

ASMADA (*Vitis vinifera* L.) EKSPLANT YÜZEY STERİLİZASYON PROTOKOLÜNÜN OLUŞTURULMASI

Elif Ceren PEHLİVAN¹, Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH², Birhan MARASALI KUNTER³

¹Arş. Gör., Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, TEKİRDAĞ

²Yrd. Doç. Dr., Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, TEKİRDAĞ

³Prof. Dr., Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, ANKARA

Geliş tarihi / Received: 11.09.2017, Kabul tarihi / Accepted: 20.06.2018

ÖZET

Bu çalışmada üzüm çeşitlerinin (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* hücre ve doku kültürü mikroçoğaltım çalışmaları için etkili yüzey sterilizasyon protokolünün oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmada Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitleri kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyon deneylerinde sodyum hipoklorit (NaOCl) ve %100 doğal su bazlı ve %0.015 aktif klor içeren ticari sıvı yüzey dezenfektanı Actijenin (Natural Protection System, NPS Biyosidal) farklı konsantrasyonlarının; farklı süre ve uygulama şekilleri ile *in vivo* koşullardan alınan yaprak ve sürgün ucu eksplantları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Eksplant materyalleri, sürgün rejenerasyon çalışmaları için 1 mg l⁻¹ 6–benzylaminopurine (BAP) içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamına aktarıldıktan sonra kontaminasyon ve canlılık yüzdesi olarak iki parametrede değerlendirilmiştir. Yapılan sürgün rejenerasyonu sonunda sürgün ucu eksplantında en yüksek canlılık yüzdesini (%90–92.31) veren sterilizasyon uygulamasının %5’lik Actijen ile 5 dk muamele edilmesi olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., eksplant, yüzey sterilizasyonu, *in vitro*

ESTABLISHMENT OF EXPLANT SURFACE STERILIZATION PROTOCOL IN GRAPES (*Vitis vinifera* L.)

ABSTRACT

The aim of this study was established an effective explant surface sterilization protocol for micro propagation of *in vitro* cell and tissue culture of grape varieties (*Vitis vinifera* L.). Sultana and Uslu grape varieties were used in this study. In surface sterilization experiments, effect of different time and methods with different concentrations of sodium hypochlorite and commercial liquid floor and surface disinfectant Actijen (Natural Protection System, NPS Biyosidal) containing 100% natural water based and 0.015% active chlorine were evaluated on leaf and shoot tips explants derived from *in vivo*. After explants transferred on shoot regeneration medium containing 1 mg l⁻¹ 6–benzylaminopurine (BAP), were evaluated two parameters as percentage of contamination and viability. At the end of the shoot regeneration, the highest percentage of viability (90–92.31%) was obtained with treatment of 5% Actijen for 5 min in shoot tips explant.

Keywords: *Vitis vinifera* L., explant, surface sterilization, *in vitro*

GİRİŞ

Bitki doku kültürü çalışmalarında hedeflenen başarının sağlanması ve sağlıklı yeni doku ve bitki materyallerinin elde edilebilmesi için başlangıç materyalleri yüzey dezenfeksiyonu ile şekillenmektedir. Başlangıç eksplantlarından ortama taşınan kontaminasyonlar ile başa çıkılmadığı veya engellenemediği durumlarda, mikroorganizmalar canlı dokular ile rekabete

girerek doku ölümleri, nekrozlar ve gelişim geriliğine neden olmaktadır. Eksplant sterilizasyonu *in vitro* bitki gelişimi için en önemli başlangıç adımıdır. Özellikle *in vivo* kaynaklı eksplantlar ile başlatılan kültürlerde kontaminasyon riskinin daha yoğun olduğu görülmektedir [5, 15].

Asmalarda *in vitro* çalışmalarda farklı sterilizasyon uygulamaları denenmiş ve başarılı uygulamalar günümüze dek kullanılmaya devam etmiştir. Farklı

eksplantlarda ortaya çıkan virüs, fungus ve bakteriyel kontaminasyonlar farklı teknik ve kimyasallar kullanılarak uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Eksplant yüzey sterilizasyonunda dezenfektan çözeltilerin uygulanmasından önce kullanılan kimyasallardan en önemlisi etil alkoldür ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$). Etil alkolün eksplanta uygulanma süresi ve yüzdesi eksplant tipine, genotipe göre değişiklik göstermektedir [16]. Eksplant sterilizasyonundan önce belli süre akan çeşme suyu altında bekletme işlemi yapılmaktadır. Asmada ortalama 15 ile 60 dk zaman aralığında yapılan bu işlemin ardından steril kabinde sürgün ucu, lateral tomurcuk, aksiller tomurcuk, boğum ve petiyol vb. eksplantlara; 8–10 sn [20], 30 sn [2, 12], 1 dk [6], 2 dk [19], 3 dk [17] veya 5 dk [7] süre ile %70'lik etil alkol muamelesi yapılan çalışmalar mevcuttur. Etil alkolün güçlü bir sterilizasyon ajanı olmasının yanında fitotoksik özelliği [16] *in vitro* çalışmaların başarısını engelleyebilmektedir.

Asma *in vitro* çalışmalarında kontaminasyonun önlenmesi için 8–HQC (8–hydroxy quinnoline citrate) [18, 3], HgCl_2 [11, 9, 12, 8], NaOCl [10] ve $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ (kalsiyum hipoklorit) gibi hipoklorit tuzunun (HOCl) çeşitli formları [16] su ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Bunların içinde asmada en yaygın kullanılan yüzey dezenfektanı sodyum hipoklorit tuzudur. Hipokloritin bazı bakteri türleri için çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olduğu ifade edilmiştir [16]. Ancak başarılı bir dezenfektandan beklenen kontaminasyon riskini düşürmesinin yanında eksplant canlılık yüzdesini en yüksek oranda korumasıdır. Bu nedenle, yüzey sterilizasyonunda amaç; genotip ve kullanılan eksplant tipi ve alınma zamanına bağlı olarak doku ölümlerini en aza indiren, canlılık oranını yüksek düzeyde koruyabilen ve uygun konsantrasyonlarda etkili olan, laboratuvar ve insan sağlığına en az zararlı olan dezenfektanların kullanılmasıdır [5]. Bu çalışmanın amacı, asma (*Vitis vinifera* L.) yaprak ve sürgün ucu eksplantlarının yüzey sterilizasyonunda NaOCl ve Actijen isimli ticari dezenfektanın etil alkol kullanılmadan etkisinin incelenmesi ve ilgili protokolün oluşturulmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmada asma (*Vitis vinifera* L.) genotipleri olarak Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitlerinin yaprak ve sürgün ucu eksplantları üzerinde çalışılmıştır. Başlangıç materyalleri Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kalecik Bağcılık Araştırma İstasyonunda bulunan Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinin bir yaşlı dallarından hazırlanan çeliklerin, iklim odasında kontrollü koşullarda sürdürülmesinden elde edilmiştir. Sıcaklığın $24 \pm 1^\circ\text{C}$ olduğu koşullarda sürgünler oluşmaya başladığında sürgün ucu ve yaprak eksplantları alınmıştır.

Eksplant yüzey sterilizasyonu

In vivo koşullarda sürdürülmüş sürgün ucu ve yaprak eksplantları 2–3 damla ticari deterjan ile yıkandıktan sonra yaklaşık 3 saat boyunca akan çeşme suyu altında bırakılmıştır. Bu uygulamadan sonra yaprak eksplantları aşağıda verilen yedi farklı sterilizasyon uygulamasından U1, U2, U3, U4, U5 uygulamalarına tabii tutulmuş; sürgün uc eksplantları ise U5, U6 ve U7 uygulamalarına göre sterilize edilmiştir. Eksplantlar, U1 ve U2 uygulamalarında etil alkol muamelesinin ardından, diğer uygulamalarda ise çeşme suyundan hemen sonra steril kabine alınarak farklı konsantrasyonlarda NaOCl ve Actijen çözeltileri ile muamele gerçekleştirilmiştir. Dezenfektan uygulamaları aşağıdaki gibidir:

U1: 3 saat çeşme suyu + %70 etil alkol/30 sn + %10 NaOCl /5 dk + 3×5 dk steril saf su

U2: 3 saat çeşme suyu + %70 etil alkol/30 sn + %10 NaOCl /10 dk + 3×5 dk steril saf su

U3: 3 saat çeşme suyu + %10 NaOCl /10 dk + 3×5 dk steril saf su

U4: 3 saat çeşme suyu + %10 NaOCl /15 dk + 3×5 dk steril saf su

U5: 3 saat çeşme suyu + %5 Actijen/5 dk + 3×5 dk steril saf su

U6: 3 saat çeşme suyu + %10 Actijen/5 dk + 3×5 dk steril saf su

U7: 3 saat çeşme suyu + %10 Actijen/10 dk + 3×5 dk steril saf su

Bu yedi uygulama dışında yalnızca Sultani Çekirdeksiz çeşidinde %10'luk Actijen çözeltisi her iki eksplanta birkaç sn püskürtme şeklinde uygulanmıştır. Daha sonra 3×5 dakika

süre ile otoklavlanmış distile sudan geçirilerek *in vitro* kültür ortamları için hazır hale getirilmiştir.

Sürgün rejenerasyonu

Sürgün ucu rejenerasyonu için gerçekleştirilen sterilizasyon uygulamalarından sonra eksplantlar 32×150 mm çapındaki, 20 ml sürgün rejenerasyon ortamı içeren kültür tüplerine, her bir kültür ortamında bir eksplant olacak şekilde kültüre alınmıştır. Besin ortamı olarak 1 mg L⁻¹ BAP ilave edilmiş MS [13] mineral tuzları ve vitaminlerini içeren ortamlar kullanılmıştır. Bu ortama %3 sukroz eklenmiş ve %0.7 oranında agar ile katı hale getirilmiştir. Sürgün rejenerasyonu boyunca kültür ortamları 24±1°C'de, 16/8 saat (aydınlık/karanlık) koşulları altında 2000–2500 lüks fotoperiyoda sahip iklim kabininde inkübe edilmiştir. Denemelerde kullanılan tüm besin ortamları 5.6–5.8 pH (ort. 5.7) değerleri arasında hazırlandıktan sonra 121°C'de ve 102.97 kPa basınç altında 20 dk süresince otoklavda steril edilmiştir. Besin ortamı otoklavlandıktan sonra ilave edilen BAP ise steril kabinde 0.2 mikrometre çapında filtre şırınga kullanılarak steril hale getirilmiştir. 1 ay sonra sürgün rejenerasyonu sonucunda kontaminasyon ve sağlıklı rejenerasyon sayıları belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Asmada *in vitro* doku kültürü çalışmalarında eksplant ve genotipe bağlı sterilizasyon protokolünün oluşturulması kontaminasyonun düşürülmesi ve canlılık seviyesinin artırılması için oldukça önemlidir. Yaprak eksplantında en iyi canlılık seviyesi etil alkol uygulanmamış eksplantlarda %5 Actijenin 5 dk süre uygulamasında Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitlerinde sırasıyla %100 ve %89 olarak bulunmuştur (Çizelge 1).

Sürgün ucu eksplant yüzey sterilizasyonunda her iki çeşitte de %5 Actijen çözeltisi 5 dk süre ile %10'luk Actijen çözeltisi 2 farklı sürede (5 ve 10 dk) uygulanmıştır. Sürgün ucu eksplantındaki en düşük kontaminasyon etil alkol uygulanmamış eksplantlarda %5 Actijenin 5 dk süre uygulamasında ve her iki çeşitte de en yüksek canlılık yüzdesi yaprak eskplantında da olduğu

gibi yine aynı uygulamada (%5–5 dk) %90–92.31 oranlarında bulunmuştur (Çizelge 2). Asmada sürgün ucu eksplantı ile başlatılan *in vitro* çalışmalarda eksplant yüzey sterilizasyonu için çeşitli dezenfektanlar farklı konsantrasyon ve sürelerde kullanılmıştır [1, 4, 7, 9, 14].

Zhang ve ark. [20], sürgün ucu eksplantlarını 30 dk çeşme suyu altında beklettikten sonra %70'lik etil alkolde 8–10 sn ve ardından %0.1 HgCl₂ (cıva klorür) çözeltisinde 5–8 dk süre bekletilerek sterilizasyon işlemi yapılmış ve dört farklı besin ortamında (½ MS, MS, Gamborg B5 ve Gansu) kültüre alınmıştır. Bu ortamlarda ki canlılık yüzdesi %44.44–75.00 aralığında belirlenmiştir. Bir başka çalışmada 5 dk çeşme suyu + birkaç damla tween 20 ilave edilen %70'lik etil alkolde 5 dk bekletilen sürgün ucu eksplantları daha sonra 5, 10 ve 15 dk %10'luk NaOCl ile muamele edilmiştir. Burada en yüksek canlılık yüzdesi (%96.3) 15 dk %10 NaOCl uygulamasından elde edildiği bildirilmiştir [7]. Zhang ve ark. [20] çalışmalarında sürgün ucu eksplantında elde ettiği bulgular bizim bulgularımızdan daha düşük iken; Jaskani ve ark.'nin [7] elde ettiği canlılık yüzdesi bizim çalışmamız ile benzerlik göstermektedir.

Sürgün ucunda yapılan bir diğer eksplant sterilizasyonunda en yüksek canlılığı veren sterilizasyon yönteminin çeşme suyunun altında bekletme işlemi ve bizim çalışmamızda da olduğu gibi etil alkol uygulaması yapılmadan %0.1 HgCl₂ çözeltisinde 10 dk süre uygulamasında olduğu belirtilmiştir [9]. Babalık ve Baydar'ın [4] yaptıkları çalışmada Laslo ve ark.'nin [9] literatüründe olduğu gibi çeşme suyu ve etil alkol uygulaması olmadan sürgün ucu eksplantlarının birkaç damla %0.01'lik tween 20 içeren %10'luk NaOCl çözeltisinde 15 dk süre ile yapılan sterilizasyon ile farklı içerikteki besin ortamlarına transfer edildiği ve rejenerasyonun sağlandığı belirtilmiştir. Sürgün ucu eksplant sterilizasyonu için bizim çalışmamıza en yakın canlılık yüzdesini veren (%80) yöntem Abido ve ark.'nin [1] çalışmasında bulunmuştur. Abido ve ark. [1] eksplantları 24 saat boyunca çeşme suyu altında bekletmeden önce doku kararmasını engellemek için 5 × (150 mg l⁻¹ sitrik asit +100 mg l⁻¹ askorbik asit) çözeltisine batırdıktan sonra rutin eksplant

sterilizasyonunda olan etil alkol uygulama adımını atlamış ve birkaç damla tween 20 içeren 4 farklı konsantrasyondaki (%0.26, 0.52, 0.78 ve 1.05) NaOCl çözeltisinde 4 farklı sürede (5–10–15–20 dk) sterilizasyon uygulamasını gerçekleştirmiştir. Bu uygulamalar sonunda en yüksek canlılığın (%80) NaOCl çözeltisinde (%0.52) 15 dk bekletme uygulamasında olduğu bildirilmiştir.

%10'luk Actijen çözeltisinin her iki eksplanta püskürtülerek uygulandığı

sterilizasyon uygulaması sonucunda Sultani Çekirdeksiz çeşidinde yaprak eksplantındaki canlılık yüzdesi daha fazla (%100) bulunmuştur (Çizelge 3). Bu uygulama ile sürgün ucu eksplantındaki canlılık yüzdesinin yaprak eksplantına göre daha düşük olmasının nedeninin ise kontaminasyon sonucu değil; daha yüksek oranda doku kararmasından kaynaklandığı görülmüştür.

Çizelge 1. Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde yaprak eksplantında yüzey sterilizasyon uygulamaları sonucunda kontaminasyon ve canlılık oranları

Table 1. Contamination and viability rate in leaf explants of Sultana and Uslu cv.

Uygulama Treatment	Çeşit Genotype	Başlangıç eksplant sayısı Number of initial explant	Kontamine eksplant sayısı Number of contaminated explant	Kontaminasyon Contamination (%)	Canlı kalan eksplant sayısı Number of surviving explant	Canlılık Viability (%)
U1	Sultani Çekirdeksiz	8	–	0	1	12.5
	Uslu	8	–	0	1	12.5
U2	Sultani Çekirdeksiz	10	–	0	–	0
	Uslu	8	–	0	–	0
U3	Sultani Çekirdeksiz	9	–	0	–	0
	Uslu	9	–	0	–	0
U4	Sultani Çekirdeksiz	9	–	0	–	0
	Uslu	9	–	0	–	0
U5	Sultani Çekirdeksiz	9	–	0	9	100
	Uslu	9	1	11.11	8	88.88

Çizelge 2. Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde yüzey sterilizasyon sonucunda sürgün ucu eksplantında kontaminasyon ve canlılık oranı (%)

Table 2. Contamination and viability rate in shoot tip explants of Sultana and Uslu cv.

Uygulama Treatment	Çeşit Genotype	Başlangıç eksplant sayısı Number of initial explant	Kontamine eksplant sayısı Number of contaminated explant	Kontaminasyon Contamination (%)	Canlı kalan eksplant sayısı Number of surviving explant	Canlılık Viability (%)
U5	Sultani Çekirdeksiz	10	1	10.00	9	90.00
	Uslu	13	1	7.69	12	92.31
U6	Sultani Çekirdeksiz	40	4	10.00	34	85.00
	Uslu	28	8	28.57	20	72.43
U7	Sultani Çekirdeksiz	49	5	10.20	44	89.79
	Uslu	36	7	19.44	29	80.56

Çizelge 3. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde %10'luk Actijen çözeltisinin eksplantlara püskürtülerek uygulandığında kontaminasyon ve canlılık oranı (%)

Table 3. Contamination and viability rate in Actijen (10%) treatments in explants of Sultana cv.

Eksplant	Başlangıç eksplant sayısı Number of initial explant	Kontamine eksplant sayısı Number of contaminated explant	Kontaminasyon Contamination (%)	Canlı kalan eksplant sayısı Number of surviving explant	Canlılık Viability (%)
Yaprak	15	–	0	15	100
Sürgün ucu	18	–	0	12	66.67

SONUÇ

Asmada *in vitro* çalışmalar kapsamında kaynaklarda daha önce kullanımı hakkında bilgi bulunmayan ve bu çalışma ile ilk kez

kullanılan Actijenin, Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitlerinde iyi bir dezenfektan olduğu ortaya konmuştur. Bunun yanında, eksplant sterilizasyonunda genellikle kullanılan NaOCl dezenfektanı yerine

Actijenin kullanılması eksplanttaki doku kararması ve doku ölümlerini bazı eksplantlarda daha aza indirmişdir.

Çalışmamızda sterilizasyon aşamalarından biri olan etil alkolde bekletme uygulaması yapılmadan Actijen kullanılması ile canlılık yüzdesi arttırılmıştır. 10'luk Actijen çözeltisinin her iki eksplanta püskürtme şeklinde uygulandığında yaprak eksplantında daha yüksek canlılık görülmüştür. Yaprak eksplantının kullanıldığı *in vitro* çalışmalarda besin ortamı, çevresel faktörler yâda eksplant kaynaklı meydana gelen bir kontaminasyon durumunda eksplantın devamlılığını sağlamak için %10'luk Actijen çözeltisinin püskürtülerek uygulanması ile kontaminasyonun ortadan kaldırılabilceği ya da baskılanabileceği düşünülmektedir.

Geliştirilen bu protokol ve bulguların asmada ve diğer bitki türlerinde *in vitro* klonal çoğaltımda yeni bir sterilizasyon protokolünün uygulanmasında yararlanabilir olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abido, A.I.A., M.A.M. Aly, S.A. Hassanen and G. A. Rayan, 2013. *In vitro* Propagation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) 'Muscat of Alexandria' cv. For Conservation of Endangerment. Middle East J Sci Res, 13:328–370.
2. Akbaş, F.D, Ç. Işıkalın, Y. Kara and D. Başaran, 2004. The Comparison on the Proliferation of Lateral Buds of *Vitis vinifera* L. cv. Perle de Csaba during Different Periods of the Year in *in vitro* Conditions. International Journal of Agriculture & Biology, 6(2):328–330.
3. Alizadeh, M. and S.K. Singh, 2009. Molecular Assessment of Clonal Fidelity in Micropropagated Grape (*Vitis* spp.) Rootstock Genotypes Using RAPD and ISSR Markers. Iranian Journal of Biotechnology, 7(1):37–44.
4. Babalık, Z ve N. Göktürk Baydar, 2008. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Gövde ve Yaprak Sapı Eksplantlarından Adventif Sürgün Oluşumu Üzerine Bir Araştırma. Mediterranean Agricultural Sciences, 21(2):231–240.
5. Badoni, A. and J.S. Chauhan, 2010. *In vitro* Sterilization Protocol for Micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri Himalini'. Academia Arena, 2(4):24–27.
6. El–Agamy, S.Z., El–Mahdy, T.K. and Mohamed, A.A. 2009. *In vitro* Propagation of Some Grape Rootstocks. Acta Hort., 839:125–132.
7. Jaskani, M.J., Abbas H., Sultana R., Khan, M.M., Qasim M. and Khan, I.A. 2008. Effect of Growth Hormones on Micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette. Pakistan J. Bot., 40:105–109.
8. Krizan, B., Ondrusikova, E., Moudra, J. and M. Pidra, 2012. Effect of Genotype on Organogenesis in Six Grape Rootstocks. Acta Hort. 961:225–230.
9. Laslo, V., Zapartan, M. and S. Vicas, 2010. *In vitro* Respons of Several Cultivars of *Vitis vinifera* L. on Media with Balanced Phytohormone Ratio. Research Journal of Agricultural Science, 42(2):269–274.
10. Lazo–Jewelera, M.F., Troncoso–Rojas, R., Tiznado–Hernandez, M.E., Martinez–Tellez, M.A., Vargas–Arispuro, I., Islas–Osuna, M.A. and M. Rivera–Dominguez, 2016. Surface Disinfection Procedure and *in vitro* Regeneration of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Axillary Buds. Springer Plus, 5:453.
11. Mhatre, M., Salunkhe, C.K. and P.S. Rao, 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: Towards an Improved Protocol. Sci. Hort., 84:357–363.
12. Mukherjee, P., Husain, N., Misra, S.C. and V.S. Rao, 2010. *In vitro* Propagation of a Grape Rootstock, deGrasset (*Vitis champinii* Planch.): Effects of Medium Compositions and Plant Growth Regulators. Scientia Horticulturae, 126:13–19.
13. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures. Physiol Plant, 15(3):473–497.
14. Notsuka, K., Tsuru, T. and M. Shiraiishi, 2000. Induced Polyploid Grapes via '*in vitro*' Chromosome Doubling. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69(5): 543–551.
15. Omamor, I.B., Asemota, A.O., Eke, C.R. and E.I. Ezia, 2007. Fungal Contaminants of the Oil Palm Tissue Culture in Nigerian Institute for Oil Palm Research (NIFOR). Afr. J. Agric. Res., 2(10):534–537.

16. Oyebanji, O.B., Nweke, O., Odebunmi, O., Galadima, N.B., Idris, M.S., Nnodi, U.N., Afolabi, A.S. and G.H. Ogbadu, 2009. Simple, Effective and Economical Explant–Surface Sterilization Protocol for Cowpea, Rice and Sorghum Seeds. *African Journal of Biotechnology*, 8(20):5395–5399.
17. Roubelakis–Angelakis, K.A. and S.B. Zivanovic, 1991. A New Culture Medium for *in vitro* Rhizogenesis of Grapevine (*Vitis* spp.) Genotypes. *Hortscience*, 26(12):1551–1553.
18. Singh, S.K., Khawale, R.N. and S.P. Singh, 2004. Techniques for Rapid *in vitro* Multiplication of *Vitis vinifera* L. Cultivars. *J. Hort. Sci. Biotech.*, 19:267–272.
19. Tassoni, A., Fornalè, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, A.J., Perry, B. and N. Bagni, 2005. Jasmonates and Na-orthovanadate Promote Resveratrol Production in *Vitis vinifera* cv. Barbera Cell Cultures. *New Phytologist*, 166(3):895–905.
20. Zhang, J.L., Xu, R., Cao, Z.Y., Wang, S.M. and J. Z. Ren, 2006. Factors Affecting *in vitro* Propagation of a Chinese Wild Grape (*Vitis piasezkii* var. *pagnucii*): Shoot Production and Rhizogenesis. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 34(3):217–223.