

BAZI ASMA (*Vitis vinifera* L.) ÇEŞİT ve ANAÇ KLONLARININ TERMOTERAPİ ve MERİSTEM KÜLTÜRÜ İLE VİRÜSLERDEN ARINDIRILMASI

Onur ERGÖNÜL*, Lerzan ÖZTÜRK

Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Tekirdağ

*Corresponding author: e-mail: onur.ergonul@gthb.gov.tr

Alınış (Received): 08 Ekim 2014, Kabul Ediliş (Accepted): 14 Ocak 2016, Basım (Published): Mart 2016

Özet: Bağ alanları ve toplam üzüm üretimi bakımından dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer alan Türkiye, birim alandan elde edilen üzüm miktarı göz önüne alındığında istenilen düzeyde bulunmamaktadır. Bu durumun en önemli nedenlerinin başında, üzüm üretiminin temel materyali olan fidanın üretimi sırasında ülkemizde genellikle kalite özellikleri belli olmayan, hastalık ve zararlılarla ilgili durumu dikkate alınmayan materyallerin kullanılması gelmektedir. Fidan üretim sürecinde, bilinen herhangi bir kültürel veya kimyasal mücadelesi olmayan bitki patojeni virüsler, diğer hastalık ve zararlılar arasında ön planda bulunmaktadır. Bağcılıkta fidan üretiminde kullanılacak olan baz materyallerin virüslerden arındırılması işlemi termoterapi ve beraberinde meristem kültürü uygulamaları ile mümkün olmaktadır. Bu çalışmada ülkemiz için ekonomik önemi bulunan 14 asma çeşit (*Vitis vinifera* L.) ve 6 anacına ait klonlar kullanılarak Avrupa Birliği ülkeleri ve ülkemiz sertifikasyon sisteminde belirlenmiş olan virüslerden ve asma patojeni *Agrobacterium vitis*'ten, termoterapi ve meristem kültürü yöntemleri ile arındırma yapılmıştır. Arındırma işlemleri sonucunda çalışılan asma çeşit ve anaç klonlarından 93 bitki elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meristem kültürü, termoterapi, virüs, asma, arındırma, tel sera.

Purification of Some Grape Cultivar (*Vitis vinifera* L.) and Rootstock Clones Eliminated from Viruses with Thermotherapy and Meristem Culture

Abstract: Turkey, one of the few important countries in the world concerning the total area of the vineyards and grape production is not in a desired level considering the amount of grape yield per unit area. The use of materials of unknown quality and whose disease and pest related conditions are not taken into account in sapling production, which is the basic material of grape production, is the main cause of this fact. Plant pathogen viruses, for which no cultural or chemical fight against are unknown, are more important than other disease and pest organisms during sapling production processes. Elimination of the viruses from the base materials used in sapling production in viticulture is only possible with thermotherapy and meristem culture. In this study, the clones of fourteen grape varieties (*Vitis vinifera* L.) and six rootstocks that have economic importance for our country were used to purify from *Agrobacterium vitis* and viruses specified in the certification system of our country and European Union countries using thermotherapy and meristem culture methods. 93 plants were obtained at the end of purification processes of the studied clones grape cultivars and rootstocks.

Key words: Meristem culture, thermotherapy, virus, grapevine, purification, screen house.

Giriş

Türkiye, dünyada bağcılık yapılan en önemli ülkelerden birisidir. Buna karşın birim alandan elde edilen üzüm üretimi dikkate alındığında 6880 kg/ha verimle 45'inci sırada yer almaktadır (Anonim 2005) ve bizim gibi sofralık ve kurutmalık üzüm üretimi açısından önde gelen ülkelerde verim daha yüksek değerlerdedir. Bu verim düşüklüğünün en önemli nedenlerinden birisi, bağcılığın temel materyali olarak kalite özellikleri ile hastalık ve zararlı durumu dikkate alınmaksızın üretilen fidanların bağ tesisinde kullanılmasıdır. Bu nedenle 1979 yılından itibaren ülke genelinde ilgili Enstitü ve Üniversitelerde başlatılan klon seleksiyonu projeleri (Tablo 1) ile günümüze kadar Türkiye'de yetiştirilen ve ekonomik öneme sahip bir çok çeşit ve anaçta klon seleksiyonu

çalışmaları tamamlanmış, üstün özelliklere sahip klonlar seçilmiştir (Tablo 2).

Ülkemizin yıllık asma fidanı ihtiyacı değişik kaynaklara göre 5 milyon ile 30 milyon arasında değişmektedir. Bu üretim bağcılık yönünden dünyanın en ileri ülkelerinde olduğu gibi seçilmiş klon materyalinden yapılmalıdır. Ancak, bu seçilmiş materyallerin sağlıklı olup olmadığı kontrol edilmeden yapılan üretimlerde verim ve kalite açısından artışlar sağlansa da, genetik üstünlüklerinden kaynaklanan gerçek performanslarının ortaya çıkması mümkün olmayacaktır. Bu nedenle, çalışma kapsamında seçilen klonlar Avrupa Birliği ülkelerinde ve ülkemiz sertifikasyon sisteminde

Tablo 1. Klon seleksiyonu tamamlanan çeşit ve klon sayıları (Söylemezoğlu ve ark. 2015).

Kurum	Üzüm Çeşidi Sayısı	Klon Sayısı	Asma Anacı Sayısı	Asma Klonu Sayısı
Manisa Bağcılık Aİ	11	29	2	4
Tekirdağ Bağcılık Aİ	15	49	5	16
Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri MAE	9	21	-	-
Erzincan Bahçe Kültürleri Aİ	1	6	-	-
Ankara Üniversitesi	1	7	-	-
Toplam	37	112	7	20

belirlenmiş olan virüslerden (Arabis mosaic nepovirus, Grapevine fanleaf nepovirus, Grapevine fleck virus, Grapevine leafroll closterovirus 1,-2,-3,-6,-7, Grapevine virus A, Raspberry ringspot nepovirus, Strawberry latent ringspot nepovirus, Tomato black ring nepovirus) ve *Agrobacterium vitis* Ophel and Kerr 1990 yönünden arındırılarak temiz materyaller elde edilmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışma, ülkemizde üzüm üretimi açısından ekonomik öneme sahip olan ve Tablo 2'de belirtilen 14 üzüm çeşidi ile 6 Amerikan asma anacının toplam 60 klonu üzerinde yürütülmüştür. Testlemeler ile makro ve mikro çoğaltımda kullanılan materyallerinin tümü Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü bünyesinde bulunan üzüm parsellerinden tedarik edilmiştir.

Metot

Tablo 2'de gösterilen klonlar, çalışma çerçevesinde çok yıllık bitkilerde sertifikalı fidan üretimine esas Arabis mosaic nepovirus, Grapevine fanleaf nepovirus, Grapevine fleck virus, Grapevine leafroll closterovirus -1,-2,-3,-6,-7, Grapevine virus A, Raspberry ringspot nepovirus, Strawberry latent ringspot nepovirus, Tomato black ring nepovirus virüsleri ve *Agrobacterium vitis* hastalığının belirlenmesine yönelik testlemeye tabi tutulmuşlardır. Virüslerden en az biri veya *A. vitis* ile bulaşıklık tespit edilmiş klonlar ise bu hastalıkların bitki materyallerinden uzaklaştırılmasını sağlayan arındırma işlemlerine (termoterapi + meristem kültürü) tabi tutulmuşlardır. Testleme sonucunda temiz çıkan materyaller ise çelikle çoğaltımları yapılarak, bundan sonraki süreçte virüs vektörlerinden korunmaları amacıyla böcek geçirmez tel seralara aktarılmışlardır.

Testleme

Çalışılan üzüm çeşit ve anaçların klonlarının bakteriyolojik ve virolojik yönden testlemeleri Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından yapılmıştır. Virüs varlığı DAS-ELISA testleri ile belirlenmiş, testler antiserumların alındığı firmanın

Tablo 2. Üzerinde çalışılan tüm üzüm çeşit ve anaç klonları.

	Çeşit/Anaç İsmi	Klon Numaraları
ÇEŞİT	Ada Karası	146, 153, 157
	Amasya Beyazı	175, 259
	Bozcaada Çavuşu	98, 275, 161
	Cinsaut	357, 389, 434
	Clairette	124, 156, 377
	Hafızali	20, 183, 293
	Hamburg Misketi	58, 13, 6
	Gamay	192, 365, 212
	Karacakız	7, 160, 64, 103
	Kozak Beyazı	292, 270, 222
	Kozak Siyahı	250, 181, 198
	Papazkarası	289, 194, 207
	Semillon	225, 197, 171, 169
	Yapıncak	175, 132, 13
ANAÇ	1103 Paulsen	5/5, 8/5, 17/16, 24/14
	110 R	20, 19, 26, 31, 30
	5 BB	59, 56, 72, 61
	5 C	11/19, 19/4
	99 R	20
	Rup. du Lot	105

protokolüne göre yapılmış ve testlerde bir yaşındaki sürgünlerin floem dokuları kullanılmıştır. Bakteriyolojik testlemeler ise Benlioğlu ve Özakman (1998)'e göre gerçekleştirilmiştir.

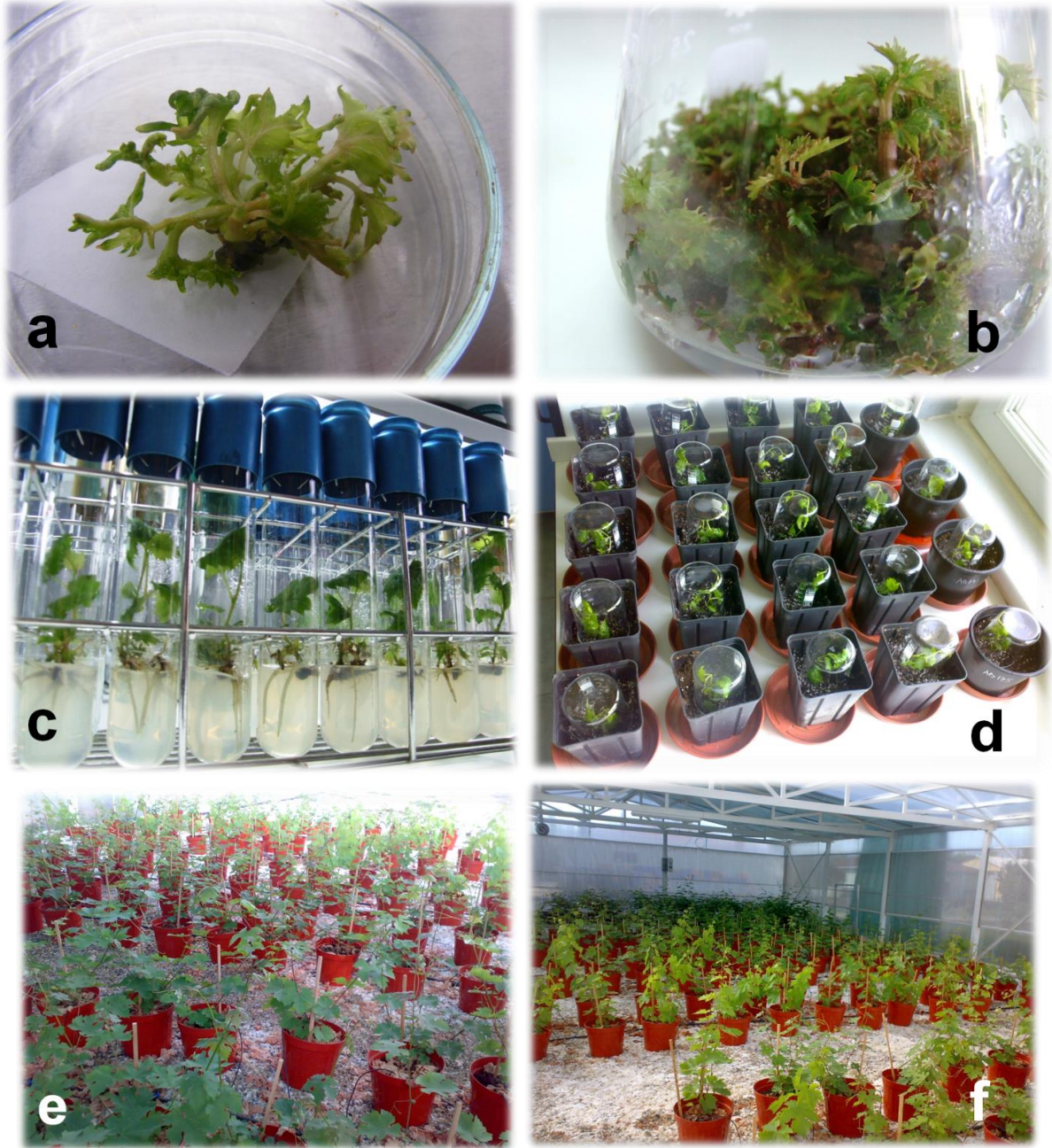
Termoterapi uygulamaları

Termoterapi ve meristem kültürü işlemleri, testlemeler sonucu virüs veya *A. vitis* yönünden bulaşık bulunan ve Tablo 4'te verilen klonlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan asma çeşit ve anaçlarının kalem ve çelikleri 2 litrelik küçük plastik saksılara dikilerek köklenmeleri ve sürgün oluşturmaları sağlanmıştır. Daha sonra bu saksılardaki bitkiler 30°C sıcaklık, % 60-70 oransal nem ve 16 saat 4000-5000 lüks aydınlatmalı termoterapi kabinine yerleştirilmiştir (Stellmach 1980).

Termoterapi kabinine yerleştirildikten sonra saksılardaki asmalardan yeni gelişen sürgün uçları toplanarak yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş, bu sürgün uçları binoküler altında 0,2-0,5 mm büyüklükte izole edilerek içinde kağıt köprü bulunan sıvı besi ortamı doldurulmuş tüplere ekilmiştir. Bir ay sonra BAP (Benzil Amino Pürin) katkılı ½ MS (Murashige Skoog) besiyerine aktarılan materyallerden her ay şaşırtma yapılarak sürgün ve kök gelişmesi sağlanmıştır (Şekil 1a-c). Köklenen bitkiler dış şartlara alıştırılmış (Şekil 1d), daha sonra toprak-perlit karışımına şaşırtılarak tel seraya aktarılmıştır (Şekil 1d-f).

Meristem kültürü uygulamaları

Termoterapi yöntemi ile bazı zararlı virüsleri asmadan temizlemek mümkün olmakla beraber tüm virüsleri temizlemek mümkün değildir. Barlass et al., (1982), 27 ve 35°C'de yetiştirilen meristemlerden birinci sıcaklık uygulamasında "Asma Yalpaze Yaprak Virüsü", ikinci sıcaklık uygulamasında ise "Sarı Benek Virüsü (Yellow Speckle)" hastalığından temizlenmenin gerçekleşmediği



Şekil 1. Meristem kültürü çalışmalarının değişik aşamaları. **a.** *In vitro* sürgün rejenerasyonu; **b.** *In vitro* sürgün gelişme aşaması; **c.** *In vitro* köklenme; **d.** Dış koşullara alıştırma; **e, f.** Tel serada muhafaza altına alınmış materyaller.

Yaprak Kıvrılma ile Leke ve Yaz Beneklenmesi (Summer Mottle) hastalıklarının ise her iki sıcaklık uygulamasında da kolaylıkla temizlendiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle, termoterapi uygulaması ile temizlenemeyen virüsler için asmanın sürgün uçlarından alınan parçalarla meristem kültürü yapılarak başarı sağlanabilmektedir.

Yöntemin başarısı için termoterapi kabiniinde büyütülmekte olan asmanın sürgün ucundan 0,2-0,5 mm büyüklüğünde bir parça alınmaktadır. Parça ne kadar küçük olursa virüslerden temiz materyal elde etme şansı o kadar yükselmekte, fakat üretimdeki başarı şansı ise o kadar düşmektedir.

Meristem kültürü için söz konusu parçaların steril ortamlar altında alınması gerekir. Bu amaçla kullanılan bitkisel materyalin besi ortamının ve meristem kültürü için kullanılan aletlerin de sterilizasyonu gereklidir.

Kullanılan Bitki Materyalinin Sterilizasyonu

Serada gelişmekte olan asmaların sürgün uçları kesilerek laboratuvarında boyları 1-1,5 cm'ye kadar kısaltılmış, % 0,6'lık Na-hipoklorit çözeltisi içinde 20 dakika bekletilmek suretiyle yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ultraviyole lamba ile sterilize edilen steril odadaki steril kabin içinde yüzey sterilizasyonuna

Tablo 3. MS besi yerinin kimyasal içeriği (Murashige ve Skoog 1962).

Bileşik	1 Litre Besi Yerinde Kullanılacak Miktar (mg)
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4 H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,85
Na ₂ EDTA	37,25
Nicotinic Acid	0,5
Pyridoxin HCl	1
Thiamine HCl	0,1
KNO ₃	1900
Sakaroz	30000
Agar	6000
BAP ¹	1-2
IBA ²	1

1 *In vitro* sürgün geliştirme sürecinde kullanılmaktadır.

2 *In vitro* köklendirme sürecinde kullanılmaktadır.

tabi tutulan materyal bu işlemde sonra steril saf su ile üç kez durulanmıştır.

Daha sonra steril kabin içine yerleştirilen binoküler mikroskop altında steril petri kapları içerisinde yine steril bisturi ve iğne yardımı ile 0,2-0,5 mm büyüklüğünde apikal meristemler çıkarılmış ve içerisinde MS besiyeri (MS besiyeri içeriği Tablo 3'de verilmektedir) bulunan tüplere yerleştirilmiştir. Hazırlanan bu tüpler 22-27°C sıcaklıkta %60-70 oransal nem içeren, 2000-3000 lüks aydınlatmalı iklim odasında gelişmeye bırakılmıştır.

Besi Yeri Sterilizasyonu

Amaca uygun olarak hazırlanan besi yerinin sterilizasyonu 1 atmosfer basınç altında 121°C sıcaklıktaki otoklavda 30 dakika tutmak suretiyle yapılmıştır.

Kullanılan Aletlerin Sterilizasyonu

Kullanılacak tüm aletler (pens, bisturi, vb.) 121°C sıcaklıktaki otoklavda 15 dakika tutularak steril hale getirilmiştir.

Sonuçlar ve Tartışma

Ülkemizde halen virüs ve bakteriden ari asma fidanı üretiminde sorunlar yaşanmaktadır. Özellikle virüsten ari baz materyal temini, yaşanan sıkıntıların başında gelmektedir. Virüsten ari asma baz materyali temin etmeye yönelik olarak 4 yıl boyunca asma patojeni virüs ve *A. vitis* bakterisinin arındırılması amacıyla sürdürülen bu araştırmada 60 asma klonu üzerinde çalışılmış, öncelikle bu klonlara virüs ve *A. vitis* testlemeleri yapılmıştır. 30 klon temiz, geri kalanı ise en az bir virüs veya *A. vitis* yönünden bulaşık bulunmuştur (Tablo 4).

Tablo 4. Arındırma çalışmaları sonucu elde edilen bitkisel materyal.

	Çeşit/Anaç İsmi	Klon No	Dış Koşullara Aktarılmış Bitki Sayısı
	Ada Karası	153	11
	Amasya Beyazı	175	4
		259	22
	Bozcaada	275	2
	Çavuşu	161	2
		98	1
		389	3
	Cinsaut	357	1
		434	1
ÇEŞİT	Clairrette	124	1
		156	1
		377	1
		365	-
	Gamay	192	1
		212	1
	Hafızali	183	1
	Hamburg	6	2
	Misketi	58	3
	Karasakız	64	1
	103	1	
Semillon	225	3	
Yapıncak	13	10	
ANAÇ	1103 P	8/5	-
		17/16	-
		30	10
	110 R	19	1
		31	1
	5 BB	72	5
	59	3	
5 C	19/14	-	
Toplam	30	93	

Testleme sonucu temiz çıkan materyaller çelik ile çoğaltılarak doğrudan virüs vektörlerinin bitkilerle temasını kesmek amacıyla böcek geçirmez tel seraya aktarılmışlardır. Bu aşamada tel seraya aktarılan materyal sayısı 177'dir. Testlemede bulaşık çıkan klonlarda ise termoterapi sonrasında *in vitro* koşullarda meristem kültürü uygulamaları yapılarak toplamda 93 bitki elde edilmiştir (Tablo 4). Bu materyaller de yine virüs vektörlerinden izole olmaları için böcek geçirmez tel seraya aktarılmıştır. Bulaşık klonlar içerisinde Gamay üzüm çeşidinin 365 nolu, 1103 P asma anacının 8/5 ve 17/16 ile 5 C asma anacının 19/14 klonlarından, termoterapi uygulamasından sonra meristematik bölgeler izole edilerek doku kültürüne alınmış ancak *in vitro* şartlarda tam bitki elde edilmesi mümkün olmamıştır.

Arındırma işlemine tabi tutularak elde edilen materyallerin bir kısmında, arındırma işleminin başarılı olup olmadığını tespit etmek amacıyla Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü'nce tekrar testleme yapılmış, testleme sonucunda arındırma işlemine tabi tutulan materyallerin virüs ve *A. vitis*'ten ari oldukları belirlenmiştir.

Araştırma sonunda daha önceki yıllarda klon seleksiyonu yapılan asma klonları kullanılarak asma sertifikasyon sisteminde yer alan virüslerden ve *A. vitis* 'ten ari materyaller elde edilmiş ve baz materyal olarak tel seralara aktarılmıştır. Elde edilen baz materyaller Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde, asma sertifikasyon sistemine peyderpey dahil edilmektedir.

Kaynaklar

1. Anonim, 2005. Faostat Statistical Database.
2. Barlass, M., Skene, K.G.M. & Clingeleft, P.R. 1982. Studies on the Fragmented Shoot Apex of Grapevine III. A Scanning Elektron Microscope Study Of Adventitious Bud Formation in Vitro. *Horticultural Science Abstracts*, 52(3):138.
3. Benlioğlu, K. & Özakman, M., 1998. Bağ Üretim Materyalinde Kök Uru Etmeni *Agrobacterium tumefaciens*'in saptanması. *Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 22: 167-174.
4. Murashige, T. & Skoog, F.A. 1962. Revised medium for rapid growth and bio-qqassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
5. Söylemezoğlu, G., Kunter, B., Akkurt, M., Sağlam, M., Ünal, A., Buzrul, S. & Tahmaz, H. 2015. Bağcılığın Geliştirilmesi Yöntemleri ve Üretim Hedefleri. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı, 1 Ocak, Ankara.
6. Stellmach, G. 1980. Moderate heat propogation of grapevines for eliminating graft transmissible disorders. 325-328. Proceedings of the 7th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine. Vineland Research Station, Ontario Canada. 8-12 Eylül 1980.

Teşekkür

Bu proje TÜBİTAK 1007 programı (Proje No: 107G116) tarafından desteklenmiştir.

