

***In vitro* Koşullarda Humik Maddelerin Kolza Bitkisinin Fizyolojik Özellikleri, Sürgün Rejenerasyonu ve Antioksidant Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi**

Emine Selcen DARÇIN^{1*} Yusuf KOÇ² Kenan TUNÇ³

¹Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Bilecik

²Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Sakarya

³Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Sakarya

*Sorumlu yazar:

E-posta: selcen.darcin@bilecik.edu.tr

Geliş Tarihi: Nisan 24, 2014

Kabul Tarihi: Haziran 06, 2014

Özet

Bu çalışmada, hem katkı maddesi hem de bitki büyüme düzenleyici olarak seçilen farklı konsantrasyonlardaki potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın kolzanın fizyolojik özellikleri, sürgün rejenerasyonu ve antioksidant enzim aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Steril edilen tohumlar % 3 (w/v) sükröz ve % 0.7 (w/v) agar ile herbiri 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm and 7 ppm konsantrasyonlarında olan potasyum humat, bor humat ve demir humat içeren Murashige and Skoog temel besiyerinde kültüre alınmıştır. Fizyolojik özellikler ve antioksidant enzim aktiviteleri bir haftalık bitkicikler üzerinde gözlenmiştir. 3-4 haftalık bitkiciklerden alınan gövde eksplantları 1 mg⁻¹ 6-benzylaminopurine ve 0,2 mg⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid içeren besiyerinde kültüre alınmıştır. Çalışmanın sonuçları incelendiğinde, bütün humik madde formlarının kolzanın fizyolojik özellikleri üzerinde olumlu etkisi olduğu, antioksidant enzim aktivitesi üzerinde negatif etki olduğu ve sürgün rejenerasyonuna hiç bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Brassica napus ssp. oleifera* L., Humik madde, sürgün rejenerasyonu

The Effects of Humic Substances on Physiological Properties, Shoot Regeneration and Antioxidant Enzymatic Activities *in vitro* Cultured Rapeseed

Abstract

It was investigated the effects of various concentrations of potassium humate, boron humate and iron humate which was selected the additives to basal medium and phytohormones on physiological characteristics, antioxidant enzymatic activities and shoot regeneration rapeseed *in vitro*. Sterilized seeds were cultured on Murashige and Skoog Basal Medium with 3% (w/v) sucrose and 0.7% (w/v) agar containing each of the individual 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm and 7 ppm potassium humate, boron humate and iron humate. Physiological characteristics and antioxidant enzymatic activities were observed from one week old seedlings obtained from the seeds. For observing shoot regeneration capacity, stem segments 3-4 mm in length were excised from 3-4 week old seedlings obtained from the seeds. Stem explants were cultured on Murashige and Skoog Basal Medium with 1 mg⁻¹ 6-benzylaminopurine and 0,2 mg⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid. As a results, it was expressed that all the humate forms had positive effects on physiological parameters, but there were no effect on shoot regeneration. It was observed negative correlation between antioxidant enzymatic activities and increasing doses of all the humate forms.

Key Words: *Brassica napus ssp. oleifera* L., Humic substance, Shoot regeneration

Abbreviations

BAP: 6-benzylaminopurine

CAT: Katalaz

FeH: Demir humat

MS: Murashige and Skoog besiyeri

SOD: Superoksit Dismutaz

BH: Bor humat

EC₅₀: Ortalama Etketif Konsantrasyon (%)

KH: Potasyum humat

NAA: 1-naphthaleneacetic acid

GİRİŞ

İnsanların temel gıda gereksinimlerinden biri olan yağlar, hiç şüphesiz, vücut için öncelikli enerji kaynağı olmaları ve sahip buldukları diğer hayati fonksiyonları nedeni ile günlük diyetle mutlaka alınmaları gerekmektedir. Yağlar orijin itibarıyla hayvansal ve bitkisel olmak üzere; iki kaynaktan sağlanmaktadır [1]. Yağlı tohumlu bitkiler sofralık yağlar, hayvan yemi, biyoyakıt, ilaç yapımı, boya sanayi gibi birçok alanda kullanılmaktadır [2]. Ayçiçeği, mısır, soya gibi yağ bitkilerinin sezon itibarıyla üretimlerinin bulunmadığı ya da yeterli olmadığı koşullarda kolza alternatif bir yağ bitkisi olarak değerlendirilebilir [3]. Kolza çeşitlerinden elde edilen bitkisel yağ, besin değeri ve içeriği bakımından zeytinyağı ve yerfıstığı yağının

kalitesine çok yakındır [2]. Kolza, yağ şalgamı (*B. campestris*; n-10; [AA]) ile lahananın (*B. oleracea*; n=9; [CC]) melezlenmesi ve kromozom sayılarının katlanmasıyla doğada kendiliğinden ortaya çıkmış amphidiploid bir bitkidir. Kolza, Rhoadales takımına ait *Crucifera* familyasına bağlı *Brassica* cinsinden *Brassica napus ssp. oleifera* L. olarak sistematikte yer alır, yazlık ve kışlık çeşitlerinin yanı sıra alternatif (hem yazlık hem de kışlık olarak ekilebilen) çeşitleri de bulunmakta olup tek yıllık otsu bir bitkidir [4]. Kolza tohumu ortalama %38-50 yağ, % 16-24 protein ve % 20 polisakkarit içermektedir [5]. Çok düşük miktarlarda doymuş yağ asidi, oldukça yüksek oranlarda oleik asit (%60) ve linoleik asit (%10) içermektedir [1]. Bunun yanısıra, tohumlarından yağ çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspesinde yüksek oranda

protein bulunduğundan hayvan yemi olarak ve yağının akaryakıt olarak kullanılabilmesi sebebiyle tarımı gittikçe yaygınlaşmakta olan bir bitkidir [1].

Son yıllarda, kolzanın ıslahının ve yetiştiriciliğinin kolaylaştırılabilmesi için araştırmalar biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması üzerine odaklanmaktadır. Ancak, biyoteknolojik yöntemler ile bitki ıslahı için etkili sürgün rejenerasyonu protokollerine ihtiyaç duyulmaktadır. Sürgün rejenerasyon kapasitesi gen aktarım tekniklerinin başarısını etkileyen en temel basamaktır [6]. Sürgün rejenerasyonunun başarısı ise genotip, eksplant tipi, besi yeri çeşidi, bitki büyüme düzenleyicileri, dezenfektan maddeleri, karbon kaynakları ve katkı maddeleri gibi faktörler belirlemektedir [6, 7, 8].

Humik maddeler toprak ve yüzey suları gibi çevresel ortamlarda bulunan ve bitkilerin bozunması sonucu oluşan doğal organik materyal sınıfından, makromoleküler bileşiklerdir[9]. Humik asit ve türevleri, hücre zarının geçirgenliğini artırarak, bitkilerin besin elementlerini almalarını kolaylaştırdığını tespit edilmiştir [10]. Başlıca hümik asit, fulvik asit ve hüminler olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Hümik ve fulvik asitler, bitki ve toprak için gerekli olan besin maddeleri ve elementleri içeren organik kompleks moleküllerdir [11]. Humik maddelerin topraklarda suyun tutulması, drenaj ve havalanma gibi toprakların fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesi ve topraktaki besin elementlerinin yararlı hale getirilmesi gibi kimyasal özellikleri etkilediği bilinmektedir. Ayrıca humik maddeler ağır metallerle birleşerek, ağır metallerin bitkiler tarafından fazla miktarda alınmasını engellemektedir [12]. Olumsuz çevre koşullarından daha az etkilenecek veya bu koşullara toleranslı çeşitler geliştirmenin yanında, bitkilerin ilk gelişme devrelerini hızlandıracak, kök ve topraküstü organlarının daha iyi gelişimini sağlayacak uygulamalar son yıllarda büyük önem kazanmaktadır. Özellikle organik madde fraksiyonlarından olan humik asidin bitki biyokütlesini artırdığı ve bu olumlu etkinin kök gelişiminde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Humik asit bitki gelişimini doğrudan veya dolaylı yoldan etkilemektedir. Doğrudan etki bitki bünyesindeki humik madde bileşenlerinin bitki tarafından alınmasıdır. Dolaylı etki ise sentetik iyon değiştiricilerin yaptığı gibi bitki besin maddelerinin sağlanması ve düzenlenmesidir [13]. Böylece toprağa humik madde uygulanması ile toprağın katyon değişim kapasitesi ve verimliliği artmakla birlikte bitkilerce besin elementlerinin alınabilirliği olumlu yönde etkilenmektedir [14]. Humik maddeler toprakta geniş bir pH aralığında tampon özelliği gösterir ve pek çok mikrobesein elementini bitkiler için alınabilir hale getirir. Ayrıca, humik maddeler, bitkilerin çimlenmesini ve büyümesini uyarıcı olarak bilinirler. Özellikle bitki zarlarının içerisinden geçebilirler, iz elementlerinin bitki kökleri içerisinde taşınmasını kolaylaştırırlar. Humik maddeler bitkilerde büyüme hormonlarına benzer davranışlar sergilerler [15]. Humik bileşiklerin reaktif yan gruplarının iyon değiştirme kapasitelerinden ötürü, bu bileşiklerin yer değiştirme reaksiyonlarıyla pestisitleri bağlama rolünde büyük bir önem taşımaktadır. Humik maddeler pestisitler ve herbisitlerle etkileşip kararlı yapılar oluşturarak onları bitkiler ve yeraltı suları için zararsız hale getirirler [16].

Bu çalışmanın amacı, hem doğal katkı maddesi olarak hem de bitki büyüme düzenleyici olarak bazı humik madde

formlarının değişik konsantrasyonlarda uygulanmasının, kolza bitkisinin fizyolojik gelişimi, antioksidant enzim aktivitesi ve sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini belirlemektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak kışlık PR46W31 çeşidine ait kolza (*Brassica napus* ssp. *oleifera* L.) tohumları kullanılmıştır.

Kolza tohumları %12'lik sodyum hipoklorid ile 15 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra üç kere saf su ile durulanmıştır. Öncelikle sterilize edilen kolza tohumları %50 oranında çimlenmesini inhibe eden EC 50 değerinin belirlenebilmesi için dokuz farklı (0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 25, 50 ppm) dozda potasyum humat ve %3 sukroz, %7 agar içeren Murashige ve Skoog (MS, 1962) [17] besiyerine 20 tohum 3 tekrarlı olarak ekilmiştir ve 7 gün sonunda sonuçlar kaydedilmiştir. Daha sonra, sterilize edilen tohumlar %3 sukroz, %7 agar ile farklı dozlarla demir humat (1 ppm, 3ppm, 5ppm, 7ppm), bor humat (1 ppm, 3ppm, 5ppm, 7ppm) veya potasyum humat (1 ppm, 3ppm, 5ppm, 7ppm) içeren Murashige & Skoog temel besin ortamında çimlendirilmiştir. Hazırlanan ortamlar pH'sı 5,8'e ayarlanarak, 20 dakika 121°C ve 1,1 kg/cm² basınç altında steril edilmiştir. Bütün kültürler 25±1°C'de, 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyotta iklim dolabında büyütülmüştür.

Çimlenme yüzdesi; kök ve gövde uzunluğu; taze ve kuru ağırlık; klorofil ve karetonoid içeriği, toplam protein miktarı ve süperoksid dismutaz ve katalaz antioksidant enzim aktivitelerinin ölçümleri bir haftalık bitki kültürlerinde yapılmıştır. Fidelerin kök ve gövdeleri birleşme yerlerinden jilette kesilerek, uzunlukları milimetrik bir cetvel yardımıyla 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür. Kök boyu ve gövde boyu cm bitki⁻¹ olarak ifade edilmiştir. Toplam taze ağırlıkları (gr bitki⁻¹) 3 tekrarlı olarak tartılmıştır. Daha sonra bitkiler 80°C'ye ayarlanmış etüvde 24 saat bekletilmiş ve tekrar tartılarak kuru ağırlıkları (gr bitki⁻¹) kaydedilmiştir.

Klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve toplam karetonoid miktarı Lichtenthaler (1987)'e göre; yapraklardaki toplam çözünür protein miktarı BSA (bovine serum albumin) kullanılarak hazırlanan standart grafik yardımıyla Bradford (1976)'a göre, süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi Beyer ve Fridovich (1987)'e göre ve katalaz (CAT) aktivitesi Aebi (1984)'e göre spektrofotometrik (SHIMADZU, UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer) olarak belirlenmiştir [18, 19, 20, 21].

Üç haftalık kültürlerden ise gövde eksplantları izole edilerek [6] 0,5 mg/L ile 1 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) ve 0,2 mg/L ile 0,4 mg/L 1-naphthaleneacetic acid (NAA) hormon kombinasyonlarını içeren MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Yaklaşık 3 hafta sonra gövde eksplantlarından sürgünler gelişmiştir. Bu süreçte kallus oluşumu yüzdesi, kallus ağırlığı, rejenerasyon oranı ve petride gelişen toplam sürgün sayısı gözlemlenmiştir.

Bütün deneyler tesadüf parselleri deneme desenine göre, üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Her tekerrür içerisinde 10 adet eksplant bulunan 10 X 15 cm'lik petrilere yerleştirilmiştir. Sonuçlar, SPSS 16.00 for Windows programında analiz edilmiş ve ortalamalar "Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi" ile karşılaştırılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

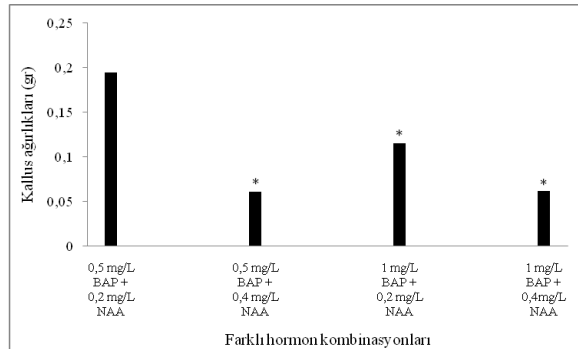
Optimizasyon çalışmalarına ait bulgular

Uygun humat dozunu belirlemek amacıyla ön çalışma olarak potasyum humat (0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 25, 50 ppm) seçilmiştir. Tohumların %50 sinin çimlenmesini inhibe eden konsantrasyon üst doz olarak çalışmamızda üst limit olarak kabul edilmiştir. 7 ppm potasyum humat %50 çimlenme ile EC50 değerine sahip olmuştur (Tablo 1).

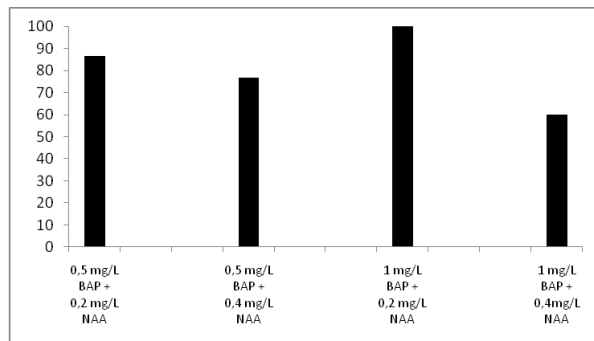
Tablo 1. Ec 50 değerinin belirlenmesi

Kontrol	92,5
1 ppm KH	87,5
3 ppm KH	85
5 ppm KH	90
7 ppm KH	50
10 ppm KH	50
15 ppm KH	47,5
25 ppm KH	45
50 ppm KH	45

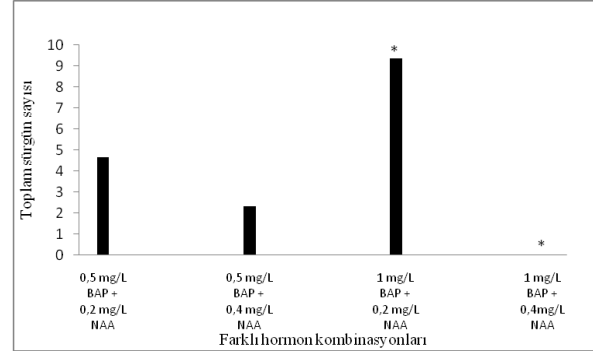
Şekil 1'e göre en iyi kallus oluşum oranı (%100), sürgün oranı (%23.33), petride gelişen toplam sürgün sayısı (9,3), eksplant başına sürgün sayısı (0,93) 1 mg/L BAP ve 0,2 mg/L NAA kombinasyonundan elde edilmiştir. en yüksek kallus ağırlığı ise 0,1935 g ile 0,5 mg/L BAP ve 0,2 mg/L NAA kombinasyonunda gözlenmiştir.



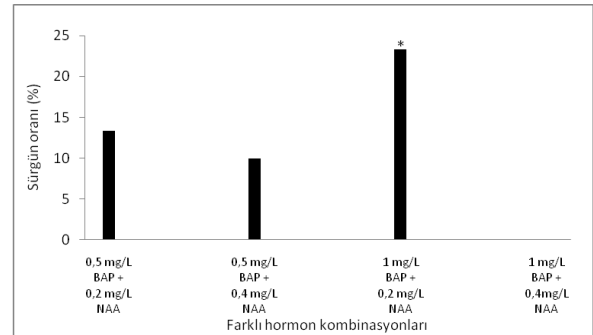
Şekil 1.1. Farklı humat dozlarının kallus ağırlığı (gram) üzerine etkisi



Şekil 1.2. Farklı humat dozlarının kallus oluşum oranı üzerine etkisi



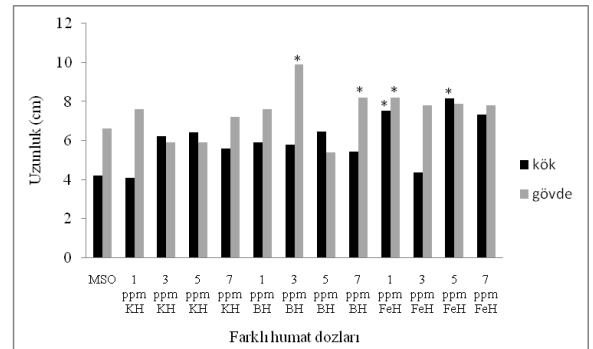
Şekil 1.3. Farklı humat dozlarının toplam sürgün sayısı üzerine etkisi



Şekil 1.4. Farklı humat dozlarının sürgün oranı üzerine etkisi

Potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın kök ve gövde üzerine etkisi

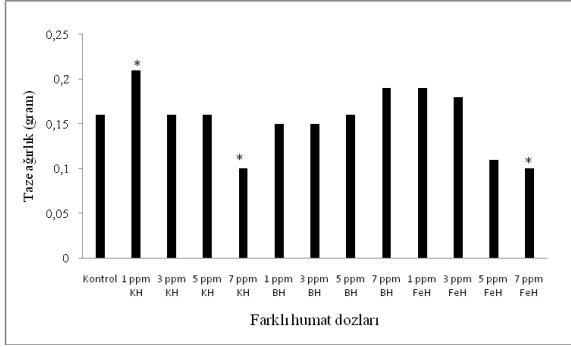
Kök boyunda kontrole göre 1 ve 5 ppm FeH de artış meydana gelmiştir. Diğer uygulamalarda anlamlı bir değişim olmamıştır. Grup içinde de uygulanan humatların anlamlı değişikliğe neden olmamıştır. Gövde boyunda ise kontrole göre 3 ve 7 ppm BH ve 1 ppm FeH dozlarında artış olmuştur. Grup içindedeki KH ve FeH in anlamlı bir değişimi olmamıştır, 3 ppm BH gövde boyunu artırırken 5 ppm BH azaltmıştır (Şekil 2).



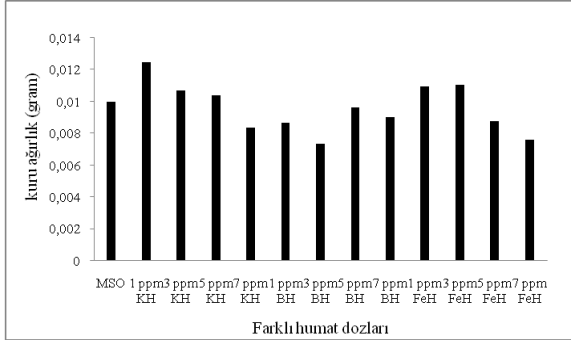
Şekil 2. Farklı humat dozlarının kök ve gövde uzunlukları

Potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın taze ve kuru ağırlık üzerine etkisi

Taze ağırlık, kuru ağırlıkta grup içi ve gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir. Taze ağırlıkta kontrole göre 1 ppm KH artışa neden olmuş 7 ppm KH ve 7 ppm FeH da ise taze ağırlığı düşürmüştür. BH dozları taze ağırlığa etki etmemiştir. Kuru ağırlıkta hiçbir uygulamada anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Gruplar içinde ise 7 ppm KH ve 7 ppm FeH kuru ağırlığı azaltmış BH etkilememiştir (Şekil 3).



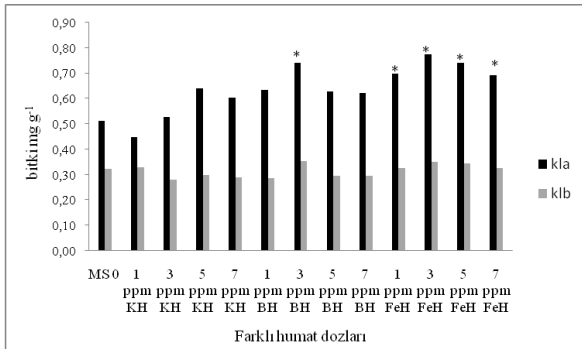
Şekil 3.1. Farklı humat dozlarının taze ağırlık üzerine etkisi



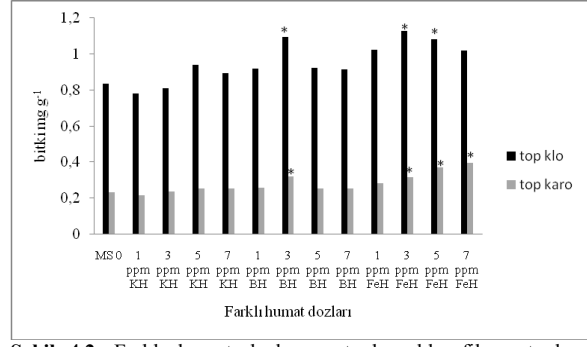
Şekil 3.2. Farklı humat dozlarının kuru ağırlık üzerine etkisi

Potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın fotosentetik pigmentler üzerine etkisi

Klorofil a, toplam klorofil, toplam karotenoid miktarlarında, katalaz ve sod aktivitesinde grup içi ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar varken klorofil b miktarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Klorofil a miktarında kontrole göre 3 ppm BH dozunda artış olmuştur. 1, 3, 5 ve 7 ppm FeH dozlarında ise artış olmuştur. Grup içinde ise 5 ve 7 ppm KH artış sağlamış diğer gruplar kendi içinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmemiştir. Klorofil b miktarında kontrole göre bütün uygulamalarda anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Gruplar içinde ise 3 ppm BH dozunda azalma meydana gelmiştir. Toplam klorofil miktarında kontrole göre 3 ppm BH dozunda artış meydana gelmiş, 3 ve 5 ppm FeH dozunda artış meydana gelmiştir. Gruplar kendi içinde anlamlı herhangi bir değişime neden olmamıştır. Toplam karotenoid miktarında kontrole göre 3 ppm BH de artış olmuştur. 3, 5 ve 7 ppm FeH dozlarında artış meydana gelmiştir. Gruplar kendi içinde 5 ve 7 ppm lik FeH dozu toplam karotenoid miktarını artırarak etkili olmuş diğer uygulamalarda anlamlı bir değişim olmamıştır (Şekil 4).



Şekil 4.1. Farklı humat dozlarının klorofil a ve klorofil b miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.2. Farklı humat dozlarının toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı üzerine etkisi

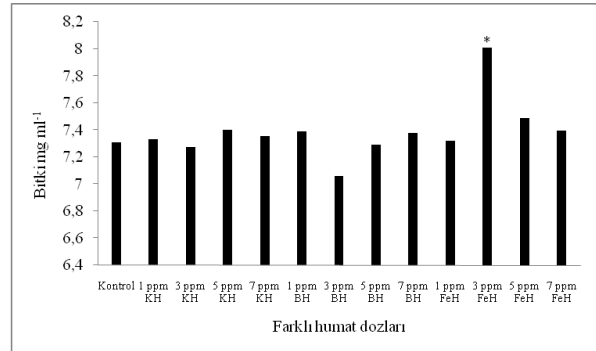
Potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın toplam çözümlü protein miktarı, SOD ve CAT enzimleri üzerine etkisi

Toplam çözümlü protein miktarında kontrole göre 3 ppm FeH dozunda artış meydana gelmiştir. Gruplar içinde ise 3 ppm BH olumsuz etki yapmış ve 3 ppm FeH olumlu etki yapmıştır. Katalaz aktivitesinde kontrole göre 5 ve 7 ppm BH ve 7 ppm FeH dozlarında artış olmuştur. Grup içinde de 5 ve 7 ppm BH dozları ve 7 ppm FeH dozu aktiviteyi artırmıştır.

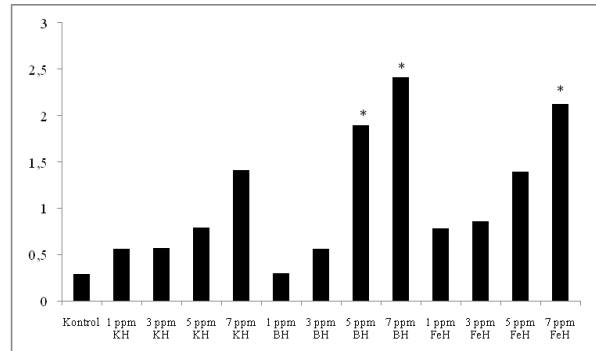
SOD aktivitesinde kontrole göre 7 ppm KH artış olmuştur. 1, 3 ve 7 ppm BH dozlarında artış olmuştur. Ayrıca 5 ve 7 ppm FeH dozlarında da sod aktivitesi artmıştır. Gruplar kendi içinde 7 ppm KH da artış, 5 ppm BH da azalış, 5 ve 7 ppm FeH dozlarında artış meydana gelmiştir (Şekil 5).

Potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın kallus oranı üzerine etkisi

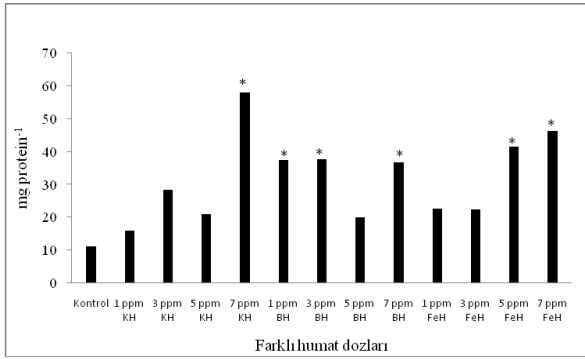
Bütün humat konsantrasyonlarında %100 kallus oranı elde edilmiştir (Şekil 6).



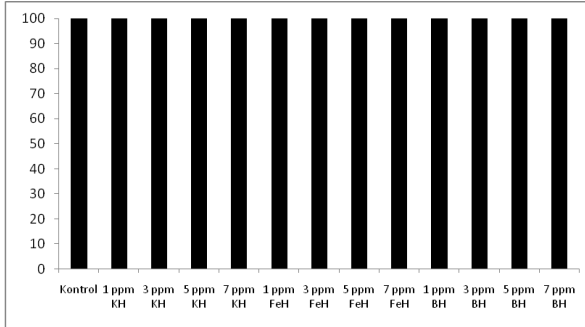
Şekil 5.1. Farklı humat dozlarının çözümlü protein miktarı üzerine etkisi



Şekil 5.2. Farklı humat dozlarının katalaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 5.3. Farklı humat dozlarının SOD aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 6. Farklı humat dozlarının kallus oranı üzerine etkisi

Potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın kallus ağırlığı üzerine etkisi

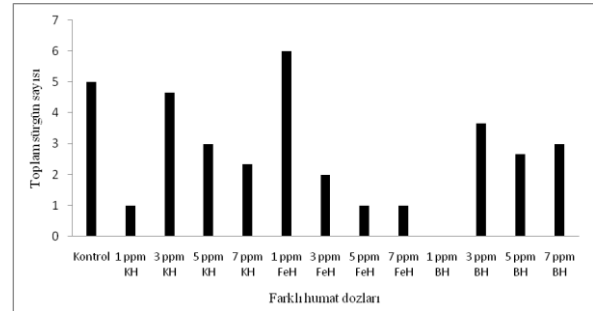
Kontrolde 0,080663 gr , 1ppm KH ortamında 0,03435 gr , 3 ppm KH ortamında 0,113106 gr, 5 ppm KH ortamında 0,09385 gr ve 7 ppm KH ortamında 0,05048 gr kallus ağırlıkları bulunmuştur. Kontrol ortamına göre 3 ppm ve 5 ppm potasyum humat ortamlarında kallus ağırlıklarında artış meydana gelmiş ayrıca 1 ppm potasyum humat ortamında azalma olmuştur. 1 ppm bor humat ortamında ortalama 0,050687 gr , 3 ppm BH ortamında 0,053477 gr , 5 ppm BH ortamında 0,08165 gr ve 7 ppm BH ortamında 0,08702 gr kallus ağırlıkları elde edilmiştir. Sonuç olarak 7 ppm bor humat ortamında kontrole göre artış meydana gelmiş 1 ve 3 ppm bor humat dozlarında azalma meydana gelmiştir. 1 ppm demir humat ortamında 0,104553 gr , 3 ppm demir humat ortamında 0,11203 gr , 5 ppm demir humat ortamında 0,078433 ve 7 ppm demir humat ortamında 0,07961 gr kallus ağırlığı elde edilmiştir. Kontrolde göre 1 ve 3 ppm demir humat dozlarında artış meydana gelmiştir. En yüksek ortalama kallus ağırlığı 3 ppm potasyum humat ortamında meydana gelmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Farklı humat dozlarının kallus ağırlığı üzerine etkisi

Potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın petride gelişen toplam sürgün sayısı üzerine etkisi

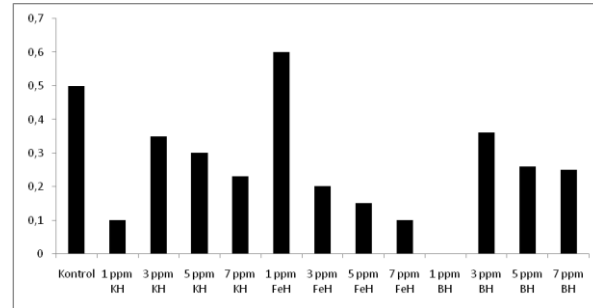
Kolza bitkisinin gövde eksplantlarından elde edilen petride gelişen toplam sürgün rejenerasyonu kontrolde toplam 15 adet, 1 ppm KH ortamında 3 adet, 3 ppm KH ortamında 14 adet, 5 ppm KH ortamında 9 adet, 7 ppm KH ortamında ise 7 adet sürgün elde edilmiştir. 1 ppm bor humat dozunda sürgün elde edilmemiştir. 3 ppm bor humat dozunda 11 adet , 5 ppm bor humat dozunda 8 adet ve 7 ppm bor humat dozunda 9 adet toplam sürgün sayısı elde edilmiştir. 1 ppm FeH ortamında 14 adet toplam sürgün elde edilmiştir. 3 ppm FeH ortamında 6 , 5 ppm FeH ortamında 8 , 7 ppm FeH ortamında ise 8 adet toplam sürgün sayısı elde edilmiştir. Sonuç olarak petri başına en yüksek sürgün rejenerasyonu 11 adet ile 1 ppm demir humat ortamında bulunmuştur (Şekil 8).



Şekil 8. Farklı humat dozlarının petride gelişen toplam sürgün sayısı üzerine etkisi

Potasyum humat, bor humat ve demir humat'ın eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi

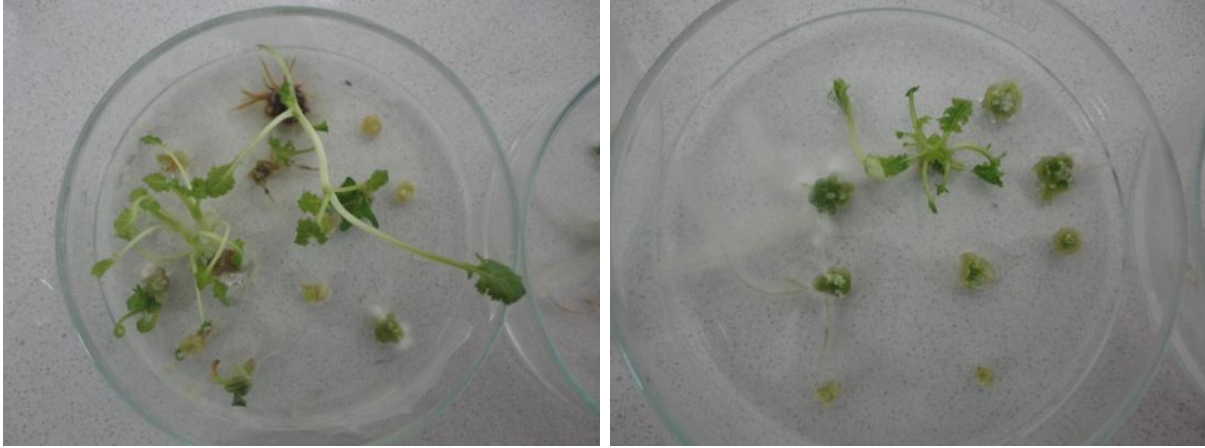
En yüksek eksplant başına sürgün oranı 1 ppm demir humat ortamında 0.6 adet olarak bulunmuştur. Kontrol ortamında ise bu oran 0.5 adet olarak bulunmuştur (Şekil 9).



Şekil 9. Farklı humat dozlarının eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi

SONUÇ VE TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmaların sonucunda, farklı humat ve dozlarına göre bitkilerin bazı fizyolojik parametreler üzerine olumlu etkiler yaptığı, sürgün rejenerasyonu üzerine ise hiç bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Ayrıca, 5 ppm ve 7 ppm dozlarındaki bütün humat uygulamaları antioksidant aktivitesini yükselmesine sebep olduğu ve strese yol açtığı gözlenmiştir. Obsuvan ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada *in vitro* koşullarda 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarının MS besiyeri düzeyinin 1/4 oranına indirildiğinde patlıcan bitkisinin gelişiminde olumlu etkileri bulunduğu ifade edilmiştir [22]. *In vitro* koşullarda 25ppm, 50 ppm ve 100 ppm potasyum içeren



a. 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA

b. 1 ppm FeH + 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA

Şekil 10. (a) 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA ve (b) 1 ppm FeH + 1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA kombinasyonlarını içeren MS besiyerinde gövde eksplantlarından elde edilen sürgün rejenerasyonu

tam doz MS besi yeri, 1/2 doz MS besi yeri ve 1/4 doz MS besi yerinde kolzanın *Licosmos* [23] ve *Gladyatör* [24] çeşitleri üzerine etkisinin incelendiği iki ayrı çalışmada ise genellikle humat dozu arttıkça kök uzunluğunun arttığı ancak gövde anlamlı bir etkisi olmadığı, MS tam doz kullanıldığında taze ve kuru ağırlığın arttığı, sadece 100 ppm'de 1/2 doz MS besi yeri ve 1/4 doz MS taze ve kuru ağırlığın düştüğü söylenmiştir. Genellikle tüm doz MS besiyerlerinde humat miktarı arttıkça glutasyon redüktaz aktivitesinin arttığı ve benzer sonuçların süperoksit dismutaz aktivitesi için de görüldüğü bildirilmiştir. Öte yandan, Swift ve Posner (1972), alkali koşullarda humik asit oksidasyonunu inceledikleri bir çalışmada humatların hormon benzeri bir etki yaparak solunum, fotosentez, protein sentezi, antioksidantlar ve çeşitli enzimleri etkileyerek bitki büyümesi ve verimliliğini arttırdığını belirtmişlerdir [25]. Diğer yapılan çalışmalar incelendiğinde de; laboratuvar, tarla veya sera koşullarında genellikle nötr veya alkali ortamlarda yetiştirilen bitkilerin fizyolojik parametrelerinin olumlu etkilendiği, antioksidant enzim aktivitelerinin düştüğü ve hatta stres altında bırakılan bitkilerin gelişimlerinin düşük düzeyde olumsuz olarak etkilendikleri bildirilmiştir [13,15, 26,27,28,29,30,31]. *In vitro* koşullarda yapılan bu çalışmada pH 5.6-5.8'e ayarlandığı için asidik ortamda humik maddelerin etkilerini istenilen düzeyde ortaya koyamadıklarını düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma 2012-02-20-016 kodu ile Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Sayın Prof. Dr. Ahmet TUTAR (Saü Fef Kimya Bölümü Öğretim Üyesi) ve Mümin DİZMAN' a humik asit sentezi ile ilgili katkılarından dolayı çok teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

[1] Epirtürk, B., Bazı kolza (*Brassica napus* ssp. *oleifera* L.) çeşitlerinde farklı ekim zamanı uygulamalarının verim ve kalite özelliklerine etkisinin araştırılması, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Tekirdağ, 2009.

[2] Gıdık, B., Trakya bölgesinde yetişen kanola (kolza) bitkisinde genetik çeşitliliğin moleküler işaretleyicilerle

karakterizasyonu, Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Çorum, 2012.

[3] Gültaş, H., Kolza (*Brassica napus* L.) bitkisinin toprak-su-atmosfer ilişkilerinin belirlenmesi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Tekirdağ, 2013.

[4] Darçın, E.S., Bazı kolza (*Brassica napus* L.) çeşitlerinde doku kültürü yöntemiyle bitki rejenerasyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2003.

[5] Anğın., N. ve Vurarak ,Y., çukurova bölgesine uygun kolza (*Brassica napus* L.) çeşitlerinin belirlenmesi, Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 5(1): 90-92, 2012.

[6] Darçın, E.S., Ö. Kolsarıcı, and M. Yıldız, Establishment of efficient regeneration protocol for three rapeseed cultivars. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(1): p. 21-26, 2014.

[7] Kamal, G.B, K.G. Illich, A. Asadollah (2007) Effects of genotype explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot in vitro organogenesis. *Afr. J. Biotechnol.*, 6 (7): 861-867.

[8] Rezaeieh K.A.P., P. Vaziri, Safran (*Crocus sativus* L.)'in Farklı Eksplantlarından

in vitro Koşullarda Bitki Çoğaltımı Hakkında Derleme ve Beklentiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (2): 29-31, 2012.

[9] Ergin, H.G., Tuzlu koşullarda yetiştirilen arpa fidelerinin bazı morfolojik ve anatomik parametrelerine humik asitin etkileri, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2014.

[10] Kaptan, M.A ve Aydın, M., Humik asidin pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) gelişimi ve kalite özellikleri üzerine etkileri. *SAÜ Fen Edebiyat Dergisi*, 1:291-298, 2012.

[11] Kocaman, A., Farklı su streslerinde yetiştirilen buğday bitkisinin (*Triticum aestivum* L.) soğuğa dayanımını artırmak amacıyla uygulanan humik asit, salisik asit ve absisik asit uygulamalarının antioksidan enzimler ve verim unsurları üzerine etkisi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Erzurum, 2010.

[12] Öztürk, E., Farklı dozlarda humik asit ve kadmiyum uygulamalarının hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde kadmiyum birikimine ve fide gelişimine etkileri, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Van, 2011.

- [13] Kolsarıcı,Ö, Kaya, M.D., Day, S., İpek, A., Uranbey S., Farklı humik asit dozlarının ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L.) çıkış ve fide gelişimi üzerine etkileri. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 18(2):151-155, 2005.
- [14]Stevenson, F.J., Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions,. Vol. 2nd edition. 1994: John Wiley and Sons.
- [15]Erdoğan, O., Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) fidelerinde nikel toksitesinin humik asit ile azaltılması üzerine bir araştırma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 2005.
- [16]Helal, A.A.I., D. M., Khalifa, S. M., Aly, H. F., Interaction of Pesticides with Humic Compounds and Their Metal Complexes. *Radiochemistry*, 48:419,2006.
- [17] Murashige, T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497. 1962
- [18] Lichtenthaler, H. K., Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in Enzymology*, 148:350-382, 1987.
- [19] Bradford, M.M., "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976
- [20] Beyer, W. F. and Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161:559-566.
- [21] Aebi, H., Catalase *in vitro* assay methods. *Methods Enzymol.*, 105: 121-126, 1984.
- [22] Obsuwan, K., Namohote, Sanmanee, N., Panishkan, K., and Dharmvanij, S., Effect of various cocentrations of humic acid on growth and development of egg plant seedling in tissue cultures at low nutrient level. *World Acad. Sci.Engg. Technol.* 80: 276-278
- [23] Koç, Y., Yıldız, M., Ergin, N. ve Darçın, E. S., *In Vitro* Koşullarda Farklı Humik Madde Konsantrasyonları İlavesinin Bitki Besin Maddesi Noksanlığının Giderilmesinin Kolza Bitkisinin Fizyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi *Ulusal Botanik Bitki Bilimi Kongresi* p. 92. 25-28 Ekim , Antalya , 2014
- [24] Koç, Y., Darçın, E. S., Yıldız, M. ve Ergin, N. Effects of Potassium Humate and Different Concentration of MS Medium in *Brassica napus* L. cv. Licosmos on Shoot Regeneration and Some Physiological Parameters. 3rd International molecular biology and biotechnology congress. Bosnia and Herzegovina. 2014
- [25] Swift, R. S., Posner, A.M., Autoxidation of humic acid under alkaline conditions. *European Journal of Soil Science*, . 23(4): p. 381-393. 1972
- [26] R.M. Atiyeh, S. L., C.A. Edwards , N.Q. Arancon, J.D. Metzger ,, The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth *Bioresource Technology* 84(1): p. 7-14. 2002
- [27] Norman Q. Arancon, C. A. E., Stephen Lee, Robert Byrne , , Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth *European Journal of Soil Biology* 42: p. 65-69. 2006
- [28] Ferrara, G. P., A.; Simeone, P.; Ferrara, E.: , Preliminary Study on the Effects of Foliar Applications of Humic Acids on Italia Table Grape. XXXth. World Congress of Vine and Wine, . 2007
- [29] Karaman, M. R., Turan, M., Yıldırım, E., Güneş, A., Esringü, A., Demirtaş, A., Gürsoy, A., Dizman, M., Tutar, A., ve Kılınç, H., Ca ve B-humat bileşiklerinin domates (*Lycopersicon esculentum* L.) bitkisinin verim parametreleri ile klorofil ve stoma geçirgenliği üzerine etkilerinin belirlenmesi. SAÜ Fen Edebiyat Dergisi 1. 2012.
- [30] Patil, R.B., Chavan, S. B., More, A.D., Shinde, J.B., Effect of potassium humate on biochemical aspects of wheat. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences* 3(1): p. 89-91. 2013.
- [31] Doğru, A., Darçın, E. S., Tutar, A., Dizman, M. ve Koç, Y., Potasyum humatın mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin büyümesi üzerine etkileri. SAÜ Fen Edebiyat Dergisi 1: p. 83-93. 2012.