

KİVİ (*ACTINIDIA DELICIOSA*) NİN *İN VİTRO* ORTAMDA ÇİMLENDİRİLMESİ

Filiz AKBAŞ^{1*}, Çiğdem IŞIKALAN², Davut BAŞARAN², Süreyya NAMLI²

¹Batman Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Batman

²Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Diyarbakır

*filiz.akbas@batman.edu.tr

Özet: Kivi (*Actinidia deliciosa*) tohumlarının *in vitro* şartlarda çimlendirilmesine, materyal şekli, Murashige Skoog besi ortamı (MS) konsantrasyonu, şeker çeşidi (sakkaroz, maltoz ve dekstroz) nin etkisi ayrı ayrı araştırıldı. 30 g/l sakkaroz ve ¼ MS in, Kivi (*Actinidia deliciosa*) tohumları için ideal çimlenme ortamı olduğu saptandı.

Ayrıca tohumların çimlendirilmesine bir sitokin olan BAP (6-Benziloaminopürin) konsantrasyonlarının (0.5-1.0-2.0-4.0-6.0-8.0 mg l⁻¹) etkisi test edildi ve 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamının en iyi sonucu verdiği belirlendi. Elde edilen sürgünler, 1.0 mg l⁻¹ NAA (naftalen asetik asit) lı besi ortamında köklendirilerek *in vivo* şartlara adaptasyonu sağlandı.

Anahtar kelimeler: *Actinidia deliciosa*, *in vitro*, çimlenme, BAP.

In vitro Germination of Kiwi (*Actinidia deliciosa*)

Abstract: Effects of explant source, strenght of MS (Murashige and Skoog medium), types of sugar (sucrose, maltoz and dextroz) on axenic germination of seeds from kiwi were examined and 30 g/l sucrose and ¼ MS were found to be optimum medium for seeds of Kiwi (*Actinidia deliciosa*).

Also, effect of BAP (6-benzyloaminopurine- with a cytokinin) concentrations (0.5-1.0-2.0-4.0-6.0-8.0 mg l⁻¹) on axenic germination of seeds were testedhe optimum result for germination of seeds was obtained on MS medium containing 2.0 mg l⁻¹ BAP. The shoots developed were rooted on MS medium with 1.0 mg l⁻¹ NAA (naphthaleneacetic acid). The *in vitro* rooted shoots were succesfully adapted at *in vivo* condition.

Keywords: *Actinidia deliciosa*, *in vitro*, germination, BAP.

1. GİRİŞ

Kivi bitkisi, son 30-50 yılda adından en çok söz edilen ve üretimi hızla artan meyve türlerinden biridir. Geniş adaptasyon yeteneği, bitki ve meyve özellikleri, depolama kolaylıkları, yüksek fiyatla alıcı bulması, üretimindeki sızramayı sağlamıştır.

Actinidia cinsine ait kivi türünün bilinen 50 kadar türü vardır. Bu türler Baltık Denizi kıyılarından güneyde Endonezya'ya, doğuda Çin'e kadar olan geniş bir coğrafyada, orman kenarı bitkisi olarak yayılmışlardır. Yabani kivi popülasyonlarının en yoğun olduğu yer ve kivi türünün anavatanı Çin dir. Günümüzde kültürel olarak yetiştiriciliği yapılan kivi çeşitleri Yeni Zelanda'da ıslah edilmiştir. İlk sera tipi kivi bahçeleri de bu ülkede 1930'lu yıllarda kurulmuştur. Dünya kivi ticareti 1970'li yıllara kadar bu ülkenin tekelinde kalmıştır. Bu tarihten sonra kuzey Akdeniz ülkeleri, Avustralya, Güney Afrika, Şili, ABD, Japonya gibi birçok ülkede de yetiştirilmeye başlanmıştır [1,2].

Ülkemizde kivi üretimi oldukça yenidir. Kivi ekolojisine uygun bölgelerin başında Karadeniz, Marmara ve Ege bölgesi gelmektedir. Özellikle bitkinin nem ve su ihtiyacının fazla oluşu, Doğu Karadeniz bölgesinde kivi üretiminin diğer bölgelere nispeten daha ekonomik ve kaliteli yapılacağını göstermektedir [3].

Tablo.1. 100 gram kivi türünün gıda değeri

Analizler	Taze Meyve	Konserve	Donmuş
Kalori	66	*	66
Rutubet	81.2 g	73.0 g	80.7 g
Protein	0.79 g	0.89 g	0.95 g
Yağ	0.07 g	0.06 g	0.08 g
Karbonhidratlar	17.5 g	25.5 g	17.6 g
Kül	0.45 g	0.45 g	0.53 g
Kalsiyum	16 m	23 mg	18 mg
Demir	0.51 mg	0.40 mg	0.51 mg
Magnezyum	30 mg	30 mg	27 mg
Fosfor	64 mg	48 mg	67 mg
Thiamine	0.02 mg	0.02 mg	0.01 mg
Niacin	0.50 mg	0.40 mg	0.22 mg
Riboflavin	0.05 mg	0.02 mg	0.03 mg
Vitamin A	175 I.U.	155 I.U.	117 I.U.
Ascorbic Acid	105 mg	103 mg	218 mg

Kaynak: Kaliforniya Üniversitesi [4].

Kivi meyvesinden çok farklı şekillerde yararlanılmaktadır (Tablo 1). Bunun yanında gıda sanayiinde, pasta, tatlı ve içki yapımında kullanılmaktadır. Kivi meyve bileşiminde en önemli ve dikkat çekici unsur, C vitamini içeriğidir. Bu unsur, kivi meyvesine değer katan ve aranan bir meyve olmasını sağlayan etmenlerin başında gelmektedir. Kivi meyvesinin 100 gramında, ortalama 100 - 400 mg C vitamini bulunur.

Kivi meyvesinin besin değeri yanında, tıpta kullanımı da söz konusudur. Çin'de yapılan analizlerde, meyve suyunda bulunan bazı maddelerin kansere neden olan faktörleri önlediği ortaya çıkmıştır. Yine bazı tıbbi içeceklerle birlikte kullanıldığında astım, öksürük ve nefes açıcı özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [4].

Bu ürünün yaygınlaştırılması ve yetiştiriciliğinin hızlandırılması için birçok ülkede alternatif çoğaltma metodu olarak, doku ve organ kültürü teknikleri geliştirilmiştir. Bitki Doku Kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları) veya organ (apikal meristem, kök vb) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler) üretilmesidir. Bitki doku kültürleri, genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılmasında, zor olan türlerin üretiminde çeşitli doku kültürü teknikleri rutin olarak uygulanmaktadır [5].

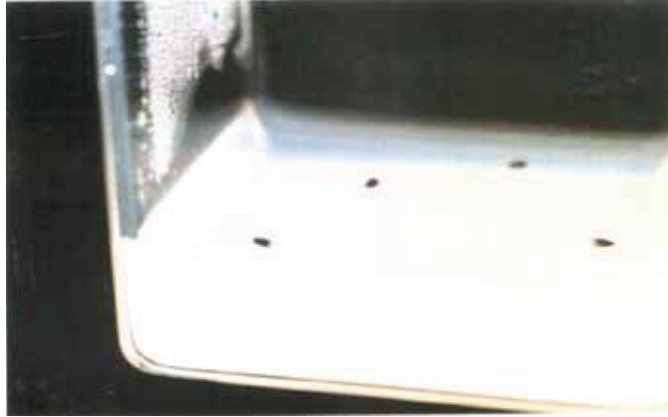
Actinidia deliciosa ile ilgili ilk mikroçoğaltım çalışmaları Harada [6] tarafından yapılmış ve daha sonraki yıllarda başka araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir [7,8,9,10]. Kültür başlatılmasında başlangıç materyali olarak sürgün uçları [11], sürgün meristemleri [12], tomurcuklar ve nodal segmentler [13] kullanılmıştır. Mikroçoğaltım çalışmalarında en uygun başlangıç materyalinin, genetik mutasyonları engellediği ve virüssüz bitki elde edildiği için sürgün meristemleri olduğu belirlenmiştir [12]. Bunun yanında, organogenesis ve somatik embriyogenesis çalışmalarında başlangıç materyali olarak, yaprak parçaları, yaprak petiyolleri ve zigotik embriyolar da kullanılmıştır [14,15].

Bir sağlık meyvesi olarak adlandırılan kivi, ülkemizde yetiştiriciliğinin yapılabileceği bölgelerin olmasına rağmen meyve talebinin büyük çoğunluğu yurt dışından ithalat yoluyla temin edilmektedir. Gerek dünyada gerekse ülkemizde büyük önem kazanan kivi, geleneksel yöntemlerin yanı sıra, doku kültürü yöntemleriyle kısa sürede istenilen miktarda çoğaltılarak hızlı fide-fidan üretimi yapılabilir. Zira, kivi geleneksel yöntemlerle çimlendirilmesi birçok ön uygulama gerektirir ve uzun zaman almaktadır. Bu özellikler göz önünde bulundurularak kivi (*Actinidia deliciosa*)'nin *in vitro* koşullarda çoğaltılma olanaklarının araştırılması için bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

Kivinin *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi çalışmalarına başlamadan önce tohumlardan yüksek verim randımanı alabilmek için yüzey sterilizasyonu ve başlangıç materyalinin tespiti araştırıldı.

Ön sterilizasyon için, kivi meyvesi musluk suyunda 3-5 dakika yıkandı. Daha sonra steril kabin içerisinde kahverengi tüylü dış kabuğu soyularak %70'lik alkolle yıkandı. Yine steril kabin içerisinde steril pens ve bistüri yardımı ile filtre kağıtları arasında tohumlar birer birer meyveden izole edildi. Tohumların çimlenmesi ve büyümesi için MS [16] besi ortamı, 30 g/l sakkaroz, 7 g/l agar ve 1 mg l⁻¹ BAP ilavesi ile desteklendi. Besi ortamı pH'sı agar ilavesinden önce, KOH veya NaOH ile 5.7-5.8 olacak şekilde ayarlanarak 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Hazırlanan besi ortamı, magenda GA-7 kültür kaplarına, steril kabin içerisinde bölüştürüldü. İzole edilen tohumlar, 4 farklı şekilde (1.Tohum- müdahale edilmemiş; 2.Tohum-testası çatlatılmış; 3. Tohum-ikiye bölünmüş; 4.Tohum-etli meyve kısmı ile), besi ortamının bulunduğu kültür kaplarına ekimi yapıldı (Resim 1.)



Resim 1. Kivi tohumlarının *in vitro* ortama ekimi.

Ekimi yapılan tohumlar, sıcaklık ayarı 25±2 °C olan ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyoda ayarlanmış kültür odasında gelişmeye bırakıldı.

Kivinin olgun tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlenmesine etkisini test etmek için, besi ortamına, farklı MS yoğunluğu (1/4 MS-1/2 MS-1/1 MS-2/1 MS), şeker çeşidi olarak ise 30 g/l sakkaroz, maltoz ve dekstroz ayrı ayrı ilave edildi.

Çimlenmeye hormonların etkisini tespit etmek için bir sitokin olan BAP'ın 6 farklı konsantrasyonu (0.5 -1.0 -2.0 -4.0-6.0 -8.0 mg l⁻¹) MS besi ortamına ilave edilerek bir kontrol grubu ile birlikte test edildi.

3. BULGULAR

Kivi Tohumlarının İn Vitro Şartlarda Çimlenmesinde Materyal Şeklinin Etkisi

Kültüre alındıktan bir hafta sonra, hiç bir test grubunda enfeksiyona rastlanmadı. Ancak birkaç test grubunda çimlenmenin belirtisi olarak radikula çıkışı gözlemlendi.

Tohumların ikiye bölünerek ya da testası çatlatılarak kültüre alınması, çimlenmeyi hızlandırmak amacıyla uygulandı. Ancak bu uygulamaların çimlenme hızını etkilemediği belirlendi. *In vitro* çimlendirme çalışmalarında, başlangıç materyali olarak kullanılan kivi tohumlarına herhangi bir müdahale uygulanmadan besi ortamına bırakılması gerektiği sonucuna varıldı.

Kivi Tohumlarının İn Vitro Şartlarda Çimlenmesinde MS Konsantrasyonunun Etkisi

Kivi tohumlarının çimlenmesine MS konsantrasyonunun etkisini tespit için yapılan çalışmada ilk on gün içinde, 1/4 MS ve kontrol gruplarında hızlı bir gelişme ile çimlenme belirtileri görüldü. MS in diğer oranlarında ise çimlenme hızının daha yavaş olduğu belirlendi. Daha sonraki günlerde kontrol grubunda test edilen tohumların gelişiminin yavaşlayıp durduğunu, bunun yanında 1/4 MS oranında bulunan tohumların aynı hızla gelişmesine devam ettiği tespit edildi.

Sonuç olarak, MS konsantrasyonuna göre tohumların çimlenme oranı ve hızının değiştiği belirlendi. Sırasıyla en iyi çimlenmenin 1/4 - 1/2 - 1/1 MS oranlarında olduğu tespit edildi. Yani, MS konsantrasyonu seyreltikçe, tohumların çimlenmesi ve gelişmesinin daha iyi olduğu belirlendi (Resim 2,3,4).



Resim 2. Kivi tohumlarının çimlenmesine, 1/4 MS besi ortamının etkisi.



Resim 3. Kivi tohumlarının çimlenmesine, 1/2 MS besi ortamının etkisi.



Resim 4. Kivi tohumlarının çimlenmesine, 1/1 MS besi ortamının etkisi.



Resim 5. Kivi tohumlarının çimlenmesinde, sakkaroz şeker çeşidinin etkisi.

Kivi Tohumlarının İn Vitro Şartlarda Çimlenmesinde Şeker Çeşidinin Etkisi

Kivinin olgun tohumlarının, *in vitro* şartlarda geç çimlendiği ve çimlenme hızına şeker çeşitlerinin etkili olmadığı görüldü. Bununla birlikte test edilen gruplar içerisinde, 30 g/l sakkarozlu MS besisi ortamının en iyi sonucu verdiği belirlendi (Resim 5.)

Kivi Tohumlarının İn Vitro Şartlarda Çimlenmesinde BAP Oranlarının Etkisi

Genel olarak kültür besisi ortamında BAP oranı arttıkça çimlenme oranının azaldığı ve hormon içermeyen yada düşük hormon içeren (0.5-1.0 mg l⁻¹ BAP) MS besisi ortamlarında, çok az sayıda tohumun çimlendiği, çimlenen tohumların da zayıf geliştiği tespit edildi. Bununla birlikte, 2.0 mg l⁻¹ BAP içeren besisi ortamının çimlenme oranı bakımından, test edilen gruplar arasında en iyi olduğu tespit edildi (Resim 6,7,8,9).



Resim 6. Kivi tohumlarının çimlenmesinde 1.0 mg l⁻¹ BAP'lı besisi ortamının etkisi.



Resim 7. Kivi tohumlarının çimlenmesinde 2.0 mg l⁻¹ BAP'lı besisi ortamının etkisi.



Resim 8. Kivi tohumlarının çimlenmesinde 8.0 mg l⁻¹ BAP'lı besisi ortamının etkisi.



Resim 9. Kivi tohumlarının çimlenmesinde hormonsuz besisi ortamının etkisi.

İn vitro koşullarda çimlendirilen kivi sürgünleri, steril kabin içerisinde pens ve bistüri yardımı ile steril filtre kağıtları arasında jelozundan arındırıldı ve 1.0 mg l⁻¹ BAP lı besisi ortamında kültüre alınarak çoğaltıldı (Resim 10). Elde edilen sürgünler, 1.0 mg l⁻¹ NAA bulunan MS besisi ortamında köklendirilerek *in vivo* şartlara adaptasyonu sağlandı [17,18] (Resim 11,12).



Resim 10. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra sürgünlerin proliferasyonuna 1.0 mg l⁻¹ BAP'ın etkisi.



Resim 11. 1.0 mg l⁻¹ NAA'li besi ortamında kültüre alınan kivi sürgünlerinin köklenmiş hali.



Resim 12. Doğal şartlara adapte olmuş Kivi fidelerinin görünüşü.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Virüsten arı stokları üretmek için virüs ile bulaşık olmayan tohumlar, kök stokları olarak kullanılmaktadır [5]. Bu görüşten yola çıkarak, tohumdan çoğaltılan kivi sürgünleri, aşılama çalışmalarında sağlıklı anaç olarak kullanılmak üzere, metod geliştirilmiştir.

Kivinin geleneksel yöntemlerle çimlendirilmesi birçok ön uygulama gerektirir. Tohumlar meyveden, pektinaz ve selüloz enzimlerinin düşük konsantrasyonlarında 7 gün bekletildikten sonra izole edilir. Çimlenmeden önce yaklaşık 1 ay kadar 4 °C de soğuklamaya tabi tutulması gerekir. Soğuklamadan sonra farklı gibberellik asit solüsyonlarıyla muamele edilerek çimlenme iyileştirilir [19]. Oysa yaptığımız çalışmada Kivi (*Actinidia deliciosa*) nin olgun tohumlarını, 30 g/l sakkaroz, ¼ MS ve 2.0 mg l⁻¹ BAP'lı besi ortamında kültüre aldıktan kısa bir süre (3-4 hafta) sonra çimlenme elde edildi. Bu şekilde geleneksel yöntemlere göre çok daha kısa zamanda çimlenmiş tohumların elde edilmesi, hem zaman hemde emek açısından daha sonra yapılacak çalışmalar için avantaj sağlayan bir durumdur.

Mancaleon ve ark. [20], *Actinidia deliciosa* sürgünlerinin *in vitro* ortamda çoğaltılmasında sitokininlerin etkisini araştırmışlar ve eksplantlarının kültür ortamında gelişebilmesi için, MS besisi ortamının mineral elementler bakımından yeterli olduğunu ancak içsel sitokininlerin yeterli olmadığını bildirmişlerdir. Biz de yaptığımız çalışmada kivi tohumlarının hormon içermeyen MS besisi ortamında çok zayıf geliştiğini, BAP içeren, özellikle 2.0 mg l⁻¹ BAP'lı ortamda çimlenmenin çok daha iyi sonuç verdiğini saptadık. Araştırmacının belirttiği gibi, kivi tohumlarının çimlenmesi için besisi ortamına mutlak suretle bir sitokinin ilavesinin gerekliliğini tespit ettik.

Kivi meyvesinin yetiştirilmesi ve toprağa adaptasyonu çok dikkat gerektirir. Çünkü *in vitro* olarak çoğaltılan bitkilerin kökleri ince ve tüsüzdür. Kuvvetli kök yapısına sahip olmadıklarından, toprağa aktarımından kısa bir süre sonra bitkicikler yaşayamaz ve ölürlere [21]. Yaptığımız çalışmada, 1.0 mg l⁻¹ NAA bulunan MS besisi ortamında köklendirilen bitkilerin toprağa aktarımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek, *in vivo* şartlarda yaşaması sağlanmıştır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Warrington I.J., Weston G.C., 1990. Kivifruit science and management. Bennetts Unit. New Zealand.
- [2] Huang H., Ferguson A.R., 2001. Kiwifruit in China, New Zealand. *Journal of Crop and Horticultural Science*, 29 (1); 1-14.
- [3] Yalçın T., Samancı H., Atak A., 1998. Türkiye'de kivi yetiştiriciliğinin durumu, geleceği, potansiyeli ve araştırma öncelikleri. 4. Bağcılık Sempozyumu, 20-23 Ekim 1998, Yalova.
- [4] Mortan J., 1987. Kiwifruit. In fruits of warm climates. Julia F. Mortan, Miami, FL. p.293-300.
- [5] Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S., 2002. Bitki biyoteknolojisi-1, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı yayımları, Konya.
- [6] Harada H., 1975. In vitro organ culture of *Actinidia chinensis* as a technique for vegetative multiplication, *Journal of Horticultural Science*, 50: 81-83.
- [7] Wang J.X., Li S.Z., Li B.W., Ren E.Y., 1982. Propagation of *Actinidia chinensis* by tissue culture, *Liaoning Agricultural Science*, I: 32-4.
- [8] Standardi A., 1983. La 'Micropropagazione' nella moltiplicazione dell' *actinidia*. *Frutticoltura*, 45: 17-22.
- [9] Wessels E., Nell D.D., Van Staden D.F.A., 1984. In vitro propagation of *Actinidia chinensis* PI.Cultivar Hayward. *Deciduous Fruit Grower*, 34: 453-7.
- [10] Monette P.L., 1986. Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 6:73-82.
- [11] Revilla M.A., Rey M.A., Gonzalez M.V., Diaz-Sala C., Rodriguez R., 1992. Micropropagation of kiwi (*Actinidia* spp.), In: Y.P.S Bajaj (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 18. High-Tech and micropropagation II (pp. 399-423). Springer - Verlag, Berlin.
- [12] Standardi A., 1981. Micropropagazione dell' *Actinidia chinensis* Planch mediante coltura 'in vitro' di apici meristemati. *Frutticoltura*, 43: 23-7.

- [13] Velayandom L., Hirsch A.M., Fortune D., (1985). Tissue culture of nodal stem segments of *Actinidia chinensis* (L) Planchon, as a method of micropropagation. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences III-Sciences de la Vie-Life Sciences*, 301: 597- 600.
- [14] Rugini E., Gutierrez-Pesce P., (2003). In S. M. Jain, & K. Ishii (Eds.), *Micropropagation of woody trees and fruits* pp. 647-669. Netherlands: Kluwer.
- [15] Akbaş F., Işıkalın Ç., Namlı S., (2009). "Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 158 (2): 470-475. DOI: 10.1007/s12010-008-8401-2.
- [16] Murashige T., Skoog F., 1962. Arevised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-479.
- [17] Adıyaman F., 2003. Pikan cevizi (*Carya ilinoensis*) ve kivi (*Actinidia deliciosa*)'nin biyoteknolojik yöntemlerle mikropropagasyon yollarının araştırılması, Doktora tezi, D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji anabilim dalı, Diyarbakır.
- [18] Adıyaman Akbaş F., Işıkalın Ç., Namlı S., Başaran D., (2007). "Micropropagation of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)". *International Journal of Agriculture & Biology*, 9(3): 489-493.
- [19] Lawes G.S., Anderson D.R., 1980. Influence of temperature and gibberellic acid on kiwifruit (*Actinidia chinensis*) seed germination, N.Z. *Journal of Experimental Agriculture*, 8: 277-280.
- [20] Moncaleon P., Conol M.J., Feito I., Rodriguez A., Fernandez B., 1999. Cytokinins and mineral nutrition in *Actinidia deliciosa* (kiwi) shoots cultured *in vitro*. *Journal of Plant, Physiology*, Vol, 155, Iss, 4-5, pp 606-612.
- [21] Kumar S., Sharma D.R., 2002. *In vitro* propagation of Kiwifruit. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 77 (5): 503-508.