakır ve İsfendiyaroğlu (12)'na göre yapılmıştır.

Bulgular

Kofaktör Aktivitesi

Ceviz çeliklerinin kısmen saflaştırılmış metanolik ekstraktlarındaki köklenme faktörlerinin, fasulye hipokotil çeliklerinin kök sayıları üzerine etkisi, Şekil 1'deki histogramlarla gösterilmiştir. Buna göre, 250 µl (2.5 g yaş ağırlık) ekstraktın bir yönlü kağıt kromatografisiyle analizi sonucunda, özellikle yumuşak odun çeliklerinin, Rf 1.0 bandında kontrole göre 3 katın üzerinde aktivite saptanmıştır. Bunun yanısıra, yumuşak odun çeliklerinin bazı Rf bantlarındaki (0.4, 0.7, 0.8 ve 0.9) engellenen, odun çeliklerinde bulunmadığı görülmüştür (Şekil 1 a, b). Ekstrakt miktarının 2 katına (500 µl) çıkarılması, Rf 1.0'daki uyarıcı aktivitenin, yumuşak odun çeliklerinde belirgin derecede azalmasına yol açmıştır (Şekil 1 c, d).

Şekil 1. Ceviz çeliklerinin metanolik ekstraktlarındaki kofaktör aktivitesi.
a: Yumuşak odun 250 µl, b: Odun 250 µl, c: Yumuşak odun 500 µl, d: Odun 500 µl
Dikey eksen: Kök sayıları, Yatay eksen: Rf değerleri, K: Kontrol.

Rejenerasyon ortamında İndol butirik asit (2 ppm IBA) bulunması durumunda ise, her iki çelik tipinde de oksinsiz ortamda engelleyici etkide bulunan bazı Rf bantlarında, uyarıcı yönde aktivite ortaya çıkmıştır. Oksinsiz ortamda yüksek aktivite gösteren Rf 1.0'da, oksinin varlığı, özellikle odun çeliklerinde belirgin bir sinerjistik etki sağlamıştır (Şekil 2 a, b). Ekstrakt miktarının 2 katına çıkarılması halinde, yumuşak odun çeliklerinde düşük konsantrasyonda engellemede bulunan Rf bantlarında (0.5, 0.7, 0.8) belirgin uyarım olduğu, bunun yanısıra, bazı uyarıcı

bantlardaki (0.4, 0.9) aktivitenin de önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Odun çeliklerinde ise etki yönündeki dönüşüm, Rf 0.4'de çok belirgindir. Ancak konsantrasyon artışı Rf 1.0'da, oksinsiz ortama kıyasla, çok daha şiddetli bir aktivite azalmasına neden olmuştur. İki çelik tipinde de birbirine yakın aktivite saptanmıştır (Şekil 2 c, d).

Şekil 2. Oksinli ortamda, ceviz çeliklerinin metanolik ekstraktlarındaki kofaktör aktivitesi.
a: Yumuşak odun 250 µl, b: Odun 250 µl, c: Yumuşak odun 500 µl, d: Odun 500 µl
Dikey eksen: Kök sayıları, Yatay eksen: Rf değerleri, K: Kontrol.

Kofaktörlerin Tanımlanması

Çeliklerdeki köklenme kofaktörlerinin tanımlanması amacıyla, ekstrakt örneklerine 2 yönlü kağıt kromatografisi uygulanmıştır. Çalışılan konsantrasyonda (10 µl) değişik Rf değerlerine sahip, 7 farklı leke saptanmıştır. Bu lekelerin hangi fenolik madde gurubuna ait olabilecekleri, kromatogramlardaki farklı konumlarından (Rf); UV ışığı (366 nm); amonyak buharı ve NS (Naturstoff) ayracı uygulaması sonrası UV ışığı; gün ışığı ve p-DMASA ayracı uygulaması sonrası yine gün ışığı altında verdikleri renk reaksiyonları yardımıyla belirlenmeye çalışılmıştır (Çizelge 1). Buna göre, 1, 2 ve 3 no'lu lekelerin flavonoid, 5 no'lu lekenin flavan bileşiği olabileceği sonucuna varılmıştır. Lekelerin büyüklük ve renk yoğunluğu kriterlerine göre belirlenen oransal miktarları arasında, çelik tipine bağlı olarak en belirgin farklılık, 2 no'lu lekede gözlenmiştir (Çizelge 1). Birinci yönde kofaktörlerin analizlerindeki solvent sisteminin (% 80 izopropanol) uygulandığı dikkate alındığında, saptanan bu 7 lekenin 0.8-1.0 Rf bölgesinde toplandığı görülmektedir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Ceviz çeliklerindeki fenolik bileşiklerin Rf değerleri, renk reaksiyonları ve oransal dağılımı.

No	Rf değerleri			Renk reaksiyonları			Fenolik bileşikler	
	İP	AA	UV	NH ₃ +UV	NS+UV	G ışığı	Odun	Y. odun
1	0.91	0.00	K.pr	K.pr	K.pr	A.pr	+++	+++
2	0.84	0.17	K	A.pr	Pr	A.pr	+++	+++++
3	0.87	0.35	K	K	K	A.sr	++++	++++
4	0.89	0.45	A.pr	A.pr	A.pr	-	+++	++
5	0.79	0.30	A.mv	A.mv	A.mv	A.mv	++	+++
6	0.78	0.04	-	A.pr	-	-	++	+++
7	0.95	0.31	-	K	-	-	++	++

İP: % 80'lik izopropanol, I. solvent, AA: % 5'lik asetik asit, II. solvent, UV: Ultra viyole ışığı, NS: Naturstoff ayracı, G. ışığı: Gün ışığı, K: Koyu, pr: Portakal, A: Açık, mv: Mavi, sr: Sarı, Y. odun: Yumuşak odun, +: Saptandı, -: Saptanamadı.

Tartışma ve Sonuç

Elde edilen bulgular, ceviz çeliklerinde köklenmeyi uyarıcı yöndeki aktivitenin Rf 1.0 bandında çok yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Aynı solvent sistemiyle analiz edilen değişik odunlu bitki türlerinin çelik ekstraktlarında da, Rf 0.9 ve 1.0'da önemli uyarıcı etki saptanmıştır (9, 13, 15). Bununla birlikte, düşük ekstrakt seviyesinde ve oksinsiz ortamda, çelik tipleri arasında Rf 1.0'daki aktivite açısından büyük farklılık görülmemiştir (Şekil 1 a, b). Ancak, oksinsiz ortamda, ekstrakt konsantrasyonundaki artış, özellikle yumuşak odun çeliklerinin Rf 1.0 bandında belirgin aktivite azalmasına yol açmıştır (Şekil 1 c, d). Ceviz çeliklerinde gözlenen bu durum, daha önce armut (6) ve avokado (15) çeliklerinde saptanan kofaktörlerin belli konsantrasyonun üzerinde uyarıcı aktivitelerindeki azalma yönünde elde edilen bulgularla paralellik göstermektedir. Buna karşın, kolay ve zor köklenen zeytin çeliklerinde, 500 µl'lik ekstrakt uygulamasının 2 katına çıkarılması, Rf 1.0'da çeşide bağlı olarak 1.1-1.6 katlık aktivite artışı sağlamıştır (13). Bu açıdan, Rf 1.0 bandındaki kofaktör miktar ve kompozisyonunun, ceviz çeliklerinde farklılık gösterebileceği akla gelmektedir. Nitekim, aynı ekstraksiyon ve saflaştırma işleminin izlendiği zeytin çeliklerinde 25 µl ekstrakt örneğinin kağıt kromatografisiyle analizinde, Rf 0.8-1.0 bölgesinde 2 farklı madde belirlenmiş, bunlardan Rf 1.0 bantındaki flavonoid bileşiğinin oransal miktarının kolay köklenen çeşitte daha fazla olduğu görülmüştür (13). Ceviz çeliklerinde ise, 10 µl'lik ekstraktın analizi sonucunda, aynı bölgede

7 farklı leke olduğu ve bunlardan ikisinin (1 ve 7 no'lu), Rf 1.0'da yer aldığı saptanmıştır (Çizelge 1). Bu açıdan, söz konusu bölgedeki kofaktör aktivitesi üzerinde birden fazla maddenin etkili olabileceği düşünülmektedir.

Köklenme kofaktörleri dışsal oksinle birlikte mung fasulyesi çeliklerinin köklenmesi üzerinde sinerjistik etkide bulunmaktadır (9). Rejenerasyon ortamında oksin bulunması durumunda, özellikle ceviz odun çeliklerinin Rf 1.0 bandında da bu etki açıkça görülmektedir (Şekil 2 a, b). Ancak oksinin varlığında uygulanan ekstrakt miktarının 2 kat artırılması, her iki çelik tipinin Rf 1.0 bandında önemli aktivite kaybına yol açmış ve çelik tipi bağlamında aktivite farkını da ortadan kaldırmıştır (Şekil 2 c, d). Bu durumun, daha önce de ileri sürüldüğü gibi, etkileri kök rejenerasyonunun farklı aşamalarına özgü olan oksin ve kofaktörlerin bir arada yarattıkları doz aşımından (15) kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber, ekstrakt konsantrasyonundaki artış, her iki çelik tipinde de uyarıcı bantların sayısı ve aktivitesinde artışlara neden olmuştur. Yüksek aktivite, özellikle yumuşak odun çeliklerinin Rf 0.8 ve 0.9 bantlarında çok belirginleşmiştir (Şekil 2 c, d). Söz konusu bölgedeki uyarıcı aktivitenin, kromatogramlarda her iki bandı da (Rf 0.8, 0.9) kapsadığı gözlenen 2 no'lu bileşiğin, yumuşak odun çeliklerindeki göreceli yüksek miktarı ile (Çizelge 1) ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak genelde, kromatogramlarda saptanan lekeler arasında çelik tipine bağlı olarak önemli ölçüde oransal miktar farklılıkları gözlenmemektedir. Nitekim, cevizde önemli fizyolojik markerler olduğu öne sürülen iki temel fenolik madde olan hidrojuglon glikozit (naftokinon) ve miricitrin (flavonol) arasındaki oranın, yaşlı *J. nigra* x *J. regia* sürgünlerinde büyüme periyodu boyunca değişiklik göstermezken, gençleştirilmiş ağaçların sürgünlerinde, büyümeye paralel olarak önemli düzeyde arttığı saptanmıştır (2). Ayrıca, bu iki bileşiğin miktarı arasındaki oranın 6'nın üzerinde bulunması halinde, sürgünlerin fizyolojik olarak genç kabul edilebileceği ileri sürülmektedir (2, 3). Bu açıdan, yaşlı ceviz ağaçlarının yumuşak odun ve odun çeliklerindeki köklenme yetersizliği, belki de sürgünlerinde bulunan fenolik maddelerin miktar ve kompozisyonunda önemli farklılıklar bulunmamasından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak, ceviz çeliklerinin köklenmesi üzerinde fenolik karakterli kofaktörlerin dışındaki bazı biyokimyasal faktörlerin de etki olasılığı oldukça yüksek görünmektedir. Ancak, bazı Rf bantlarında

oksinin varlığında, konsantrasyona bağlı olarak ortaya çıkan yüksek aktivite, bu bölgedeki uyarıcı faktörlerin izole edilerek, uygun konsantrasyonda ceviz çeliklerine uygulanması halinde, kök rejenerasyon kapasitesi üzerinde olumlu etki yaratabileceğini akla getirmektedir.

Özet

Bu çalışmada, yaşlı ceviz ağacının yumuşak odun ve odun çeliklerinden elde edilen metanolik ekstraktların, mung fasulyesi (*Vigna radiata*) çeliklerinin köklenmesi üzerine etkisi incelenmiştir. Her iki çelik tipinde de kromatogramların Rf 1.0 bandında önemli düzeyde uyarıcı aktivite saptanmıştır. Ortamda oksin (IBA) bulunması durumunda, özellikle odun çeliklerinin spesifik Rf bandında sinerjistik etki gözlenmiştir. İki yönlü kağıt kromatografisi sonucunda, Rf bantlarındaki kofaktör aktivitesinden birden fazla fenolik maddenin sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak, çelik tipleri arasında fenolik madde kompozisyonu ve oransal miktarı açısından, genelde belirgin farklılık saptanamamıştır.

Anahtar kelimeler: Ceviz, çelik, köklenme kofaktörleri, fenolik bileşikler.

Kaynaklar

1. Anonim, 2001. www.fao.org web sayfası, FAO Statistical Databases, Agriculture, Crop Primary, Walnut Production in The World.
2. Claudot, A. C., A. Drouet, C. Jay-Allemand, 1992. Tissue Distribution of Phenolic Compounds in Annual Shoots from Adult and Rejuvenated Hybrid Walnut Trees. *Plant Physiol. Biochem.*, 30(5), 565-572.
3. Claudot, A. C., C. Jay-Allemand, E. A. Magel, A. Drouet, 1993. Phenylalanine Ammonia-lyase, Chalcone Synthase and Polyphenolic Compounds in Adult and Rejuvenated Hybrid Walnut Tree. *Trees Structure and Function*, 7, 92-97.
4. Çelebioğlu, G., O. Konarlı, 1975. Cevizlerde Odun Çelikleri ile Çoğaltma Yöntemleri Üzerinde Araştırmalar. V. Bilim Kongresi, Tarım ve Ormanlık Araştırma Grubu, Tebliğ Özetleri, Tübitak, İzmir, 129-130.
5. Dirr, M. A., C. W. Jr. Heuser, 1987. *The Reference Manual of Woody Plant Propagation: From Seed to Tissue Culture*, Varsity Press. Inc., Athens, Georgia, 239 p.
6. Fadl, M. S. and Hartmann, H. T., 1967. Isolation, Purification ,and Characterization of An Endogenous Root-Promoting Factor Obtained from Basal Sections of Pear Hard Wood Cuttings. *Plant Physiol.*, 42, 541-549.
7. Gautam, D. R., J. S. Chauhan, 1990. Physiological Analysis of Rooting in Cuttings of Juvenile Walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Horticulturae*, 284, 33-43.
8. Hartmann, H. T., Kester, D. H. and Davies, F. T. Jr., 1990. *Plant Propagation, Principles and Practices*. 5th Ed. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 647p.
9. Hess, C. E., 1964. Characterization of The Rooting Cofactors Extracted from *Hedera helix* L. and *Hibiscus rosa-sinensis* L. *Proc. XVIth Int. Hort. Cong. Brussels*, 4, 382-388.
10. Jay-Allemand, C., D. Cornu, J. J. Macheix, 1988. Biochemical Attributes Associated with Rejuvenation of Walnut Tree. *Plant Physiol. Biochem.*, 26(2), 139-144.

11. Kantarcı, M., H. Jacob, 1988. Ceviz Odun Çeliklerinin Köklenmesinde Uyarıcı Bazı İşlemlerin ve Büyüme Düzenleyici Maddelerin Etkileri. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yıllığı, 39 (1-2), 1-12.
12. Karakır, M. N., M. İsfendiyaroğlu, 1999. Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.)'nin Vegetatif Yöntemlerle Çoğaltılması ve Kök Oluşumunun Anatomik-Fizyolojik İncelenmesi Üzerine Araştırmalar. Tübitak, TOGTAG-1511, Sonuç Raporu, 97 s., İzmir.
13. Özeker, E., M. İsfendiyaroğlu, 2000. Çelikleri Kolay ve Zor Köklenen Zeytin Çeşitlerinde İçsel Köklenme Faktörlerinin Biyolojik Etkileri. Türkiye I. Zeytincilik Sempozyumu, 6-9 Haziran, Bursa, 115-121.
14. Rao, N: M. B., Satyanarayana, G., Raj, S. A., Kumari, G. N. and Padmanabham, V., 1988. Influence of Post-Ringing Period on Cofactor Activity and Total Phenol Content in Shoot Cuttings of Cashew (*Anacardium occidentale* L.). Trop. Agric., 65, 370-372.
15. Raviv, M. Reuveni, O. and Goldschmidt, E. E., 1986. Evidence for The Presence of A Native Non-Auxinic Rooting Promoter in Avocado (*Persea americana* Mill.) Plant Growth Reg., 4, 95-102.
16. Rodriguez, R.,A. Revilla, M. Albuerno, C. Perez, 1989. Walnut (*Juglans* spp.) In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 5 Trees II (ed. by Y. P. S. Bajaj). Springer-Verlag berlin Heidelberg, 99-126 pp.
17. Şen, S. M., 1986. Ceviz Yetiştiriciliği. Ondokuzmayıs Üniversitesi. Ziraat Fakültesi, Eser Matbaası, Samsun, 229 s.
18. Wilbur, O. R., C. A. Leslie, H. I. Forde, J. R. Mckenna, 1988. Propagation. In: Walnut Production Manual, University. of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 3373, 71-84pp.