



Hayward ve Matua Kivi Çeşitlerinde Mikro Çoğaltım*

Nuray Sivritepe^{1*}, Yusuf Tuğ¹

¹Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bursa
*e-posta: nuray@uludag.edu.tr Tel: 0224 2941474

Geliş Tarihi: 06.08.2010, Kabul Tarihi: 10.10.2010

Özet: Bu araştırmada “Hayward” ve “Matua” kivi çeşitlerinde mikro çoğaltım olanakları değerlendirilmiştir. Başlangıç kültüründe en başarılı sonuçlar, 2 mg/L BA, 22.5 g/L sukroz ve 7 g/L difco-bacto agar ilave edilmiş ¾ doz MS ortamından elde edilmiştir. Elde edilen bulgular, her iki çeşitte de, *in vitro* kültüre başlamak için sürgün ucu eksplantlarının, tek boğumlu mikro çeliklere oranla daha avantajlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle sürgün çoğaltım aşamasında sadece sürgün ucu eksplantları kullanılmış ve farklı besin ortamlarının eksplantlarda büyüme ve çoğalma üzerine etkileri incelenmiştir. “Hayward” çeşidinde, en yüksek çoğalma oranı (5.3) ve sürgün sayısı (3.4); sodyum fosfat (170 mg/L), adenin sülfat (80 mg/L), thiamin-HCl (0.3 mg/L), inositol (100 mg/L), BA (2 mg/L), IBA (0.03 mg/L), sukroz (30 g/L) ve agar (6 g/L) ilave edilmiş tam doz MS besin ortamından elde edilmiştir. “Matua” kivi çeşidinde ise maksimum çoğalma oranı (5.22) ve sürgün sayısına (4.19) ulaşabilmek için söz konusu besin ortamının sıvı formda kullanılması gerekmektedir. Köklenmeyi temin etmek için çoğalan kültürlerden kesilen sürgünler (≥2cm), önce bir seri IBA çözeltisine bandırılmış, sonra 20 g/L sukroz ve 7 gr/L agar ilave edilmiş ½ doz MS ortamına aktarılmıştır. En yüksek köklenme oranları “Hayward” çeşidinde (%51.85) 20 mg/L IBA’nın 15 saniye uygulaması, “Matua” çeşidinde (%70.37) ise 50 mg/L IBA’nın 2 saat uygulaması ile sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Actinidia deliciosa*, mikro çoğaltım, eksplant tipi, besin ortamları, IBA.

Micropropagation of Kiwifruit Cultivars “Hayward” and “Matua”

Abstract: Possibilities of micropropagation of kiwifruit cultivars “Hayward” and “Matua” were investigated in the present study. In the initiation culture, the best results were obtained from the ¾ strength MS medium supplemented with sucrose (22.5 g/L), difco-bacto agar (7 g/L) and BA (2 mg/L). In both cultivars, the results showed that shoot tip explants were more advantageous relative to nodal cuttings in order to establish an *in vitro* culture. Therefore, at the proliferation stage of culture only shoot tip explants were used and the effects of different culture media on growth and proliferation of explants were evaluated. In “cv. Hayward”, the highest multiplication rate (5.3) and shoot number (3.4) were obtained from the full strength MS medium (SA-K) supplemented with

* Yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

sodium phosphate (170 mg/L), adenine sulphate (80 mg/L), thiamine-HCl (0.3 mg/L), inositol (100 mg/L), BA (2 mg/L), IBA (0.03 mg/L), sucrose (30 g/L) and agar (6 g/L). However, in “cv. Matua”, it was concluded that the above mentioned medium should be used in liquid form to reach maximum multiplication rate (5.22) and shoot number (4.19). In order to induce rooting, shoots (≥ 2 cm) were cut off from proliferating cultures and dipped in a series of IBA solutions and then transferred to the ½ strength MS, supplemented with sucrose (20 g/L) and agar (7 g/L). The maximum ratio of rooting was 51.85% in “cv. Hayward” with the 15 second treatment of 20 mg/L IBA, and it was 70.37% in “cv. Matua” with the 2 hour treatment of 50 mg/L IBA.

Key Words: *Actinidia deliciosa*, micropropagation, explant type, culture media, IBA.

Giriş

Kivi, generatif ya da vegetatif çoğaltım metotları ile çoğaltılabilen bir bitkidir. Yine de fidan üretiminde tohumla çoğaltım tercih edilmemektedir. Tohumdan elde edilen popülasyonda genetik varyasyon yüksek oluşu gibi, bitkinin dioik yapısı gereği popülasyonun yaklaşık %80’ini erkek, %20’sini dişi karakterli bitkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle kivi fidanı üretiminde genellikle, vegetatif çoğaltım tekniklerinden yararlanılmaktadır (Tanimoto, 1994). Bununla birlikte büyük ölçekli, hızlı, ekonomik ve kolay fidan üretimi için doku ve organ kültürü teknikleri ile mikro çoğaltım önerilmektedir (Kumar and Sharma, 2002). Mikro çoğaltım kısa sürede hızlı bir kitlesel üretim sağladığı gibi, fenotipik ve genotipik açıdan homojen, hastalık ve zararlılardan arındırılmış fidan üretimini de temin etmektedir (Wang ve ark., 1988; Marino ve Bertazza, 1990; Souad ve ark., 1998).

Şimdiye değin yapılan araştırmalar incelendiğinde, kivide çok farklı organ ve dokular kullanılarak direk ve indirek organogenesis ile bitki rejenerasyonunun mümkün olduğu görülmektedir (Kumar ve Sharma, 2002; Rugini ve Gutierrez-Pesce, 2003). Ancak indirek organogenesisde sürgün çoğaltımı kallustan sağlandığı için bitkilerin klonlanmasında sakıncalı görülmektedir. Bunun en önemli nedenlerinden biri, genetik stabilitenin kontrol edilememesidir (Kumar ve Sharma, 2002). Nitekim Prado ve ark. (2007)’nin yaprak ayası ve sapından alınan eksplantlarda indirek organogenesis yolu ile üretilen erkek kivi genotiplerinde yapmış olduğu AFLP analizleri, doku kültüründe üretilen bitkiler ile anaç bitkiler arasında genetik varyasyon olduğunu göstermiştir.

Bu nedenle kivilerin klonal üretiminde *in vitro* sürgün çoğaltımının aksiller tomurcuk oluşumu ile sağlandığı kültür şekilleri tercih edilmektedir. Bu amaçla kivilerde eksplant olarak koltuk altı (aksiler) tomurcukları veya koltuk altı tomurcuğu içeren tek boğumlu mikro çelikler ile sürgün uçlarının kullanıldığı görülmektedir (Monette, 1986; Wang ve ark., 1988; Marino ve Bertazza, 1990; Wiyaporn ve ark., 1990; Pedroso ve ark., 1992; Ding ve ark., 1997; Kumar ve ark., 1998; Souad ve ark., 1998). Ancak sürgün çoğaltımı bakımından başlangıç materyali olarak hangi eksplant tipinin daha üstün olduğu bilinmemektedir.

Hangi eksplant tipi seçilirse seçilsin mikro çoğaltım yöntemi ile üretilmiş tam bir bitkiye ulaşabilmek için; başlangıç kültürü, sürgün çoğaltımı ve köklendirme olmak üzere üç temel aşamanın başarı ile tamamlanması gerekmektedir. Bu üç aşamada da başarıyı etkileyen temel faktörlerden biri kullanılan besin ortamının bileşimidir. Kivide başlangıç ortamı olarak bazı araştırmacılar IBA (indole 3-butirik asit) ve BA (N⁶-Benziladenin)

ilaveli tam doz, bazıları ise BA ve GA₃ (gibberellik asit) ilaveli ¾ doz MS (Murashige and Skoog) ortamı önermektedir (Monett, 1986, 1987; Marino ve Bertazza, 1990; Kyte ve Kleyt 1996). Sürgün çoğaltım aşamasında, genel olarak tam doz MS besin ortamı kullanılıyor ise de Marino ve Bertazza (1990), MS ortamının myo-inositol, nikotinic asit, pyridoxine, HCl, glycine, thiamine HCl ve büyümeyi düzenleyici maddeler ile zenginleştirilmesini ve agar ilavesiyle hazırlanmasını; Kyte ve Kleyt (1996) da sodyum fosfat, adenin sülfat, inositol, thiamin HCl ve büyümeyi düzenleyici maddeler ile zenginleştirilmesini, fakat sıvı halde kullanılmasını önermiştir. Moncalean ve ark. (1999) ise bunların tam tersine, fosfat kapsamı hariç, tam doz MS ortamının özellikle sıvı hazırladığı durumlarda kivi için gereğinden fazla zengin olduğunu belirlemiştir.

Bu aşamada araştırmacıların çoğu aksilleri dallanmayı teşvik etmek için tek başına ya da kombinasyonlar halinde zeatin, kinetin, IAA (indol asetik asit), IBA, BA ve GA₃ gibi büyümeyi düzenleyici maddelerin kullanımını önermektedir (Wessels ve ark., 1984; Monett, 1986, Marino ve Bertazza, 1990; Nachtigal ve ark., 1995; Kyte ve Kleyn, 1996; Ding ve ark., 1997; Sotiropoulos ve ark. 2006). Ancak araştırmaların sonuçları aynı çeşitte bile ortak bir büyümeyi düzenleyici madde ve dozunu işaret etmemektedir. Hatta Pedroso ve ark. (1992), büyümeyi düzenleyici maddelerden arı MS ortamını tavsiye etmiş ve 1 mg/L zeatin + 0.05 mg/L IAA ilavesinin kültürde %18 oranında anormal sürgün gelişmesine neden olduğunu bildirmişlerdir.

Köklendirme ortamı tercihleri açısından da durum farklı değildir. Bazı araştırmalarda kivi için köklendirme ortamı olarak MS, tam doz kullanılırken (Wessels ve ark., 1984; Wang ve ark., 1988; Canhoto ve Cruz, 1989; Kumar ve ark., 1998); bazı araştırmalarda ½ doz kullanılmıştır (Wiyaporn ve ark., 1990; Ding ve ark., 1997; Nasib ve ark., 2008). Kyte ve Kleyn (1996) bu aşamada inositol ve thiamin HCl ile zenginleştirilmiş, sukroz oranı azaltılmış ½ doz MS kullanımını önerirken; Marino ve Bertazza (1990) çok daha zenginleştirilmiş tam doz MS besin ortamını tercih etmişlerdir.

Kivide köklenmeyi teşvik etmek amacıyla büyümeyi düzenleyici maddelerin ya besin ortamına ilave edildiği ya da köklendirme ortamına dikilmeden önce doğrudan eksplantlara uygulandığı görülmektedir. Tatminkâr bir köklenme oranı için Wessels ve ark. (1984) MS ortamına 10 mg/L, Canhoto ve Cruz (1989) 1 mg/L, Ding ve ark. (1997) 0.7 mg/L, Nasib ve ark. (2008) ise 0.2 mg/L IBA ilave edilmesini önermişlerdir. Bunlardan farklı olarak Wiyaporn ve ark. (1990), köklenme bakımından en iyi sonuçların 0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA (naftalen asetik asit) ilave edilmiş MS ortamından, Kumar ve ark. (1998) ise 1 mg/L IAA ilave edilmiş MS ortamından alındığını bildirmiştir.

Oysa Wang ve ark. (1988), 2 saat süre ile 20 mg/L IBA çözeltisinde bekletilen sürgünlerde, 10 gün içinde köklenmenin başladığını ve %90 oranında köklenme elde edildiğini bildirmektedir. Aynı dozdaki IBA uygulamasında bekleme süresini farklı yazarlar sırası ile 30 saniye, 5 dakika ve 24 saat olarak önermişlerdir (Kamenicka ve Rypak, 1990; Sammarcelli ve Legave, 1990; Pedroso ve ark., 1992). Monette (1986) ise IBA'nın birkaç saniye süreyle uygulanan 5, 10 ve 20 mg/L dozları arasında farklılık olmadığını, üç uygulama neticesinde de %50 köklenmeye ulaşıldığını bildirmektedir. Oysa Xiao ve ark. (1991), uygulama süresi ve dozunun artırılması ile (2 saat, 50 mg/L IBA) Hayward kivi çeşidinde %80 oranında köklenme temin edilebileceğini belirlemiştir.

Yapılan araştırmalar incelendiğinde gerek kültürün farklı aşamalarında (başlangıç, sürgün çoğaltımı ve köklenme) kullanılacak besin ortamlarının bileşimleri, gerekse

çoğalma ve köklenmeyi teşvik etmek amacı ile kullanılan büyümeyi düzenleyici maddeler ve konsantrasyonları konusunda bir mutabakata varılamadığı görülmektedir. Dolayısıyla literatürden faydalanarak kivi klonal çoğaltımını sağlayacak rutin bir mikro çoğaltım programı oluşturulmak mümkün değildir. Bu nedenle ülkemiz koşullarına uygun bir mikro çoğaltım metodunun geliştirilmesi ve pratiğe aktarılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, Hayward ve Matua kivi çeşitlerinde rutin bir mikro çoğaltım programı oluşturmak amacı ile uygun eksplant tipi, başlangıç ve sürgün çoğaltım aşamalarında kullanılabilecek en uygun besin ortamları ile köklenmenin teşvik edildiği en uygun IBA doz ve uygulama süresinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Araştırmada materyal olarak Hayward (dişi) ile ona dölleyici olarak kullanılan Matua (erkek) kivi çeşitleri (*Actinidia deliciosa*) kullanılmıştır. Mikro çoğaltım denemeleri başlangıç, sürgün çoğaltım ve köklendirme olmak üzere 3 farklı aşamada gerçekleştirilmiş; her aşamada kullanılan materyal ve yöntemler aşağıda verilmiştir.

Başlangıç Kültürü

Bu aşamada sürgün ucu (shoot tip) ve tek boğumlu mikro çelik (nodal cutting) olmak üzere iki farklı eksplant tipi kullanılmıştır. Tüm eksplantlar vegetasyon başlangıcında sürgünlerin uç kısımlarından alınan 4-5 cm uzunluğundaki yeşil çeliklerden hazırlanmıştır. Yeşil çeliklerden 1-1.5 cm uzunluğunda sürgün uçları çıkartıldıktan sonra, sürgün ucuna yakın 3 ila 5. boğumlardan tek boğumlu mikro çelikler hazırlanmıştır.

Yüzey sterilizasyonuna eksplantların akan su altında 30 dakika yıkanmasıyla başlanmıştır. Daha sonra % 70'lik etil alkolde (15 saniye) tutulan eksplantlar steril distile su ile çalkalanarak, Tween 20 ilave edilmiş % 5'lik sodyum hipoklorit (NaOCl, ticari) çözeltisine alınmıştır. Sodyum hipoklorit uygulaması 10'ar dakikalık sürelerle, iki kez tekrarlanmış ve eksplantlar steril distile su ile çalkalanarak (3 kez) yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. Sterilizasyondan sonra aseptik kabine alınan tek boğumlu eksplantlar, boğumun alt ve üst kısmından, materyal 0.4-0.6 cm kalacak şekilde; sürgün uçları ise dip kısmından, materyal 0.7-1.0 cm kalacak şekilde, kesilerek dikime hazırlanmıştır.

Başlangıç kültüründe dikim ortamı olarak eşit miktarlarda sukroz (22.5 g/L) ve BA (2 mg/L) ilave edilmiş ¼ doz Murashige ve Skoog (MS; M-5519, Sigma Chemical Co.) besin ortamının katı (7g/L difco-bakto agar ilavesi ile katılaştırılmış) ve sıvı formları kullanılmıştır. Katı olan ortam "B-K", sıvı olan ise "B-S" olarak adlandırılmıştır.

Besin ortamlarının pH'sı, ortam sıcaklığı 70°C'e ulaşmadan önce, 5.8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamlar 25 x 150 mm'lik kültür tüplerine, yaklaşık 15 ml olacak şekilde doldurulmuş; sıvı besin ortamında, eksplantları taşınması için kağıt köprüler kullanılmıştır. Kültür tüplerine doldurulan besin ortamları daha sonra 121°C'de, 1.5 p.s.i. basınçta 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Kültür tüplerinde besin ortamlarına, her tüpte bir eksplant olacak şekilde dikim yapılmış; deneme, her bir çeşit, eksplant tipi ve besin ortamında 3 tekrür ve tekrürde 10 tüp olacak şekilde kurulmuştur.

Dikim sonrası iklim dolabına yerleştirilen eksplantlar, 4 hafta süreyle $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, 16 saat fotoperiyotta florasan lamba altında ($30\text{-}35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$) kültüre alınmıştır. 4 haftalık gelişme periyodu neticesinde, başlangıç kültüründe kullanılan besin ortamları ve eksplant tiplerinin karşılaştırılması amacıyla, eksplantlarda kontaminasyon oranı (%), karama oranı (%), kallus gelişme oranı (%), sürme oranı (%), sürgün uzunluğu (mm) ve boğum sayısı/sürgün parametrelerine bakılmıştır.

Sürgün Çoğaltımı

Bu aşamada eksplant olarak, 0.7-1.0 cm uzunluğa ulaşmış, tek boğumlu sürgünler (shoot tip) kullanılmıştır. Bu sürgünler, başlangıç kültüründe tanımlanan sürgün ucu eksplantlarının 4 haftada bir "B-K" besin ortamında alt kültüre alınması ile elde edilmiştir. Kültür koşulları başlangıç aşamasında belirtildiği gibidir.

Sürgün çoğaltım aşamasında, eşit miktarlarda BA (2 mg/L), IBA (0.03 mg/L) ve sukroz (30 g/L) ilave edilmiş 4 farklı besin ortamı denenmiştir. Bu aşamada denenilen "SA-S" ortamı, 170 mg/L sodyum fosfat, 80 mg/L adenin sülfat, 0.3 mg/L thiamin HCL ve 100 mg/L inositol ilave edilmiş, tam doz MS besin ortamının sıvı halidir. "SA-K" ortamı ise "SA-S" ortamının 6 g/L agar ilavesi ile katılaştırılmış halidir. "SB-S" olarak adlandırılmış olan; tam doz MS besin ortamıdır ve sıvıdır. "SB-K" ortamı ise 6 g/L agar ilave edilerek katılaştırılan tam doz MS besin ortamıdır. Besin ortamlarının pH'sı başlangıç kültür ortamlarında olduğu gibi 5.8'e ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamlar, 150 ml'lik cam kültür kavanozlarına yaklaşık 30 ml olacak şekilde doldurulmuştur. Sıvı halde olan "SA-S" ve "SB-S" ortamlarında, eksplantları taşıması için, kavanozların tabanına kağıt köprüler yerleştirilmiştir. Ortam sterilizasyonu başlangıç kültüründe belirtildiği gibidir.

Kültür kavanozlarında besin ortamlarına, her kavanozda 3 eksplant olacak şekilde dikim yapılmış; deneme, her bir çeşit ve besin ortamında 3 tekrür ve tekrürde 3 kavanoz olacak şekilde düzenlenmiştir.

Dikim sonrası eksplantlar başlangıç kültürü ile aynı koşullara sahip iklim dolabında kültüre alınmıştır. 4 haftalık gelişme periyodu sonunda ortamlarından çıkartılan eksplantlarda eksplant taze ağırlığı (mg), çoğalma oranı (%), sürgün sayısı/eksplant, $3 \geq$ boğumlu sürgün sayısı/eksplant, sürgün uzunluğu (mm) ve yaprak sayısı/sürgün parametrelerine bakılmıştır.

Köklendirme

Bu aşamada eksplant olarak 2-3 boğumlu ($\geq 2\text{cm}$) sürgünler kullanılmıştır. Bu sürgünler, sürgün çoğaltım aşamasında tanımlanan sürgün ucu eksplantları ile "SA-K" ortamında yapılan alt kültürler neticesinde elde edilmiştir.

Köklendirme aşamasında eksplantlar, 20 g/L sukroz ve 7 gr/L agar ilave edilmiş $\frac{1}{2}$ doz MS (M-5519, Sigma Chemical Co.) besin ortamına dikilmiştir. Kültür ortamı olarak 8 cm yükseklikte 300 ml'lik cam kavanozlar kullanılmış, her kavanoza yaklaşık 65 ml besin ortamı konulmuştur. Besin ortamının pH ayarlaması ve sterilizasyonu daha önceki aşamalarda belirtildiği gibi yapılmıştır.

Besin ortamına dikilmeden önce eksplantlara köklenmeyi teşvik etmek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda IBA uygulanmıştır. Hayward kivi çeşidine ait eksplantlar IBA'nın 0,

10, 20, 30, 50 mg/L dozlarında 15 saniye, 20 mg/L dozunda 2 saat; Matua kivi çeşidine ait eksplantlar ise 0, 10, 20, 50, 60 mg/L IBA çözeltilerinde 15 saniye, 50 mg/L IBA çözeltilerinde 2 saat bekletilmiştir.

Deneme, her bir çeşit ve IBA uygulaması için 3 tekrür ve her tekrürde 3 kavanoz olacak şekilde düzenlenmiş; her kavanozda besin ortamlarına 3 adet eksplant dikilmiştir.

Eksplantlar, daha önceki mikro çoğaltım aşamalarında belirtilmiş olan kültür koşullarında, 5 hafta süreyle köklenmeye terk edilmiştir. Köklenmenin temini açısından en uygun IBA uygulamasının tespit edilebilmesi amacıyla, kültür süresince ve kültür süresinin sonunda, eksplantlarda köklenme oranı (%), kök sayısı / sürgün ve kök uzunluğu (mm) ile köklenmeye kadar geçen gün sayısı belirlenmiştir. Varyans analizleri yapılırken köklenme meydana gelmeyen uygulamalar için, maksimum süre olan 35 gün değeri kullanılmıştır.

Denemeler neticesinde elde edilen tüm verilerin varyans analizleri 0.05 önemlilik seviyesinde ve Barnes bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılıklar ise Mstat-C bilgisayar programında, 0.05 önemlilik seviyesinde LSD testi ile saptanmıştır.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Başlangıç kültüründe karşılaşılan en önemli sorunlardan biri kontaminasyonlardır. Hayward kivi çeşidinde kontamine olmuş eksplantların oranı, istatistikî açıdan önemli bulunmasa da, kullanılan besin ortamı ve eksplant tipine bağlı olarak %10 ile %30 arasında değişmiştir. Matua çeşidinde de durum pek farklı değildir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Hayward kivi çeşidinde farkı eksplant tipi ve besin ortamlarının, başlangıç kültürü aşamasında incelenen parametreler üzerine etkileri.

Eksplant tipi	Besin ortamı	Kontaminasyon oranı (%)	Kararma oranı (%)	Kallus gelişme oranı (%)	Sürme oranı (%)	Sürgün uzunluğu (mm)	Boğum sayısı/sürgün
Sürgün Ucu	B-A	10.00	33.33	0.00 <i>b*</i>	53.33	17.10 <i>a</i>	1.97
	B-B	30.00	60.00	0.00 <i>b</i>	40.00	18.50 <i>a</i>	1.33
Tek boğumlu mikro çelik	B-A	10.00	10.00	70.00 <i>a</i>	3.33	14.00 <i>a</i>	1.33
	B-B	20.00	43.33	40.00 <i>a</i>	0.00	0.00 <i>b</i>	0.00
ANOVA							
Eksplant tipi (A)		öd	öd	**	**	**	**
Besin Ortamı (B)		öd	**	**	**	**	**
A x B		öd	öd	**	öd	**	öd

* İncelenen parametreler bazında eksplant tipi x besin ortamı interaksyonu bakımından ortaya çıkan farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

Başlangıç kültüründe, eksplant tipi ve besin ortamına bağlı olarak, %3.33 ile %30 arasında kontaminasyon tespit edilmiştir. Her iki çeşitte de sürgün ucu eksplantlarının katı MS ortamında kültüre alınması üstünlük sağlıyorsa da yüzey sterilizasyonun mutlak başarı sağlamadığına işaret etmektedir. Monett (1986), yüzey sterilizasyonu ve meristem izolasyonuna rağmen kivide anaç bitkilerden gelen *Aerococcus* sp. ve *Bacillus fastidiosus*

bakterilerinin elimine edilemediğini; bununla birlikte, ortamda gelişen bakterilerin mikro çoğaltımı etkilemediğini bildirmiştir. Tezcan ve ark. (2001) ise Hayward kivi çeşidinin başlangıç kültüründe, yıllara bağlı olarak, %1.7 ile %12.0 arasında değişen oranlarda bakteriyel bulaşma olduğunu, asıl problemin başta *Alternaria spp.* olmak üzere, *Fusarium spp.* ve *Penicillium spp.* gibi fungal etmenlerden kaynaklandığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu kontaminasyonların önüne geçmek bakımından, eksplant alınmadan 10 gün önce, omcaların 200 g/100 L chlorothanil ile ilaçlanmasının etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Başlangıç kültüründe başarıyı etkileyen bir diğer sorun da eksplantların kararmasıdır. Hayward kivi çeşidinde eksplantların kararması ile ilgili olarak eksplant tipinden çok kullanılan besin ortamının belirleyici olduğu tespit edilmiştir. Besin ortamının sıvı olması her iki eksplant tipinde de kararmayı teşvik etmiştir (Çizelge 1). Matua çeşidinde de sıvı besin ortamının kararmayı teşvik ettiği, bununla birlikte sürgün ucu eksplantlarının kararmaya daha temayüllü olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Aksiller tomurcuk oluşumunun teşvik edildiği *in vitro* çoğaltım tekniklerinde, direk organogenesis ile sürgün çoğaltımı amaçlandığından, eksplantların kallus oluşturması arzulanmaz (Mansuroğlu ve Gürel 2001). Bu açıdan değerlendirildiğinde Hayward çeşidinde sürgün ucu eksplantlarında hiç kallus gelişimi olmazken, tek boğumlu mikro çeliklerde hem katı (%40) hem de sıvı ortamda (%70) kallus gelişimi gözlenmiştir. Bu durum kültürün başarısını olumsuz yönde etkilemiş, tek boğumlu mikro çeliklerde 4 hafta süresince sürme meydana gelmemiştir. Matua kivi çeşidinde de benzer durum gözlenmiş, tek boğumlu mikro çeliklerin, özellikle sıvı MS ortamında (% 90) aşırı kallus gelişimi nedeni ile süremediği belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Matua kivi çeşidinde farklı eksplant tipi ve besin ortamlarının başlangıç kültürü aşamasında incelenen parametreler üzerine etkileri.

Eksplant tipi	Besin ortamı	Kontaminasyon oranı (%)	Kararma oranı (%)	Kallus gelişme oranı (%)	Sürme oranı (%)	Sürgün Uzunluğu, (mm)	Boğum sayısı/sürgün
Sürgün Ucu	BA	3.33 <i>b</i> *	90.00 <i>b</i>	0.00 <i>c</i>	50.00	14.80 <i>a</i>	1.23 <i>a</i>
	BB	26.67 <i>ab</i>	100.00 <i>a</i>	6.67 <i>c</i>	30.00	0.00 <i>b</i>	0.00 <i>b</i>
Tek boğumlu micro çelik	BA	30.00 <i>a</i>	0.00 <i>d</i>	90.00 <i>a</i>	10.00	0.00 <i>b</i>	0.00 <i>b</i>
	BB	20.00 <i>ab</i>	26.67 <i>c</i>	50.00 <i>b</i>	3.33	3.30 <i>b</i>	0.67 <i>ab</i>
ANOVA							
Eksplant tipi (A)		öd	**	**	**	**	öd
Besin Ortamı (B)		öd	**	**	**	**	öd
A x B		**	**	**	öd	**	**

* İncelenen parametreler bazında eksplant tipi x besin ortamı interaksyonu bakımından ortaya çıkan farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

Wiyaporn ve ark. (1990) Bruno, Pedrosa ve ark. (1992) Hayward kivi çeşidinde tek boğumlu eksplantlardan, birkaç istisna dışında, sürgün elde edilemediğini bildirmişlerdir. Diğer bazı çok yıllık bahçe bitkilerinin tersine, kivilerde kallustan sürgün formasyonu çok uzun sürmektedir. Yapılan araştırmalar kallustan tomurcuk oluşumunun altı ay (Barbieri ve

Morini, 1988), sürgün formasyonunun ise bir yıl sürebildiğini göstermiştir (Sammarcelli ve Legave, 1990). Sürme oranı (% 53.33), sürgün uzunluğu (17.10 mm) ve boğum sayısı (1.97) açısından değerlendirildiğinde Hayward kivi çeşidinde en iyi sonuçlar “BA” ortamında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarından elde edilmiştir (Çizelge 1).

Sürme oranı (% 50), sürgün uzunluğu (14.80 mm) ve boğum sayısı (1.23) ile ilgili olarak Matua kivi çeşidinde de benzer sonuçlar elde edilmiş; sürgün ucu eksplantlarının tek boğumlu mikro çeliklere, “BA” besin ortamının da “BB” ortamına göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). Elde edilen bulgular Hayward ve Matua kivi çeşitlerinin *in vitro* koşullarda klonal üretimi için başlangıç kültüründe dikim ortamı olarak sukroz (22.5 g/L) ve BA (2 mg/L) ilave edilmiş ¾ doz MS besin ortamının katı formda kullanılabileceğini göstermiştir.

Sürgün çoğaltım aşamasıyla ilgili olarak elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; Hayward kivi çeşidinde, incelenen tüm parametreler açısından sodyum fosfat, adenin sülfat, thiamin HCL ve inositol ilave edilerek zenginleştirilmiş MS besin ortamlarının (SA-K ve SA-S), diğer iki besin ortamına göre daha avantajlı olduğu görülmektedir (Çizelge 3). “SA-S” ve “SA-K” besin ortamları karşılaştırıldığında ise eksplant ağırlığı, çoğalma oranı, sürgün uzunluğu ile yaprak sayısı bakımından “SA-K” ortamının tercih edilmesi gerekmektedir. “SA-S” ortamının tercih edilmeyişinin en önemli sebebi, sıvı ortamlarda kültür yapılmasının daha fazla el işçiliği gerektirmesidir. Genç sürgünlerin “SA-K” besin ortamında kültüre alınması ile 4 hafta gibi kısa bir sürede, eksplantlarda çoğalma oranı 5.3’e yükselmiş ve her bir eksplantta ana bitkiden ayrılarak köklenme ortamına aktarılacak nitelikte (ortalama 28.65 mm uzunlukta) 3.4 adet sürgün gelişmiştir. Bu sürgünlerin 1.89 adeti 3 ≥ boğuma sahiptir. Burada sürgün çoğaltımı açısından ulaşılan maksimum değerler literatürdeki çalışmalar ile uyum içerisindedir. Hayward kivi çeşidinde en iyi sonucu verdiği belirtilen besin ortamlarında maksimum çoğalma oranlarının 4.5 ile 5.9, 2 mm ve üzerinde uzunluğa sahip sürgün sayılarının ise 3.12 ile 3.78 arasında değiştiği bildirilmektedir (Monette, 1986; 1987; Marino ve Bertazza, 1990; Sotiropoulos ve ark., 2006).

Çizelge 3. Hayward kivi çeşidinde farklı besin ortamlarının sürgün çoğaltım aşamasında incelenen parametreler üzerine etkileri.

Besin ortamı	Eksplant taze ağırlığı (mg)	Çoğalma oranı (%)	Sürgün sayısı / eksplant	3 ≥ boğumlu sürgün sayısı/ eksplant	Sürgün uzunluğu (mm)	Yaprak sayısı/ sürgün
SA-S	1078.46 b*	4.45 ab	4.11 a	1.89	25.37 ab	3.17
SA-K	1309.20 a	5.30 a	3.41 ab	1.89	28.65 a	3.22
SB-S	540.24 c	4.11 ab	3.67 a	1.48	22.09 b	2.65
SB-K	726.56 c	3.41 b	2.44 b	1.11	26.05 ab	2.65

*İncelenen parametreler bazında besin ortamları bakımından ortaya çıkan farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

Matu kivi çeşidinde, Hayward’ın aksine, en iyi sonuçlar sıvı besin ortamlarından (SA-S ve SB-S) elde edilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. Matua kivi çeşidinde farklı besin ortamlarının sürgün çoğaltım aşamasında incelenen parametreler üzerine etkileri.

Besin ortamı	Eksplant taze ağırlığı (mg)	Çoğalma oranı (%)	Sürgün sayısı / eksplant	3 ≥ Boğumlu sürgün sayısı/ eksplant	Sürgün uzunluğu (mm)	Yaprak sayısı/ Sürgün
SA-S	1014.87 a*	5.22 a	4.19 a	3.04 a	30.52 a	3.08 ab
SA-K	1079.38 a	6.37 a	3.41 ab	2.04 b	23.53 b	3.25 a
SB-S	688.12 ab	3.48 b	3.19 ab	1.67 bc	20.56 b	2.63 b
SB-K	361.33 b	3.15 b	2.78 b	1.07 c	21.59 b	2.70 b

* İncelenen parametreler bazında besin ortamları bakımından ortaya çıkan farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

Bu iki ortam kıyaslandığında ise, özellikle sürgün sayısı, 3 ≥ sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve yaprak sayısı bakımından, fosfat, adenin sülfat, thiamin HCL ve inositol ilavesi ile zenginleştirilmiş tam doz MS besin ortamının (SA-S) daha avantajlı olduğu görülmektedir. Monette (1986, 1987)'nin bulguları da bu yöndedir. Matua çeşidine ait genç sürgün uçlarının söz konusu besin ortamında kültüre alınması ile 4 hafta sonunda, çoğalma oranının 5.22'e ulaştığı ve her bir eksplantta köklendirme ortamına aktarılacak nitelikte (ortalama 30.52 mm uzunlukta) 4.19 adet sürgün geliştiği belirlenmiştir. Bu sürgünlerin 3.04 adedi de 3 ≥ boğuma sahiptir. Sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan kivi çeşitlerinin performansı kıyaslandığında, genel olarak, Matua kivi çeşidinde çoğalma oranı ve sürgün formasyonunun daha yüksek olduğu görülmektedir. Spasenoski ve Neskovic (1987) de erkek kivi bitkilerinde çoğalma oranının yüksek olduğunu belirlemiştir.

Köklendirme aşamasıyla ilgili olarak elde edilen bulgular, literatürde belirtildiği gibi, kivilerde köklenmenin temin edilmesi bakımından büyümeyi düzenleyici madde kullanımının zorunlu olduğunu göstermiştir (Çizelge 5 ve 6).

Çizelge 5. Hayward kivi çeşidinde farklı IBA uygulamalarının köklenme üzerine etkileri.

IBA uygulamaları		Köklenme oranı (%)	Köklenmeye kadar geçen gün sayısı	Kök sayısı/sürgün	Kök uzunluğu (mm)
Uygulama dozu (mg/L)	Uygulama süresi				
0 (Kontrol)	15 sn	11.11 b*	32.81 ab	0.33 b	11.00 c
10	15 sn	7.41 b	33.74 ab	1.00 b	12.67 c
20	15 sn	51.85 a	13.26 c	1.30 b	26.70 a
30	15 sn	3.70 b	34.30 a	0.33 b	4.35 d
50	15 sn	22.22 ab	30.30 b	1.11 b	17.94 b
20	2 h	40.74 a	12.47 c	4.03 a	19.11 b

* İncelenen parametre bazında IBA uygulamaları bakımından ortaya çıkan farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

Çizelge 6. Matua kivi çeşidinde farklı IBA uygulamalarının köklenme üzerine etkileri.

IBA uygulamaları		Köklenme oranı (%)	Köklenmeye kadar geçen gün sayısı	Kök sayısı/sürgün	Kök uzunluğu (mm)
Uygulama dozu (mg/L)	Uygulama süresi				
0 (Kontrol)	15 sn	0.00 <i>c*</i>	35.00 <i>a</i>	0.00 <i>e</i>	0.00 <i>d</i>
10	15 sn	14.81 <i>b</i>	31.71 <i>b</i>	1.33 <i>d</i>	28.50 <i>a</i>
20	15 sn	22.22 <i>b</i>	30.92 <i>bc</i>	2.17 <i>d</i>	19.72 <i>c</i>
50	15 sn	59.26 <i>a</i>	14.00 <i>d</i>	3.87 <i>d</i>	26.92 <i>a</i>
60	15 sn	25.92 <i>b</i>	29.45 <i>c</i>	5.78 <i>b</i>	21.22 <i>bc</i>
50	2 h	70.37 <i>a</i>	13.57 <i>d</i>	8.50 <i>a</i>	26.32 <i>ab</i>

* İncelenen parametre bazında IBA uygulamaları bakımından ortaya çıkan farklılıkları göstermektedir.

Hayward kivi çeşidinde en yüksek köklenme oranları 20 mg/L IBA uygulamalarından (15 saniye ve 2 saat) elde edilmiştir. Uygulama süresinin arttırılması köklenme oranını azaltmış, fakat kök sayısını arttırmıştır. 20 mg/L IBA'nın 15 saniye süreyle uygulanması ile Hayward kivi çeşidinde köklenme oranı %51.85'e ulaşmış, bitkilerde ortalama 1.3 adet ve 26.7 mm uzunluğunda kök oluşumu sağlanmıştır. Köklenmeye kadar geçen süre ise 13.20 gün olmuştur. Matua kivi çeşidi ise köklendirme aşamasında Hayward'a oranla daha üstün performans göstermiş ve en yüksek köklenme oranları 50 mg/L IBA uygulamalarından (15 saniye ve 2 saat) elde edilmiştir. 50 mg/L IBA'nın 2 saat uygulanması ile köklenme oranı %70.37'e ulaşmış, bitkilerde ortalama 8.5 adet ve 26.32 mm uzunluğunda kök oluşumu saptanmıştır. Bununla birlikte köklenmeye kadar geçen süre Hayward çeşidi ile aynı olmuştur.

Literatürde, kullanılan büyümeyi düzenleyici madde ve dozuna bağlı olarak, kivilerde köklenme oranlarının %50 ile %100, köklenme süresinin ise 10 ile 25 gün arasında değiştiği bildirilmektedir (Wessels ve ark., 1984; Canhoto ve Cruz, 1989; Marino ve Bertazza, 1990; Ding ve ark., 1997; Kumar ve ark., 1998). Monette (1986), 20 mg/L IBA'ya hızlı daldırma ile %50 köklenme olduğunu bildirirken; Wang ve ark. (1988), aynı konsantrasyonda 2 saat bekletilen sürgünlerde %90 köklenme olduğunu belirlemişlerdir. Xiao ve ark. (1991) ise 2 saat, 50 mg/L IBA uygulamasının Hayward kivi çeşidinde %80 oranında köklenme temin edilebileceğini bildirmişlerdir. Büyümeyi düzenleyici maddelerin köklenme üzerine etkileri bakımından ortaya çıkan bu farklılıklar; köklenmede kullanılan çeşit, köklendirme ortamı ve çevre koşullarının da etkili olabileceğine işaret etmektedir. Burada örneklenen çalışmalarda çeşit farklılığı olduğu gibi, her araştırmanın kendine özgü köklendirme ortamlarına sahip olduğu görülmektedir.

Literatürde, büyümeyi düzenleyici maddelerin kök kalitesi üzerine etkileri bakımından da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Monett (1986), bir araştırmasında IBA konsantrasyonuna bağlı olarak kök sayısının 4.5 ile 15.9, uzunluğunun ise 26.6 ile 34.9 mm arasında değiştiğini bildirirken; bir başka araştırmasında kültürün muhafaza süresine bağlı olarak 5 mm ve daha uzun kök sayısının 0.1 ile 2.2 arasında değiştiğini belirlemiştir (Monette 1987). Marino ve Bertezza (1990) çeşitlere ve IBA konsantrasyonlarına bağlı olarak kök sayısını 2.67-15.24, kök uzunluğunun da 9.31-12.82 mm arasında değiştiğini tespit etmiştir.

Burada yürütülen çalışmada köklenme bakımından tatminkar sonuçlar elde edilmişse de, yeni yapılacak araştırmalar ile özellikle Hayward kivi çeşidinde köklenme oranı ve kök

kalitesini iyileştirecek besin ortamları ve büyüme düzenleyici madde uygulamalarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Barbieri, C. and S. Morini. 1988. Shoot Regeneration from Callus Cultures of *Actinidia chinensis* (cv. Hayward). *Acta Horticulturae*, 227: 470-472.
- Canhoto, J.M. and G.S. Cruz. 1989. *In Vitro* Multiplication of *Actinidia chinensis* Planch. by Culture of Young Leaves. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 60: 239-252.
- Ding, S.L., X.Z. Zhu and H.M. Yu. 1997. Kiwifruit Tissue Culture. *China Fruits*, 2: 27-29.
- Kamenicka, A. and M. Rypak. 1990. The Regeneration of *Actinidia chinensis* Planch. Cultured *In Vitro*. *Horticultural Abstracts*, 60 (6): 4156.
- Kumar, S and D.R. Sharma. 2002. *In Vitro* Propagation of kiwifruit. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77 (5): 503-508.
- Kumar, S., C. Subodh, H. Gupta and D.R. Sharma. 1998. Micropropagation of *Actinidia deliciosa* from Axillary Buds. *Phytomorphology*, 48 (3): 303-307.
- Kyte, K. and J. Kleyn. 1996. *Plants from Test Tubes*. Timber Press, Portland, Oregon, USA. 240 pp.
- Mansuroğlu, S. ve E. Gürel. 2001. Mikroçoğaltım. “Bitki Biyoteknolojisi I – Doku Kültürü ve Uygulamaları” (Editörler: M. Babaoğlu, E. Gürel ve S. Özcan), Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya. s. 262-281.
- Marino, G. and G. Bertazza. 1990. Micropropagation of *Actinidia deliciosa* cvs ‘Hayward’ and ‘Tomuri’. *Scientia Horticulturae*, 45: 65-74.
- Moncalean, P., M.J. Canal, I. Feito, A. Rodriguez and B. Fernandez. 1999. Cytokinins and Mineral Nutrition in *Actinidia deliciosa* (Kiwi) Shoots Cultured *In Vitro*. *Journal of Plant Physiology*, 155 (4/5): 606-612.
- Monette, P.L. 1986. Micropropagation of Kiwifruit Using Non-Axenic Shoot Tips. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 6: 73-82.
- Monette, P.L. 1987. Organogenesis and Plantlet Regeneration Following *In Vitro* Cold Storage of Kiwifruit Shoot Tip Cultures. *Scientia Horticulturae*, 31: 101-106.
- Nachtigal, J.C., A.G.D. Zecca, S.L.B. Figueiredo and G.R.d.L. Fortes. 1995. Effect of Benzylaminopurine (BAP) on the *In Vitro* Multiplication of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Ciencia Rural*, 25 (1): 23-26.
- Nasib, A., H. Ali and S. Khan. 2008. An Optimixed and Improved Method for the *In Vitro* Propagation of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) Using Coconut Water. *Pakistan Journal of Botany*, 40 (6): 2255-2360.
- Pedroso, M.C., M.M. Oliveira and M.S.S. Pais. 1992. Micropropagation and Simultaneous Rooting of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* ‘Hayward’. *HortScience*, 27 (5): 443-445.

- Prado M. J., M. V. Gonzalez, S. Romo and M. T. Herrera. 2007. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88 (1):1–10.
- Rugini, E. and P. Gutierrez-Pesce, 2003. Micropropagation of kiwifruit (*Actinidia ssp*). In: Jain, S.M. and K. Ishii (eds.), *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, pp: 647–69. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Sammarcelli, F. and J.M. Legave. 1990. *In Vitro* Multiplication by Neoformation in *Actinidia deliciosa*, Cultivar Hayward. *Fruits*, 45 (4): 393-401.
- Sotiropoulos, T.E., K.N. Dimassi and V. Tsirakoglou. 2006. Effect of boron and methionine on growth and ion content in kiwifruit shoots cultured in vitro. 50 (2): 300-302.
- Souad, B., S.M. Lionakis and D. Gerasopoulos. 1998. Effects of Explant Type on Proliferation and Rooting of Kiwi *In Vitro*. *Advances in Horticultural Science*, 12 (3): 123-126.
- Spasenoski, M. and M. Neskovic. 1987. *In Vitro* Vegetative Propagation of *Actinidia chinensis* Planch. from Juvenile and Adult Plant Segments. *Horticultural Abstracts*, 57 (11): 8334.
- Tanimoto, G. 1994. Propagation. “In: *Kiwifruit Growing and Handling* (Eds., J.K. Hasey, R.S. Johnson, J.A. Grant and W.O. Reil)”. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 3344, 21-24.
- Tezcan, H., N. Sivritepe ve Y. Tuğ. 2001. Kivinin *In Vitro* Çoğaltımında Fungal Bulaşmaların Önlenmesi Üzerine Bazı Fungusitlerin Etkileri. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, 3-8 Eylül 2001, Tekirdağ. *Bildiriler Kitabı*, s. 649-655.
- Wang, D., Y.L. Gui and J.S. Sun. 1988. Tissue Culture of Fruit Crops in China. *HortScience*, 23 (6): 962-965.
- Wessels, E., D.D. Nel and D.F.A. von Staden. 1984. *In Vitro* propagation of *Actinidia chinensis* Pl. Cultivar Hayward. *Deciduous Fruit Grower* 34 (12): 453-457.
- Wiyaporn S., S. Subhadrabandhu and O. Sahavacharin. 1990. *In Vitro* Vegetative Multiplication of Kiwi Plant. *Acta Horticulturae*, 279: 447-459.
- Xiao, X.G., A.M. Hirsch and D. Fortune. 1991. Regeneration of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* Cultivar Hayward) from Young Leaves. *Fruits (Paris)*, 46 (1): 57-66.