

Isabella (*Vitis labrusca*) üzüm çeşidinin *in vitro* sürgün ucu kültürü ile çoğaltılması*

Hatice BİLİR EKİBİ¹, Gül Şükriye YILMAZ¹, Seda CİĞERLİ¹

¹Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 52200-Ordu

Alınış tarihi: 16 Aralık 2015, Kabul tarihi: 31 Aralık 2015

Sorumlu yazar: Hatice BİLİR EKİBİ, e-posta: haticebilirekbic@gmail.com

*Bu çalışma Ordu Üniversitesi BAP Kurumu tarafından desteklenmiş ve VII. Ulusal Bahçe Bitkileri kongresinde kısa özet olarak basılmıştır.

Öz

Bu çalışmada, Isabella üzüm çeşidinden alınan 1 mm uzunluktaki meristem uçları ile 2-3 yaprak taslağını içeren sürgün uçları eksplant olarak kullanılarak doku kültürü ortamında çoğaltma gerçekleştirilmiştir. Sürgün uçları sürgün oluşturma aşamasında (kardeşlenme) MS ortamına 0, 1, 2, 3 ve 4 mg/l dozlarında BA ilavesi yapılmış deney tüplerinde kültüre alınmıştır. Bitkicikler üçer hafta ara ile taze ortama aktarılmış ve bu işlem 5. alt kültüre kadar devam ettirilmiştir. Köklendirme aşamasında ise ortamdan BA çıkarılmış ve IBA' in 0, 0.5, 1, 2 ve 4 mg/l konsantrasyonları eklenerek köklenmeleri incelenmiştir. Denenen BA dozları arasında en yüksek bitki başına ortalama sürgün sayısı, 5. alt kültürde 1 mg/ BA ilave edilen MS ortamından elde edilmiştir. En yüksek köklenme oranı ve gelişim parametreleri açısından ise en uygun köklendirme ortamı 2 mg/l IBA olarak tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Vitis labrusca*, doku kültürü, sürgün ucu, benziladenin, indol butirik asit

***In vitro* propagation of Isabella (*Vitis labrusca*) grape cultivar by shoot tips**

Abstract

This study was carried out at the tissue culture laboratory of Horticultural Department, Agricultural

Faculty, Ordu University between 2013 and 2014. In this study, shoot tips containing 2-3 draft leaves and meristematic tips in 1 mm length were used as explant in Isabella grape cultivars. Shoot tips were cultured in MS medium containing 0, 1, 2, 3 and 4 mg^l-1 doses of BA during the shoot formation. Plantlets were transferred to fresh medium triweekly and this process was continued until the 5th subculture. In the rooting stage, BA is removed from medium and is rooting is examined as adding IBA in the doses of IBA 0, 0.5, 1, 2 ve 4 mg^l-1. The highest average shoot number per plant, was obtained from the MS medium added 1 mg^l-1 BA in 5th subculture. The most suitable rooting medium for rooting and growth parameters is determined as 2 mg^l-1 IBA.

Key words: *Vitis labrusca*, tissue culture, shoot tip, benzyladenin, indole butyric acid

Giriş

Ülkemiz, asmanın anavatanı olması ve bağcılığın oldukça eskiye dayanmasının yanında gerek üretim miktarı gerekse çeşit zenginliği açısından dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer almaktadır. Türkiye'nin hemen hemen tüm bölgelerinde bağcılık yapılabilirken Doğu Anadolu Bölgesi ve yıllık 2000 mm ve üzerinde yağmur alan Karadeniz Bölgesinin özellikle sahil şeridinde Avrupa grubunda yer alan türler ile bağcılık yapılamamaktadır. Karadeniz Bölgesinde Amerika üzümü, kokulu kara üzüm,

Isabella veya çilek üzümü gibi değişik isimlerle adlandırılan *labrusca* grubu üzüm tip ve çeşitleri yetiştirilmektedir (Çelik ve ark., 2009). Ordu ilinde ekonomik anlamda bağcılık yapılmazken, asması olmayan bahçenin de bulunmadığı bildirilmektedir. Bölgemizde üzüm yetiştiriciliği için kullanılan çeşitlerin mantari hastalıklardan etkilenmediği dolayısıyla bu çeşitlerle yapılan yetiştiricilikte ilaç kullanımına gereksinim duyulmadığı değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Cangi, 1999; Çelik, 2004; Çelik ve ark., 2009).

Asmanın, çeşitlere göre değişmekle birlikte, çeşitli hastalıklara hassasiyeti olan bir tür olduğu bildirilmektedir. Önemli verim kayıplarına neden olan bu hastalıklar fungus, bakteri, virüs ve nematod kaynaklı olabilmektedir. Asmalarda filoksera, bakteri, nematod ve akar gibi çok sayıda hastalık ve zararlılar çoğaltma materyaliyle taşınabilmektedir (Murrell ve Lo, 2000; Hartman ve Bachi, 2009).

Bazı çoğaltma yöntemlerinin uzun zaman sürecinde ve sınırlı sayıda bitki üretimine olanak tanınması, sistemik olan hastalıkların taşınmalarına ve istenmeyen mutasyonlara neden olması, geniş çoğaltma alanlarına ihtiyaç duyması ile elde edilen bitkilerin çoğaltma materyalleri üretimleri için daha fazla süreye ihtiyaç duymaları gibi olumsuz özelliklerinden dolayı günümüzde bitki çoğaltımında daha hızlı ve kitlesel üretimde daha etkin olan doku kültürü yöntemlerinin önem kazandığı görülmektedir. Doku kültürü yöntemleri ile genetiksel olarak homojen bitki popülasyonlarının oluşturulması ile güçlü ve sağlıklı bitkilerin üretimi sağlanabilmektedir (Murashige, 1974; Blazina ve ark., 1991).

Asmalarda mikro çoğaltma ilk olarak mikro çeliklerden bitkicik elde edilmesi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (Jean ve ark., 1998; Kinfe, 2010). Meristem, sürgün ucu, boğum gibi eksplantlar kullanılarak bitkicik oluşturulması ise değişik araştırmacılar tarafından sağlanmıştır (Barlas ve Skene, 1980; Gray ve Fischer, 1985). Bu çalışmada kullanılan sürgün ucu kültürü yöntemi ise daha kısa sürede ve daha küçük bir alanda kitlesel üretimin yapılmasına olanak tanınması açısından önemli bir mikro çoğaltım yöntemlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda sürgün ucu kültürünün özellikle *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi türünün

taşınmasına engel olması açısından önemli olduğu vurgulanmaktadır (Burr ve ark., 1988; Robacker ve Chang, 1992).

Bu çalışmayla *V. labrusca* türü içinde yer alan kokulu üzüm ya da kokulu kara üzüm olarak da isimlendirilen Isabella üzüm çeşidinde in vitro koşullarda mikro çoğaltılması ve köklendirilmesinin sağlanması amacıyla sürgün ucu kültürü gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmayla bölgemizde yetiştiriciliği tercih edilen Isabella üzüm çeşidinin, klonal çoğaltımı amacıyla doku kültürü tekniklerinden biri olan sürgün ucu kültürü ile çoğaltılması hedeflenmiştir. Ayrıca, *V. labrusca* türü içinde yer alan bu çeşidin in vitro sürgün ucu yoluyla çoğaltılmasında bir protokol oluşturulmaya çalışılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışma, 2013-2015 tarihleri arasında Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışma kapsamında Giresun Fındık Araştırma Enstitüsü bağında açıkta yetişen *V. labrusca* türüne ait Isabella üzüm çeşidinin aktif büyüme dönemindeki sürgünlerinden alınan sürgün uçları kullanılmıştır.

Alınan sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonları için sürgün uçları % 10 sodyum hipoklorid ve % 0.01 Tween 20 içeren çözeltide 20 dakika süreyle tutulmuş ve sonrasında steril kabin içinde steril saf su ile 3 defa durulanmıştır. Daha sonra yaklaşık 1 mm uzunluktaki meristematik uç ile 2-3 yaprak taslağını içeren uç kısımlar aseptik koşullarda ve dikey hava akımlı kabinde bir bistürü yardımıyla çıkarılarak kültüre alınmıştır. Alınan eksplant örnekleri pH 5.7-5.8'e ayarlanan MS (Murashige and Skoog, 1962) temel besi ortamında kültüre alınmıştır. Besin ortamları kullanım öncesinde otoklavda 121°C ve 1.05 atm basınçta 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Sürgün oluşturma (kardeşlenme) aşamasında MS ortamına 0, 1, 2, 3 ve 4 mg/l dozlarında BA ilave edilmiş ve 15 cm x 2.5 cm boyutlarında deney tüplerinde kültüre alınmıştır. Alt kültüre alma işlemi yaklaşık 3-4 haftada bir yapılmış ve bu işlem 5. alt kültüre kadar devam ettirilmiştir. Köklendirme

aşamasında ise ortamına BA eklenmemiş ve 0, 0.5, 1, 2 ya da 4 mg/l IBA eklenmiştir. Kültürler, sıcaklığı 26 ± 2 °C, fotoperiyodu 16 saat, ışıklanması 3000-4000 lüks olan soğuk beyaz lambaların bulunduğu büyütme kabini içinde tutulmuştur.

Deneme kapsamında uygulamaların karşılaştırılması amacıyla eksplant başına sürgün sayısı (n), köklenen eksplant oranı (%), kök sayısı/bitkicik oranı (n), boğum sayısı/bitkicik oranı (n), sürgün uzunluğu (cm), yaprak sayısı (n), kök uzunluğu (cm) özelliklerinde inceleme gerçekleştirilmiştir.

Deneme 3 yinelemeli, her yinelemede 15'şer bitki materyali kullanılacak şekilde Tesadüf Parselleri Deneme desenine göre düzenlenmiş, farklı grupların tespitinde $P<0.05$ önem seviyesinde LSD testinden faydalanılmıştır. Yüzde (%) olarak ifade edilen değerlerin analizinde açı değerleri kullanılmış ve gruplamalar buna göre yapılmıştır.

Bulgular

Eksplant Başına Düşen Sürgün Sayısı (n): Farklı BA dozlarının eksplant başına düşen bitki sayısı üzerine etkisi Çizelge 1'de gösterilmiştir. Çizelge 1 incelendiğinde, 1. ve 2. alt kültürlerde BA dozlarının kardeş sayısı üzerinde farklılığa neden olmadığı dikkat çekmektedir.

Alt kültür sayısı arttıkça dozlar arası farklılığın daha belirgin hale geldiği ve dozların artışıyla da eksplant başına düşen bitki sayısında paralel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Dördüncü alt kültürde en yüksek kardeş sayısı 2 ve 3 mg/l BA içeren MS ortamından elde edildiği (3 adet/eksplant); bu ortamı ise 2 adet/eksplant ile 1 mg/l BA ortamının izlediği tespit edilmiştir. Beşinci alt kültürde ise en yüksek kardeş sayısının çok belirgin farklılıkla 1 mg/l BA içeren ortamdaki elde edildiği, 3 mg/l BA içeren ortamdaki ise kontrol ile aynı sayıda bitkinin elde edildiği ise dikkat çekmiştir (1 adet/eksplant).

Çizelge 1. Farklı BA dozlarının isabella üzüm tiplerinde eksplant başına düşen bitki sayısı (n) üzerine etkisi

Uygulama	1. alt kültür	2. alt kültür	3.alt kültür	4.alt kültür	5. alt kültür
Kontrol	1	1	1 c	1 c	1 c
1.0 mg/l BA	1	2	2 b	2 b	4 a
2.0 mg/l BA	1	2	2 b	3 a	2 b
3.0 mg/l BA	1	2	3 a	3 a	1 c
LSD %5	Ö.D	Ö.D	0.2	1	0.4

Kök Uzunluğu (cm): MS besin ortamına ilave edilen farklı dozdaki IBA'nın kök uzunluğu üzerine etkisinin istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 2). Sonuçlara göre en yüksek kök uzunluğu 1.76 cm ile MS ortamına 2 mg/l IBA ilavesinden elde edildiği belirlenmiştir. Diğer tüm IBA dozları ise aynı istatistiksel grupta yer alarak 2 mg/l IBA dozundan elde edilenden daha kısa köklü bitkiler oluşturmuştur.

Kök Sayısı (n)/bitkicik: Farklı IBA dozlarının bitkiciklerin kök sayısı üzerine olan sonuçlarının kök uzunluğu sonuçlarıyla paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2). Buna göre en fazla kök

olan bitkiciklerin 2 mg/l IBA ilavesinden elde edilen MS ortamından sağlandığı tespit edilmiştir (5 adet/bitkicik). Kontrol uygulaması bitkiciklerinde ise kök oluşumunun olmadığı gözlenmiştir.

Köklenen Eksplant Oranı (%): Farklı IBA dozlarının köklenen eksplant oranı üzerine etkisi Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Kök uzunluğu ve kök sayısı sonuçlarıyla paralellik göstererek en yüksek köklenmenin % 71.4'lük değerle 2 mg/l IBA ilavesinden elde edildiği tespit edilmiştir. Bu ortamı ise %29.3'lük oranla 4 mg/l IBA dozunun izlediği belirlenmiştir (Şekil 1).

Çizelge 2. Farklı Dozdaki IBA dozlarının Kök Uzunluğu (cm), Kök Sayısı (n) ve Köklenen Eksplant Oranı (%) Üzerine Etkisi

Uygulama	Kök Uzunluğu (cm)	Kök Sayısı (adet)	Köklenen Eksplant Oranı (%)
Kontrol	0.25 b	0 c	11.8 d
0.5 mg/l IBA	0.69 b	1 bc	20.7 c
1.0 mg/l IBA	0.59 b	2 b	23.2 bc
2.0 mg/l IBA	1.76 a	5 a	71.4 a
4 mg/l IBA	0.28 b	1 bc	29.3 b
LSD %5	0.60	1	7.9



Şekil 1. Aktarması yapılan köklü bitkicikten görünüm

Boğum Sayısı/Bitkicik Oranı (n): Araştırmada, her bitkicığın sahip olduğu boğum sayısının farklı IBA dozlarından istatistiksel olarak etkilendiği belirlenmiştir (Çizelge 3). Elde edilen sonuçlara göre diğer çoğu bitkisel gelişim özelliklerinde olduğu gibi 2 mg/l IBA dozunun ortama ilave edilmesiyle en yüksek boğum sayısı taşıyan bitkicikler elde edilebilmiştir (4 adet/bitkicik).

Yaprak Sayısı (n): MS ortamına farklı IBA dozları ilavesinin bitkicikteki yaprak sayısını istatistiksel olarak etkilediği tespit edilmiştir (Çizelge 3). En yüksek yaprak sayısı diğer özellik sonuçlarıyla paralellik göstererek 2 mg/l IBA dozundan elde edilmiştir (4 adet/bitkicik). En düşük yaprak sayısı ise kontrol grubu bitkiciklerinde tespit edilmiştir.

Sürgün Uzunluğu (cm): Sürgün uzunluğu üzerine farklı IBA dozlarının etkisini gösteren sonuçlar Çizelge 3’de gösterilmektedir. Çizelge 3 incelendiğinde, 3.17 cm ile en uzun sürgünü olan bitkicikler 2 mg/l IBA içeren MS ortamından elde edildiği belirlenmiştir (3.17 cm). Bu ortamı 4 mg/l IBA ilave edilen ortam izlemiştir (1.45 cm).

Çizelge 3. Farklı Dozdaki IBA dozlarının Boğum Sayısı (adet), Yaprak Sayısı (n) ve Köklenen Eksplant Oranı (%) Üzerine Etkisi

Uygulama	Boğum Sayısı (adet)	Yaprak Sayısı (adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)
Kontrol	1 c	1 c	1.13 c
0.5 mg/l IBA	3 ab	2 b	1.26 bc
1.0 mg/l IBA	1 c	2 b	1.25 c
2.0 mg/l IBA	4 a	4 a	3.17 a
4 mg/l IBA	2 bc	2 b	1.45 b
LSD %5	1	0	0.19

Sonuçlar ve Tartışma

Bu çalışmada kardeşlendirme ve köklendirme için gerekli olan optimum BA ve IBA dozunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kardeşlendirme açısından denenen BA hormonu dozları içinde en üstün sonuçlar, 1 mg/l BA ve üzeri dozlardan elde edilmiştir. Tangolar ve ark. (1995)'nin sürgün oluşturma ve köklenmeleri için en uygun sitokinin ve oksin konsantrasyonlarını belirledikleri çalışmada sürgün oluşturan eksplantların yüzdesi ve sürgün sayısı/eksplant oranı üzerine 110 R ve 5 BB anaçlarında 0.5 ve 1.0 mg/l; 41 B'de ise sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde 4 mg/l, sürgün sayısı/eksplant oranında 2.0 ve 4.0 mg/l BA'nın en iyi sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Bu açıdan yapılan bu araştırma sonuçlarıyla Tangolar ve ark. (1995) ile Compton ve Gray (1994) in yaptıkları araştırma sonuçlarıyla paralellik gösterdiği yani MS ortamına BA ilavesinin yapılmasıyla elde edilen kardeş sayısında artışın olduğu belirlenmiştir.

Araştırmada elde edilen kardeş bitkiciklerin köklenmesi amacıyla MS besin ortamına ilave edilen değişik dozlardaki IBA'nın köklenme üzerine olan özelliklere olan etkisi değerlendirilmiştir. Ortama oksin ilavesinin bitkiciklerin köklenmesini ve kök kalitesini teşvik ettiği diğer birçok çalışma sonuçlarına dayalı olarak vurgulanmıştır (Gray ve Benton, 1990, Compton ve Gray, 1994, Tangolar ve ark., 1995, Kinfe, 2010). Bu çalışmada da kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm) ve köklenen eksplant oranı (%) açısından en üstün sonuçlar MS besin ortamına 2 mg/l IBA dozunun ilave edilmesiyle sağlanmıştır. Daha önce gerçekleştirilen bu tür çalışmalarda materyal olarak daha çok *Vitis vinifera* türüne ait çeşitler kullanılmıştır.

Yapılan bu çalışmanın *V. labrusca* türünde yer alan Isabella üzüm çeşidini içermesi açısından ayrı önem taşımaktadır. Bunun yanında bu çalışmadan elde edilen sonuçların ileride bu türün çeşit ve tiplerinde gerçekleştirilecek olan ıslah ve özellikle de abiyotik stres çalışmalarında doku kültürünün kullanılmasına öncülük etmesi açısından anahtar rolü oynayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

Barlass, M., Skene K.G.M., 1980. Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. the regenerative capacity

of primordia fragments in vitro. J. Exp. Bot., 31: 483-8.

Blazina, I., Korosec-Koruza, Z., Ravinkar, M., Gogala, N., 1991. Regeneration and micropropagation of the grapevine (*Vitis vinifera* L. 'zelen ') from shoot tip meristem. Acta Horticulturae, 300: 123-126.

Compton, M.E., Gray, D.J., 1994. Micropropagation of southern home hybrid grape. Proc. Fla. State Hort. Soc., 107: 308-310.

Çelik, H., 2004. Kanser ve kalp krizine karşı doğal koruyucu: karadeniz bölgesindeki kokulu kara üzüm. Doğa, Çevre ve Kültür Dergisi, 3:54-61.

Çelik, H., Odabaş, F., Köse, B., Cangı, R., 2009. Samsun'da yetişmekte olan İzabella (*Vitis labrusca* L.) üzüm tiplerinin ampelografik özelliklerinin belirlenmesi. 7. Türkiye Bağcılık ve Teknolojileri Sempozyumu, 5-9 Ekim, Manisa, Cilt 2: 51-56.

Gray, D., Fisher, L.C., 1985. In vitro shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. Proc. Fla. State Hort. Soc., 98:172-174.

Gray, D.J., Benton, C.M., 1991. In vitro micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). Plant Cell Tissue Organ Cult., 27:7-14.

Hartman, J., Bachi, P., 2009. Phomopsis Cane and Leaf Spot and Eutypa Dieback Diseases of Grape. Plant Pathology Fact Sheet. University of Kentucky. United Kingdom.

Jean, P.P., Torregrosa, L., Gilles, B., 1998. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. J. Exp. Bot., 49(319): 171-179.

Kinfe, B., 2010. Multiple shoot regeneration study on three varieties of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from shoot tip and nodal culture. Addis Ababa University School of Graduate Studies, Master Thesis, Ethiopia, 42 p.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15:473-497.

Murashige, T., Skoog, F., 1974. Ann. Rev., Plant Physiol., 25:135-165. Murrell, V. C., Lo, P.L., 2000. Time of leafroller infestation and effect on yield in grapes. New Zealand Plant Protection. 53:173-178.

Cangı, R., 1999. Ordu'da yetiştirilen bazı üzüm çeşitlerinin ampelografik özelliklerinin saptanması üzerine bir araştırma. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 14-17 Eylül. Ankara, 1009-1013.

Burr, T.J., Katz, B.H., Bishop, A.L., Meyers, C.A., 1988. Effect of shoot age and tip culture propagation of grapes on systemic infestations by *Agrobacterium*

- tumefaciens* Biovar 3. Amer. J. Enol. Viticult., 39: 67-70.
- Robacker, C.D., Chang, C.J., 1992. Shoot-tip Culture of Muscadine Grape to Eliminate Pierce's Disease Bacteria. HortScience, 27(5): 449-450.
- Tangolar, S., Gök, S., Çetiner, S., 1995. Bazı Amerikan Asma Anaçlarının In vitro Sürgün Ucu Kültürü ile Çoğaltılması. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 3-6 Ekim 1995. Adana, 544-548.