

EKŞİ KARA VE NARİNCE ÜZÜM (*Vitis vinifera* L.) ÇEŞİTLERİNDE ANTER KÜLTÜRÜ

Zeki KARA¹, Kevser YAZAR², Heydem EKİNCİ³

¹Prof. Dr., Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, KONYA

²Arş. Gör., Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, KONYA

³Zir. Müh., Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, KONYA

Geliş tarihi / Received: 11.09.2017, Kabul tarihi / Accepted: 20.06.2018

ÖZET

Anter kültürü, haploit bitki elde etmek amacıyla kullanılan bitki ıslahı yöntemlerinden birisidir. Bir bitkiden izole edilen anterlerin uygun bir besin ortamında kallus gelişimi ve bitkiye dönüşümü esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle üretilen haploit bitkilerden istenilen mutant tipler seçilebilmekte ve yeni varyetelerin geliştirilmesi mümkün olmaktadır. Türkiye’de halen üretimi lokal alanlarında alternatifsiz olarak devam eden ‘Ekşi Kara’ ve ‘Narince’ üzüm çeşitlerinde anter kültürü çalışılmıştır. Kültüre başlama için en uygun olduğu kabul edilen yaklaşık tek çekirdekli mikrospor aşamasındaki anterler (0.3–1.0 mm uzunlukta soluk yeşil renkli) kullanılmıştır. *In vitro*’da N&N besi ortamında, 25°C sıcaklıkta, 6 hafta karanlık ortamda kallus gelişimi incelenmiştir. Korolla rengi koyu yeşilden hafif sarıya döndüğü ve henüz açılmamış çiçek tomurcuklarında bulunan anterlerin daha uygun olduğu gözlemlenmiştir. Çeşitlerin N&N besi ortamına verdiği tepkiler farklı olup ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde %22.86 ve ‘Narince’ üzüm çeşidinde %35.17 oranında kallus gelişimi tespit edilmiştir. Embriyonik indüksiyonun başlangıç eksplant tipi, gelişme düzeyi, kültür ortamı ve genotipten etkilendiğinden bu çalışmada farklı üzüm çeşitlerinin aynı besi ortamına farklı tepkiler verdiği belirlenmiştir. ‘Ekşi Kara’ ve ‘Narince’ üzüm çeşitlerinde uygun besin ortamı kullanıldığında çeşitler arasında farklı tepkiler bulunmakla birlikte anterlerinden kallus elde edilebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Asma, *Vitis vinifera* L., anter kültürü, haploid, embriyonik kallus

ANTHER CULTURE OF ‘EKŞİ KARA’ AND ‘NARİNCE’ GRAPE (*Vitis vinifera* L.) VARIETIES

ABSTRACT

Anther culture is one of the plant breeding methods used to obtain haploid plants. The anthers isolated from a plant are based on the development of callus and plant transformation into a suitable culture media. The desired mutant types can be selected from the haploid plants produced by this method and new varieties can be developed. Anther culture has been studied in the ‘Ekşi Kara’ and ‘Narince’ grapes varieties, which are still cultivate in Turkey without any alternative in their locations. Anthers (0.3–1.0 mm long, pale green colour) were used in the approximately single–nucleus microspore stage, which was considered optimal for the start to culture. Callus development was investigated *in vitro* in N&N medium, at 25°C for 6 weeks in darkness. It is observed that the anthers found in the flower buds’ corolla–covered, which have turned from the dark greenish to slightly yellow colour and have not yet opened, are more suitable. The response of the varieties to the N&N feeding media was different, and the callus development was found at 22.86% in ‘Ekşi Kara’ grape variety and 35.17% in ‘Narince’ grape variety. Since embryonic induction was affected by initial explant type, development level, culture medium and genotype, it was determined that different grape varieties gave different responses to the same culture medium in this study. When the appropriate nutrient medium is used in the ‘Ekşi Kara’ and ‘Narince’ grapes varieties, calluses can be obtained from the anthers together with the different reactions among the varieties.

Keywords: Grapevine, *Vitis vinifera* L., anther culture, haploid, embryonic callus

GİRİŞ

Asmanın geleneksel ıslah yöntemleriyle genetik olarak iyileştirilmesi, uzun süren gençlik dönemleri ve kendileme depresyonu ile engellenmektedir [10, 14]. Dolayısıyla, somatik embriyogenesis yöntemini içeren alternatif yaklaşımlar, genetik iyileştirme programları ve virüs eliminasyonu için büyük fayda sağlayacaktır [5, 6, 3, 14]. Embriyogenik hücrelerin karakteristik kökeni ile somatik embriyoların oluşumuna yol açan ontogenik gelişimsel dizilerin oluşturulmasında embriyogenik kallus meydana getiren asma anterlerinin anatomik ve morfolojik çalışmaları önemlidir [17]. Asmada, çeşitli dokuların türleri başarıyla kullanılmış olmasına rağmen, anterler somatik embriyoların yenilenmesi için en uygun eksplant olarak kabul edilir. Bu nedenle günümüzde birçok türde somatik embriyoların yenilenmesini sağlamak için kullanılmaktadırlar [2].

Anter kültürü yöntemiyle, içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulunduran anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploit embriyolar elde edilmesi amaçlanmaktadır [6]. Haploitler kromozom sayısı gametofitik düzeyde olan bitkiler olup duble haploitler kromozom sayısı iki katına çıkartılmış haploitlerdir. Haploitler ve çift haploitlerin (DH'ler) gametik embriyogenez yoluyla üretilmesi, heterozigot ebeveynlerden tam homozigot hatların geliştirilmesinde, homozigot bitkilerin üretilmesi için geleneksel ıslah yöntemlerinde birçok nesil kendileme için gerekli süreyi kıyasla kısaltır. Haploit ve DH'lerin üretimi cazip biyoteknolojik bir araçtır. Homozigot bitkiler üretmek için haploidi teknolojisi ve protokollerinin geliştirilmesi tarım sistemleri üzerinde önemli bir çarpan etkisine sahiptir. Günümüzde, bu biyoteknolojiler, tarımsal açıdan önemli bitkilerin ıslah programlarının ayrılmaz bir parçasını temsil etmektedir. Haploit ve DH'leri elde etmek için birkaç yöntem olmakla birlikte *in vitro* anter veya izole edilmiş mikrospor kültürü en etkili ve yaygın olarak kullanılanıdır [4]. Yetiştiriciler için arzu edilse de doğal popülasyonlarda haploit

bitkilerin spontan oluşumu çok nadirdir. Bitkiler hem erkek hem de dişi gametlerden rejenere olabilirken, çok sayıdaki haploit ve DH bitki eldesi için kural olarak erkek gametlerin (mikrosporlar veya polen) kullanılması gerektiği bildirilmiştir [15].

Asmada yeni çeşit geliştirmek amacıyla yapılan ıslah çalışmalarında genel olarak klon seleksiyonu ve melezleme ıslahı teknikleri kullanılmaktadır. Melezleme ıslahı çalışmalarında ıslah sürecinin çok uzun olması nedeniyle değişen tüketici tercihlerini yeterli oranda karşılayamama ve asmanın heterozigotik yapısı nedeniyle var olan ve geliştirilmesi beklenen özellikte değişim meydana gelmesi gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Mutasyon ıslahı çalışmalarında klasik melezleme ıslahı çalışmalarındaki uzun zaman ihtiyacı kısaltılarak, adaptasyon yeteneği yüksek olan popüler çeşitlerin bir veya birkaç özelliği değiştirilerek daha iyi özelliklere sahip yeni çeşitler geliştirilebilmektedir [1, 13].

Konya ve çevresine adaptasyonu iyi 'Ekşi Kara' üzüm çeşidi yetiştiriciliği bölgemiz için önem taşımaktadır. Çeşidin tozlayıcı gerektirmesi [12] özelliğinde iyileşme sağlamak ve meyve kalitesini uluslararası pazara uygun hale getirmek amacıyla ploiploidi seviyesinin artırılmasına yönelik çalışmaların üzerinde durulması düşünülmüştür.

Anter kültürü çalışmaları ile elde edilen haploid bitkiler kromozom katlaması yöntemiyle poliploid bitkiler elde edilebileceği ümit edilmektedir. Bu çalışmada, 'Ekşi Kara' ve 'Narince' üzüm çeşitlerinin anterleri N&N besi ortamında kallus gelişimi yönünden incelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

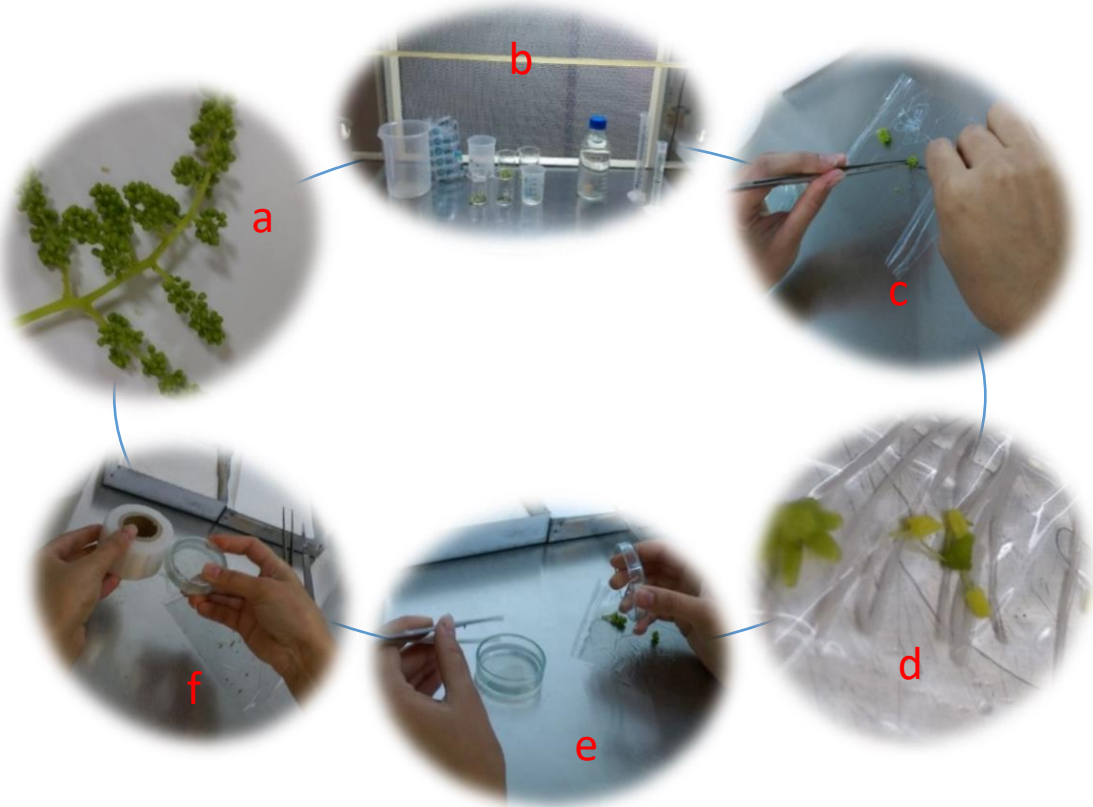
Bu çalışmada Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bağ'ında bulunan yaklaşık 11 yaşındaki, kendi kökü üzerinde yetiştirilen 'Narince' üzüm çeşidi ve bölge şartlarına iyi adapte olmuş otokton bir çeşit olan 'Ekşi Kara' üzüm çeşidinin anterleri kullanılmıştır. 'Ekşi Kara', geçmiş bin yılları bulan yerli bir çeşittir. Konya çevresinde sofralık, natürel kurutmalık ve şıralık olarak yetiştirilmektedir. Normal irilikteki taneleri çerezlik kuru üzüm

olarak pazarlanırken dölleme kusuru nedeniyle partenokarpik taneler oluşturmaktadır [12]. ‘Narince’ üzüm çeşidi ülkemizde yetiştirilen en önemli beyaz şaraplık üzüm çeşitlerinden birisidir. Yaygın olarak yetiştirildiği bölge Tokat ve Amasya yöreleri olup, genellikle şaraplık ve sofralık olarak kullanılmaktadır. Taneleri beyaz, yuvarlak, orta irilikte, kabuk orta kalınlıkta ve tatlı olup ortalama 2–3 adet çekirdeğe sahiptir. Yaprakları da sarmalık olarak yüksek kaliteye sahiptir [11]. Konya yöresindeki çalışmalarda ekolojik uyumu dikkati çekmektedir.

Kültüre başlamak için anterlerin yarı-sarı sarıya dönüştüğü zaman olarak karakterize edilen mikrospor aşamasındaki açmamış çiçek salkımları toplanmıştır [23]. Yüzey sterilizasyonu, çiçek tomurcuklarının NaClO’ya (%0.1) 10 dakika batırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bunu takiben, bitki materyali dört ila beş kez steril damıtılmış su

içerisinde durulanmıştır. Anterler 80×15 mm boyutundaki petri başına 4–5 adet olacak şekilde %2.5 süzkroz, 2,4-D (5 µM) ve BAP (5 µM) kombinasyonlarını içeren %0.3 phytagel ile katılaştırılmış N&N (Nitsch ve Nitsch, 1969) ortamında kültüre alınmıştır [22, 20] Besi ortamına transferi yapılan anterler 25°C sıcaklıkta, 6 hafta süre ile karanlıkta bekletilmiştir.

Bu indüksiyon ortamı üzerinde 6 haftanın ardından anterlerden kallus oluşumu gözlenmiştir. Elde edilen kalluslar, 10 µM NAA, 1 µM BAP, 20 µM IAA, %0.6 süzkroz, %0.25 aktif karbon, %1 gelrite agar içeren NN (makro–mikro)+MS (vitamin) embriyo farklılaşma ortamına aktarılmıştır [20]. Kallus tipleri ve kallus oluşum oranı (%) belirlenerek çeşitler arasındaki farklılık SPSS 17.0 paket programı ile $p \leq 0.05$ önem seviyesinde analiz edilmiştir.



Şekil 1. a) Açmamış çiçek tomurcuğu, b) eksplantların sterilize edilmesi, c) kaliptranın çıkarılması, d) Anterlerin genel görünümü, e) anterlerin petri kabına aktarımı, f) petri kabının streçle sarılması

Figure 1. a) Inflorescence, b) sterilization of explants, c) removal of calyptra, d) general view of the anthers, e) transfer of anthers to petri dishes, f) stretch-wrapping of petri dishes

BULGULAR VE TARTIŞMA

Üzüm çeşitlerinin besi ortamına verdikleri kallus oluşum tepkileri Çizelge 1’de verilmiştir. Farklı tipte kallus oluşumları daha önceki yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [19, 3, 20]. 6 hafta sonra bazı eksplantlardan beyaz organize olmamış kallus geliştiği, diğer eksplantların ise kahverengiye dönüştüğü ve fonksiyonunu kaybettiği gözlenmiştir. Numunelerin ışık mikroskobunda analizi yapılmış olup kallusların embriyonik farklılaşma yeteneğinde olup olmadıkları belirlenmiştir. ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde embriyonik olan kallus (Tip 1) ve embriyonik olmayan kallus (Tip 2) olarak iki tip kallus oluştuğu görülmüştür. ‘Narince’ üzüm çeşidinde ise kallusların embriyonik farklılaşma yeteneğinde olmadıkları yine ışık mikroskobuyla tespit edilmiştir. Embriyogenik kallus, nispeten küçük nişastalı, sitoplazması yoğun, vakuolleri daha büyük embriyogenik hücrelerden oluşur. Somatik embriyolar direkt olarak embriyogenik hücre kütlelerinden suspensor (Döllenmeden sonra bitkilere ait zigotun bölünme ile oluşturduğu hücresel ipliklerdir. Bitki embriyosu bu ipliğin sonuncu hücresinden oluşur.) benzeri yapılar yoluyla gelişir [9]. Embriyogenesise geçmek için yeterli mikrosporların oluşumu, sitoplazmik ve çekirdek genleri arasındaki etkileşim tarafından kontrol edilir ve çevre tarafından modifiye edilmektedir [4].

‘Narince’ üzüm çeşidinde kallus oluşum oranı (Tip 1 ve Tip 2) %35.17 iken ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde %22.86 olarak belirlenmiştir. ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde oluşan kalluslar içerisinde embriyonik kallus oranı %2.04 olarak bulunmuştur (Çizelge 1). Polen embriyogenesiste çalışan araştırmacıların çoğunun da belirttiği gibi endojen faktörler arasında genotip önemli bir rol oynamaktadır. Bir türün içindeki farklı çeşitlerin, anter kültüründe çeşitli tepkiler sergilediği bildirilmiştir [4]. *Vitis* türlerinde embriyonik kültürlerin oluşumu ve sürekliliğinin sağlanması yüksek oranda genotipe bağlıdır ve bugüne kadar birkaç türe ve onların hibritlerine uygulanabilmiştir [8, 21, 17]. Daha önceki yapılan çalışmalara benzer şekilde, ‘Ekşi Kara’ ve ‘Narince’ üzüm çeşitleri anterlerin den oluşan kallus tipleri karşılaştırıldığında embriyonik indüksiyonun, eksplant tipi, gelişim evresi ve genotip tarafından etkilendiği görülmektedir. Anter kültürü için en yaygın olarak kullanılan bazal ortamların; N6 (Chu, 1978), modifiye MS (Murashige ve Skoog, 1962), Nitsch ve Nitsch (1969) ortamı ve B5 ortamı (Gamborg ve ark., 1968) ve diğer modifiye ortamlar olduğu bildirilmiştir [4]. Bununla birlikte besin ortamının içeriğinin de embriyo gelişimi ve olgunlaşması için önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir [8, 14]. Kallus oluşum oranını çeşit özellikleri kadar ortam içeriğinin de etkilediği düşünülmektedir.

Çizelge 1. ‘Ekşi Kara’ ve ‘Narince’ üzüm çeşitlerinde kallus oluşum oranları

Table 1. Callus formation rate of ‘Ekşi Kara’ and ‘Narince’ grape varieties

Çeşitler Cultivars	Anter sayısı Number of anthers	Kallus oluşum oranı (%) (Tip 1 ve Tip 2) Callus formation ratio (%) (Type 1 and Type 2)	Embriyonik kallus oranı (%) Embryonic callus ratio (%)
Narince	526	35.17±0.55 a	0.00±0.00
Ekşi Kara	225	22.86±0.78 b	2.04±0.03
LSD 0.05	—	1.55	0.048

^aAynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (LSD)

^bMean separation within columns by LSD multiple test at, 0.05 level

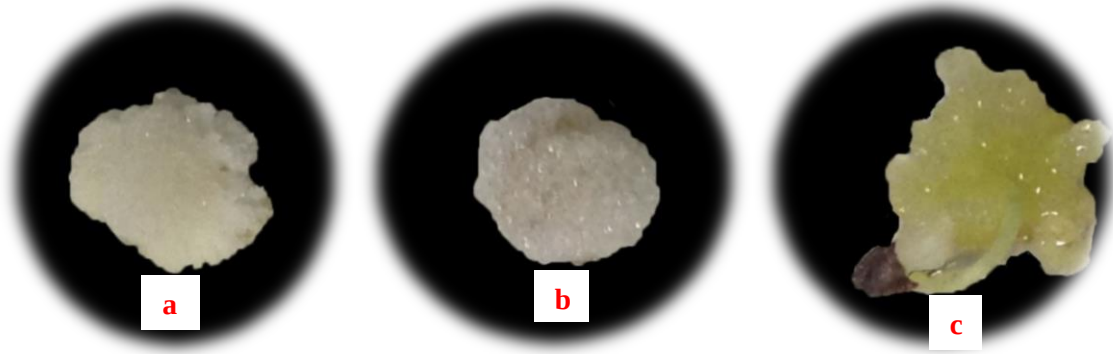
SONUÇ

Elde edilen verilere göre ‘Ekşi Kara’ ve ‘Narince’ üzüm çeşitleri anterlerinden oluşan kallus tiplerinin; embriyonik indüksiyondan, eksplant çeşidinden, gelişim evresi ve genotipten etkilendiği görülmektedir. Bununla birlikte besin ortamının içeriğinin de embriyo

gelişimi ve olgunlaşması için önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir [8, 14]. Çeşitlerin ve ortamın kallus oluşum oranına etkilerinin belirlenmesi amacıyla büyüme düzenleyicilerin kombinasyonları üzerine farklı tür ve çeşitlerle birlikte çalışılması üzerinde durulması gereken bir konudur. Sonuçlarımıza bakıldığında ‘Ekşi Kara’ üzüm

çeşidinin embriyonik kallus oluşumuna verdiği tepkilerin daha memnun edici olduğu gözükmemektedir. Dolayısıyla, doku kültürüne karşı inatçılığı ile bilinen asma için bile, embriyojenik kallus gibi *in vitro* muhafaza edilen, somatik hücre kültürü başlatılabilir.

Bitki geniş bir çeşitlilikteki genotiplerden verimli bir şekilde yenilenebilir. Bu çalışma ile ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde yeni denemelerde kullanılabilecek embriyonik kallus oluşumu yöntemi ilk defa belirlenmiştir.



Şekil 2. a) ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidi anterinden oluşan embriyonik kallus, b) ‘Narince’ üzüm çeşidine ait anterden meydana gelen embriyonik olmayan kallus, c) ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidine ait filamentten oluşan embriyonik kallus

Figure 2. a) embryonic callus formation of ‘Ekşi Kara’ grape variety anther, b) non-embryonic callus formation of ‘Narince’ grape variety anther, c) embryonic callus formation of ‘Ekşi Kara’ grape variety filament

KAYNAKLAR

1. Ahloowalia, B.S. and M. Maluszynski, 2001. Induced Mutations A New Paradigm in Plant Breeding. *Euphytica*, 118(2):167–173.
2. Bouquet, A. and L. Torregrosa, 2003. Micropropagation of the Grapevine (*Vitis* spp.). In *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer 75:319–352.
3. Gambino, G., R. Vallania and I. Griabudo, 2010. In situ Localization of Grapevine Fanleaf Virus and Phloem-Restricted Viruses in Embryogenic Callus of *Vitis vinifera*. *European Journal of Plant Pathology*, 127(4):557–570.
4. Germanà, M.A., 2011. Anther Culture for Haploid and Doubled Haploid Production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 104(3):283–300.
5. Goussard, P.G., J. Wiid and G.G.F. Kasdor, 1991. The Effectiveness of in vitro Somatic Embryogenesis in Eliminating Fanleaf virus and Leafroll Associated Viruses from Grapevines. *South African Journal of Enology& Viticulture* 12(2):77–81.
6. Goussard, P.G. and J. Wiid, 2017. The Elimination of Fanleaf Virus from Grapevines Using in vitro Somatic Embryogenesis Combined with Heat Therapy. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 13(2):81–83.
7. Gönülşen, N., 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. Ege Tar. Araş. Enst. Müd. Yayınları, 140s.
8. Gray, D.J. and C.P. Meredith, 1992. Grape (Hammerschlag, F.A. and Litz, R.E. (eds)). *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. CAB International, Cambridge. 8:229–262.
9. Gray, D.J. and J.A. Mortensen, 1987. Initiation and Maintenance of Long Term Somatic Embryogenesis from Anthers and Ovaries of *Vitis longi* ‘Microsperma’. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 9(1):73–80.
10. Jayasankar, S., Z. Li and D.J. Gray, 2000. In-vitro Selection of *Vitis vinifera* Chardonnay with Elsinoe Ampelina Culture Filtrate is accompanied by Fungal

- Resistance and Enhanced Secretion of Chitinase. *Planta*, 211(2):200–208.
11. Kara, Z., 1990. Tokat Yöresinde Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinin Ampelografik Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar (Doktora Tezi). Ankara Üniversitesi Fen Bil. Enstitüsü.
 12. Kara, Z., A. Sabır, K. Yazar, O. Doğan ve A. Khaleel, 2017. Fertilization Biology of Ancient Grape 'Ekşi Kara' (*Vitis vinifera* L.). *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi* 31(2):92–97.
 13. Kunter, B. ve D.D. Karataş, 2011. Asmalarda Mutasyonlar ve Mutant *Vitis vinifera* L. Çeşitleri. *Yüzüncü Yıl Üni. Tarım Bil. Dergisi* 21(2):146–151.
 14. Komamine, A., R. Kawahara, M. Matsumoto, S. Sunabori, T. Toya, A. Fujiwara, M. Tsukahara, J. Smith, M. Ito, H. Fukuda, K. Nomura and T. Fujimura, 1992. Mechanisms of Somatic Embryogenesis in Cell Cultures: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. *in vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 28: 11–14.
 15. Morgana, C., R. Di Lorenzo and F. Carimi, 2004. Somatic Embryogenesis of *Vitis vinifera* L. (cv. Sugraone) from Stigma and Style Culture. *Vitis*, 43(4):169–173.
 16. Morrison, R.A., and D.A. Evans, 1988. Haploid Plants from Tissue Culture: New Plant Varieties in a Shortened Time Frame. *Nature biotechnology*, 6(6):684–690.
 17. Motoike, S.Y., R.M. Skirvin, M.A. Norton and A.G. Otterbacher, 2001. Somatic Embryogenesis and Long Term Maintenance of Embryogenic Lines from Fox Grapes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66(2):121–131.
 18. Newton, D.J. and P.G. Goussard, 1990. The Ontogeny of Somatic Embryos from In Vitro Cultured Grapevine Anthers. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 11(2):70–75.
 19. Perrin, M., C. Gertz and J.E. Masson, 2004. High Efficiency Initiation of Regenerable Embryogenic Callus from Anther Filaments of 19 Grapevine Genotypes Grown Worldwide. *Plant Science* 167(6):1343–1349.
 20. Prado, M.J., M.P. Grueiro, M.V. González, P.S. Testillano, C. Domínguez, M. López and M. Rey, 2010. Efficient Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis from Anthers and Ovaries of Six Autochthonous Grapevine Cultivars from Galicia (Spain). *Scientia Horticulturae* 125(3):342–352.
 21. Reisch, B.I., C.L. Owens and P.S. Cousins, 2012. Grape. In *Fruit Breeding*, Springer US. 225–262s.
 22. Salunkhe, C.K., P.S. Rao and M. Mhatre, 1999. Plantlet Regeneration via Somatic Embryogenesis in Anther Callus of *Vitis latifolia* L. *Plant Cell Reports* 18(7–8): 670–673.
 23. Stamp, J.A., and C.P. Meredith, 1988. Somatic Embryogenesis from Leaves and Anthers of Grapevine. *Scientia Horticulturae* 35:235–250.