

Çekirdeksiz x Çekirdeksiz Üzüm Melezlemelerinden Embriyo Kültürü Kullanılarak Bitki Elde Edilmesi*

Semih TANGOLAR, Sinan ETİ, Serpil GÖK, Fuat ERGENOĞLU
Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.02.1998

Özet: Bu araştırma embriyo kültürü tekniğinin çekirdeksiz üzüm ıslahında kullanılabilme olanaklarının ortaya konması amacıyla planlanmıştır. Araştırmada Sultani çekirdeksiz, Ergin çekirdeksizi, 3A-261, Perlette, Pembe çekirdeksiz, 2B-56, Flame Seedless ve King's Ruby çekirdeksiz üzüm çeşitleri kullanılmıştır. Birinci yılda çeşitlerin çiçek tozu kalite ve üretim miktarları saptanmıştır. 2. yılda ise Çekirdeksiz x Çekirdeksiz melezlemelerinden embriyo kültürü yoluyla bitki eldesine çalışılmıştır.

İncelenen çeşitlerin tamamının tozlayıcı bir çeşitte olması gerektiği kadar çiçek tozu canlılık ve çimlenme kapasitesine sahip olduğu saptanmıştır. Çiçek tozu üretim miktarları ve morfolojik homojenlik değerleri de yeterli düzeyde görülmüştür.

Melez kombinasyonlardan embriyo kültürü yoluyla bitki elde edilmesi de başarıyla gerçekleşmiştir. Embriyolardan 2.5 gün (Ergin çekirdeksizi x Perlette) ile 9 gün (Flame Seedless x Flame Seedless) gibi kısa sürede ve %77.1 (Flame Seedless x Perlette)' in üzerinde bir çimlenme saptanmıştır. Çimlenen embriyolardan %0 (Ergin çekirdeksizi x Perlette) - %78.9 (Perlette x Pembe çekirdeksiz)'u tam bitkiye dönüştürmüştür.

Obtaining Plants From Seedless x Seedless Grape Crosses Using Embryo Culture

Abstract: This experiment was planned to research the possibilities of the use of embryo culture on seedless grape breeding. Samples of Sultani çekirdeksiz (Thompson Seedless), Ergin çekirdeksizi, 3A-261, Perlette, Pembe çekirdeksiz, 2B-56, Flame Seedless and King's Ruby seedless grape varieties were used. In the first year of experiment, pollen viability and germination, amount of pollen production and their morphological homogeneity levels were determined. In the second year, plants were tried to obtain from seedless x seedless crosses by embryo culture.

The results obtained in the experiment showed that all of the varieties had enough pollen viability and germination capacity. In addition, the amount of pollen production and their morphological homogeneity levels were sufficient.

Plants were obtained successfully from hybrid combinations by embryo culture. Germination period of embryos were ranged between 2.5 days (Ergin çekirdeksizi x Perlette) and 9 days (Flame seedless x Perlette). The rate of germination was found over 77.1% (in Flame Seedless x Perlette). Percent of whole plant obtained from germinated embryos was zero in Ergin çekirdeksizi x Perlette while 78.9% in Perlette x Pembe çekirdeksiz combinations.

Giriş

Sofralık çekirdeksiz üzüm ıslahının bağcılık araştırmalarında önemli bir yeri vardır. Bu çeşitlerin klasik ıslahında çekirdeksiz çeşitler yalnız tozlayıcı olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalarda çekirdeksizliğin kalıtımı da incelenmiş ve çekirdeksiz genotiplerin elde edilmesine çalışılmıştır.

Cain ve ark. (1) ve Ramming (2) ile Singh ve Brar (3)'a göre Çekirdekli x Çekirdeksiz melezlemelerinde çekirdeksizlerin oranı %10-15 dolayındadır. Spiegel-Roy

ve ark. (4)'na göre de Çekirdekli x Çekirdeksiz melezlerinde çekirdeksiz döllerin sıklığı değişmektedir. Araştırmacılar, erkek birey olarak Sultani'yi kullandıklarında %6.5; Perlette'te %7.8; Flame Seedless'te ise %9.5 oranında çekirdeksizlik saptamışlardır. Loomis ve Weinberger (5) 10 000 den daha fazla birey inceleyerek, *Vitis* türlerinde çekirdeksizliğin kalıtımı üzerinde yaptıkları çalışmada, çekirdekli çeşitlerin kendilenmesinden elde edilen döllerde % 0-10.7 oranında çekirdeksiz birey saptamışlardır. Çekirdekli x Çekirdeksiz melezlemeleri benzer sonuçlar vermiş ve bunlarda %0-55

* Bu çalışma Ç.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir

oranında çekirdeksizlik gözlenmiştir. Araştırmacılar, çekirdeksizliğin resesif faktörler tarafından kontrol edildiğini belirtmişlerdir. Spiegel-Roy ve ark. (6) da yaptıkları melezlemelere dayanarak çekirdeksizliğin iki resesif genle taşındığını belirtmişler ve Çekirdekli x Çekirdeksiz melezlemelerinden elde edilen, dikkate değer ölçüde tohum izine sahip olmayan döllerin oranının %30.7 olduğunu ifade etmişlerdir. Striem ve ark. (7), Oz ve Early Muscat çekirdekli çeşitlerini Flame Seedless ile tozladıkları çalışmalarında, Oz çeşidi döllerinde %23.7; Early Muscat'ta ise %1.2 oranında gelişmemiş veya kısmen gelişmiş endosperm içeren bireyler elde etmiştir. Bunlara karşın bazı araştırmacılar (4, 8), çekirdeksizlikte dominant kontrol olasılığından da söz etmektedir. Barış ve Gürnil (8), 22 değişik sofralık çekirdekli çeşitle, Sultani tipi üç çekirdeksiz çeşidi kullandıkları çalışmalarında F₁ bireylerinde %48 oranında çekirdeksiz çeşit olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, bulgularına göre stenospermokarpik çekirdeksizliğin tek allel gen çifti tarafından kontrol edilen dominant bir özellik olduğunu belirtmişlerdir.

Embriyo kültürü yoluyla, stenospermokarpik çekirdeksiz çeşitlerden aborsiyon öncesinde alınan tohum taslağı veya embriyolardan yeni bitkiler elde edilmektedir (2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). Bu tekniğin kullanılabilmesi ile çekirdeksiz üzüm ıslahı çalışmalarında, Çekirdeksiz x Çekirdeksiz melezlemeleri uygulanabilir olmuştur. Böylece çekirdeksiz çeşitlerin geleneksel ıslah yöntemine (12) bir alternatif çıkmıştır.

Bu araştırmada bazı çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin çiçek tozu kalitelerinin ve üretim miktarlarının saptanması ve bunların birbirleriyle melezlenmeleri sonucunda oluşan zigotik embriyolardan embriyo kültürü kullanılarak bitki elde edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu araştırma Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde 1995 ve 1996 yıllarında yürütülmüştür. Materyal olarak Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma Bağında yetiştirilen beyaz çekirdeksiz çeşitlerden Ergin çekirdeksizi, Sultani çekirdeksiz (Thompson Seedless), 3A-261 ve Perlette ile renklilerden Pembe çekirdeksiz, 2B-56, Flame Seedless ve King's Ruby çeşitleri kullanılmıştır.

Projede, 1995 yılında öncelikle söz konusu çeşitlerin çiçek tozu kalite incelemeleri yapılmış ve çiçek tozu üretim

miktarları saptanmıştır.

Çiçek tozu kalite incelemeleri kapsamında, 1) çiçek tozu canlılık ve 2) çimlendirme testleri yapılmıştır.

Çiçek tozu canlılık testlerinde 2,3,5 Triphenyltetrazolium chlorid (TTC) ve Fluorescein diacetat (FDA) çözeltileri kullanılmıştır. TTC testi Norton (18)'a , FDA testi ise Heslop-Harrison ve Heslop-Harrison (19)'a göre yapılmıştır. Normal gün ışığında gerçekleştirilen TTC canlılık testlerinin uygulanmasından 2 saat sonra yapılan sayımlarda çiçek tozları, boyanma tonlarına göre 3 gruba ayrılmış, koyu kırmızı boyanan çiçek tozları canlı, açık kırmızı boyananlar yarı canlı ve sarımsı pembe ya da renksiz olanlar cansız olarak kabul edilmişlerdir. FDA canlılık testinde sayımlar çiçek tozlarının ekiminden 5 dakika sonra floresans mikroskopta yapılmış, parlak yeşil görünen çiçek tozları canlı, mat olanlar cansız olarak değerlendirilmiştir. Çiçek tozları çimlendirme testleri ise petride agar yöntemiyle, %1 agar ortamına ilave edilmiş %5, %10 ve %15 sakkaroz karışımlarında; ayrıca asılı damla yöntemiyle, %0, %5, %10 , %15 ve %20'lik sakkaroz çözeltilerinde karşılaştırmalı olarak yapılmıştır (20). Bu testlerde her çeşit için üç lam veya petri kutusu ve bunların herbirinde tesadüfi olarak seçilen dörder alanda bulunan çiçek tozlarından çimlenen ve çimlenmeyenler sayılarak çimlenen çiçek tozlarının oranları % olarak belirlenmiştir.

Ayrıca denemeye alınan üzüm çeşitlerinde çiçek tozu üretim miktarlarının saptanabilmesi amacıyla Eti (21) tarafından belirlenen Hemositometrik yöntem uygulanmıştır. Bu amaçla her tip için henüz açılmamış 20 çiçeğin anterleri sayılarak, onarlık 2 yineleme halinde ayrılmışlardır. Bu anterler patladıktan sonra her yineleme için 4 lam, her lamda da tesadüfi seçilen 4 alanda çiçek tozu sayımları yapılmıştır. Bu yöntemle ayrıca çiçek tozlarının varsa morfolojik gelişme bozuklukları da incelenmiştir.

Çalışmanın 2. yılında, çiçeklenme zamanı birbirine uyan çeşitlerde kendileme ve karşılıklı melezlemeler yapılmıştır (Tablo 1).

Melez kombinasyonlardan, tam çiçeklenmeden sonraki 5-6. haftada alınan salkım örnekleri (17) laboratuvara getirilerek , 1/3'lük orta kısımlarından tane örnekleri alınmıştır (22). Daha sonra Tangolar ve ark.'nda (17) da belirtilen embriyo kültürü yöntemi ve E20A (17, 23) besi ortamı kullanılarak bu örneklerden bitki elde edilmesine çalışılmıştır. Tanelerden çıkarılan ve her

kombinasyon için yaklaşık 150 adet kullanılan ovüller, petrilere geçen ovül geliştirme aşamasında 12 hafta tutulmuştur. Bu süre içinde bazı çeşitlerde ovül içinde embriyo çimlenmesi gerçekleşmiş ve çimlenme, kökçüğün mikropilden çıkmasıyla belirlenmiştir. Bu ovüller, çimlenen ovül (%) kapsamında değerlendirilmiştir. Daha sonra ovüllerden çıkarılan embriyolar, çimlenmeleri için yine E2OA ortamına yerleştirilmiştir. Bu aşamada çimlenenler, çimlenen embriyo (%) olarak dikkate alınmıştır. Kültür süresince başlangıçtan itibaren ayrıca, Ovül çimlenme süresi (gün), Ovüldeki embriyo (%), Embriyo çimlenme süresi (gün) ve Tam bitki (%) (4) gibi özellikler incelenmiştir.

Tablo 1. İncelenen Kombinasyonlar (+. var. -. yok)

Ana	Tozlayıcı					
	Pç.	Eç.	P.	FS.	KR.	2B-56
Pembe çekirdeksiz (Pç.)	+	+	+	+	-	-
Ergin çekirdeksizi (Eç.)	+	+	+	+	-	-
Perlette (P.)	+	+	+	+	-	-
Flame Seedless (FS.)	+	+	+	+	-	-
King's Ruby (KR.)	-	-	-	+	+	+

Araştırmada yüzde olarak hesaplanan bütün değerlerin varyans analizi açılı transformasyonlarına göre yapılmış olup, çizelgelerde gerçek değerler verilmiştir.

İstatistiksel analizler, tesadüf parselleri deneme deseni esas alınarak yapılmış ve ortalamalar LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

Sonuçlar ve Tartışma

Çiçek Tozu Kalite İncelemeleri ve Çiçek Tozu Üretim Miktarları

In Vitro Koşullarda Çiçek Tozu Canlılık Testleri

Araştırma kapsamında incelenen 8 üzüm çeşidine ait çiçek tozlarının canlılık düzeylerini belirleyebilmek amacıyla TTC ve FDA canlılık testleri yapılmıştır.

TTC testinde canlı çiçek tozları koyu kırmızıya boyanırken, açık kırmızı ve pembe boyanan çiçek tozları yarı canlı, renksiz olanlar ise cansız olarak kabul edilmişlerdir. İncelenen çeşitlerde her 3 gruba giren çiçek

tozlarının canlılık düzeyleri arasındaki istatistiksel farklılık önemli bulunmuştur (Tablo 2). En yüksek canlılık düzeyi (%91.42) Flame Seedless çeşidinde belirlenmiş, bunu %88.52 değeri ile 2B-56 izlemiştir. Diğer çeşitlere ait çiçek tozlarının tamamında canlılık değerleri %70'in üzerinde bulunmuştur. Ayrıca, teorik olarak %50'sinin canlı olduğu kabul edilen yarı canlı çiçek tozu miktarları da dikkate alındığında, bütün çeşitlerin çiçek tozu canlılık değerlerinin oldukça yüksek düzeylerde bulunduğu söylenebilir. Cansız çiçek tozu miktarı yönünden en yüksek değerler ise King's Ruby, 3A-261 ve Sultani çekirdeksiz çeşitlerinde (sırasıyla %21.80, %21.20 ve %19.22) bulunmuştur.

Tablo 2. Değişik Üzüm Çeşitlerine Ait Çiçek Tozlarının TTC Testi Yardımıyla Saptanan Canlılık Değerleri (%)

Çeşit	Canlı	Yarı canlı	Cansız
Perlette	71.34 b	21.90 a	6.76 b
Ergin çekirdeksizi	71.14 b	13.64 ab	15.22 ab
Pembe çekirdeksiz	70.52 b	14.86 ab	14.62 ab
Sultani çekirdeksiz	71.72 b	9.06 bc	19.22 a
King's Ruby	72.84 b	5.36 cd	21.80 a
Flame Seedless	91.42 a	1.28 d	7.30 b
2B-56	88.52 a	4.87 cd	6.61 b
3A-261	76.33 b	2.47 d	21.20 a
LSD %5	4.64	5.64	6.22

Denemeye alınan çeşitlere ait çiçek tozlarının canlılık düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan FDA testinde floresans mikroskopta parlak yeşil renkli görülen çiçek tozları canlı, mat görülenler cansız olarak kabul edilmektedir. Yapılan FDA testi sonucunda çeşitlere ait çiçek tozlarında belirlenen canlılık düzeyleri arasındaki istatistiksel farklılığın önemli olduğu bulunmuştur (Tablo 3). Çizelgeden de izlenebileceği gibi, FDA testinde en yüksek çiçek tozu canlılık değerleri Flame Seedless, 3A-261 ve King's Ruby çeşitlerinde (sırasıyla %65.74, %62.42 ve %61.94) bulunmuştur, bu yönden en düşük değer (%13.68), 2B-56 çeşidinden elde edilmiştir.

TTC ve FDA çiçek tozu canlılık testlerinden elde edilen değerler karşılaştırıldığında FDA testinde genel olarak daha düşük canlılık değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Flame Seedless çeşidine ait çiçek

tozlarında her iki testte de en yüksek canlılık değerleri elde edilirken, diğer çeşitlerde TTC ve FDA testi sonuçları yönünden tam bir paralellik görülmemiştir. Hatta 2B-56 çeşidinde olduğu gibi birbirinden çok farklı sonuçlar dahi elde edilebilmiştir. Nitekim Eti (24), elma, armut, kiraz, vişne ve erik türlerine ait toplam 10 çeşidin çiçek tozlarında yaptığı TTC, FDA ve IKI testlerinden elde ettiği canlılık değerlerini karşılaştırırken, bu testlerin her zaman için birbirleriyle uyumlu sonuçlar vermeyebildiğini belirlemiştir.

Tablo 3. Değişik Üzüm Çeşitlerine Ait Çiçek Tozlarının FDA Testi Yardımıyla Saptanan Canlılık Değerleri (%)

Çeşit	Canlı	Cansız
Perlette	47.47 b	52.53 e
Ergin çekirdeksizi	36.59 c	63.41 d
Pembe çekirdeksiz	31.59 d	68.41 c
Sultani çekirdeksiz	21.71 e	78.29 b
King's Ruby	61.94 a	38.06 f
Flame Seedless	65.74 a	34.26 f
2B-56	13.68 f	86.32 a
3A-261	62.42 a	37.58 f
LSD %5	2.98	2.98

In Vitro Koşullarda Çiçek Tozu Çimlendirme Testleri

Çiçek tozlarının çimlenme düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan testlerde, denemede yer alan üzüm çeşitlerine ait çiçek tozları "asılı damla" ve "petride agar" yöntemleri uygulanarak *in vitro* koşullarda çimlendirilmiştir.

Asılı damla yöntemiyle yapılan çimlendirme testleri sonucunda, çiçek tozlarının çimlenme düzeyleri arasındaki farklılığın önemli olduğu bulunmuştur (Tablo 4). Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, çeşitler bazında en yüksek çimlenme değerlerinin 3A-261, King's Ruby ve Pembe çekirdeksiz çeşidinde (sırasıyla %63.91, %55.47 ve %52.40) %5 sakkaroz; Ergin çekirdeksizi ve Sultani çekirdeksiz'de (%55.57 ve %30.48) %10 sakkaroz; Perlette'te (%52.30) %15 sakkaroz ve Flame Seedless çeşidinde sırasıyla (%60.69 ve %59.69) %20 ve %15 sakkaroz ortamlarında elde edildiği belirlenmiştir. 2B-56 çeşidinde ise bu ortamlarda hiç çimlenme olmamıştır.

Tablo 4. Değişik Üzüm Çeşitlerine Ait Çiçek Tozlarının Asılı Damla Yöntemiyle Farklı Sakkaroz Konsantrasyonlarında Belirlenen Değerleri (%)

Çeşit	Sakkaroz konsantrasyonları (%)			
	5	10	15	20
Perlette	23.05 e	43.27 b	52.30 b	13.28 d
Ergin çekirdeksizi	34.78 d	55.57 a	51.57 b	19.84 c
Pembe çekirdeksiz	52.40 b	46.88 ab	43.44 c	0.00 e
Sultani çekirdeksiz	13.98 f	30.48 c	0.00 d	0.00 e
King's Ruby	55.47 b	25.40 d	44.29 c	38.18 b
Flame Seedless	39.00 c	50.74 ab	59.69 a	60.69 a
2B-56	0.00 g	0.00 e	0.00 d	0.00 d
3A-261	63.91 a	45.28 ab	0.00 d	34.79 b
LSD %5	2.12	4.29	2.47	2.70

Petride agar yönteminde belirlenen çiçek tozu çimlenme değerleri genel olarak asılı damla yöntemine oranla daha düşük düzeylerde olmuştur. En yüksek çimlenme değerlerinin %1 agar+%5 sakkaroz ve %1 agar+%10 sakkaroz ortamlarında 2B-56 (sırasıyla %30.11 ve %43.20), %1 agar+%15 sakkaroz ortamında ise King's Ruby çeşitlerinde belirlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Değişik Üzüm Çeşitlerine Ait Çiçek Tozlarının Agar + Sakkaroz Karışımlarında Belirlenen Çimlenme Değerleri (%)

Çeşit	%1 Agar + Sakkaroz		
	%5 Sakkaroz	%10 Sakkaroz	%15 Sakkaroz
Perlette	19.80 bc	24.98 bc	28.25 bc
Ergin çekirdeksizi	18.98 bc	27.94 b	23.03 cd
Pembe çekirdeksiz	19.54 bc	18.80 d	20.79 d
Sultani çekirdeksiz	7.69 d	11.09 e	11.40 e
King's Ruby	27.63 ab	30.95 b	39.10 a
Flame Seedless	13.93 cd	21.81 cd	17.86 d
2B-56	30.11 a	43.20 a	34.16 b
3A-261	8.73 d	18.31 d	22.53 cd
LSD %5	4.92	3.19	3.46

Özbek (25) Çavuş üzümü ile birlikte 7 üzüm çeşidinin çiçek tozu çimlenme oranlarını %10-15-20 ve 25'lik sakkaroz çözeltilerinde incelemiş ve ele alınan çeşitlere ait çiçek tozu çimlenme oranlarının %30'un üzerinde bulunduğunu ve en uygun konsantrasyonun %15 ve %20'lik çözeltiler olduğunu belirlemiştir. Çekirdekli ve çekirdeksiz Emperor üzüm çeşitlerinde İstar (26) tarafından yapılan bir araştırmada %20 sakkaroz ortamı, en yüksek çiçek tozu çimlenme oranını vermiştir. Bu konsantrasyonda çekirdekli Emperor çiçek tozları %78, çekirdeksiz Emperor çiçek tozları ise %75 oranında çimlenmişlerdir. Nagarajan ve Mathava Rao (27), %15 ve %25'lik sakkaroz konsantrasyonlarında üzüm çiçek tozlarında optimum çimlenmenin olduğunu belirlemişlerdir.

2B-56 çeşidine ait çiçek tozlarında asılı damla yöntemiyle değişik sakkaroz konsantrasyonları kullanılarak yapılan çimlendirme denemelerinde hiç çimlenme gerçekleşmezken, aynı çeşitte agar + sakkaroz ortamında en yüksek çimlenme değerine ulaşılması ilgi çekici bulunmuştur. Çiçek tozları *in vitro* koşullarda değişik ortamlarda farklı çimlenme değerleri gösterebilmektedir. Bu nedenle çiçek tozu çimlendirme testlerinde en az iki farklı çimlendirme yöntemi ve bu yöntemlerde farklı substrat konsantrasyonları denenmelidir. Bu noktada çimlenme başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri de çiçek tozu dış duvarının geçirgenlik özelliğidir. Nitekim, Stanley ve Linskens (20) ve Ehlers (28), bazı bitkilere ait çiçek tozlarının çimlenme için çok nemli bir ortama gereksinim duyarken,

bazılarının daha düşük nem koşullarında rahatlıkla çimlenebildiğini belirtmektedirler.

Bu araştırmada gerek her iki çimlendirme testinden, gerekse genel olarak çimlendirme ve canlılık testlerinden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, değerler arasında tam bir paralellik bulunmadığı görülmektedir. Norton (18), bu testler arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirlemesine karşın, Eti ve Stösser (29) çiçek tozu canlılık ve çimlendirme testleri arasında her zaman için uyumlu sonuçlar bulunamayacağını belirlemişlerdir. Bu durumda, incelenen çeşitler için en uygun canlılık testi ve çimlendirme ortamının ancak o çeşit için yapılacak özel ön deneme testleri ile ortaya çıkarılabileceği söylenebilir (24).

Bu araştırmada incelenen tüm üzüm çeşitlerine ait çiçek tozlarının farklı testlerde farklı değerler ortaya koymalarına karşın, sonuçta hepsinin de tozlayıcı bir çeşitte aranan canlılık ve çimlenme değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir.

Çiçek Tozu Üretim Miktarlarının Saptanması

Denemede yer alan üzüm çeşitlerine ait ortalama anter sayısı, bir çiçekteki ve bir anterdeki ortalama çiçek tozu sayısı ve morfolojik homojenlik değerleri Tablo 6' da verilmiştir.

Bir çiçekteki ortalama anter sayısı yönünden çeşitler arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli çıkmamıştır. İncelenen üzüm çeşitlerine ait ortalama anter sayılarının 4.8 ile 5.4 arasında olduğu belirlenmiştir.

Çeşit	A*	B*	C*	D*
Perlette	5.4	7518 a	1411 ab	72.76 a
Ergin çekirdeksizi	5.1	5710 cd	1120 c	68.68 a
Pembe çekirdeksiz	5.0	7427 a	1486 a	59.79 b
Sultani çekirdeksiz	4.9	5829 c	1194 bc	68.84 a
King's Ruby	4.9	6569 b	1342 ab	59.46 b
Flame Seedless	5.1	5569 cd	1103 c	53.85 c
2B-56	5.4	5439 cd	1007 c	69.33 a
3A-261	4.8	5191 d	1082 c	66.70 a
LSD %5	Ö.D	621	218	2.58

Tablo 6. Değişik Üzüm Çeşitlerinde Belirlenen Çiçek Tozu Üretim Miktarları ve Morfolojik Homojenlik Değerleri

Ö.D. : Önemli Değil

A*: Bir Çiçekteki Ortalama Anter Sayısı (n)

B*: Bir Çiçekteki Ortalama Çiçek Tozu Sayısı (n)

C*: Bir Anterdeki Ortalama Çiçek Tozu Sayısı (B/A) (n)

D*: Morfolojik Olarak Normal Çiçek Tozu Oranı (%)

Bir çiçekteki ortalama çiçek tozu sayısı yönünden en yüksek değerler Perlette (7518 adet) ve Pembe çekirdeksiz (7427 adet), bir anterdeki çiçek tozu sayısı yönünden ise yine Pembe çekirdeksiz (1486 adet) ve Perlette (1411 adet) çeşitlerinden elde edilmiştir. Bu kriterler yönünden King's Ruby çeşidi, Perlette ve Pembe çekirdeksiz'i izlerken, öteki çeşitlerde daha düşük değerler bulunmuştur.

Bir çiçekteki çiçek tozu sayısı yönünden en düşük değer (5191 adet) 3A-261 çeşidinde, bir anterdeki çiçek tozu sayısı yönünden ise en düşük değer (1007 adet) 2B-56 çeşidinde olduğu belirlenmiştir. Oberle ve Goertzen (30), değişik meyve tür ve çeşitlerinde yaptıkları bir çalışmada asmalarda bir anterdeki çiçek tozu üretim miktarının çeşitlere göre 1242 ile 3790 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Çiçek tozlarının morfolojik homojenlik düzeyleri yönünden en yüksek değerler Perlette, 2B-56, Sultani çekirdeksiz, Ergin çekirdeksiz ve 3A-261 çeşitlerinde sırasıyla (% 72.76, % 69.33, % 68.84, % 68.68 ve % 66.70) olarak belirlenirken, bu yönden en düşük değer (% 53.85) Flame Seedless çeşidinden elde edilmiştir. Eti (31), morfolojik homojenlik değeri % 100'e yaklaştıkça, bir çeşidin tozlayıcı olarak kullanılma şansının arttığını belirtmiştir. Araştırmacı, bir çeşidin çiçek tozlarında morfolojik homojenlik düzeyinin % 80-90 dolayında olması durumunda, ele alınan çeşidin bu yönden istenilen özelliklere yeterince sahip olduğunun söylenebileceğini ifade etmiştir.

Melez Kombinasyonlardan Embriyo Kültürü Yoluyla Bitki Elde Edilmesi

Pembe çekirdeksiz üzüm çeşidi kombinasyonlarından elde edilen bulgular Tablo 7 de verilmiştir (Tablodaki kısaltmalar, daha sonraki tablolar için de geçerlidir). Tablo incelendiğinde, kullanılan kombinasyonlar arasında yalnızca çimlenen embriyo ve tam bitkiye dönüşüm oranı bakımından önemli farklılığın olmadığı görülmektedir. En kısa çimlenme süreleri, ovüllerde 52.8 gün ile Pç. x Eç.; embriyolarda ise 4.0 ve 4.3 gün ile aynı grupta yer alan Pç. x P. ve Pç. x FS. kombinasyonlarında saptanmıştır. Çıkarılan embriyolarda ise %95'in üzerinde çimlenme gerçekleşmiştir.

Tablo 8'de verilen bulgulardan, Ergin çekirdeksizinde ovül çimlenmesinin olmadığı görülmektedir. Bunun nedeni; muhtemelen bu çeşidin tohum kabuğunun diğerlerinden daha sert ve çimlenme

için gerek mekanik, gerekse biyokimyasal bir engel yaratmış olmasıdır. Ancak, 12 haftalık kültürden sonra nispeten sert tohum kabuğu etkisinden kurtarılarak çıkarılan bütün embriyolarda, besi ortamı üzerinde %100 çimlenme gözlenmiştir. Bu durum, Ergin çekirdeksiz çeşidindeki tohum olgunluğunun, ana ebeveyn olarak diğer çeşitlerin kullanıldığı kombinasyonlardan daha ileri düzeye eriştiğinin bir göstergesi olarak da yorumlanmıştır. Bu çeşitte, ovüldeki embriyo oranı %9.2 (Eç. x Eç.) - 14.9 (Eç. x P.) ve embriyo çimlenme süresi 2.5-5.8 gün arasında değişmiştir. Tam bitkiye dönüşüm oranı ise (Eç. x P.) %0 - 75.0 (Eç. x Pç.) olarak saptanmıştır.

Tablo 7. Pembe çekirdeksiz Üzüm Çeşidi Kombinasyonlarının Embriyo Kültürüne İlişkin Bulgular

Melezler*	A*	B*	C*	D*	E*	F*
Pç. x Pç.	64.0 ab	11.7 b	13.9 b	5.0 b	100	75.0
Pç. x Eç.	52.8 c	18.7 ab	20.6 ab	8.0 a	100	74.1
Pç. x FS.	63.2 b	21.0 a	27.7 a	4.3 c	96.3	66.9
Pç. x P.	72.8 a	29.6 a	26.9 a	4.0 c	95.0	47.5
LSD %5**	9.1	7.9	7.4	0.4	Ö.D.	Ö.D.

* P.: Perlette FS.: Flame Seedless Pç.: Pembe çekirdeksiz
Eç.: Ergin çekirdeksiz ** Ö.D.: Önemli Değil
A*: Ovül çimlenme süresi (gün) B*: Çimlenen ovül (%)
C*: Ovüldeki embriyo (%) D*: Embriyo çimlenme süresi (gün)
E*: Çimlenen embriyo (%) F*: Tam bitki (%)

Tablo 8. Ergin çekirdeksiz Üzüm Çeşidi Kombinasyonlarının Embriyo Kültürüne İlişkin Bulgular

Melezler*	A*	B*	C*	D*	E*	F*
Eç. x Eç.	-	-	9.2 c	4.4 b	100	50.0 ab
Eç. x Pç.	-	-	10.9 b	5.0 a	100	75.0 a
Eç. x FS.	-	-	11.1 b	5.8 a	100	20.0 bc
Eç. x P.	-	-	14.9 a	2.5 b	100	0.0 c
LSD %5	-	-	1.6	2.0	Ö.D.	35.5

Perlette çeşidinin ana olarak kullanıldığı bütün kombinasyonlarda ovül çimlenmesi saptanmıştır (Tablo 9). Perlette çeşidinin kendilenmesi sonucunda elde edilen ovüllerde çimlenme, daha uzun sürede gerçekleşmiş; çimlenen ovül yüzdelerinin ise Ergin çekirdeksiz kombinasyonunda daha düşük olduğu (%11.9) bulunmuştur. Bu çeşitte ovüldeki embriyo oranı P. x Eç.

kombinasyonunda (%27.4) ile en düşük olarak saptanmış ve embriyo çimlenme süresi 4.7-5.0 gün; çimlenen embriyo oranı ise %88.2-93.5 arasında değişmiştir. Tam bitkiye dönüşüm oranının %54.9 (P. x P.) ile %78.9 (P. x Pç.) arasında olduğu saptanmıştır.

Tablo 9. Perlette Üzüm Çeşidi Kombinasyonlarının Embriyo Kültürüne İlişkin Bulgular

Melezler*	A*	B*	C*	D*	E*	F*
P. x P.	87.2 a	27.3 a	39.5 a	5.0	91.5	54.9 b
P. x FS.	78.0 b	27.0 a	33.6 a	4.7	93.5	68.8 ab
P. x Pç.	78.3 b	27.4 a	32.6 a	5.0	89.3	78.9 a
P. x Eç.	75.1 b	11.9 b	27.4 b	4.9	88.2	59.0 ab
LSD %5	7.0	7.7	7.2	Ö.D.	Ö.D.	19.0

Tablo 10'da verilen Flame Seedless çeşidi sonuçlarından, kombinasyonlar arasında, çimlenen embriyo kriteri dışındaki bütün özellikler bakımından önemli farklılıkların olduğu görülmektedir. Bu çeşitte embriyoların Pç. ve P. kombinasyonlarında oldukça kısa sürede çimlendiği (sırasıyla 6 ve 9 gün), çimlenen embriyo miktarının da hayli yüksek olduğu (%77.1-100) bulunmuştur. Çimlenen embriyolardan %29.2-72.6'sı tam bitkiye dönüşmüştür.

Tablo 10. Flame Seedless Üzüm Çeşidi Kombinasyonlarının Embriyo Kültürüne İlişkin Bulgular

Melezler*	A*	B*	C*	D*	E*	F*
FS. x FS.	98.0 a	12.7 a	12.7 c	9.0 a	100	50.0 a
FS. x Pç.	83.8 b	10.9 ab	23.9 ab	6.0 b	100	72.6 a
FS. x Eç.	97.0 a	7.4 b	16.1 bc	8.8 a	93.8	56.3 a
FS. x P.	75.2 b	5.9 b	24.6 a	6.8 b	77.1	29.2 b
LSD %5	11.1	9.0	5.7	1.1	Ö.D.	27.6

Kaynaklar

- Cain, D.W., Emershad R.L., Tarailo, R.E., In-ovulo embryo culture and seedling development of seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.), *Vitis* 22, 9-14, 1983.
- Ramming, D.W., The use of embryo culture in fruit breeding, *Hortscience* 25, 4, 393-398, 1990.
- Singh, Z., Brar, S.J.S., In vivo development of ovule in seedless and seeded cultivars of grapes (*Vitis vinifera* L.)- a particular reference to in ovulo embryo culture, *Vitis* 31, 77-82, 1992.
- Spiegel-Roy, P., Sahar, N., Baron, J., Lavi, U., *In vitro* culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds., *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110, 1, 109-112, 1985.
- Loomis, N.H., Weinberger, J.H., Interitance studies of seedlessness in grape, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 104, 2, 181-184, 1979.
- Spiegel-Roy, P., Sahar, N., Baron, Y., Sahar, N., Inheritance of seedlessness in seeded x seedless progeny of *Vitis vinifera* L., *Vitis* 29, 79-83, 1990.

King's Ruby çeşidinde de Tablo 11'den izleneceği gibi, kombinasyonlarda 49.0-72.2 gün arasında değişen sürelerde, %0.8-5.8 oranında ovül çimlenmesi belirlenmiştir. Ovüllerden çıkarılan embriyolarda ise, 5.9-7.0 günde %79.6-94.4 oranında çimlenme görülmüştür. 2B-56 ile olan kombinasyonlarda en yüksek oranda (%59.3) tam bitkiye dönüşüm görülmektedir.

Tablo 11. King's Ruby Üzüm Çeşidi Kombinasyonlarının Embriyo Kültürüne İlişkin Bulgular

Melezler*	A*	B*	C*	D*	E*	F*
KR. x KR.	69.4 a	4.9	16.5	6.6 ab	79.6	24.1 b
KR. x FS.	72.2 a	5.8	18.3	7.0 a	85.0	40.0 ab
KR. x 2B-56	49.0 b	0.8	18.4	5.9 b	94.4	59.3 a
LSD %5	12.7	Ö.D.	Ö.D.	1.3	Ö.D.	26.1

Elde edilen bulguların değerlendirilmesinden, bütün kombinasyonlarda embriyo çimlenmesinin, 2.5 gün (Ergin çekirdeksiz x Perlette) ile 9.0 gün (Flame Seedless x Flame Seedless) arası gibi kısa bir sürede ve %77.1 (Flame Seedless x Perlette) den daha yüksek bir oranda gerçekleştiği sonucu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç, Tangolar ve ark.(17)'nin aynı çeşitleri ve E20A besi ortamını kullanarak yaptıkları çalışmada tam çiçeklenmeden sonraki 5. - 6. haftada alınan örneklerden elde ettikleri sonuçlarla uygunluk göstermektedir. Bu da çekirdeksiz x çekirdeksiz melezlemeleri yoluyla çekirdeksiz üzüm ıslahında embriyo kültürü tekniğinin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini (2, 9), benzer konuda çalışan ve makalenin giriş bölümünde verilen çok sayıda araştırmacının da görüşlerine paralel bir şekilde ortaya koymuştur.

7. Striem, M.J., Spiegel-Roy, P., Baron, I., Sahar, N., The degrees of development of the seed-coat and the endosperm as separate subtraits of stenospermocarpic seedlessness in grapes, *Vitis* 31, 149-155, 1992.
8. Barış, C., Gürnil, K., Üzüm çeşitlerinde (*V. vinifera* L.) çekirdeksizliğin kalıtımı, *Bahçe* 20, 1-2, 87-100, 1991.
9. Ramming, D.W., Embryo culture. Moore, J.N. and Janick, J., (Editors). In methods in fruit breeding, 136-142, 1983.
10. Ramming, D.W., Emershad, R.L., Embryo culture of early-ripening seeded grape genotypes, *HortScience* 19, 594. (Abstr.), 1984.
11. Emershad, R.L., Ramming, D.W., In ovulo embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless. *Amer. J. Bot.*, 71, 873-877, 1984.
12. Barlass, M., Ramming D.W., Davis, H.P., In-ovulo embryo culture-a breeding technique to rescue seedless x seedless table grape crosses, Division of Hort. Report 1985-1988, 8-9. CSIRO Australia, 1988.
13. Goldy, R.G., Amborn, U., *In vitro* culturability of ovules from 10 seedless grape clones, *Hortscience* 22, 5, 952, 1987.
14. Gray, D.J., Fisher, L.C., Mortensen, J.A., Comparison of methodologies for in ovulo embryo rescue of seedless grapes, *Hortscience*, 22, 6, 1334-1335, 1987.
15. Tsoleva, V., Obtaining plants from crosses of seedless grapevine varieties by means of *in vitro* embryo culture. *Vitis*, 29, 1-4, 1990.
16. Fernandez, G.E., Clark, J.R., Moore, J.N., Effect of seedcoat manipulation on the germination stenospermocarpic grape embryos cultured in ovulo, *Hortscience*, 26, 9, 1220, 1991.
17. Tangolar, S., Gök, S., Ergenoğlu, F., Çetiner, S., Bazı çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin embriyo kültüründen yararlanılarak çoğaltılması, *Türk Tar. ve Orm. Dergisi*, 22, 1, 87-92, 1998.
18. Norton, J. D., Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts, *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 89, 132-134, 1966.
19. Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence, intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate, *Stain Technology*, 45, 115-120, 1970.
20. Stanley, R. G., Linskens, H. F., *Pollen: Biology, Biochemistry Management*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. 344 p., 1974.
21. Eti, S., Çiçek tozu miktarını belirlemede kullanılan pratik bir yöntem, *Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Dergisi* 5, 4, 49-58, 1990.
22. Anonymous, *Grape descriptors*, IBPGR Secretariat, Rome, 1983.
23. Sarı, N., Karpuzlarda ışınlanmış polen uyarımıyla haploid bitki eldesi üzerine genotipin ve mevsimin etkisi ile ışınlama yerine geçebilecek uygulamalar üzerinde çalışmalar, *Çukurova Üniv. Fen Bilim. Enst. Bahçe Bitkileri AnaBilim dalı, Doktora Tezi*, Adana, 244 s., 1994.
24. Eti, S., Bazı meyve tür ve çeşitlerinde değişik *in vitro* testler yardımıyla çiçek tozu canlılık ve çimlenme yeteneklerinin belirlenmesi. *Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Dergisi* 6,1, 69-80, 1991.
25. Özbek, S., Baba çeşitlerin Çavuş üzümünün meyve vasıfları üzerine doğrudan doğruya tesiri (Metaxenie). *Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yıllığı* 23 s., 1951.
26. İştar, İ., Akdeniz Bölgesi ve Bilhassa İçel bağcılığı ve bu bölgede yetiştirilen başlıca üzüm çeşitlerinin ampelografileri ile İçel ili bağcılığının geliştirilmesi imkanları üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yay.:149, 59-70. Ankara Üniv. Basımevi. Ankara., 1959.*
27. Nagarajan, C. R., Madhava Rao, V. N., Pollen studies in grapes, *S. Indian, Hort. Abstr.*, 18, 1-17, 1970.
28. Ehlers, H., Untersuchungen zur Ernährungsphysiologie der Pollenschläuche. *Biologisches Zentralblatt*, 70, 432-451, 1951.
29. Eti, S., Stösser, R., Fruchtbarkeit der Mandarinsorte "Clementine" (*Citrus reticulata* Blanco). I. Pollenqualität und Pollenwachstum. *Gartenbauwiss.* 53, 4, 160-166, 1988.
30. Oberle, G. D., Goertzen, K. L., A method for evaluating pollen production of fruit varieties, *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 59, 263-265, 1952.
31. Eti, S., Döllenme biyolojisi ders notları (Basılmamış), 1992.