

## BAĞCILIKTA BIYOTEKNOLOJİ ALANINDAKİ SON GELİŞMELER

H. İbrahim UZUN

İlknur SARIKAYA

Akdeniz Üniversitesi , Ziraat Fakültesi,  
Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya.

**Özet:** Asmalarda biyoteknoloji konusundaki gelişmeler incelenmiştir. Doku kültürü çalışmaları, meristem, protoplast, embriyo ve anter kültürü bazında incelenmiştir. Asmalarda izoenzim teknikleri ve gen transferi konusundaki yöntemler tartışılmıştır.

### Recent Advances in Grapevine Biotechnology

**Summary:** Progresses in grapevine biotechnology were studied. Tissue culture techniques were documented on the basis of meristem, protoplast, embryo, and anther culture. Also, methods dealing with isoenzyme techniques and genetic transformation of grapevine were discussed.

### Giriş

Genel anlamda biyoteknoloji: biyolojik vasıtalar, sistemler veya materyaller kullanarak, ticaret ve sanayi için mal ve hizmet üretimidir. Bu anlamda biyoteknoloji 4 ana grup altında incelenebilir: 1) Biyoişlemler: Fermantasyon sonucunda ilaç, ekmek, şarap gibi ürünlerin elde edilmesi, 2) Doku Kültürü: Bitki veya bitki kısımlarının *in vitro* da; çoğaltımı, patojenlerden arındırılması, genetik materyalin saklanması, yararlı varyantların oluşturulması ve seleksiyonu, 3) İmmünoloji: Bitki hastalık etmenlerinin bulunmasında antikor kullanımı, 4) Genetik mühendisliği: Bitki özelliklerini değiştirmek amacıyla DNA'nın düzenlenmesi(1).

Son yıllarda hızlı bir gelişme sürecine giren biyoteknolojinin, önümüzdeki yüzyıla damgasını vuracak en önemli biyolojik olayların başında geleceği açıktır. Doğrudan insana hitap etmesi açısından, biyoteknolojinin pratikte en yaygın kullanımını tıp ve tarımda bulması doğaldır. Hızlı nüfus artışıyla ortaya çıkan açlık ile mücadelede kullanılacak en büyük araç biyoteknoloji olacaktır. Transgenik bitkilerin ilk olarak elde edildiği 1983 den beri, günümüze kadar sağlanan başarılar, tarımsal biyoteknoloji konusunda ileriki yıllarda büyük atılımlar yapılacağına bir belirtisidir. Günümüzde ticari olarak tarımsal biyoteknoloji alanındaki ilgi üç ana konu üzerinde yoğunlaşmıştır: 1) Hastalık ve zararlılara dayanıklılık, 2) Yabancı ot ilaçlarına tolerans, 3) Gıda kalitesi. Tarımsal biyoteknoloji alanında alınan izinlerin %80 ini bu üç konu oluşturmaktadır. Geri kalan %20 sini ise tütün, pamuk, ormancılık, süs bitkileri ve diğer gıda dışı ürünler

oluşturur. Gıda kalitesinin iyileştirilmesi açısından biyoteknolojinin en fazla kullanıldığı alanlar; ürünlerin raf ömrünü uzatma, kuru madde içeriğini arttırma, protein ve yağ kalitesini iyileştirmektir(2).

Meyvecilik ve bağcılıkta bitkilerin çok yıllık olması, ayrıca genetik ve fizyolojileri konusundaki bilgilerin sınırlı olması gibi değişik nedenler, bunların biyoteknolojide tek yıllık bitkilere göre ikinci planda kalmasına yol açmıştır (3). Bu tip bitkilerde gençlik kısırlığı görülmesi ve ayrıca yüksek orandaki heterozigotluk, gen aktarımıyla yeni bireylerin elde edilmesini zorlaştırır. Diğer taraftan bu tip çalışmalar sonucunda elde edilen bitkilerin özelliklerini gözlemede geniş alanlara gerek duyulması, araştırmacıların çok yıllık bitkilerle çalışma isteğini kırmaktadır. Genel olarak incelendiğinde meyvecilikteki çeşit sayısının, sebze ve süs bitkisi gibi tek yıllık bitkilere göre daha az olmasının nedenlerinden biri de bu durumdur. Aynı olumsuz etki, biyoteknoloji alanındaki çalışmalar için de geçerlidir. Bağcılıkta biyoteknoloji alanında son yıllarda daha ağırlıklı olarak yapılmakta olan çalışmaları, aşağıdaki ana gruplar altında toplamak mümkündür.

## Doku Kültürü

### Embriyo Kültürü

Basit anlamda *in vitro* da belirli ortamlarda embriyoların çimlendirilmesi diyebileceğimiz embriyo kültürü, uzun yıllardan beri çeşitli ürünlerin ıslahında kullanılmaktadır. Bağcılıkta ise değişik ihtiyaçlardan dolayı özellikle son yıllarda, embriyo kültürü üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu konudaki çalışmaların ana amacı: a)Çekirdeksiz çeşitlerin embriyolarının aborsiyona uğramasının önlenmesi ve iki çekirdeksiz çeşidin melezlenmesini sağlayarak, çekirdeksiz döllerin frekansını arttırmak, b) *Euvitis* ve *muscadinia* alt türleri arasında melezlemeyi mümkün kılmak, c) Erkenci üzüm çeşitleri ıslahındaki düşük çimlenme problemini aşmaktır.

a) Bağcılıkta son yıllarda çekirdeksiz üzüme talep artmıştır. Fakat bu tip üzümlerde stenospermi nedeniyle çeşit sayısı son derece sınırlı kalmıştır. Değişik amaçlara ve tüketici kesimlerine hitap edecek çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin geliştirilmesinde stenospermi engelini aşmak için embriyo kültüründen yararlanılması düşünülmüştür. Geleneksel melezleme tekniğiyle çekirdeksiz dölleri elde etmek için, çekirdekli çeşitler ana, çekirdeksiz çeşitler tozlayıcı olarak kullanılır. Fakat bu yöntemde çekirdeksiz dölleri oranı oldukça düşüktür ve bu oran çeşide bağlı olarak en fazla %24 e çıkabilmektedir. Çekirdekli çeşitlerin ebeveynleri arasında çekirdeksiz bir çeşit varsa, çekirdeksizlik frekansı da artmaktadır. Bu durum iki çekirdeksizin melezlenmesi sonucunda çok daha fazla sayıda çekirdeksiz dölleri elde edilebileceğini ifade eder. Bu oranı arttırmak için iki çekirdeksizin melezlenmesi düşünülmüş, fakat geleneksel yöntemlerle bu başarılamamıştır (4). Çünkü

çekirdeksiz çeşitlerin çoğu stenospermik özellik gösterir. Meyve oluşumu için döllenme olur, fakat daha sonra embriyo gelişimi durur ve çekirdekler aborsiyona uğrar. Eğer bu aborsiyon önlenbilirse veya embriyo, gelişmesine özel ortamlarda devam edebilirse, iki çekirdeksizin melezlenmesinden istenilen amaç elde edilebilir. Bazı çekirdeksiz çeşitlerde döllenmeden sonra embriyo gelişiminin durduğu, fakat taneler olgunlaşınca kadar aborsiyona uğramadan kaldığı belirtilmiştir (5). Stenospermik üzümlerde embriyo ve/veya endosperm gelişmesinin durması çiçeklenmeden yaklaşık 2-3 hafta sonra meydana gelir. Ayrıca çiçeklenmede de istenmeyen bazı anormallikler saptanmıştır. Döllenmiş ovullardaki embriyonun gelişme derecesi birkaç hücre oluşumundan, globular safhaya kadar değişir. Bu safhalardaki embriyoların zarar verilmeden kültüre alınıp yetiştirilmesi oldukça güçtür. Uygun gelişme ortamı seçilemezse embriyolar canlılığını yitirir. Ovul içindeki embriyonun gelişmesine, endospermdeki yüksek orandaki amino asitler ve organik asitlerin etkili olduğu belirtilmiştir. Eğer bu maddeler stenospermik embriyoların in vitro da özel gelişme ortamlarına ilave edilirse embriyo gelişiminin teşvik edilebileceği düşünülmüştür (6,7). Embriyo kültürü birçok araştırmada ovul-embriyo kültürü şeklinde ifade edilmiştir. Bunun nedeni, tanelerden önce ovullerin alınması, daha sonra bu ovullerin embriyoları çıkarılarak veya çıkarılmadan kültür ortamında geliştirilmesinden kaynaklanır.

Embriyo kültüründe genel olarak sıvı ve katı olmak üzere iki tip ortam kullanılır. Sıvı ortamda 50 ml ortam içeren 125 ml lik erlenlerde, filtre kağıtları üzerine 20 şer ovul yerleştirilerek kültür yapılır. Katı ortam için 100x15 veya 50x15 mm lik petri kapları kullanılır. Petri başına ilkinde 20, ikincisinde 10 ovul yerleştirilir. Genellikle her iki yöntemde ovul başına elde edilen embriyo sayısı eşittir. Fakat bazı çeşitlerde katı ortam daha iyi sonuç verebilir (8,9). Ortam olarak doku kültüründe kullanılan değişik ortamlardan yararlanılır. Embriyo gelişiminde ortamlar ve genotipler oldukça önemlidir (7). Murashige ve Skoog (MS) ile Nitsch ve Nitsch (NN) ortamı oldukça iyi sonuçlar vermiştir. Ortama aktif kömür ilavesi dokuların kararmasını, ortamın renk değiştirmesini ve kallus oluşumunu azaltır (9, 10, 11, 12).

Çekirdeksiz çeşitlerde embriyo kültüründen alınan bazı başarılı sonuçlar ve bunların alınma zamanları Çizelge 1 de gösterilmiştir. Embriyoların kültüre alınma zamanı da başarıda oldukça etkili faktördür. İlk 14 günde alınan ovullerde anormallikler saptanmıştır. Ancak 38. günden sonraki ovullerde canlı embriyolar gözlenmiştir. Fakat alınma zamanı çeşitlere göre çok değişmektedir. Genellikle çiçekten 40-60 gün sonra alınan ovullerden iyi sonuç alınmıştır (10, 13, 14).

b) Asma ıslahçıları 100 yıldan fazla bir süredir *Euvitis x Muscadinia* alt cinsleri arasında melezleme gerçekleştirmeye çalışmaktadır. Bunun amacı *V. vinifera* (L.)'ların meyve kalitesini, *Muscadinia*'ların hastalık ve sıcaklığa toleransı ile kombine etmektir. Fakat kromozom sayılarındaki farklılıklar

nedeniyle *Euvitis*( $2n=2x=38$ ) X *Muscadinia*( $2n=2x=40$ ) melezlerini elde etmek zordur. Melez oluşturulsa bile verimlilikleri düşüktür. *Euvitis* ana olarak kullanılırsa başarı artmaktadır. Bu engel nedeniyle *Euvitis*'in çekirdeksizlik özelliğini de, *Muscadinia*'lara aktarmak zordur. Fakat *V. rotundifolia* (Michx.) ile tozlanan çekirdeksiz *Euvitis* ovullerinin kültüre alınması sonucu çekirdeksizlik özelliği gösteren melezler elde edilebilir. Bu tip melezlerde çekirdeksizliğin transferi için iki faktörün göz önüne alınması gerekir: 1) Ovullerin in vitro kültürüne uygunluğu, 2) Ebeveyn kombinasyonlarının uyuşması (15, 16, 17). *V. vinifera* (L.) ile *V. rotundifolia* (Michx.) melezlemesinde, 5010 tozlama sonucunda oluşan 565 çöğürden 52 melez elde edilmiştir (16). Benzer bir durum da çekirdeksiz *V. vinifera*(L.)'ların kullanılması durumunda 16 000 tozlamadan 19 melez çekirdeksiz elde edilmiştir. Embriyoların oluşturulmasında çeşitlerle, ovullerin olgunluğu arasında kuvvetli bir ilişki vardır. *Muscadinia*'larda çiçeklenmeden 40 gün sonra alınan ovuller, daha genç olanlara nazaran daha çok sayıda embriyo oluşturmuştur (18).

Çizelge 1. Asmalarda Embriyo Kültüründeki Bazı Başarılı Sonuçlar.

Çeşitler	Kültürün başlangıç tarihi (çiçekten sonra)	Kültüre alınan ovul sayısı	Canlı embriyo yüzdesi	Embriyodan çıkan bitki yüzdesi	Kaynak
<b>MELEZLER</b>					
Seedless V1-4 x K. Moldovski	52.gün 66.gün	160 160	12.5 4.4	5.0 -	11
Perlette x Perlette	52.gün	220	17.2	10.9	9
Perlette X Flame Seedless	52.gün	280	15,3	11.1	
Flame Seedless X Perlette	52.gün	300	25.6	16.3	
Orlando Seedl xOrlando Seedl	60.gün	140	27.9	22.8	8
Venus X Saturn	8 hafta	39	67.0	33.0	13
<b>TEK ÇEŞİT</b>					
Thompson Seedless	6/10hafta	840	5.6	89.4	7
P 60-58	6/10hafta	840	21.4	11.7	

c) Çekirdekli ve erkenci üzüm çeşitlerinde en büyük problem çimlenme yüzdesinin düşüklüğüdür. *In vitro*'da embriyo kültürü ile bu tip çeşitlerin çimlenmesi arttırılmıştır. *In vivo*'ya nazaran embriyo kültürü ile Cardinal ve Sivan çeşitlerinde çimlenme %15 ve %30 oranında arttırılmıştır. Bazı çeşitlerde soğuklatma çimlenmeye neden olmuştur (19).

### Somatik Embriyogenesis

Somatik embriyogenesis(SE), bitkilerin soma hücrelerinden embriyoların ve bunlardan da bitkilerin elde edilmesi anlamındadır. İki şekilde meydana gelebilmektedir (20):

1. Direkt embriyogenesis: Eksplantlar alınmadan önce embriyoların oluşmasıdır. Eğer alınan örneklerde herhangi bir kallus oluşumu olmaksızın SE görülürse, bunların direk embriyogenesissten kaynaklandığı kabul edilir. *Vitis* türlerinde direk embriyogenesis ile ovul başına 1200-1400 somatik embriyo oluşturulmuştur.

2. İndirekt embriyogenesis: Eksplantlar alındıktan sonra, uyarılmayla embriyogenesis oluşturulmasıdır. Uyarımda oksin grubu hormonlar kullanılır. Bunları başında 2,4-D gelmektedir.

Somatik embriyogenesis yoluyla asmalarda bitkiciklerin elde edilmesi ilk olarak sıvı kültür şartlarında 1976 yılında rapor edilmiştir. Daha sonraları katı agar ortamında SE sağlanmıştır. SE oluşumunda eksplant olarak yaprak, petiol, dal, anter, zigotik embriyo, ovul ve ovaryum kullanılabilir. Sıvı ortamda çok sayıda somatik embriyo elde etmek mümkündür. Fakat çoğu zaman bunlardan bitkiciklerin elde edilmesi oldukça zordur ve oluşan embriyoların çoğu anormaldir. Embriyolar küresel ve kalp şekli safhalarına ulaşmalarına rağmen, bundan sonra gelişme bloke olmakta ve çok az embriyo bitkicik oluşturabilmektedir. Bunun nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Bir neden torpido safhasına geçmede besin maddelerinin noksanlığı olabileceği düşünülmüştür. Diğer bir neden ortamda oluşan etilen, asetaldehit, etil alkol ve bazı özel glikoproteinler gibi inhibitör maddelerin varlığıdır. Molekül ağırlığı 10 kDa dan daha ağır olan hücre dışı makro moleküllerin meristem oluşumunu engellediği saptanmıştır (21). SE de bitkilerin elde edilmesi genotipe ve ortama bağlıdır. Eksplantların uygun seçimi, büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları belirli sınırlar içerisinde kaldığı sürece, SE oluşturmada en kritik faktördür. Embriyoların üretilmesi işlemi sadece embriyoların sayısal çoğaltılmasını değil, bunların izolasyonunu, transferini ve bitkinin embriyogenik durumunun 1 yıl kadar muhafazasını kapsamaktadır. SE oluşturmada 1.5-5.0 mm uzunluğundaki yapraklar kullanıldığında başarılı sonuçlar alınmıştır. Bundan daha büyük yapraklar SE oluşturmaz, daha küçükler ise gelişemezler. Embriyonik dokular doğrudan yaprakların orta damarlarından oluşur. Fakat bazı araştırmalarda tam büyüklüğünü almış yaprakların da SE oluşturduğu görülmüştür (22). Yaprak ayasına nazaran petioller daha fazla sayıda SE oluşturabilir.

Embriyolar Nitsch ve Nitsch ortamında 1µM BA ile kültüre alındığında sürgün gelişimi teşvik edilmiş ve oran çeşitlere göre %90 a kadar çıkmıştır. Petiollerin SE de eksplant olarak kullanılmasının avantajları; kolayca alınabilmesi ve kültür ortamına kolayca yerleştirilebilmesidir (23). Yaprak petiollerinden sürgün oluşumu, promeristemlerin epidermal ve subepidermal hücre tabakasından oluşması nedeniyle, eksogen kabul edilmiştir. Petiolleri kültüre aldıktan 3 gün sonra hücre bölünmesi ve 6 gün sonra da belirli üç bölgede meristematik aktivite görülmüştür (24). Ayrıca Petiollerden sürgün oluşumunda, oksin ve sitokininlerin de etkisi olduğu bulunmuştur (25). Yapraklardan elde edilen sürgünler kolayca köklenmiş ve morfolojik olarak alındıkları bitkilere benzemişlerdir (26).

Embriyogenesis oluşturabilmek için kültürün herbir safhasında, ortamdaki 2,4-D , NAA ve BAP konsantrasyonlarının uygun olarak seçilmesi gerektiği belirtilmiştir. Bu durum asmalarda yaprak ve dallardan alınan örneklerde aşağıdaki şekilde formüle edilmiştir (27).

1. safha: dal,yaprak→2,4-D(1mg/l)+ BAP→ Kallus
2. safha: kallus → NAA + BAP(1-5 mg/l)

Olgun üzümün zigotik embriyolarından da somatik embriyolar oluşturulmuştur. Kültüre alınan embriyolar 5 gün içinde gelişmeye başlamış, 20-30 gün sonra zigotik embriyonun kotiledon ve sürgün ucu bölgesinden kallusa benzemeyen beyaz bir doku meydana gelmiş ve 10 gün içinde de bu dokudan globular somatik embriyolar oluşmuştur.Embriyolar düşük nemde ve 5°C sıcaklıkta depolansa bile embriyogenik doku ve somatik embriyo oluşturmuşlardır (28).

Bazı çalışmalarda SE de embriyoların çimlenebilmesi yani bitkicik oluşturabilmesi için soğuklatmaya gerek olmadığı belirtilmiştir (28, 29).Bunun aksine diğer birçok araştırmada embriyonun dinlenmeye girdiği, dinlenmenin yapısal gelişmeyi ve olgunlaşmayı teşvik ettiği, fakat çimlenmeyi açık bir şekilde engellediği ifade edilmiştir. Dinlenmeyi kırmak amacıyla; soğuklatma, dehidratasyon ve dışsal büyüme düzenleyicilerinin (BA; GA) kullanılabileceği belirtilmiştir (30, 31). Yalnız, dinlenme ile çimlenme arasında bir sakinlik(=Quiescence) devresinin de bulunduğu, embriyoların bu dönemde metabolik olarak aktif olmasına rağmen beyaz ve mat kaldıkları ve genellikle herhangi bir ön işlem yapılmadığı sürece çimlenemedikleri belirtilmiştir. Üzümlerde somatik embriyolar, 2-4 haftalık soğuklatma ve GA<sub>3</sub> uygulamasından sonra çimlenebilmiştir. Soğuklatma uygulanmış embriyolarda GA in ön maddeleri (kaurenolik asit, kaurene) artmakta,ABA azalmaktadır. Üzümlerde somatik embriyolarda bulunan doğal gibberellin GA<sub>4</sub> dür. Bu embriyolar 2 haftalık soğuklatmadan sonra %83 oranında çimlenmişlerdir (31, 32).

Anterlerin kültüre alınması yoluyla da *Vitis* türlerinde sürgün oluşturmak mümkündür (33). Bu amaçla açık yeşil renkte, yarı şeffaf, yaklaşık 0.5-1 mm uzunluğunda anterler

kullanılabilir. Anterin embriyogenik yeteneğinin göstergesi anterin uzunluğundan çok, rengidir. Sarı ve daha büyük anterler nadiren embriyogenik dokular oluşturur. Anterler 0.3-0.5 mm den daha küçük olursa gelişme göstermezler (22). Anter kültürü ile oluşan embriyogenik kallusların anterin filamentlere bağlandığı noktadan ve/veya anter duvarıyla buna bağlı yapıların somatik hücrelerinden oluştuğu bulunmuştur. Diğer taraftan anter kültüründe oluşan kallusta hem haploid, hem de diploid hücrelere rastlanmıştır. Haploid hücrelerin orijini polenlerdir. Diploid hücrelerin kaynağı ise diploid vegetatif hücrelerdir ve bu anter kültürü ile oluşan kallusun büyük çoğunluğunu meydana getirir. Böylece oluşan kallusta hem haploid hem de diploid hücreler olmasına rağmen, oluşan bitkicikler diploiddir (34). Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda sadece Çin'de yapılan bir tek çalışmada polenlerden haploid bitki elde edilebilmiştir. Bunun dışında haploid bitki elde edilememiştir. Diğer taraftan diploid Grenache çeşidinin anterlerinden elde edilen bitkilerin kök ucu hücrelerindeki kromozom sayısının triploid (%86.5 oranında) olduğu saptanmıştır. Triploid bitkilerin anterdeki somatik hücrelerden çok mikrosporlardan oluştuğu kabul edilmiştir. Bu mikrosporlar ise vegetatif çekirdek ile generatif çekirdeğin birleşerek (karyomiksis) gelişiminden oluştuğu ifade edilmiştir (35). Asmalarda anter kültürüyle haploid bitki elde edilememesinin nedeni, haploidinin *V. vinifera*(L.)'larda letal bir durum olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (36).

#### Meristem Kültürü

Asmalar *in vitro* da ilk kültüre alınan(1944) bitkilerdendir. Fakat önceleri pek başarı sağlanamamış ve bu açıdan asma inatçı bir bitki olarak kabul edilmiştir. Daha sonra 1950 ve 1960 11 yıllarda bu konuda bir çok çalışma yapılmıştır. 1960 başlarında virüslerden arındırılması için doku kültürüne başvurulmuştur. önceleri kallus ve kök oluşumu sağlanmışsa da, organ oluşumu ilk olarak 1976 yılında bildirilmiştir (36). Asmalarda 4 aylık bir süre içerisinde tek bir sürgün ucundan sadece iki alt kültür yapmak suretiyle 8000 bitki elde edilebilir. Sürgün ve kök oluşturma başarısı %100 gibi yüksek bir rakama ulaşabilir (37).

Sürgün ucu meristem kültürü; mikro üretim, genetik materyalin depolanması ve virüsten arındırmada kullanılmaktadır. Son yıllarda bazı bakterilerden arındırmada da kullanılabileceği belirtilmiştir. Bu bakterilerin başında *Agrobacterium tumefaciens* (kök uru) ve *Xylella fastioliosa* (pierce's hastalığı) gelmektedir (38, 39).

Asmalarda meristem kültüründe, sürgün ucu sadece meristem hücrelerinin olduğu kubbe 0.2-0.4 mm olacak şekilde alınabilir. Bu kısım 1 mm kadar büyüklükte olursa bazı yaprak taslaklarını da içermektedir. Kimera gösteren asmaların sürgün ucu meristem kültürüyle üretimi önerilmez. Eğer bu işlem virüsten arındırma amacıyla yapılıyorsa, indeksleme sırasında genetik kararlılık gözlenmelidir (40). Sürgünlerin alınma zamanındaki boyu da

önemli bir faktör olabilir. Bu açıdan sürgünler 10 cm boyunda olduğunda alınan sürgün uçlarında daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir (41).

Dokuların özellikle kültür başlangıcında nekrozu ve kararması odunlu bitkilerin *in vitro* da kültürünü güçleştirmektedir. Bu problemi azaltmak için; ortama antioksidanlar katılmakta, eksplantlar antioksidanlar ile muamele edilmekte, kültürler karanlıkta yetiştirilmekte ve alt kültürler sıkça tazelenmektedir. Dokuların kararması eksplant'ın kaynağıyla da yakından ilgilidir. Asmalarda koltuk sürgünü ana sürgüne; gölgede yetişen sürgünler güneş görenlere nazaran daha başarılı sonuçlar vermiştir. Ayrıca sürgün uçlarının toplam fenol içeriği ile eksplantların canlı kalması arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır (42). Asmalarda meristem kültüründe çeşit veya türlere göre ortamlar da farklı sonuçlar alınabilmektedir. Genelde Mürashige ve Skoog ortamında ve bunun modifikasyonlarından olumlu sonuçlar alınmıştır. Bunun yanında bazı özel ortamlardan da başarılı sonuçlar alınmıştır (43,44,45).

*In vitro* da yetiştirilen sürgünlerin gelişme özellikleri; sülüklerin ve spiral dizilişin olmayışı, yapraklarda yan ceplerin bulunmayışı vb. bazı özellikler açısından tohumdan çıkan çöğürlere benzer. Bunlar *in vitro* da yetiştirilen asmaların genel özellikleridir. Fakat bu bitkiler sera şartlarına transfer edildiklerinde olgun asmaların özelliklerini gösterir (46). Benzer olarak *in vitro* kültüründe elde edilen bitkilerin yukarıda belirtilen gençlik kısırlığı özellikleri yerine, olgun bitki özelliklerini göstermesini sağlamak için CO<sub>2</sub> uygulaması yapılmıştır. Fakat burada CO<sub>2</sub> köklenmeyi engellediği için işlem iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Önce bitkicikler köklendirilmiş, sonra CO<sub>2</sub> uygulanmıştır (47). Bağcılıkta meristem kültürü pratikte daha çok asmaları virüsten arındırmada kullanılmaktadır.

### Protoplast Kültürü

Protoplast kültürü, değişik organlardan elde edilen hücrelerde, mekanik olarak veya çeşitli enzimler kullanarak hücre duvarının eritilmesi ve daha sonra bu hücrelerin kültüre alınarak bitki elde edilmesi esasına dayanır. Protoplast, hücre duvarından yoksun olan hücrelere verilen isimdir. Asmalarda protoplastların izolasyonu ve kültürü yapılarak mikrokallus veya kallus oluşumu konusunda başarılar sağlanmış ise de son yıllara kadar bitki elde edilememiştir. Yalnız, 1994 yılında protoplast kültürüyle bitki eldesi de sağlanmıştır (48).

Asmalarda protoplastlar daha çok yapraklar, üzüm taneleri, dallar, sürgün ucu, yaprak sapı ve köklerden elde edilebilir. Özellikle tane, yaprak ve dallardan oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır (49, 50, 51, 52). Protoplastlar daha çok yapraklardaki mezofil tabakasından, tanelerde ise tane kabuğundan elde edilmiştir. Mezofilden sağlanan praotoplastlar çapları 8-32 mm, tane kabuğu protoplastları ise 50-60 mm arasında değişir. Tane



kabuğu protoplastları, mezofil protoplastlarına nazaran daha iridirler, daha büyük vakuollere ve daha az sayıda kloroplastlara sahiptirler (52). Yaprakların yaşı ve büyüklüğü izolasyonda önemli bir faktördür. Bir aydan daha genç yapraklar veya çapı 7 cm den daha az olan yapraklardan az sayıda ve düşük canlılıkta protoplastlar elde edilmiştir (53). Fakat başka bir çalışmada optimum yaprak büyüklüğü, tarlada ve serada yetiştirilen bitkiler için 7 cm den az yaprak uzunluğu veya 400 mg dan daha az yaprak ağırlığı olarak bulunmuştur. *In vitro* da yetiştirilen bitkilerde ise optimum yaprak büyüklüğü için taze ağırlığın 50-100 mg arasında olması gerektiği saptanmıştır (51).

Protoplastların kalitesi, hücre duvarını eritme (digestion) işleminden önce yaprakların aldığı ışık yoğunluğu tarafından etkilenir. Çoğu araştırmacılar eritme işleminden önce, yaprakları gölge bir yere veya düşük ışık yoğunluğundaki kontrollü çevre şartlarına birkaç saatliğine koyarlar. Bu süre 4-24 saat arasında değişir. Yaprakların ışıkta kalması protoplast verimini 5 kat azaltmıştır (53). Kültürden önce yüksek ışık yoğunluğu uygulamasının protoplast verimliliğini azaltmasının nedeni, kloroplastlardaki hızlı renk açılmasına bağlanmıştır (54). Ayrıca doku kitlesinin eritme ortamına oranı da protoplast verimini etkiler. En iyi sonuçlar 100-150 mg/ml lik oranlarda alınmıştır. Hücre duvarını eritme amacıyla daha çok Cellulase, Macerozyme, Cellulysin, Driselase, Pectolyase ve Pectinase gibi enzimler kullanılır. Enzimlerin kombine kullanılması durumunda daha iyi sonuç alınır (52, 53). Sıcaklık ta önemli bir faktördür. 22°C altındaki ve üstündeki sıcaklıklar protoplast verimini düşürür (52). Fakat 22-28 °C sıcaklığın uygun olduğunu belirten çalışmalar da vardır (54). Kültür ortamının filtre edilmesi, ortamın otoklavda sterilize edilmesine göre daha iyi sonuç vermiştir (55).

Protoplastların bölünmeye başlaması 4-7 gün içinde görülür. Fakat 5 haftaya kadar uzayabilir. Yeniden hücre duvarı oluşumu 3-10 gün içinde gerçekleşir, 4 hafta sonra hücre yığınları oluşur. 6 hafta sonra da protoplastlardan %70 i mikrokallus oluşturur (53, 56).

Asma yapraklarından canlı protoplastların izole edilmesi ve gelişimini engelleyen en önemli faktörlerden biri, protoplastlar tarafından salgılanan fenolik maddelerin birikimi nedeniyle ortamın kahverengileşmesidir. Ayrıca ortamda oluşan yüksek asit de önemli bir problemdir. Bu durumlar ortama deterjan ve indirgen maddelerin ilavesini veya uygun tamponlamayı gerektirir. Fakat bunlar protoplastlarda zararlanmalara yol açabilir (51). Ortamın pH sı 5,5-5,8 arasında tutulmalıdır (54). Ortama %0.5 PVP ilavesi kahverengileşmeyi önleyememiş fakat miktarını azaltmıştır. Aktif kömür ise ortamdaki kahverengileşmeyi önlemiş fakat aynı zamanda hücrelerin koloni oluşturma etkinliğini (plating efficiency) engellemiştir. Aktif kömürün bu olumsuz etkisi; doğrudan engelleyici etkisi şeklinde olabileceği gibi protoplastların gelişmesi için gerekli olan maddeleri de absorbe etmesinden kaynaklanabilir (50, 57). Elde

edilen protoplastların kültürü konusunda değişik yöntemler uygulanmaktadır. Katı (agar) ve sıvı ortamlar kullanılabilir. Ortamdaki protoplast yoğunluğu protoplastların bölünmesini etkiler. Herbir ml deki hücre sayısı  $0,1 \times 10^5$  den az ve  $10^6-10^7$  den fazla olursa bölünme olumsuz etkilenir. Ortama bazı büyüme düzenleyicileri (NAA, 2,4-D, BA vb.) ile glutamine, hindistan cevizi sütü gibi maddeler de ilave edilebilir(51, 53).

Protoplast kültürüyle yapılan son çalışmada ümit verici sonuçlar alınmış ve bitkicikler elde edilmiştir. Yapraklardan elde edilen protoplastlardan önce kallus, sonra da bitkicikler oluşturulmuştur. Burada CPW-13 ortamına NOA/TDZ hormonları ilave edilerek, kültürün başlamasından 6-8 hafta sonra 0,5-1,5 mm büyüklüğünde mikrokallus oluşturulmuştur. Bunlardan da NN ortamında ve NOA/TDZ ilavesiyle somatik embriyogenesis sağlanmıştır. Bitkilerin regenerasyonu hormonsuz NN ortamında gerçekleştirilmiştir(48).

### Genetik (Moleküler) Markörler

Bitki özelliklerinin genetik kontrolü ve kalıtımı hakkında bilgi veren maddeler markör olarak bilinir. Bu amaçla fenotopik özellikleri içeren morfolojik markörlerin yanısıra, biyokimyasal markör olarak da uçucu yağlar, aromatik bileşikler, pigmentler v.s. incelenmektedir. Fakat esas önemli olanlar ise taksonomi ve kalıtım açısından daha önemli bilgileri içeren genetik markörler veya moleküler markörler diye de bilinen izoenzimler ve DNA lardır. Genetik markörlerin, biyokimyasal ve morfolojik markörlere tercih edilmesinin esas nedeni bunların çevre şartlarının etkisi altında kalmamasıdır.

Genetik markörlerin pratikteki kullanımı başlıca iki alanda yoğunlaşmıştır (58):

a) Genetik ilişkilerin açıklanmasında bu markörlerden yararlanmak. Bunun başlıca uygulamaları çeşitlerin tanısı, ıslahçı haklarının korunması ve ebeveynlerin tanımlanmasıdır.

b) Kantitatif özellikleri etkileyen lokusların haritalarının çıkarılmasında ve tanısında genetik markörlerin kullanımı, ayrıca bu lokuslardan ıslah çalışmalarında yararlanılmasıdır.

Klonlar ve çeşitler arasındaki farklılıkları ortaya koymada gen ürünlerinden çok, doğrudan genleri analiz etmek daha güvenilirdir. Bu açıdan DNA analizleri en iyi yöntemdir. Fakat bu analizler basit ve ucuz değildir. Bunun yerine genlerin ilk ürünleri olan izoenzimler daha kolay ve ucuz bir şekilde analiz edilebilirler.

DNA analizleri konusunda yararlanılan yöntemlerin başında RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ve RAPD (Random amplified polymorphic DNA) gelmektedir. Bu yöntemler DNA yapısındaki farklılıkları nükleotid sekansları seviyesinde yansıtan yöntemlerdir. Böylece farklılıklar objektif olarak

gözlenir ve çevre şartlarından etkilenmezler. İki çeşidin aynı bant desenlerini gösterme olasılığı  $5.64 \times 10^{-8}$  gibi çok düşük bir orandır. Aynı bant desenine sahip farklı isimdeki çeşitlerin aslında aynı çeşit olduğuna, ancak bu sayede karar verilebilir (59). Üzüm çeşitlerinin yanısıra anaçlarda RFLP analizinde çeşitlerin DNA desenleri farklı bulunmuştur. Fakat bir çeşitteki klonlar arasında ise fark bulunmamıştır (60). RFLP analizi daha önce izoenzim teknikleriyle ayırt edilemeyen bazı üzüm çeşitlerinin genetik olarak farklı olduğunu ortaya koymuştur. Fakat daha sonra geliştirilen RAPD tekniği potansiyel olarak RFLP den daha kullanışlıdır. Bu yöntemde, DNA konsantrasyonunun düşük olmasından ortaya çıkan problemler de ortadan kalkmıştır. Bu nedenle RAPD nın çabuk ve tutarlı bir DNA analiz tekniği olduğu belirtilmiştir (61). RAPD sayesinde çeşitlerin ebeveynleri de daha sağlıklı olarak saptanabilmektedir. Örneğin daha önce bilinenlerin aksine Müller-Thurgau üzüm çeşidinin Riesling ve Silvaner melezeninden elde edilmediği bu yöntemle saptanmıştır (62).

Izoenzim analizi konusunda nişasta jel elektroforezi (NJE), Poliakrilamid jel elektroforezi (PAJE) ve izoelektrik fokussing (IEF) en çok kullanılan yöntemlerdir. Bantların elde edilmesinin esası NJE ve PAJE de proteinlerin farklı moleküler ağırlıkta olmalarına, IEF de ise proteinlerin net elektriksel yüklerine dayanır (63).

Genler organlara özgündürler. Bu nedenle karşılaştırmalarda aynı organdaki izoenzimler kullanılmalıdır. Yaprak, meyve, dal, kök kallus, floem, polen ve çekirdek izoenzim ve proteinleri incelenen asma kısımlarıdır. Izoenzimlerin ekstraksiyonundaki en büyük zorluk, özellikle ortamda fenol bulunmasıdır. Çünkü ekstraksiyon sırasında fenoller proteinlerle reaksiyona girerek bunları inaktif hale sokarlar. Dolayısıyla enzimler elde edilemez. Bu nedenle ekstraksiyon ortamına indirgen maddeler ve fenolleri absorbe eden polimer maddeler (PVP vb.) ilave edilmektedir (64). Diğer bir çözüm ise ekstraksiyonda; polen, floem ve çekirdek (testa hariç) gibi az fenol içeren veya hiç içermeyen bitki kısımlarının kullanılmasıdır.

Çeşitlerin ayırt edilmesinde sadece birkaç enzim yeterli olmayabilir. Ne kadar fazla sayıda enzimle çalışılırsa ve benzerlik veya farklılıklar karşılaştırılarak teyit edilirse çalışmadan o derecede güvenli sonuçlar elde edilir. Teşhislerde benzerliklerden çok, farklılıkları bulmak esastır. Aynı bant desenini gösteren iki çeşide aynı çeşittir denilemez. Çünkü incelemeye alınmayan enzimler bakımından bu çeşitler arasında farklılıklar olabilir. Fakat farklı izoenzim bant deseni gösteren iki çeşit veya biotipin birbirinden genetik açıdan farklı olduğunu söyleyebiliriz. Çeşitler arasındaki farklılıkların izoenzim düzeyinde ayırt etmek mümkün olmasına karşın, aynı çeşidin klonlar arasındaki farklılıklar izoenzimlerden saptamak pek mümkün değildir. Bu durumda daha güvenilir sonuçlar DNA analizlerinden sağlanabilir.

Diğer taraftan izoenzim analizinde bazı enzimler zaman veya organ ve dokulara göre çok kararlı bir yapı göstermesine karşın, bazılarının izoenzim bant desenleri çevre şartlarındaki değişiklikler göre az çok karasızlık gösterebilmektedir. Bu açıdan GPI (Glucosephosphate isomerase) ve PGM (Phosphoglucomutase) en kararlı enzimlerdendir (65). Izoenzim çalışmalarında bant sayısı veya lokus sayısı az olan enzimlerden çok, bunların makul düzeyde fazla olduğu enzimlerdeki bantların yorumlanması daha iyi sonuç vermektedir.

Polenlerden ekstrakte edilen protein bantlarının çevre şartlarından (anaçlar, toplama zamanı, yetiştirme koşulları) etkilenmedikleri saptanmıştır. Polenleri incelenen 37 çeşidin, 11 enzim sistemi açısından 2-23 arasında değişen farklı bant deseni grubu oluşturduğu saptanmıştır (66). Kontrollü melezleme yapılan çeşitlerde F<sub>1</sub> generasyonunda incelenen 9 polen enzimi bakımından 10 lokus olduğu saptanmıştır (67). Polenlerden ekstrakte edilen proteinler ise zamana göre kararlılık gösterdiği ve çevre şartlarından bağımsız olduğu bulunmuştur (68). Çeşitlerin veya klonların teşhisinde polen proteinleri de markör olarak kullanılabilir (69). Fakat polenlerin kullanımını sınırlayan en önemli faktörlerden biri, çiçeklenmenin dolayısıyla polenlerin elde edilmesinin nisbeten dar bir zaman aralığında gerçekleşmesidir. Bu ise özellikle çok sayıda çeşitle çalışılması durumunda sınırlayıcı bir faktördür. Polen yerine daha geniş zaman aralığında örnek alınabilecek, çevre ve yaşa bağlı varyasyonların en az olduğu bitki parçaları da önem kazanır. Bu amaçla çubuktaki floem dokularının incelenmesi önerilmektedir. Asmalarda 313 farklı çeşidin dormant çubuklarından sağlanan floemde yapılan peroksidase izoenzim analizinde 38 farklı bant deseni saptanmıştır (63). Üzümlerde çekirdeğin çeşit teşhisinde kullanılmasının avantajı, çekirdekteki embriyonun çok ufak olması ve proteinlerin daha çok endospermlerde yoğunlaşmış olmasıdır. Böylece tozlanmadan kaynaklanabilecek varyasyonun yok denecek kadar az olması yanında, çevresel faktörlerin etkisi de sınırlıdır. Asma çekirdeklerinde yapılan iki boyutlu jel elektroforezinde depo proteinlerinin yüksek derecede polimorfik olduğu görülmüş ve yaklaşık 300 polipeptit saptanmıştır (70). Bu ise polipeptit desenlerinin çeşitlere göre yorumlanmasını güçleştirmektedir.

izoenzim çalışmalarındaki en büyük beklentilerden biri melezleme yapılan çok yıllık bitkilerde genetik özellikleri erken safhada örneğin gençlik kısırlığı döneminde bile ortaya koyabilmektir. Böylece genlerin veya özelliklerin kalıtımı daha kısa sürede incelenebilecektir. Bu açıdan öncelikli olarak incelenecek organ yapraklardır. *V. Vinifera* X *Muscadinia rotundifolia* melezlerinin F<sub>1</sub> çöğürleri arasındaki farklılıklar, erken dönemde ayırt edilebilmiştir (71). Benzer olarak iki kompleks çeşidin melezlemesinden elde edilen çöğürlerin yapraklarında incelenen 11 enzimde 8 yeni lokus saptanmıştır (72). Yine yapraklardan ekstrakte edilen GPI ve PGM izoenzimleri incelenen 145 üzüm çeşidininin 52 farklı bant deseni grubu oluşturduğu saptanmıştır (73). Verime yatmış bağlarda ise

çeşitlerin ayırt edilebilmesinde yararlanılabilecek en önemli organlardan biri de olgun tanelerdir. Bu açıdan incelenen 60 üzüm çeşidinin ayırt edilmesinde, incelenen enzimlerden dördünün çok uygun olduğu saptanmıştır (74).

Benzer olarak *in vitro* çalışmalarında da enzim markörlerinden yararlanılabilir. Somatik embriyogenesisin değişik safhalarında örneğin morfogenik olmayan kallus ile embriyogenik kallus ve embriyo arasında izoenzim bant desenlerinin farklılık gösterdikleri saptanmıştır (75). Ayrıca doku kültüründen elde edilen bitkilerin orijinal ebeveynleri ile farklılık gösterip göstermediği başka bir deyişle *in vitro* da mutasyona uğrayıp uğramadığı da izoenzim analizlerinden anlaşılabilir (76).

izoenzim markörlerinin kullanılmasındaki ana amaçlardan biri de, izoenzim bantları ile kalitatif veya kantitatif özellikler arasında bir ilişki kurmaktadır. Dolayısıyla ıslah çalışmalarında bu ilişkiden yola çıkarak erken seleksiyon sağlayabilmektir (71). Fakat asmaların oldukça yüksek heterozigotik yapı göstermesi nedeniyle şimdiye kadar böyle bir ilişki tam olarak saptanamamıştır.

#### Genetik Transformasyon

Asma ıslahçıları yıllardır hastalık ve zararlılara dayanıklı, meyve kalitesi ve olgunlaşma zamanı düzenlenmiş asmalar elde etmek amacıyla melezlemeler yapmaktadır. Fakat bu ıslah çalışmalarında heterozigotluk, melezleme depresyonu, bağıcılık açısından önemli özelliklerin çok genli kalıtım göstermesi, uzun generasyon zamanı, genotip-çevre interaksyonu ve seleksiyon kriterlerinin subjektifliği gibi nedenlerden dolayı pekçok problemlerle karşılaşmaktadır. Geleneksel ıslah yöntemleriyle, karşılaşılan bu problemlerin tam olarak üstesinden gelinememiştir. Çünkü, istenmeyen diğer genetik özelliklerden arındırılmış tek bir geni bir genoma aktarmak oldukça güçtür. Biyoteknolojiden beklenen ise geleneksel üzüm çeşitlerinin özelliklerini etkilemeksizin, bunların genomlarına bağıcılık açısından önemli olan genlerin aktarılmasıdır (77, 78).

Gen transferi konusunda kullanılan en genel yöntem *Agrobacterium* yardımıyla transformasyondur. Hastalığa neden olan özelliklerinden arındırılan *Agrobacterium* hatlarına yeni genler ilave edilir. Bu bakteri bitki hücrelerini infekte edince, yüklenen genler de hücrelere geçmiş olur. Bu hücrelerden oluşturulan bitkilere de transgenik bitkiler adı verilir. *Agrobacterium* yardımıyla gen aktarımında başarının sırrı eksplantlardır. Bunlar gen aktarımına ve bitki oluşturmaya uygun olmalıdır. Bu açıdan kullanılan bitki *Agrobacterium*'un konukçusu olmalı ve eksplant dokuları enfeksiyona karşı hassas olmalıdır. Doğada asmalarda hastalık yapan *Agrobacterium tumefaciens*, "Biovar 3" dür. Oysa bitkilerde gen vektörü olarak kullanılan hat ise "Biovar 1" dir ve farklı özelliklere sahiptir. Fakat bu hattın da asma hücrelerini infekte

edebildiği ve gen transferini sağladığı belirtilmiştir (78, 79). Benzer olarak *Agrobacterium rhizogenes* yardımıyla gen aktarımı sağlanmış bitkiler elde edilmiştir (77, 81). Gen aktarımı konusunda yararlanılan diğer yöntemler ise protoplast füzyonu ve biolistik transformasyondur. Fakat bağıcılıkta bu konuda sağlanan gelişmeler oldukça yavaştır. Kullanılan yöntemlerin iyileştirilmesi ve uygulanabilir olması konusunda çalışmalar devam etmektedir (82). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, diğer bazı bitkilerde sağlandığı gibi tam anlamıyla transgenik asmalar elde edilememiştir.

## Sonuç

Son yıllarda önemli bir gelişme sürecine giren biyoteknoloji konusunda, bağıcılık alanında da önemli adımlar atılmıştır. Bunların başında çekirdeksiz yeni çeşitlerin eldesini güçleştirilen embriyo aborsiyonu, ovul-embriyo kültürü ile aşılarak iki çekirdeksiz melezlenmesi ve dolayısıyla istenilen özelliklere sahip yeni çekirdeksiz çeşitlerin eldesi kolaylaşmıştır. Son olarak protoplast kültürüyle bitki regenerasyonunun sağlanması ve ayrıca DNA'nın yeniden düzenlenmesini sağlayan RAPD ve RFLP gibi tekniklerle elde edilen başarılar yakın bir gelecekte transgenik asmaların da elde edilebileceği müjdesini vermektedir. Dünyadaki bu hızlı gelişmelerden yurdumuz da yararlanma yoluna gitmeli ve bu konuda yapılacak çalışmalar öncelikli olarak desteklenmelidir.

## Kaynaklar

1. Schaff D. A. Biotechnology— Gene Transfer: Terminology, Techniques, and Problems Involved. HortScience, 26, 8, 1021-1024, 1991.
2. Beck C. I., T. Ulrich. Biotechnology in the Food Industry. Bio/Technology, 11, 895-900, 1993.
3. Scorza R. Gene Transfer for the Genetic Improvement of Perennial Fruit and Nut Crops. Hortscience, 26, 8, 1033-1035, 1991.
4. Ramming D. W., R. L. Emershad, R. Tarailo, J. X. Chaparro, B. D. Mowrey. The Zygotic Origin of Hybrids from Thompson Seedless Grape, *Vitis vinifera* L. Vitis, 30, 11-15, 1991.
5. Barritt B. H. Ovule Development in Seeded and Seedless Grapes. Vitis, 9, 7-14, 1970.
6. Emershad R. L., D. W. Ramming. In-ovulo Embryo Culture of *Vitis vinifera* L. c.v. 'Thompson Seedless'. Amer. J. Bot., 71, 6, 873-877, 1984.
7. Emershad R. L., D. W. Ramming, M. D. Serpe. In ovulo Embryo Development and Plant Formation from Stenospermic

- Genotypes of *Vitis vinifera*. Amer.J.Bot.,76,3,397-402, 1989.
8. Gray D. J., L. C. Fisher, J. A. Mortensen. Comparison of Methodologies for in Ovulo Embryo Rescue of Seedless Grapes. HortScience,22, 6, 1334-1335, 1987.
  9. Spigel-Roy N. Sahar, J. Baron , U. Lavi. *In vitro* Culture and Plant Formation from Grape Cultivars with Abortive Ovules and Seeds. J.Amer.Soc.Hort.Sci.,110,1,109-112, 1985.
  10. Cain D. W., R. L. Emershad R. E. Tarailo. In-Ovulo Embryo Culture and Seedling Development of Seeded and Seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). Vitis, 22, 9-14, 1983.
  11. Tsoлова V. Obtaining Plants Crosses of Seedless Grapevine Varieties by Means of *in vitro* Embryo Culture. Vitis, 29, 1-4, 1990.
  12. Gribaudo I, R. Zanetti, R. Botta, R. Vallania, I. Eynard. *In ovulo* Embryo Culture of Stenospermocarpic Grapes. Vitis, 32, 9-14, 1993.
  13. Fernandez G. E., J. R. Clark, J. N. Moore. Effect of Seedcoat Manipulation on the Germination of Stenospermocarpic Grape Embryos Cultured in Ovulo. HortScience, 26, 9, 1220, 1991.
  14. Singh Z., S. J. S. Brar. *In vivo* Development of Ovule in Seedless and Seeded Cultivars of Grapes (*Vitis vinifera* L.) — a Particular Reference to *in ovulo* Embryo Culture. Vitis, 31, 77-82, 1992.
  15. Goldy R. G., U. Amborn. In Vitro Culturability of Ovules from 10 Seedless Grape Clones.HortScience, 22, 5, 952, 1987.
  16. Goldy R. G., D. W. Ramming, R. L. Emershad, J. X. Chaparro. Increasing Production of *Vitis vinifera* X *V.rotundifolia* Hybrids Through Embryo Rescue.HortScience,24,5,820-822,1989.
  17. Goldy R., R. Emershad, D. Ramming, J. Chaparro. Embryo Culture as a Means of Introgressing Seedlessness from *Vitis vinifera* to *V. rotundifolia*. HortScience,23,5,886-889, 1988.
  18. Gray D. J., L. A. Hanger. Effect of Ovule Maturity on Recovery of Zygotic Embryos and Embryogenic Cultures from Muscadine Grape. HortScience, 28, 3, 227, 1993.
  19. Ramming D. W., R. L. Emershad. Embryo Culture of Early Ripening Seeded Grape (*Vitis vinifera*) Genotypes. HortScience, 25, 3, 339-342, 1990.
  20. Wann S. R. Somatic Embryogenesis in Woody Species. Horticultural Reviews, 10, 153-181, 1988.

21. Thevenot P. C., I. G. Tourand, M. C. Mauro, J.P. Jouanneau, M. Boulay, A. Deloire J. Guern. Somatic Embryogenesis from Grapevine Cells. I-Improvement of Embryo Development by Changes in Culture Conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 29, 125-133, 1992.
22. Stamp J. A., C. P. Meredith. Somatic Embryogenesis from Leaves and anthers of Grapevine. *Scientia Horticulturae*, 35, 235-250, 1988.
23. Robacker C. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Muscadine Grape Leaf Explants. *HortScience*, 28, 1, 53-55, 1993.
24. Colby S. M., A. M. Juncosa, J. A. Stamp, C. P. Meredith. Developmental Anatomy of Direct Shoot Organogenesis from Leaf Petioles of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Amer. J. Bot.*, 78, 2, 260-269, 1991.
25. Reisch B. I., M. H. Martens, Z. M. Cheng. High Frequency Regeneration from Grapevine Petioles: Extension to New Genotypes. 5. Int. Simp. on Grape Breeding, 419-422, 1990.
26. Stamp J. A., S. M. Colby, C. P. Meredith. Direct Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Leaves of Grape (*Vitis* spp.). *Plant, Cell and Tissue Organ Culture*, 22, 127-133, 1990.
27. Marchenko A. O., Induction of Embryogenesis in Primary Calluses from Grape Stem and Leaves. *Fiz. Rast.*, 38, 3, 580-590, 1991.
28. Stamp J.A., C. P. Meredith. Proliferative Somatic Embryogenesis from Zygotic Embryos of Grapevine. *J. Amer. Soc. Hort.*, 941-945, 1988.
29. Krul W. R., J. F. Worley. Formation of Adventitious Embryos in Callus Cultures of 'Seyval', a French Hybrid Grape. *J. Amer. Soc. Hort. Science*, 102, 3, 360-363, 1977.
30. Martinelli L., P. Bragagna, V. Poletti, A. Scienza. Somatic Embryogenesis from Leaf- and Petiole-derived Callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell Reports*, 12, 207-210, 1993.
31. Gray D. J. Effects of Dehydration and Exogenous Growth Regulators on Dormancy, Quiescence and Germination of Grape Somatic Embryos. *In Vitro Cell.Dev.Biol.*, 23, 1173-1178, 1989.
32. Pearce D., R. P. Pharis, K. Rajasekaran, M. G. Mullins. Effect of Chilling and ABA on (<sup>3</sup>H) Gibberellin A<sub>4</sub> Metabolism in Somatic Embryos of Grape (*Vitis vinifera* L. X *V. rupestris* Scheele). *Plant Physiol.*, 80, 381-385, 1987.



33. Hirebayashi T., I. Kozaki, T. Akihama. *In vitro* Differentiation of Shoots from Anther Callus in *Vitis*. *HortScience*, 11, 5, 511-512, 1976.
34. Rajasekaran K., M. G. Mullins. The Origin of Embryos and Plantlets from Cultured Anthers of Hybrid Grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34, 2, 108-113, 1983.
35. Wei L., C. Ziyi. Origin of Triploid Plants from Anther Culture of *Vitis vinifera* var. Grenache. *Vitis*, 32, 191-196, 1993.
36. Mullins M. G. Applications of Tissue Culture to the Genetic Improvement of Grapevines. 5. *Int. Simp. on Grape Breeding*, 399-407, 1990.
37. Barlass M., K. G. M. Skene. *In vitro* Propagation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) from Fragmented Shoot Apices. *Vitis*, 17, 335-340, 1978.
38. Thies K. L., C. H. Graves. Meristem Micropropagation Protocols for *Vitis rotundifolia* Michx. *HortScience*, 27, 5, 447-449, 1992.
39. Robacker C. D., C. J. Chang. Shoot-tip Culture of Muscadine Grape to Eliminate Pierce's Disease Bacteria. *HortScience*, 27, 5, 449-450, 1992.
40. Skene K. G. M., M. Barlass. Studies on the Fragmented Shoot Apex of Grapevine. IV. Separation of Phenotypes in a Periclinal Chimera In Vitro. *Jour. Exper. Bot.*, 34, 147, 1271-1280, 1983.
41. Gray D. J., C. M. Benton. In Vitro Micropropagation and Plant Establishment of Muscadine Grape Cultivars (*Vitis rotundifolia*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 7-14, 1991.
42. Yu D., Carole P. Meredith. The Influence of Explant Origin on Tissue Browning and Shoot Production in Shoot Tip Cultures of Grapevine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 11, 6, 972-975, 1986.
43. Roubelakis-Angelekis K. A., S. B. Zivanovitch. A New Culture Medium for *in vitro* Rhizogenesis of Grapevine (*Vitis* spp.) Genotypes. *Hortscience*, 26, 12, 1551-1553, 1991.
44. Chée R., R. M. Pool. Improvement Inorganic Media Constituents for In Vitro Shoot Multiplication of *Vitis*. *Scientia Hort.*, 32, 85-95, 1987.
45. Singh Z., S. J. S. Brar. *In vitro* Plant Regeneration in Seedless Grapes (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 32, 229-232, 1993.

46. Skene K. G. M., M. Barlass. Micropropagation of Grapevine. Int. Plant. Prog. Soc. Proc, 564-570, 1986.
47. Fournioux J.C., R. Bessis. Use of Carbon Dioxide Enrichment to Obtain Adult Morphology of Grapevine *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 33, 51-57, 1993.
48. Reustle G., M. Harst, G. Allewelt. Regeneration of Grapevine (*Vitis* sp.) Protoplast. *Vitis*, 33, 3, 173-174, 1994.
49. Reustle G., G. Allewelt. Isolation and Culture of Grapevine Protoplasts. 5.Int.Symp.on Grapevine Breeding, 423-431, 1990.
50. Reustle G., I. Natter. Effect of Polyvinilpyrrolidone and Activated Charcoal on Formation of Microcallus from Grapevine Protoplast (*Vitis* sp.). *Vitis*, 33, 117-121, 1994.
51. Theodoropoulos P. A., K. A. Roubelakis-Angelakis. Progress in leaf Protoplast Isolation and Culture from Virus-free Axenic Shoot Culture of *Vitis vinifera* L. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 20, 15-23, 1990.
52. Filippis L. F., H.Ziegler. The Physiology of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Protoplasts Isolated from Green and Senescing Leaves. Biochem. Physiol. Pflanzen, 180, 645-653, 1985.
53. Krul W. R. Recent Advances in Protoplast Culture of Horticultural Crops: Small Fruits. *Scientia Horticulturae*, 37, 231-245, 1988.
54. Katsirdakis K. C., K. A. Roubelakis-Angelakis. Modified Culture Conditions for Increased Viability and Cell Wall Synthesis in Grapevine (*Vitis vinifera* L.cv.Sultanina) Leaf Protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 28, 255-260, 1992.
55. Barbier M., R. Bessis. Isolation and Culture of Grapevine cv.Chardonnay Leaf Protoplasts. *Euphytica*, 47, 39-44, 1990.
56. Gray D. J., C. P. Meredith. Grape. Biotechnology of Perennial Fruit Crops. *Biotechnology in Agriculture*, No: 8, 229-262, 1992.
57. Hasler M., H. P. Ruffner, D. M. Rast. Ultrastructure of Grape Leaf Protoplasts in Comparison with the Source Tissue. *Vitis*, 22, 193-201, 1983.
58. Soller, M., J. S. Beckmann. Genetic Polymorphism in Varietal Identification and Genetic Improvement. *Theor. Appl. Genet*, 67, 25-33, 1983.
59. Bowers J. E., E. B. Bandman, C. P. Meredith. DNA Fingerprint Characterization of some Wine Grape Cultivars. *Am. J.*

Enol. Vitic., 44, 3, 266-274, 1993.

60. Bourquin J. C., P. Tournier, L. Otten, B. Walter. Identification of Sixteen Grapevine Rootstocks by RFLP and RFLP Analysis of Nuclear DNA Extracted from the Wood. *Vitis*, 31, 157-162, 1992.
61. Gogorcena Y., S. Arulsekhar, A. M. Dandekar, D. E. Parfitt. Molecular Markers for Grape Characterisation. *Vitis*, 32, 138-185, 1993.
62. Büscher N., E. Zyprian, O. Bachmann, R. Blaich. On the Origin of Grapevine Variety Müller-Thurgau as Investigated by the Inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Vitis*, 33, 15-17, 1994.
63. Bachmann O., Peroxidase Isoenzyme Patterns in Vitaceae. *Vitis*, 33, 151-153, 1994.
64. Anderson J. W. Extraction of Enzymes and Subcellular Organelles from Plant Tissues. *Phytochemistry*, 7, 1973-1988, 1968.
65. Parfitt D. E., The Use of Isozyme Electrophoresis for Ampelography and Evaluation of Genetic Diversity in *Vitis vinifera* L. *Riv. Vitic. Enol. N1.*, 7-14, 1989.
66. Stavrakakis M., M. Loukas. The Between- and Within-Grape-Cultivars Genetic Variation. *Scientia Horticulturae*, 19, 321-334, 1983.
67. Loukas M., M. N. Stavrakakis, C. B. Krimbas. Inheritance of Polymorphic Isoenzymes in Grape Cultivars. *J. Heredity*, 74, 181-183, 1983.
68. Cargnello G., E. Gianazza, G. Tedesco, M. Cappella, F. M. Gerola. Wall Proteins of *Vitis vinifera* Pollen I. Constancy of the Phenotype. *Vitis*, 27, 47-55, 1988.
69. Tedesco G., E. Gianazza, S. Arrigotti, G. Cargnello. Wall Proteins of *Vitis vinifera* Pollen II. Influence of Environment and Rootstock on the Electrophoretic Pattern. *Vitis*, 28, 65-72, 1989.
70. Lamikanra O., Identification of Grape Cultivars from their Seed Polypeptide Composition. *Phytochemistry*, 32, 5, 1199-1202, 1993.
71. Chaparro J. X., R. G. Goldy, R. D. Mowrey, D. J. Werner. Identification of *Vitis vinifera* L. X *Muscadinia rotundifolia* Small Hybrids by Starch Gel Electrophoresis. *HortScience*, 24, 1, 128-130, 1989.

72. Weeden N. E., B. I. Reisch, M.-H. E. Martens. Genetic Analysis of Isoenzyme Polymorphism in Grape. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 113,5,765-769, 1988.
73. Parfitt D. E., S. Arulsekar. Inheritance and Isozyme Diversity for GPI and PGM Among Grape Cultivars. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 114,3,486-491,1989.
74. Wolfe W.H., Identification of Grape Varieties by Isozyme Banding Patterns. *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 2, 68-73, 1976.
75. Martinelli L., A. Scienza, P. Villa, P. De Ponti, E. Gianazza. Enzyme Markers for Somatic Embryogenesis in *Vitis*. *J. Plant Physiol.*, 141,476-481, 1993.
76. Botta R., R. Vallania, M. L. Miajo, G. Vorgano, G. Me. Isozyme Pattern Comparison Between Tissue Cultured Grapevines and Mother Plants. 5. 5. Int. Simp. on Grape Breeding, 88-92, 1990.
77. Gribaudo I., A.Schubert. Grapevine Root Transformation with *Agrobacterium rhizogenes*. 5. Int. Simp. on Grape Breeding, 412-418, 1990.
78. Mullins M. G., F. C. A. Tang, D. Facciotti. *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Grapevines: Transgenic Plants of *Vitis rupestris* Scheele and Buds of *Vitis vinifera* L. *Bio/Technology*, 8, 1041-1045, 1990.
79. Baribault T. J., K. G. M. Skene, P. A. Cain, N. S. Scott. Transgenic Grapevines: Regeneration of Shoots Expressing  $\beta$ -glucuronidase. *J. Exper. Bot.*, 42, 229, 1045-1049, 1990.
80. Meredith C. P., S. M. Colby, J. A. Stamp, A. M. Dandekar, E. B. Bandman. Progress Toward the Production of Transgenic Grapevines by *Agrobacterium*-Mediated Transformation. 5. Int. Simp. on Grape Breeding, 408-411, 1990.
81. Guellec V., C. David, M. Branchard, J.Tempé. *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Transformation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20, 211-215, 1990.
82. Hebert D., J. R. Kikkert, F. D. Smith, B. I. Reisch. Optimization of Biolistic Transformation of Embryogenic Grape Cell Suspensions. *Plant Cell Reports*, 12, 585-589, 1993.