ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KALECİK KARASI'NIN 4 ve 23 NO'LU KLONUNDA BAZ MATERYAL ELDE EDİLMESİNE YÖNELİK OLARAK YAPILAN MERİSTEM KÜLTÜRÜ YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU

Nesrin KARACA

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2006

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU danışmanlığında, Ziraat Mühendisi Nesrin KARACA tarafından hazırlanan **'Kalecik Karası'nın 4 ve 23 No'lu Klonunda Baz Materyal Elde Edilmesine Yönelik Olarak Yapılan Meristem Kültürü Yönteminin Optimizasyonu'** adlı tez çalışması 28/12/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU
Ankara Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU
Ankara Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Murat ÖZGEN
Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **5**
3. MATERYAL ve YÖNTEM **29**
3.1 Materyal **29**
3.2 Yöntem **29**
3.2.1 Bitkisel materyalin elde edilmesi **29**
3.2.2 Üzüm klonlarına ait çeliklerin sürdürülmesi **30**
3.2.3 Besin ortamlarının bileşimi ve hazırlanması **32**
3.2.4 Sürgün uçlarının toplanması **33**
3.2.5 Sürgün uçlarının dezenfeksiyonu **34**
3.2.6 Meristemlerin çıkarılması ve kültüre alınması **35**
3.2.7 Sürgün çoğaltım aşaması **36**
3.2.8 Köklendirme aşaması **37**
3.2.9 Kültür koşulları **38**
3.2.10 Denemelerin değerlendirilmesi **39**
3.2.11 Dış koşullara alıştırma aşaması **40**
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA **42**
4.1 Başlangıç Aşaması **43**
4.1.1 Meristemlerin yaşama oranı (%) **43**
4.1.2 Meristemlerin gelişme düzeyleri (cm) **44**
4.1.3 Meristemlerin kallus oluşturma oranları (%) ve düzeyi (cm) **45**
4.1.4 Vitrifikasyon oluşturma durumu **45**
4.2 Sürgün Çoğaltma Aşaması **45**
4.2.1 Sürgün sayısı (n) **46**
4.2.2 Sürgün uzunluğu (cm) **46**
4.2.3 Kallus oluşturma oranı (%) ve düzeyi (mm) **47**
4.3 Köklendirme aşaması **48**
4.3.1 Köklendirme aşamasında oluşan sürgün sayısı (n) **54**
4.3.2 Oluşan sürgünlerin uzunluğu (cm) **56**
4.3.3 Yaprak sayısı (n) **58**
4.3.4 Kallus oluşturma oranı (%) ve düzeyi (cm) **59**
4.3.5 Köklenme (Tam bitkiye dönüşüm) oranı (%) **61**
4.3.6 En uzun kök değerleri (cm) **61**
4.3.7 Köklerin ortalama uzunluğu (cm) **63**
4.3.8 Ortalama kök sayısı (n) **65**
5. SONUÇ **67**
KAYNAKLAR **71**
ÖZGEÇMİŞ **82**

SİMGELER DİZİNİ

ArMV	Arabis Mosaic Virus
BA	Benzil adenin
BAP	Benzil Amino pürin
cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
2,4-D	2,4 Diklorofenoksi asetik asit
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sobent Assay
%	Yüzde
g	Gram
GA_3	Gibberelik asit
GCBV	Grapevine Corky Bark
GFLV	Grapevine Fanleaf Virus
GFkV	Grapevine Fleck Virus
GLRV	Leafroll Kompleksi
IAA	Indol-3-asetik asit
IBA	Indol-3-bütirik asit
2İP	(2-isopentenyl) adenosine
KK4	Kalecik Karası 4 numaralı klon
KK23/2	Kalecik Karası 23/2 numaralı klon
LS	Linsmaier ve Skoog
WPM	Woody Plant Medium
µM	Mikromol
mm	Milimetre
mg/L	miligram/litre
ml/L	mililitre/litre
MS	Murashige Skoog
NAA	Naftalen asetik asit
pH	Asitlik
RRV	Raspberry Ringspot Virus
SLRV	Strawberry Latent Ringspot Virus
TBRV	Tomato Black Ring Virüs

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Sera koşullarında saksılarda kum, perlit ve torf (1: 1: 1:) karışımında sürdürülen Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon çelikleri……. 30
Şekil 3.2 İklim odasında çimlendirme kaplarında ve polietilen tüplerde kum, perlit ve torf (1: 1: 1) karışımında sürdürülen Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon çelikleri……... 31
Şekil 3.3 İklim odasında çimlendirme kaplarında kum, perlit ve torf (1: 1: 1) karışımında sürdürülen Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon çelikleri……. 31
Şekil 3.4 İklim odasında polietilen torbalarda kum, perlit ve torf (1: 1: 1) karışımında sürdürülen Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon çelikleri……. 32
Şekil 3.5 İklim odasında kontrollü koşullarda sürdürülen Kalecik Karası 4 numaralı klona ait çelik…… 32
Şekil 3.6 Toplanan sürgün uçlarının görünümü…….. 34
Şekil 3.7 Laboratuvara su bulunan beher içinde getirilen sürgün uçları……. 34
Şekil 3.8 Sürgün uçlarından çıkartılan meristem dokusu……... 35
Şekil 3.9 Başlangıç ortamına dikilen Kalecik Karası 4 numaralı klonuna ait meristemlerin birinci ve dördüncü haftalardaki görünüşü……... 36
Şekil 3.10 Başlangıç ortamına dikilen Kalecik Karası 23/2 numaralı klonuna ait meristemlerin birinci ve dördüncü haftalardaki görünüşü……... 36
Şekil 3.11 Meristemlerin sürgün ortamındaki gelişmeleri…….. 37
Şekil.3.12 İklim odasında gelişmeye alınan köklendirme aşamasındaki Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klona ait meristemlerin görünüşleri……..... 38
Şekil 3.13 Doku kültürü iklim odasındaki kontrollu koşullar altında yetiştirilen Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klona ait kültürler…… 38
Şekil 3.14 Plastik bardaklara dikilen bitkiler…….. 40
Şekil 3.15 Saksılara aktarılan bitkiler……. 41
Şekil 4.1. Kalecik Karası 4 numaralı klonun "0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (1) ve "0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (2) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları……. 48
Şekil 4.2. Kalecik Karası 4 numaralı klonun "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (3) ve "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (4) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları……. 49
Şekil 4.3 Kalecik Karası 4 numaralı klonun "2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (5)ve "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (6) kombinasyonundaki kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları……... 49

Şekil 4.4 Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun "0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (1) ve "0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (2) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları…….. 50
Şekil 4.5 Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (4) ve "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (4) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları…….. 50
Şekil 4.6 Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun "2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (5) ve "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (6) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları…….. 51
Şekil 4.7 Kalecik Karası 4 numaralı klonun "0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (7) ve "0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (8) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları…….. 51
Şekil 4.8 Kalecik Karası 4 numaralı klonun "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (9) ve "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (10) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları…….. 52
Şekil 4.9 Kalecik Karası 4 numaralı klonun "2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (11) ve "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (12) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları…….. 52
Şekil 4.10 Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun "0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (7) ve "0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (8) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları…….. 53
Şekil 4.11 Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (9) ve "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (10) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları…….. 53
Şekil 4.12 Kalecik Karası 23/2 numaralı klon "2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (11) ve "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (12) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları…….. 54
Şekil 4.13 Köklendirme aşamasında iki farklı Kalecik Karası klonuna ait eksplantlar üzerinde oluşan sürgün sayısı……. 56
Şekil 4.14 Köklendirme aşamasında iki farklı Kalecik Karası klonuna ait sürgün uzunluğu……. 58
Şekil 4.15 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonlarına ait yaprak sayısı…….. 59
Şekil 4.16 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonlarına ait kallus düzeyi……. 61
Şekil 4.17 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait en uzun kök değeri……. 63
Şekil 4.18 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait kök uzunlukları…… 64
Şekil 4.19 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait kök uzunlukları…… 66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 MS temel besin ortamında bulunan besin maddeleri konsantrasyonları.. 33
Çizelge 4.1 İki değişik Kalecik Karası klonuna ait yaşama oranları……... 44
Çizelge 4.2 İki değişik Kalecik Karası klonuna ait meristemlerin gelişme düzeyleri (cm)…… 45
Çizelge 4.3 Sürgün çoğaltımı aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait sürgün sayıları…… 46
Çizelge 4.4 Sürgün çoğaltma aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait sürgün uzunlukları……. 47
Çizelge 4.5 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait sürgün sayısı (adet)…… 55
Çizelge 4.6 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait oluşan ait sürgünlerin uzunluğu…… 56
Çizelge 4.7 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonlarına ait yaprak sayısı……... 59
Çizelge 4.8 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait kallus düzeyi……. 60
Çizelge 4.9 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait en uzun kök değeri…….. 62
Çizelge 4.10 Köklendirme aşamasında ki değişik Kalecik Karası klonuna ait kök uzunlukları……. 64
Çizelge 4.11 Köklendirme aşamasında asma genotiplerine ait ortalama kök sayısı... 65

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KALECİK KARASI'NIN 4 ve 23 NO'LU KLONUNDA BAZ MATERYAL ELDE EDİLMESİNE YÖNELİK OLARAK YAPILAN MERİSTEM KÜLTÜRÜ YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU

Nesrin KARACA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

Bu çalışmada, ülkemiz bağcılığı için çok büyük önem taşıyan klon kökenli sertifikalı asma fidanı üretimi için mutlak gerekli klona dayalı kalem damızlıkların kurulmasında kullanılacak virüs ve virüs benzeri hastalıklardan ari Kalecik Karası'nın 4 ve 23/2 numaralı klonunun elde edilmesi ve bu klonların hızlı çoğaltılması hedefine yönelik olarak; belirtilen asma genotiplerinde meristem kültürünün köklenme aşamasında, 12 farklı oksin (IBA) ve sitokinin (2iP ve BAP) konsantrasyonun, kök gelişimine ve bitkiye dönüşümüne etkileri incelenmiş; yöntemin en uygun duruma getirilmesi amaçlanmıştır.

Meristem aşamasında, Kalecik Karası 4 numaralı klon %60 yaşama oranına sahipken, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon %80'lik bir yaşama oranı göstermiştir. Meristem ve sürgün aşamasında kallus oluşumu gözlenmemiştir. Sürgün aşamasında 2.0 mg/l BAP +0.5 mg/l IBA kullanılmış ve sürgün sayısı bakımından değerler sırasıyla 3.67 ve 3.83 sürgün uzunluğu bakımından ise 2.42 cm ve 2.04 cm olarak bulunmuştur. Köklendirme aşamasında ise Kalecik Karası 23/2'de sürgün oluşumu ve yaprak sayısı daha fazla olmuş; 1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP/2iP konsantrasyonunun en yüksek sürgün oluşumu ve yaprak sayısı değerini verdiği tespit edilmiştir. Uygulamalarda oksin ve sitokinin düzeyi arttıkça kallus oluşumu da artmıştır. En yüksek köklenme değerini 2mg/l IBA katkılı MS ortamı vermiştir. En uzun kök değerleri ise Kalecik Karası 4 numaralı klon için1 mg/l IBA ile 3.47cm, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için 0.5 mg/l IBA ile 3.90 cm olarak bulunmuştur.

2006, 82 sayfa

Anahtar Kelimeler: Asma, Kalecik Karası Klon 4, Kalecik Karası Klon 23/2 Mikroçoğaltım, Sürgün ucu kültürü, Virüs, Baz Materyal

ABSTRACT

Master Thesis

OPTİMİZATİON OF MERİSTEM CULTURE TO OBTAİN BASIC VEGETAL MATERİAL FROM KALECİK KARASI CLONE 4 and 23

Nesrin KARACA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

The production of certificated, clonal basic vegetal material is very important for viticulture in Turkey. In this research, therefore, the effect of the concentration of 12 different auxin (IBA) and cytokinin (2iP and BAP) concentrations on root development during rooting phase of meristem culture fort the production of basic material belonging to vine genotypes of Kalecik Karası 4 and 23/2 clones were investigeted with the aim of obtaining these clones, which will be used establish absolutely necessary, clone based basic vegetal material and which are free from viruses and virus-like diseases and of fast propagation of these clones.

At meristem phase, Kalecik Karası clone 23/2 has shown a survival rate(80%) greater than that of clone 4 (60%). Callus development has not been observed during meristem phase. During shooting 2.0 mg/l BAP+0.5 mg/l IBA has been used and, the values of shooting numbers were determined as 3.83 and 3.67 and the values of the lenght of shoots were found to be 2.04 cm and 2.42 cm, respevtively. It was observed that the propagation of shoots and the number of leaves were higher for $KK_{23/2}$ during rooting and a concentrarion of 1.0 mg/l IBA+0.5 mg/l BAP/2iP has promed the production of the highest level of shooting and the highest number of leaves. Aplications indicates that an increase in the level of auxin and cytokinin results in the exalaration of callus production. The highest callus levels were found to be 0.43 cm for KK_4 and 0.72 cm for $KK_{23/2}$ the highest rooting valve was obtained in a MS medium supplemented with 2 mg/l IBA. The highest root lenghts were 3.47 cm and 3.90 cm, respectively.

2006, 82 pages

Key Words: Grapevine, Kelecik Karası Clone 4, Kalecik Karası Clone 23/2, Micropropagation, Shoot tip culture, Virus, Basic Material

TEŞEKKÜR

Ülkemiz bağcılığı için büyük önem taşıyan klon kökenli sertifikalı asma fidanı üretimi için mutlak gerekli klona dayalı kalem damızlıklarının kurulmasında kullanılacak virüs ve virüs benzeri hastalıklardan ari Kalecik Karası'nın 4 ve 23/2 numaralı klonlarının elde edilmesi ve bu klonların hızlı çoğaltılmasını amaçlayan, bitkisel materyal olarak Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait Kalecik Karası klon koleksiyon bağındaki 4 ve 23/2 numaralı klonlara ait virüslerle bulaşık olduğu belirlenmiş olan omcaların kullanıldığı bu çalışmaya beni yönlendiren, araştırmamda sadece bilimsel yönden değil; maddi, manevi her konuda çok büyük yardımlarını ve desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, değerli fikirlerini ve ilgisini eksik etmeyen danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda yardım ve fikirlerini esirgemeyen, beni her zaman güler yüzüyle karşılayıp, her sorumu sabırla cevaplayan ve tezimi tamamlayabilmemde büyük emeği olan hocam, Sn. Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na çok ama çok teşekkür ederim. Derslerine büyük bir zevkle katıldığım bilgisini ve tecrübesini hayranlıkla izlediğim hocam, Sn. Prof. Dr. Murat ÖZGEN'e öneri ve fikirleriyle bana destek olan hocam Sn. Prof. Dr. Hasan ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda büyük emeği olan, ihtiyaç duyduğum her konuda büyük anlayış ve sabırla yanımda olan, ilgi, destek ve yardımlarını hiç esirgemeyen, pratik çözüm ve fikirleriyle beni yalnız bırakmayan hocam, Araş. Gör. Atilla ÇAKIR'a teşekkür ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim. Tezime ait sonuçların istatistik değerlendirilmesinde bana vaktini ayıran, Araş. Gör. Özgür KOŞKAN'a ve tezimin hazırlanma sürecinde yardımlarını esirgemeyen tüm bölüm hocalarına, çalışanlarına ve Mehmet TÜRKOĞLU'na teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında yardımlarını eksik etmeyen, bana güç veren arkadaşlarım Orhan YILMAZ'a Özge KEPENEKÇİ'ye ve Çağrı BARAL'a tezimin basım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Ahmet CAN'a çok teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca desteklerini, ilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen aileme sevgilerimi ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Nesrin KARACA
Ankara, Aralık 2006

1. GİRİŞ

2005 verilerine göre Dünya'da 7.351.612 ha alanda bağcılık yapılmakta olup, bu alanda toplam 65.584.122 ton ürün elde edilmektedir. Bu değerlerden de rahatlıkla anlaşılacağı üzere, üzüm; kurutmalık, sofralık, şaraplık, şıralık ve ülkemizde olduğu gibi pekmez sucuk, köfter, bastık vb. çok yönlü değerlendirilmesi şekillerine sahip olması sebebiyle dünyada en fazla yetiştiriciliği yapılan meyve türlerinin başında gelmektedir (Anonim 2005).

Bağcılık konusunda gelişmiş olan ülkelerde, yeni bağların tesis edilmesi sırasında gözönünde bulundurulan en önemli faktör; ulusal ve uluslararası pazarda meydana gelmiş olan pazar rekabeti sebebiyle kurulacak olan bağlardan uzun yıllar boyunca yeterli ve kaliteli ürün elde edilebilmesini sağlamaktır. Bu amaçla; kurulacak olan bağların ekolojiye ve pazar isteklerine uygun çeşit, anaç ve yetiştirme tekniği seçimini kapsayacak bir şekilde planlanması kaçınılmazdır. Bu planlamanın temelini ise sertifikalı yani ismine doğru, sağlıklı ve standartlara uygun (kaliteli) klona dayalı fidanlarla bağların tesis edilmesi oluşturmaktadır.

Günümüzde, bağcılık konusundaki gelişmeler bakımından daha ileri durumda bulunan ülkelerde hedeflenen verim ve kalite artışının sağlanması için üzüm çeşitlerinin klonlarına ait sertifikalı çoğaltma materyallerinin üretim ve kullanımı zorunlu hale getirilmiştir.

Dünyada bağcılık yapılan alanlarda bugüne değin 40'dan fazla virüs ve benzeri hastalık etmeni saptanmış olup (Caudwell and Dalmasso 1985), bu etmenler içerisinde gerek yayılım alanlarının genişliği, gerekse neden oldukları hastalıklar nedeniyle en fazla önem taşıyanlar; Asma Yelpaze Yaprak Virüsü (Grapevine Fanleaf Virus; GFLV), Flek (Grapevine Fleck Virus; GFkV), Asma Yaprak Kıvırcıklığı Virüsü (Grapevine Leafroll Virus; GLRV), Arabis Mozayik Virüsü (Arabis Mosaic Virus; ArMV), Domates Siyah Halkalı Leke Virüsü (Tomato Black Ring Virüs; (TRRV), Çilek Latent Halkalı Leke Virüsü (Strawberry Latent Ringspot Virus-SLRV), Ahududu Halkalı Leke Virüsü

(Raspberry Ringspot Virus; RRV), Asma Mantarımsı Kabuk (Grapevine Corky Bark; GCBV) ve Enation'dır (Martelli 1992).

Virüs ve benzeri etmenlerin neden olduğu hastalıklar; bağlarda sürgün ve yaprak oluşumunun azalması, dallar ve yapraklarda deformasyonların görülmesi ile dallarda odunlaşmanın gecikmesi şeklinde ortaya çıkan gelişme bozuklukları ile çiçeklerin dökülmesi, meyve tutumunun azalması, irili ufaklı tane tutumunun meydana gelmesi, tanelerde şeker birikiminin azalması, renklenmenin düzensiz olması ve olgunlaşmanın gecikmesi şeklinde ortaya çıkan verim ve kalite düşüklüklerine neden olmaktadır (Winkler and Kliewer 1974, Martelli 1992).

Virüs ve virüs benzeri hastalıkların tüm bitkilerde olduğu gibi asmalarda da sistemik olarak zarar yapması ve hastalıkla bulaşık vegetatif çoğaltma materyali kullanımı ile hızlı olarak yayılabilmesi, asma gibi ticari olarak tümüyle aşı yoluyla çoğalan bitkilerde bu patojen gurubunun yol açtığı verim ve kalite kayıplarının boyutunu aynı hızla artırmaktadır. Yelpaze Yaprak virüsü ve benzeri hastalıkların yapmış olduğu zarar, virüs ırkının tipine ve etmenin tipine göre değişmektedir. Bazı ırklar %80'e varan ölçüde verimi düşürmektedir (Bovey *et al.* 1980, Brückbauer 1979). Bu yüzden, bağlarda düzenli, kararlı ve sağlıklı ürün elde etmenin tek yolu, virüs ve virüs benzeri hastalıklar yönüyle test edilmiş ve hastalık etmeni taşıyan materyalin uzaklaştırılmasıyla, sadece temiz damızlık bitkilerden çoğaltım yapmak için materyal temin edilmesidir. Bu nedenle klon selleksiyonu denildiğinde, çeşitlerin verim ve kalite yönünden iyileştirilmesinin yanı sıra, virüs ve virüs benzeri hastalık etmelerinden temizlenmesine ve temizlenen klonların yeni bulaşmalardan korunmasına yönelik tüm çalışmaları kapsayan bir süreç anlaşılmaktadır.

Asmaların geleneksel yöntemlerle çoğaltımı, yeni çeşitler veya elit tipler için yavaş işleyen bir sistem olup, geleneksel yöntemlerin de tamamlayıcısı olan *in vitro* teknikler, genetik ilerleme programlarında, sağlıklı çeşitlerin eldesinde ve çoğaltımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Böylelikle asma ıslahında sürenin kısaltılması ile birlikte ıslahçılara büyük kolaylıklar sağlamaktadır (Dalloul *et al.* 1990, Lavee 2000, Mhatre *et al.* 2000, Torregrosa *et al*. 2001, Thomas and Schiefelbein 2004, Doğan 2004).

Bitkilerin çoğaltılması ve ıslahında yeni bir çığır açan doku kültürü çalışmalarının sağladığı en önemli yararlardan birisi; asmaların da aralarında bulunduğu pek çok kültür bitkisini kimyasal ve biyolojik yöntemlerle kontrolü mümkün olmayan virüs ve virüs benzeri hastalık etmenlerinden arındırabilmesidir. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan *in vitro* mikro çoğaltma tekniği, meristem kültürüdür. Asmalarda da gelişme, verim ve kalite yönünden ciddi gerilemelere hatta ölümlere yol açan bu hastalıklar, aşı ve fidan üretim materyalleri ile kolayca taşınarak yayıldığından, özellikle asma fidanlıklarındaki anaç ve kalem damızlık parsellerinin söz konusu hastalıklardan arındırılmış klonal çoğaltım materyalleri (Baz Materyal) kullanılarak kurulması büyük önem taşımakta ve sertifikalı fidan üretiminin temelini oluşturmaktadır (Çelik vd. 2000a, Çelik ve Karlı-İlbay 2002).

Bitkilerin hastalıksız kısımlarından alınan doku ya da parçalarının kültüre alınması yoluyla bakteriyel enfeksiyonlardan korunmak mümkün olduğu halde, virüsler ve benzerlerinin çoğu sistemik olarak etkili olduğundan bunların elimine edilmesinde özel bazı yöntemlerin kullanılması gerekmektedir (Babaoğlu vd. 2002). Virüsten ari bitki elde etme amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılan meristem kültürü; diğer yüksek bitkilerde olduğu gibi üzüm çeşit ve anaçlarına ait klonların virüs ve virüs benzeri hastalık etmenlerinden arındırılmasında kullanılan başlıca yöntemdir (Çelik ve Batur 1989, Çelik vd. 1999).

Diğer bitki kısımları yerine meristemin kullanılmasının başlıca nedeni ise, diploid bir bitkide apikal meristemin birörnek diploid hücrelere sahip olmasıdır. Yani, meristematik hücrelerin en önemli özelliklerinden birisi genetik yönden stabil olmalarıdır. Bilindiği gibi, genetik stabilite özellikle eşeysiz çoğaltma materyali için çok önemli bir özelliktir. Çünkü bitkinin diğer dokularından farklı seviyede poliploid hücrelerin bulunması nedeniyle bu dokuların kültüründen elde edilecek bitkilerin poliploid olma olasılığı da söz konusudur.

Bu araştırmada ülkemiz bağcılığının geleceği açısından çok büyük önem taşıyan klon kökenli sertifikalı asma fidanı üretimi için mutlak gerekli olan klona dayalı kalem damızlık parsellerinin kurulmasında kullanılacak ‘Baz materyal’ niteliğindeki Kalecik

Karası'nın 4 ve 23/2 numaralı klonlarından virüssüz sertifikalı fidanların elde edilmesi ve *in vitro* meristem kültürü tekniği kullanmak, yöntemin pratik ve ekonomik bir şekilde kullanılabilmesi için de optimizasyonunu gerçekleştirmek amaçlanmıştır.

Bu amaçla, konu ile ilgili önceden yapılmış araştırmalar esas alınarak meristem kültürünün ilk aşamalarında en iyi sonuç vermiş olan besin ortamları ve kültür koşulları kullanılmış; *in vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin köklendirme aşamasında yapılan çeşitli uygulamalarla, köklendirme için en uygun kombinasyonların belirlenmesine çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitkisel gen kaynaklarının korunması ve ıslah programlarında son çeyrek yüzyılda moleküler genetik, rekombinant DNA teknolojisi ve doku kültürü tekniklerinin yaygın bir şekilde kullanımı, çok önemli ilerlemeler sağlanmasına neden olmuştur. *In vitro* teknikler, hastalıklardan arındırma ve tanı, çoğaltım, tanımlama, değerlendirme ve izleme, muhafaza, dağıtım gibi genetik materyalin korunması ile ilgili etkinliklerde başarıyla kullanılmaktadır (Özgen vd. 2000).

Bitki doku kültürü, bitkinin çeşitli kısımlarından alınan parçaların sterilize edildikten sonra, steril ortamda (*in vitro*) ve uygun çevre koşullarında kültüre alınması olarak tanımlanabilir (Gönülşen 1987). Bir başka anlatımla; hücrelerin veya organların belirli şartlar altında cam tüpler veya çeşitli kaplarda steril olarak geliştirilmesidir (Staudt 1990). Bu metotla *in vitro* koşullarda yani cam kaplarda bitkinin çoğaltılması sağlanmıştır. Eksplant olarak da adlandırılan küçük bir doku parçacığından çok kısa bir süre içinde tam anlamıyla gelişmiş bitki elde etme olanağı elde edilmiştir (Yu and Meredith 1986).

Doku kültürü çalışması ilk kez 1902'de Alman bitki fizyoloğu Habertland tarafından ortaya atılmıştır. Bu bulgular 1934'te P.R.White'ın domates köklerini maya ekstraktı kullanarak sürekli olarak *invitro'*da üretmesine kadar gelişmiş, aynı dönemde B_1 Vitamininin (Thiamine) yapay besin ortamında gerekliliği saptanmıştır. 1939'da 3 araştırmacı Fransa'dan Nobecourt ve Gautheret ile ABD'den White birbirlerinden bağımsız olarak kallus doku kültüründe oksin uygulamasıyla bir yapay besin ortamı kavramını tanımlamışlardır. Bu çalışmaları, 1946'da Lupinus'un sürgün ucu kültürü üzerine yaptığı araştırmalar ve 1948'de Skoog and Tsui'nin tütün bitkisi üzerinde organ oluşumunun düzenlenmesi araştırmaları izlemiştir. 1949'da Lamasset and Corneut tarafından meristemin virüsten ari olduğu üzerine çalışmalar başlatılmıştır (Pierik 1993, Kung 1993, Endress 1994).

Virüs ve benzeri etmenlerin kontrolünde, kimyasal maddelerden yararlanılamamaktadır. Virüsleri yok etmede kullanılan kimyasallar, bitkide fitotoksik etki yaptıkları gibi,

virüsleri tamamen yok etmemekte ve kullanımları kesildiği durumlarda virüsler eski kontaminasyonlarına tekrar ulaşmaktadırlar (Hansen 1985).

Bakteri, mantar, virüs, mikoplazma ve nematodların neden olduğu hastalıklar bitkilerde büyük verim ve kalite kayıplarına neden olurlar. Virüs ve mikoplazmalar dışındaki hastalık etmenlerinin birçoğu için etkin mücadele yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak, virüs ve mikoplazmalarla mücadele için etkin bir yöntem mevcut değildir. Ülkemiz için büyük bir gelir kaynağı olan bağcılıkta da virüs ve virüs benzeri hastalıklar açısından önemli sorunların olduğu bilinmektedir (Gürsoy 1991, Çelik vd. 2000 b).

Birçok bitkide uzun yıllardan beri farklı amaçlarla *in vitro* çoğaltım yöntemi kullanılmaktadır (Broome and Zimmerman 1978, Schenk *et al.* 1983, Röbbelen 1985). Örneğin meyvecilikte virüssüz bitki elde etmek için *in vitro* üretim yöntemi geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Boxus 1974, Gebhardt *et al.* 1983). Asma bitkisinde de hızlı bir çoğaltım ve sağlıklı materyal elde etmek için *in vitro* metodu asma ıslahında son derece yaygın olarak kullanılmaktadır (Becker 1985).

Asmalarda sağlıklı kısımlardan alınan dokuların kültüre alınmasıyla bazı bakteriyel ve fungal hastalık etmenlerinden arındırılmış bitkilerin elde edilmesi mümkün olduğu halde, virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri sistemik yaşayan organizmalar olduklarından, bitkilerin bunlardan arındırılabilmesi için bazı özel yöntemlerin kullanılması gerekmektedir (Çelik ve Karlı İlbay 2002).

Asmalar, Avrupa bağcılığının filoksera ile tanıştığı 1850'li yıllara kadar çelikle bu zararlı ile baş etmenin tek yolunun Amerikan kökenli türler üzerine aşılama olduğunun anlaşıldığı 1860'lı yılların sonundan günümüze dek ise aşı ile çoğaltıldığından, uzun süre başka çoğaltma tekniği kullanmaya gerek duyulmamıştır. Ancak, *in vitro* çoğaltma ile birçok meyve türünde sağlanan başarı, daha sonra bu yöntemin asmalarda da kullanılmasını teşvik etmiştir. Bu teknik, üstün nitelikli asma genotiplerinin (klonların) virüs ve virüs benzerlerinden arındırılarak hızlı çoğaltılmasının yanısıra *Vitis berlandieri* gibi zayıf köklenme kapasitesi nedeniyle çok az kullanılan anaçların

kolaylıkla çoğaltılmasını sağlayarak önem kazanmasına olanak sağlamıştır (Tangolar vd. 1995).

Asma çoğaltma materyallerinden, bilinen tüm zararlı virüslerin başarılı olarak elemine edilmesinin; bunların bağlarda neden olduğu sorunların tek güvenilir çözüm yolu olduğu ve termoterapi ve /veya meristem kültüründen geçirilerek virüslerden arındırılan klonların gelişme kuvveti ve veriminin önemli ölçüde arttığı bilinmektedir. Ancak, bu durum eskiden beri bağcılık yapılan ülkelerde virüs ve virüs benzeri hastalıkların tamamen ortadan kaldırılmasına dayanan sağlık seleksiyonunun uygulamasına verilen öneme bağlıdır. Yine de, 20-30 yıl süreyle, tekrar bulaşmadan kaçınmak için gerekli koşulların yaratılması oldukça zor görünmektedir. Klonların tüm virüslerden arındırılma olasılığı ise bazı virüs veya virüs benzeri hastalıklar açısından oldukça düşüktür (Torregrosa *et al.* 2001).

Asmalar, doku kültürüyle oldukça kolay çoğaltılabilmektedir. Meristem veya sürgün ucu kültürü, sertifikasyon programlarında asma virüsleri ve virüs benzerlerinin eliminasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Asmalar, doku kültürü koşullarında virüsleri tespit etmek ve virüslere dayanıklılığı değerlendirmek için aşılanabilmektedir. Doku kültürü, çoğaltılması zor olan klonlar veya çeşitlere yönelik olarak da hızlı ve daha kolay çoğaltım için de tavsiye edilmektedir (Walker and Galino 1999).

Nüfus artışına paralel olarak gıdalara olan gereksinim hızla arttığına göre hastalıklardan ari bitkisel materyal kullanımı daha fazla önem kazanmıştır. Bu nedenle de asmaların *in vitro* yaklaşımlarla çoğaltımı tüm dünyada ticari değer taşımaktadır (Dodds and Roberts 1993, Reisch and Pratt 1996).

Virüsten ari bitkilerin elde edilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (George 1993, Sherwood 1993).

1. Meristem ucu kültürü
2. Sıcaklık uygulaması (Temoterapi)

3. Meristem kültürü ile birlikte sıcaklık uygulaması
4. Kimyasal madde kullanımı (Kemoterapi)
5. Soğuk uygulaması (Krayoterapi)
6. Mikroaşılama
7. Virüsten ari bitkilerin kallus ve protoplasttan elde edilmesi
8. Virüsten ari diğer eksplantların kullanılması

Bu yöntemlerden en çok tercih edileni ise termoterapi ve meristem kültürüdür.

Gerek mikro-çoğaltım, gerekse virüsten ari bitki elde etme amacı ile günümüzde yaygın olarak kullanılan meristem kültürü; diğer yüksek bitkilerde olduğu gibi üzüm çeşitlerine ve asma anaçlarına ait klonların virüs ve virüs benzeri hastalık etmenlerinden arındırılmasında kullanılan başlıca yöntemdir (Çelik ve Batur 1989).

Bulaşık omcalardan sağlıklı bitkiler elde etmede kullanılan ilk yöntem ise asmada ilk kez 1961 yılında Galzy, 1965 yılında da Goheen tarafından kullanılan termoterapi yöntemidir (Quak 1977). Özel kaplar ve ortamlar içinde yetiştirilen asmaların 35–38 ºC' deki iklim odalarında birkaç saatten birkaç aya kadar değişen sürelerde tutulmaları ve bu bitkilerin sürgünlerinin uç kısımlarından alınan mikroçeliklerin çoğaltmada kullanılması prensibine dayanan termoterapi yönteminde, omcaların bazen yüksek sıcaklıktan zararlanması söz konusu olabildiği gibi, omcalarda bulunabilecek birden fazla etmenin her birinin farklı sıcaklık ve süre istemeleri nedeniyle de hastalık etmenlerini yok etmede her zaman güvenilir sonuçlar vermemektedir.

Kassanis and Posnetta (1961), bahçe bitkileri ve bağlarda zarar yapan virüslerin yarısına yakınına karşı termoterapinin etkisiz kaldığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Auger ve Arancibia (1990) da termoterapinin virüs hastalıklarının hepsini yok etmede başarısız kaldığını, Guo *et al.* (1990) ise, bazı asma bitkilerinin termoterapi sıcaklığından zarar gördüğünü tespit etmişlerdir. Bu nedenle, günümüzde termoterapi yöntemi tek başına değil, genellikle meristem kültürü ile kombine olarak kullanılmaktadır.

Sıcaklık uygulamasında büyüme için gerekli optimum sıcaklığın üzerinde bir sıcaklık seçmek gereklidir. Aynı zaman da bu sıcaklığın, bitki ya da bitki materyali için öldürücü olmayan bir sıcaklık uygulaması olması da gerekir. Sıcaklık uygulamasında bitki kısımları sıcak suda veya sıcak havada (50-52 ^{o}C) belirli sürelerde (10-30 dk) bırakılmaktadır (George 1993).

Barlas ve Skene (1982), asmalarda termoterapi uygulaması ile Asma Yelpaze Yaprak ve Leke virüsünü temizlemişlerdir. Gürsoy (1991) 99R, 110R, 420A ve Rup du Lot anaçlarında 38 °C'de 1 ay süreyle termoterapi uygulamış ve bunların Asma Yelpaze Yaprak Virüsü ve Arabis Mosayik Virüsünden temizlendiğini bildirmiştir. Fakat Asma Yaprak Kıvırcıklığı Virüsü ile önce sağlanan başarı devamlı olmamıştır. Buna karşın Sarı Benek hastalığını elimine etmek için termoterapi uygulaması hiç başarılı olmamıştır.

Bitkilerin büyük bir kısmı başarılı şekilde doku kültürü virüs eliminasyon programlarıyla viral bulaşmalardan korunabilmektedir ki Avrupa Birliği'ne aday ülkeleri de bağlayıcı nitelikte olan Avrupa Birliği direktiflerinde virüs ve benzerlerinden arındırılmış klonal, kaliteli ve sağlıklı (sertifikalı) asma fidanlarının kullanımı ve çoğaltımına yönelik ölçütler yer almaktadır (Mullins 1990, Doğan 2003).

Asmada bir tek hastalık için bile birden fazla virüs etkili olabildiğinden, termoterapi yöntemi ile bunların tümünü elimine etmenin mümkün olmadığı (Fidan vd. 1984), bu nedenle virüsten ari materyal elde etmek için termoterapi metodu ile birlikte meristem kültürü uygulanması ve böylece başarı sağlandığı ifade edilmiştir (Barlass and Skene 1982, Brückbauer 1979, Fidan vd. 1984, Gürsoy 1991).

Meristem kültürü, termoterapi ve kemoterapi ile kombine edilerek kullanılabilmektedir. Ancak, *in vitro* meristem kültürü termoterapiden daha etkilidir (Martelli 1992). Ayrıca. viroidlerden ari asmaların eldesinde de meristem veya *in vitro* mikro aşılama teknikleri kullanılmaktadır (Mullins 1990).

Mikroçoğaltımın temel uygulaması; patojenlerden ari damızlıkların oluşturulmasıdır. Ayrıca, bitkilerin büyük bir kısmı başarılı şekilde doku kültürü-virus eliminasyon programlarıyla viral bulaşmalardan korunabilmektedirler (Mullins 1990, Dodds and Roberts 1993). Sözü geçen doku kültürü teknikleri sayesinde, hastalıklardan arındırılmış olan damızlıklar kullanılarak sertifikalı fidan üretimi mümkün olabilmektedir ki virüs eliminasyonu için doku kültürü ilk kez l960'larda kullanılmış ve bu yöntem günümüzde temiz damızlık oluşturma programlarının standart sistemi haline dönüşmüştür (Mullins 1990).

Moral and Martin Dalya, Orkide ve patates bitkilerinde yapılan çalışmalarla meristemlerin virüsten ari oldukları kanıtlanmıştır. Sırasıyla Latin çiçeği, tütün, siklamen, orkide ve patates üzerinde yapılan çalışmalardan sonra 1970 yılından itibaren diğer bitkilerde de doku kültürü üretimi başlamıştır. Meristematik doku, ince çeperli, plazması bol, genel olarak izodiyametrik, hücre arası boşlukları olmayan ve farklılaşmamış küçük hücreler topluluğudur. En önemli özellikleri hızlı bölünme ile yeni hücreler meydana getirmeleridir (Akman 1996). Bu dokular sayesinde, bitkiler yeni hücre ve organlar kazanarak büyürler (Gönülşen 1987).

Meristem kültürü, sürgün ucundaki meristematik büyüme konisi ile hemen altındaki birkaç yaprak taslağını içeren kısmın binoküler mikroskop altında kesilerek çıkarılması ve *in vitro* koşularda yapay besin ortamlarında kültüre alınarak bunlardan tam ve sağlıklı bitkiler elde edilmesini kapsamaktadır (Hatipoğlu 1997, Çelik vd. 1998, Çelik ve Karlı İlbay 2002).

Meristem dokusu, sürekli bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerden oluşmuştur. Bu hücrelerin bölünüp farklılaşmasıyla da tam bir bitkiye dönüşüm sağlanmaktadır. Meristem kültürü ile bitki çoğaltım katsayısının yüksek olması, diğer bir deyimle tek bir sürgün ucu meristeminden çok sayıda bitki oluşumunun sağlanması yanında, bu bitkilerde varyasyon olasılığının düşük ve hastalık etmenlerinden ari olmaları gibi bir takım üstünlüklere de sahip olmaktadırlar. Meristem kültürü ile sağlıklı bitkiler elde edilebilmesinin nedeni kesin olarak ortaya konulamamakla birlikte, bu konuda az ya da çok kabul görmüş bazı teoriler şunlardır (Pierik 1989):

- Meristem dokularında henüz iletim sistemi oluşmadığı için bu dokulara virüsler ulaşamamakta ve bu kısım temiz kalmaktadır.
- Hücrelerin çoğalma hızı ile virüslerin çoğalma hızı arasında bir rekabet vardır. Hücrelerin çoğalma hızının daha yüksek olması, meristematik dokuların bu etmenler bakımından temiz kalmasına neden olmaktadır.
- Meristem dokuları da virüs içermektedirler; ancak, kültür ortamında geçen süre içinde bu virüsler aktivitelerini yitirmektedirler.
- Virüslerin çoğalması için enzimler gereklidir. Meristematik dokularda bu enzimler bulunmadığı için virüsler çoğalamazlar.
- Meristemlerde sentezlenen doğal büyümeyi engelleyiciler, virüslerin konsantrasyonunu azaltmaktadır. Meristem dokularında yüksek konsantrasyonlarda bulunan oksin ve sitokininler, virüs çoğalması üzerinde kısıtlayıcı bir etki oluşturmaktadır.

Meristem kültürü ile virüs ve benzeri etmenlerden arındırılmış bitkiler elde etme sürecindeki aşamalar aşağıda gösterilmiştir (Baydar 2000).

- Bitkide virüs ve benzeri etmenlerin tanımlanması
- Virüs ve benzeri etmenlerle bulaşık bitkiler
- Meristem Kültürü Aşaması
- Meristemlerin dezenfeksiyonu ve izolasyonu
- Meristemlerin steril besin ortamlarına dikilmeleri
- Sürgün oluşturma
- Sürgünleri köklendirme
- Saksılara şaşırtma ve dış koşullara alıştırma
- Virüs testlerinin yapılması
- İndikatör bitkiler
- Elektron mikroskobu
- Serolojik testler
- Bitkilerin tekrar bu etmenlerle bulaşmayacakları ortamlarda yetiştirilmeleri ve sağlıklı bitkilerin üretimi

Asmanın meristem kültürü yoluyla çoğaltılmasına yönelik çalışmalar, diğer yüksek bitkilerde olduğu gibi başlıca dört aşamadan oluşmaktadır. Bunlar, meristemlerin izolasyonu, dikimi ve gelişmenin başlatılması, sürgün oluşturma, oluşan sürgünlerin köklendirilmesi ve elde edilen tam bitkilerin dış koşullara aktarılmasıdır. İlk aşamada, sürgün uçları dezenfekte edildikten sonra apikal meristem ve 2–3 yaprak taslağını içeren doku kısmı kültür ortamına alınarak büyümenin başlaması sağlanır. İkinci aşamada amaç, sürgün oluşumunun sağlanmasıdır. Bu aşamada hormonun hormonel kapsamı sürgün oluşumuna yönelik olarak hazırlanır. Üçüncü aşama ise oluşan sürgünlerin köklendirilmesidir. Köklendirilmenin uyarılması için besin ortamına oksin ağırlıklı büyümeyi düzenleyici maddeler eklenir. Son aşama, bitki için gerekli olan sıcaklık ve nem koşullarının çok iyi ayarlanması gerekmektedir (Fidan vd. 1984).

Birkaç yaprak taslağı ile beraber 1 mm.den küçük eksplantların kültürü 'meristem ucu kültürü' olarak ifade edilmektedir. Bazı kaynaklarda meristem ucu 0,1–0,5 mm olarak belirtilmekte ve uç 0,5 mm' den büyük olduğunda sürgün ucu (0,5–5,0 mm) olarak tanımlanmaktadır (Bürün 2002). Ancak genellikle 1 mm' den küçük eksplantlar virüsten ari bitkileri elde etmek amacı ile kullanılmaktadır ve meristem ucu eksplantlarının optimal büyüklüğü 0.2-1.0 mm arasıdır. Apikal meristem. sadece sürgün ucu bölgesini: sürgün ucu ise. apikal meristem ile birlikte birkaç yaprak taslağını belirtmektedir: Böylesine küçük eksplantların kesilip çıkarılması oldukça zordur ve bu eksplantların yaşama şansı çok düşüktür; ayrıca, bitkilerin *in vitro* çoğaltımı için pratik değildir (Dodds and Roberts 1993).

Çok küçük bir eksplantın kültüre alınması gelişme şansını düşürmekte ve kültürde başarıyı sınırlamaktadır. Bu nedenle meristemin yaprak taslaklarıyla birlikte kültüre alınması başarılı bir kültür için gerekli olmaktadır ve bu 'meristem ucu kültürü' olarak tanımlanmaktadır (Grout 1993).

Meristem bölgesi, etil alkol ile silinmiş binoküler stereomikroskobu altında yatay hava akışlı kabinde çalışarak izole edilmelidir. Meristemi ayırmak için kullanılan kesicilerin keskin olmasını sağlamak bakımından sık sık değiştirilmesi ve sterilize edildikten sonra kullanılmalıdır. Öncelikle dış yapraklar ve yaprak taslakları temizlenmeli ve sonra

meristematik bölge alınmalıdır. Meristematik bölge çabuk kuruyabilir ve zarar görebilir. Kurumayı önlemek için sterilize edilen aletlerin sıcak olmamasına dikkat edilmeli ve çalışma bölgesinin aydınlatılmasında ısınmaya meydan verilmemesi gereklidir (Sherwood 1993).

Meristem kültürünün ilk uygulandığı yıllarda White ortamı en sık kullanılan besi ortamıydı (Hatipoğlu 1997). Daha sonra Murshige ve Skoog ortamının (MS) daha uygun olduğu bulunmuştur (Bürün 2002). Murashige ve Skoog (MS) veya Linsmaier ve Skoog (LS) ortamlarının mineral madde kompozisyonu. özellikle bitki rejenerasyon ortamlarında çok sık kullanılmaktaysa da (Hatipoğlu 1997) halen meristem, sürgün ucu ve tomurcuk kültürü için genel bir ortam mevcut değildir. MS ortamı bazı modifikasyonlar yapılarak en fazla kullanılan ve en başarılı sonuçlar veren besi ortamıdır ancak, Roubelakis-Angelakis and Katsirdakis (1990) tarafından bildirildiğine göre; kültür ortamı ve genotip arasında sıkı bir ilişki bulunduğu da unutulmamalıdır.

Gönülşen ve Özcan (1980) tarafından yapılan araştırmada, genetik materyalin muhafazasından önceki çoğaltma sorunları incelenmiştir. Asmanın sürgün ucu ve 6. boğuma kadar olan her bir boğumdan alınan parçalar, Knop, Murashige ve Skoog ile Knudson B ortamlarında kültüre alınmışlardır. En iyi sonuç, 5.ve 6. boğumdan alınan parçalarla Knudson B temel ortamında yapılan kültürlerden sağlanmıştır.

Barlas and Skene (1980a) önce, asmanın apikal kısımlarını, stokinin içeren sıvı ortamda kültüre alınmışlar, katı ortama transfer edildiklerinde ise adventif tomurcuklardan yaprak benzeri yapılar oluşturmuşlardır. Bu yapraklar yeniden farklılaşmaya ve kallus oluşumuna gerek duymadan primordial hücrelerden rejenere olmuşlardır.

Barlas and Skene (1980b) parçalanmış sürgün ucu kısımlarının hormonal ve besin gereksinimlerini incelemişlerdir. MS ortamına eklenen 10 µM BA'nın, apikal kısımlarının yaprak oluşturmasına ve bu yapraklardan adventif sürgün oluşmasına uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Barlas vd. (1982), Cabernet Franc üzüm çeşidinin aşıyla geçen virüs hastalıklarıyla (yaprak kıvırcıklığı, sarı benek, yaz beneği) bulaşık olduğu bilinen omcalarından alınan sürgün ucu kültürleri, 27 °C ve 35 °C' de gelişmeye alınmış ve rejenere olan bitkiler dış koşullara alınmışlardır. 4 yıl süre ile bu omcalarda, söz konusu 5 virüs hastalığının ortaya çıkıp çıkmadığını belirlemek için indeksleme ve incelemeler yapılmıştır. Termoterapi ile kombine edilerek uygulanan bu teknik sayesinde kısa boğum virüsünden ari asmalar elde edilmiştir. 20–27 °C' de yapılan sıcaklık uygulaması ise sarı benek virüsünden ari bitkiler elde edilmesini mümkün kılmıştır.

Grenan'ın (1984) bulgularına göre *Vitis vinifera* L.'nın *in vitro* ve termoterapi uygulanarak elde edilen virüssüz çeşitleri dışarıya transfer edildiklerinde beklenmeyen morfolojik özellikler göstermişlerdir. Yaprak özelliklerinin incelenmesi sonucunda kontrol bitkileri ve *in vitro* ile terapiden geçen bitkiler arasındaki farklar gözlenmiştir. Ancak bu konudaki analizler, yapraklardaki değişimlerin *in vitro* ve termoterapi ile ilgili olmadığını ve bağ koşullarında sürekli olmadığını göstermiştir.

Corte and Mendonca (1985), virüssüz asma klonlarının hızlı çoğaltımında meristem kültürünün önemini araştırmışlardır. 14 Vinifera çeşidi, 11 anaç ve *Vitis rupestris*'in 2 formunun tepe ve koltuk tomurcuklarından alınan meristemler *in vitro*'da kültüre alınmışlardır. Materyalin çoğunda meristemin orijini kültürün başarısını etkilememiştir. Ancak Sercial, Boal ve Negro çeşitleri ve Jacguez anacında ise sadece koltuk tomurcuklarında başarı sağlanmıştır. 99R, 161–49 ve 420 A anaçları, meristemin orijini ne olursa olsun, düşük çoğaltım oranına sahip genotipler olarak saptanmışlardır. Sercial, Boal, Negro, Jacquez, 99R ve 161-49'da bitki elde etmek için gerekli olan zaman diğer materyaller için gereken zamanın 2 katı düzeyinde bulunmuştur (7 aya karşı 14 ay) . 420 A' da ise hiç bitki elde edilememiştir. Bu araştırma sonucunda, gen bankalarının oluşumunda *in vitro* tekniklerinin kullanılabileceği öne sürülmüştür.

Dan-Hua and Meredith (1985), Chenin blanc, Zinfandel, Pinot noir, White Riesling gibi genotiplerde eksplant kaynağının, ışıklanmanın ve ana bitkinin gelişme kuvvetinin etkilerinin incelendiği çalışmalarında sürgün ortamı olarak 2 mg/l BA katkılı sıvı, alt kültürler için de 6 g/l agar ile katılaştırılmış MS ortamını (pH 5.8*)* kullanmışlardır.

Araştırma bulgularına göre; koltuk sürgünü uçlarının, daha fazla ışık alan terminal sürgün uçlarına nazaran yaşama oranı daha yüksek olmuştur. Bunun yanısıra, eksplantın alındığı pozisyonun Chenin blanc, Zinfandel gibi çeşitlerde güçlü bir etkisi ortaya çıkmışken Pinot noir, White Riesling gibi çeşitlerde ise ışıklanma durumunun daha etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca, sürgün gelişme kuvvetinin de dokunun yaşama şansını etkilediği ve daha zayıf gelişme gösteren sürgünlerden alınan meristemlerin çok daha yüksek yaşama şansına sahip olduğu belirlenmiştir. En iyi gelişme gösteren ana sürgün uçlarından en düşük sürgün sayısı elde edilmiş ve bu eksplantlarda kahverengileşmenin yanısıra kallus oluşumu da daha fazla gözlenmiştir.

Galzy (1985), yaptığı bir çalışmada kallus oluşumunun ardından rejenere olan farklılaşmış dokunun kültürü ile apikal meristem kültürü tekniğini kıyaslamıştır. İlk tekniğin uygulanmasında, kallus oluşumu sırasında sitolojik anormalliklerin ortaya çıkma olasılığı nedeniyle klonal germplazmın muhafazası amacıyla ikinci teknik tercih edilmiştir. *İn vitro*'da muhafaza için en uygun sıcaklık 12 °C olarak saptanmıştır. Materyal, alt kültüre alınmadan 1 yıl muhafaza edilmiştir.

Passos vd. (l986), Çekirdeksiz A Dona çeşidinin apikal meristemleri standart Nitsch, ve 1, 2, 5, 10 µM BAP içeren Nitsch ortamında kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda, 2 ve 5 µM konsantrasyonların en iyi gelişmeyi sağladığı tespit edilmiştir.

Monette (1986), ArMV ve GFLV ile bulaşık Runny vira üzüm çeşidine ait 0,2 mm büyüklüğündeki meristemleri, *in vitro*'da kültüre alarak, farklı sürelerde farklı sıcaklık rejimleri uygulamıştır. Araştırmada, GFLV ve AMV virüslerini yok etmede 39 ºC' de 6 saat ve 22 ºC' de 18 saat sıcaklık rejimi uygulamasının bu virüsleri arındırmada başarılı sonuçlar verdiği saptanmıştır.

Altmayer (1990), farklı nepovirüsler (ArMV, RRV, GFLV, TBRV, SLRV) ve GLRV ile bulaşık Müller Thurgau, Portugieser, Traminer, Optima, Riesling üzüm çeşitlerinin de aralarında bulunduğu 14 çeşitten alınan 0.5 mm büyüklüğündeki meristemlerin kullanıldığı bir diğer araştırmada da yapılan testler sonucunda elde edilen bitkilerin bu

etmenlerden bütünüyle arındırılmış olduğu, buna karşın kontrol bitkilerinin tümünde bu virüslerin bulunduğu tespit edilmiştir.

Gray ve Fisher (1987) tarafından yapılan bir araştırma ile 5 μM BA içeren değiştirilmiş MS ortamında kültüre alınan birkaç Vitis genotipine ait 1-2 mm uzunluğundaki sürgün parçalarından sürgün proliferasyonunda başarı sağlanmıştır. Ortama NAA'nın eklenmesi sürgün proliferasyonunu artırmamıştır.

Fournioux and Bessis (1987) *in vitro*'da kültüre alınan asmanın gelişmesinde CO_2'in etkisini incelemişlerdir. Pinot çeşidinin sürgün kısımları 80 ml hacimli cam tüplerde kültüre alınmış, tüplerin ağzı parafilmsiz ve parafilmle birlikte pamukla kapatılmıştır. Büyüme ortamındaki atmosferin CO_2 konsantrasyonu 500 ppm olarak sabit tutulmuştur. Farklı kapatma yöntemleriyle bağlantılı 2 farklı şekillenme tipi ortaya çıkmıştır. Parafilmli kültürler çok küçük yapraklar, kısa boğum araları ve azalan kök sistemiyle minyatüre edilmiş bir şekil alırlarken, parafilmsiz kültürler ise genç ve erişkin formlar arasında morfolojik özellikler göstermişlerdir. Elde edilen sonuçlar, parafilmin tüplerdeki CO_2 konsantrasyonunu değiştirdiğini kanıtlamıştır. CO_2 konsantrasyonu ışıklanma (16saat) süresince 100 ppm'le optimum düzeyin altına düşmüş, karanlık periyotta ise 3000 ppm'le üzerine çıkmıştır. Parafilmle kapatılan tüplerdeki eksplantın büyümesinin 5 ml CO_2 enjeksiyonuyla artması, CO_2'nin asmanın *in vitro*'da büyümesini etkileyen önemli bir çevresel faktör olduğunu göstermiştir.

Çelik vd. (1988) yaptıkları bir araştırmada, Kalecik Karası üzüm çeşidi ile 41B Amerikan asma anacının meristem kültürü ile çoğaltımında besin ortamının mineral yapısını, GA_3 içeriği ve vitamin kompozisyonunun başarısını, oksin-stokinin kombinasyonlarının ise sürgün ve kök gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yürütülen üç denemenin ikisinde, MS besin ortamının mineral bileşimi; normal, %25 ve %50 oranında üç değişik konsantrasyonda seyreltilerek kullanılmış, ayrıca bu ortamlara değişik konsantrasyonlarda (0.0, 0.1 ve 0.5 mg/l) katılan GA_3'ün etkileri araştırılmış ve her iki genotip için 'normal dozda MS x 0.5 mg/l GA_3 kombinasyonunun en elverişli kombinasyon olduğu belirlenmiştir. Aynı araştırıcıların yapmış oldukları ikinci denemede ise, MS ortamının mineral bileşimi normal ve %25 daha konsantre olarak

hazırlanmış, bununla kombine halde MS, Morel, 'Thiamine –İnositol' den oluşan üç farklı vitamin formülasyonunun etkileri incelenmiş ve en iyi sonuç normal MS mineral kompozisyonu ve MS vitamin formülasyonundan elde edilmiştir. Üçüncü denemede ise, ilk iki denemenin sonuçları esas alınarak, normal dozda MS mineral ve vitamin formülasyonuna sahip besin ortamına kombinasyon halinde katılan BAP ve IBA'nın (0.0, 0.5 ve 1.0 mg /l) yine her iki genotipten izole edilen büyüme ucu meristemlerinin sürgün ve kök oluşturma yetenekleri üzerine etkileri incelenmiştir. Bu denemenin sonucunda ise Kalecik Karası üzüm çeşidi için sürgün aşamasında "1.0 mg/l BAP" köklenme aşamasında ise "1.0 mg/l IBA" katkılı MS ortamı en iyi sonucu vermiştir. 41B MG anacında da benzer sonuçlar alınmış, sürgün oluşturma ve köklenme yönünden "1 mg/l BAP" kombinasyonundan iyi sonuç alınmıştır.

Batur (1989) yapmış olduğu çalışmada Kalecik Karası üzüm çeşidi ile 41 B MG anacının meristem kültürü ile çoğaltılmasında sürgün oluşturma ve köklendirme ortamları için en uygun "Oksin x Sitokinin" kombinasyonlarının belirlenmesine yönelik olarak, sürgün aşamasında sitokinin köklendirme aşamasında ise oksin baskın olmak üzere hazırlanan 15 değişik "IBA x BAP" kombinasyonunun etkilerini incelemiştir. Her iki aşamada da kültür başına sürgün, kök ve özellikle bitki oluşumunun yanısıra, eksplant sayısı, kallus oluşumu ve taze doku ağırlığı ile ilgili parametrelerin de incelendiği denemelerin sonucunda, Kalecik Karası üzüm çeşidinde sürgün ortamı için "IBA:0.0 mg/1 x BAP:1.0 mg/1" ve "IBA:0.5mg/l x BAP:1.0mg/l", köklendirme ortamı için "IBA:1.0 mg/1 x BAP:0.0 mg/1" ve "IBA:1.0 mg/1 x BAP:0.5 mg/1" kombinasyonları; 41 B anacında ise sürgün ortamı için "IBA: 0.0 mg/1 x BAP: 1.0 mg/1" köklendirme aşaması için "IBA: 5.0 mg/1 x BAP: 0.0 mg/1" kombinasyonların en iyi sonuçları verdiği tespit edilmiştir.

Jako (1989)' nun yaptığı araştırmada, Pinot noir ve Merlot çeşitlerinin 2-4 yapraklı ve 0.5-1 mm büyüklüğündeki sürgün uçlarından *in vitro'* da yetiştirilen bitkiler, 5 yıl sonra yapılan testlerde GLRV belirtisi göstermemiştir (Gürsoy 1991).

Altmayer (1990), Nepovirüslerle (ArMV. RRV, GFV, TmBRV, SLRV) ve leafroll (GLR) ile enfekte olan asmalar, *in vitro* meristem kültürü ile çoğaltılmıştır. Maksimum

büyüklüğü 0.5 mm olan ve 1-3 yaprak taslağına sahip sürgün ucu meristemleri, 1 mg/l IAA ve 2 mg/l BAP katkılı Linsmaier-Skoog ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün rejenerasyonundan sonra köklenme için modifiye edilmiş White ortamı kullanılmıştır. Aynı yöntem kullanılarak bulaşık asmaların *Agrobacterium tumefaciens'*den arındırılması da mümkün olmuştur.

Auger ve Arancibia (1990), Black Seedless çeşidinde 29-120 gün süreyle 38°C' de termoterapi uygulamışlar ve 120 günlük sıcaklık uygulamasından sonra 0.5 mm büyüklüğündeki sürgün uçlarını *in vitro* koşullarda geliştirmişlerdir. Bu uygulamalar sonucunda çeşidin Asma Yelpaze Yaprak Virüsü ile bulaşık olduğunu saptamışlardır.

Hartl *et al.* (1990), yaptıkları çalışmada, 0.5 mg/l IAA, 0.1 mg/l BA ve % 3 sukroz içeren MS ortamında bütün asma genotiplerine ait sürgün uçları başarılı olarak kültüre alınmıştır. Kuvvetli bitkicikler, BA (0.02-2.2 mg/l) ve IAA (0.1-0.5 mg/l) içeren ortama transfer edilmiştir. *in vitro'da* gelişen sürgünlerin büyüme özellikleri, üç temel morfolojik karakteri (sülüklerin bulunmaması, spiral filotaksi ve yapraklarda lateral sinüslerin bulunmaması) göstermiştir.

Karoglan e*t al.* (1990), meristem kültürü üzerinde gerçekleştirilen bir diğer çalışma ile %2 sukroz, %0.8 agar, 1 mg/l tiamin-HCl, 0.5 mg/l pridoksin-HCl, 2 mg/l glisin, 100 mg/l myo-inositol içeren IAA ve NAA'nın değişik konsantrasyonlarının ve kombinasyonlarının ilave edildiği MS' in tam ve yarı kuvvetli dozları ile LLOYD ve McCOWN (WPM) ortamları test edilmiştir. *Vitis vinifera* L'nin Chardonnay, Pinot white, Sultanina, Plavac mali ve Plavac mali sivi çeşitleri ile yürütülen çalışmada elde edilen bulgulara göre, 1 mg/1 BA ve 0.3 mg/1 IAA içeren MS ortamı en iyi sürgün çoğaltım ortamı olarak belirlenmiştir.

Gürsoy (1991), virüsten ari bitki elde etmek amacıyla *in vivo* ve *in vitro* koşullarda 30°C - 35°C ve 38°C'lerde 1 ve 2 ay süreyle termoterapi uygulamıştır. Denemede uygulanan sıcaklığın artmasıyla virüs ve virüs benzeri hastalıkların temizlenmesinde olumlu etkiler saptanmıştır.

Gray and Benton (1991), değişik sitokininlerin farklı konsantrasyonlarının meristem kültüründe başarı üzerine etkilerini incelemek için MS ortamını kullanmışlardır. Daha önceden 5 μM BA içeren MS ortamlarından elde ettikleri apikal meristem eksplantlarını 5, 10 ve 20 μM BA; 10, 20 ve 40 μM kinetin ve 0.5, 1 ve 5 μM TDZ kombinasyonlarında test etmişlerdir. *In vitro* köklenme için sürgünler 1 μM NAA içeren veya içermeyen MS ortamına aktarılmıştır. Farklı sitokinin kombinasyonları içerisinde BA hem kinetin hem de TDZ' ye göre çok daha iyi sonuç vermiştir. 5 ve 20 μM BA iki farklı üzüm çeşidi için de (sırasıyla Carlos ve Fry) en iyi sonucu vermiştir. *In vitro* köklendirme çalışmalarında 1 μM NAA katkılı ortam, köklenme oranını, kök uzunluğunu ve sürgün başına düşen kök sayısını arttırmıştır.

Gürsoy (1991), tarafından yapılan araştırmada meristem kültürü uygulamalarında MS besin ortamı modifiye edilerek kullanılmıştır. Başlangıç kültürü için kullanılan sıvı MS ortamına 2 mg/1 BAP eklenmiştir. Birinci ayın sonunda gelişen meristemler 7 g/1 agarla katılaştırılmış aynı kültür ortamına alınmıştır. Bu işleme meristemler sürgün oluşturuncaya kadar 2–3 ay devam edilmiştir. Oluşan sürgünler köklendirme amacıyla 1/2 MS ortamına şaşırtılmıştır. Ayrıca Gürsoy (1991), Ege Bölgesi'nde yaygın olarak yetiştirilen Yuvarlak Çekirdeksizin yanısıra, Perlette, Cardinal ve Razakı üzüm çeşitleriyle 110R, 99R, 420A, 41B ve Rupestris du Lot asma anaçlarına ait klon adaylarını ve fertleri virüs ve virüs benzeri hastalıklar açısından incelemiştir. Virüs ile bulaşık olduğu saptanan söz konusu genotiplerin arındırılmasında termoterapi, meristem kültürü ve bu iki yöntemin kombinasyonunu kullanmıştır. Araştırmada, meristem kültürü uygulamalarında diğer bitkilerle aynı sayıda sürgün ucu ile başlanmasına rağmen çeşitli aşamalarda kuruma ya da fungal bulaşmalar nedeniyle 99R. 420A ve Rupestris du Lot'tan bitki elde edilememiştir. Diğerlerinden toplam 24 adet bitkicik elde edilmiştir. Arındırma çalışmalarında sürgün ucunun küçük olmasının, test edilen virüs hastalıklarının temizlenmesinde olumlu katkıda bulunduğu görülmüştür. Sürgün ucu küçüldükçe bitki elde etmek için doku kültürü gibi birçok aşamayı kapsayan tekniklerin kullanılması gerekmiştir. Bu da çeşitli nedenlerle sonuçta elde edilen bitki sayısını etkilemiştir. Araştırma sonucunda, sürgün ucu büyüklüğünün 0,2–0,5 mm olmasının, özellikle GLRV I, GLRV III ve GPhLV un temizlenmesine olumlu etkide bulunduğu tespit edilmiştir.

Lewandowski (1991), tek boğumlu ve 15 mm'lik sürgün parçalarını kullanarak 100 mg/l myo-inositol 0.4 mg/l tiamin-HCl, 1.0 mg/1 BAP, 0.45 mg/l GA_3, 20.9 mg/l $FeSO_4 7H_2O$, 28.0 mg/l Na_2 EDTA $2H_2O$ içerecek şekilde modifiye ettiği MS ortamına (pH 5.7) dikim yapmış ve köklendirme denemesi için de 1-2 cm uzunluğundaki mikro çelikleri 1/2 MS ve myo-inositol, sukroz ve tiamin-HCl'i daha önce kullanmış olduğu dozun yarısına indirerek, 13.9 mg/l $FeSO_4 7H_2O$ ve 18.7 mg/l $Na_2EDTA\ 2H_2O$ olacak şekilde ayarladığı 0, 0.005, 0.01 ve 0.05 mg/l IBA ve 0, 0.001, 0.005 ve 0.01 mg/l NAA katkılı ortamları (pH 5.7) kullanmıştır. En iyi köklenmeyi 0.001 mg/l NAA/0.005 mg/l IBA katkılı ortam sağlamıştır. Ancak, en fazla kök sayısı 0.01 mg/l NAA 0.05 mg/l IBA katkılı ortamdan elde edilmiştir.

Sudarsono and Goldy (1991)'nin dört Muscadine üzüm çeşidinin *in vitro* meristem kültürü ile çoğaltılabilme yeteneklerinin belirlenmesine yönelik yapmış oldukları çalışmada, Chee ile değiştirilen MS besin ortamına değişik oranlarda BA, kinetin ve TDZ ilave edilerek değişik eksplant pozisyonlarının sürgün oluşumuna ve eksplant gelişimine etkileri incelenmiştir. TDZ ile BA veya kinetin kombinasyonlarının kullanıldığı ortamlarda sadece BA veya kinetin içeren ortamlara göre daha fazla taze ağırlık elde edilmiştir. Sadece BA veya sadece kinetin içeren ortamlarda tek sürgün oluşurken, TDZ ile BA veya kinetin kombinasyonlarının denendiği uygulamalarda daha fazla sayıda sürgün elde edilmiştir. Ayrıca, TDZ içeren ortamlarda kallus oluşmamıştır.

Kara (1992), Çavuş'un 21. Müşküle'nin 62. Hafızali'nin 7. Razakı'nın 14 ve 88. Sultani Çekirdeksizin 7 ve 23 ve Çal Karası'nın 36 no'lu klonlarının virüs ve virüs benzeri hastalıklardan termoterapi ve meristem kültürü yoluyla arındırılması üzerinde çalışmış ve meristem kültüründe 0.5 mg/1 BAP katkılı, yeşil çelik ve sürgünlerin köklendirilmesi amacıyla 0.03 mg/1 BAP ve 0.01 mg/1 NAA katkılı Linsmaier ve Skoog'e göre değiştirilmiş MS besin ortamını (pH 6.0) kullanmıştır. Sonuçta, 5.958 ve 1.417 arasında boğum sayısı ve 3.783 ile 0.858 cm arasında sürgün uzunluğu, 6.333 ile 0.833 cm arasında kök uzunluğu elde edilmiştir.

Singh *el al.* (1992), gölgede yetiştirilen Perlette üzüm çeşidinden alınan sürgün uçlarının eksplant olarak kullanıldığı çalışmada; 5, 10 veya 15 μM BA ve 0, 0.5, 2.0

veya 2.5 µM NAA ilave edilen MS ortamı kullanılmıştır. Bütün denemeler, sürgün uzama ve gelişimini etkilerken 0.5 µM NAA ve 10 µM BA kombinasyonundan, en yüksek yaşama oranı (%85) elde edilmiştir. Köklendirme için 1, 5, 10, 15 veya 20 µM IBA katkılı MS ortamlarının denendiği çalışmada, primer köklerin sayısı ve uzunluğu, lateral köklerin sayısı 10 µM IBA ilave edilmiş MS ortamında en yüksek değerleri vermiştir.

Baptista *el al.* (1993), Serada sürdürülen bitkilerin sürgün uçlarından 3 yaprak taslağı bulunduran ve 0.2-0.3 mm büyüklüğünde çıkarılan meristemlerin agar bazlı ortamda, 25 °C'de ve 16 saatlik fotoperiyotta (1000 lüks) kültüre alınmasının başarılı sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Singh ve Brar (1993), tarafından çekirdeksiz üzüm çeşitlerinde yürütülen araştırmada 0.5 mg/l BAP katkılı veya katkısız MS ortamında kültüre alınan mikroçoğaltılmış asmaların yapraklarından, adventif yapılar geliştirilememiştir. Adventif gözler, 1.0 veya 2.0 mg/l BAP içeren ortamda iki hafta süreyle gözlemlenmiştir. 5 hafta sonra rejenere olan eksplantlar kallus oluşumu olmaksızın 10-25 adventif sürgün oluşturmuşlardır. Oluşan sürgünler 4-5 hafta içerisinde 1 mg/1 IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir.

Koruza and Jelaska (1993) ise, meristem kültürü ile sağlıklı bitkiler elde etme etkinliğinin hastalık etmenine göre değiştiğini tespit etmiştir. Araştırıcılar meristem kültürü ile GLRV'nin %100 oranında arındırılabilirken, GFLV'nin ancak %60 oranında arındırılabildiğini tespit etmişlerdir.

Regner and Romann (1994) tarafından 2.9 µM IAA içeren MS besin ortamında ($CaCl_2$ yerine Ca ($N0_2$)$_2$ kullanılmıştır) sürgün ucu ve boğum kültürleri ile *in vitro* koşullarda elde edilen asmalardan alınan yapraklar temel MS, LS (Linsmaier & Skoog), NN (Nitsch & Nitsch) ortamları ve MS ile LS ortamlarının makro, mikro elementlerinin NN ortamına ait vitamin kompozisyonuyla kombine edilmiş LSN veya MSN ortamlarında değişik BA, GA_3, TDZ ve IAA kombinasyonları ile 0.5-1.0 g/l aktif kömür, % 0.01 chinosol, 0.5-2.0 ml/l havuç ekstraktı ve 0.25-0.5 g/l süt tozu kullanılarak denenmiştir.

Araştırma bulgularına göre, en yüksek sürgün gelişmesi 8.8 µM BA ve 0-2.9 µM IAA katılmış LS/NS ortamında, köklenme ise 2.9 µM IAA içeren NS ortamından elde edilmiştir. Çeşit rejenerasyonunda yoğun kallus oluşumu, ortamdaki yüksek büyümeyi düzenleyici seviyelerine bağlanmıştır (Doğan 2004).

Kalyon (1995)'un yapmış olduğu çalışmada, çiçek tomurcuklarına 72, 96 ve 120 saat süre ile +4 °C'lik soğuk şoku uygulanmasının ve besin ortamına katılan değişik 2,4-D/BAP ve NAA/Kinetin kombinasyonlarının asmalarda anter kültüründeki embriyo oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Bazı modifikasyonlar yapılan Nithsch ve Nitsch (1969) bileşimi, temel besin ortamı olarak kullanılmıştır. Erkek çiçekli Rupestris du Lot ve 99R genotiplerinin Hasandede ve Kalecik Karası üzüm çeşitlerine göre anter kültürüne daha yakın oldukları tespit edilmiştir. Anterlerle uygulanan soğuk şoku, genotip ve hormon konsantrasyonları arasında anter gelişme oranı bakımından etkileşim olduğu belirlenen aynı araştırmada, NAA/Kinetin hormon kombinasyonu, 2,4-D/BAP kombinasyonuna göre daha ümivar görülmüştür. Ancak hiçbir uygulamadan ve genotipten embriyogenik kallus veya embriyo elde edilememiştir. Sadece 99R ve Rupestris du Lot asmalarına ait anterler bazı uygulamalarda kallus/kallus benzeri oluşumlar meydana getirmişlerdir.

Kebeli vd. (1996), Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsünde gerçekleştirilmiş olduğu çalışmasında, Clairette şaraplık üzüm çeşidinin meristem kültürü ile *in vitro* koşullarda sürgünucu çoğaltımı üzerine, NAA ve BAP'dan oluşturulan sekiz ayrı kombinasyonun etkilerini Mayıs ayının ikinci yarısı, Haziran ayının ilk ve ikinci yarısı ve Temmuz ayının ilk yarısı olmak üzere dört ayrı devrede belirlemeye çalışmıştır. Araştırma sonucunda, NAA kapsamayan 2,0 mg/l' lik BAP dozunun Temmuz döneminde alınan meristem dokular üzerinde en etkili doz olduğu belirlenmiştir.

Baydar (1997), asma için en uygun *in vitro* mikroaşılama tekniğinin belirlenmesi amacıyla yapmış olduğu bir çalışmada, mikroaşılama çalışmalarında Kalecik Karası ve Uslu üzümüne ait sürgün uçları ile Kober 5 BB ve Vialla anaçlarına ait çöğürler kullanılmıştır. Araştırma sonucunda, en iyi sonuçları veren *in vitro* çimlendirme ortamı, sürgün ucu kaynağı, aşılı bitkilerin kültüre alındıkları besin ortamı ile aşılama yöntemi

belirlenmiş olup, aşı yerine uygulanan ve besin ortamına ilave edilen büyümeyi düzenleyici maddelerin etkileri incelenmiştir. *In vitro* koşullarda enfeksiyon nedeniyle çimlenemeyen Vialla tohumlarının *in vivo* koşullarda çimlendirildiği araştırmada, Kober 5 BB tohumları için en uygun *in vitro* çimlendirme ortamı olarak 0.5 mg/l GA_3, katkılı MS mineral tuzlarını içeren besin ortamı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çimlenme öncesi tohumların steril saf su içinde 24 saat süreyle bırakılmalarının sert tohum kabuğunu yumuşatarak, çimlenmeyi kolaylaştırdığı da saptanmıştır. Üzerinde çalışılan bütün kombinasyonlar için, en uygun sürgün ucu kaynağı olarak *in vitro* bitkilerden alınan sürgün uçlarının olduğunun tespit edildiği araştırmada, aşıda başarı ve gelişme kriterleri (sürgün uzunluğu, yaprak sayısı, sürgün yaş ve kuru ağırlıkları, kök uzunluğu, kök yaş ve kuru ağırlıkları) bakımından en yüksek değerler tepeye yerleştirme yöntemi ile aşılanarak katı MS ortamında kültüre alınan mikroaşılardan elde edilmiştir. Aşılama sırasında aşı yerine damlatılan BAP'ın ve besin ortamlarına ilave edilen büyümeyi düzenleyici maddelerin, aşı tutma başarısı üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı da belirlenmiştir.

Heloir *et al.* (1997) Pinot noir üzüm çeşidinin meristem kültürü yoluyla çoğaltılmasında erken safhada beş BA konsantrasyonu (1.1, 2.2, 4.4, 6.7 ve 8.9 μM) denemiş ve en iyi sonucu 8.9 μM BA'dan almıştır. Köklendirme aşamasında ise, NAA ve IBA'nın 2 farklı konsantrasyonu denenmiştir (2.5 ve 5 μM). NAA'Iı ortamda en fazla kök sayısı elde edilirken IBA katkılı ortama göre kökler daha kısa olmuştur. Kallus oluşumu ise, sadece NAA'lı ortamda gözlenmiştir. Farklı oksin konsantrasyonlarının etkileri arasında belirgin farklılıklar ortaya çıkmamıştır. Araştırma sonucunda, 2.5 μM'lık IBA katkısının Pinot noir sürgünlerinin *in vitro* köklendirilmesi için uygun olduğu tespit edilmiştir.

Elidemir ve Uzun (1998), bu araştırmada, tohum çimlenmesi güç olan erkenci çeşitler ile rudimenter olarak adlandırılan çekirdeksiz çeşitlerin melezlerinden embriyo kültürü yoluyla asma bitkisi elde etmeyi amaçlayan çalışmalarında, ana ebeveyn olarak erkenci çeşitlerden Trakya İlkeren ve Uslu tozlayıcı olarak çekirdeksiz çeşitlerden Barış ve Perlette çeşitlerini kullanmışlardır. Ovüller, melezlemelerin yapıldığı tarihten 40, 50 ve 60 gün sonra ovul embriyo kültürüne alınmıştır. Ovul ve embriyolar yarı katı Cain (C), Nitsch and Nitsch (NN), ve E20A besi ortamında kültüre alınmıştır. Embriyo çimlenme

oranları, çeşitlerin örnek alma zamanlarına ve kullanılan besi ortamlarına göre farklılıklar göstermiştir. En fazla embriyo çimlenme oranı, melezlemeden 50 gün sonra kültüre alınan ovüllerde, Uslu X Perlette melezinde C ortamında, Trakya İlkeren X Barış melezinde NN ortamından elde edilmiştir. Bitki eldesi bakımından en iyi ortam E20A ortamı olarak belirlenmiştir. Embriyo kültürü yöntemi kullanılarak, erkenci üzüm çeşitleri ile çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin melezlerinin embriyolarından bitki eldesi mümkün olmaktadır.

Kebeli vd (1999), Yapıncak, Hafizali, Papazkarası, Bozcaada Çavuşu, Kozak Beyazı, Gamay, Clairette, Semillon üzüm çeşitleri ve 99R, Kober 5BB, Rupestris du Lot anaçlarının sürgünlerinden alınan meristematik dokuları kullanarak bazı virüslerden arındırılmış bitkiler elde edilmesine yönelik olarak meristem kültürü yönteminin kullanıldığı bu çalışmada, besin ortamı olarak Murashige Skoog (1962) ortamı kullanılmıştır. Başlangıç ve sürgün oluşturma aşamasında büyümeyi düzenleyici maddelerden çeşide göre değiştirilen dozlarda (1-2 mg/1) olmak üzere BAP, köklendirme aşamasında ise oksin grubundan IBA 1 mg/1 dozunda kullanılmıştır.

Baydar (2000) tarafından, organogenesis yoluyla beş üzüm çeşidi ile iki asma anacına ait yaprak eksplantlarından adventif sürgün gelişimi üzerine genotip, eksplant kaynağı ve besin ortamlarının etkilerinin incelendiği çalışmada, yaprak eksplantları değişik oranlarda BAP ve NAA katkılı MS ve NN besin ortamlarında kültüre alınmıştır ve sonunda, adventif sürgün oluşumu için en uygun besin ortamının Kalecik Karası, Çavuş, Sultani Çekirdeksiz ve Kober 5BB için 2 mg/1 BAP katkılı MS ortamı olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca adventif sürgün oluşturma yetenekleri bakımından genotipler arasında farklılıklarında bulunduğu tespit edilmiştir.

Çelik vd (2000a), ülkemizde tarımsal alanda ilk EUREKA (EU 679 VITIS) projesi olma özelliği taşıyan ve Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde yürütülen ayağında; yerli standart 10 üzüm çeşidine (Bozcaada çavuşu, Emir, Hafizali, Kalecik Karası, Narince, Razakı, Sultani çekirdeksiz, Uslu, Yapıncak, Yuvarlak çekirdeksiz) ait 16 klon veya fert, GFLV, GLRV-C, ArMV, GFkV virüslerinin antiserumları ile testlenmiş; tüm klon ve fertlerin en az bir, çoğunun ise üç ya da daha fazla hastalık etmeni ile bulaşık olduğu

tespit edilmiştir. Virüslerle bulaşık oldukları saptanan tüm klon ve fertler, termoterapi+meristem kültürü kombinasyon tekniği ile arındırmaya tabi tutulmuş ve arındırmadan çıkan bitkiler, GFLV, ArMV, GFkV'in yanısıra GVA ve GLRV 1,2,3,5,7'ye ait ELISA antiserumları ile yeniden testlenmişlerdir. Çalışmaların sonucunda, Bozcaada Çavuşu'nun 110 ve 161, Razakı'nın 31. Yapıncak'ın 132 ve Yuvarlak Çekirdeksiz'in 5 no'lu klonları ile Narince'nin iki ve Emir'in bir ferdine ait temiz bitkiler elde edilerek, SUNFiDAN A.Ş. Salihli işletmesindeki kaynak parsele aktarılmıştır. Projenin Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde yürütülen ikinci bölümünde ise, üzerinde çalışılan 10 üzüm çeşidinin 6 asma anacı (5BB, SO4, 1103 P, 110 R, 41B, Fercal) ile uyuşma düzeylerinin belirlenmesine yönelik morfolojik ve anatomik incelemeler, *in vitro* mikroaşılama çalışmaları ve PAGE tekniği ile üç enzim sistemine (Peroksidaz, Asit Fosfataz ve Esteraz) ait enzimatik anaç/kalem uyuşmazlık çalışmalarının bulgularına göre, üzerinde çalışılan aşı kombinasyonlarında mutlak uyuşmazlığın sözkonusu olmadığı, ancak fenotip-çevre etkileşmesinden kaynaklanan oransal uyuşmazlığın aşılı asmaların gelişme ve verimliliğini etkilediği anlaşılmıştır.

Çelik ve İlbay (2002), ülkemiz bağcılığının sağlam ve sağlıklı bir temel üzerinde geliştirilmesi açısından birinci derecede önem taşıyan sertifikalı asma fidanı üretiminde, meristem kültürü tekniği ile elde edilen bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması aşamasında önemli bir sorun olan yüksek kayıpların, antitranspirant ve büyümeyi engelleyici kimyasal madde uygulamaları ile en aza indirilmesini amaçladıkları çalışmalarında, Alphonse Lavallee ve Atasarısı standart sofralık üzüm çeşitleri ile ülkemizin en önemli kırmızı şaraplık üzüm çeşitlerinden birisi olan Kalecik Karası'nın 9,12 ve 15 no'lu klonlarının yanısıra, Kober 5BB (5BB) ve 41B M.G. (41B) asma anaçları üzerinde çalışmişlardır. *In vitro* koşullarda köklenme (tam bitkiye dönüşüm) oranına ait en yüksek değer Kalecik Karası (Klon-12) ve Atasarısı (%100.0)'ından elde edilmiş, bu çeşitleri sırasıyla 5BB (%93.2), Alphonse Lavallee (%75.0), Kalecik Karası (Klon-15) (%56.7) izlemiştir. Dış koşullara uyum sağlayan bitki oranı (%) bakımından en yüksek oranlar ise %100,0 ile '5BB x 10 mg/L Wiltpruff (WP)' ve '5BB x 1 mg/L Paclobutrazol (PB)' kombinasyonlarından elde edilirken, bunları %80,0 ile '41B x 10 mg/L WP' kombinasyonu izlemiştir. Diğer genotiplere göre en yüksek değerler A.

Lavallee için 5 ve 10 mg/L WP (%50,0). Atasarısı için 10 mg/L WP (%37,1), Kalecik Karası'nın 9 no'lu klonu için 5 mg/L WP (%20,3), 12 no'lu klonu için 5 ve 10 mg/L WP (%70,0) ve 15 no'lu klonu için 20 mg/L WP (%62.2) uygulamalarından elde edilmiştir.

Tangolar vd. (2001)'nin yapmiş oldukları çalışmada ise somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonunun aşamalarının birincisi olan embriyojenik kallus elde edilmesi aşaması için uygun bir protokol oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla 41B Amerikan asma anacı ve Yalova incisi üzüm çeşidinin *in vivo* ve *in vitro* da yetiştirilen bitkilerinden alınan yaprak ayası ve yaprak sapı eksplant olarak kullanılmıştır. Bu eksplantlardan embriyojenik kallus elde edilebilmesi için üç değişik temel besin ortamı (MS, NN ve B5) dört farklı 2,4-D konsantrasyonu (0.5, 1, 2 ve 4 mg/1) ile denemeye alınmıştır. Eksplantlar 16 saat aydınlık ve sürekli karanlık olmak üzere iki farklı koşulda inkübe edilmişlerdir. 41B ve Yalova incisi'nin *in vitro* yaprak ayası ve yaprak sapı eksplantları bütün uygulamalarda *in vivo* bitkilerinden alınanlardan daha yüksek oranda kallus ve embriyojenik kallus oluşturulduğu tespit edimiştir.

Sarkar *et al.* (2001) Perlette ve Thompson Seedless üzüm çeşitlerinin doku kültürü ile çoğaltılması üzerindeki çalışmalarnda, en uygun ortam ve organ parçası tespit edilmeye çalışılmıştır. Kültür ortamı olarak, 1 mg/l NAA + 0.5 mg/l kinetin, 10 mg/l NAA + 0.5 mg/l BAP, 5 mg/l ve 2 mg/l BAP katkılı MS ortamı; 2 mg/1 BAP, 2 mg/l kinetin + 2 mg/l BAP katkılı 3/4 kuvvetli MS ortamı; "2 mg/1 IBA + 0.1 mg/l BAP", 0.1 mg/l gibberellik asit katkılı Knop ortamı kullanılmıştır. Araştırma bulgularına göre; çeşit, eksplantın doğası ve ortamın kimyasal bileşimi kallus yoğunluğunu, kallus tipini. kallus oluşumunun başladığı günleri ve rejenerasyonu etkilemiştir.

Argun vd. (2002) tarafından Orta Anadolu bağlarında Taç Uru hastelığına neden olan *Agrobacterium vitis*'in bölgesel dağılımı ve sürgün ucu kültürü ile bu patojenin arındırılması konusunda yürütülen çalışmada hem sofralık hem de şaraplık-şıralık üzüm çeşitlerine ait 3-4 yaprak taslağı içeren sürgünler ile çalışılmış ve sürgün ucu kültürü ile elde edilen bitkiciklerde yapılan testlemeler sonucunda, bu bitkilerin *Agrobacterium vitis*'ten ari olduğu tespit edilmiştir.

Dzazio *et al.* (2002) BA ve kinetinin 0.1, 5 ve 10 µM oranlarının denendiği bir diğer çalışmada; başlangıç ortamı olarak MS, MS/2, MS/4, MS/8, NN'e WPM ortamları, çoğaltma aşamasında MS, MS/2, NN ve WPM ortamları ve köklendirmede ise aktif kömürsüz ve 1 g/l aktif kömür eklenmiş MS/2 ortamları kullanılmıştır. BA eksplant başına sürgün sayısını arttırırken artan BA konsantrasyonunda eksplant başına yaprak sayısı azalmış, vitrifikasyon semptomları artmış ve en iyi sonuç 1 µM BA uygulamasından elde edilmiştir. Başlangıç ortamında, tam kuvvetli MS kültür ortamı en iyi sürgün gelişimini sağlamıştır. MS ortamının seyreltilmesi anacın gelişiminin yavaşlamasına neden olmasına karşın çoğaltma aşaması boyunca, MS/2 en etkili ortam olarak saptanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, 420 A anacının başlangıç aşamasında 1 µM BA içeren tam kuvvetli MS ortamında, çoğaltma aşamasında ise MS/2 ortamında kültüre alınabileceği belirlenmiştir.

Kebeli ve Işık (2003), yapmış oldukları bir araştırmada, Bozcaada Çavuşu, Amasya Beyazı, Yapıncak, Semillon ve Papazkarası üzüm çeşitlerinden izole edilen meristemleri ayrı ayrı yıllarda, başlangıç ve sürgün oluşturma aşamalarında 1 mg/1 BAP ve köklendirme aşamasında 1 mg/1 IBA katkılı MS ortamında (pH 5,8) kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda, meristem kültürü yoluyla *in vitro*'da çoğaltılmış üzüm çeşitlerinde morfogenesis sürecinin sarsıntıya uğradığı ve juvenilite olayının meydana geldiği tespit edilmiştir.

Doğan (2004) ise, Kalecik Karası üzüm çeşidinin 12 no'lu 1103 P asma anacının 113 no'lu ve 140 Ru asma anacının 101 no'lu klonlarının meristem kültürü yoluyla klonal mikroçoğaltımı için ekonomik ve pratik bir yöntem geliştirmek üzere sürgün aşamasında 6 değişik oksin (IBA) ve sitokinin (BAP) kombinasyonunun, köklenme aşamasında ise çift fazlı ortama aktif kömür katılmasının sürgün ve kök gelişimine etkilerini incelemiştir. 1103 P'nin 113 no'lu ve 140 Ru'nun 101 no'lu klonlarına ait asma anaçları için sürgün aşamasında MS ortamına sadece 0.5 mg/1 BAP katkısı en yüksek değerleri verirken; Kalecik Karasının 12 numaralı klonu için ise 0.5 mg/1 BAP ile birlikte ortama düşük konsantrasyonda (0.5 mg/l) oksin (IBA) ilavesinin sürgün verim ve kalitesini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir. Köklendirme aşamasında denenen aktif kömür katkılı ve tek fazlı ortamlarda sürgün sayısı genel olarak azalırken,

özellikle aktif kömür ilave edilmemiş. çift fazlı ortamlarda aksillar sürgün oluşumu artmıştır. En yüksek köklenme (tam bitki) oranı % 64.3 ile 140 Ru klon 101'de gözlenirken, bu değerler Kalecik Karası 12 numaralı klonda % 62.5 ve 1103 P klon 113'de ise % 50.0 olarak gerçekleşmiştir.

Rego (2004) başlangıç aşaması için tam kuvvetli MS ortamı ile birlikte "1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IBA", sürgün aşaması için yarı kuvvetli MS ve köklendirme aşaması için de yarı kuvvetli MS ile 1 mg/l IBA kullanılmış ve değişik asma genotiplerine ait her sürgünden 2-4 adet yeni sürgün elde edilmesi için 40 günlük sürenin yeterli olduğunu belirtmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma, 2005-2006 yıllarında Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü araştırma ve deneme seraları ve soğuk hava depoları ile, A.Ü. Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji Labotaruvarı Bahçe Bitkileri biriminde gerçekleştirilmiştir.

3.1 Materyal

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait "Klon Koleksiyon Bağı'nda bulunan Kalecik Karası üzüm çeşidinin 4 ve 23/2 numaralı klonlarına ait virüslerle (ArMV ve GLRaV-3) bulaşık olduğu belirlenmiş olan omcalardan alınan 0.2-0.4 mm büyüklüğündeki sürgün ucu meristemleri kullanılmıştır.

3. 2 Yöntem

3. 2. 1 Bitkisel materyalin elde edilmesi

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: 72) tarafından desteklenen 'Standart Üzüm Çeşitlerimiz ile Asma Anaçlarına ait Klonların Virüslerden Arındırılması ve Elde edilen Baz Materyallerle Kalem ve Anaç Damızlıklarının Kurulması' konulu araştırma kapsamında öngörülen DAS ELISA testleri yapılarak, ArMV ve GLRaV-3 virüslerinin bulunduğu belirtilen Kalecik Karası 4 ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klonlarına ait bitkilerden alınan çelikler bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

Kullanılacak olan asma çelikleri budama döneminde alınmış ve dikim ortamı hazırlanana kadar soğuk hava depolarında dezenfekte edilmiş halde polietilen torbalar içerisinde +4°C'de %90-95 nisbi nem koşullarında muhafaza edilmiştir.

Hava koşullarının uygun olmadığı dönemde, iklim odalarında katlama kapları ve tüplere dikilen tek gözlü/iki gözlü çeliklerden elde edilen sürgünler kullanılmış, omcaların

üzerinde sürgün bulunduğu bahar ve yaz döneminde ise seradaki sürgün uçları toplanmıştır.

3.2.2 Üzüm klonlarına ait çeliklerin sürdürülmesi

Sera (Şekil 3.1) ve iklim odasına (Şekil 3.2) klonlara ait çelikler, 1:1:1 oranında kum, perlit ve torf karışımını içeren saksılara, çimlendirme kaplarında (Şekil 3.3) ve polietilen torbalara (Şekil 3.4) dikilmiş ve budama, sulama, gübreleme ve hastalık ve zararlılara karşı ilaçlama gibi kültürel işlemler düzenli olarak gerçekleştirilerek bitkilerin sürmeleri ve sağlıklı bir şekilde gelişmeleri sağlanmıştır.

Kalecik Karası klonlarının çelikleri, sürdürülebimeleri için iklim odasına alınmış ve sıcaklığı 25±1 °C, gün uzunluğu 16 saat, ışık şiddeti 3500-3800 lüks koşullarında yetiştirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.1 Sera koşullarında saksılarda kum, perlit ve torf (1: 1: 1:) karışımında sürdürülen Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon çelikleri



Şekil 3.2 İklim odasında çimlendirme kaplarında ve polietilen tüplerde kum, perlit ve torf (1: 1: 1) karışımında sürdürülen Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon çelikleri



Şekil 3.3 İklim odasında çimlendirme kaplarında kum, perlit ve torf (1: 1: 1) karışımında sürdürülen Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon çelikleri



Şekil 3.4 İklim odasında polietilen torbalarda kum, perlit ve torf (1: 1: 1) karışımında sürdürülen Kalecik Karası 4numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon çelikleri



Şekil 3.5 İklim odasında kontrollü koşullarda sürdürülen Kalecik Karası 4 numaralı klona ait çelik

3.2.3 Besin ortamlarının bileşimi ve hazırlanması

Doku kültürü uygulamalarının tümü aseptik koşullar altında yapılmış olup, bu amaçla steril kabin kullanılmıştır. Kullanılan bistüri bıçağı ve pensler önceden steril edilmiş ve dikim işlemi sırasında da %96'lık etil alkole batırılıp alevden geçirilerek steril

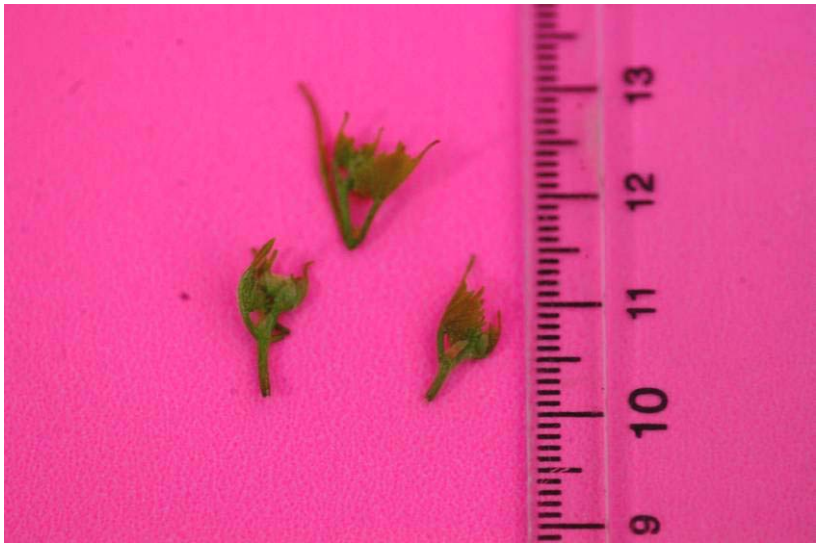
koşulların devamı sağlanmıştır. Besin ortamları daha önceden steril edilen petri kutularına steril kabin içerisinde 10'ar ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Ortamların otoklavda sterilizasyonu, 1.2 atmosfer basınç altında, 121^{o}C sıcaklıkta 20 dakika sürede gerçekleştirilmiştir. Besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog 1962) temel ortam bileşimi kullanılmıştır. MS ortamına %3 sukroz ve %0.7 agar ilave edilmiş ve pH 5.7'ye ayarlanmıştır. MS ortam reçetesine göre mineral tuzların ve vitaminlerin cins ve dozları Çizelge 3.1'de olduğu gibidir.

Çizelge 3.1 MS temel besin ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları (Murashige ve Skoog 1962).

Ortam bileşenleri	Miktarı (mg/litre)
$(NH_4)NO_3$	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_20$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$FeSO_4.7H_2O$	27,8
Na_2EDTA	37,2
$MnSO_4.4H_20$	22,3
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6
H_3BO_3	6,2
KI	0,83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25
$CoCl_2.6H_2O$	0,025
$CuSO_4.5H_2O$	0,025
Myo-inositol	100
Glisin	2,0
Pridoksin-HCl (Vit.B_6)	0,5
Thiamin-HCl	0,1
Nikotinik Asit	0,5

3. 2. 4 Sürgün uçlarının toplanması

İklim odasında ya da serada yetiştirilen bitkilerin sürgünleri l0-l5 cm' ye ulaştıktan sonra toplanan 1–3 cm uzunluğundaki bir ya da iki yapraklı sürgün uçları (Şekil 3.6), herhangi bir su kaybına uğramamaları için içerisinde su bulunan kaplarla laboratuvara taşınmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.6 Toplanan sürgün uçlarının görünümü



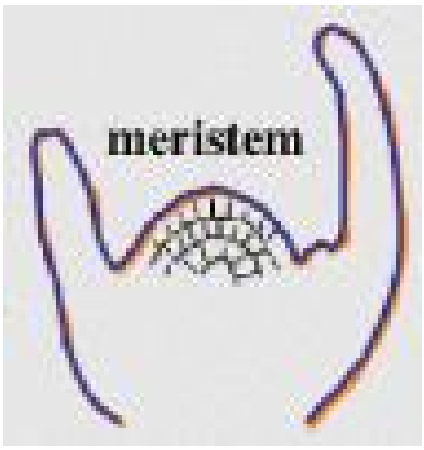
Şekil 3.7 Laboratuvara su bulunan beher içinde getirilen sürgün uçları

3. 2.5 Sürgün uçlarının dezenfeksiyonu

Laboratuvara getirilen sürgün uçları, % 20'lik sodyumhipoklorit içerisine birkaç damla Tween-20 damlatılarak hazırlanan çözelti içerisinde 15 dakika bekletilmiş, ardından 3 kez 5'er dakika süre ile steril saf su ile çalkalanarak yıkanmıştır. Tüm bu işlemler, steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3. 2. 6 Meristemlerin çıkartılması ve kültüre alınması

Dezenfekte edilen sürgün uçları, steril kabin içerisinde aseptik koşullarda stereomikroskop altında yaprak, sülük taslakları, pullar ve tüylerden temizlenerek 0.2–0.4 mm büyüklüğünde en uç kısımda bulunan sürgün ucu meristemleri çıkartılmıştır (Şekil 3.8) ve çıkartılan sürgün ucu meristemleri, 7 cm çapındaki petriler içerisine 0.5 mg/l GA_3 ve 2.5 mg/l BAP içeren tam kuvvetli Murashige ve Skoog (MS) içeren başlangıç ortamına (pH 5.8) her petride 4 eksplant olacak şekilde dikilerek etrafları streç filmle kapatılmış ve yaklaşık 4–5 hafta süre ile iklim odasında kültüre alınmıştır (Şekil 3.9 ve 3.10)



Şekil 3.8 Sürgün uçlarından çıkartılan meristem dokusu



Şekil 3.9 Başlangıç ortamına dikilen Kalecik Karası 4 numaralı klonuna ait meristemlerin birinci ve dördüncü haftalardaki görünüşü



Şekil 3.10 Başlangıç ortamına dikilen Kalecik Karası 23/2 numaralı klonuna ait meristemlerin birinci ve dördüncü haftalardaki görünüşü

3. 2. 7 Sürgün çoğaltım aşaması

4-5 hafta boyunca *in vitro* koşullarda geliştirilen, meristemler yine steril kabin içerisinde sürgün çoğaltma ortamı olarak kullanılarak "2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IBA" içeren tam kuvvetli MS ortamına aktarılmış ve 4 hafta süre ile gelişmeleri

sağlanmıştır(Şekil 3.11). Sürgün ortamına alınan meristemler 4. hafta sonunda alt kültüre alınarak, 4 hafta daha gelişmeleri sağlanmış ve sonrasında köklendirme aşamasına alınmışlardır.



Şekil 3.11 Meristemlerin sürgün ortamındaki gelişmeleri

3. 2.8 Köklendirme aşaması

4 hafta süre ile sürgün ortamında geliştirilen meristemler, farklı oksin ve sitokinin kombinasyonları ile modifiye edilen tam kuvvetli MS ortamına (pH 5.8) aktarılmıştır (Şekil 3.12). Ortamda kullanılan oksin ve sitokinin kombinasyonları aşağıda belirtilmiştir.

1. 0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP
2. 0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP
3. 1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP
4. 1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP
5. 2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP
6. 2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP
7. 0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP
8. 0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP
9. 1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP
10. 1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP
11. 2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP
12. 2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP



Şekil.3.12 İklim odasında gelişmeye alınan köklendirme aşamasındaki Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klona ait meristemlerin görünüşleri

3. 2. 9 Kültür koşulları

Başlangıç aşamasında petri kapları, sürgün aşamasında erlenler ve köklendirme aşamasında da tüpler içerisindeki kültürler, sıcaklığı 25±1 °C, gün uzunluğu 16 saat, ışık şiddeti 3200-3500 lüks olan iklim odasında yetiştirilmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Doku kültürü iklim odasındaki kontrollu koşullar altında yetiştirilen Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klona ait kültürler

3. 2. 9 Denemelerin değerlendirilmesi

Bu çalışmada kullanılmış olan Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klonlarına ait baz materyal üretimine yönelik olarak sürgün ucu kültürünün başlangıç, sürgün ve köklendirme aşamalarında incelenen özellikler aşağıda verilmiştir.

1. Başlangıç Ortamı	**İncelenen özellikler**
MS makro ve mikro elementleri ile vitaminleri	1. Meristemlerin yaşama oranı (%)
pH : 5.8	2. Meristemlerin gelişme düzeyi (cm)(En+Boy/2)
GA_3 : 0.5 mg/l	3. Meristemlerin kallus oluşturma oranı ve düzeyi
BAP : 2.5 mg/l	4. Vitrifikasyon

2. Sürgün Aşaması	**İncelenen özellikler**
MS makro ve mikro elementleri ile vitaminleri	1. Sürgün oluşturma oranı (%)
pH :5.8	2. Sürgün sayısı/Eksplant (n)
BAP : 2.0 mg/l	3. Sürgün uzunluğu (cm)
IBA : 1mg/l	4. Kallus oluşturma oranı (%) ve düzeyi (cm)

3. Köklendirme aşaması **İncelenen özellikler**

(Farklı hormon uygulamaları–3.2.6 Köklendirme aşaması kısmında verilmiştir)

MS makro ve mikro elementleri ile vitaminleri	1. Sürgün oluşturma oranı (%)
pH :5.8	2. Sürgün sayısı (n)
	3. Sürgün Uzunluğu (cm)
	4. Kallus oluşturma oranı (%) ve düzeyi (cm)
	5. Köklenme (Tam bitkiye dönüşüm) oranı (%)
	6. Kök sayısı (n) ve uzunluğu

3.2.10 Dış koşullara alıştırma aşaması

Erlenler içerisindeki bitkiler bir pens yardımıyla köklere zarar vermeden çıkarılmıştır. Saf su dolu üç ayrı kabın içerisinden sırayla geçirilerek köklerde yapay besin ortamı kalmayıncaya kadar yıkanmış ardından kök kısmı % 0.1 benomyl katkılı solüsyona batırılıp kurutma kağıdı üzerine konulmuştur. Kök budaması yapıldıktan sonra steril edilmiş torf + perlit ortamı olan plastik bardaklara dikilen bitkilere köklenmeyi ve sürgün oluşumunu teşvik edici olarak mikro ve makro besin elementlerini içeren aktivitör 9-10 damla olacak şekilde eklenmiş ve üst kısmı yine plastik bardakla kapatılarak iklim odasına götürülmüştür (Şekil 4.14). İklim odasında bir hafta kaldıktan sonra üzerindeki bardağa her gün bir iki delik açılarak dış koşullara yavaş yavaş alışması sağlanmış ve üçüncü hafta sonunda üstündeki bardak tamamen çıkartılmıştır. Birkaç gün bardak içerisinde kalan bitkiler dördüncü haftada saksılara aktarılmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.14 Plastik bardaklara dikilen bitkiler



Şekil 3.15 Saksılara aktarılan Kalecik Karası klonlarına ait bitkiler

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Önceki araştırmalarda ilk gelişme aşaması ve sürgün çoğaltma aşamaları konusunda optimizasyon çalışmaları yapılmış ve en uygun besin ortamı bileşimi ve hormon kombinasyonlarının öneri olarak bildirildiği kaynaklar gözönüne alınarak *in vitro* koşullarda yetiştirilen Kalecik Karasına ait iki farklı klondan alınan meristem dokuları, gelişmiş ve sağlıklı sürgünler oluşturmuştur. Baz materyal eldesine yönelik olarak elde edilen *in vitro* sürgünlerin yüksek oranda köklendirilerek dış koşullara aktarılması, en önemli aşamalardan birisidir. Bu nedenle *in vitro* sürgünlerin köklendirilmesi için en uygun büyüme düzenleyici kombinasyonunu belirlemeye yönelik olarak yürütmüş olduğumuz çalışmamızda, her iki klonda da köklenme sağlanmış ve tam bitki elde edilebilmiştir.

Üzerinde durulan özellikler bakımından araştırma "Tesadüf Parselleri Deneme Desenine" göre ve Faktöriyel düzende kurulmuş ve değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde, genotip faktöründe, Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon olmak üzere iki seviye; uygulama faktöründe," 0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP", "0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP", "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP", "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP","2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP","2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP", "0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP", "0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP", "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP", 1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP", "2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP", "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" olmak üzere oniki seviye bulunmaktadır.

Varyans analizi tekniğine ilişkin hesaplamaların sonucunda ortalama sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, kallus değeri, en uzun kök uzunluğu, kök uzunluğu, ortalama kök sayısı, bakımından "genotip x uygulama" interaksiyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$). Bunun anlamı üzerinde durulan özellikler bakımından bu iki çeşidin ortalaması arasındaki farkın uygulamadan uygulamaya değiştiği veya başka bir değişle oniki adet uygulama ortalamaları arasındaki farklılıkların Kalecik Karası 4 numaralı klon klonunda başka, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon klonunda başka şekillerde ortaya çıkmış olmasıdır. Çoklu karşılaştırmalar da bu yaklaşıma uygun şekilde yapılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için Duncan testi yapılmıştır. Ortalama

yaprak sayısı bakımından yapılan hesaplamalarda ise "genotip x uygulama" interaksiyonu istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Sadece Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon klonlarının ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$).

4.1 Başlangıç Aşaması

Başlangıç aşaması olarak "0,5 mg/l GA_3 ve 2,5 mg/l BAP" katkılı MS ortamında kültüre alınan asma sürgün ucu meristemlerinin yaşama oranı (%), gelişme düzeyleri (cm), meristemlerin kallus oluşturma oranı (%) ve düzeyleri (mm) ve vitrifikasyon ile ilgili bulgular sırasıyla Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.

4.1.1 Meristemlerin yaşama oranı (%)

Üzerinde çalışılan asma genotiplerine ait sürgün ucu meristemlerinin yaşama oranlarının karşılaştırılmasında Z testi kullanılmıştır. Kalecik Karası 4 numaralı klonu ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klonu arasında kültüre alınan meristemlerin yaşama oranları bakımından istatistik olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Singh *et.al* (1992) Perlette üzüm çeşidinde yaptığı araştırmada, sürgün uçlarının eksplant olarak kullanmış ve en yüksek yaşama oranını % 85 olarak bulmuştur. Doğan (2003)'ın Kalecik Karası 12 numaralı klonununda elde ettiği %80'lik yaşama oranı, bizim çalışmamızda yer alan Kalecik Karası 23/2 numaralı klonu ile aynı değeri taşımaktadır; fakat Kalecik Karası 4 numaralı klonun yaşama oranı bir miktar azalarak % 65'e düşmüştür (Çizelge4.1). Ancak istatistiksel olarak bu farklılığın önemli olmaması, bulgularımızla, önceden yapılan araştırma sonuçlarının uyumlu olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1 İki değişik Kalecik Karası klonuna ait meristemlerin yaşama oranları (%)

GENOTİP	YAŞAMA ORANI
Kalecik Karası 4 numaralı klon	65
Kalecik Karası 23/2 numaralı klon	80

4.1.2 Meristemlerin gelişme düzeyleri (cm)

En, boy ve gelişme düzeyleri bakımından genotiplerin karşılaştırılmasında varyans analizi tekniği kullanılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda en ve boy ölçümleri ile bunlardan elde edilen gelişme düzeyleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. En ve boy ölçümleri ve bunların ortalamasının alınmasından sonra elde edilen değerler arasında yani gelişme düzeyleri bakımından istatistiksel olarak Kalecik Karası klonları arasında farklılık tespit edilememiştir. Buna karşılık Doğan (2003), Hatipoğlu (1997), Roubelakis-Angelakis (1990), Dalloul *et al.*(1990) meristemlerin *in vitro* büyüme ve gelişmesinin genotipe bağlı olarak değişim gösterdiğini ve sürgün ucu meristemlerinin başlangıç ortamındaki gelişme düzeylerinin istatistiki olarak farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Doğan (2003) tarafından gözlenen sonuçlarda, en iyi gelişim gösteren Kalecik Karası 12 numaralı klonu 140Ru ve 1103P izlemiştir. Ancak bizim çalışmamızda kullanılan iki genotipin, pekçok özellik bakımından aynı kökenden gelmiş olmaları ve sadece aynı çeşidin farklı klonları olması nedeniyle *in vitro* koşullarda farklı gelişme kuvveti sergilemediklerini söylemek mümkündür. Böyle bir çalışmanın farklı üzüm genotipleri ile tekrarlanması halinde, genotipler arasında farklı gelişme oranlarının ortaya çıkacağını beklemek normaldir.

Çizelge 4.2 İki değişik Kalecik Karası klonuna ait meristemlerin gelişme düzeyleri (cm)

GENOTİP	EN (cm)	BOY(cm)	Gelişme düzeyleri (en+boy/2)
Kalecik Karası 4 numaralı klon	0.25 ± 0.09	0.69 ± 0.30	0.22 ± 0.01
Kalecik Karası 23/2 numaralı klon	0.22 ± 0.08	0.71 ± 0.25	0.25 ± 0.01

4.1.3 Meristemlerin kallus oluşturma oranları (%) ve düzeyi (cm)

Doğan (2003)'de Kalecik Karası 12 numaralı klon'da görüldüğü gibi Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun'da kallus oluşumu görülmemiştir.

4.1.4 Vitrifikasyon oluşma durumu

Dan-Hua and Meredith (1985) ile Doğan (2003) tarafından asmada yapılan meristem kültürü çalışmalarında, gelişmenin değişik aşamalarında vitrifikasyon ortaya çıktığı ifade edilmiş ve çalışmanın kurgulanması aşamasında bu yüzden gözlemler arasına bu özellik de dahil edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun'da vitrifikasyon oluşumu görülmemiştir.

4.2 Sürgün Çoğaltma Aşaması

Başlangıç ortamında 4 hafta geliştirildikten sonra sürgün aşaması olarak "2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l IBA" katkılı MS ortamında kültüre alınan genotiperde sürgün sayısı (n), sürgün uzunluğu (cm), kallus oluşturma oranı (%) ve düzeyi (cm) ile ilgili bulgular aşağıdaki alt başlıklarda açıklanmış ve sırasıyla çizelge 4.3, 4.4'de gösterilmiştir.

4.2.1 Sürgün sayısı (n)

Sürgün sayıları karşılaştırılırken eldeki gözlemler karekök transformasyonuna tabi tutulmuş daha sonra t testiyle irdelenmiştir. Sürgün sayısı bakımından yapılan t testi sonucunda Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Sürgün sayısı bakımından, literatürde yer alan önceki çalışmalardan alınan en yüksek değerler sitokinin ve oksinlerin bir arada kullanıldığı MS ortamı bileşimlerinden elde edilmiştir (Sudarsono and Goldy 1991, Doğan 2003). Baydar (2000) tarafından yapılan araştırma sonucunda ise adventif sürgün oluşumu için en uygun besin ortamının Kalecik Karası, Çavuş, Sultani Çekirdeksiz ve Kober 5BB için "2 mg/l BAP" katkılı MS ortamı olduğu tespit edilmiştir. Denemelerimizde kullanılan klonların sürgün sayılarına ait değerler çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Kalecik Karası 4 numaralı klonu için sürgün sayısı 3.67 adet iken Kalecik Karası 23/2 numaralı klonu için 3.83 adet olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3 Sürgün çoğaltımı aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait sürgün sayıları (n)

GENOTİP	SÜRGÜN SAYISI
Kalecik Karası 4 numaralı klon	3.67 ± 0.5
Kalecik Karası 23/2 numaralı klon	3.83 ± 0.6

4.2.2 Sürgün uzunluğu (cm)

İki farklı Kalecik Karası klonunun meristemlerinden geliştirilen sürgünlerin uzunlukları karşılaştırılırken t testi kullanılmıştır. Yapılan t testi sonunda iki grup ortalaması arasındaki fark, istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

Çavuş, Müşküle, Hafızali, Razakı, Sultani Çekirdeksiz ve Çal Karası çeşitlerinde meristem kültüründen elde edilerek, *in vitro* koşullarda büyütülen sürgünlerin uzunlukları, 3.783–0.858 cm arasında değişmiştir (Kara 1992). Doğan (2003) ise

Kalecik Karası 12 numaralı klonun sürgün uzunluğunun en fazla 1.52 cm olduğunu kaydetmektedir. Çalışmamızda Kalecik Karası 4 numaralı klon için sürgün uzunluğu 2.42 ± 1.2 cm iken, Kalecik Karası 23/2 numaralı klonunda ise 2.04 ± 0.3 cm olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Bu durumda, sürgün uzunluğu bakımından genotipler arasında farklılıkların ortaya çıkabileceği, ancak bu farklılık üzerinde doku kültürünün yapıldığı yer ve zaman faktörünün de etkisinin olabileceği yorumu akla gelmektedir. Çünkü Kalecik Karası'na ait bizim kullandığımız iki klon arasındaki farklılık aynı deneme koşullarında farklılık göstermez iken; aynı çeşidin bir başka klonunda çalışan Doğan (2003), bizim bulduğumuz sürgün uzunluğunun yaklaşık yarısı bir değerden bahsetmektedir. Bu sonuçlar, genotipten kaynaklanacak gelişme kuvvetinden olabileceği gibi, farklı laboratuvar koşulları, bitkisel materyalin alındığı ekoloji ve donör bitkinin beslenme durumu, kullanılan besin ortamlarının yapısı gibi değişkenlerden de kaynaklanmış olabilir. Ancak bizim elde etiğimiz değerler, Kara (1992) tarafından verilen referans değerlerin arasında yer almakta ve sağlıklı bir gelişme kuvvetini yansıtmaktadır.

Çizelge 4.4 Sürgün çoğaltma aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait sürgün uzunlukları(cm)

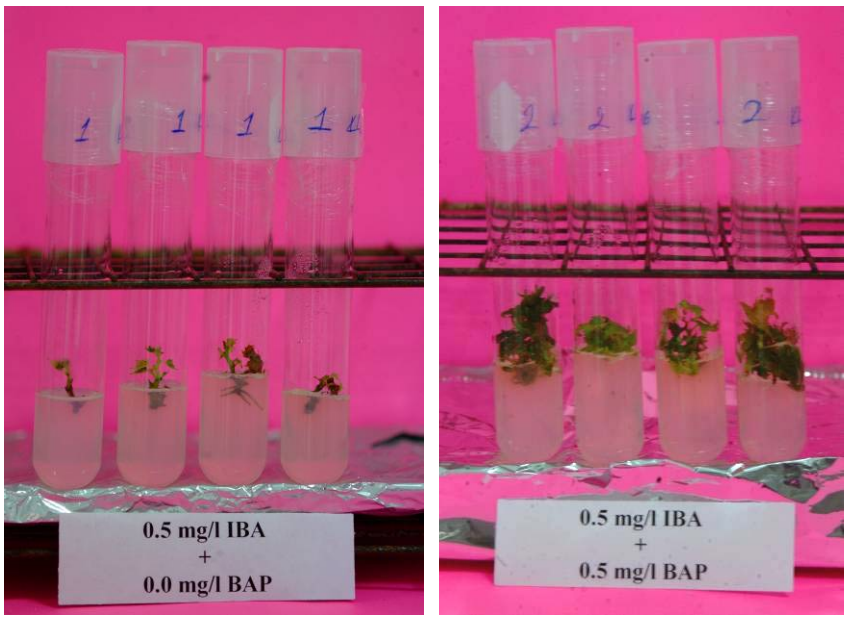
GENOTİP	SÜRGÜN UZUNLUĞU
Kalecik Karası 4 numaralı klon	2.42 ± 1.2
Kalecik Karası 23/2 numaralı klon	2.04 ± 0.3

4.2.3 Kallus oluşturma oranı (%) ve düzeyi (mm)

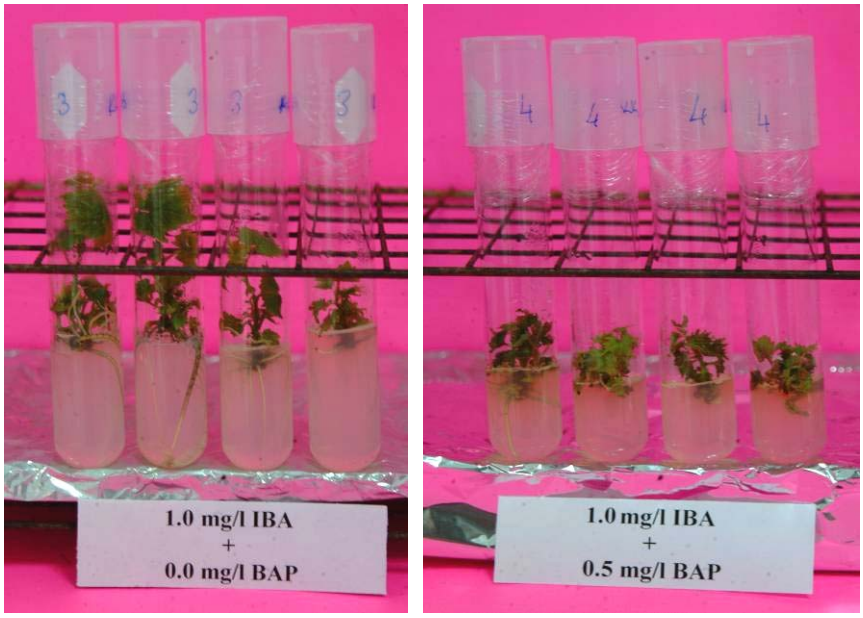
Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon'da kallus oluşumu görülmediği gibi, Doğan (2003) da Kalecik Karası 12 numaralı klonunda kallus oluşumundan bahsetmemektedir.

4. 3 Köklendirme aşaması

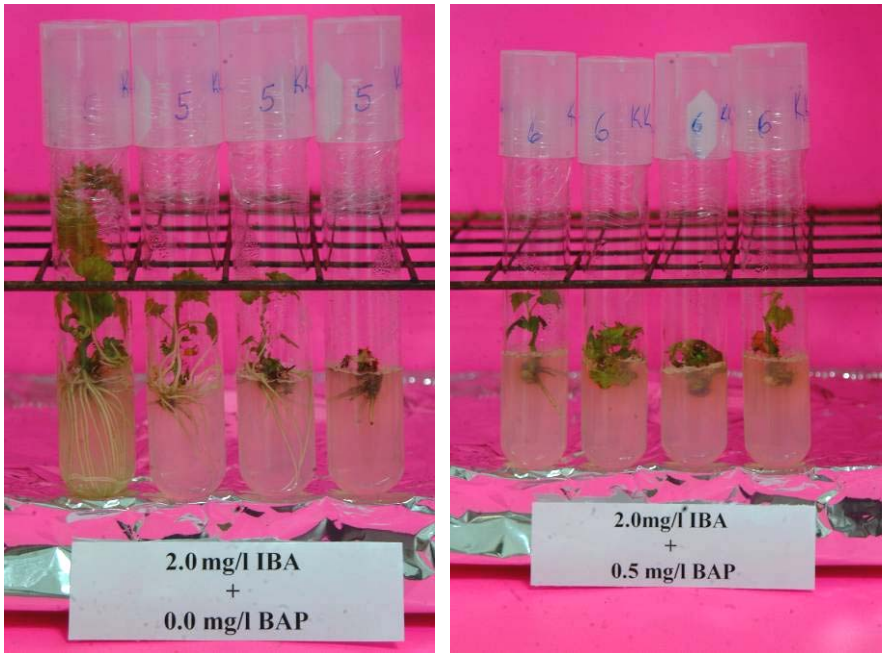
Sürgün aşamasında elde edilen sürgünler için en uygun köklendirme ortamının belirlenmesi amacıyla kullanılan 12 farklı besin ortamı bileşiminde geliştirilen sürgünlerde; sürgün sayısı (n), sürgün uzunluğu (cm), Sürgünlerdeki yaprak sayısı, kallus oluşturma oranı (%) ve düzeyi (mm) köklenme oranı (tam bitkiye dönüşüm oranı) (%), kök sayısı (n) ve uzunluğu (eni) incelenmiştir (Şekil 4.1-4.12). Sürgün çoğaltma aşamasında elde edilen sürgünler, köklendirme aşamasında da aksillar sürgün oluşturduklarından esas olarak sürgün aşamasında değerlendirilen sürgün sayısı (n) ve uzunluğu (eni) köklendirme aşamasında da incelenmiştir.



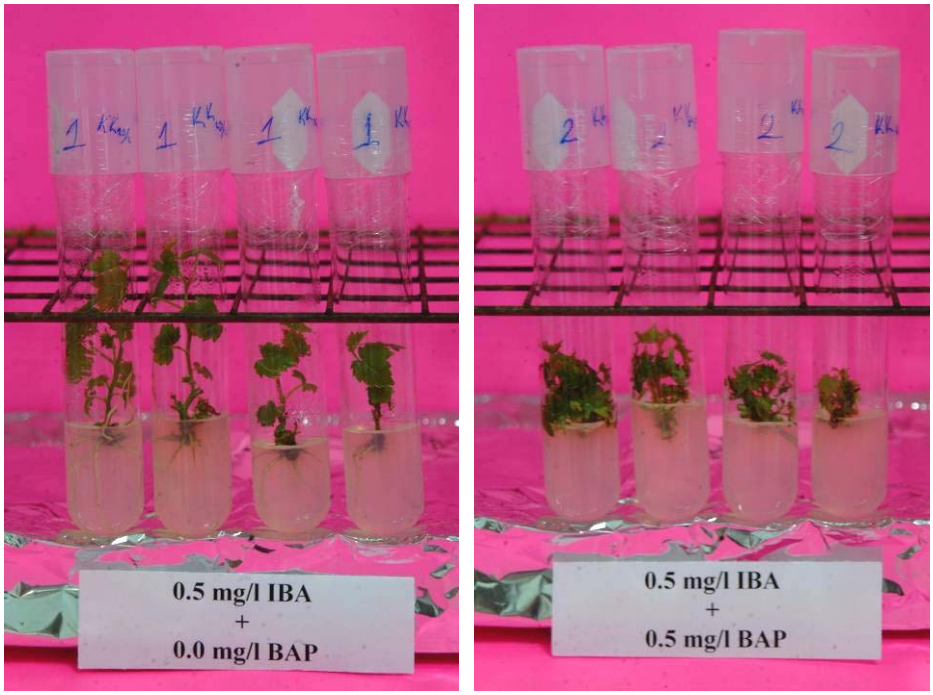
Şekil 4.1. Kalecik Karası 4 numaralı klonun "0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (1) ve "0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (2) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



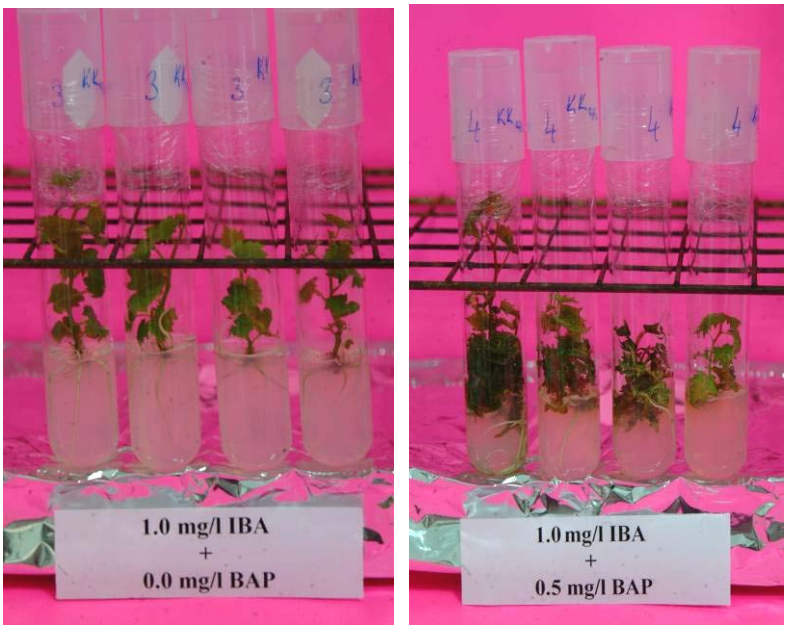
Şekil 4.2. Kalecik Karası 4 numaralı klonun "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (3) ve "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (4) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



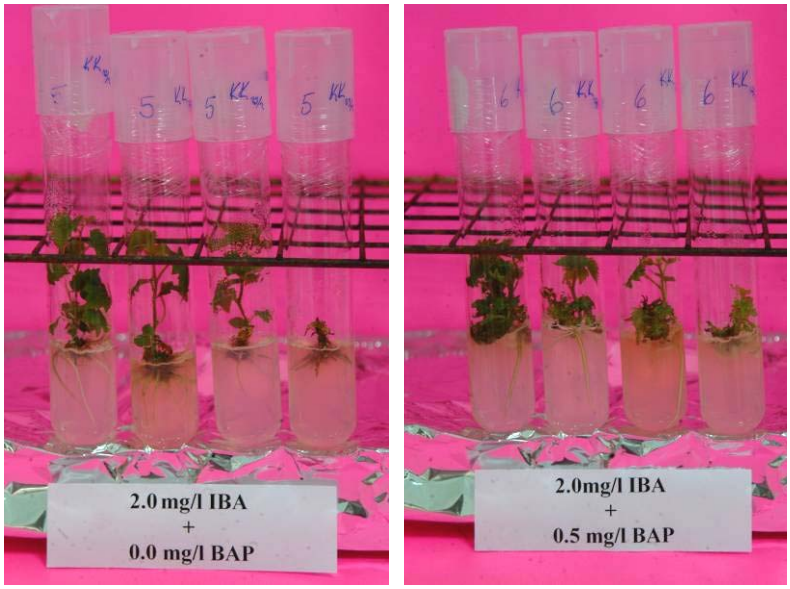
Şekil 4.3 Kalecik Karası 4 numaralı klonun "2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (5)ve "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (6) kombinasyonundaki kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



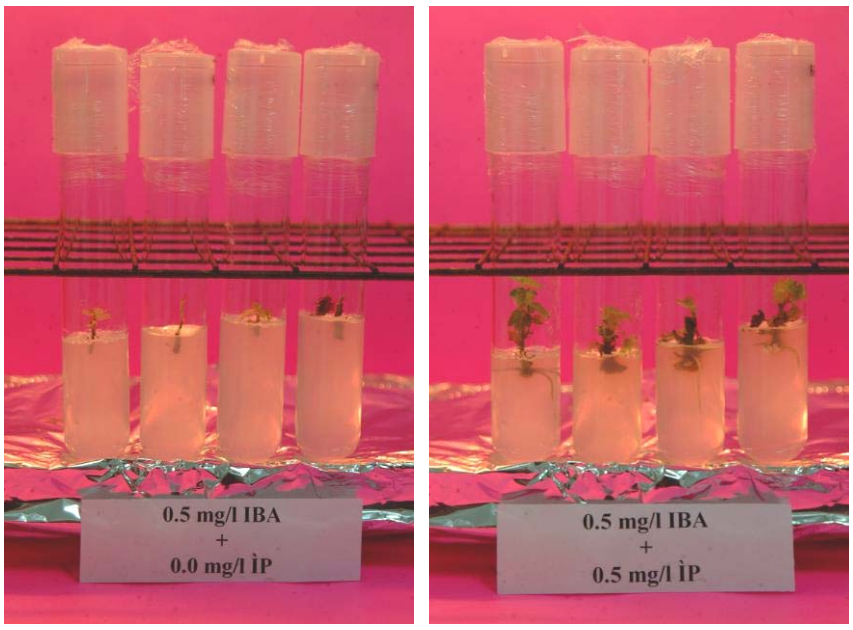
Şekil 4.4 Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun "0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (1) ve "0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (2) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



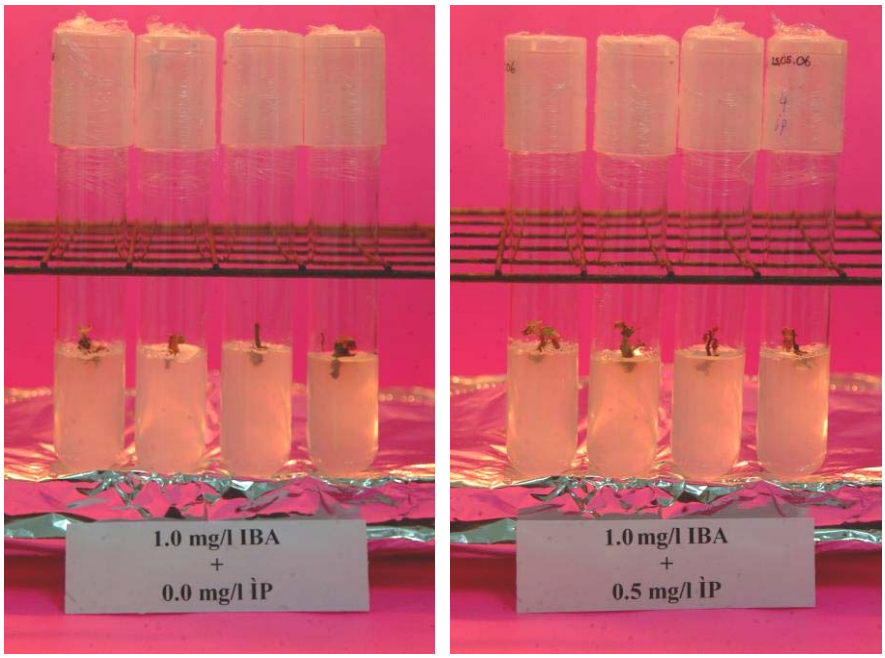
Şekil 4.5 Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (4) ve "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (4) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



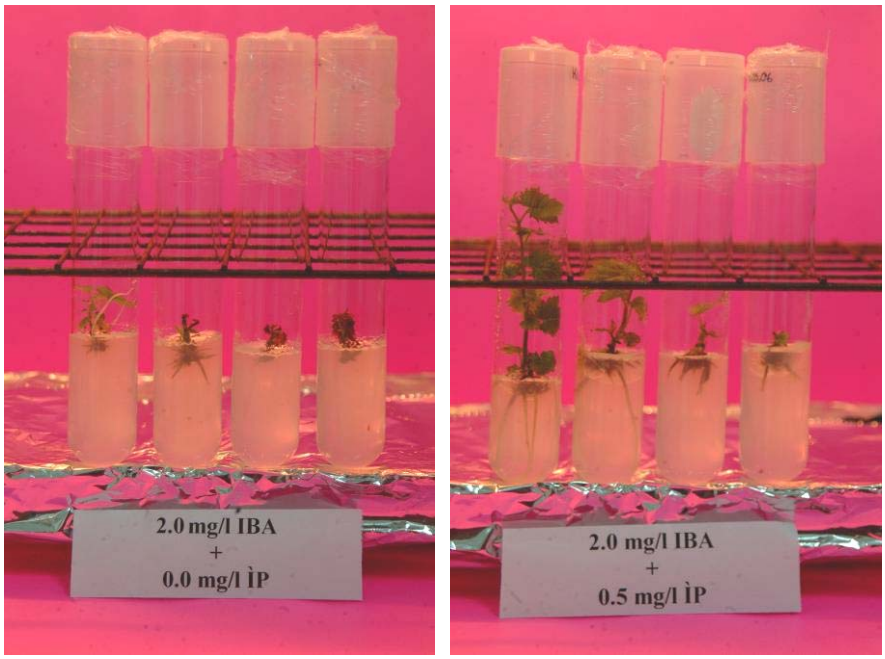
Şekil 4.6 Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun "2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" (5) ve "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" (6) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



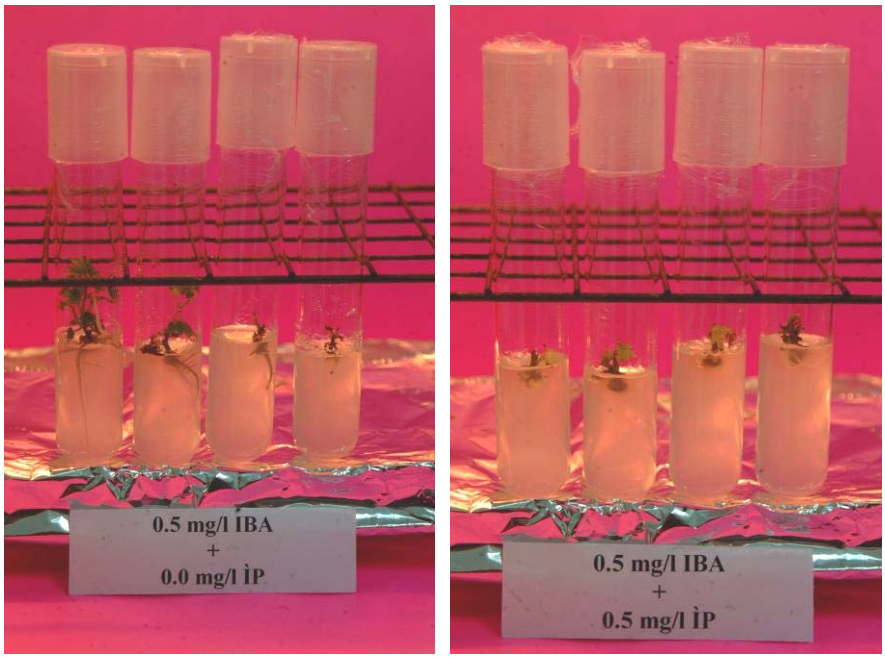
Şekil 4.7 Kalecik Karası 4 numaralı klonun "0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l İP" (7) ve "0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (8) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



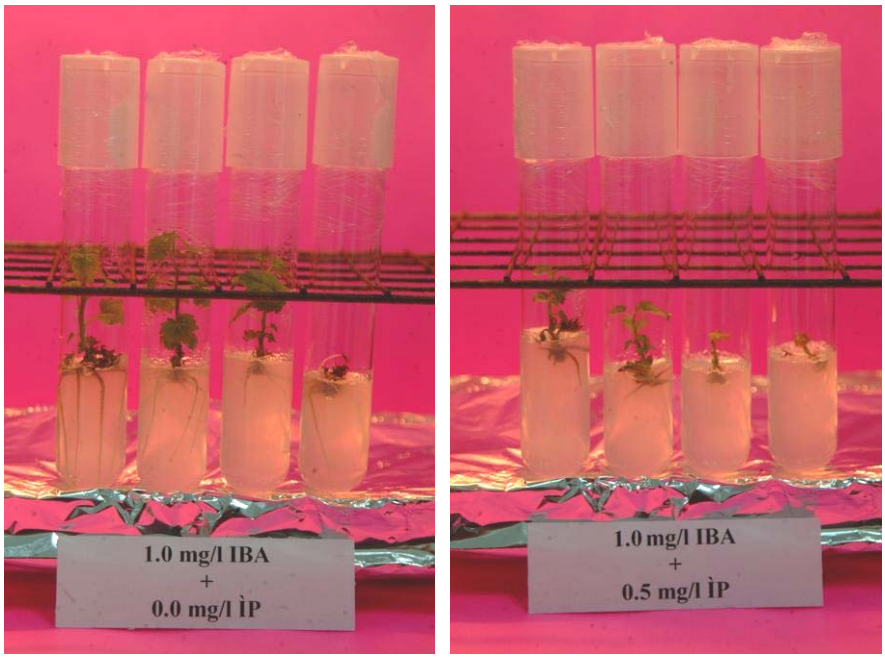
Şekil 4.8 Kalecik Karası 4 numaralı klonun **"**1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (9) ve "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (10) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



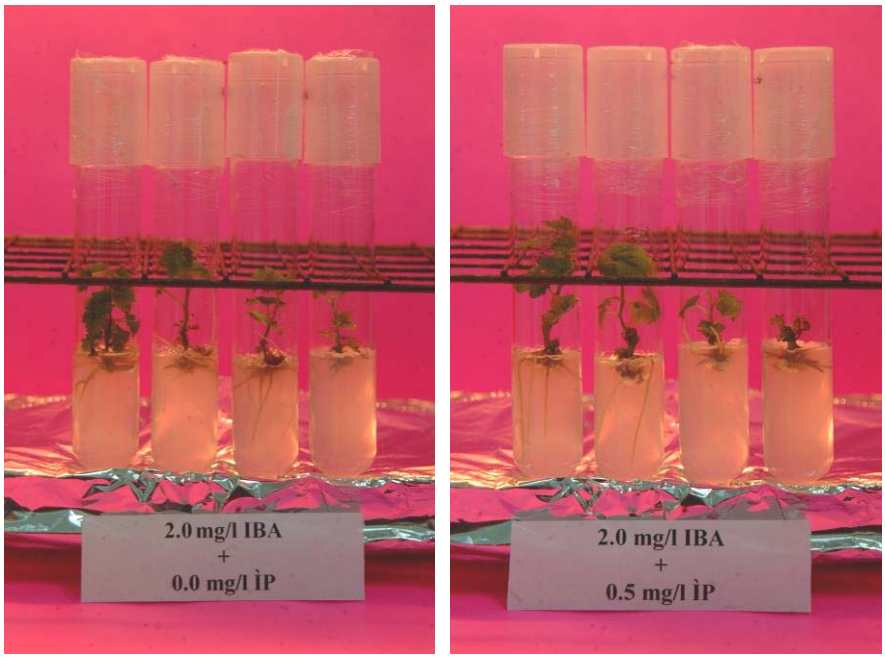
Şekil 4.9 Kalecik Karası 4 numaralı klonun **"**2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (11) ve "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (12) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



Şekil 4.10 Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun "0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (7) ve "0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (8) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



Şekil 4.11 Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (9) ve "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (10) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları



Şekil 4.12 Kalecik Karası 23/2 numaralı klon "2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" (11) ve "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" (12) kombinasyonlarında gelişen sürgünler ve kök oluşum durumları

4.3.1. Köklenme aşamasında oluşan sürgün sayısı (n)

Varyans analizi tekniğine ilişkin hesaplamaların sonucunda köklenme aşamasındaki sürgünlerde oluşan yeni sürgünlerin sayısına ilişkin değerlendirmeler yapılmış, ortalama sürgün sayısı bakımından genotip x uygulama interaksiyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi 2, 4 ve 6. uygulamalarda genotipler arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon'da sürgün oluşumu daha fazladır. Kalecik Karası 4 numaralı klon için en yüksek sürgün sayısı "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" dozları kullanılan onuncu uygulamadan elde edilirken (2.11 adet) Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için dördüncü uygulama olan "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" kombinasyonları en yüksek sayıda aksillar sürgün oluşumuna neden olmuştur. Bu kombinasyonlarda oluşan sürgün sayıları sırasıyla 2.11 adet ve 2.11 adet'tir (Çizelge 4.5) (Şekil 4.13).

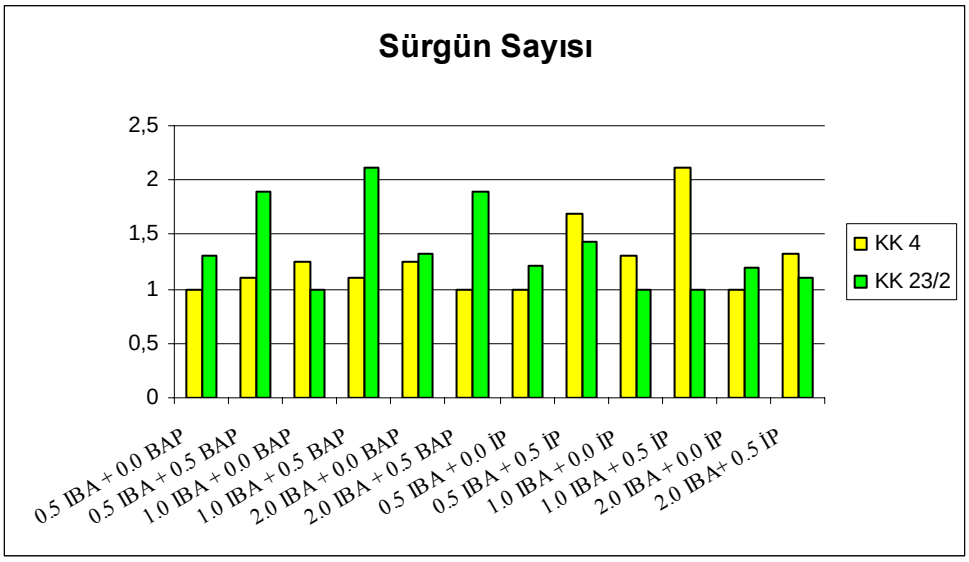
Çizelge 4.5 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait sürgün sayısı (adet)

UYGULAMALAR	KALECİK KARASI 4	KALECİK KARASI 23/2
1 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	1.0 ± 0.0 **c*** **A****	1.30 ± 0.15 **bc A**
2 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	1.11 ± 0.11**b B**	1.90 ± 0.34 **ab A**
3 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	1.25 ± 0.16 **b A**	1.00 ± 0.0 **c A**
4 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	1.10 ± 0.1 **b B**	**2.11 ± 0.42 a A**
5 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	1.25 ± 0.16 **b A**	1.33 ± 0.21 **bc A**
6 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	1.0± 0.0 **b B**	1.89 ± 0.26 **ab A**
7 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	1.0 ± 0.0 **b A**	1.22 ± 0.14 **c A**
8 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	1.7 ± 0.33 **ab A**	1.43 ± 0.3 **bc A**
9 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	1.3 ± 0.15 **b A**	1.0 ± 0.0 **c A**
10 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	**2.11 ± 0.45 a A**	1.0 ± 0.0 **c A**
11 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	1.0 ± 0.0 **b A**	1.2 ± 0.22 **c A**
12 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	1.33 ± 0.23 **b A**	1.1 ± 0.1 **c A**

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0.01$)
* Küçük harfler uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir
** Büyük harfler genotipler arasındaki farklılıkları göstermektedir

Doğan (2003) da, köklenme aşamasındaki sürgünler üzerinde oluşan aksiller sürgünler bakımından bir değerlendirme yapmıştır. Buna göre en yüksek sürgün sayısı, 1103 P klon 113 ve 140 Ru klon 101 için çift fazlı ve aktif kömürsüz ortamlarda sırasıyla 4.27 ve 4.96 adet, Kalecik Karası 12 numaralı klonu için tek fazlı ve binde 1 oranında aktif kömür katkılı ortamdan 1.83 adet olarak elde edilmiştir.

Şekil 4.13 de sürgün sayısına ait genotip x uygulama interaksiyonunu grafik olarak gösterilmiştir. Aynı şekilde Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon'da 10. ve 4. uygulamalarda en yüksek değerler görülmektedir.



Şekil 4.13 Köklendirme aşamasında iki farklı Kalecik Karası klonuna ait eksplantlar üzerinde oluşan sürgün sayısı

Genel bir gözlem bildirmek gerekirse, Klon 4'te köklenme aşamasında sürgün oluşturma eğiliminin klon 23/2'ye göre daha düşük olduğunu söylemek mümkündür. Bununla birlikte 2iP, klon 4'te oksin dozunun düşük kullanıldığı kombinasyonda sürgün oluşumunu belirgin biçimde olumlu yönde etkilemiştir. Klon 23/2'nin Sürgün oluşturmaya karşı daha fazla eğiliminin bulunduğu ve BAP'nin ilave edildiği ortamlarda, oksin baskısının düşük olması durumunda sürgün oluşumu eğiliminin daha da belirginleştiğini söylemek yanlış olmayacaktır. Ancak köklendirme ortamında amaç sürgün çoğaltımını sağlamak olmadığından, bu oluşum artı bir değer olarak nitelendirilmemiştir.

4.3.2. Oluşan sürgünlerin uzunluğu (cm)

Köklenme aşamasında oluşan sürgün uzunluğu bakımından Kalecik Karası 4 numaralı klon için uygulamalar arasında istatistiki anlamda bir fark bulunmazken Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için uygulamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir. Kara (1992) Çavuş, Müşküle, Hafızali, Razakı, Sultani Çekirdeksiz ve Çal karası'nın bazı klonlarında yaptığı çalışmada 5.958 ve 1.417 arasında boğum sayısı ve 3.783 ile 0.858 cm arasında sürgün uzunluğu elde etmiştir. Çalışmamızda ise elde edilen en yüksek

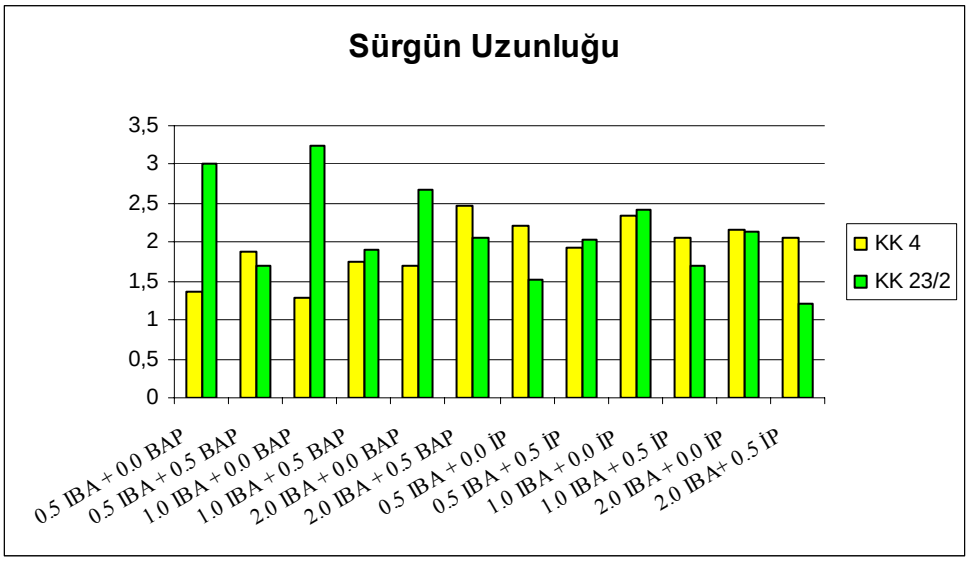
değerler Kalecik Karası 4 numaralı klon için "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" uygulaması ile 2.46 cm, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için ise "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" uygulaması ile 3.25 cm dir. İki genotip arasındaki farkı 1., 3. ve 5. uygulamalarda görmekteyiz.Sürgün uzunluğu bakımından birinci sırada Kalecik Karası 23/2 numaralı klonu ikinci sırada Kalecik Karası 4 numaralı klon bulunmaktadır (Çizelge 4.6) (Şekil 4.14).

Çizelge 4.6 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait oluşan ait sürgünlerin uzunluğu(cm)

UYGULAMALAR	KALECİK KARASI 4	KALECİK KARASI 23/2
1 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	1.37 ± 0.11 **a* B****	3.02 ± 0.5 **ab A**
2 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	1.87 ± 0.26 **a A**	1.71 ± 0.22 **ba A**
3 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	1.29 ± 0.09 **a B**	**3.25 ± 0.73 a A**
4 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	1.74 ± 0.33 **a A**	1.9 ± 0.4 **bc A**
5 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	1.69 ± 0.23 **a B**	2.67 ± 0.53 **abc A**
6 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	**2.46 ± 0.7 a A**	2.07 ± 0.23 **abc A**
7 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	2.21 ± 0.39 **a A**	1.53 ± 0.2 **c A**
8 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	1.93 ± 0.14 **a A**	2.04 ± 0.4 **abc A**
9 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	2.35 ± 0.30 **a A**	2.42 ± 0.52 **abc A**
10 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	2.07 ± 0.30 **a A**	1.71 ± 0.23 **bc A**
11 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	2.17 ± 0.71 **a A**	2.13 ± 0.45 **abc A**
12 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	2.06 ± 0.30 **a A**	1.2 ± 0.42 **abc A**

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0.01$)
* Küçük harfler uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir
** Büyük harfler genotipler arasındaki farklılıkları göstermektedir

Şekil 4.14'de sürgün uzunluğuna ait genotip x uygulama interaksiyonunu grafik olarak gösterilmiştir. Aynı şekilde yapılmış olan diğer çalışmalara benzer şekilde Kalecik Karası 4 numaralı klon için 6. uygulamada ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon'da 3 uygulamalarda en yüksek değerleri görmekteyiz.



Şekil 4.14 Köklendirme aşamasında iki farklı Kalecik Karası klonuna ait sürgün uzunluğu

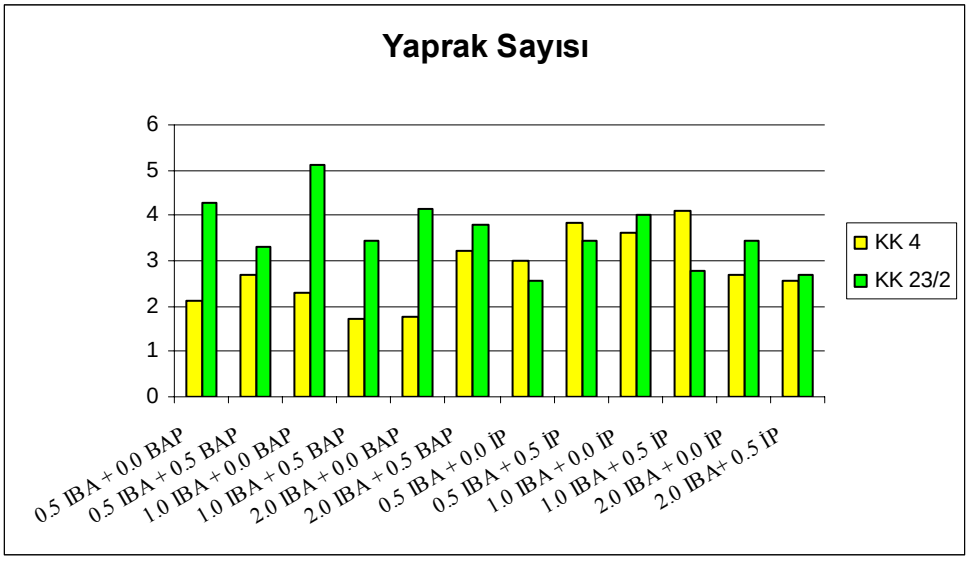
4.3.3 Yaprak sayısı (n)

Ortalama yaprak sayısı bakımından yapılan hesaplamalarda ise genotip x uygulama interaksiyonu istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Sadece Kalecik Karası 4 numaralı klon ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klon ortalamaları arasındaki fark, yani genotiplerin genel davranışı bakımından ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak anlam taşımaktadır ($P<0.01$). Bir sürgün üzerindeki yaprak sayısı bakımından en yüksek değerler Kalecik Karası 4 numaralı klon için "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" uygulamasından elde edilmiş (4.1 ± 0.41 adet), Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için ise "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" uygulaması ile 5.13 dür (Çizelge 4.7) (Şekil 4.15).

Çizelge 4.7 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonlarına ait yaprak sayısı(adet)

UYGULAMALAR	KALECİK KARASI 4	KALECİK KARASI 23/2
1 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	2.11 ± 0.35*	4.3 ± 0.79
2 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	2.67 ± 0.50	3.30 ± 0.30
3 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	2.31 ± 0.69	**5.13 ± 1.23**
4 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	1.70 ± 0.33	3.45 ± 0.39
5 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	1.75 ± 0.52	4.16 ± 0.95
6 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	3.22 ± 0.1	3.8± 0.36
7 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	3.0 ± 1.26	2.56 ± 0.35
8 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	3.85 ± 0.85	3.45 ± 0.84
9 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	3.60 ± 0.6	4.0 ± 0.84
10 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	**4.1 ± 0.41**	2.8 ± 0.74
11 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	2.67 ± 1.37	3.44 ± 0.67
12 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	2.57 ± 0.5	2.70 ± 0.76

* İstatistiksel olarak fark bulumamadığı için harflendirme yapılmamıştır.



Şekil 4.15 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonlarına ait yaprak sayısı(adet)

4.3.4 Kallus oluşturma oranı (%) ve düzeyi (cm)

Sürgün aşamasında kallus oluşumu gözlenmezken, köklenme aşamasında eksplantların bazal kısımlarında kallus oluşumu ortaya çıkmış ve bu kallus düzeyleri arasındaki

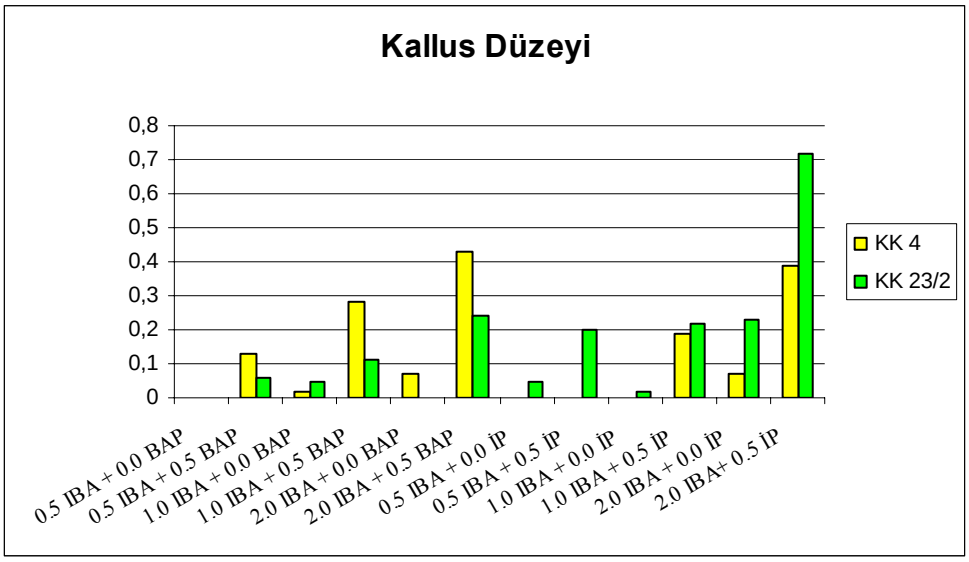
farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Çalışmamızda, kallus düzeyi bakımından dördüncü uygulama Kalecik Karası 4 numaralı klon için daha yüksek bir değer iken diğer uygulamalarda Kalecik Karası 23/2 numaralı klon'da yüksek düzeyde kallus oluşumu görülmüştür. En yüksek kallus düzeyleri ise sırasıyla Kalecik Karası 4 numaralı klon için "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" kombinasyonunda 0.43 cm Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" kombinasyonunda 0.72 cm'dir (Çizelge 4.8) (Şekil 4.16). Doğan (2003)'ın yapmış olduğu çalışmada en yüksek kallus oranları sırasıyla 1103 P, 140 Ru, ve Kalecik Karası 12 numaralı klon'da görülmüştür.

Çizelge 4.8 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait kallus düzeyi

UYGULAMALAR	**KALECİK KARASI 4**	**KALECİK KARASI 23/2**
1 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.0 ± 0.0 **e*** **A****	0.0 ± 0.0 **d A**
2 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	0.13 ± 0.05 **de A**	0.06 ± 0.04 **cd A**
3 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.02 ± 0.02 **e A**	0.05 ± 0.03 **d A**
4 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	0.28 ± 0.05 **bc A**	0.11 ± 0.06 **bcd B**
5 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.07 ± 0.04 **de A**	0.0 ± 0.0 **d A**
6 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	**0.43 ± 0.04 a A**	0.24 ± 0.06 **b B**
7 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	0.0 ± 0. 0 **e A**	0.05 ± 0.02 **cd A**
8 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	0.0 ± 0. 0 **e B**	0.20 ± 0.1 **bc A**
9 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	0.0 ± 0. 0 **e A**	0.02 ± 0.02 **d A**
10 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	0.19 ± 0.01 **cd A**	0.22 ± 0.05 **b A**
11 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	0.07 ± 0.05 **de B**	0.23 ± 0.06 **b A**
12 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	0.39 ± 0. 07 **ab B**	**0.72 ± 0.02 a A**

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0.01$)
* Küçük harfler uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir
** Büyük harfler genotipler arasındaki farklılıkları göstermektedir

Şekil 4.16 de kallus oluşumuna ait genotip x uygulama interaksiyonunu grafik olarak gösterilmiştir. Aynı şekilde Kalecik Karası 4 numaralı klon için 6. uygulamada ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klonunda 12. uygulamalarda en yüksek değerleri görmekteyiz.



Şekil 4.16 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonlarına ait kallus düzeyi

3.3.5 Köklenme (Tam bitkiye dönüşüm) oranı (%)

Dört hafta süre ile köklendirme ortamında yetiştirilen sürgünlerde her iki genotip içinde köklenme oranı %100 olarak bulunmuştur.

4.3.6 En uzun kök değerleri (cm)

En uzun kök değeri bakımından genotip x uygulama interaksiyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur. Çizelge 4.7 de görüldüğü gibi Kalecik Karası 4 numaralı klon için en uzun kök değeri "1.0 mg/l IBA +0.0 mg/l İP" dozları kullanılan dokuzuncu uygulamadan elde edilirken (3.47cm) iken Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için birinci uygulama olan "0.5 mg/l IBA +0.0 mg/l BAP" kombinasyonlarında (3.9cm)görülmüştür. En uzun kök uzunluğu değerleri Kalecik Karası 4 numaralı klon için 3.47 ± 1.28 cm, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için 3.90 ± 0.70 cm'dir (Çizelge 4.9) (Şekil 4.17).

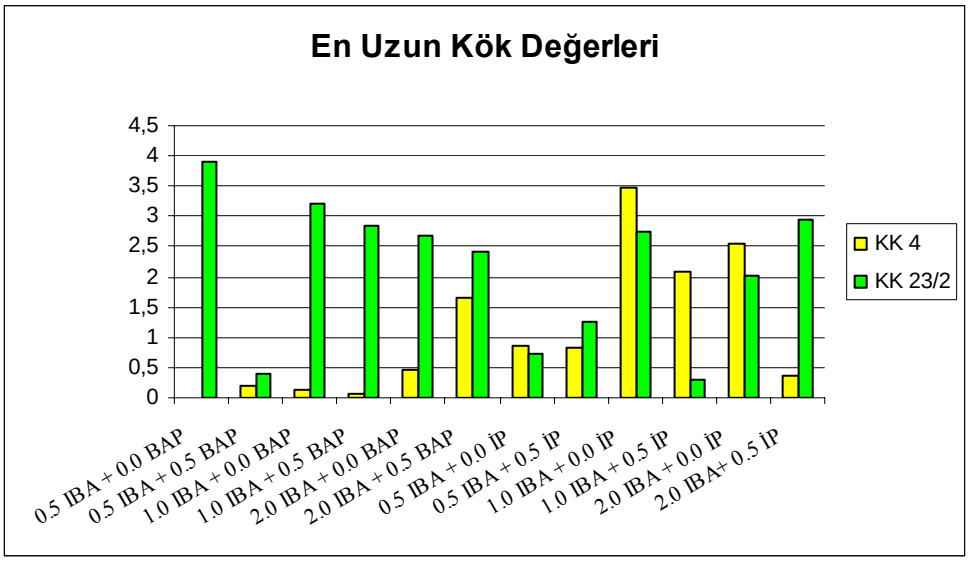
Kara (1992) yapmış olduğu çalışmasında Çavuş, Müşküle, Hafızali, Razakı, Sultani çekirdeksiz ve Çal karası çeşitlerinde 6.333 ile 0.33 cm arasında kök uzunluğu elde etmiştir. Doğan (2004) ise, klon12 için 4.79 cm kök uzunluğuna ulaşmıştır aynı çalışmada 140 Ru için kök uzunluğu 5.80 cm 1103 P için ise 9.60 cm olarak verilmiştir

Çizelge 4.9 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait en uzun kök değeri(cm)

UYGULAMALAR	**KALECİK KARASI 4**	**KALECİK KARASI 23/2**
1 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.0 ± 0.0 **b*** **B****	**3.9 ± 0.70 a *A**
2 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	0.21 ± 0.21 **b A**	0.4 ± 0.33 **cd A**
3 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.12 ± 0.12 **b B**	3.2 ± 0.79 **ab A**
4 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	0.08 ± 0.08 **b B**	2.84 ± 1.63 **abcd A**
5 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.47 ± 0.28 **b B**	2.67 ± 0.67 **abcd A**
6 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	1.64 ± 0.83 **ab A**	2.4 ± 0.90 **abcd A**
7 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	0.86 ± 0.86 **b A**	0.72 ± 0.27 **bcd A**
8 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	0.84 ± 0.58 **b A**	1.26 ± 0.93 **bcd A**
9 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	**3.47 ± 1.28 a A**	2.74 ± 0.59 **abcd A**
10 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	2.09 ± 1.12 **ab A**	0.31 ± 0.20 **d B**
11 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	2.54 ± 1.07 **ab A**	2.02 ± 0.38 **abcd A**
12 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	0.36 ± 0.28 **b B**	2.96 ± 1.17 **abcd A**

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0.01$)
* Küçük harfler uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir
** Büyük harfler genotipler arasındaki farklılıkları göstermektedir

Şekil 4.17'de sürgün uzunluğuna ait genotip x uygulama interaksiyonunu grafik olarak gösterilmiştir. Kalecik Karası 4 numaralı klon için 9. uygulamada ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klonunda 1 uygulamalarda en yüksek kök uzunluğu değerlerini görmekteyiz



Şekil 4.17 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait en uzun kök değeri

4.3.7 Köklerin ortalama uzunluğu (cm)

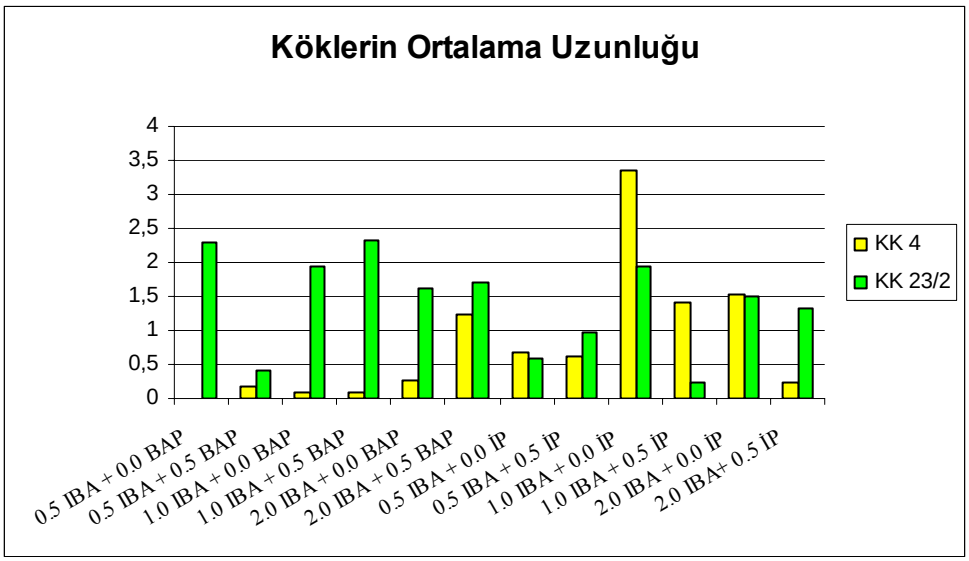
Köklendirme aşamasında iki farklı Kalecik Karası klonuna ait *in vitro* sürgünlerin her birinde oluşan tüm köklerin uzunluklarının ortalaması değerlendirildiğinde ortaya cıkan ortalama kök uzunlukları Çizelge 4.10 de verilmiştir. Buna göre, Kalecik Karası 4 numaralı klon için "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP" kombinasyonunda en yüksek değerin 3.34 ± 1.27 cm olduğu, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için ise "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" kombinasyonunda 2.33 ± 1.38 cm olduğu belirlenmiştir. (Çizelge 4.10) (Şekil 4.18).

Çizelge 4.10 Köklendirme aşamasında ki değişik Kalecik Karası klonuna ait kök uzunlukları(cm)

UYGULAMALAR	KALECİK KARASI 4	KALECİK KARASI 23/2
1 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.0 ± 0.0 **b*B****	2.29 ± 0.43 **a A**
2 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	0.17 ± 0.16 **b A**	0.41 ± 0.33 **ab A**
3 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.09 ± 0.08 **b B**	1.94 ± 0.40 **ab A**
4 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	0.08 ± 0.08 **b B**	**2.33 ± 1.38 a A**
5 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.27 ± 0.14 **b A**	1.63 ± 0.29 **ab A**
6 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	1.24 ± 0.69 **b A**	1.71 ± 0.60 **ab A**
7 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	0.69 ± 0.68 **b A**	0.59 ± 0.21 **ab A**
8 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	0.61 ± 0.40 **b A**	0.96 ± 0.69 **ab A**
9 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	**3.34 ± 1.27 a A**	1.93 ± 0.44 **ab A**
10 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	1.40 ± 0.78 **b A**	0.23 ± 0.16 **b A**
11 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	1.53 ± 0.69 **b A**	1.50 ± 0.25 **ab A**
12 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	0.24 ± 0.17 **b A**	1.31 ± 0.45 **ab A**

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0.01$)
* Küçük harfler uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir
** Büyük harfler genotipler arasındaki farklılıkları göstermektedir

Şekil 4.18 da kök uzunluğuna ait genotip x uygulama interaksiyonu grafik olarak gösterilmiştir. Kalecik Karası 4 numaralı klon için 9. uygulamada ve Kalecik Karası 23/2 numaralı klonunda 3. uygulamalarda en yüksek ortalama kök uzunluğu değerleri görmekteyiz



Şekil 4.18 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait kök uzunlukları(cm)

4.3.8 Ortalama kök sayısı (n)

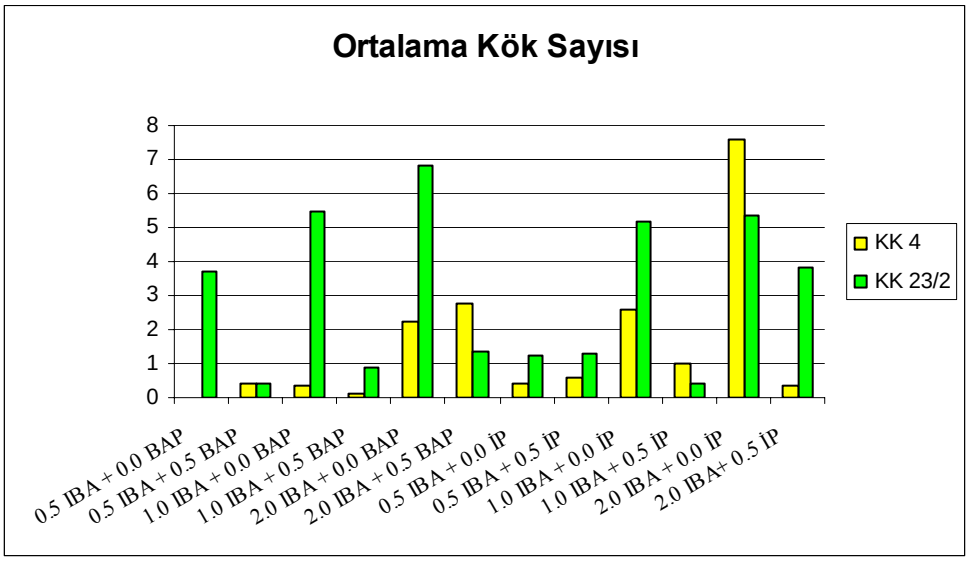
Ortalama kök sayısı bakımından 11. ve 5. uygulamalardaki en yüksek değerler çizelge 4.9 da görülmektedir. Kalecik Karası 4 numaralı klon için "2.0 mg/l IBA + 0.0 2iP" dozunda kullanılan hormon kombinasyonunda 7.6 ± 2.42 olan ortalama kök sayısı Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için de "2.0 mg/l IBA + 0.0 BAP"'da 6.83 ± 1.4 ile en yüksek değeri almıştır. En fazla kök sayısı sırasıyla Kalecik Karası 23/2 numaralı klon, Kalecik Karası 4 numaralı klonda görülmüştür Görüldüğü gibi her iki genotip içinde 2.0 mg/l IBA kullanımı en yüksek kök sayısı değerlerini vermektedir (Çizelge 4.11) (Şekil 4.19).

Çizelge 4.11 Köklendirme aşamasında asma genotiplerine ait ortalama kök sayısı

UYGULAMALAR	KALECİK KARASI 4	KALECİK KARASI 23/2
1 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.0 ± 0.0 **b*** **B****	3.7 ± 0.65 **bc A**
2 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	0.44 ± 0.44 **b A**	0.4 ± 0.3 **d A**
3 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	0.37 ± 0.37 **b B**	5.5 ± 1.45 **ab A**
4 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	0.10 ± 0.1 **b A**	0.89 ± 0.51 **d A**
5 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP)	2.25 ± 1.21 **b B**	**6.83 ± 1.4 a A**
6 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP)	2.78 ± 1.19 **b A**	1.33 ± 0.50 **cd A**
7 (0.5 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	0.40 ± 0.4 **b A**	1.22 ± 0.45 **cd A**
8 (0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	0.60 ± 0.34 **b A**	1.29 ± 0.84 **cd A**
9 (1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	2.6 ± 0.9 **b B**	5.2 ± 1.09 **ab A**
10 (1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	1.0 ± 0.52 **b A**	0.4 ± 0.30 **d A**
11 (2.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l 2iP)	**7.6a ± 2.42 a A**	5.33 ± 0.96 **ab A**
12 (2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP)	0.33 ± 0.23 **b B**	3.8 ± 0.77 **bc A**

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0.01$)
* Küçük harfler uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir
** Büyük harfler genotiplerer arasındaki farklılıkları göstermektedir

Ortalama kök sayısı bakımından Şekil 4.19'de de 11,ve 5. uygulamalardaki en yüksek değerleri görmekteyiz.



Şekil 4.19 Köklendirme aşamasında iki değişik Kalecik Karası klonuna ait kök uzunlukları(cm)

5. SONUÇ

Ülkemizde asma yetiştiriciliğin en önemli problemlerden biri üretilen fidanların virüsler ile bulaşık olması ve bu fidanların ülkenin değişik yörelerine dağıtılarak yayılmasıdır. Yapılması gereken ise hastalık etmeni bulundurmayan, temiz bitkisel materyalle, sertifikalı asma fidanlarıyla yani genotip/klon ve anaç damızlıklarıyla çalışmaktır.

Bitkilerin büyük bir kısmı başarılı şekilde doku kültürü-virüs eleminasyon programlarıyla viral bulaşmalardan korunabilmektedir ki Avrupa Birliği'ne aday ülkeleride bağlayıcı nitelikte olan Avrupa Birliği direktiflerinde virüs ve benzerlerinden arındırılmış klonal, kaliteli ve sağlıklı (Sertifikalı) asma fidanının kullanımı ve çoğaltıma yönelik ölçütler yer almaktadır (Mullins 1990, Doğan 2003).

Virüslerle bulaşık olduğu tespit edilmiş olan Kalecik Karası 4 numaralı klonu ile Kalecik Karası 23/2 numaralı klonuna ait virüssüz baz materyal eldesi ve meristem kültürü ile hızlı çoğaltımı temel hedefi çerçevesinde, yöntemin bu iki klon için optimizasyonu amacıyla yapılan bu araştırmadan elde edilen sonuçlar maddeler halinde sıralanmıştır.

- Başlangıç aşamasında "0.5 mg/l GA_3 ve 2.5 mg/l BAP" içeren tam kuvvetli MS ortamında kültüre alınan sürgün ucu meristemlerinde Kalecik Karası 4 numaralı klonun yaşama oranı %65 iken, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için bu oran %80 bulunmuştur.

- Meristemlerin gelişme düzeyleri bakımından iki genotip arasında bir farklılık olmadığı bulunmuştur. Kalecik Karası 4 numaralı klon için gelişme düzeyi 0.22 cm, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon içinde 0.25 cm'dir.

- Meristem aşamasında her iki genotip içinde kallus ve vitrifikasyon oluşumu görülmemiştir. Aynı şekilde sürgün aşamasında da kallus oluşumu meydana gelmemiştir.

- Θ 4-5 hafta boyunca *in vitro* koşullarda geliştirilen meristemler yine steril kabin içerisinde sürgün çoğaltma ortamı olarak kullanılacak "2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IBA" içeren tam kuvvetli MS ortamına aktarılarak 4 hafta süre ile gelişmeleri sağlanmış ve genotiplerin sürgün sayıları karşılaştırıldığında klonlar arasında önemli bir fark bulunamamıştır; bununla beraber Kalecik Karası 4 numaralı klon için sürgün sayısı 3.67 adet /eksplant iken Kalecik Karası 4 numaralı klon için 3.83 adet/eksplant olduğu görülmüştür.

- Θ Sürgün aşamasında genotiplerde sürgün uzunlukları da incelenmiş ve sürgün sayıları gibi sürgün uzunlukları arasında da önemli bir fark bulunamamıştır. Kalecik Karası 4 numaralı klonun sürgün uzunluğu 2.42 cm, Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun 2.04 cm olarak belirlenmiştir.

- Θ Köklendirme aşamasında, Kalecik Karası 23/2 numaralı klonda sürgün oluşumu daha fazladır. Kalecik Karası 4 numaralı klon için en yüksek sürgün sayısı "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" dozlarındaki uygulama iken Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" kombinasyonlarında görülmüştür. Bu kombinasyonlardaki sürgün sayıları sırasıyla 2.11 adet ve 2.11 adet bulunmuştur.

- Θ Köklendirme aşamasındaki sürgün uzunluğu değerleri, Kalecik Karası 4 numaralı klon için "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" uygulaması ile 2.46 cm, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için ise "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" uygulaması ile 3.25 cm bulunmuştur. Kalecik Karası 23/2 numaralı klonun sürgün uzunluğu değerleri Kalecik Karası 4 numaralı klondan daha yüksek bulunmuştur.

- Θ Sürgün başına yaprak sayısı bakımından en yüksek değerler Kalecik Karası 4 numaralı klon için "1.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" uygulaması ile 4.1 adet, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için ise "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" uygulaması ile 5.13 adet'tir.

- Meristem ve Sürgün çoğaltımı aşamalarında kallus oluşumu görülmemesine rağmen köklendirme aşamasında kallus oluşumu görülmüştür. Uygulamalarda oksin ve sitokinin düzeyi arttıkça kallus oluşumu da artmıştır. En yüksek kallus düzeyleri ise sırasıyla Kalecik Karası 4 numaralı klon için "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l BAP" kombinasyonunda 0.43 cm, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için "2.0 mg/l IBA + 0.5 mg/l 2iP" kombinasyonunda 0.72 cm'dir

- Dört hafta süre ile köklendirme ortamında yetiştirilen sürgünlerde her iki genotip içinde köklenme oranı %100 olarak bulunmuştur.

- Kalecik Karası 4 numaralı klon için en uzun kök değeri "1.0 mg/l IBA +0.0 mg/l 2iP" dozları kullanılan dokuzuncu uygulama iken Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için birinci uygulama olan "0.5 mg/l IBA +0.0 mg/l BAP" kombinasyonlarında görülmüştür. En uzun kök değerleri Kalecik Karası 4 numaralı klon için 3.47cm, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için 3.90 cm dir.

- Sürgün başına ortalama kök uzunlukları, Kalecik Karası 4 numaralı klon için "1.0 mg/l IBA +0.0 mg/l 2iP" kombinasyonu ile 3.34 cm, Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için ise "1.0 mg/l IBA + 0.0 mg/l BAP" kombinasyonu ile 2.33 cm bulunmuştur. Her iki genotip içinde 1 mg/l IBA kullanımı en iyi değeri vermiştir.

- En yüksek kök sayısı ise her iki genotip içinde 2.0 mg/l IBA kullanımı ile elde edilmiştir. Kalecik Karası 23/2 numaralı klondaki kök sayısı Kalecik Karası 4 numaralı klondan daha fazladır. Kalecik Karası 4 numaralı klon için "2.0 mg/l IBA + 0.0 2iP" dozunda kullanılan hormon kombinasyonunda 7.6 adet olan ortalama kök sayısı Kalecik Karası 23/2 numaralı klon için de "2.0 mg/l IBA + 0.0 BAP"da 6.83 adet ile en yüksek değeri almıştır.

- Dış koşullara alıştırma aşamasında, erlenler içerisinde tam bir bitki haline gelen bitki çok dikkatli bir şekilde dış ortama aktarılmalıdır. Kontrollu koşullardan dışarı çıkartılan bitkiler çevre şartlarına karşı çok hassastır bu nedenle kayıplar

söz konusu olabilir. Çalışmamızda her iki klon içinde dış koşullara alıştırma oranı %90'dır. Dış koşullara alıştırma yüzdesi bakımından klonlar arasında farklılık bulunmamıştır.

Sonuç olarak, Kalecik Karası üzüm çeşidine ait iki klonda yapılan meristem kültürü çalışmaları; asmada bu yöntemin pratik olarak kullanılabileceğini ve ticari firmalar tarafından fidan üretimi sırasında uygulanabilir nitelik taşıdığını bizim koşullarımızda da ortaya koymuştur. Doku kültürünün genel özelliği, asmadaki meristem kültürü sırasında da kendini göstermiş; aynı çeşide ait olsa bile farklı klonlar arasında tüm koşulların sabit tutulması halinde bile farklı sonuçlar alınabileceği gözlenmiştir. Bu farklılık, meristemlerin gelişmesi, sürgün sayısı ve köklenme oranları ile kök geliştirme kapasiteleri gibi özellikler bakımından belirgin bir biçimde ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla asma fidancılığında baz materyal elde etmek için meristem kültürü tekniğinden yararlanmak isteyen kişi ve kuruluşların gözden kaçırmaması gereken en önemli husus, genotip etkisi nedeniyle her genotip için yöntemin optimize edilmesi gerekebileceği konusudur. Ancak meristem kültürünün dışında baz materyal elde edilmesinde şu ana kadar bilinen daha etkin bir yöntemin bulunmayışı, bu konuda verilecek çabanın gerekliliğini de vurgulamaktadır. Çalışmamızda virüslü materyalden örnek alınmış ve bunlarda meristem kültürü yapılarak bitkiler elde edilmiş olmakla birlikte, tez süresi kapsamında elde edilen bitkilerde virüs testlemeleri yapılamamıştır. Dolayısıyla virüsten arındırma konusunda kullandığımız yöntemin bizim koşullarımızda ne kadar etkin olduğu hakkında bir yorum yapmak mümkün olamamıştır. Ancak şu anda gelişimlerine kontrollu sera koşullarında devam etmekte olan bitkilerde, proje çalışmaları kapsamında ELISA testleri yapılacak ve virüsten arındırma oranı ortaya konulabilecektir.

KAYNAKLAR

Akman, Y. 1996. Bitki Biyoteknolojisine Giriş Botanik. Palme Yayınları, 188 s. Ankara.

Altmayer, B. 1990. The Use of *In vitro* Apical Culture of Grapevines to Eliminate Pathogens (Different Viruses, Agrobacterium tumefaciens). Proceedings of the 5 th International Symposium on Grape Breeding 12-16 September 1989 VITIS Special Issue, 463 p, St. Martin / Pfalz, Germany.

Anonim. 2005. Tarım istatistikleri özeti DİE yayını, Ankara.

Auger, J.and Arancibia R. 1991 Selective elimination by heat treatment and meristem culture of closteroviruses associated with leafroll in grapevine, Vitis vinifera L., cv. Black Seedless in: Rumbos, I.C.; Bovey, R.; Gonsalves, D.; Hewitt, W.B.; Martelli, G.P. (Eds.): Proceedings of the 10th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine, ICVG, September 3-7, 1990, Greece

Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M. 2002. Doku Kültürü Temel Laboratuar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü Uygulamaları, Editörler; Mehmet BABAOĞLU, Ekrem GÜREL Sebahattin ÖZCAN. 2. Baskı, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları,1-35s, Konya.

Baptista, C.R., Kuniyuki, H., Muller, G.W.and Betti, J.A. 1993. Production of Seven Grapevine Varieties Free from Viruses by Meristem Tip Culture in Sao Paulo. Summa Phytopathologica, 19:2, 96-98 p.

Barlas, M. and Skene, K.G.M., 1980a. Studies on the Fragmented Shoot Apex of Grapevine. I. The Regenerative Capacity of Leaf Primordial Fragments *In vitro.* Jornal of Exp. Botany. 31(121): 483-488.

Barlas, M. and Skene, K.G.M., 1980b. Studies on the Fragmented Shoot Apex of Grapevine. II. Factors Affecting Growth and Differentation *In vitro.* Jornal of Exp. Botany. 31(121): 489-495.

Barlas, M., Skene, K.G.M., Woodham, R.C. and Krake, L.R.,1982. Regeneration of Virus-Free Grapevines Using *In vitro* Apical Culture. Ann. Appl. Biol. 101:291-295.

Batur, M. 1989. Kalecik Karası Üzüm Çeşidi ve 14 BMG Anacının Meristem Kültürü ile Çoğaltılmasında Değişik Oksin-Sitokinin Kombinasyonlarının Sürgün Oluşumu ve Köklenme Üzerine Etkileri. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Ankara.

Baydar, N.G. 1997. Bağcılıkta *In vitro* Mikroaşılama Tekniği ile Çoğaltma Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 98s, Ankara.

Baydar, N.G. and Çelik, H. 1999. The Effects of Tip Source on the Success of *In vitro* Micrografting in Grapevine (*Vitis vinifera L.*). Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 1999, 23: Supplement 3, 741-747 p.

Baydar, N.G. 2000. Asmada (Vitis spp.) Yapraklardan Adventif Sürgün Oluşumu Üzerine Bir Araştırma. Turkish Journal of Biology. 24:3,645–656 p.

Becker, H. 1985. Gentechnologie oder klassische Rebenzüchtung Der Deutsche Weınbau 1985, 15-24.

Boxus, P. 1974. The production of strawberry plants by *in vitro* micro-propagation. J. Hort. Sci. 49, 209-210.

Brückbauer, H. 1979. Erzeugung von virusfreien Klonen und Probleme der Bodenentseuchung. Staatliches Seminar für landwirtschaftliche Lehr-und Beratungsrafte Rheinland-Pfalz 1979, Emmelshausen.

Bürün, B. 2002. Hastalıksız Bitki Üretimi. Doku Kültürü : BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİ I Doku Kültürü ve Uygulamaları.Editörler : Mehmet BABAOĞLU, Ekrem GÜREL,Sebahattin ÖZCAN. 2. Baskı,2002, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları,190–210 s Konya.

Çelik, H., Abak, K., Batur, M. ve Sakin, Ş. 1988. Asmaların Meristem Kültürü ile Çoğaltılması Üzerine Araştırmalar. Türkiye III. Bağcılık Sempozyumu, 31 Mayıs–3 Haziran, Bursa, s:12

Çelik, H. and Batur, M. 1989. Meristem Culture for Clonal Micropropagation of Grapevines. Proceedings of the 5 th International Symposium on Grape Breeding 12–16 September, St. Martin/Pfalz, FR of Germany, VITIS Special Issue, 455–462 p.

Çelik, H., Barış, C., Gökçay, E., Kara, Z., Özışık, S., Ecevit, F., Söylemezoğlu, G., Turan, A. ve Gürsöz, S. 1995. Bağcılıkta Tüketim Projeksiyonları ve Üretim Hedefleri. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, IV. T ÜRKİYE Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi Bildirileri II. Cilt: 675–695, 9-13 Ocak, Ankara.

Çelik, H., Ağaoğlu, Y.S., Fidan, Y., Marasalı, B. ve Söylemezoğlu, G. 1998. Genel Bağcılık. Sunfidan A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi, 100–102 s. Ankara.

Çelik, H., Marasalı, B., Söylemezoğlu, G., Gürsoy, Y., Göktürk Baydar, N., Yüksel, İ., Gökçay, E., Karlı İlbay, A. ve İlhan, İ. 1999. Türkiye'de Virüssüz Sertifikalı Asma Fidanı Üretim Tekniği Geliştirilmesi (EUREKA EU 679 VITIS). Türkiye III.Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi 14-17 Eylü, 6-11, Ankara.

Çelik, H., Marasalı, B., Söylemezoğlu, G., Gürsoy, Y.Z., Göktürk Baydar, N., Yüksel, İ., Gökçay, E., Karlı İlbay, A. ve İlhan, İ. 2000 a. Türkiye'de Virüssüz Sertifikalı Asma Fidanı Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi (EUREKA EU 679 VITIS). (Proje No : TOAG-1108) TÜBİTAK, Ankara, s: 1-6,17, 18, 41-43, 46-49, Ankara.

Çelik, H., Çelik, M. ve Yalçın, R. 2000 b. Türkiye'de Meyve ve Asma Fidancılığının Stratejik Açıdan Değerlendirilmesi. Türkiye 1. Fidancılık Sempozyumu, 25-28 Eylül 2000, 10 s. Izmir.

Çelik, H. ve Karlı-İlbay, A. 2002. Bazı Asma Genotiplerinde Meristem Kültürü Yoluyla Elde Edilen Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması Aşamasında Başarının Artırılması Üzerinde Araştırmalar. Proje No : 98-11-01-08, T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ağustos 2002, Ankara.

Corte, G. and Mendonca, A.O. 1985. Impartance of Meristem Culture for Rapid Propagation of Grape Clones Free of Virus. Hort. Abst. 55(12):9407.

Dalloul, A., Misik, S. and Olah. L. 1990. *In vitro* Micropropagation of Grape Varieties. Proceedings of the 5 th İnternational Syınposium on Grape Breeding 12 - 16

September 1989, VITIS Special Issue. 463 p, St. Martin / Pfalz. FR of Germany.

Dan-Hua, Y. and Meredith, P. 1985. Environmental and Developmental Factors Affecting Adventitious Shoot Formation in *Vitis vinifera.* 4th international Symposium on Grapevine Breeding, 13- 18 April 1985. 36-39 p, Vrone (Italie)

Dodds, J.H. and Roberts, LW. 1993. Experiments in Plant Tissue Culture. Second Edition, Cambridge University Press, USA.

Doğan, E.Ç. 2003. Genişleme Sürecindeki Avrupa Birliği'nde Asma Fidanı Sertifikasyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek lisans Semineri, 29s, Ankara.

Doğan, E.Ç. 2004. Asmaların Meristem Kültürü ile Klonal Mikroçoğaltımında Çift Fazlı Ortam ve Aktif Kömürün Etkileri, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 35s ,Ankara.

Dzazio, P.M., Biasi, LA. and Zanette, F. 2002. Micropropagation of 420-A Grapevine Rootstock. Revista Brasileira-de-Fruticultura, 24: 3, 759-764 p.

Endress HR. 1994. Basıc tecnigues. In: Plan Cell Biotechnologies, pp. 16-17, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Fournioux, J.C. and Bessis, R. 1996. *In vitro* Morphogenesis of Grapevine (*Vitis vinifra L.*) Originated from Anticipated or Latent Buds. Vitis 35 (3), 107-111 p.

Fidan, Y., Abak, K. ve Çelik. H. 1984. Asmalarda Meristem Kültürü ile Çoğaltım. Türkiye II. Bağcılık ve Şarapçılık Simpozyumu Bildiri Özetleri, 14-17 Kasım 1983, Manisa.

Galzy, R. 1985. Possibilities of *In vitro* Conservation of A Collection of Grape Clones. Hort. Abst. 55(11):8501.

Gebhardt, K., Viola-Ehrmantraut, U., Schimmelpfeng, H. 1983. *In vitro* Kultur von Himbeeren: Massenvermehrung und Eignung für den gartnerischen Anbau. Mitt. Klosterneuburg 33, 24-30.

George EF. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part I. The Technology, Second Edition, 574 sayfa, Exegetics Ltd., England.

Goodwin, P.H. and Nassuth, A. 1993. Detection and Characterization of Plant Pathogens. Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. Edited by Bernard R. Glick and John E. Thompson, CRC Press, INC., 303 p, United States.

Gönülşen, N. ve Özcan, Ö. 1980. Asma(Vitis spp)nın Doku kültürü ile Üretilebilmesi Üzerinde Araştırmalar. TÜBİTAK VII. Bilim Kongresi. Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu, 6-10 Ekim Adana.

Gönülşen, N. 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. TC. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No: 78, s: 68, Menemen-İzmir

Gözen, A., Abak, K., Kasnakoğlu, H., Çetiner, S. ve Güzel, A. 1995. Bitki Biyoteknolojisinde Gelişmeler ve Öncelikler. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, IV. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi Bildirileri II. Cilt: 675-695,9-13 Ocak, s:1223, 1226, 1231, 1232, 1243, Ankara.

Gray, D.J., Fısher, L.C. 1987. *In vitro* Shoot Progetion of Grape Species, Hybrids and Cultuvars. Hort. Abstr.57(14):2446.

Gray, D.J. and Benton, C.M. 1991 *In vitro* Micropropagation and Plant Establısment of Muscadine Grape Cultivars (Vitis rotundıfolia). PlanI Cell. Tissuc and organ Culture. 27: 7-14 p.

Grenan, S. 1984. Polymorphisme Floaire Consecutif A la Culture *In vitro* De *Vitis Vinifera L. Vitis.* 23(3):159-174.

Grout, BWW. 1990. Meristem-tip culture. In: Pollrd JW and Walker JM(eds), Plant Cell and Tissue Culture-Metods in Molecular Biology, Vol.6, pp. 81-91. The Humana Pres, USA.

Gürsoy, Y. 1991. Termoterapi ve Meristem Kültürü Yöntemleriyle Virüssüz Asma Materyali Elde Edilmesi Üzerine Araştırmalar. Bağcılık Araştırma Projesi, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayın No:42, Manisa.

Hansen, A. J. 1985. An end to the dilemma: Virus-free all the way. Hortscience, 20(5):852-859.

Hartl, D., Males, P. and Jeleska, S. 1990. Vegetative Multiplication of five Dlmatian Autochthonous Grape Cultivars *In vitro.* Proceedings of the 5 th International Symposium on Grape Breeding, 12-16 September 1989, VITIS Special Issue.464 p, St. Martin/Pfalz, FR of Germany.

Hatipoğlu, R. 1997. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Genel Yayın NO : 190, Ders Kitapları Yayın No: 190. ADANA.

Hemmat, M., Weeden, N.F., Manganaris, A.G. and Lawson, D.M. 1994. Molecular marker linkage map for apple. J. Hered. 85: 4-11.

Heloir, MC., Fournioux, J.C., Oziol, L. and Bessis, R. 1997. An lmproved Procedure for The Propagation *In vitro* of Grapevine (*Vitis vinifera* ev. Pinot noir) using Axillary-Bud Microcuttings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 49:223-225 p.

İlbay, A.K. 2001. Boş Çekirdekli Sofralık Üzüm Çeşitlerinin Melzleme Islahında *In ovulo* Embriyo Kültüründen Yararlanma Olanakları. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı,Doktora Tezi.60s, Ankara.

Jako, N. 1989. Elemination of leafroll virus from grapevine using shoot meristem cultures. Szöletermes Boraszat 10(23):1620.

Kalyon, D. 1995. Asmalarda Anter Kültüründe Embriyo Oluşumu Üzerine Soğuk Uygulamaları ve Büyümeyi Düzenleyicilerin Etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 37 s. Ankara.

Kassanis, B. and Posnetta, P. 1961. Thermoterapy of virus infected plant recents. Adv. Bot., 1: 557-563.

Kara, S. 1992. Asmaların Meristem Kültürü Yoluyla Çoğaltılması Üzerine Araştırmalar. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, s: 89. Bornova-İzmir.

Karoglan, J., Mirosevic, N. and Jelaska, S. 1990. Grapevine Shoot Formation *In vitro* Proceedings of the 5 th International Symposium on Grape Breeding, 12-16 September 1989, VITIS Special lssue. 466 p, St. Martin / Pfalz. FR of Germany.

Kebeli, N., Özen, T. ve Boz, Y. 1996. Clariette Üzüm Çeşidinin Mersitem Kültürü ile Çoğaltılmasında Uygun Oksin-Sitokinin Kombinasyonunun Araştırılması. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 1-9 s, Tekirdağ.

Kebeli, N., Boz, Y. ve Gürsoy, Y. Z. 1999. Klon Seleksiyonuyla Elde Edilen Elit Asma Materyalinin Meristem Kültürü Yoluyla Çoğaltılması Üzerine Araştırmalar. Proje Kod No: TAGEM/96/06/04/014. T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 2-16 s, Tekirdağ.

Kebeli, N. ve Işık, H. 2003. Bazı Üzüm Çeşitlerinde *In vitro* Çoğaltım Tekniği İle Elde Edilmiş Bitkilerin Morfogenesis Özellikleri Üzerine Araştırmalar. Türkiye V. Bağcılık ve Şarapçılık Sempozyumu Bildirileri. 5–9 Ekim. 270–275 s, Kapadokya-Nevşehir.

Koruza, S. and Jelaska, S. 1993. Influence of Meristem Culture and Virus Elimnation on Phenotypical Modifications of Grapevine (*Vitis vinifera L.*). Vitis 32, 59-60.

Köse, Ö. 1994. Süs Bitkileri Üzerine Doku Kültürü Yönteminin Uygulama Alanı Üzerine Araştırmalar, T. C. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Peyzaj Mimarlığı Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, s: 6 İzmir.

Köklü, G. 1999. Trakya Bölgesi Bağlarında Asma Yaprak Kıvrılma Virüs (Leafroll) Hastalığının Karekterizasyonu ve Surveyi, T. C. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, s: 9, Adana.

Kung S-D. 1993 Introduction: From gren revolution to gene revolution. Transgenic Plants Vol. 2. Present Status and Social and Economic Impacts, pp. 146-177, Academic Pres.

Lavee, S. 2000. Grapevine (*vitis vinifera)* Growth and Performance in Warm Climates. Temperate Fruit Crops in Warm Climates. Edited by Ammon EREZ. Kluwer Academic Publishers, 364p, Netherlands.

Lewandowski, V.T. 1991 Rooting and Acclimatization of Micropropagated *Vitis labrusca* "Delaware". Hortscience. 26 (5) : 586-589 p.

Martelli, G.P. 1992. Proposed Scheme For Grapevine Certification In The European EEconomic Community. Proceedings of a Panel Discussion and Seminar of Grapevine Viruses and Certification in EEC Countries: State of the Art. 22-23 March 1991. Instıtuto Agronomico Mediterraneo, 101-110p. Italy.

Mullins, M.G. 1990. Application of Tissue Culture to the Genetic Improvement of Grapevines. Proceedings of the 5 th international Symposium on Grape Breeding 12-16 September 1989, VITIS Special lssue. 399-401 p, St. Martin/Pfalz, FR of Germany.

Namlı, S. 1995. *Vitis vinifera L.* Cardinal Asma Çeşidinin Doku ve Organlarından İtibaren Biyoteknolojik Yöntemlerle Mikro Çoğaltma Araştırmaları, T. C. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, s: 17 Diyarbakır.

Özgen, M., Adak, M.S., Söylemezoğlu, G. ve Ulukan, H. 2000. Bitkisel Gen Kaynaklarının Korunma ve Kullanımında Yeni Yaklaşımlar. TMMOB Zirat Mühendisleri Odası, v. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi. 17-21 Ocak, s: 259, Ankara.

Passos, I.R., Sondahl, M.R., Rıberio, I.J.A. Terra ,M.M. and Pıres, E.J.P. 1986. *In vitro* Culture of Grapevine Meristems. IBA Concentrations in the Primary Medium. Hort. Abst. 56(5):3228.

Pierik Rlm. 1989. *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers. 321p.

Pierik Rlm. 1993. Micropropagation: Technology and opportunities. In: Prakash J, Pierik RML(eds), Plant Biotechnology. Commercial Prospects and Problems.p 9, Intercept Ltd.UK.

Quak, F. 1977. Applied and Fundamental Aspects Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 598-615

Regner, F. and Romann, H. 1994. Regeneration of Grapevine. vi th international Symposium on Grape Breeding : Yalta, Crimea, Ukraine, 4-10 September 1994, 49-50 p.

Rego, J. A. 2004. Kişisel ve yazılı görüşme. Direcço-Geral de Protecço das Culturas Tapada de Ajuda-Edificio 1, 1349- 018. LISBOA.

Reisch, B. I. and Pratt, C. 1996 Fruıt Breeding, Vineand Small Fruits, Volume II. Edited by Jules Janick, James N. Moore. John Wiley & Sons, Inc., pp: 313-317, USA.

Rouhelakis-Angelakis, K.A. and Katsirdakis, K.C. 1990. *In vitro* Micromultiplication of Grapevine : Effect of Age, Genotype and Culture Conditions on lnduction of Callus *vitis spp*. Leaf Segments. Plant-Aging : -Basic- and - Applied - Approaches. 89-95 p, NATO AsI Series, Series A, Life Sciences Vol. 186, Plenum Pres, New York

Röbbelen, G. 1985. Einsatz von *In vitro* Verfahren und Gentechnologie in der Rebenzüchtung. Internationales Symposium für Rebenveredlung vom 6. bis 8. Februar 1985 in Höchst.

Sarkar, S. and Sharma, S. 2001. *In vitro* Regeneration in Seedless Grapes (*Vitis vinfera L.).* Enviromnent and Ecology, 19:1. 43-47 p.

Sherwood J.L. 1993 Aplied aspects of plant regeneration. In: Sixon DA and Gonzales RA(eds), Plant Cell Culture-A Pratical Approach, pp.135-138, New York.

Singh, A.K., Sharma, B.B., Pandey, R.M. and Subhadrabandhu, S. 1992. Rapid *In vitro* Multuplication of *Vitis vinifera L*. Through Shoot Tips and Nodal Segments. International Symposium on Tropical Fruit : Frontier in Tropical Fruit Research, Pattaya City, Thailand, 20-24 May 1991. Acta-Horticulturae. No. 321, 601-605 p.

Singh, Z.. Brar. S.1.S. 1993. *In vitro* Plant Regeneration in Seedless Grapes (*Vitis vinifera L.).* Vitis 32, 229-232 p.

Staudt, G. and Kassemeyer, H.H. 1990. Elimination of Virus Diseases by *In vitro* Culture. Proceedings of the 5 th International Symposium on Grape Breeding, 12-16 September 1989. VITIS Special Issue. 465p, St. Martin/Pfalz, FR of Germany.

Sudarsono and Goldy, R.G. 1991. Growth Regulator and Axillary Bud Position Effects on *In vitro* Establishment of Vitis rotundifolia. HORTSCIENCE, 26 (3):304-307 p, March 1991.

Tangolar, S., Gök, S. ve Çetiner, S. 1995. Bazı Amerikan Asma Anaçlarının *In vitro* Sürgün Ucu Kültürü İle Çoğaltılması. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 3-6 Ekim, Cilt 2, 544-548 s, Adana.

Tangolar, S., Büyüktaş, F. N., Gök, S. ve Ergenoğlu, F. 1999. Fenolik Bileşiklerin Asma Sürgün Uçlarında Vegetasyon Dönemindeki Dağılımı ve Sürgün Ucu Kültüründeki Etkisi. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 14–17 Eylül, s: 383-388, Ankara.

Thies, K.L. and Graves, C.H. 1992. Meristem Micropropagation Protocols for *Vitis rotundifolia* Michx. Hortscience, 27: 5, 447-449 p.

Thomas, P. and Schiefelbein, J. W. 2004. Roles of Leaf in Regulation of Root and Shoot Growth from single Node Softwood Cuttings of Grape (*Vitis vinifera*). Ann. Appl. Biol. 144: 27-37 p, UK.

Torregrosa, L., Bouguet, A. and Goussard, P. G. 2001. *In vitro* Culture and Propagation of Grapevine. L. Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine. Edited by Kalliopi, A. Roubelakis-Angelakis, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 282-286, 297-312p.

Torregrosa, L., Locco, P. and Thomas, M.R. 2002. lnfluence of Agrobacterium Strain, Culture Medium and Cultivar on the Transformation Efficiency of *Vitis vinifera* L. American Journal of Enology and Viticulture, 53:3, p: 183-190

Torres, C. K. 1989. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. An AVİ Book. Published by Van Nostrand Rheinhold, NewYork.

Walker, M.A. and Jin, Y. 2000. Breeding Vitis rupestris x Muscadinia rotundfolia rootstocks to control Xiphinema index and fanleaf degeneration. Proc. of vii. İnternational Symp. On Grapevine Genetics and Breeding, Montpellier, France, 6-10 Tem. 1998, Vol 2, Acta Horticulturae. No: 528, 511- 515

Walker, M.A. and Galino, D.A 1999. Rapid Propagation of Grape Planting Stock. http:// www.practicalwinery.com/mayjune99/rapidpropagation.htm.

Winkler, A.J., Cook, J.A., Kliwer, W.M. and Lider, L.A. 1974. General Viticulture. Univ. Calif. Pres. Berkeley and Los Angeles,710p.

Yu, D. and C. P. Meredith. 1986. The Influence of Explant Origin on Tissue Browning and Shoot Production in Shoot Tip Cultures of Grapevine. J. Amer. Soc. Sci. 111(6): 972-975.

Yücel, S. 1991. *Pistacia vera L.* (Antep Fıstığı) Meristemlerinden İtibaten *In vitro* Şartlarda Fidan Üretme Yöntemleri ve Aşılanmayla Oluşan Olumsuz Fertlerin Islahı Çalışmaları. T. C. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 36 s. Diyarbakır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nesrin KARACA

Doğum Yeri : İstanbul

Doğum Tarihi : 12.12.1981

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : Ankara Mustafa Kemal Lisesi (1995-1998)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü (1999-2003)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı (2003-2006)