

***VITIS VINIFERA L. CV. SULTANI (VITACEAE)*'DE IN VITRO
KALSİYUM DEĞİŞİMİNİN KALLOGENEZ VE REGENERASYON
ÜZERİNE ETKİSİ**

Olga ALTUN*, A. Kamil YÜREKLİ **

* Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Balıkesir-TÜRKİYE

** Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir-TÜRKİYE

ÖZET

Ülkemizin önemli ihracat ürünleri arasında yer alan *Vitis vinifera L. cv. Sultani*'de doku kültür teknikleri kullanılarak in vitro kalsiyum değişiminin kallogenez ve regenerasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu bitkiye ait eksplantların sterilizasyon zamanı % 70'lik etanolde 7 dakika ve % 4.5'lik sodyum hipokloritte 10 dakika olarak saptanmıştır. Kalsiyum miktarı değiştirilerek hazırlanmış 5 farklı MS ortamından elde edilen kallogenez ve regenerasyon sonuçları morfolojik olarak verilmiştir. Sonuçta en iyi kallus verimi %100 ile MS ortamındaki kalsiyum miktarı azaltılarak ve 3mg/l NAA (Naftalen Asetik Asit) eklenerek hazırlanmış 2 mmol/l Ca⁺² ve 3 mmol/l Ca⁺² numaralı ortamlardan elde edilmesine rağmen en iyi kallus biyoması normal MS ortamında gözlenmiştir. En iyi gövde ve kök gelişimi ise MS ortamındaki kalsiyum iyonunun miktarı artırılarak ve 3 mg/l NAA eklenerek elde edilen 5 mmol/l Ca⁺² ve 6 mmol/l Ca⁺² modifiye ortamlardan elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Vitis vinifera*, kallogenezis, regenerasyon.

**THE EFFECTS OF IN VITRO CALCIUM VARIATION ON
CALLOGENESIS AND REGENERATION IN *VITIS VINIFERA L.*
*CV. SULTANI***

ABSTRACT

In this study, the effects of in vitro calcium variation on callogensis and regeneration in *Vitis vinifera L. cv. Sultani* - one of the most important export products of Turkey- were studied by using tissue culture techniques.

The sterilization periods for explants of this plant were founded as 7 minutes in 70 % ethanol and 10 minutes in 4.5 % sodium hypochloride. The callogenesis and regeneration results obtained by changing the amount of calcium in 5 different MS medium were evaluated in morphological viewpoint. Results show the best callogenesis (%100) was in 2 mmol/l Ca⁺² and 3 mmol/l Ca⁺² modified medium with 3 mg/l NAA and was deficient in Ca ion, the best callus biomass was observed in normal MS medium. In addition, the best stem and root development was realized in 5 mmol/l Ca⁺² and 6 mmol/l Ca⁺² modified medium supplemented with 3 mg/l NAA.

Keywords: *Vitis vinifera*, callogenesis, regeneration.

1. GİRİŞ

Vitaceae (asmagiller) familyasına ait olan *V. vinifera L. cv. Sultani* (çekirdeksiz Sultani üzümü) özellikle Batı Anadolu'da yetiştirilen önemli ihracat ürünlerimizden biridir [1-2]. Bitkinin glikoz bakımından zengin olan küçük taneli, esmer sarı renkli meyveleri taze olarak tüketildiği gibi kurutulduktan sonra özellikle pasta ve kek endüstrisinde de kullanılmaktadır.

Son yıllarda çekirdeksiz kuru üzüm ihracatında görülen düşüşün temel nedenlerinden biri bağ alanlarında görülen külleme hastalığıdır. Üründe kalite ve verim kaybına neden olan bu hastalığın yanı sıra ürün kalitesinin belirlenmesinde etkili olan şeker miktarındaki düşüş de ihracatımızı olumsuz yönde etkileyen faktörlerden biri olmuştur. Küllemeyle karşı direnç sağlamak ve meyvedeki şeker verimini yükseltmek genel amacına bağlı olarak, *V. vinifera L. cv. Sultani*'de in vitro kalsiyum değişiminin kallogenez ve regenerasyon üzerindeki etkileri doku kültür tekniklerinden biri olan meristem kültürü ile araştırılmıştır.

Asma ile ilgili yapılan doku kültür çalışmalarında genel amaç, ürün kalitesi ve verimi arttırmak olmuştur. Bu konuyla ilgili olarak yapılmış bir çalışmada, *V. vinifera*'nın ticari çekirdeksiz kültür formlarının anterlerinden somatik embriyogenezis ve sonrasında diploit bitkiler elde edilmiştir [3]. Aynı bitkinin üzerinde yapılan bir başka in vitro çalışmada, embriyogenik kallus indüksiyonu için gerekli besi ortamının katılaştırılmasında Gelrit denilen katılaştırıcı ajanın diğerlerine göre (agar, vs...) daha üstün olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar, oksinlerin sinergistik etkilerini ve ABA'nın embriyogenik kallus oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu da tespit etmişlerdir [4]. Bir başka çalışmada Gönülşen ve Özcan [5] Asma (*Vitis ssp.*)'nin doku kültürü ile üretilmesi üzerinde araştırmalar

yapmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında, asmanın tepe noktası ve 6. boğuma kadar olan her bir nodyumdan aldıkları parçaları Knop, Murashige Skoog ve Knudson B gıda ortamlarının temel ve çeşitli hormon kombinasyonlarında kültüre almışlardır. En iyi sonucu 5. ve 6. boğumdan alınan parçalarla Knudson B temel ortamında yapılan kültürlerden sağlamışlardır. Görüldüğü gibi doku kültür teknikleri değişik bitki türlerinde çok çeşitli amaçlar doğrultusunda giderek artan bir ilgi ile kullanılmaktadır. Öte yandan bitki besleme iyonlarından biri olan kalsiyum iyonunun değişimi de araştırmacılarca incelenmiştir. İki değerlikli bir katyon olan kalsiyum iyonunun bitkide çok çeşitli görevleri vardır. Bilinen en önemli fonksiyonu kalsiyum pektat şeklinde çeperin önemli yapıtaşını oluşturmasıdır. Orta lameldeki kalsiyum sadece pektinlerin yapısı için gerekli olmayıp aynı zamanda dokunun fungal enfeksiyonlara karşı direnç kazanmasında da etkilidir. Başka bir ifadeyle yüksek düzeyde Ca-pektat içeren hücre çeperlerinin fungal enfeksiyonlara karşı artan bir direnç göstereceği söylenebilir. Yine bilindiği gibi senesensin özel bir safhası olan meyve olgunlaşması artan etilen üretimi ile bir korelasyon göstermektedir [6]. Bu durum kalsiyumca fakir dokularda artmaktadır [7] ve meyveye kalsiyum uygulanması ile baskılanabilir [8]. Bu nedenle meyve olgunlaşması için kalsiyumun bir kısmının orta lamel (bağlı kalsiyum)' den kesinlikle uzaklaştırılması gerektiği ortadadır.

Bütün bu bilgilerin ışığı altında çekirdeksiz kuru üzümde verim ve kalitenin artırılabilmesi için, küllemeğe karşı direnç sağlamak ve meyvedeki şeker verimini yükseltmek genel amacına bağlı olarak bu çalışma planlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Çalışma materyali olarak *V. vinifera L. cv. Sultani* (çekirdeksiz Sultani üzümü) bitkisinin gövde, yaprak sapı, koltukaltı tomurcuğu ve tepe tomurcuğu kullanılmıştır.

Magnoliopsida (Dicotyledoneae) sınıfının *Rosidae* alt sınıfındaki *Rhamnales* ordosunun *Vitaceae* (asmagiller) familyasına ait olan *V. vinifera L* (asma) bitkisinin ülkemizde özellikle Trakya, Batı ve Güney Anadolu'da kültürü yapılmaktadır [1].

2.2. Metot

Denemeler süresince kullanılan tüm malzemeler ve besi ortamlarının sterilizasyonu 121 °C sıcaklıkta 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak gerçekleştirilmiştir. Ege Üniversitesi botanik bahçesinde doğal ortamından alınan bitkisel materyal %70'lik etanolde 7 dakika ve %4.5'lik sodyum hipokloritte 10 dakika tutularak steril edilmiştir.

Besi ortamı olarak Murashige ve Skoog (MS) temel besi ortamı [9] ve kalsiyum miktarı değiştirilmiş modifiye MS ortamları (2, 3, 5 ve 6 no'lu ortamlar) kullanılmıştır. MS temel ortamına (4 mmol Ca içeren ortam) 3 mg/l NAA eklenerek 4 numaralı ortam elde edilmiştir. 2, 3, 5 ve 6 numaralı ortamlar ise MS temel ortamındaki kalsiyum iyonunun miktarı değiştirilerek ve 3 mg/l NAA eklenerek hazırlanmıştır. Normal MS ortamında 4 mmol/l olan kalsiyum iyonu 2 ve 3 numaralı ortamlarda sırasıyla 2 ve 3 mmol/l'ye düşürülürken 5 ve 6 numaralı ortamlarda ise 5 ve 6 mmol/l'ye çıkarılmıştır. Hazırlanan bu 5 farklı ortam (2, 3, 4, 5 ve 6 no'lu ortamlar) kallogenez ve regenerasyon denemelerinde kullanılmıştır.

Doku ve hücre kültürlerinde, ekim yapıldıktan sonra ortamların muhafaza edildiği kültür inkübasyon odalarındaki koşulların da bitkilerde regenerasyon üzerinde büyük etkisi olduğu saptanmış bulunmaktadır [10]. Bu bağlamda Laminar Air Flow Steril Kabin'de ekim işlemi yapıldıktan sonra materyaller 25±2°C sıcaklık, 16-8 saat uzun gün periyodunun bulunduğu 2000 lüks'lük beyaz, soğuk floresans lambası ile aydınlatılmış büyüme odacığı (yetiştirme odası) ve biyotronda kontrollü şartlar altında kültüre alınmışlardır.

3. BULGULAR

Denemeler süresince yapılan gözlemlerden elde edilen sonuçlara göre tüm eksplant çeşitlerinden (tepe tomurcuğu, koltuk altı tomurcuğu, gövde, yaprak sapı) kallus elde edilmiştir. Tablo 1'de de görüleceği üzere en iyi kallus verimi %100 ile, MS ortamındaki kalsiyum miktarı azaltılarak hazırlanmış 2 ve 3 no'lu ortamlardan elde edilmesine rağmen en iyi kallus biyoması normal MS ortamında (4 no'lu ortam) gözlenmiştir. En iyi gövde ve kök gelişimi genellikle koltuk altı tomurcuğundan ve gövdeden alınan parçalardan elde edilmiştir. En iyi sürgün verimi %50 ve %40 ile MS'deki kalsiyum miktarı arttırılarak hazırlanan 5 ve 6 no'lu ortamlardan elde edilmiş olup baskın sürgün görünümü ile morfolojik sonuçlar da bu durumla paralellik göstermektedir (Tablo 1). Kök oluşum yüzdesine bakıldığında en iyi kök verimi %83.3 ile MS'deki Ca miktarı arttırılarak hazırlanmış 6 numaralı ortamda elde edilmiştir. Bunun yanı sıra 2 ve 4 numaralı

ortamlarda da kök gelişiminin iyi düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 1: Kallus, sürgün ve kök oluşumu ile ilgili sonuçlar

Ortam Numarası	Kallus oluşum yüzdesi ve kallus karakteri	Sürgün oluşum yüzdesi ve özelliği	Kök oluşum yüzdesi ve özelliği
2	%100 Yeşil,sert ve kahverengi yumuşak	%25 Tekli sürgün	%60 Kalın,çok kollu
3	%100 Açık yeşil,sert ve kahverengi yumuşak	%20 Tekli sürgün	%20 Zayıf
4	%55.5 Kahverengi, yumuşak	%28.57 Tekli sürgün	%57.1 Kalın
5	%80 Açık yeşil, yumuşak	%50 Baskın sürgün	%20 Zayıf
6	%83.3 Açık kahverengi yumuşak	%40 Baskın sürgün	%83.3 Kalın

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ülkemizin ihracat ürünlerinden *V. vinifera L. cv. Sultani* kültür formu 250 milyon dolarlık payı ile ihracatımız içerisinde önemli bir yere sahiptir. Ürünün gerek yurt içi gerekse yurt dışı taleplerinde görülen artış beraberinde bitkinin daha kısa sürede üretilmesi ve kalite ve verimin de üst düzeyde tutulması sorununu gündeme getirmiştir. Bu problemlerin aşılmasında biyolojinin uygulamalı bir alanı olan biyoteknoloji çok çeşitli çözüm yolları önermektedir. Gerek biyoteknolojinin gelişmesi için lazım olan hızlı üretim tekniklerinden, gerek ıslah süresini kısaltacak tekniklerden, gerekse bitki gen kaynaklarını koruyacak ucuz yöntemlerden biri doku kültür teknikleridir [11]. Biyoteknolojinin bir uğraş alanı olan bitki doku kültür teknikleri; bitkilerden ayrılan organ, doku, hücre, hücre kısımlarının steril koşullarda yapay besi ortamlarında yetiştirilmesi, geliştirilmesi ve yeni bitkilere dönüştürülmesidir [12]. Yukarıda sayılan gerekçeler doğrultusunda bu çalışmada, *V. vinifera L. cv. Sultani* adı ile bilinen çekirdeksiz Sultani üzümünde doku kültürü çeşitlerinden biri olan meristem kültürü ile in vitro çalışmalar yapılmıştır.

Doku kültür tekniklerinin doğru uygulanmasının ilk basamağı, doğru ortam seçimidir. Doku kültürü yapılırken; bitki türüne, kültüre alınacak doku ve organa ve denemenin amacına göre özel bir ortamın seçilmesi

gerektiği bildirilmektedir [13]. Nitekim Gonzalez ve arkadaşları [14] *V. vinifera L. cv. albarino*'nun gövde segmentlerinin gelişimi üzerinde MS ve Galzy kütür ortamlarının etkilerini in vitro koşullarda araştırmışlardır. İncelemelerinin neticesinde MS besi ortamında *albarino*'nun köklenmesinin azaldığı ve sıkı kallus oluşumunun meydana geldiğini, Galzy ortamında ise genç görünüşlü, yüksek aktiviteli kallusların oluştuğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca gövde oluşum sayısının ortam çeşidine bağlı olmadığını da bulmuşlardır. Yine pek çok araştırmacı doku kültürü ortamı olarak MS temel ortamını seçmiştir [15-16]. Kaynak ve Yürekli [17] tütün bitkisi ile yaptıkları in vitro çalışmalarda meristem kültürü için MS ortamının uygun olduğunu tespit etmişlerdir. Bu bilgilerin neticesinde çalışmalarımızda amacımıza en uygun olan Murashige-Skoog (MS) besi ortamını ve bunun modifiye formlarını kullandık.

Kallus oluşumunun teşviki için oksin miktarının sitokininden fazla olması gerektiği genel yargısına dayanarak denemelerimizde tüm besi ortamlarına 3 mg/l NAA eklenmiştir. Nitekim Gönülşen ve Özcan [5] normal MS ortamında asma (*V. spp.*)'nın herhangi bir gelişim göstermediğini ancak MS ortamına 1 mg/l NAA+ 0.5 mg/l kinetin, 2 mg/l NAA, 2 mg/l NAA+ 0.5 mg/l kinetin, 2 mg/l NAA+ 1mg/l kinetin ilavesi ile elde edilen kombinasyonlarda çok veya az miktarda kallus oluştuğunu tespit etmişlerdir. Bu durum oksin miktarının sitokininden fazla olduğu durumlarda kallus oluşumunun teşvik edildiği genel yargısını doğrulamakta olup bizim elde ettiğimiz sonuçlarla da uygunluk göstermektedir. Ancak kallus biyomasının sürekliliği ve gelişimi için belli bir oksin-sitokinin dengesinin sağlanması gerektiği bilinmektedir.

Regenerasyon sonuçlarını irdeleyecek olursak, genel olarak oksin-sitokininin oranı oksin lehine bozulduğunda explantta kök oluşumu sitokinin lehine bozulduğunda ise sürgün oluşumu beklenir. Hazırladığımız besi ortamlarında sadece oksin kullandığımızdan eksplantlardan çoğunlukla kök eldesi gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra gövde oluşumu da gözlenmiştir. Sonuçta denilebilir ki, hazırlanan besi ortamlarında oksin oranının fazla olmasına rağmen aynı ortamlarda (3 mg/l NAA içeren besi ortamları) hem kallus hem sürgün hem de köklenmenin elde edilmesi eksplantların başlangıç hormon düzeyleri ile ilgili olabileceği gibi sonradan eksplanttan elde edilen sürgün ya da kökte sentezlenecek hormonların ortamdaki hormon dengesini bozmasından da kaynaklanabilir. Kısacası kallus, sürgün ve kök eldesi için 3 mg/l NAA eklenmiş MS ortamının yeterli olduğu görülmüştür.

Bu çalışmanın temel amacı, ülkemiz topraklarının kalsiyumca zenginliği de göz önüne alındığında bu elementteki değişimin kallogenez ve

regenerasyon üzerindeki etkilerini in vitro koşullarda araştırmak olmuştur. Nitekim Akçam ve Yürekli [18] *Origanum spyleum* üzerinde yaptıkları kallus kültürü çalışmalarında MS temel ortamındaki kalsiyum miktarını 4 mmol'den 5 mmol'e arttırarak kallus elde etmişlerdir. Ayrıca bir başka çalışmada Baba ve Yürekli [19] temel tuzlardan biri olan kalsiyum iyonunun miktarını değiştirerek çeşitli türlerde kallus gelişimini incelemişlerdir. Araştırcılar, MS'deki kalsiyum miktarını 2 mmol'e düşürdüklerinde *Sideritis sipylea* türünün gövdesinden alınan eksplantlarda kallus veriminin % 100, *Astragalus tmoleus* fidelerinden oluşan kalluslarda verimin % 80 ve *Stachys tmolea* sürgünlerinden elde edilen kalluslarda ise verimin % 52 olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırcılar normal MS ortamında *Thymus sipyleus* ve *Digitalis cariensis* türlerinin % 100 verimle kalluslar oluşturduğunu da görmüşlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada ise Ca miktarındaki azalmanın kallus verimini arttırdığı (Tablo 1) ancak kallus biyomasının normal MS ortamında daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırcıların elde ettikleri sonuçlar ve bizim yapmış olduğumuz gözlemlerin neticesinde denilebilir ki farklı türlerde in vitro kalsiyum değişiminin kallogenenez üzerindeki etkileri de farklı olmaktadır. Ayrıca elde ettiğimiz bir diğer sonuca göre ise en iyi sürgün oluşumunun MS'deki kalsiyum miktarı arttırılarak hazırlanmış 5 ve 6 numaralı ortamlarda, en iyi kök oluşumunun ise 2, 4, ve 6 numaralı ortamlarda elde edildiği görülmüştür. Sonuçta sürgün ve kök gelişimi için 6 mmol/l'lik kalsiyum içeren MS ortamının daha uygun olduğu söylenebilir.

Bütün bu verilerin ışığı altında konunun moleküler düzeyde de incelenmesi gerektiği gerçeği ortaya çıkmaktadır. Ancak gerek bölüm imkanları açısından gerekse kontaminasyon oranının çok yüksek olması nedeniyle, yeterince materyalin elde edilememesinden dolayı çalışmanın bu boyutunun kürsümüzde yapılma olanağı bulunamamıştır. Umarız ki bundan sonraki çalışmalarda gerekli olanaklar sağlanarak konu yeterince aydınlığa kavuşturulabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E., Tohumlu Bitkiler Sistematığı Ders Kitabı, Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi No: 116, İzmir, 1995, 396 s.
- [2] Baytop, T., Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), İstanbul (1984).

- [3] Perl, A., Gollop, R., Lipsky, A., Holland, D., Sahar, N., Or, E., Elyasi, R., Regeneration and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.), Plant Tissue Culture of Biotech., 2(4): 187-193(1996).
- [4] Perl, A., Saad, S., Sahar, N., Holland, D., Establishment of long-term embryogenic cultures of seedless *Vitis vinifera* cultivars-a synergistic effect of auxins and the role of abscisic acid, Plant Science, 104,193-200(1995).
- [5] Gönülşen, N., Özcan, Ö., Asma (*Vitis ssp.*)'nin doku kültürü ile üretilmesi üzerine araştırmalar, Tübitak TOAG VII. Bil. Kong., 455 – 466(1983).
- [6] Läuchli, A., Bielecki, R.L., Encyclopedia of Plant Physiology New Series, Inorganic Plant Nutrition, Springer Verlag Berlin-Heidelberg, Germany, 1983, 354p.
- [7] Faust, M., Shear, C.B., Biochemical changes during the development of cork spot of apples, Qual Plant Mater Veg, 19, 225 – 265 (1969).
- [8] Lougheed, E.C., Murr, D.P. and Miller, S.R., 1979, Effects of calcium and daminozide on ethylene production and softening of apple fruits, Experimenta, 35: 43-45 (1979).
- [9] Murashige, T., Skoog, F., Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, Phsiology Plant, 15,453-498(1962).
- [10] Margara, J., Bases de la Multiplication Vegetative, INRA, Paris(1984).
- [11] Mahlstedt, J.P., Haber, E.S., Plant Propagation. John Willey and Sons, New York, 1959, 441pp.
- [12] Mavituna, F., Applications of plant cell biotechnology in industry and agriculture, Recent Advances in Biotechnology Series E: Applied Sciences, 210,207-226(1991).
- [13] Dodds, J. H., Roberts, L.W., Experiments in plant tissue culture, Cambridge University Press.(1986).
- [14] Gonzales, E., Diaz, T., Mosquera, M.V., Influence of culture medium on nodall segments on *Vitis vinifera* L. cv. albarino cultivated in vitro, Phton (Buenos Aires), 58 (1-2): 9-13(1996).
- [15] Sanchez-Grass, M.C., Segura, J., In vitro propogation of *Sideritis angustifolia*, Lag. J. Plant Phsiol, 130,93-99(1987).
- [16] Roubelakis-Angelakis, K.A., Van, K.T.T., Morphogenesis in Plants Molecular Approaches, Plenum Press, New York, 1993, 283pp.

- [17] Kaynak, M., Yürekli, A.K., *Nicotiana tabacum*'dan hücre kültürü yöntemi ile nikotin elde edilmesi imkanlarının araştırılması, E.Ü. Fen Bil. Ens. Der., 2(1): 43-47(1991).
- [18] Akçam, E., Yürekli, A.K., Callus culture studies on *Origanum spyleum* species, J. of Fac. Sci. Ege Univ., 15 (1): 21-25(1993).
- [19] Baba, B. , Yürekli, A.K., Ekonomik öneme sahip endemiklerin doku kültür teknikleri ile çoğaltılması, TBAG- 1190 nolu proje (1995).