

## ASMADA (*Vitis vinifera* L.) GÖVDE VE YAPRAK SAPI EKSPLANTLARINDAN ADVENTİF SÜRGÜN OLUŞUMU ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA\*

Zehra BABALIK Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR<sup>a</sup>  
Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri, 32260 Isparta

Kabul Tarihi: 05 Aralık 2008

### Özet

Bu araştırmada bitkisel materyal olarak Kalecik karası üzüm çeşidine ait *in vitro* bitkilerden alınan gövde ve yaprak sapı eksplantlarının *in vitro* rejenerasyonları üzerine eksplant tipi, besin ortamları ile ışıklandırma süresinin etkileri incelenmiştir. Eksplantlar, farklı konsantrasyonlarda BAP, 2,4-D, zeatin, IBA ve kazein hidrolizat içeren MS ve NN ortamlarına dikildikten sonra aydınlık ve karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır. Araştırma sonucunda kallus oluşturan eksplant oranı, direkt ve indirekt adventif sürgün oluşumu, adventif sürgünlerin bitkiye dönüşüm oranı eksplant tipine, besin ortamlarına ve ışıklandırma süresine göre değişmiştir. Buna göre gövde eksplantları direkt ve indirekt adventif sürgün oluşumu bakımından en iyi sonuçları verirken; ortamlar içinde kallus oluşumu en fazla 0,2 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D+2,5 mg/l IBA içeren MS ve yalnızca 2 mg/l 2,4-D içeren NN ortamlarından, direkt adventif sürgün gelişimi de 2 mg/l zeatin içeren MS ortamı ile 2 mg/l BAP içeren NN ortamında, indirekt adventif sürgün gelişimi ise 0,2 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D+1 g/l kazein hidrolizat katkılı MS ortamı ile 2 mg/l zeatin NN ortamından elde edildiği belirlenmiştir. Karanlık kültür koşulları kallus oluşumu üzerinde olumlu etkiler de bulunurken; 16/8 sa ışıklandırma ise direkt-indirekt adventif sürgün gelişimini artırdığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Asma (*Vitis vinifera* L.), eksplant tipi, besin ortamı, kültür koşulları, *in vitro* rejenerasyon

### A Study on Adventitious Shoot Formation from Stem and Petiole Explants of Grape (*Vitis vinifera* L.)

#### Abstract

In this study, the effects of explant type, nutrient media and culture conditions on *in vitro* regeneration of stem and petiole explants taken from *in vitro* plants of Kalecik karası were investigated. The explants were planted on MS and NN medium supplemented with different concentrations of BAP, 2,4-D, zeatin, IBA and casein hydrolyzate and then they were cultured in dark or light conditions. As a result of this research, formation of callus, direct and indirect adventitious shoot formation were obtained in different ratio according to explant type, nutrient media and culture conditions. Stem explants gave the best results for the direct and indirect adventitious shoot formation. While formation of callus were obtained from MS medium added 0.2 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D+2.5 mg/l IBA and NN medium added 2 mg/l 2,4-D the highest direct adventitious shoot formation were obtained from MS medium added 2 mg/l zeatin and NN medium added 2 mg/l BAP and indirect adventitious shoot formation were obtained from MS medium added 0.2 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D+1 g/l casein hydrolyzate and NN medium contained 2 mg/l zeatin. Dark condition was showed positive effect on formation of callus. On the other hand, 16/8 h light regime increased direct and indirect adventitious shoot formation.

**Key Words:** Grapevine (*Vitis vinifera* L.), explant type, nutrient media, culture conditions, *in vitro* regeneration

### 1. Giriş

Asma dünyada yetiştiriciliği yapılan önemli türler arasında yer almaktadır. Geçmiş yüzyıllardan günümüze kadar *Vitis* cinsinin bazı türlerine ait pek çok çeşidin

ticari olarak üretimi yapılmaktadır. Ancak değişen pazar isteklerine uygun verim ve kalitesi yüksek, çeşitli stres faktörlerine dayanıklı ya da toleranslı çeşitlerin elde

\* Bu araştırma Zehra Babalık'ın yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

<sup>a</sup> İletişim: N. Göktürk Baydar, e-Posta: nilgun@ziraat.sdu.edu.tr

edilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, asmanın uzun generasyon süresi ve yüksek heterozigotik yapısı, geleneksel ıslah çalışmaları ile amaca uygun çeşitlerin elde edilmesini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, bitkilerde biyoteknolojik metotların geliştirilmesi ve bunların ıslah amaçlı kullanılması, geleneksel ıslah çalışmalarında karşılaşılan zorlukların ortadan kaldırılması için büyük önem taşımaktadır.

Bitkilerde uygulanan biyoteknolojik metotlar içinde doku kültürü çalışmaları büyük yer tutmaktadır. Hızlı çoğaltma, virüs ve benzeri etmenlerden arındırılmış bitki elde etmek, genetik materyal muhafazası, sekonder metabolit üretimi gibi birçok alanda kullanılan doku kültürü, ıslah amaçlı kullanım alanları da son derece fazla olan bir teknikler bütünüdür. Bitkilerin farklı kısımlarından alınan eksplantların kallus ya da adventif sürgün oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi, hem doğrudan kallus kültürü yoluyla yeni genotiplerin elde edilmesinde, hem de gen transferi çalışmaları için son derece güvenilir birer kaynak oluşturma özelliklerinden dolayı ıslah çalışmalarında büyük önem taşımaktadırlar. Asmada eksplant kaynağı olarak, sürgün ucu (Thomas, 2000; Matsumoto ve Sakai, 2003) anter (Nakajima ve Matsuta 2003; Kikkert ve ark., 2005), ovul (Emershad ve Ramming, 1994), meristem (Göktürk Baydar, 1997), sülük (Salunkhe ve ark. 1997), olgunlaşmış ve olgunlaşmamış zigotik embriyo (Gök Tangolar, 2002)'nun yanı sıra yaprak ayası ve sapı (Nakano ve ark., 1997; Zhu ve ark., 1997; Jayasankar ve ark., 1999) ile boğum arası parçacıkları (Thomas, 2001) doku kültürü çalışmalarında kullanılabilir. Ancak genotip ve eksplant tipine göre elde edilen başarının çok değişken olması nedeniyle, ıslah çalışmalarına başlamadan önce mutlaka kullanılabilir özellikte bir rejenerasyon sisteminin oluşturulması gerekmektedir. Bu çalışmada, bitkisel materyal olarak ülkemizin en önemli kırmızı şaraplık üzüm çeşidi olan Kalecik karası üzüm çeşidine ait gövde ve yaprak sapı eksplantları kullanılmış olup, söz konusu eksplantların *in vitro* rejenerasyonları üzerine eksplant tipi,

besin ortamı ile ışıklandırma süresinin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi doku kültürü laboratuvarında yürütülen bu çalışmada, bitkisel materyal olarak yerli şaraplık üzüm çeşitlerimizden Kalecik karası üzüm çeşidine ait *in vitro* sürgünlerin gövde ve yaprak sapı eksplantları kullanılmıştır. *In vitro* bitkicikler ise Kalecik karası'na ait 1 yaşlı dalların sürdürülmesi ile elde edilen sürgünler üzerindeki sürgün uçları ile yaklaşık 5 mm uzunluğundaki tek gözlü boğumların kültüre alınması ile elde edilmiştir.

### 2.1. In Vitro Bitkiciklerin Elde Edilmesi

Gövde ve yaprak sapı eksplantlarının *in vitro* rejenerasyon kapasitelerini belirlemek amacıyla yapılmış olan bu çalışmada, öncelikle bu eksplantların alınacağı *in vitro* bitkiciklerin elde edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla Kalecik karası üzüm çeşidine ait kış dinlenmesini tamamlamış 1 yaşlı dallardan hazırlanan çelikler iklim odasına alınarak su içinde sürdürülmüşlerdir. Taze sürgünlerden alınan sürgün uçları ile üzerinde tek göz bulunduran boğumlar 1-2 damla %0,01'lik tween 20 maddesi ilave edilmiş %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisi kullanılarak 15 dakika dezenfekte edilmiştir. Dezenfeksiyon sonrası materyaller, her biri en az 5 dakika olmak üzere 3 kez steril saf su ile durulanmışlardır. Dezenfeksiyon işleminin ardından sürgün uçları, meristem ile 3-4 yaprak taslağı; tek gözlü boğumlar da yaklaşık 5 mm uzunluğunda olacak şekilde hazırlanmışlardır. İzole edilen bu sürgün uçları ve tek boğumlu mini çelikler, içerisinde 10 ml 0,5 mg/l GA<sub>3</sub> (Gibberellik asit) ve 2,5 mg/l BAP (Benzilamino purin) ilave edilmiş Murashige ve Skoog (MS) (Murashige ve Skoog, 1962) steril besin ortamı bulunan 15x1.5 cm boyutlarındaki cam deney tüplerinde kültüre alınmışlardır. Sürgün uçları ve boğumlu mini çelikler bu ortamda 2000–2200 lux ışık yoğunluğunda,

16 sa ışıklandırma rejiminde ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta kültüre alınmışlardır. İlk dikim ortamında 4 haftalık gelişmelerini tamamlayan sürgün uçları ve tek gözlü mini çeliklerin dip kısımlarından 1–2 mm uzunluğunda kesimler yapılarak, 0,5 mg/l IBA (İndol butirik asit) ve 1,0 mg/l BAP katkılı MS besin ortamından 100 ml içeren 250 ml'lik erlenlerde kültüre alınarak, deneme için yeterli sayıda sürgün oluşana kadar 4'er hafta aralıklarla alt kültüre alınmışlardır. Sürgünler yeterli büyüklüğe ulaştıktan sonra köklenmeleri için 5 mg/l IBA içeren MS besin ortamına transfer edilmişlerdir. Daha sonra bu *in vitro* bitkiciklerden alınan gövde ve yaprak sapı eksplantları daha sonraki aşamalarda kullanılmışlardır.

## 2.2. Gövde ve Yaprak Sapı Eksplantlarının Dikimi

Sürgün ucu ve tek gözlü mini çeliklerin kültürü ile elde edilen bitkiciklerden alınan gövde ve yaprak sapı eksplantları 2-3 mm büyüklüğünde kesilerek dikime hazırlanmışlardır. Dikimde içerikleri Çizelge 1'de görülen MS ve NN (Nitsch ve Nitsch, 1969) ortamlarının BAP, zeatin, 2,4-D (2,4, diklor fenoksi asetik asit) IBA ve Kazein hidrolizat'lı kombinasyonları kullanılmıştır. Tüm ortamlara 30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar katılarak, pH 5.8'e ayarlanmıştır. Ortamlar, otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de ve 1 atm basınçta 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Dikim, gövde ve yaprak sapı eksplantları ayrı ayrı olmak üzere her bir petriye 25 eksplant olacak şekilde yapılmış ve uygulama başına 2 petri ve 50

eksplant kullanılmıştır. 9 cm çapındaki petriyer içersine dikilen gövde ve yaprak sapı eksplantları sıcaklığı  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  olarak ayarlanmış iklim odalarında iki farklı ışıklandırma rejiminde tutulmuşlardır. Bu amaçla, kültürlerden bir kısmı karanlık, bir kısmı da gün uzunluğu 16 sa ve ışık şiddeti 2000-2200 lux olarak ayarlanmış iklim odalarında kültüre alınmışlardır. Besin ortamlarındaki 4 haftalık gelişmelerini tamamlayan kültürler besin içerikleri aynı olan taze ortamlara transfer edilmişlerdir. Kültür başlangıcından 8 hafta sonra gözlemler alınmıştır. Bu amaçla, kallus oluşturan eksplant oranı (%), direkt ve indirekt adventif sürgün oluşumu (%) ile adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%) belirlenmiştir. Adventif sürgünlerin tam bitkiye dönüşümlerinin sağlanması amacıyla, sürgünler 5 mg/l IBA içeren MS besin ortamına transfer edilerek köklenmeleri teşvik edilmiştir.

## 3. Bulgular

Kalecik karası üzüm çeşidine ait *in vitro* bitkilerden alınan yaprak sapı ve gövde eksplantlarının besin ortamlarına ve kültüre alındıkları ışıklandırma sürelerine ait bulgular Çizelge 2 de sunulmuştur.

Çizelge 2'de de görüldüğü üzere kallus oluşumu, adventif sürgün oluşumu ve adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı, eksplant kaynağına, besin ortamına ve ışıklandırma koşullarına göre farklılık göstermiştir. Gövde eksplantlarından en yüksek kallus oluşum oranı %95'lik bir oranla MS 8 karanlık uygulamasından elde

Çizelge 1. Gövde ve Yaprak Sapı Eksplantlarının Dikildiği Besin Ortamları

BESİN ORTAMLARI MS/NN	BAP (mg/l)	ZEATİN (mg/l)	2,4-D (mg/l)	IBA (mg/l)	KAZEİN HİDROLİZAT (g/l)	AGAR (g/l)	SAKKAROZ (g/l)
1	2	-	-	-	-	7	30
2	-	2	-	-	-	7	30
3	1	-	1	-	-	7	30
4	1	-	2	-	-	7	30
5	1	-	1	-	1	7	30
6	1	-	2	-	1	7	30
7	0,2	-	1	2,5	1	7	30
8	0,2	-	1	2,5	-	7	30
9	0,2	-	1	-	1	7	30
10	-	-	2	-	-	7	30

edilirken, NN ortamlarında bu oran en yüksek %52,08 ile NN 10 aydınlık uygulamasından elde edilmiştir. Hem MS 2'nin hem de NN 6'nın aydınlık ve karanlık uygulamalarından herhangi bir kallus elde edilememiştir. Direkt adventif sürgün oluşumu bakımından en iyi sonuç %33,30 ile MS 1'in karanlık ve %13,95 ile NN 1'in aydınlık uygulamasından elde edilmiştir. Yine gövde eksplantı MS 9 karanlık ortamında %46,60 ile indirekt adventif

sürgün oluştururken, NN ortamında ise bu oran en fazla %14,63 ile NN 2 aydınlık ortamından sağlanmıştır. Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı bakımından MS 2 karanlık (%92,30) ve NN 1 aydınlık (%83,33) ortamları en başarılı ortamlar olmuştur. Bunun yanında MS 5, MS 6, MS 7, MS 8, MS 10, NN 4, NN 5, NN 6, ortamlarından herhangi bir adventif sürgün elde edilememiştir.

**Çizelge 2. Gövde ve Yaprak Sapı Eksplantlarının Farklı Büyüme Düzenleyici Madde İçeren MS ve NN Ortamları ile Farklı Kültür Koşullarında Göstermiş Oldukları Gelişme Durumları**

Ortam no	Kültür koşulları	GÖVDE				YAPRAK SAPI			
		Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Adventif sürgün oluşumu (%)		Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%)	Kallus oluşturan eksplant oranı (%)	Adventif sürgün oluşumu (%)		Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı (%)
			Direkt	İndirekt			Direkt	İndirekt	
MS-1	Aydınlık	10,63	0	27,65	23,00	0	1,92	0	100
	Karanlık	40,00	33,30	0	73,30	33,30	2,00	0	100
MS-2	Aydınlık	0	32,5	0	76,92	40,00	0	2,22	0
	Karanlık	0	28,80	0	92,30	22,20	2,00	0	100
MS-3	Aydınlık	35,55	4,44	6,66	40,00	91,11	0	0	0
	Karanlık	73,91	0	0	0	69,81	0	1,75	0
MS-4	Aydınlık	45,65	13,04	4,34	75,00	36,95	2,17	4,34	33,33
	Karanlık	62,50	0	5,00	20,00	100	0	0	0
MS-5	Aydınlık	24,39	0	0	0	74,41	0	6,97	0
	Karanlık	21,62	0	0	0	86,36	0	2,27	0
MS-6	Aydınlık	7,50	0	0	0	40,00	0	0	0
	Karanlık	84,00	0	0	0	97,56	0	2,43	0
MS-7	Aydınlık	42,85	0	0	0	57,14	2,38	0	100
	Karanlık	94,59	0	0	0	76,92	0	0	0
MS-8	Aydınlık	57,50	0	0	0	61,11	0	0	0
	Karanlık	95,00	0	0	0	84,61	0	0	0
MS-9	Aydınlık	48,83	11,62	2,32	66,66	45,00	0	5,00	0
	Karanlık	46,60	0	46,60	28,57	39,47	0	0	0
MS-10	Aydınlık	89,74	0	2,56	0	50,00	0	0	0
	Karanlık	70,00	0	0	0	56,41	0	0	0
NN-1	Aydınlık	4,65	13,95	0	83,33	0	2,43	2,43	50,00
	Karanlık	28,20	10,25	2,25	60,00	0	0	0	0
NN -2	Aydınlık	19,51	2,43	14,63	14,28	23,80	0	0	0
	Karanlık	5,00	0	10	0	23,80	0	0	0
NN -3	Aydınlık	17,07	7,31	4,87	40,00	5,12	0	0	0
	Karanlık	10,00	2,50	2,50	100	7,89	2,63	0	100
NN -4	Aydınlık	28,57	0	0	0	9,75	0	0	0
	Karanlık	11,11	0	0	0	0	0	0	0
NN -5	Aydınlık	20,93	0	0	0	25,49	0	0	0
	Karanlık	2,50	0	0	0	0	0	0	0
NN -6	Aydınlık	0	0	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	0	0	0	0	0	0	0	0
NN -7	Aydınlık	6,25	8,33	2,08	60,00	0	0	0	0
	Karanlık	0	0	0	0	9,52	0	0	0
NN -8	Aydınlık	15,55	0	0	0	0	0	0	0
	Karanlık	8,10	2,70	0	100	0	0	0	0
NN -9	Aydınlık	22,72	6,81	0	100	0	0	0	0
	Karanlık	17,07	0	0	0	0	0	0	0
NN -10	Aydınlık	52,08	6,25	4,16	60,00	45,00	0	0	0
	Karanlık	6,67	0	0	0	0	0	0	0

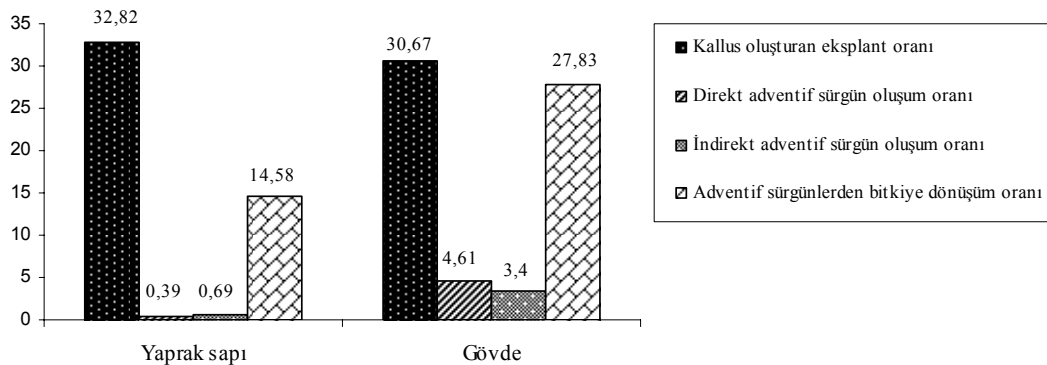
Yaprak sapı eksplantında kallus oluşturan eksplant oranı bakımından MS 6 karanlık (%97,56) ve NN 10 aydınlık (%45,00) ortamları başarılı bulunmuş olup, NN 1, NN 6 ve NN 8 ortamlarından ise hiç kallus elde edilememiştir. MS 7 aydınlık ve NN 3 karanlık ortamları direkt adventif sürgün oluşumu bakımından, MS 5 (%6,97) ve NN 1 (%2,43) aydınlık indirekt adventif sürgün oluşumu bakımından diğer ortamlara göre daha yüksek oranlarda indirekt adventif sürgün oluşturması nedeniyle başarılı bulunmuştur. MS 1 aydınlık-karanlık, MS 2 karanlık, MS 7 aydınlık ve NN 3 karanlık ortamlarında %100'lük bir oranla adventif sürgünlerin bitkiye dönüşümü gerçekleşmiştir. Bunun yanı sıra NN 2, NN 4, NN 5, NN 6, NN 7, NN 8, NN 9 ve NN 10 ortamlarında hiç adventif sürgün oluşmamıştır.

Eksplant tipinin kallus oluşturan eksplant oranı, direkt ve indirekt adventif sürgün oluşum oranı ile adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranları üzerine etkilerinin de incelendiği araştırmada, kallus oluşturan eksplant oranı bakımından en iyi sonuç %32,82 ile yaprak sapı eksplantından elde edilirken, direkt ve indirekt adventif sürgün oluşumu ile adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranının ise en fazla gövde eksplantında olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).

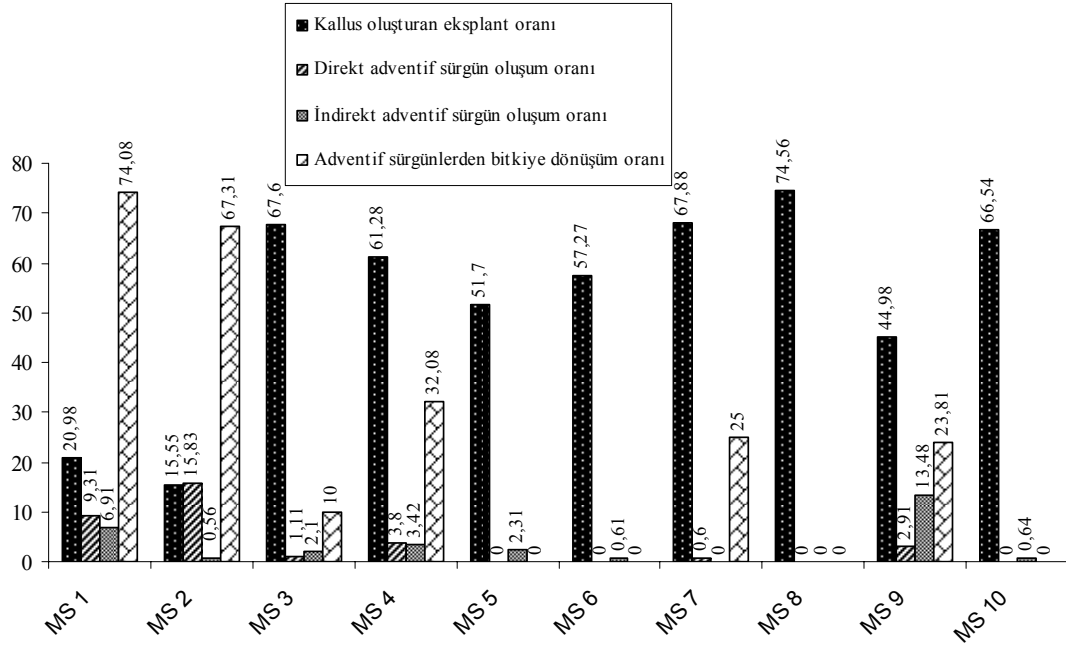
Kültür süresince yapılan incelemeler sonucunda, besin ortamlarının (MS ve NN) kallus oluşturan eksplant oranı, direkt ve indirekt adventif sürgün oluşum oranı

adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı üzerine etkileri Şekil 2 ve 3'de sunulmuştur. Buna göre, MS besin ortamları kallus oluşturan eksplant oranı bakımından incelendiğinde en iyi sonuç MS 8 ortamından elde edilmiştir. Direkt adventif sürgün oluşumu bakımından MS 2, indirekt adventif sürgün oluşumu bakımından MS 9, adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı ise MS 1 başarılı bulunmuştur. Temel besin ortamı olarak NN'in kullanıldığı besin ortamlarında ise (%25,94) NN 10 ortamında en fazla kallus oluşumu gözlemlenirken, direkt adventif sürgün oluşumu en fazla NN 1 de, indirekt adventif sürgün oluşumu NN 2 den sağlanmıştır. NN 6 ortamı ise incelenen kriterler bakımından hiçbir gelişmenin elde edilmediği ortam olarak tespit edilmiştir. Adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı ise NN 3 ortamında en yüksek sonucu vermiştir.

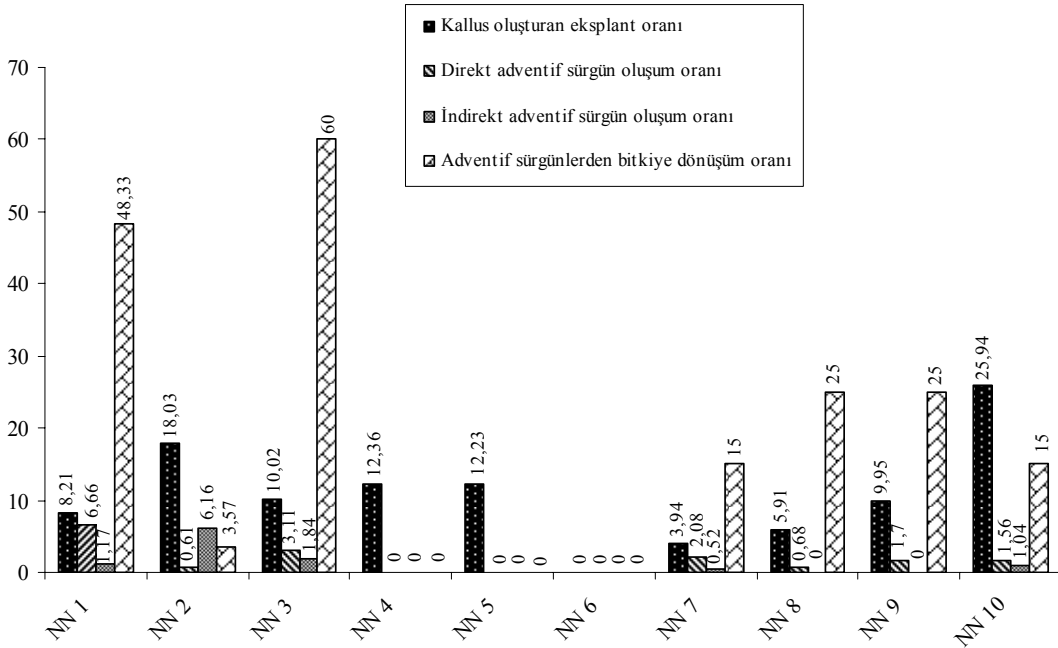
Tamamen karanlık koşullar ile gün uzunluğu 16 sa ve ışıklanma şiddeti 2000-2200 lux olan aydınlık koşullarda kültüre alınan eksplantlarda, araştırmada incelenen kriterler bakımından elde edilen sonuçlar Şekil 4'de sunulmuştur. Buna göre kallus oluşturan eksplant oranı en fazla %34,62 ile sürekli karanlık koşullarda kültür edilen eksplantlardan elde edilmiştir. Direkt ve indirekt adventif sürgün oluşum oranı ile adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı bakımından ise 16 sa aydınlık 8 sa karanlık koşullarda kültür edilen eksplantların daha yüksek oranlar gösterdiği saptanmıştır.



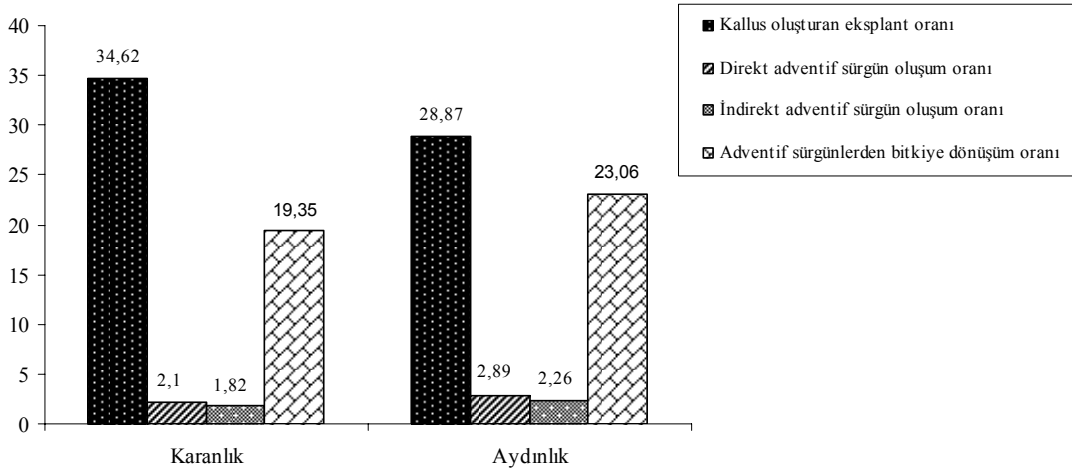
Şekil 1. Eksplant Tipinin Kallus Oluşturan Eksplant Oranı, Direkt ve İndirekt Adventif Sürgün Oluşum Oranı ile Adventif Sürgünlerden Bitkiye Dönüşüm Oranları Üzerine Etkileri



Şekil 2. MS Besin Ortamlarının Kallus Oluşturan Eksplant Oranı, Direkt ve İndirekt Adventif Sürgün Oluşum Oranı ile Adventif Sürgünlerden Bitkiye Dönüşüm Oranı Üzerine Etkileri



Şekil 3. NN Besin Ortamlarının Kallus Oluşturan Eksplant Oranı, Direkt ve İndirekt Adventif Sürgün Oluşum Oranı ile Adventif Sürgünlerden Bitkiye Dönüşüm Oranı Üzerine Etkileri



Şekil 4. Işıklanma Rejimlerinin Kallus Oluşturan Eksplant Oranı, Direkt ve İndirekt Adventif Sürgün Oluşum Oranı ile Adventif Sürgünlerden Bitkiye Dönüşüm Oranı Üzerine Etkisi

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Asmada farklı eksplantların *in vitro* rejenerasyonlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, bitkisel materyal olarak Kalecik karası şaraplık üzüm çeşidine ait *in vitro* bitkilerden elde edilen yaprak sapı ve gövde eksplantları kullanılmıştır. Araştırma, eksplant tipleri, besin ortamları, büyümeyi düzenleyici maddelerin tip ve konsantrasyonu ile kültür koşullarının, *in vitro*'da kallus oluşturan eksplant oranı, adventif sürgün oluşum oranları ve adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranları üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada incelenen kriterlerin eksplant tiplerine göre büyük ölçüde değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir. Kültüre alınan eksplant tipine göre *in vitro*'da elde edilen başarının değiştiği daha önce bu alanda yapılan araştırmalar ile de belirlenmiştir (Stamp ve ark., 1990a; Mhatre ve ark., 2000; Göktürk Baydar ve Çetin, 2003; Jayasankar ve ark., 2003). Araştırmada kallus oluşturan eksplant oranı bakımından en yüksek değerler yaprak sapı eksplantlarından elde edilirken; Cheng ve Reisch (1989), Göktürk Baydar (2000), Gök Tangolar (2002) ve Göktürk Baydar ve Çetin (2003) tarafından yapılan araştırmalarda da yaprak sapı eksplantlarının yaprak ayalarına göre daha başarılı sonuçlar

verdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, direkt ve indirekt adventif oluşumu ve adventif sürgünlerden bitkiye dönüşüm oranı bakımından gövde eksplantlarının daha iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır.

Eksplant tiplerinin yanı sıra eksplantların alındıkları ana bitkilerin yetiştiği ortam şartları da eksplantların *in vitro* rejenerasyon kapasiteleri üzerine oldukça etkili olmaktadır. *In vitro*'da yetişen bitkilerden alınan eksplantların çok daha başarılı olduklarının belirlenmesi üzerine, çalışmada kontrollü koşullarda yetişen bitkilerden alınan eksplantlar kullanılmıştır. Nitekim *in vivo* ve *in vitro*'da yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantları kullanan Clog ve ark. (1990) da *in vitro*'da yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantların *in vitro* koşullarda daha iyi rejenerasyonu belirttiği ve bunun nedeninin de *in vivo*'da yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantların yüzey sterilizasyonuna tabi tutulması ve doku zararlanmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Benzer sonuçlar, Gök Tangolar (2002) tarafından da tespit edilmiştir.

Besin ortamları ve besin ortamlarına katılan büyümeyi düzenleyici maddelerin tip ve konsantrasyonlarının yaprak sapı ve gövde eksplantlarının *in vitro* rejenerasyon yeteneklerine olan etkilerinin de incelendiği çalışmada, elde edilen bulguların besin ortamlarına ve kullanılan büyüme

düzenleyici madde tip ve konsantrasyonlarına göre değiştiği belirlenmiştir. Bu amaçla MS ve NN olmak üzere iki farklı temel besin ortamının her biri için 10'ar tane olmak üzere farklı tip ve konsantrasyonda büyümeyi düzenleyici madde içeren toplam 20 farklı besin ortamı kullanılmıştır. Araştırma sonucunda eksplantların gelişme durumları, kullanılan besin ortamlarına göre değişmiştir. Eksplant tiplerine göre değişmekle birlikte, eksplantlar kültüre alındıkları bazı ortamlarda herhangi bir gelişme gösteremezken, bazı ortamlarda ise dikimi takip eden ilk 20 gün içerisinde kuruyarak canlılıklarını yitirmişlerdir. Diğer taraftan canlılıklarını sürdüren eksplantlarda ise, 4 haftalık gelişme sonunda adventif sürgün ya da kallus oluşumu gözlenmiştir. Besin ortamlarının içeriğine göre elde edilen kallusların renk, yapı ve görünüşlerinde de farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Kallus oluşturan eksplant oranı ile adventif sürgün oluşum oranı bakımından MS besin ortamı daha iyi sonuç vermiştir. Benzer şekilde Gök Tangolar (2002), adventif göz oluşumu üzerine MS besin ortamının NN ve B5 ortamlarına göre daha başarılı sonuçlar verdiğini tespit etmiştir. Kullanılan besin ortamlarının *in vitro* kültürde sonucu etkileyen en önemli faktörlerden birisi olduğu daha önce Matsuta ve Hirabayashi (1989), Göktürk Baydar (2000), Göktürk Baydar ve Çetin (2003) ve Bayır ve ark. (2004) tarafından da belirtilmiştir.

Besin ortamları içerisine konulan büyümeyi düzenleyici maddelerin tip ve konsantrasyonları da kültürün başarısını etkileyen faktörler içerisinde yer almaktadır. Bu çalışmada BAP, 2,4-D, zeatin, kazein hidrolizat ve IBA'nın farklı konsantrasyonları denenmiş olup, bu maddelerin eksplantların gelişimi üzerine etkilerinin oldukça değişken olduğu belirlenmiştir. Örneğin kallus oluşum oranı bakımından BAP ve 2,4-D içeren 4 no'lu MS ortamı ile yalnızca zeatin içeren 2 no'lu NN ortamı iyi sonuçlar verirken, adventif sürgün oluşumu bakımından en iyi sonuçlar yalnızca zeatin içeren 2 no'lu MS ile BAP, 2,4-D ve kazein hidrolizat içeren 9 no'lu MS ortamından ve yalnızca BAP içeren 1 no'lu NN ortamından elde edilmiştir. Büyümeyi

düzenleyici maddelerin eksplantların *in vitro* gelişmelerine olan etkileri üzerine araştırma yapan Goebel Tourand ve ark. (1993) çalışmalarında zeatin ve BAP'ın embriyo morfolojisinin gelişmesini teşvik ettiğini, aynı zamanda bu maddelerin anormal oluşum oranını artırdığını ve bitkiye dönüşüm oranının artmasında da etkisiz olduğunu belirlemişlerdir. Yine bir diğer araştırmada Stamp ve ark. (1990b), adventif sürgün oluşumu bakımından en iyi sonuçları 2 mg/l BAP içeren ortamlardan elde edildiğini belirlemişlerdir. Matsuta ve Hirabayashi (1989), Perrin ve ark. (2001), Martinelli ve ark. (2003), Leal ve ark. (2004), Morgana ve ark. (2004) ile Carimi ve ark. (2005) da araştırmalarında farklı büyümeyi düzenleyici maddeler içeren besin ortamlarını kullanmışlar, bu maddelerin eksplantların *in vitro* gelişmelerinde oldukça önemli olduklarını ve kültürde eksplant gelişimlerinin yönünü belirlediklerini vurgulamışlardır.

Araştırmada karanlık ve aydınlık olmak üzere farklı iki kültür koşulu denenmiştir. Direkt ve indirekt adventif sürgün oluşum oranı bakımından aydınlıkta kültüre alınan eksplantlarda daha yüksek sonuçlar elde edilirken, kallus oluşturan eksplant oranı bakımından ise karanlık koşullar daha olumlu olup, benzer şekilde Gök Tangolar (2002) da 41 B asma anacına ait yaprak sapı eksplantlarından en yüksek kallus oluşturan eksplant oranlarını karanlıkta kültüre aldıkları eksplantlardan elde ettiklerini belirtmiştir.

Asmada farklı eksplantların *in vitro* rejenerasyon yeteneklerinin belirlenmesi üzerine gerçekleştirilen bu proje sonucunda eksplant tipi, besin ortamları ve bu ortamlara ilave edilen büyümeyi düzenleyici maddelerin tip ve konsantrasyonları ile kültür koşullarına bağlı olmak üzere kallus oluşumu ile direkt ve indirekt olmak üzere adventif sürgün oluşumu gözlenmiştir. Araştırmamızda adventif sürgün gelişimi ile bitki oluşumu gerçekleşmiş olup, bu tip rejenerasyon da moleküler genetik metotlarının ıslah çalışmalarında başarılı bir şekilde uygulanabilmesi bakımından önem taşımaktadır. Çünkü bu çalışmalarda başarı her şeyden önce ıslah materyali olarak kullanılan bu bitki parçacıklarının *in vitro*



koşullarda tam bitkiye dönüşümlerinin sağlanması ile mümkün olabilmektedir.

## Kaynaklar

- Bayır A., Uzun, H. İ. ve Elidemir, A.Y., 2004. Effects of 2,4-D, Kinetin and BAP Combinations on Callus Formation and Organogenesis in *Vitis*. The 14th FESPB Congress August 23-27, 2004, Cracow/Poland. Acta Physiologiae Plantarum, 26(3), 255.
- Carimi, F., Barizza, E., Gardiman, M. and Schiavo, F.L., 2005. Somatic Embryogenesis from Stigmas and Styles of Grapevine. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 41(3), 249-252.
- Cheng, Z.M. and Reisch, B.I., 1989. Shoot Regeneration from Petioles and Leaves of *Vitis labruscana* Catawba. *Plant Cell Reports*, 8(7), 403-406.
- Clog, E., Bass, P. and Walter, B., 1990. Plant Regeneration by Organogenesis in *Vitis* Rootstock Species. *Plant Cell Reports*, 8(12), 726-728.
- Goebel Tourand, I., Mauro, M.C., Sossountzov, L., Miginiac, E. and Deloire, A., 1993. Arrest of Somatic Embryo Development in Grapevine: Histological Characterization and The Effect of ABA, BAP and Zeatin in Stimulating Plantlet Development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 91-103.
- Emershad, R.L. and Ramming, D.W., 1994. Somatic Embryogenesis and Plant Development from Immature Zygotic Embryos of Seedless Grapes (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 14(1), 6-12.
- Göktürk Baydar, N., 1997. Bağcılıkta In Vitro Mikroaşılama Tekniği ile Çoğaltma Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 99 s., Ankara.
- Göktürk Baydar, N., 2000. Asmada (*Vitis spp.*) Yapraklardan Adventif Sürgün Oluşumu Üzerine Bir Araştırma. *Türk J. Biol.*, 24, 645-656.
- Göktürk Baydar, N. ve Çetin, S., 2003. Asma Yaprak Eksplantlarının *In Vitro* Gelişmeleri Üzerine Genotip, Eksplant Tipi ve Besin Ortamlarının Etkileri. 13. Biyoteknoloji Kongresi Bildiriler Kitabı, 99-104, Çanakkale.
- Gök Tangolar, S. 2002. Asmalarda Somatik Embriyogenesis ve Organogenesis Yoluyla Bitki Elde Edilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 165 s., Adana.
- Jayasankar, S., Gray, D.J. and Litz R.Z., 1999. High Efficiency Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Suspension Cultures of Grapevine. *Plant Cell Reports*, 18, 533-537.
- Jayasankar, S., Bondada, B.R., Zhijian, L. and Gray, D.J., 2003. Comparative Anatomy and Morphology of *Vitis vinifera* (*Vitaceae*) Somatic Embryos from Solid-and Liquid Culture Derived Proembryogenic Masses. *American Journal of Botany*, 90 (7), 973-979.
- Kikkert, J.R., Striem, M.J., Vidal, J.R., Wallace, P.G., Barnard, J. and Reisch, B.I., 2005. Long Term Study of Somatic Embryogenesis from Anthers and Ovaries of 12 Grapevine (*Vitis spp.*) Genotypes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 41(3), 232-239.
- Leal, F., Pinto-Carnide, O., Guedes-Pinto, H. and Pais, M.S., 2004. Embryogenesis and Plant Regeneration in *Vitis vinifera* L. by Anther Culture. *ISHS Acta Horticulturae* 652, I. International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research, Lisbon, Portugal.
- Martinelli, L., Gribaudo, I., Semenzato, M. and Poletti, V., 2003. Ovary as Valuable Explant for Somatic Embryogenesis Induction in Grapes (*Vitis spp.*). *ISHS Acta Horticulturae* 603, VIII. International Conference on Grape Genetics and Breeding, 2(111), Kecskemet, Hungary.
- Matsuta, N. and Hirabayashi, T., 1989. Embryogenic Cell Lines from Somatic Embryos of Grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 7, 684-681.
- Matsumoto, T. and Sakai, A., 2003. cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro grown grape (*Vitis*) by a two step vitrification protocol. *Euphytica*, 131, 299-304.
- Mhatre, M. and Salunkhe, C.K., Rao, P.S., 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L. Towards an Improved Protocol. *Scientia Horticulturae*, 84, 357-363.
- Morgana, C., Di Lorenzo, R. and Carimi, F., 2004. Somatic Embryogenesis of *Vitis vinifera* L. (cv. Sagraone) from Stigma and Style Culture. *Vitis Journal of Grapevine Research*, 43(4), 169-173.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. Arevised Medium for Rapid Growth Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-479.
- Nakajima, I. and Matsuta, N., 2003. Somatic Embryogenesis from Filaments of *Vitis vinifera* L. and *Vitis labruscana* Bailey. *Vitis*, 42 (1), 53-54.
- Nakano, M., Sakakibara, T., Watanabe, Y. and Mii, M., 1997. Establishment of Embryogenic Cultures in Several Cultivars of *Vitis vinifera* and *V. x labruscana*. *Vitis*, 36(3), 141-145.
- Nitsch, J. and Nitsch, C., 1969. Haploid Plants from Pollen Grains. *Science*, 163, 85-87.
- Perrin, M., Martin D. and Joly D., Demangeat, G., This, P., Masson, J.E., 2001. Medium-Dependent Response of Grapevine Somatic Embryogenic Cells. *Plant Science*, 161, 107-116.
- Salunkhe, C.K., Rao, P.S. and Mhatre, M., 1997. Induction of Somatic Embryogenesis and Plantlets in Tendrils of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Reports*, 17, 65-67.
- Stamp, J.A., Colby, S.M. and Meredith, C.P., 1990a. Improved Shoot Organogenesis from Leaves of Grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115(6), 1038-1042.
- Stamp, J.A., Colby, S.M. and Meredith, C.P., 1990b. Direct Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Leaves of Grape (*Vitis spp.*).

*Asmada (Vitis vinifera L.) Gövde ve Yaprak Sapı Eksplantlarından Adventif Sürgün Oluşumu Üzerine Bir Araştırma*

- Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 22, 127-133.
- Thomas, P., 2000. Microcutting leaf area, weight and position on the stock shoot influence root vigour, shoot growth and incidence of shoot tip necrosis in grape plantlets in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 61, 189-198.
- Thomas, P. 2001. Leaf number and position effects on the survival and performance of grape microcuttings in vitro, and the sensitivity of the cut nodal region to the medium. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 65, 129-139.
- Zhu, Y.M., Hoshiro, Y., Nakano, M., Takahashi, E. and Mii, M., 1997. Highyl Efficient System of Plant Regeneration from Protoplasts of Grapevine (Vitis vinifera L. ) Through Somatic Embryogenesis by Using Embryogenic Callus Culture and Activated Charcoal. Plant Science, 123, 151-157.