

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ASMADA (*Vitis vinifera* L.) KROMOZOM KATLAMA UYGULAMALARI İLE
OTOPOLİPLOİDİNİN UYARILMASI VE ORGANOGENEZ**

Elif Ceren PEHLİVAN

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2020**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Elif Ceren PEHLİVAN tarafından hazırlanan “Asmada (*Vitis vinifera* L.) Kromozom Katlama Uygulamaları ile Otopoliploidinin Uyarılması ve Organogenez” adlı tez çalışması 27/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Birhan KUNTER
Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Birhan KUNTER
Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Cihat TÜRK BEN
Uludağ Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Murat AKKURT
Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYAN DAZAGH
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

27.01.2020



Elif Ceren PEHLİVAN

ÖZET

Doktora Tezi

ASMADA (*Vitis vinifera* L.) KROMOZOM KATLAMA UYGULAMALARI İLE OTOPOLİPLOİDİNİN UYARILMASI VE ORGANOGENEZ

Elif Ceren PEHLİVAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Birhan KUNTER

Çalışmada asmada (*Vitis vinifera* L.), poliploid bireylere ulaşmak için *in vitro* kromozom katlama tekniğinin çeşitlere (Sultani Çekirdeksiz ve Uslu) özgü olarak geliştirilmesi amaçlanmıştır. Orizalin mutageni, koltuk altı meristemi ve kallus eksplantına sıvı ve katı MS besin ortamında 0, 20, 30, ve 40 μM dozunda 24, 36, 48 saat süresince uygulanmıştır. Kolhisin mutageni ise tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantına sıvı MS besin ortamında 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 μM dozunda $\frac{1}{2}$ saat süre ile ve daha sonra bu uygulamanın sonucuna göre seçilen üç farklı dozda (1000, 1250, 1500 μM) 24 ve 48 saat sürede uygulanmıştır. Canlılık oranı bakımından kontrol grubuna en yakın sonuçlar her iki çeşitte koltuk altı meristemi ve kallus eksplantında 20 μM orizalin dozunun 24 saat uygulaması sonucundan elde edilmiştir. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristemi eksplantı için 30 $\mu\text{M} \times 48$ saat, kallus eksplantı için 40 $\mu\text{M} \times 24$ saat uygulamaları; Uslu çeşidinde ise koltuk altı meristemi eksplantı ve kallus eksplantı için 30 $\mu\text{M} \times 48$ saat uygulamaları LD₅₀ değeri olarak önerilmiştir. Kolhisin uygulaması yapıldıktan sonra her iki çeşitte en düşük canlılık oranı, tek boğumlu mikro çelik eksplantında en yüksek doz ve en yüksek süreden (1500 $\mu\text{M} \times 48$ saat) elde edilmiştir. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantında canlılık oranının %50'nin altına düşmediği belirlenmiştir. Sürgün ucu eksplantı için 1500 $\mu\text{M} \times 48$ saat uygulamaları LD₅₀ değeri olarak önerilmiştir. Uslu çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantı için 1250 $\mu\text{M} \times 48$ saat, sürgün ucu eksplantı için 1500 $\mu\text{M} \times 24$ saat uygulamaları LD₅₀ değeri olarak önerilmiştir. Sürgün rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu çeşitlerde farklı bulunmuştur. Sultani çeşidinin her iki eksplantında en yüksek rejenerasyon en düşük dozda kolhisin uygulanan sürgünlerden sağlanmıştır. Kolhisin uygulamasında Sultani Çekirdeksiz çeşidi Uslu çeşidine göre daha iyi rejenerasyon ve sürgün uzunluğu sergilemiştir. Orizalin ve kolhisin uygulamalarında her iki çeşitten *in vitro* sürgün çoğaltımından sonra flow sitometride yapılan çekirdek DNA analizi sonucunda diploid yapının devam ettiği belirlenmiştir.

Ocak 2020, 140 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., orizalin, kolhisin, *in vitro*, koltuk altı meristemi, kallus, tek boğumlu mikro çelik, sürgün ucu

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INDUCTION of AUTOPOLYPLOIDY and ORGANOGENESIS VIA CHROMOSOME DOUBLING TREATMENTS in GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.)

Elif Ceren PEHLIVAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Birhan KUNTER

This study aims to develop an *in vitro* chromosome doubling technique in order to induce polyploid in Sultana Seedless and Uslu varieties (*Vitis vinifera* L.). Oryzalin was applied to the axillary meristem and callus explants in liquid and solid MS nutrient medium at 0, 20, 30, and 40 μM doses for 24, 36, 48 hours. Colchicine (250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 and 2000 μM dose) was applied to single-node cuttings and shoot tip explants in liquid MS nutrient medium for 1/2 hours and then according to the results of this application, (1000, 1250, 1500 μM) 24 and 48 hours. In terms of survival rate (%), the closest results to the control group were obtained from the application of 20 μM oryzalin dose for 24 hours in both types of axillary meristem and callus explants. In the Sultana Seedless variety, 30 $\mu\text{M} \times 48$ hours for axillary meristem and 40 $\mu\text{M} \times 24$ hours for callus explant are recommended as LD₅₀ values. 30 $\mu\text{M} \times 48$ hours' application was accepted as LD₅₀ values for both axillary meristem and callus explant in Uslu variety. After the colchicine application, the lowest survival rate was obtained from the maximum dose and maximum incubation time (1500 $\mu\text{M} \times 48$ hours) in single-node microcutting explants. It was determined that the survival rate did not decrease below 50% in terms of LD₅₀ value on single-node microcutting explants in Sultana Seedless variety. 1500 $\mu\text{M} \times 48$ hours' applications for shoot tip explant were established as LD₅₀ value. In Uslu variety, 1250 $\mu\text{M} \times 48$ hours for single-node microcutting explant and 1500 $\mu\text{M} \times 24$ hours for shoot tip explant were determined as LD₅₀ value. Shoot regeneration rate and shoot length differed between the varieties. The highest regeneration was obtained from shoots that were given the lowest dose of colchicine using both explants of Sultana Seedless. In colchicine application Sultana Seedless showed higher regeneration rate and shoot length than Uslu variety. The diploid structure was found to be maintained as a result of nuclear DNA content analysis performed in flow cytometry after *in vitro* shoot propagation of both varieties using oryzalin and colchicine applications.

January 2020, 140 pages

Key Words: *Vitis vinifera* L., oryzalin, colchicine, *in vitro*, axillary meristem, callus, single node cuttings, shoot tip

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın planlanması ve gerçekleştirilmesinde bana yol gösteren ve her konuda yardımcı olan akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Birhan KUNTER (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü) başta olmak üzere değerli tez İzleme Komitesi üyelerim Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü) ve Doç. Dr. Murat AKKURT'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü) içten teşekkür ederim. Doktora öğrenimim için imkanlarını ve katkılarını sunan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Başkanlığı, öğretim elemanları ve diğer çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında benden desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Sheida ROYANDAZAGH DANESHVAR (Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü) ve Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü), istatistik analizlerimin yapılmasında bana her konuda yardımcı olan Doç. Dr. Alpay BALKAN'a (Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü) ve Araş. Gör. Dr. Yasemin ERDOĞDU'ya (Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü), desteklerinden dolayı Zir. Yük. Müh. Zeliha ÖZALP ve Zir. Yük. Müh. Onur ERGÖNÜL'e (Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu) ve Dr. Sevil CANTÜRK'e;

Laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesi aşamasında her imkândan faydalanmamı sağlayan Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Sezen ARAT başta olmak üzere Tarımsal Biyoteknoloji Bölümündeki tüm değerli hocalarıma, araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve lisansüstü öğrencilerine;

Tüm laboratuvar olanaklarını kullanmama imkan sağladığı için Prof. Dr. Metin TUNA'ya (Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi) ve Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Sitogenetik Laboratuvarında çalışan tüm lisansüstü öğrencilerine;

Doktora süresince maddi ve manevi her konuda destekleyen sevgili babam Velittin KALINKARA, annem Sunay KALINKARA'ya, en önemlisi benimle beraber doktoramın her aşamasında sonsuz emeği olan eşim Yasin PEHLİVAN ve oğlum Selim Aras PEHLİVAN'a teşekkür ederim.

Elif Ceren PEHLİVAN
Ankara, Şubat, 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

| | |
|---|------|
| ETİK | i |
| ÖZET | ii |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ | 4 |
| 2.1 Poliploidi | 4 |
| 2.2 Poliploidinin Yapay Yollarla Uyarılması | 5 |
| 2.2.1 Kimyasal mutagen kullanımı | 7 |
| 2.2.2 Kimyasal mutagenin <i>in vitro</i> poliploidide kullanımı | 10 |
| 2.3 Asmada Poliploidinin Yapay Yollarla Uyarılması | 12 |
| 2.3.1 Asmada poliploidinin uyarılması için fiziksel yöntemlerin kullanımı | 13 |
| 2.3.2 Asmada <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> poliploidide kimyasal mutagenlerin kullanımı | 16 |
| 2.4 Ploidinin Belirlenmesi | 23 |
| 2.4.1 Asmada ploidinin belirlenmesi | 24 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM | 26 |
| 3.1 Materyal | 26 |
| 3.2 Yöntem | 29 |
| 3.2.1 Kimyasal mutagen uygulanacak eksplantların seçimi | 29 |
| 3.2.2 Çalışmada kullanılan besin ortamı ve kültür koşulları | 31 |
| 3.2.3 Laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonu | 33 |
| 3.2.4 Eksplant sterilizasyonu | 33 |
| 3.2.4.1 <i>In vivo</i> sürgün ucunun yüzey sterilizasyonu | 33 |
| 3.2.4.2 <i>In vivo</i> tek boğumlu mikro çeliklerin yüzey sterilizasyonu | 34 |
| 3.2.5 Koltukaltı meristemi eksplantının geliştirilmesi | 34 |
| 3.2.6 Kallus eksplantının geliştirilmesi | 35 |
| 3.2.7 <i>In vitro</i> orizalin uygulamaları ve mutant aday bitkiciklerin elde edilmesi | 36 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.7.1 | Koltuk altı meristemi ve kallus eksplantlarında <i>in vitro</i> orizalin uygulaması | 36 |
| 3.2.7.2 | Orizalin uygulanan koltuk altı meristeminden sürgün rejenerasyonu ile mutant aday bitkiciklerin elde edilmesi..... | 38 |
| 3.2.7.3 | Orizalin uygulanan kallus eksplantından sürgün rejenerasyonu ile mutant aday bitkiciklerin elde edilmesi | 38 |
| 3.2.8 | <i>In vitro</i> kolhisin uygulamaları ve mutant aday bitkiciklerin elde edilmesi | 39 |
| 3.2.8.1 | Tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantlarında <i>in vitro</i> kolhisin uygulaması..... | 39 |
| 3.2.8.2 | Kolhisin uygulanan tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonu ile mutant aday bitkiciklerin elde edilmesi | 41 |
| 3.2.9 | <i>In vitro</i> orizalin ve kolhisin uygulanan eksplantlarda rejenerasyon ve sürgün çoğaltım ortamında mutant aday bitkiciklerde incelenen özellikler | 42 |
| 3.2.9.1 | Eksplant canlılık oranı (%) ve LD ₅₀ değeri | 42 |
| 3.2.9.2 | Sürgün rejenerasyon oranı (%)..... | 42 |
| 3.2.9.3 | Başlangıç sürgünü ve rejenerasyon sonrası sürgün uzunlukları..... | 42 |
| 3.2.9.4 | Çekirdek DNA içeriğinin belirlenmesi..... | 42 |
| 3.2.10 | Deneme deseni ve istatistik analizler..... | 44 |
| 4. | ARAŞTIRMA BULGULARI..... | 45 |
| 4.1 | Sultani Çekirdeksiz ve Uslu Üzüm Çeşitlerinde Yüzey Sterilizasyon Yöntemlerinin Eksplant Canlılık Oranı Üzerine Etkisi..... | 45 |
| 4.1.1 | Yüzey sterilizasyon yöntemlerinin sürgün ucu eksplantının canlılık oranı üzerine etkisi..... | 45 |
| 4.1.2 | Yüzey sterilizasyon yöntemlerinin tek boğumlu mikro çelik eksplantının canlılık oranı üzerine etkisi..... | 46 |
| 4.2 | Sürgün Ucu Eksplantında Canlılık ve Rejenerasyon Bulguları..... | 47 |
| 4.3 | Kallus Eksplantında Rejenerasyon Bulguları..... | 50 |
| 4.4 | Sultani Çekirdeksiz ve Uslu Üzüm Çeşitlerinde <i>in vitro</i> Orizalin Uygulaması Bulguları | 52 |
| 4.4.1 | Orizalin uygulamalarının koltuk altı meristem eksplantında canlılık oranına etkisi ve letal dozun belirlenmesi..... | 52 |
| 4.4.2 | Orizalin uygulamalarının kallus eksplantında canlılık oranına etkisi ve letal dozun belirlenmesi..... | 57 |
| 4.4.3 | Orizalin uygulamalarının koltuk altı meristemi eksplantının rejenerasyon oranına etkisi | 61 |
| 4.4.4 | Orizalin uygulamalarının kallus eksplantının rejenerasyon oranına etkisi | 66 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.5 | Sultani Çekirdeksiz ve Uslu Üzüm Çeşitlerinde <i>in vitro</i> Kolhisin Uygulamaları..... | 70 |
| 4.5.1 | Kolhisin uygulamalarının tek boğumlu mikro çelik eksplantında canlılık oranı ile başlangıç sürgün uzunluğuna etkisi ve letal dozun belirlenmesi.. | 70 |
| 4.5.2 | Kolhisin uygulamalarının sürgün ucu eksplantında canlılık oranı ile başlangıç sürgün uzunluğuna etkisi ve letal dozun belirlenmesi..... | 75 |
| 4.5.3 | Kolhisin uygulamalarının tek boğumlu mikro çelik eksplantında rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğuna etkisi..... | 81 |
| 4.5.4 | Kolhisin uygulamalarının sürgün ucu eksplantında rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğuna etkisi | 86 |
| 4.6 | Çekirdek DNA İçeriğine Ait Bulgular | 91 |
| 4.6.1 | Orizalin uygulamaları ile elde edilen <i>in vitro</i> bitkiciklerde çekirdek DNA içeriği..... | 91 |
| 4.6.2 | Kolhisin uygulamaları ile elde edilen <i>in vitro</i> bitkiciklerde çekirdek DNA içeriği..... | 93 |
| 5. | TARTIŞMA ve SONUÇ | 96 |
| | KAYNAKLAR | 114 |
| | EKLER..... | 128 |
| | EK 1 Regresyon Analizleri..... | 128 |
| | EK 2 Grafikler | 132 |
| | ÖZGEÇMİŞ..... | 139 |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|-----------------|--|
| % | Yüzde |
| °C | Santigrat |
| cm | Santimetre |
| cm ² | Santimetre kare |
| dk | Dakika |
| g | Gram |
| g/l | Gram/litre |
| Gy | Gama ışınım doz birimi |
| mg/kg | Miligram/kilogram |
| mg/l | Miligram/litre |
| ml | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| M | Molar |
| N | Normal |
| mM | Milimolar |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |
| rpm | Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı) |

Kısaltmalar

| | |
|------------------|--|
| 2,4-D | 2,4-diklorofenoksiasetik asit |
| ABA | Absizik asit |
| ANOVA | Tek yönlü varyans analizi |
| B-5 | Gamborg B-5 temel besin ortamı |
| BAP | Benzil Amino Purin |
| BBD | Bitki büyüme düzenleyicisi |
| Co ⁶⁰ | Kobalt-60 |
| CV | Varyasyon katsayısı |
| DAPI | 4ϕ,6ϕ-diamidino-2-phenylindole |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| EMS | Ethyl methanesulphonate |
| ENU | 1-ethyl-1-nitrosourea |
| Etho | Etanol |
| FAO | Food and Agriculture Organisation (Gıda ve Tarım Örgütü) |
| GA | Gibberellik asit |
| HCl | Hidroklorik asit |
| IBA | Indolbütirik asit |

| | |
|------------------|--|
| IAEA | International Atomic Energy Agency (Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu) |
| LSD | Least significant different (En az anlamlı fark testi) |
| LD ₅₀ | Letal doz |
| MNU | 1-methyl-1-nitrosourea |
| MS | Murashige ve Skoog temel besin ortamı |
| NAA | Naftalen asetik asit |
| NN | Nitsch ve Nitsch besin ortamı |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| PI | Propidium Iodide |
| TDZ | Thidizauron |
| UV | Ultraviyole |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | | |
|------------|--|----|
| Şekil 2.1 | Kolhisinin kimyasal yapısı | 8 |
| Şekil 2.2 | Kullanılan farklı kimyasal mutagenlerin hücre döngüsünün farklı noktalarında mitotik evreyi durdurduğunu gösteren şema..... | 9 |
| Şekil 2.3 | Orizalinin kimyasal yapısı | 10 |
| Şekil 3.1 | Kalecik Bağcılık Araştırma ve Uygulama İstasyonu'nda tez çalışması için çelik alınan Sultani Çekirdeksiz çeşidine ait olgun salkımlar..... | 27 |
| Şekil 3.2 | Kalecik Bağcılık Araştırma ve Uygulama İstasyonu'nda tez çalışması için çelik alınan Uslu çeşidine ait olgun salkımlar..... | 28 |
| Şekil 3.3 | Bir yaşlı dallardan hazırlanan çeliklerin sürmesi | 28 |
| Şekil 3.4 | Tez çalışmasında kullanılan eksplantlar: sürgün ucu, tek boğumlu mikro çelik, kallus eksplantı (a) ve koltuk altı meristemi eksplantı (b) | 31 |
| Şekil 3.5 | 16 saat aydınlık koşuldaki iklim odasında tez çalışması ile ilgi materyalin inkübe edilmesi (a ve b) | 32 |
| Şekil 3.6 | Orizalin stok çözeltisinin steril kabinde hazırlanışı DMSO ile orizalin kimyasalının çözdürülmesi (a) 10 mM orizalin stok çözeltisi (b) 100 mM kolhisin stok çözeltisi (c) | 32 |
| Şekil 3.7 | Steril kabinde Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantlarının NaOCl ile yüzey sterilizasyonu..... | 34 |
| Şekil 3.8 | Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde <i>in vitro</i> koşullarda elde edilen koltuk altı meristemi eksplantı | 35 |
| Şekil 3.9 | Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sürgün çoğaltma ortamında gelişen sürgünlerden alınan koltuk altı meristemi ve kallusların orizalin ilave edilmiş sıvı ve katı MS besin ortamına aktarılması (a) ve orbital çalkalayıcı üzerindeki inkübasyonu (b)..... | 36 |
| Şekil 3.10 | Koltuk altı meristemi ve kallus eksplantlarında <i>in vitro</i> orizalin uygulamasının aşamaları..... | 37 |
| Şekil 3.11 | Sürgün ucu ve tek boğumlu mikro çelik eksplantlarında <i>in vitro</i> kolhisin uygulamasının aşamaları..... | 40 |
| Şekil 3.12 | Farklı dozlarda kolhisin içeren sıvı besin ortamlarına Uslu çeşidi tek boğumlu mikro çelik eksplantlarının inkübasyonu | 41 |
| Şekil 3.13 | Sultani Çekirdeksiz çeşidinde (a) tek boğumlu mikro çelik (250 µM kolhisin dozu) ve (b) sürgün ucu (500 µM kolhisin dozu) eksplantının sürgün rejenerasyon ortamına alınması..... | 41 |
| Şekil 3.14 | Kolhisin uygulanmış (1500 µM dozunda) Sultani Çekirdeksiz çeşidi sürgün ucu eksplantından rejenere olan bitkiciklerin yapraklarından alınan örneklerde DNA içeriğinin belirlenmesi için uygulanan protokol aşamaları | 43 |

| | | |
|------------|---|----|
| Şekil 4.1 | Sultani Çekirdeksiz çeşidi (a) ve Uslu çeşidinde (b) başlangıç ortamındaki eksplantların 7 günlük görünümü..... | 48 |
| Şekil 4.2 | Sultani Çekirdeksiz çeşidi (a) ve Uslu çeşidinde (b) başlangıç ortamındaki eksplantların 10 günlük görünümü..... | 49 |
| Şekil 4.3 | Sürgün çoğaltma ortamına alınan sürgünlerin 10 gün sonraki gelişme durumu; Sultani Çekirdeksiz (a ve b), Uslu (c ve d)..... | 49 |
| Şekil 4.4 | <i>In vitro</i> sürgün rejenerasyonundan 4 hafta sonra sağlıklı sürgünlerin 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA içeren MS sürgün çoğaltım ortamlarına transfer edilmesi | 50 |
| Şekil 4.5 | Sultani Çekirdeksiz çeşidinde 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamındaki boğum arası eksplantları (a) ve boğum arası eksplantından elde edilen kalluslar (b ve c) | 51 |
| Şekil 4.6 | Uslu üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında 24 saat süresince farklı dozlarda yapılan orizalin uygulamasından sonra sürgün rejenerasyon ortamına alınmış koltuk altı meristemi ve kallus eksplantlarının 18 günlük görünümü..... | 56 |
| Şekil 4.7 | Sultani Çekirdeksiz çeşidinde 48 saat süresince sıvı besin ortamında farklı dozlarda bekletilen kallus eksplantlarının 7 günlük görünümü | 59 |
| Şekil 4.8 | Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında 36 saat süresince 20 µM (a), 30 µM (b) ve 40 µM (c) dozundaki orizalin uygulamasından sonra sürgün rejenerasyon ortamındaki sürgünlerin durumu | 62 |
| Şekil 4.9 | Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında 24 saat süre 20µM orizalin dozu uygulamasının ardından rejenere olmuş koltuk altı meristem eksplant | 63 |
| Şekil 4.10 | Sultani Çekirdeksiz çeşidinde katı besin ortamında 48 saat süre 40 µM doz orizalin uygulanmış koltuk altı meristemi eksplantlarının gelişme durumu | 64 |
| Şekil 4.11 | Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında 20 µM orizalin dozunda 48 saat inkübe edilen kallus eksplantında sürgün rejenerasyonu..... | 68 |
| Şekil 4.12 | Sultani Çekirdeksiz çeşidinde 750 ve 1500 µM dozda ½ saat süre kolhisin uygulaması ardından canlı kalan (a) ve canlılığını yitiren (b) tek boğumlu mikro çelik eksplantları..... | 72 |
| Şekil 4.13 | Uslu çeşidinde 24-48 saat kolhisin uygulaması ardından canlı kalan (a) ve canlılığını yitiren (b) sürgün ucu eksplantının 7 günlük görünümü..... | 80 |
| Şekil 4.14 | Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde ½ saat süresinde 750 ve 1250 µM kolhisin dozu uygulanmış tek boğumlu mikro çelik eksplantından elde edilen sürgün rejenerasyonu | 83 |
| Şekil 4.15 | Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde 1250 µM kolhisin dozunda kontrol, 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerindeki tek boğumlu mikro çelik eksplantından sürgün rejenerasyonu | 84 |
| Şekil 4.16 | Kontrol grubu diploid Sultani Çekirdeksiz ve standart bitkinin (Domates) G1 piki Sultani Çekirdeksiz (a) ve Uslu (b)..... | 92 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan eksplant, kimyasal mutagen ve besin ortamları | 29 |
| Çizelge 3.2 Orizalin dozları ve inkübasyon süreleri..... | 37 |
| Çizelge 3.3 Kolhisin dozları ve inkübasyon süreleri | 40 |
| Çizelge 4.1 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde yüzey sterilizasyonunun sürgün ucu eksplant canlılık oranına (%) etkisi | 46 |
| Çizelge 4.2 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde yüzey sterilizasyonunun tek boğumlu mikro çelik eksplant canlılık oranına (%) etkisi | 47 |
| Çizelge 4.3 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitlerinde sürgün ucu eksplantında <i>in vitro</i> canlılık oranı (%), eksplant başına ortalama ana sürgün ve yan sürgün uzunlukları (cm), eksplant başına ortalama yan sürgün sayısı ve eksplant başına yan sürgün oranı (%). | 48 |
| Çizelge 4.4 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitlerinde sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerin sürgün çoğaltım ortamındaki rejenerasyon oranı (%), eksplant başına ortalama ana sürgün ve yan sürgün uzunlukları (cm), eksplant başına ortalama yan sürgün sayısı ve eksplant başına yan sürgün oranı (%). | 50 |
| Çizelge 4.5 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde farklı besin ortamı ve eksplant tipine bağlı kallus oluşturma oranı (%) | 51 |
| Çizelge 4.6 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)..... | 53 |
| Çizelge 4.7 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)..... | 54 |
| Çizelge 4.8 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)..... | 55 |
| Çizelge 4.9 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)..... | 56 |
| Çizelge 4.10 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)..... | 58 |
| Çizelge 4.11 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)..... | 59 |
| Çizelge 4.12 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)..... | 60 |

| | |
|---|----|
| Çizelge 4.13 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) | 61 |
| Çizelge 4.14 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin koltuk altı meristemi eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) | 62 |
| Çizelge 4.15 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin koltuk altı meristemi eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) | 64 |
| Çizelge 4.16 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin koltuk altı meristemi eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) | 65 |
| Çizelge 4.17 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin koltuk altı meristemi eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) | 66 |
| Çizelge 4.18 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%)..... | 67 |
| Çizelge 4.19 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%)..... | 68 |
| Çizelge 4.20 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) | 69 |
| Çizelge 4.21 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) | 69 |
| Çizelge 4.22 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | 71 |
| Çizelge 4.23 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | 72 |
| Çizelge 4.24 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | 73 |
| Çizelge 4.25 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | 75 |
| Çizelge 4.26 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | 76 |

| | |
|--|----|
| Çizelge 4.27 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | 78 |
| Çizelge 4.28 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm)..... | 79 |
| Çizelge 4.29 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | 80 |
| Çizelge 4.30 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)..... | 82 |
| Çizelge 4.31 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)..... | 83 |
| Çizelge 4.32 Sıvı besin ortamında ½ saat süresince farklı dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)..... | 85 |
| Çizelge 4.33 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)..... | 86 |
| Çizelge 4.34 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)..... | 87 |
| Çizelge 4.35 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)..... | 88 |
| Çizelge 4.36 Sıvı besin ortamında ½ saat süresince farklı dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm) | 89 |
| Çizelge 4.37 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)..... | 90 |
| Çizelge 4.38 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinin koltuk altı meristemi ve kallus eksplantına sıvı ve katı besin ortamlarında uygulanan orizalinin farklı doz ve uygulama sürelerinde kolhisin uygulamasının ardından çekirdek DNA içerik ortalamaları (pg/2C) | 92 |
| Çizelge 4.39 Uslu üzüm çeşidinin koltuk altı meristemi ve kallus eksplantlarına sıvı ve katı besin ortamında uygulanan orizalinin farklı doz ve inkübasyon sürelerinde kolhisin uygulamasının ardından çekirdek DNA içerik ortalamaları (pg/2C) | 93 |

- Çizelge 4.40 Uslu ve Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşitlerinde tek boğumlu mikro çelik ve sürgünucu eksplantına ½ saat süresince farklı dozda kolhisin uygulamasının ardından çekirdek DNA içerik ortalamaları (pg/2C)95
- Çizelge 4.41 Uslu ve Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinin tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantlarına 24-48 saat süresince farklı dozda kolhisin uygulamasının ardından çekirdek DNA içerik ortalamaları (pg/2C).....95



1. GİRİŞ

Bitki ıslahında mutasyon ıslahı terimi ilk kez Freisleben ve Lein (1944) tarafından bazı bitki özelliklerinin iyileştirilmesi için indüksiyon yoluyla (uyarılmış) mutant hatların geliştirilmesinde kullanılmıştır (Shu vd. 2012). Kültür bitkilerinde kalıtsal yapıda, “mutasyon” tanımı ile ani değişimler sağlayabilecek yöntemlerin kullanılması ile kısa sürede varyasyon yaratılabilme olasılığı bulunmaktadır (Şehirli ve Özgen 2013). Bitki ıslahında kullanılan mutasyon teknikleri ümit edilen ölçülerden daha az; ancak türlere bağlı olarak değişen başarılı sonuçları ile yeni çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Bu kullanım alanı “yeşil gen transfer tekniği” olarak da ifade edilmektedir (Shu vd. 2012). IAEA veri tabanına göre 190 bitki türünde 3281 mutant çeşit kaydedilmiştir (Anonymous 2018). Mutantların büyük çoğunluğu Asya ülkelerinde küçük taneli tahıl gruplarında (1.993) geliştirilmiştir. Asya’dan sonra Avrupa ülkeleri (955) izlemekte ve daha sonra sırasıyla Kuzey Amerika (200), Afrika (72), Latin Amerika (51) ve son olarak Avustralya ve Pasifik Ülkeleri (10) takip etmektedir. Bitki ıslahında önemli bir yeri olan bitki mutasyon çalışmaları son yıllarda genomik ve moleküler tekniklerin bir parçası haline gelmiştir (Shu vd. 2012).

Mutasyon ıslahında diploid bitkilerden daha çok poliploid bitkilerin elde edilmesi yüksek beklentinin olduğu önemli bir çalışma alanıdır (Xu vd. 2014). Bitkilerde doğrudan mutant çeşit geliştirilmesinde %89 gibi yüksek bir oranda fiziksel bir mutagen olan radyasyon tekniğinin kullanıldığı görülmektedir. Bunların içinde de gamma ışınının kullanıldığı çalışma sayısı X-ışınlarının kullanıldığı mutasyon çalışmalarından yaklaşık 3 kat daha fazladır. Kimyasal mutagen çalışmalarının sayısı ise radyasyon tekniklerinin kullanıldığı mutasyon ıslahı çalışmalarına göre oldukça düşüktür (Maluszynski vd. 2000). Gama ışınları yardımıyla mutasyon ıslahı, 1960’lı yıllarda dünyada hızla yayılmış ve özellikle tohumla çoğalan türlerde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Maluszynski vd. 2000, Ahloowalia vd. 2004). Elde edilen gelişmelerin %75’i tarla bitkilerine, %25’i ise tıbbi bitkiler ve süs bitkilerine aittir. Yapay yollarla uyarılan poliploidler, ıslah çalışmaları için germplazm kaynağı olmakta ve ekonomik öneme sahip yeni çeşitlerin elde edilmesine doğrudan hizmet etmektedir. Doğada kendiliğinden var olan ya da ıslah yolu ile yapay olarak gerçekleştirilen poliploidi; daha

iri meyveler, daha koyu renkli yapraklar, daha büyük çiçekler, geç çiçeklenme, çekirdek sayısında azalma, verim artışı, biyokimyasal değişimler sonrasında yüksek sekonder metabolit üretimi ve abiyotik stres koşullarına yüksek dayanım gibi önemli tarımsal özelliklerin elde edilmesiyle sonuçlanmaktadır (Dhawan ve Lavania 1996, Gao vd. 1996, Predieri 2001, Roy vd. 2001, Shao vd. 2003, Stanys vd. 2006, Urwin vd. 2007, Fong 2008, Glowacka vd. 2010, Prado vd. 2010, Guo vd. 2011, Acanda vd. 2013, Chang vd. 2014, Sinski vd. 2014). Bu tarımsal özelliklerin yanında yapay poliploidler, ana veya tozlayıcı ebeveyn olarak kullanılarak, diploid çeşitler ile melezleme yoluyla 3x (triploid) çekirdeksiz bireylerin geliştirilmesinde önemli genetik materyallerdir (Guo vd. 2004, Chen vd. 2008, Xu vd. 2014).

Ülkemiz asma gen kaynaklarının geliştirilmesi, değişen koşullara uygun yeni genotiplerin ıslah programlarında yer alması ve geleceğe dönük ıslah hedefleri kapsamında poliploid genotiplerin geliştirilmesi; önem verilmesi gereken bir ıslah alanı olarak değerlendirilmelidir.

Poliploidi ıslahı ile özellikle tane iriliğinde artış ve farklılık sağlanması amaçlanan asma genotipleri için uygun, pratik ve ekonomik *in vitro* kromozom katlama tekniklerinin geliştirilmesi beklenmektedir. Asmalarda kromozom sayısının yüksek olması ve göz sisteminin kompleks yapısı, sitogenetik yapının tamir mekanizmalarının devreye girmesinden çok önce karşılaşılan yapısal sorunlardır. Asmalarda uyarılmış mutasyon etkilerinin şansa bırakılmadan geliştirilebilmesi için mutagen tipi, uygulama biçimi, doz, seleksiyon kriterleri vb. alanlarda çalışmalar yapılmasını gerektirmektedir.

Bu tez çalışmasında ülkemiz asma gen kaynaklarında eksikliği söz konusu olan poliploid asma genotiplerinin geliştirilmesinde doğrudan bir meristem bölgesinin hedef alınarak *in vitro* kromozom katlama için canlı ve çoğaltılabilir nitelikte bireylerin geliştirilmesine uygun protokollerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç kapsamında, Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitleri üzerinde iki farklı uygulama yapılmıştır. İlk uygulamada kallus ve koltuk altı meristemi (aksiller tomurcuk) olmak üzere iki farklı eksplanta, iki uygulama şeklinde (sıvı ve katı besin ortamı) orizalin uygulanmıştır.

İkinci uygulamada ise sürgün ucu ve tek boğumlu mikro çelik olmak üzere yine iki farklı eksplanta sıvı besin ortamında uygulanan kolhisinin ardından geliştirilen sürgünlerin canlılık oranı, rejenerasyon oranı, LD₅₀ değeri belirlenmiştir. Tez çalışmasından elde edilen bireylerde ve gelecek çalışmalarda otopoliploid bireylerin hızlı tanımlanmasında kullanılacak çekirdek DNA miktarlarının belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Poliploidi

Organizmalardaki kromozom sayılarında meydana gelen değişimlere “ploidi”, somatik hücrelerde ikiden fazla kromozom takımının bulunmasına ise “poliploidi” denmektedir (Şehirli ve Özgen 2013). Poliploidler her bir hücre çekirdeğinde bulunan diploid kromozomların sayısını aşan organizmalar olarak tanımlanmakta (Soltis vd. 2004) ve orijinlerine göre “otopoliploid” ve “allopoliploid” olarak sınıflandırılmaktadır. “Otopoliploidler”, bir diploid türün homolog kromozomlarının iki veya daha fazla çiftinin katlanması ile meydana gelmektedir (Dhooghe vd. 2011). Otopoliploidlerde diploid akrabalarına göre eklenen yeni ya da özel bir genetik bilgi bulunmamasına rağmen daha iri, büyük, fazla gibi tanımlamalarla ifade edilebilen özelliklerin, hücre sayısının fazla oluşundan ziyade hücre boyutunun daha büyük olmasından kaynaklandığı kabul edilmektedir. Islah programlarında otopoliploidinin kullanılması ile ploidin artırılma hedefi genelde vegetatif organları kullanılarak vegetatif olarak çoğaltılabilen kültür çeşitlerinde (Paterson 2005) ve özellikle süs bitkileri ıslahında kullanılmıştır (Dhawan ve Lavania 1996, Blasco vd. 2015). Otopoliploidler, katlanma sonrasında sahip olduğu homolog kromozom sayısına göre triploid (3x), tetraploid (4x), hekzaploid (5x), oktoploid (6x) vb. olarak adlandırılır (Yang vd. 2011). Günümüzde yetiştiriciliği yapılan başlıca poliploid bitkilere örnek olarak triploid muz, karpuz, elma; tetraploid pamuk, patates, tütün, hekzaploid buğday, yulaf ve krizantem; oktoploid hercai menekşe, şeker kamışı ve çilek gibi türler örnek verilebilir (Sattler vd. 2016).

“Allopoliploidi” ise uyumsuzluk gösteren türler arasındaki melezlerde meydana gelen poliploid yapılardır. Poliploidinin bu şekilde kromozomlar iki farklı genomdan oluşmaktadır (Klug vd. 2009, Dhooghe vd. 2011). Allopoliploid bireylerin evrimsel sürecin gelişiminde otopoliploid bireylere göre daha fazla etkilendiği ve doğada var olan çoğu poliploid bitki türünün de melez kökenli olduğu ifade edilmektedir (Cimo, 2017). Allopoliploidiye örnek olarak; çavdarın sertlik özelliği ile buğday tanesinin kalite özelliğinin birleştirildiği türler arası melez olan tritikale verilebilir (Acquaah 2007, Chen 2010).

Otopoliploidi doğal (spontan) ve uyarılmış (yapay) olarak iki farklı şekilde ortaya çıkmaktadır. Doğal genom katlanması sonucunda oluşan doğal poliploidinin meydana gelmesinde ilk olarak kromozomlar kopyalanır (replike olur); ancak hücre bu esnada bölünmez ve tekrar interfaza girer. Bu sayede kromozom sayısı ikiye katlanır (Klug vd. 2009). Doğal poliploid bireyler, iki farklı şekilde meydana gelmektedir. Birincisinde farklı ploidi seviyelerine sahip türler arasında melezleme yoluyla, ikincisinde ise; tür içi ya da türler arası gamet ve indirgenmemiş gametlerin birleşimi yoluyla oluşmaktadır. (Sattler vd. 2016, Guo vd. 2016). Yapay poliploid bireyler ise melezleme yoluyla ya da melezleme olmaksızın farklı mutagenler tarafından uyarılmış yapay genom katlanmaları sonucunda ortaya çıkmaktadır (Cimo 2017).

Hem doğal hem de yapay poliploidinin genetik varyasyon yaratarak türlerin canlılık ve devamlılığında bir artış sağladığı belirtilmiştir (Jain 2010, Hollister 2014, Godfree vd. 2017). Poliploidlerin yaklaşık %15'inin angiosperm türlerinde meydana geldiği tahmin edilmekte (Wood vd. 2009) ve bu da doğal yolla yeni bir poliploid birey oluşma şansının düşük olduğunu göstermektedir (Eng ve Ho 2019). Söz konusu araştırmacılara göre, yapay poliploidizasyon farklı kimyasal mutagenlerle birlikte hızlı ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilebilmekte ve bitki mutasyon ıslahında yapay poliploidizasyon artarak kullanılmaktadır.

2.2 Poliploidinin Yapay Yollarla Uyarılması

Mutasyon ıslahında çeşitli kimyasal mutagen (antimitotik ajan) ve fiziksel mutagenlerle yapay poliploidizasyon sağlanmakta ve sentetik kromozom katlama gerçekleştirilebilmektedir. Yapay poliploidinin uyarılmasında kimyasal ya da fiziksel mutagen uygulanmalarında başarıyı etkileyen birçok faktör vardır. Mutagen seçimi yapılırken uygulama sonrası bitki materyalinden yeni bir bitkinin rejenere olabilmesi en önemli kriterdir. Rejenerasyon başarısını ise bitki türü, ploidi seviyesi, gelişim aşaması ve fizyolojik koşullarına uygun mutagen ve dozunun belirlenmesi gibi faktörler etkilemektedir (Suprasanna vd. 2011).

Yapay poliploidi *in vivo* ve *in vitro* üretimlerde kullanılmaktadır. Literatürlere bakıldığında ploidin uyarılmasında *in vitro*da kullanılan mutagenlerin *in vivo*da kullanılan mutagenlerden farklı olmadığı görülmüştür. *In vivo* koşullarda poliploid bitkilere ulaşma şansının düşük (Dhooghe vd. 2011) olması ve *in vitro* tekniklerin gelişmesi ile birlikte *ex vitro* (Eng ve Ho 2019) ve *in vivo*da yapılan çalışmaların yerini *in vitro* poliploidizasyon çalışmalarının aldığı görülmektedir. Aktif olarak bölünen hücreler, bölünmeyen hücrelere göre mutagen uygulamasına daha duyarlı oldukları için; *in vitro* mutagenizasyon çalışmalarında belirlenen dozlar genellikle *in vivo* çalışmalardaki dozlara göre daha düşüktür. Bu dozlar belirlenirken doku ya da hücrenin belirli bir mutagene duyarlılığı ve canlılık oranına bakılmaktadır. Mutagen ile muamele edilen doku ya da hücrenin yaklaşık %50'sini öldüren doz (letal doz) LD₅₀ olarak adlandırılır (Suprasanna vd. 2011). LD₅₀ değerinin yanında bir diğer önemli faktör eksplant seçimidir. Farklı çalışmalarda radyasyon uygulaması yapılmış aksiller tomurcuk eksplantından gelişen sürgünlerde mutasyona uğrama olasılığının daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Suprasanna vd. 2011). Kimyasal ya da fiziksel mutagenin aynı bitki türünde hatta aynı çeşitteki bitkinin farklı doku ya da organına uygulanması farklı sonuçlar doğurmaktadır (Sinski vd. 2014). Mutagenin hazırlanma şekli, uygulanma şekli, uygulama süresinin uzunluğu, doz seviyesi eksplant canlılığını, rejenerasyonunu ve ploidi seviyesini değiştiren faktörler arasındadır.

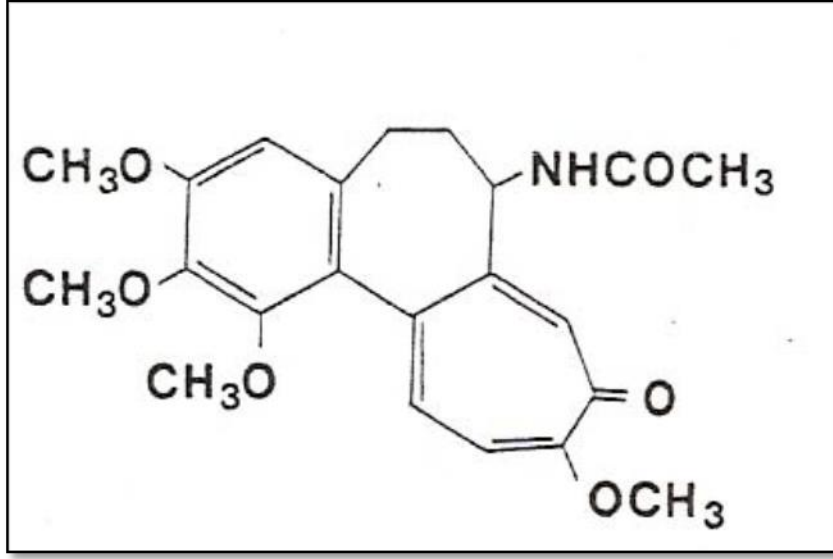
Suprasanna vd. (2011) tarafından bildirildiğine göre; 1934 yılında Altenberg tarafından ultraviyole ışınları (UV) ile yapılan çalışmaların ardından 1950'lerde gamma ışın çeşidi Co⁶⁰ (kobalt-60) ile yapılan mutagenizasyon çalışmaları yaygın hale gelmiştir. 1960 ve 1970'li yıllarda ise çeşitli nötron formları ve 90'lı yıllardan itibaren iyon ışınlamaları ile yapılan çalışmalar yeni fiziksel mutagenler olarak ortaya çıkmıştır. Şimdiye dek kullanılan en yaygın mutagenler γ -ışınları, X-ışınları gibi fiziksel mutagenlerdir. Kimyasal mutagenlerin fiziksel mutagenlere göre başarı şansının daha düşük olması ve daha sınırlı sayıda kullanılmasının nedeni; bileşiğin mutagen uygulanan dokulara daha az miktarda nüfuz etmesinin vegetatif organlar için nispeten daha zor olmasıdır (Suprasanna vd. 2011).

2.2.1 Kimyasal mutagen kullanımı

Yapay poliploidizasyonda kromozom sayılarının katlanmasına ait ilk kimyasal mutagen (antimitotik ajan) uygulamaları 1937 yılında Blankeslee'nin kolhisin ile yaptığı çalışmalarla *in vivo* koşullarda başlatılmıştır. 1930 ile 1960'lı yıllarda poliploidizasyon çalışmaları *ex vitro* koşullarda eksplant olarak genellikle tohum kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Eng ve Ho 2019). Bu metot ekonomik öneme sahip patates, yonca, gül, zambak gibi birçok türün ıslah programlarında etkin bir şekilde kullanılmıştır (Sattler vd. 2016).

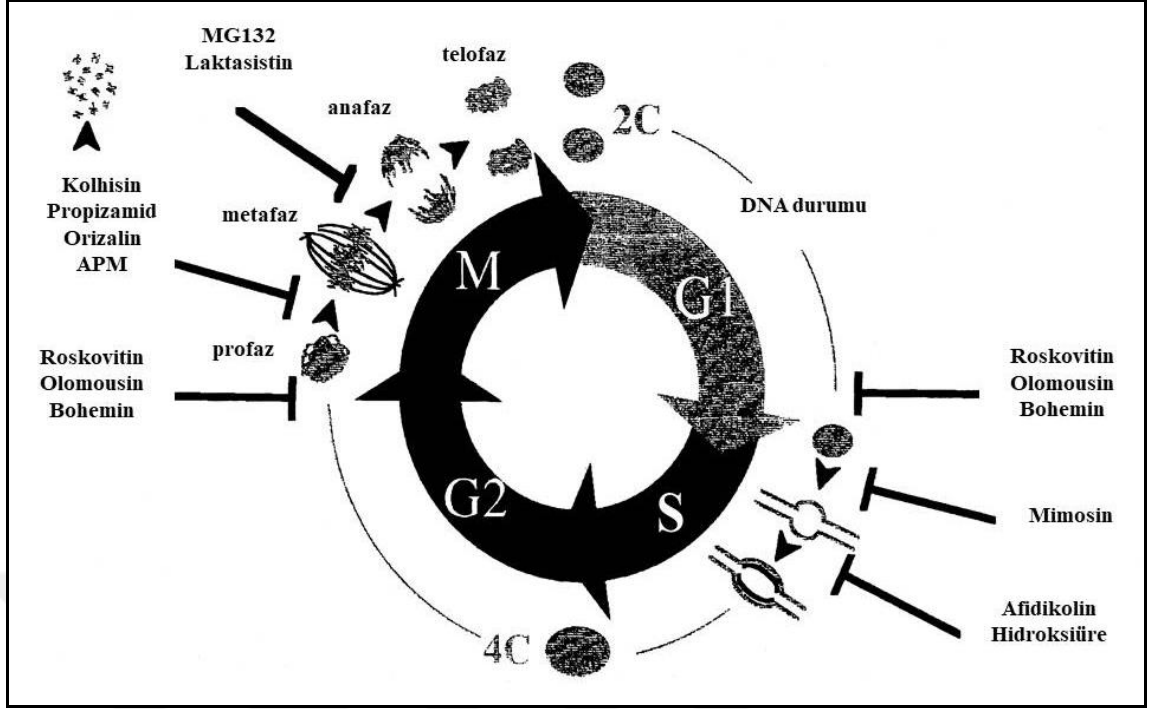
Kolhisin, güz çiğdemini (*Colchicum autumnale* L.) köklerinden elde edilen alkaloid yapıda kuvvetli bir zehir olup; renksiz bir maddedir. Alkol, kloroform veya soğuk suda eriyebilen; fakat sıcak su veya eterde erimeyen bir maddedir (Eigsti ve Dustin 1955, Genç ve Yağbasanlar 1994, Köksal 1999). Kimyasal formülü $C_{22}H_{25}O_6$ olarak gösterilir (Şekil 2.1). Kolhisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller. Bu sayede replikasyona uğramış kromozomların anafaz safhasında kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar (Köksal 1999, Klug vd. 2009).

Nadler (2009) tarafından bildirildiğine göre; tıbbi açıdan kolhisinin ürik asit kristallerinin neden olduğu iltihaplanmayı engellediği ve insanlardaki akut gut hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. 0.5 ila 0.8 mg / kg kolhisin dozlarının yüksek derecede toksik olduğu ve 0.8 mg / kg'dan daha yüksek dozların tipik olarak öldürücü olduğu bildirilmiştir (Slobodnick vd. 2015).



Şekil 2.1 Kolhisinin kimyasal yapısı (Fong 2008)

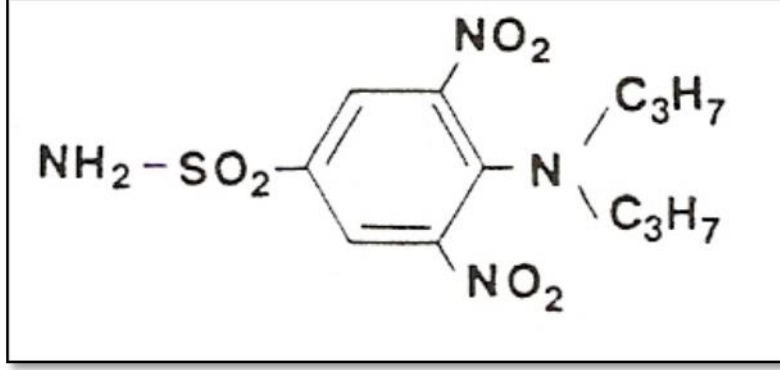
Kromozom katlaması için geçmişte ve günümüzde en fazla kullanılan madde olan kolhisinin, insan sağlığı için toksik bir mutagen olması ve bu özelliğine bağlı olarak DNA üzerine mutasyon meydana getirebilme olasılığının bulunması (Van Tuyl vd. 1992, Carvalho vd. 2005, Rego vd. 2011) kolhisinden farklı antimitotik ajanların etkinliklerinin araştırılmasına neden olmuştur. Bu konuda son yıllarda dinitroanilin ve benzamid sınıfında yer alan herbisitler (trifluralin, orizalin ve pronamid), kloral hidrat, sülfanilamid, heksaklorosikloheksan, asenaften, alkaloidler (kafein) ve benzofuranlar (grisefulvin) gibi yeni bileşikler (Şekil 2.2); bitki tübülünleri ile daha yüksek uyuma gösteren buna karşılık kullanıcılar için daha az toksik olma özellikleriyle kromozom katlama çalışmalarına entegre edilmek amacıyla denenmektedir (Haüntzschel ve Weber 2010, Ekbiç ve Tangolar 2016). Antimitotik ajan bileşiklerin sayısı oldukça fazla olmasına rağmen sadece çok küçük bir kısmı bitkiler üzerinde kullanılmıştır. Bu çalışmalarda alkali ajan grubunun daha fazla ve etkin kullanıldığı görülmüştür. IAEA'nın (Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu) veri tabanında da belirtildiği gibi yeni mutant çeşitlerin neredeyse %80'i alkali ajanların kullanıldığı kimyasal mutagenез yolu ile elde edilmiştir. Bu alkali ajanların içinde en önemli 3 tanesi: EMS (ethyl methane sulphonate), MNU (1-methyl-1-nitrosourea) ve ENU (1-ethyl-1-nitrosourea) olarak belirtilmiştir (Şekil 2.2) (Shu vd. 2012).



Şekil 2.2 Kullanılan farklı kimyasal mutagenlerin hücre döngüsünün farklı noktalarında mitotik evreyi durdurduğunu gösteren şema (Planchais vd. 2000'den değiştirilerek alınmıştır.)

Surflan herbisidinin aktif bileşiği olan (Takamura vd. 2002) orizalin (3,5-dinitro-N4, N4-dipropylsulfanilamide) (Şekil 2.3), tarımda herbisit olarak kullanımının yanında bitkilerde de poliploidinin uyarılmasında kullanılmaktadır. Orizalinin insan sağlığına olan zararının araştırıldığı bir çalışmada ratlar üzerinde oral yolla alınabilecek letal dozun (%50) 5000 mg/kg'dan daha büyük olduğunun belirlenmesi ile kolhisinden daha az toksik olduğu bildirilmiştir. Orizalin bileşiğinin toksisite sınıflandırmasında pratikte toksik olarak bulunmadığı; fakat ambalajlarında "uyarı" etiketinin mutlaka bulunması gerektiği belirtilmiştir (Nadler 2009). Kullanılan kimyasal mutagenin bitki hücrelerine iyi bir şekilde nüfuz etmesi oldukça önemlidir. Bitkilerdeki tohum kabuğu, kalınlaşmış kütikül tabakası gibi bitkiyi dış etmenlerden korumak için gelişmiş fiziksel bariyerleri aşması için DMSO (Dimetil sülfoksit), NaOH (Sodyum hidroksit) gibi bu kimyasal mutagenlere yardımcı bazı kimyasallar kullanılmaktadır. DMSO'nun bu özelliğine karşın bitki dokularına verdiği zararlar nedeniyle; kolhisin kullanmak yerine mutagen olarak NaOH veya etanolde (C_2H_5OH) çözünebilme avantajına sahip olan orizalinin (Hamill vd. 1992) kullanımı artış göstermiştir. Orizalin gibi daha düşük dozlarda kullanılan mutagenlerin bitkiden uzaklaştırılması da nispeten daha kolay olduğu için istenmeyen mitotik mutasyonları en aza indirmekte ve toksik etkisinin de bu sayede

daha düşük olduğu söylenebilmektedir (Planchais vd. 2000). Orizalin son yıllardaki çalışmalarda kolhisinin yerini bu nedenlerle almaktadır.



Şekil 2.3 Orizalinin kimyasal yapısı (Fong 2008)

2.2.2 Kimyasal mutagenin *in vitro* poliploidide kullanımı

Birçok türde kolhisin ve orizalinin kromozom katlama uygulamalarındaki etkisi çeşitli araştırmalarda karşılaştırılmıştır. Vainola vd. (2000)'nin yaptıkları çalışmada 3 farklı *Rhododendron* kültür çeşidinde mikro çelik eksplantına 24 ve 48 saat süre boyunca sıvı besin ortamında 0.625 ve 1.25 mM dozunda kolhisin ile 30 ve 150 µM dozunda orizalin kimyasalı eklenmiştir. Son olarak her iki çözeltiye %2 DMSO ilavesi yapılmıştır. Eksplant canlılığında kolhisinin orizalin çözeltisinden daha iyi sonuç verdiği ve bununla beraber yüksek dozların öldürücü olduğu belirtilmiştir. Orizalinin uygulama süresinin canlılığı etkilemediği, poliploidiyi uyarmada kolhisinden daha iyi bir mutagen olduğu belirtilmiştir. Çalışmada daha çok miksploidiye ulaşılmıştır. Tetraploid bireylerinde, en fazla oranda (%18.2) 24 saatte %0.005 orizalin ile muamele görmüş bitkilerden elde edildiği bildirilmiştir. Ploidi seviyesi flow sitometri cihazı ile analiz edilmiştir. Uygulama yapılan eksplantların daha yavaş gelişim gösterdiği de eklenmiştir.

Takamura vd. (2002), *in vitro*da zambaklar için en etkili orizalin dozunun araştırıldığı bu çalışmada *in vitro* kromozom katlama için en uygun doz %0.0075 olduğu bildirilmiştir. Düşük dozların (%0.001) bile ploidiyi etkilediği; bunun yanında %0.005 gibi daha yüksek dozların ise fitotoksisite yarattığı fakat yine de yüksek oranda

poliploid bitki elde edilebildiği rapor edilmiştir. Yüksek dozlarda eksplanttan soğan oluşumu gerçekleşmemiştir. Optimum orizalin dozu %0.003 olarak belirlenmiştir.

Thao vd. (2003), $2n=28$ kromozom sayısına sahip *Alocasia* bitkisinin *in vitro*da sürgün ucu eksplantına kolhisin ve orizalin uygulanmıştır. Her iki mutagen de %1 DMSO'da çözdürülmüştür. 24, 48 ve 72 saat sürelerinde yapılan uygulamalarda %0.01, 0.05 ve 0.1 dozlarında kolhisin, %0.005, %0.01 ve %0.05 dozlarında orizalin kullanılmıştır. Her iki uygulamanın ardından en uygun mutagenin orizalin ve en uygun protokolün ise 24 saatte %0.01 dozu olduğu belirtilmiştir.

Carvalho vd. (2005), çalışmalarında annatto bitkisinin *in vitro*da yetişmiş fidelerinden aldıkları hipokotil ve kotiledon boğum eksplantlarını poliploidi oluşturmak için kullanmışlardır. Poliploidi için 100 mg/l myo-inositol + 2.28 veya 4.56 μ M ZEA + 0.3 μ M IAA (yalnızca hipokotil için) içeren katı MS (Murashige ve Skoog 1962) besin ortamını kullanmışlardır. Bu ortama kolhisin (0, 25, 250 ve 1250 μ M) ve orizalin (0, 5, 15 ve 30 μ M) mutagenleri eklenmiştir. Her iki mutagenin olduğu rejenerasyon ortamlarında 15 ve 30 gün süre ile muamele edilmiştir. En iyi rejenerasyon 15 μ M orizalin dozunda 15 gün muamelesinden elde edilmiş kotiledon boğumlarda görülmüştür. Flow sitometri ile ploidi seviyeleri belirlenmiş ve karakteristik değerlendirmelerin ise stoma büyüklüğü belirlenerek yapıldığı bildirilmiştir.

Fong (2008) *Nepenthes gracilis*'de orizalin ve kolhisin dozları ile yaptıkları uygulamalarla DNA içerik miktarlarını karşılaştırdığı çalışmada *in vitro*da boğum eksplantını kullanmıştır. Kolhisini 0, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mM dozlarında ve orizalini ise 0, 20, 40, 60 ve 80 μ M dozlarında 24, 48, 72 ve 96 saat sürelerde uygulamıştır. Görülen en önemli etkinin sürgünlerde tomurcuk gelişiminin gecikmesi ve morfolojik olarak anormal vegetatif gelişim görülmesi olduğunu bildirilmiştir. Çekirdek DNA analizi flow sitometri yöntemi ile yapılmış ve tetraploidinin kolhisinin ile 72 saat muamelesinde 10 mM dozunda ve orizalin ile 24 saat muamelesindeki 40 μ M dozunda geliştiği ve bu uygulamalar sonucunda sırasıyla %1.39 ve 0.70 gibi düşük bir tetraploidi oluşturduğu rapor edilmiştir.

Rego vd. (2011)'nin poliploidi çalışmalarında *Passiflora edulis* Sims'in *in vitro* hipokotil eksplantlarına 0, 25, 250 ve 1250 µM dozlarında kolhisin ve 0, 5, 15 ve 30 µM orizalin MS besin ortamına eklenerek uygulanmıştır. 250 ve 1250 µM dozlarında kolhisin hipokotil eksplantlarında nekroz oluşumu ve ölüme neden olmuştur. Orizalin de kolhisinde olduğu gibi yüksek dozlar olumsuz etki göstermiştir. 25 µM kolhisin ve 15 µM orizalinin ototetraploidiyi uyardığı belirtilmiştir.

2.3 Asmada Poliploidinin Yapay Yollarla Uyarılması

Bugün Dünya bağcılığında doğrudan veya potansiyel anlamda ekonomik değer kazanmış asma çeşitleri, *Vitis* cinsi içerisinde yer alan birkaç türe bağlı olarak geliştirilmiştir. Üzüm çeşitleri kavramında *Vitis vinifera* L. tartışmasız hakim tür olmakla birlikte, *Vitis labrusca* türünün tüketilebilir nitelikteki çeşitlerinin ıslah süreçlerine katılması ile zenginleşmiştir. Diğer taraftan, Avrupa bağcılığının tek türü olan *Vitis vinifera* L., uzak doğu bağcılığı ile yeniden tanışmaktadır. Özellikle Japonya ve Çin Halk Cumhuriyeti bağcılığında ploidi ıslahına dayanan tetraploid üzüm çeşitlerinin ıslahının önemli yeri bulunmaktadır (Chen vd. 2014, Mitani vd. 2014). Asma tür ve çeşitlerinin uzun yıllar vegetatif çoğaltıma uygun populasyonlar oluşu, bu populasyonlar içerisinde yüksek mutasyon birikiminin bulunduğunu göstermektedir (Kunter ve Değirmenci Karataş 2011). Ülkemiz bağcılığı için de poliploid bireyler elde edilmesi hedefi, gen kaynaklarımızın geliştirilmesi bakımından farklı kazanımlar sağlayacak bir alandır.

Üzüm çeşitlerinde poliploidi ilk olarak Kaliforniya'da 1914 yılında bildirilmiştir (Olmo 1952) *V. aestivalis*, *V. vinifera* ve *V. rotundifolia* türlerinde kolhisin uygulamaları ile tetraploid bireylerin geliştirilmesine çalışılmış ve poliploid üzümlerin sitogenetik yapıları incelenmiştir (Luo vd. 1989, Zhang vd. 1989). Resmi olarak ilk mutant üzüm çeşidi "Fikreti", 1986 yılında tescil edilmiştir. Bu çeşit tohumlara 50 Gy gama ışını ve %0.1 kolhisin uygulanarak elde edilmiştir (Anonymous 2018). İlk poliploid üzüm kavramından bugüne 4x "Kyoho", 3x "King Dela" ve 3x "Mirei" gibi ekonomik değer

kazanmış poliploid üzüm çeşitleri geliştirilebilmiştir (Bessho vd. 2000, Yun vd. 2008). Triploid üzümlerin çekirdeksizlik özellikleri büyük taneli ve çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin elde edilmesinde yeni bir yol açmıştır (Guo vd. 2004). Genel olarak poliploid üzümlerde tane iriliği ve çekirdeksizlik ile omca veriminin artırılması ıslah hedeflerindeki olumlu değişimlerdir. Bu nedenle poliploid bireyler doğrudan ticari çeşit olmalarının yanı sıra ıslah çalışmalarının ebeveyni olarak da önem taşımaktadır (Xu vd. 2014).

Tetraploid sofralık üzüm çeşitlerinin ıslahı ve yetiştiriciliğinin önem kazandığı Japonya'da melezlenme sonucu oluşan "Kyoho" ve "Pione" çeşitleri (*V. vinifera* x *V. labrusca*) toplam bağ alanlarının %40'ını kaplamaktadır (Motosugi vd. 2002b). Mevcut tetraploid çeşitlerin özelliklerinin geliştirilmesini hedef alan çalışmalarla "Aki Queen" (Kyoho x Kyoho), "Fujiminori" (Ikawa 682 x Pione) gibi yeni tetraploid çeşitlerin ıslahı sürdürülmüştür (Park vd. 2002). Tetraploid üzüm ıslahına yönelik çalışmaların Japonya, Çin ve ABD'de yoğunlaştığı bilinmektedir (Luo vd. 1995, Kuksova vd. 1997; Notsuka vd. 2000, Motosugi ve Motioko 2001, Motosugi vd. 2002b, Aihong vd. 2005, Yang vd. 2006, Prado vd. 2010, Guo vd. 2011, Acanda vd. 2013, Chen vd. 2014, Chang vd. 2014, Mitani vd. 2014).

2.3.1 Asmada poliploidinin uyarılması için fiziksel yöntemlerin kullanımı

Asmalarda *in vivoda* farklı eksplantların gama radyasyonundan (Co^{60}) etkilenme düzeyi üzerine yapılan çalışmalarda, elde edilen başarının çeşitlere göre değiştiği belirlenmiştir. Poliploid bitki meydana getirmek için gama ışınımı radyasyonu kullanılan çalışmalarda farklı aralıklarda birden fazla doz denenmiş ve çalışmaların sonuçlarına göre en etkili ve öldürücü gama radyasyonu uygulama dozlarının çeşide bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (Rosati vd. 1990, Lima da Silva vd. 2000, Çoban vd. 2002, Marasalı vd. 2003).

Önceki çalışmalarda gama ışınımı *in vivoda* tohum (Bozhinova-Boneva ve Kondarev 1973, Costacurta vd. 1978), polen (Bozhirova-Boneva 1975), dinlenme halindeki göz (Fideghelli 1990), çelik (Ponnuswami vd. 1991) ve *in vitro*dan elde edilen tek gözlü

çeliklere (Lima da Silva ve Doazan 1995, Khawale vd. 2006) uygulanmıştır. Yapılmış olan bu çalışmalarda gama ışınımı uygulanan asma çeşitleri ve anaç materyallerinde morfolojik özellikler bakımından bazı çeşitlerin dayanıklılıkgösterdiği; ancak anaçların çok az bir kısmının canlı kaldığı (Bozhirova-Boneva ve Kondarev 1973) belirtilmiştir. Vegetatif gelişim açısından incelendiğinde sürgün gelişiminin sağlanamaması, yaprakta klorofil noksanlığı, yaprak şekil, büyüklüğü ve tüylülüğünde değişim, meyvenin erken olgunlaşması ve meyve aromasında değişimlerin meydana geldiği (Einset ve Pratt 1975, Fideghelli, 1990) vurgulanmıştır. Bazı gama ışınımı dozlarının polen çimlenmesini teşvik ettiği (Bozhinova-Boneva 1975), tohumlarda çimlenme düzeyini arttırdığı (Costacurta vd. 1978), tanede irilik ve daha kalın tane kabuğu ile birlikte “*Botrytis cinerea*” ya karşı dayanım (Botta vd. 1988) ve boğum arası uzunluğunda kısalma (Fideghelli, 1990) gibi değişimler sağladığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir.

Mutasyon ıslahına yönelik olarak *in vivo* gamma radyasyonu ile farklılık elde etmeyi planlayan çalışmalardan biri olan Çoban (1998) yaptığı çalışmasında bulgularını morfolojik değişimlere dayandırmıştır.

Değirmenci Karataş ve Kunter (2012), gamma radyasyonu uygulamasından elde edilen Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sitolojik çalışmalar sonucunda kromozom sayımı yaparak diploid ve mikroploid yapılar belirlemişlerdir. Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sadece 30 Gy gamma radyasyonu uygulanmış 34 no’lu bireyde $2n=2x=38$ kromozom sayısından fazla kromozom bulunmuş ve bu çeşitte yapılan çalışmalar içinde poliploid kromozom sayısına sahip ilk genotip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışma ülkemizde üzümlerde kromozom sayısında uygulamaya yönelik farklılık elde edilen ilk çalışma olmuştur.

Ekbiç ve Tangolar (2016), Trakya İlkeren ve Flame Seedless üzüm çeşitlerinde, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda kolhisin ve Co^{60} mutagenlerinin farklı dozlarının poliploid bitki elde edilmesi üzerindeki etkisini doz ve uygulama süresine bağlı olarak araştırmıştır. Uygulamalar sonucunda gelişen bitkilerden alınan yaprak örneklerinde yapılan flow

sitometri incelemelerine göre bir örneğin %50 hücresinde 2x+4x yapısı görülmüştür. Bunun dışındaki tüm örneklerde ise diploid yapının devam ettiği belirtilmiştir.

Kuksova vd. (1997), Podarok Magaracha üzüm çeşidinde somatik embriyogenez yolu ile geliştirilen birincil kalluslara 10 ve 500 Gy dozlarında; embriyogenik kalluslara ise 5, 10, 40, 100 ve 500 Gy dozlarında Co⁶⁰ uygulanmış ve daha sonra taze besin ortamına transfer edilmiştir. 2 hafta karanlıkta inkübe edilen kallusların rejenerasyonu sonrası kök ucunda kromozom sayımı yapılmıştır. En fazla tetraploid bitki embriyojenik kallusa yapılan 5-100 Gy dozundan elde edildiği (%7.6) ve bunun yanında anöploid bitkilerinde oluştuğu bildirilmiştir.

Munir vd. (2015) tarafından Desi, Sundar Khani ve Çin kültür üzüm çeşitlerinde *in vitro* boğum eksplantlarına 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 Gy dozunda Co⁶⁰ ışınımı uygulanmış ve eksplantları 1 mg/l BAP içeren MS ortamlarına aktarılmıştır. Rejenerasyonu sağlanan sürgünler karşılaştırıldığında 5 Gy Co⁶⁰ ışınımına kadar artan bir sürgün uzunluğu var iken bu dozdan sonrasında her üç çeşitte de sürgün uzunluğunda tam tersi bir azalma görüldüğü belirtilmiştir.

Asmada *in vitro* kromozom katlama amacıyla farklı doku kültürü teknikleri kullanılmaktadır. Seçilen doku kültürü tekniği ile birlikte eksplant ve genotipin etkisinin poliploidi başarısı ile ilişkili olmaktadır (Notsuka vd. 2000, Yang vd. 2006, Dhooghe vd. 2011, Sinski vd. 2014). Kullanılan antimitotik ajanın dozu, uygulama süresi ve çözücüsü farklı etki mekanizmalarına sahiptir. Bu nedenle eksplanta ve antimitotik ajana uygun tekniklerin geliştirilmesi ve uygulama sınırlarının, uygulama süresine bağlı olarak araştırılması önem taşımaktadır. Uygulanabilir yüksek dozlar ve uygulama sürelerinin yüksek seviyede ploidi ile sonuçlanma oranının yüksek olduğu bildirilmektedir. Bunun yanında genel olarak düşük dozların başarısının düşük, yüksek dozların ise letal etkisinin olduğu da bildirilmektedir (Allum vd. 2007).

2.3.2 Asmada *in vivo* ve *in vitro* poliploidide kimyasal mutagenlerin kullanımı

İlk *in vitro* poliploidizasyon 1966'da Murashige ve Nakano (1966) tarafından tütün bitkisinde gerçekleştirilmiştir. *In vitro* koşullarda besin ortamı, uygulama ve bitkiye dönüşümde kontrollü ve standart koşulların sağlanması ile genel olarak kromozom katlama yöntemlerinin etkinliğinde *in vivo* koşullara göre artışlar sağlanmıştır (Dhooghe vd. 2011). Bu nedenle, poliploid bitkilere ulaşmak amacıyla yönelik olarak *in vitro*da eksplant seçimi, besin ortamının önemli olduğu kadar kullanılan antimitotik ajanın dozu, uygulama süresi (Xie vd. 2015) ve kullanıldığı yöntemin geliştirilmesi de başarılı sonuçlara ulaşabilmenin ön koşulları olarak önem kazanmıştır.

Asmada yapay poliploidinin uyarılması için kullanılan ilk kimyasal mutagen kolhisin olmuştur. Poliploidinin sağlanması amacıyla kolhisin mutageni yoluyla yapılan çalışmalarda uygulama yapılmış olan ve kontrol grubu (diploid) asmaların ploidi seviyeleri belirlendikten sonra genellikle morfolojik özellikleri açısından da farklılıkları ortaya konmuştur (Yamane ve Kurihara 1980, Luo vd. 1995, Luo vd. 1997, Kuliev 2011). Bazı çalışmalarda kolhisin uygulamasının ardından tetraploid asmaların yaprak morfolojisi bakımından diploidlerden farklı olduğu; stoma büyüklüğü açısından diploidlerden %40 oranında daha iri, birim alana düşen stoma sayısı açısından ise diploidlere göre yaklaşık %40 oranında daha düşük olduğu (Yamane ve Kurihara 1980) bildirilmiştir. Yine uygulamaların ardından çiçek yapılarının değiştiği (Kuliev 2011), tetraploidlerin özelliklerinin 3 generasyon boyunca değişmeden kaldığı; tane renk ve kalitesinde değişim gözlenmeden tane iriliğinde artışın saptandığı (Luo vd. 1995) çalışmalara rastlanmıştır. Tetraploid ($2n=4x=76$) asmalarda salkımların diploid olanlarına göre %63 daha iri olduğu ve 10 gün kadar daha erken olgunlaştığı, kalite özellikleri açısından ise çoğu özellik bakımından diploid salkımlarla benzerlik gösterdiği; ancak daha yoğun aromaya sahip oldukları (Luo vd. 1997) belirlenmiştir.

Asmada kolhisin ve orizalin mutagenlerinin *in vivo* ve *in vitro*da uygulama dozu, uygulanma şekli, uygulama süresi, uygulanan eksplant tipi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bu aşamaya kadar açıklanmaya çalışılan asmalarda *in vivo* ve *in vitro*da

kimyasal mutagenlerle poliploid bitki elde etme amacına yönelik yöntemlerin bazı başarılı uygulamaları literatür bildirişi olarak aşağıda verilmiştir.

Motosugi vd. (2002a), ototetraploid asma anaçlarının (Riparia Gloire de Montpellier, Rupestris St. George, 3309 C ve Kober 5 BB) filokseraya dayanım özelliklerini *in vitro*da incelemişlerdir. Diploid ve ototetraploid anaçların köklerinde ya hiç ya da çok az filoksera nimflerine rastlanmıştır; buna karşın Cabernet Franc çeşidi köklerinde ise %26.8 oranında filoksera yumurtasının ergine dönüştüğü belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen ototetraploid anaçların ve kontrol grubu olan Kyoho çeşidi asmalarının filoksera ile bulaşık bağ alanına dikimi yapılmıştır ve gal oluşumu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tetraploid anaçların filokseraya dayanıklı olduğunu ve orijinal diploid anaçlardan önemli ölçüde bir farkları olmadığı bildirilmiştir.

Kuliev (2011), çalışmasında üzüm çekirdeklerine %0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 olmak üzere 5 farklı doz ve 3 farklı sürede (24, 48, 72 saat) uyguladığı kolhisin sonrasında ploidi seviyesi ve morfolojik olarak değişim olup olmadığını incelemiştir. Kolhisin uygulaması sonrasında çimlenme oranı çeşitlere göre %32.5 ile 63.2 arasında bulunduğu bildirilmiştir. Çalışma sonunda bitkilerde %58.2 oranında morfolojik değişim ve yalnızca %5.9'unda ploidi seviyesinde bir değişim olduğu belirtilmiştir.

Xu vd. (2014), tetraploid (4x) ve diploidlerin (2x) çaprazlanması ile oluşturulan triploid (3x) çekirdeksiz misket üzümünü (*Vitis rotundifolia* Michx.) geliştirdikleri çalışmada tetraploid ve anöploidleri içeren 16 poliploid misket üzümü tanımlanmıştır. Ploidi seviyesi flow sitometri aracılığıyla doğrulanmıştır ve kromozomlar sayılmıştır. Poliploid üzümler ile diploid (2x) misket üzümleri karşılaştırıldığında daha erken tomurcuk patlaması, daha zayıf vegetatif büyüme, daha kısa boğumlar, daha yeşil ve kalın yapraklar, daha zayıf öze sahip gövdeler ve daha erken olgunlaşma gibi morfolojik farklılıklar olduğu belirtilmiştir.

Chen vd. (2014), Guibao üzüm çeşidinin hibrit ve hibrit olmayan çekirdeklerini çimlendirmeye aldıktan 4 gün sonra 6 farklı sürede (36, 48, 60, 72, 84 ve 96 saat) ve 7 farklı dozdaki (%0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 ve 0.8) kolhisin ile muamele edilmiştir. Uygulama yapılan hibrit x hibrit olmayan melez bitkilerin %25.8'inde ince gövde yapısı, zayıf gelişim, kısa bitki boyu gözlemlendiği; hibrit çekirdeklerde ise kolhisin uygulaması sonrasında morfolojik olarak zayıf bir karaktere rastlanmadığı rapor edilmiştir.

Ekbiç ve Tangolar (2016) Trakya İlkeren ve Flame Seedless çeşitlerinde sürgün uçlarına *in vivo* kolhisin uygulaması ile ploidi artışı sağlamak istemişlerdir. Bu amaçla çalışmalarında sürgün uçlarını %0.5, 0.75 ve 1.00'lik kolhisin çözeltisine batırılmış pamuklara sararak 3 farklı sürede (1, 3 ve 5 gün) muamele etmişlerdir. Trakya İlkeren çeşidi için %1.00; Flame Seedless çeşidi için ise %0.75 ve 1.00'lik kolhisin dozlarında sürgün uçlarının kuruyarak canlılıklarını yitirdiklerini tespit etmişlerdir. Her iki çeşit için sürgün ucu canlılık oranı incelendiğinde kontrol grubundan sonra en iyi sonuç %0.50'lik kolhisinin 1 ya da 3 günlük süre ile muamelesinden elde edilmiş; Trakya İlkeren çeşidinde ise %0.75'lik dozun 3 ve 5 gün süre muamelesinde canlılık oranının %50'nin altına düştüğü belirtilmiştir.

Kara vd. (2018) çalışmalarında serada köklendirilmiş 41B anacına ait tek göz çeliklerinin hızlı büyüme döneminde farklı süre (24, 48, 72 ve 96 saat) ve dozlarda (%0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 ve 1.1) kolhisin uygulaması yapmışlardır. Kolhisin uygulamasının ardından meydana gelen morfolojik değişimler kaydedilerek, ploidi seviyesinde değişim olup olmadığının tespiti için stoma boyu, stoma genişliği ve stoma alanı, stoma sayısı incelenmiştir. Çekirdek DNA içeriklerinin tespiti için de flow sitometri analizi yapılmıştır. Uygulama yapılmış örneklerde stoma genişliği ve alanında bir artış, stoma sayısında ise azalma tespit edilmiştir. Flow sitometri analizlerinde sitolojik açıdan bir farklılığa rastlanmadığı bildirilmiştir. Buna ek olarak kolhisin uygulaması tek gözlü çeliklerin sürgün ucunda kurumaya neden olmuştur. En yüksek doz ve süre (96 saat × %1.1) en fazla sürgün ucu kurumaya, düşük canlılık oranı ile en düşük sürgün uzunluğuna (2.10 ± 0.45) neden olmuştur.

Notsuka vd. (2000), 29 diploid, 3 triploid ve 1 tetraploid üzüm tipinde *in vitro* kromozom katlaması amacıyla mikro çelik eksplantı kullanarak kolhisinin %0.05'lik dozunun 1 ya da 2 gün süreyle uygulamasının tetraploid oluşumu uyardığını bildirmiştir. Uygulamalarda sitokimera ($2x+4x$) oluşumunun yüksek oranda meydana geldiği de vurgulanmıştır. Diğer taraftan tetraploid bireylere ulaşmada diploid çeşitlerin kolhisine karşı yanıtının farklı olduğu ve *V. vinifera* çeşitlerinin Amerikan türleri arasındaki melezlerden daha olumlu yanıt verdiği belirtilmiştir. Elde edilen tetraploid bitkilerin diğer formlara göre daha güçlü geliştiği, kolay köklendiği ve sitogenetik yapının değişmeden kaldığı görülürken, $3x+6x$ ve $4x+8x$ sitokimeraların bitkiye dönüşüm sürecinde sitogenetik kayıplara maruz kaldığı belirlenmiştir. Araştırmada elde edilen tetraploid bitkiler diploid kaynak bitkilerle karşılaştırıldığında olgunlaşma zamanı, salkım ve tane şekli, tane rengi, SÇKM ve asit düzeyinde belirgin bir farklılığın olmadığı buna karşın, çeşide bağlı olarak tetraploidlerde tane iriliğinde 1.1 ile 1.5 kat artış elde edildiği bildirilmiştir.

Motosugi ve Motioko (2001), mikro çeliklerle mikroçoğaltımı yapılan *Vitis flexuosa* Thunb, *V. ficifolia* var. *Izu-insularis* Hara, *V. ficifolia* var. *ganebu* Hatsusima, ve *V. shiragai* Makino çeşitlerine kolhisin uygulamasını *in vitro* koşullarda %0.1 dozunda 1 hafta ve %0.01 dozunda 3 hafta süreyle yapmışlardır. Eksplant gelişiminde kolhisin uygulanan eksplantlarda kontrol grubuna göre, stomaların daha büyük; köklerin ise daha kalın olduğu saptanmıştır. Çalışmada flow sitometrik incelemeler sonucunda, 3 türde (*Vitis flexuosa*, *V. ficifolia* ve *V. shiragai*) tetraploid bireyler elde edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada aynı zamanda *V. shiragai*'nin $2x+4x$ ve *V. ficifolia* var. *ganebu*'nun ise $4x+2x$ periferik kimerik formunu da elde etmişlerdir.

Motosugi vd. (2002 b), yaptıkları çalışmada diploid ve tetraploid Gloire de Montpellier, Rupestris St. George ve 3309 C anaçlarının mikroçoğaltım yoluyla elde edilen sürgünlerine kolhisin uygulamasıyla ototetraploidiye ulaşıldığı bildirilmiştir. Araştırmada morfolojik açıdan incelemeler yapıldığında tetraploid bitkilerin yapraklarının diploidlere göre daha geniş stomalara sahip olduğu belirlenmiştir. Köklenmeye bakıldığında tetraploid bitkilerin diploidlere göre köklerinin daha kısa; Gloire ve St George anacının tetraploid olanlarında ise sürgün boylarının ve boğum

aralarının diploidlere göre daha kısa olduğu saptanmıştır. Bunun tersine tetraploidlerde kök yapılarının daha güçlü olduğu belirlenmiştir. Araştırmanın sera denemelerinde ise tetraploid anaç sürgünlerinin diploidlere göre daha zayıf gelişim göstermesine karşın, daha kalın gövdeli ve yüksek yaprak ağırlık değerine (yaprak kuru ağırlığı/yaprak alanı) sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın ploidi seviyesi flow sitometri analizi ile belirlenmiştir.

Aihong vd. (2005), Jingxiu ve Red Globe üzüm çeşitlerinin *in vitro*da geliştirilen sürgünlerine farklı doz ve sürelerde kolhisin uygulayarak tetraploidi elde etmeyi amaçlamış ve ploidi seviyelerini flow sitometri analizi ile belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda tetraploid elde edilmesi için sürgünlerin kolhisin içeren çözeltilerde bekletilmesinin kültür ortamına kolhisin eklenmesine göre daha etkili olduğu saptanmıştır. Bu çeşitlerde tetraploid birey elde edilmesi için en uygun uygulamanın sürgünlerin 3000 mg/l kolhisin solüsyonunda 3-4 gün süreyle bekletilmesi olduğunu bildirmişlerdir. Bu uygulama ile tetraploidi seviyesinin %16.7 ile %23.3 oranına yükseldiği belirtilmiştir.

Leal vd. (2006), *Vitis vinifera* L. 'Viosinho' kültür çeşidinin iki farklı klonunun anterlerinden geliştirilen somatik embriyodan elde edilen sürgünlerde ploidi seviyelerini belirlemek için flow sitometri kullanılmıştır. Somatik embriyo geliştirme ortamı için farklı dozlarda 2,4-D, BAP ve NOA (Naftoksi asetik asit) içeren 5 farklı MS besin ortamı denenmiştir. Somatik embriyolar geliştikten sonra yalnızca BAP içeren bitki gelişim ortamına transfer edilmiştir. Burada gelişen ve sağlıklı kalan sürgünlerde herhangi bir haploid veya anöploid bitkiye rastlanmamış, somaklonal varyasyon göstererek tetraploid hale gelen bitki sayısı ise %2.4 olarak tespit edilmiştir. 9 farklı *V. vinifera* çeşidi ile karşılaştırılan çekirdek DNA içeriklerinde önemli bir farklılık görülmediği rapor edilmiştir.

Yang vd. (2006), diploid asmalarda yaptıkları somatik embriyogenez çalışması sonucu güçlü gelişme gösteren embriyoları selekte ederek 0, 10 ve 20 mg/l dozundaki kolhisin ile 1, 2 ve 3 gün sürede muamele etmişlerdir. Sonrasında bitki rejenerasyonu için 0.03

mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA ilave edilen NN (Nitsch ve Nitsch 1969) ve MS ortamına aktarılan embriyolardaki canlılık oranında ve rejenere olan bitkicik sayısında kolhisinin uygulama dozu ve süresinin artışına bağlı olarak bir azalma olduğu saptanmıştır. Kolhisin uygulaması yapılmış somatik embriyolardan oluşan bitkiciklerin tesadüfi olarak seçilenlerinden 5 tanesinin tetraploid olduğu flow sitometri ile belirlenmiştir. Ayrıca, diploid ve tetraploid sürgünlerin yaprak stoma özelliklerinin de belirgin şekilde farklılık gösterdiği görülmüştür.

Prado vd. (2010) tarafından altı önemli İspanyol üzüm çeşidinde anter ve ovaryum eksplantlarına kolhisin uygulandığı bir somatik embriyogenez çalışması yapılmıştır. Embriyogenik kalluslardan rejenere olan bitkilerdeki somaklonal varyasyon ile elde edilmeye çalışılan mutasyon oranlarına bakılmıştır. Sonuçta eksplant gelişim aşamasının, farklı besin ortamının ve çeşidin poliploidiyi etkilediği görülmüştür.

Chang vd. (2014)'nın yaptıkları çalışmada *in vitro*da elde edilen Victoria üzüm çeşidinin sürgünlerinden alınan boğum parçaları %0.05 ve %0.1 dozundaki sıvı kolhisin çözeltisinde 24 veya 48 saat bekletilmiştir. Kromozom katlamasında en etkili denemenin %0.05 dozundaki kolhisin çözeltisinde 48 saat ve %0.1 dozundaki kolhisin çözeltisinde 24 saat bekletilen üçüncü ve dördüncü boğumda olduğu saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda ploidi seviyesi katlanmış bitki elde edilme oranı yukarıda bildirilen iki başarılı doz ve süre kombinasyonunda sırasıyla ilk generasyonda %24.6 ve %25.5 olarak bildirilmiştir.

Sinski vd. (2014), Crimson Seedless ve BRS Clara çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin sürgün ucu ve somatik embriyoların eksplant olarak kullanıldığı çalışmada poliploidizasyon için farklı dozlarda (0, 20, 100, 250 ve 1.250 μ M) kolhisin ve (0, 20, 40, 60 ve 80 μ M) orizalin kullanılmıştır. Kontrol grubu ile birlikte 5 farklı sürede bu kimyasallar sıvı besin ortamlarında muamele edilmiştir. Daha sonra katı besin ortamına aktarılan eksplantların rejenerasyon ve köklenmelerinin ardından kök ucundan kromozom sayımı yapılarak ploidi belirlenmeye çalışılmıştır. En yüksek canlılık oranı ve tetraploid bitki oranının somatik embriyonun başlangıç eksplantı olarak kullanıldığı 80 μ M-48 saat

kolhisin denemesinden elde edildiği belirtilmiştir. Orizalin uygulamasında ise hemen her çalışmada tetraploid bitki elde edildiği ve yüksek rejenerasyon oranının ise düşük doz denemelerinde ortaya çıktığını saptamışlardır.

Xie vd. (2015), 101-14 Millardet et de Grasset (*Vitis riparia*&*V. rupestris*) (101-14 Mgt) ($2n=2x=38$) X *Muscadinia rotundifolia* cv. Trayshed ($2n=2x=40$) hibrit asma anaçlarının *in vitro*da tetraploidinin uyarılması için bir protokolün oluşturulduğu çalışmada antimitotik ajan olarak üç farklı dozda (250, 625 ve 1250 μ M) kolhisin ve üç farklı dozda (5, 15 ve 30 μ M) orizalin çözeltisi 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulanmıştır. Sürgün ucu, anter ve embriyogenik kallusların kültüre alınarak rejenerasyonunun sağlandığı ve ploidi düzeylerinin flow sitometri yöntemi ile belirlendiği bildirilmiştir. En yüksek canlılık, sürgün ucu eksplantından görülürken, en yüksek tetraploid bireyin embriyogenik kalluslardan gelişen sürgünlerden elde edildiği belirtilmiştir.

Acanda vd. (2015), şaraplık çeşit olan Mencia zm eşidinde (*V. vinifera*) yapılan *in vitro* kromozom katlama uygulamasında antimitotik ajan olarak 4 farklı dozda (%0.0, 0.1, 0.2 ve 0.4) kolhisin kullanmışlardır. Embriyogenik hücre elde etmek için başlangıçta stamen ve ovaryumların belirlenen dönemde toplanarak farklı dozlarda TDZ içeren NN ve MS besin ortamlarında kültüre alındığı belirtilmiştir. Gelişen embriyolardan embriyogenik hücre kümesi elde etmek için süspansiyon kültürüne transfer edilmiştir. Süspansiyon hücre kültüründeki hücre kümelerine 24 saat süresince uygulanan kolhisinin ardından embriyogenez gerçekleştirilmiş ve rejenere olmuş sağlıklı sürgünlerde ploidi seviyesi ve ekirdek DNA içeriği belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda en etkili uygulamanın %0.2 kolhisin dozundan elde edildiği ve %25 oranında tetraploid bitkiye ulaşıldığı belirtilmiştir.

Ülkemiz asma gen kaynakları arasında doğal poliploid çeşit kaydı bulunmamaktadır. Islah alışmaları kapsamında ise son yıllara kadar ilgi gösterilmiş bir alan olmaktan da uzak kalmıştır.

2.4 Ploidinin Belirlenmesi

In vivo ya da *in vitro*da bir doku, organ, tohum veya bitkide yapılan kromozom katlama uygulamaları sonrasında yapılan uygulamaların başarılı sonuç verip vermediğini öğrenmek adına ploidi seviyelerinin tanımlanması gerekmektedir. Fenotipe bağlı değerlendirmeler, bitkilerde kromozom sayısı artışına paralel olarak bitkinin tüm organlarında hacimsel büyümeye yani irilik artışına bağlıdır. Poliploidinin fenotipik etkisinin açıkça belirgin olmasına rağmen; poliploidinin belirlenmesinde yeterli ve güvenilir bir metot değildir (Dart vd. 2004). Sonuç olarak poliploidi varlığının tespit edilmesinde çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bu metotları direkt ve dolaylı tespit metotları olarak iki ana sınıfa ayırabiliriz (Beck vd. 2005). Direkt metotların en önemli örneği olan kromozom sayımı, morfolojik karakter çalışmalarının ardından ploidi seviyesinin belirlenmesi için özellikle sürgün ya da köklerin apikal meristemlerindeki aktif bölünme döneminin uygun olduğu belirtilmiştir (Baker 1943, Bali ve Tandon 1959, Maritz 2008). Bazı bitkilerde; özellikle odunsu bitkilerde kromozom büyüklüklerinin nispeten küçük oluşu ve buna ek olarak hücre bölünmesinin sınırlı sayıda olması, çalışmayı zor ve zaman alıcı hale getirmektedir (Beck vd. 2003, Beck vd. 2005). Kromozom sayımında laboratuvar uygulamalarının uzun zaman alması ve deneyim gerektirmesi sağlıklı sonuçlar almada önemli bir dezavantaj olarak görünmektedir. Son yıllarda önde gelen bir diğer direkt metot ise güvenilir, hızlı ve ekonomik bir yöntem olan akış sitometrisi metodu (flow sitometri) kullanılarak DNA içeriği miktarının belirlenmesidir (Dolezel vd. 1992). Dolaylı metotlar ise morfolojik karakterlerin değerlendirilmesi, stoma bekçi hücrelerinin kloroplast miktarı, stoma uzunluğu ve yoğunluğunun belirlenmesi (Beck vd. 2003) ve yaprak klorofil içeriği miktarının ölçümüdür (Mathura vd. 2006). Eng ve Ho (2019) tarafından bildirildiğine göre; flow sitometri, biyolojik hücre gözleminde kullanılmak üzere Gucker vd. (1947) tarafından icat edilmiştir. Bitkideki ilk akış sitometrisi metodu ise Heller (1973) tarafından uygulanmış ve flow sitometri analizi ile ilgili bilimsel makaleler (Awoleye vd. 1994, Van Duren vd. 1996, Tambong vd. 1998) 90'lı yıllarda yayımlanmaya başlanmıştır. Flow sitometri esas olarak, bir süspansiyon içerisinde boyanmış partiküllerin (hücre çekirdeği ya da DNA) bir floresans mikroskobu aracılığıyla okunmasıdır. Yaklaşık olarak 5.000-10.000 adet arasında hücre çekirdeği DNA

miktarının floresans yardımıyla okunması sağlanmakta ve bu çekirdeklere ait floresans yoğunluğu grafiğe dökülmektedir (Kaya 2010).

Flow sitometri analizi çekirdek sayısını floresans seviyesinin bir fonksiyonu olarak grafiğe dökme (Kaya 2010). DNA içeriği bilinen bir standart bitki ve örnek dokuları aynı anda hazırlanır. Örnek analiz edildiğinde histogramda gözlenen örnek ve standart piklerini ayırt etmek için çalışma başlamadan önce örnek ve standart ayrı ayrı analiz edilmekte ve piklerin yerleri sayısal olarak tespit edilmektedir. Sonuç olarak; asma ve standart bitkinin birer tane pik oluşturması ve tetraploid pikin ise daha yüksek floresans seviyesine sahip olması gerekmektedir (Kaya 2010, Tuna vd. 2016).

2.4.1 Asmada ploidin belirlenmesi

Asmada ploidin belirlenmesinde günümüze dek yapılan çalışmalarda dolaylı (fenotipik incelemeler) ve direkt metotların her ikisi de kullanılmıştır. Asmalarda ploidin belirlenmesi, yapılan mutagen uygulamalarının ardından başarı oranını belirlemek için morfolojik gözlemlerin yanında oldukça önemlidir. *Vitis* türleri yüksek kromozom sayısına ($2x=38$) sahiptir. Buna karşın karyolojik çalışmalarda kromozom büyüklükleri de sonuçtaki başarı oranını etkilemektedir. Yapılan sitolojik çalışmalar sonucunda Lodhi ve Reisch (1995)'in bildirdiğine göre; asmanın kromozom büyüklüklerinin diğer türlere göre (örneğin kromozom büyüklüğünün küçük olduğu bilinen kakaonun neredeyse yarısı büyüklüğünde) daha küçük olduğu belirtilmiştir (Shetty 1958). *Vitis vinifera* diğer Asya ve Kuzey Amerika *Vitis* türlerine göre nispeten daha küçük çekirdek DNA içeriğine sahiptir (Lodhi ve Reisch 1995) Bu çalışmalarda başarıyı etkileyen faktörlerin başında ezme preparat hazırlığı gelmektedir. Bu yönde yapılan çalışmalar sonucunda (Patil ve Jadhav 1985, Patil ve Patil 1992) asmanın kromozom sayısının çeşitlere ve ezme preparat yöntemlerine (Haas ve Alleweldt 2000) göre 0.5 ile 2.450 mikron aralığında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Asma kromozom sayısının daha sağlıklı bir şekilde yapılabilmesi için farklı enzimler kullanılarak preparat hazırlık protokolünde değişik yöntemler geliştirilmiştir.

Fenotipik olarak stoma gözlemleri, stoma büyüklüklerinin karşılaştırıldığı çalışmalar, kök ucunda ezme preparat yöntemi ile kromozom sayımı çalışmaları mevcuttur (Yang vd. 2006, Sinski vd. 2014, Xie vd. 2015). Asmadan ziyade genel olarak tüm türlerde ploidi çalışmalarına bakıldığında direkt ve/veya dolaylı metotlar ile ploidi belirlendiği görülmüştür. Birden çok metot kullanımı sonuçları doğrular nitelikte olmuştur. Bazı literatürlerde ise yalnızca stomatal ya da kök ucu kromozom sayımı yapılmıştır. Asmada ploidi çalışmalarında kök ucundan kromozom sayımı (Kuksova vd. 1997, Notsuka vd. 2000, Yang vd. 2006, Kuliev 2011, Chang vd. 2014, Xu vd. 2014, Acanda vd. 2015, Xie vd. 2015) yapılan birçok çalışma mevcuttur. Bitkilerin kök ucu dokularının çeşitli boyalar ile boyanması yoluyla yapılan ezme preparat çalışmaları ile ploidi seviyesinin belirlenmesi yöntemi çok sayıda bitki örneğinin analizini gerektirmektedir. Bu yöntem zaman ve iş gücü açısından dezavantajlıdır ve ploidi düzeyi belirlemede pratik olmaması açısından tercih edilmemektedir (Tuna vd. 2016). Son yıllarda daha hızlı ve güvenilir bir yöntem olan flow sitometri analizi ile çekirdek DNA içeriği tayini de bu ploidi çalışmalarında (Leal vd. 2006, Prado vd. 2010, Acanda vd. 2013, Sinski vd. 2014, Acanda vd. 2015, Xie vd. 2015) yerini almıştır.

Yukarıda bildirilen araştırma sonuçları poliploid asma genotiplerinin elde edilmesi için yeni çalışmaların hedeflenmesinin gereğini açıkça ortaya koymaktadır. Doktora tez çalışması ile ülkemiz asma genotipleri içerisinde farklı özellikleri ile yer edinmiş olan Sultani çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde, poliploid bireylere ulaşmak için *in vitro* kromozom katlama tekniğinin çeşitlere özgü olarak geliştirilmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tez çalışması 2015-2018 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü ve Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü laboratuvarları ve iklim odasında yürütülmüştür. Çalışmaların yürütülmesinde Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü ve Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü olanaklarından da yararlanılmıştır.

3.1 Materyal

Tez çalışmasının materyalleri Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitleridir (*Vitis vinifera* L.). T.C. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kalecik Bağcılık Araştırma ve Uygulama İstasyonu'nda yetiştirilmekte olan çeşitlerden, dinlenme döneminde bir yaşlı odun çelikleri çalışmaların kaynağını oluşturmak üzere alınmıştır.

Sultani Çekirdeksiz: Sultani Çekirdeksiz, dünya çekirdeksiz sofralık ve kurutmalık üzüm çeşitlerinin atasal genotipi olup, kökeni Anadolu'dur. Stenospermokarpik tane tutum özelliği gösteren ve orta mevsimde olgunlaşan bir çeşittir. Sofralık olarak değerlendirilmesinde küçük tane yapısı GA₃ (Giberellik asit) kullanılarak irileştirilmektedir. Çeşidin üstün özelliklerinin tane iriliği ile birleştirilmesi çalışmalarına hizmet edecek genetik materyallerin elde edilmesi için yapılan mutasyon çalışmalarına yol göstermesi amacı ile seçilmiştir (Şekil 3.1)



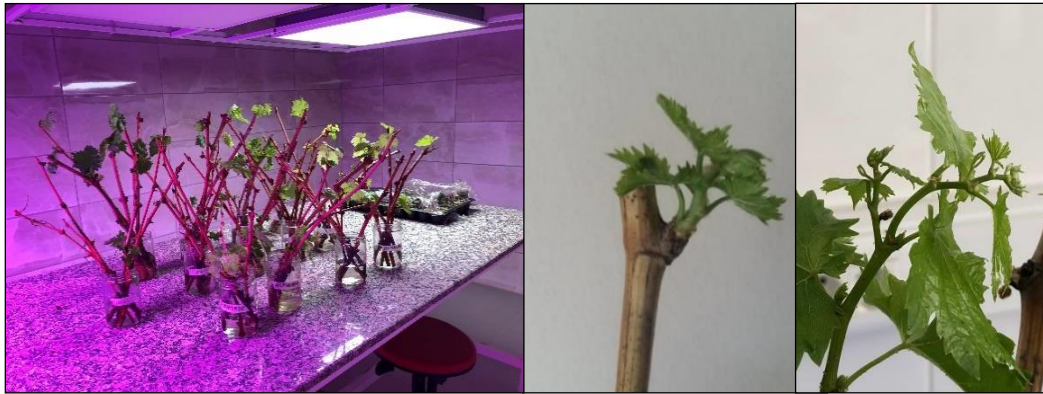
Şekil 3.1 Kalecik Bağcılık Araştırma ve Uygulama İstasyonu'nda tez çalışması için çelik alınan Sultanî Çekirdeksiz çeşidine ait olgun salkımlar

Uslu: Tez çalışmasında yer alan diğer çeşit Hönüsü x Siyah Gemre melezi olan Uslu, ülkemiz melezleme ıslahı çalışmalarının ilk tescil edilen genotiplerindedir. Uslu üzüm çeşidi, erkencilik, kırmızı tane rengi ve tane eti kalitesi ile özgün olmasına karşın salkım üzerinde partenokarpik tane ve LGO (live green ovary) oluşma oranının yüksek olması nedeniyle salkım kalitesi bakımından yetersiz kalmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Kalecik Bağcılık Araştırma ve Uygulama İstasyonu'nda tez çalışması için çelik alınan Uslu çeşidine ait olgun salkımlar

In vitro çalışmalar için gerekli eksplantlar, Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerine ait bir yaşlı dallardan hazırlanan odun çeliklerinin kontrollü koşullarda 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyodunda, 24°C sıcaklık ve %70-80 nem içeren iklimlendirme odasında sürdürülmesiyle (Şekil 3.3) elde edilen sürgünlerden hazırlanmıştır.



Şekil 3.3 Bir yaşlı dallardan hazırlanan çeliklerin sürmesi

3.2 Yöntem

3.2.1 Kimyasal mutagen uygulanacak eksplantların seçimi

Tez çalışmasında *in vivo* ve/veya *in vitro*dan temin edilen üç farklı eksplanta iki farklı kimyasal mutagen uygulaması yapılmıştır. Çizelge 3.1’de uygulama şekli sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan eksplant, kimyasal mutagen ve besin ortamları

| Eksplant kaynağı | | Eksplant | Kimyasal mutagen | Besin ortamı |
|----------------------------|------------------------|-------------------------|------------------|-------------------|
| <i>In vivo</i> asma çeliği | <i>In vitro</i> sürgün | Kallus | Orizalin | Sıvı besin ortamı |
| | | Koltuk altı meristemi | | Katı besin ortamı |
| <i>In vivo</i> asma çeliği | | Sürgün ucu | Kolhisin | Sıvı besin ortamı |
| | | Tek boğumlu mikro çelik | | |

Çalışmada orizalin mutageninin uygulanacağı koltuk altı meristemi ve kallus eksplantını geliştirmek için başlangıç materyali olarak *in vivo* çeliklerden elde edilen sürgün ucu eksplantı kullanılmıştır. Kolhisin mutageni uygulanan sürgün ucu ve tek boğumlu mikro çelik eksplantı ise doğrudan *in vivo* çelikten temin edilmiştir (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.4). Bu eksplantların seçilme amaçlarını incelediğimizde;

Sürgün ucu eksplantı, yüksek sayıda meristematik hücre bulundurması, hücrelerinin diploid yapıda olması, genotipik değişimlere açık olması (Özler 2014) ve virüsten arı bitki üretiminin söz konusu olmadığı durumlarda tercih edilen (Sim 2006) bir eksplant olması nedenleriyle seçilmiştir. Apikal meristeme sahip olması ve nispeten daha büyük bir eksplant oluşu *in vivo* kaynaklı olsa bile canlı kalma oranının (%80-100) yüksek olması da önemlidir (Hu ve Wang, 1983).

Koltuk altı meristemi (aksiller tomurcuk) eksplantı, aktif büyüme dönemindeki sürgünlerden alındığı için rejenerasyon yeteneğinin daha yüksek olması, her birinin yeni bir sürgün oluşturma yeteneği ve toprak üstü aksamı olduğu için daha az kontaminasyona uğrama olasılığı (Özler 2014) olduğu için seçilmiştir. Asmada canlılık oranının kallus ve sürgün ucu eksplantına kıyasla daha yüksek olması (Yu ve Meredith 1986), kallus ve sürgün ucundan gelişen sürgünlerde sürgün çoğaltımı aşamasında aksiller dallanmanın daha fazla olması (Özler 2014) koltuk altı meristemi eksplantının denemede kullanılmasının nedenlerindedir.

Kallus eksplantı, farklılaşmamış hücreler topluluğu olması sayesinde tek hücreden yeni ve aynı özellikte bir birey oluşturma özelliğinden (totipotensi) uzaklaşabilme yeteneğine sahip bir eksplant tipidir. Asmada kallus eksplantı gövde, petiol, sülük, çiçek salkımı, çekirdek gibi çeşitli organlardan oluşabilmekte; fakat alt kültürleme sırasında kallus gelişiminin olumsuz etkilenebildiği de bilinmektedir (Bouquet ve Torregrosa 2003). Sürgün ucu, boğum, koltuk altı meristemi ve tek boğumlu mikro çelik gibi eksplantlardan gelişen sürgünler genellikle tek düze diploid bireyler oluşturmaktadır (Özler 2014). Buna nazaran kallus hücreleri tekdüze olmaması ile birlikte mutasyona açıktır. Bu yolla poliploid ve anöploid bitkiler meydana getirebilme potansiyeline sahiptir. Varyasyona açık bir eksplant olması tez çalışmasında kullanılmasının temel nedenlerindedir.

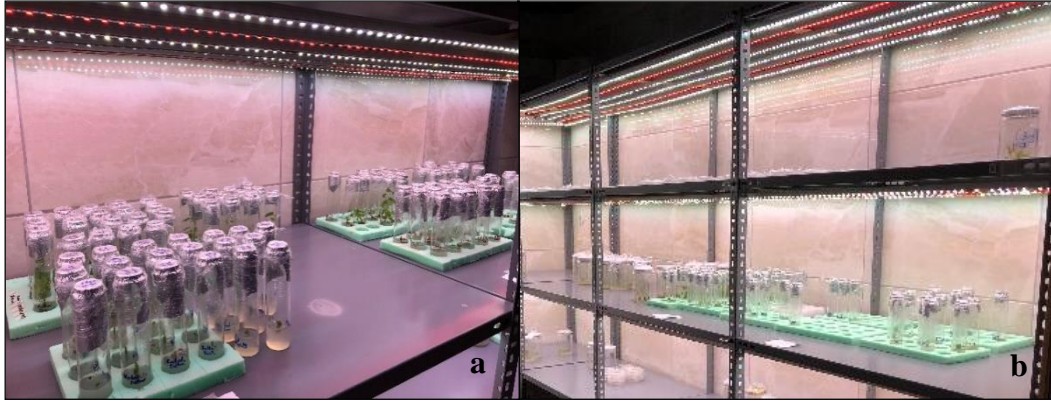
Tek boğumlu mikro çelik eksplantı, *in vivo*da sürdürülmüş odun çeliklerinin aktif büyüme döneminde alınması rejenerasyon oranını artırmaktadır. Tek boğumlu mikro çelik eksplantından sürgün gelişiminin daha kısa sürede olması, abiyotik ve biyotik strese daha dayanıklı olduğu için uygulanan mutagene daha iyi dayanım gösterme olasılığı nedenleriyle *in vitro* mutagen uygulaması için seçilmiştir (Yılmaz 2018).



Şekil 3.4 Tez çalışmasında kullanılan eksplantlar: sürgün ucu, tek boğumlu mikro çelik, kallus eksplantı (a) ve koltuk altı meristemi eksplantı (b)

3.2.2 Çalışmada kullanılan besin ortamı ve kültür koşulları

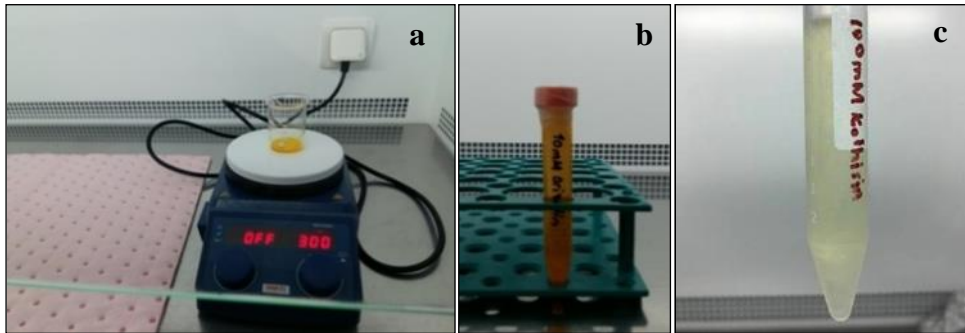
Tez çalışmasında kullanılan tüm eksplantların kültüre alınmasından itibaren yapılan sürgün rejenerasyonu, kallus rejenerasyonu, sürgünlerin çoğaltılması ve köklendirilmesi sırasında besin ortamı olarak vitaminleri de içeren MS besin ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) kullanılmıştır. MS besin ortamına karbon kaynağı olarak 30 g/l sukroz (Sucrose, Duchefa) ve katı ortamlarda katılaştırıcı olarak 4.4 g/l bitki agarı (Plant Agar, Duchefa) ilavesi yapılmıştır. Kullanılan tüm kültür ortamları $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 16 saat aydınlık koşulları altında 2000-2500 lüks fotoperiyoda sahip iklim dolabında (Daihan Scientific, Wisecube) inkübe edilmiştir. Bunun yanında kallus kültürü çalışmalarında kültüre alınan eksplantlar 2-4 hafta karanlık ortamda, daha sonra 8 saat karanlık koşullarda iklim odasında inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5). Kullanılan tüm besin ortamları 5.7 ± 1 pH değerlerinde hazırlanmış ve 1.1 kg cm^2 basınç altında, 121°C 'de 20 dk süre ile otoklavda (Alp CLG) steril edilmiştir. Besin ortamının otoklavda sterilizasyonunun ardından içerisine farklı aşamalara yönelik belirlenen dozlarda bitki büyüme düzenleyecileri (oksin ve sitokinin) eklenmiştir.



Şekil 3.5 16 saat aydınlık koşuldaki iklim odasında tez çalışması ile ilgili materyalin inkübe edilmesi (a ve b)

Besin ortamına ilave edilen BAP, IBA ve 2,4-D (Duchefa) gibi bitki büyüme düzenleyiciler (BBD) kendine özgü çözücüsünde çözülmüştür. Orizalin DMSO'da ve kolhisin distile su içinde çözdürülmüş ve daha sonra steril distile su ile istenilen hacme tamamlanmıştır. Orizalin (Duchefa) stok çözeltisi 10 mM ve kolhisin (Sigma-Aldrich) stok çözeltisi ise 100 mM dozunda hazırlanmıştır.

Hazırlanan tüm BBD, orizalin ve kolhisin stok çözeltileri steril kabinde 0.2 mikron porlara sahip hazır steril filtre (Millex-GS) ve ticari 10 ml'lik şırınga (SET/inject) kullanılarak steril edilmiştir (Şekil 3.6). Kullanılan tüm BBD stok çözeltileri +4°C'de (buzdolabında), orizalin ve kolhisin ise -20°C'de muhafaza edilmiştir. Tüm stok çözeltiler tez çalışma süresince 2 ayda bir yenilenmiştir.



Şekil 3.6 Orizalin stok çözeltisinin steril kabinde hazırlanışı DMSO ile orizalin kimyasalının çözdürülmesi (a) 10 mM orizalin stok çözeltisi (b) 100 mM kolhisin stok çözeltisi (c)

3.2.3 Laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonu

In vitro çalışmalarda kullanılan tüm cam, polipropilen ve metal malzemeler 3 defa distile sudan geçirilerek otoklavlanmıştır. Bunun yanında kolhisin ve orizalin ile bulaşık materyallerin sterilizasyonunda cam ve polipropilen malzemeler 0.1 N sodyum tiyosülfat pentahidrat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) çözeltisinde bir gece süresince; metal malzemeler ise 2 saat süreyle bekletildikten sonra 3 kez distile sudan geçirilmiş ve 121°C'de 20 dk süre ile otoklavda steril edilmiştir.

3.2.4 Eksplant sterilizasyonu

Orizalin uygulamaları için başlangıç materyali *in vivo* kaynaklı sürgün ucudur. Kolhisin uygulamalarında ise başlangıç materyali olarak *in vivo* çelikten alınan sürgün ucu ve tek boğumlu mikro çelik eksplantları kullanılmıştır.

3.2.4.1 *In vivo* sürgün ucunun yüzey sterilizasyonu

Çeliklerin sürdürülmesiyle elde edilen sürgünlerden toplanan sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonu için %5'lik Actijen (%0.015 aktif klor içeren ticari dezenfektan) çözeltisinde (5 ve 10 dk) ve %10'luk Actijen çözeltisinde 10 dk olmak üzere 3 farklı sterilizasyon yöntemi denenmiştir.

Sürgün ucu eksplantları 2-3 damla ticari deterjan (Tween 20) ile yıkandıktan sonra 2-3 saat boyunca akan çeşme suyu altında bırakılmıştır. Daha sonra steril kabine alınan eksplantlar etil alkol uygulaması yapmaksızın dezenfektan çözeltisi içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Dezenfektanın eksplant dokularından arınması için 3×5 dk distile sudan geçirilmiştir.

3.2.4.2 *In vivo* tek boğumlu mikro çeliklerin yüzey sterilizasyonu

Tek boğumlu mikro çelik eksplantının yüzey sterilizasyonu için rapor edilmemiş ön denemelerde sürgün ucu eksplantı için uygulanan yüzey sterilizasyon protokolü uygulanmıştır. Ancak canlılık oranı %50'nin altında bulunduğu için Actijenden farklı olarak önceki literatürde de en yaygın görülen dezenfektan olarak sodyum hipoklorit (NaOCl) kullanılmıştır. Literatür araştırmaları sonucunda 10 dk ve 15 dk olmak üzere 2 farklı sürede %20'lik NaOCl'de sterilizasyonu yapılmıştır (Şekil 3.7).

Tek boğumlu mikro çelik eksplantları, 2-3 damla ticari deterjan (Tween 20) ile yıkandıktan sonra 2-3 saat boyunca akan çeşme suyu altında bırakılmıştır. Daha sonra steril kabine alınan eksplantlar etil alkol uygulaması yapmaksızın dezenfektan çözeltisi içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Dezenfektanın eksplant dokularından arınması için 3 × 5 dk distile sudan geçirilerek hazırlık tamamlanmıştır.



Şekil 3.7 Steril kabinde Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantlarının NaOCl ile yüzey sterilizasyonu

3.2.5 Koltukaltı meristemi eksplantının geliştirilmesi

Sürgün uçlarından *in vitro* sürgün rejenerasyonu sağlanabilmesi için ön denemeler (tez kapsamında ayrıca rapor edilmemiş) sonucunda 1 mg/l BAP içeren MS besin ortamı (1× MS + 30 g/l sukroz + 6.5 g/l agar + 1 mg/l BAP) en uygun ortam olarak belirlenmiştir.

Sürgün çoğaltımında ise, (1× MS + 30 g/l sukroz + 6.5 g/l agar + 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA) ortamı denenmiştir; ancak NAA içeren bu ortamdan kardeşlenme elde edilemediği için oksin grubu BBD değiştirilerek yerine IBA kullanılmıştır. Sürgün çoğaltma ortamındaki (1× MS + 30 g/l sukroz + 6.5 g/l agar + 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) sürgünlerin canlılıklarının devamının sağlanması için 30 gün sonra BBD içermeyen MS ortamına alınmıştır. Rejenerasyon ve sürgün çoğaltımı ortamlarında rejenerasyon oranı, sürgünlerdeki ortalama ana sürgün uzunluğu, eksplant başına ortalama yan sürgün sayısı, yan sürgün uzunluğu ve yan sürgün oluşturma oranı yüzde olarak (%) belirlenmiştir. Alt kültürleme sonunda gelişen sağlıklı sürgünlerin her bir boğumundan Şekil 3.8’de görüldüğü gibi koltuk altı meristemi eksplantları hazırlanarak farklı dozlarda orizalin içeren sıvı ve katı besin ortamlarına kültüre alınmaya hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.8 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde *in vitro* koşullarda elde edilen koltuk altı meristemi eksplantı

3.2.6 Kallus eksplantının geliştirilmesi

Sağlıklı kallus gelişimi elde etmek için iki farklı eksplant (yaprak diski ve boğum arası) üç farklı besin ortamında kültüre alınmıştır. Böylece tez çalışması için en uygun eksplantın seçimi ile kallus indüksiyon ortamının optimize edilmesi gerçekleştirilmiş ve aşağıda yapılan uygulamalar açıklanmıştır.

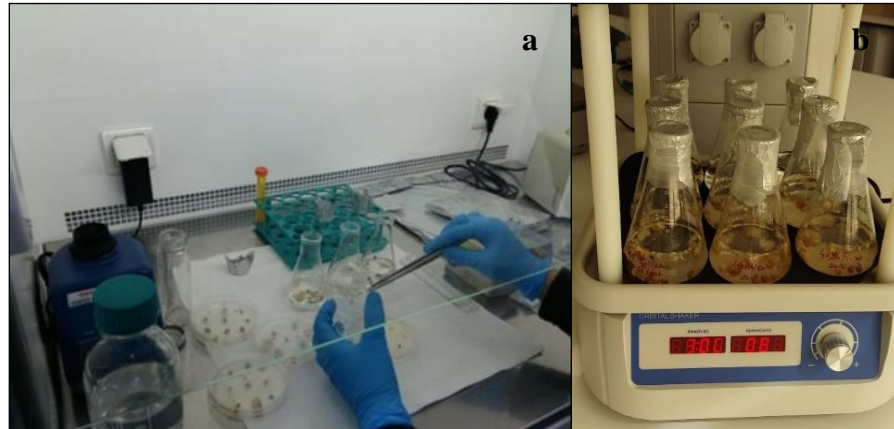
Birinci uygulamada yaprak diskleri ve boğum eksplantları üç farklı dozda 5.0, 10.0 ve 15.0 mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. İkinci uygulamada; Babalık ve Baydar (2008) tarafından bildirilmiş olan kallus gelişim ortamı modifiye edilerek; 0.5

mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamında, üçüncü uygulamada; 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D (Keskin ve Kunter 2007) ve dördüncü uygulamada ise; 2 mg/l BAP + 0.3 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA (Khan vd. 2015) ilave edilmiş iki farklı MS ortamında yaprak ve boğum arası eksplantları kültüre alınmıştır. Belirtilen çalışma sonucunda, tekstür ve canlılık oranı bakımından en iyi sonucun elde edildiği boğum arası eksplantı ve üçüncü uygulama olan 1 mg/l BAP + 0.1mg/l 2,4-D içeren katı MS ortamı mutagen uygulamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.2.7 *In vitro* orizalin uygulamaları ve mutant aday bitkiciklerin elde edilmesi

3.2.7.1 Koltuk altı meristemi ve kallus eksplantlarında *in vitro* orizalin uygulaması

Orizalin, Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde koltuk altı meristemi ve kallus olmak üzere iki farklı eksplanta iki farklı şekilde (sıvı ve katı MS ortamı) uygulanmıştır. 0, 20, 30 ve 40 μ M orizalin dozları sıvı MS ve katı MS besin ortamına ilave edilmiştir (Şekil 3.9). Koltuk altı meristemi ve kallus eksplantları sıvı ve katı MS ortamında kültüre alınarak 24, 36, 48 saat sürelerde iklim odasında 100 rpm hızındaki orbital çalkalayıcı üzerinde 24°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İki farklı eksplant için uygulanan orizalin dozları ve *in vitro* kültür koşulları Çizelge 3.2’de açıklanmıştır.

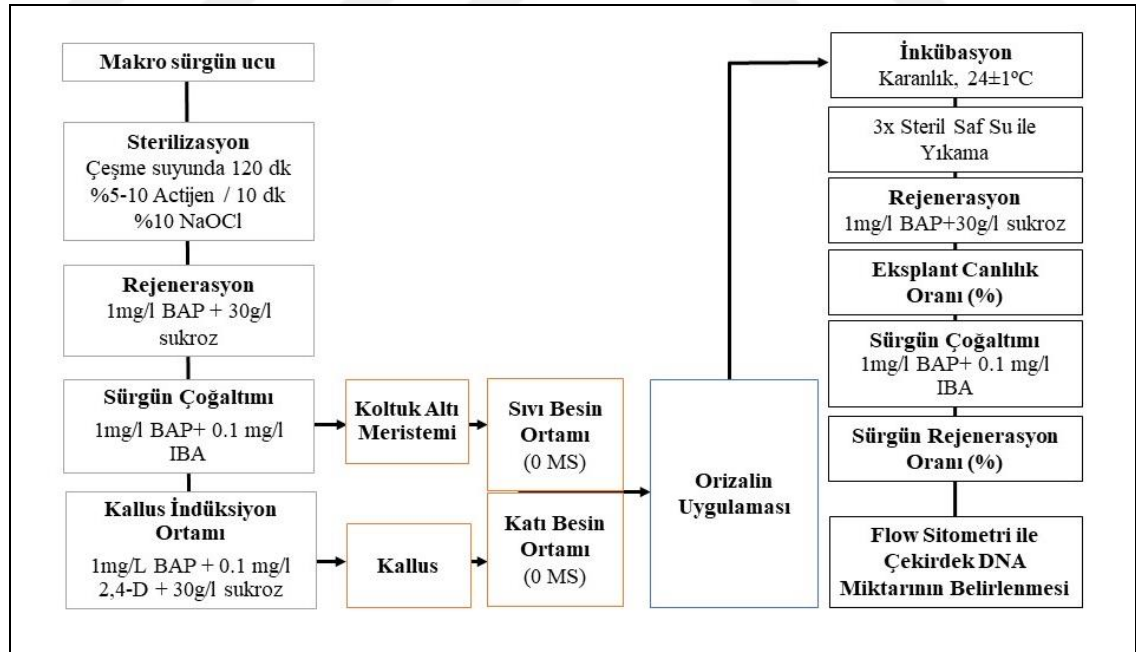


Şekil 3.9 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sürgün çoğaltma ortamında gelişen sürgünlerden alınan koltuk altı meristemi ve kallusların orizalin ilave edilmiş sıvı ve katı MS besin ortamına aktarılması (a) ve orbital çalkalayıcı üzerindeki inkübasyonu (b)

Çizelge 3.2 Orizalin dozları ve inkübasyon süreleri

| Orizalin dozu (μM) | Uygulama Süresi (saat) |
|---------------------------------|------------------------|
| 0 (kontrol) | 24 |
| | 36 |
| | 48 |
| 20 | 24 |
| | 36 |
| | 48 |
| 30 | 24 |
| | 36 |
| | 48 |
| 40 | 24 |
| | 36 |
| | 48 |

Orizalin uygulama denemeleri üç tekerrürlü ve her tekerrürde 10 eksplant bulunacak şekilde kurulmuştur. Uygulamaların ardından eksplantlar Şekil 3.10’da belirtildiği gibi sürgün rejenerasyon ortamına aktarılmadan önce orizalinin bitki dokularından (koltuk altı meristemi ve kallus) uzaklaştırılması için 3×5 dk steril distile sudan geçirilmiştir.



Şekil 3.10 Koltuk altı meristemi ve kallus eksplantlarında *in vitro* orizalin uygulamasının aşamaları

3.2.7.2 Orizalin uygulanan koltuk altı meristeminden sürgün rejenerasyonu ile mutant adayı bitkiciklerin elde edilmesi

Sıvı ve katı MS besin ortamlarında üç farklı orizalin dozu uygulanmış koltuk altı meristem eksplantlarından sürgün rejenerasyonu sağlanması için ön denemelerde optimize edilmiş en uygun ortam olan 1 mg/l BAP içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda rejenerasyonu sağlanan sağlıklı sürgünlerden rejenerasyonun devamlılığını sağlamak için gelişen ana ve yan sürgünler sürgün çoğaltma ortamına (1 × MS + 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) alınmıştır. Canlılığını ve uzamasını sürdüren koltuk altı meristemi eksplantlarında doku kararmasını engellemek için 2-3 kez 0 MS besin ortamına alt kültüre alınmıştır. Alt kültürlerde 4-5 yapraklı hale gelen *in vitro* bitkicikler kromozom katlama analizi için çekirdek DNA içeriğinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.7.3 Orizalin uygulanan kallus eksplantından sürgün rejenerasyonu ile mutant adayı bitkiciklerin elde edilmesi

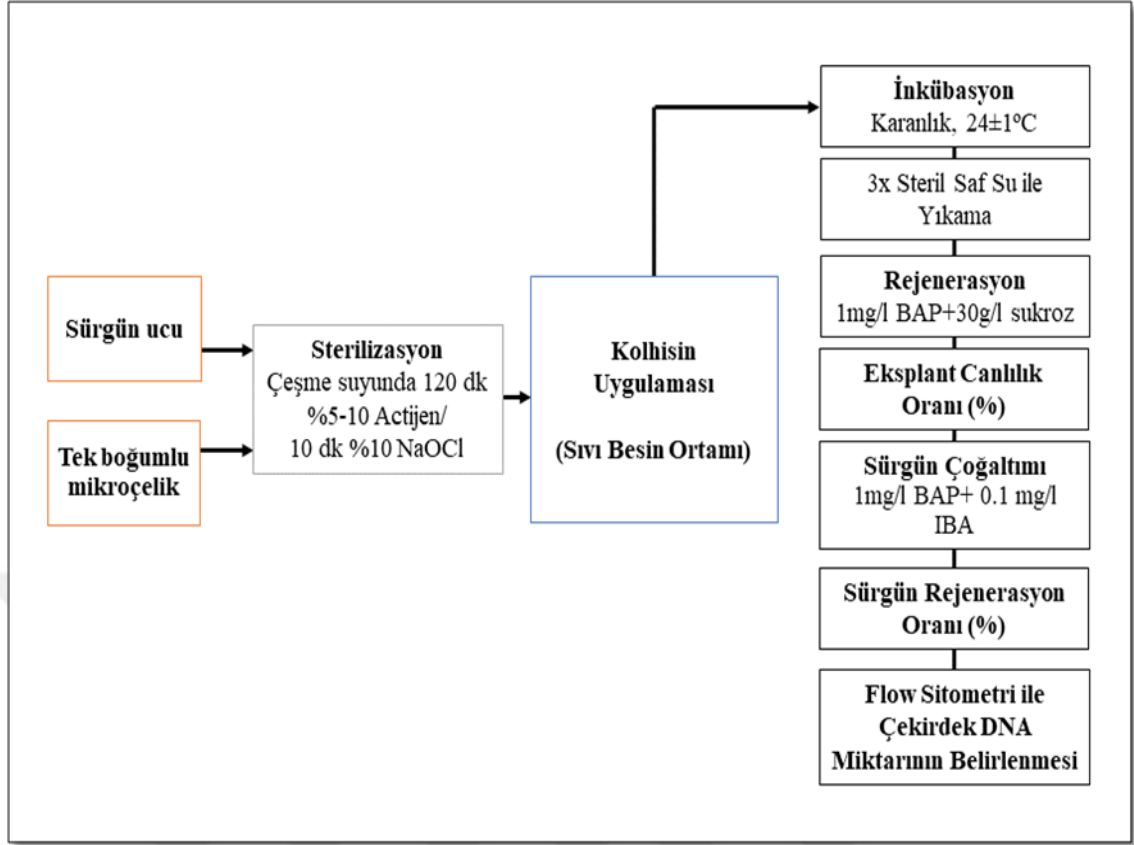
In vitro koşullardan elde edilen kalluslardan sürgün rejenerasyonu sağlanması 1 mg/l BAP içeren MS besin ortamı; rejenerasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Bu ortamdan elde edilen sağlıklı sürgünlerde rejenerasyonun devamlılığını sağlamak için 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA içeren MS sürgün çoğaltma ortamına ve daha sonra sürgünlerin canlılığını sürdürmesi için 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA + 0.1 mg/l GA₃ içeren MS ortamına aktarılmıştır. Canlılığını ve uzamasını sürdüren sürgünlerde doku kararmasını engellemek için eksplantlar BBD içermeyen MS besin ortamına 2-3 kez alt kültüre alınmıştır. Gelişen ve 4-5 yapraklı hale gelen bitkicikler kromozom katlama analizi için çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.8 *In vitro* kolhisin uygulamaları ve mutant adayı bitkiciklerin elde edilmesi

3.2.8.1 Tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantlarında *in vitro* kolhisin uygulaması

Tez çalışmasında kullanılan kolhisin dozları önceki çalışmalarda asma sürgün ucu ve/veya tek boğumlu mikro çelik eksplantlarına sıvı besin ortamında uygulanan dozlar dikkate alınarak belirlenmiştir (Xie vd. 2015, Sinski vd. 2014, Chang vd. 2014, Yücel 2008, Notsuka vd. 2000 ve Tepe vd. 2002). Kolhisin, her iki çeşitte tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantlarına sıvı MS besin ortamında uygulanmıştır. Bu amaçla eksplantlar, her 100 ml'lik erlenmayer içerisinde 50 ml hacmindeki sıvı besin ortamına sekiz farklı dozda: 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 μM kolhisin ilave edilmiştir. Hazırlanan ortamlar, 24°C'de karanlık koşullarda, 100 rpm hızındaki orbital çalkalayıcı üzerinde ½ saat süre ile inkübe edilmiştir.

½ saat sürede farklı dozda yapılan kolhisinin uygulamasının sonucunda yüksek dozdan başlayarak en iyi canlılık ve rejenerasyon gösteren üç farklı dozdaki (1000, 1250, 1500 μM) kolhisin uygulaması yapılmıştır. Kolhisin yine her iki çeşitte tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantlarına sıvı MS besin ortamında uygulanmıştır. Hazırlanan ortamlara kolhisin ilave edilerek 24°C'de karanlık koşullarda, 100 rpm hızındaki orbital çalkalayıcı üzerinde 24 ve 48 saat sürelerde inkübe edilmiştir (Şekil 3.12). Kolhisin doz ve inkübasyon süreleri çizelge 3.4'de verilmiştir. Kolhisin uygulamaları üç tekerrürlü ve her tekerürde 10 eksplant bulunacak şekilde kurulmuştur. Sürgün rejenerasyon ortamına aktarılmadan önce kolhisinin bitki dokularından uzaklaştırılması için eksplantlar 3 × 5 dk steril distile sudan geçirilmiştir (Şekil 3.11)



Şekil 3.11 Sürgün ucu ve tek boğumlu mikro çelik eksplantlarında *in vitro* kolhisin uygulamasının aşamaları

Çizelge 3.3 Kolhisin dozları ve inkübasyon süreleri

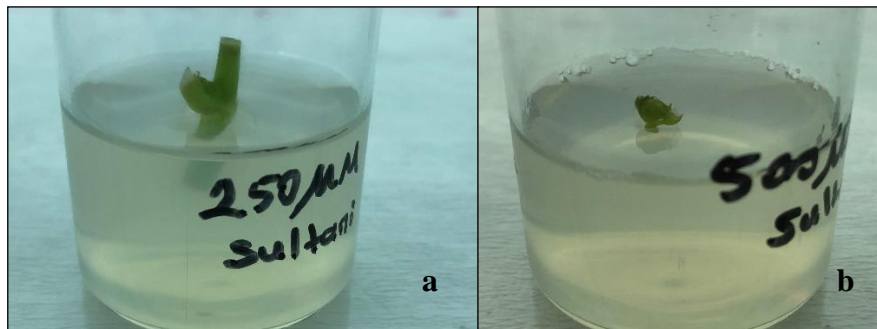
| Kolhisin dozu (μM) | İnkübasyon süresi (saat) |
|---------------------------------|--------------------------|
| 250 | $\frac{1}{2}$ |
| 500 | $\frac{1}{2}$ |
| 750 | $\frac{1}{2}$ |
| 1000 | $\frac{1}{2}$ |
| | 24 |
| | 48 |
| 1250 | $\frac{1}{2}$ |
| | 24 |
| | 48 |
| 1500 | $\frac{1}{2}$ |
| | 24 |
| | 48 |
| 1750 | $\frac{1}{2}$ |
| 2000 | $\frac{1}{2}$ |



Şekil 3.12 Farklı dozlarda kolhisin içeren sıvı besin ortamlarına Uslu çeşidi tek boğumlu mikro çelik eksplantlarının inkübasyonu

3.2.8.2 Kolhisin uygulanan tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonu ile mutant adayı bitkiciklerin elde edilmesi

Kolhisin uygulamalarının ardından eksplantların inkübe edildiği ortam olarak sürgün rejenerasyon ortamı ($1 \times MS + 1 \text{ mg/l BAP}$) kullanılmıştır (Şekil 3.13). Sürgün rejenerasyon ortamında 30 gün sonunda canlı eksplant sayısı yüzde (%) olarak belirlenmiş ve sürgün uzunlukları ölçülmüştür. Sürgün rejenerasyon ortamındaki sürgünlerin devamlılığını sağlamak için sürgün ucu ve tek boğumlu mikro çelik eksplantlarından gelişen ana ve yan sürgünler sürgün çoğaltım ortamına ($1 \times MS + 1 \text{ mg/l BAP} + 0.1 \text{ mg/l IBA}$) kültüre alınmıştır. 30 gün sonunda sürgün çoğaltım ortamında gelişen sağlıklı sürgünlerin rejenerasyon oranı (%) belirlenmiş ve sürgün uzunlukları ölçülmüştür. Sağlıklı bir şekilde gelişen ve 4-5 yapraklı duruma gelen sürgünlerden flow sitometride çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi için yaprak örneği alınmıştır.



Şekil 3.13 Sultani Çekirdeksiz çeşidinde (a) tek boğumlu mikro çelik ($250 \mu\text{M}$ kolhisin dozu) ve (b) sürgün ucu ($500 \mu\text{M}$ kolhisin dozu) eksplantının sürgün rejenerasyon ortamına alınması

3.2.9 *In vitro* orizalin ve kolhisin uygulanan eksplantlarda rejenerasyon ve sürgün çoğaltım ortamında mutant adayı bitkiciklerde incelenen özellikler

3.2.9.1 Eksplant canlılık oranı (%) ve LD₅₀ değeri

Orizalin ve kolhisin uygulamalarının ardından eksplantlar rejenerasyon ortamına alınmıştır. 30 gün sonunda canlı kalan eksplantlar için, başlangıç eksplant sayısına göre canlılık oranı (%) belirlenmiştir. Eksplantların yaklaşık %50'sini öldüren doz (LD₅₀ değeri) belirlenmiş olup, daha sonraki çalışmalarda kullanılacak optimum uygulama dozları saptanmıştır.

3.2.9.2 Sürgün rejenerasyon oranı (%)

Eksplant canlılığı belirlenen ve canlı olarak değerlendirilen eksplantlar sürgün çoğaltma ortamında alt kültüre alınmıştır. Bu ortamda 30 günün sonunda rejenerasyon olan eksplantların sayısı ve başlangıç eksplant sayısına göre sürgün rejenerasyon oranı (%) hesaplanmıştır.

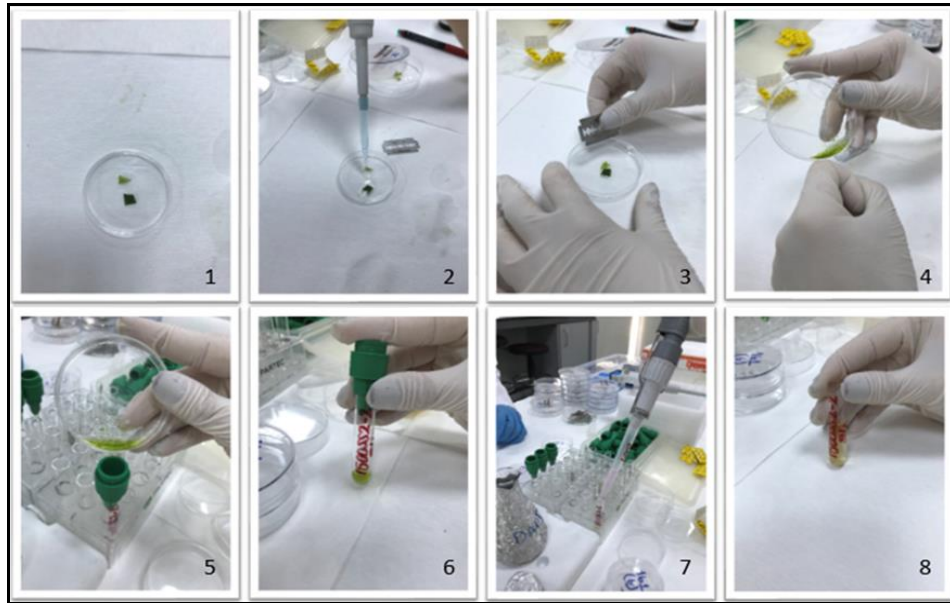
3.2.9.3 Başlangıç sürgünü ve rejenerasyon sonrası sürgün uzunlukları

Kolhisin uygulamasının ardından canlılık oranı belirlenen sürgünlerin başlangıç sürgün uzunlukları ve rejenerasyon sonrası sürgün uzunlukları cetvel yardımıyla 'cm' olarak ölçülmüştür.

3.2.9.4 Çekirdek DNA içeriğinin belirlenmesi

In vitro koşullarda elde edilen mutant adayı asma bitkiciklerinin genç dokularından alınan örnekler üzerinde hücre çekirdeklerinin ayıklanma ve boyanma işlemleri ile flow sitometri analizi Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çekirdek DNA içeriğini ve ploidi seviyesini belirlemek için çekirdek DNA analizi yapılmıştır. Analizde CyStainUV Precise P kiti (SYSMEX) kullanılmıştır. *In vitro* koşullarda 4-5 yapraklı hale gelen asmaların genç kısımlarından 15 µg ve domates bitkisinden alınan 10 µg taze yaprak dokuları alınarak petri kabında 0.5 ya da 0.6 ml nükleus izolasyon tamponu ile jilet ile küçük parçalara ayrılana kadar parçalanmıştır. Petri kabına A stok solüsyonundan (20 ml MgSO₄ buffer, 20 mg Dithiothreitol, 500 µl PI stok, 550 µl TritonX-100) 1 ml eklenmiş ve bu solüsyon içinde 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra parçalanan çekirdeklere 5 µM DAPI boyama solüsyonundan (4',6-diamidino-2-phenylindole) 2,4 ml eklenmiş ve bu solüsyonda da 5 dk bekletilmiştir. Süspansiyon edilmiş çekirdekler 30-33 µm filtreye sahip mikro-santrifüj tüplerine transfer edilerek filtre edilmiştir (Şekil 3.14). Mikro-santrifüj tüpünün dibinde oluşan tortu (süpernatant) son olarak 400 µl B solüsyonu (5 ml solüsyon A, 10 µl RNase ve DNase free) içerisinde çözdürülmüştür. Çekirdek izolasyonu sonucunda hazırlanan örnekler 5 ml'lik cam tüplerde 37°C'de 15 dk bekletildikten sonra flow sitometri cihazıyla analiz edilmiştir. Flow sitometri analizleri Petersen vd. (2002)'nin yöntemine göre yapılmıştır. Her bir örnekte tek çekirdeğin toplam DNA'sının floresansa verdiği cevap 5.000 çekirdeğin DNA içeriği incelenerek PA flow sitometri (Partec 06-5-4003) ile analiz edilmiştir (Petersen vd 2002, Glowacka vd 2010).



Şekil 3.14 Kolhisin uygulanmış (1500 µM dozunda) Sultani Çekirdeksiz çeşidi sürgün ucu eksplantından rejenere olan bitkiciklerin yapraklarından alınan örneklerde DNA içeriğinin belirlenmesi için uygulanan protokol aşamaları

Bir bitki hücresindeki DNA miktarı “C” harfi ile pikogram cinsinden belirtilir. C değeri haploid genomu; 2C değeri ise diploid somatik genomun DNA miktarını ifade etmektedir. Bitkilerin çekirdek DNA içeriklerine ait belirlenen C değerleri pikogram cinsinden belirlenmekte ve nükleotid baz çiftine (1 pg = 980 Mbp) dönüştürülebilmektedir (Tuna vd. 2016).

Vitis vinifera'nın çekirdek DNA miktarının tespiti için, asmanın standart bitkisi olan domates (Leal vd. 2006) ve örneklerin G1 piklerinin verdiği floresans yoğunlukları ile doğru orantılı olarak hesaplanıp karşılaştırılması yapılmıştır. Asmanın floresans yoğunluğunun standart bitkinin floresans yoğunluğuna oranı, asmanın standart DNA miktarı (1.96) ile çarpılarak örnek bitkinin çekirdek DNA miktarı aşağıdaki formüle göre tayin edilmiştir.

$$\text{Asma çekirdek DNA miktarı} = \frac{\text{Asmanın Floresans Yoğunluğu}}{\text{Domatesin Floresans Yoğunluğu}} \times \text{Asmanın DNA miktarı}$$

Bu tez çalışmasında yapılan *in vitro* denemeler sonucu alınan her bir bitki örneğinin flow sitometri okuması sonucunda oluşturduğu pik, bu standart (domates) pikler ile karşılaştırılarak ploidi düzeyleri belirlenmiştir.

3.2.10 Deneme deseni ve istatistik analizler

Çalışmada yürütülen denemelere ait veriler üç tekerrürlü olarak varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Bulgular ve istatistik değerlendirmeler ortalama ve standart hata ile birlikte sunulmuştur. İstatistik değerlendirmelerde ortalamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde LSD testi (en küçük anlamlı fark testi) uygulanmıştır ve istatistik önemlilik düzeyi %5 ile %1 olarak dikkate alınmıştır. İstatistik değerlendirmeler için JMP (ver. 14) bilgisayar paket programı kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu Üzüm Çeşitlerinde Yüzey Sterilizasyon Yöntemlerinin Eksplant Canlılık Oranı Üzerine Etkisi

Tez çalışmasında kullanılan kallus, koltuk altı meristemi, sürgün ucu, tek boğumlu mikro çelik eksplantlarının yüzey sterilizasyon yöntemlerine ait bulgular, eksplant tipine ve çeşitlere göre karşılaştırılarak aşağıda açıklanmıştır.

4.1.1 Yüzey sterilizasyon yöntemlerinin sürgün ucu eksplantının canlılık oranı üzerine etkisi

Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerine ait sürgün ucu eksplantlarının Actijen ile üç farklı sterilizasyon yönteminden elde edilen bulgular çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Sürgün ucu eksplantına uygulanan sterilizasyon yöntemleri ile çeşitler arasında, canlılık oranı bakımından istatistik olarak 0.05 düzeyinde bir interaksiyon bulunmuştur (Çizelge 4.1). Uygulamalar karşılaştırıldığında 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Uygulamalar arasında en yüksek canlılık oranı %10’luk Actijen çözeltisinde 10 dk süre uygulamasında elde edilmiştir. Çeşitler karşılaştırıldığında da 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde %5’lik Actijen çözeltisinde 5 dk, %10’luk Actijen çözeltisinde 5 dk ve %10’luk Actijen çözeltisinde 10 dk süre ile yapılan sterilizasyon uygulamalarının sonucunda canlılık oranları sırasıyla %85.00, 89.79 ve 90.00 olarak tespit edilmiştir. Uslu çeşidinde ise %5’lik Actijen çözeltisinde 5dk, %10’luk Actijen çözeltisinde 5 dk ve %10’luk Actijen çözeltisinde 10 dk süre ile yapılan sterilizasyon uygulamalarının sonucunda canlılık oranları sırasıyla %72.43, 80.56 ve 92.30 olarak tespit edilmiştir. Actijen dozu ve uygulama süresi arttıkça artan bir canlılık oranı her iki çeşitte de görülmektedir.

Çizelge 4.1 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde yüzey sterilizasyonunun sürgün ucu eksplant canlılık oranına (%) etkisi

| Uygulama (Actijen) | | Çeşit | | |
|--------------------|-----------|---------------------|----------------|----------|
| Doz (%) | Süre (dk) | Sultani Çekirdeksiz | Uslu | Ortalama |
| 5 | 5 | 85.00 ± 2.89 a | 72.43 ± 1.49 a | 78.72 c |
| 10 | 5 | 89.79 ± 0.07 ab | 80.56 ± 3.39 c | 85.17 b |
| 10 | 10 | 90.00 ± 2.89 a | 92.30 ± 2.47 b | 91.15 a |
| Ortalama | | 88.26 a | 81.76 b | |

CV(%):4.05, **%1 düzeyinde önemli *%5 düzeyinde önemli

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{uyg}:5.26^{**}$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{çesit}:4.28^{**}$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{çesit \times uyg}:7.24^*$

4.1.2 Yüzey sterilizasyon yöntemlerinin tek boğumlu mikro çelik eksplantının canlılık oranı üzerine etkisi

Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerine ait tek boğumlu mikro çelik eksplantlarının Actijen ile üç farklı sterilizasyon yönteminden elde edilen bulgular çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Tek boğumlu mikro çelik eksplantına uygulanan sterilizasyon yöntemleri ile çeşitler arasında, canlılık oranı bakımından istatistik olarak 0.05 düzeyinde bir interaksiyon bulunmuştur (Çizelge 4.2). Uygulamalar karşılaştırıldığında 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Uygulamalar arasında en yüksek canlılık oranı %20’lik NaOCl çözeltilinde 15 dk süre uygulamasında elde edilmiştir. Çeşitler karşılaştırıldığında da 0.05 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde %10’luk Actijen çözeltilinde 10 dk, %20’lik NaOCl çözeltilinde 10 dk ve 15 dk süre ile yapılan sterilizasyon uygulamalarının sonucunda canlılık oranları sırasıyla %27.50, 83.00 ve 87.50 olarak bulunmuştur. Uslu çeşidinde %10’luk Actijen çözeltilinde 10 dk, %20’lik NaOCl çözeltilinde 10 dk ve 15 dk süre ile yapılan sterilizasyon uygulamalarının sonucunda canlılık oranları sırasıyla %30.00, 71.43 ve 85.70 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde yüzey sterilizasyonunun tek boğumlu mikro çelik eksplant canlılık oranına (%) etkisi

| Doz (%) | | Süre (dk) | Çeşit | | |
|----------|------|--------------|---------------------|----------------|----------|
| Actijen | NaOC | | Sultani Çekirdeksiz | Uslu | Ortalama |
| 10 | - | 10 | 27.50 ± 1.45 c | 30.00 ± 2.89 c | 28.75 c |
| - | 20 | 10 | 83.00 ± 1.69 a | 71.43 ± 1.44 a | 77.21 b |
| - | 20 | 15 | 87.50 ± 1.45 a | 85.70 ± 0.00 b | 86.60 a |
| Ortalama | | | 66.00 a | 62.37 b | |

CV(%):4.97, **%1 düzeyinde önemli *%5 düzeyinde önemli

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{uyg}: 3.70^{**}$

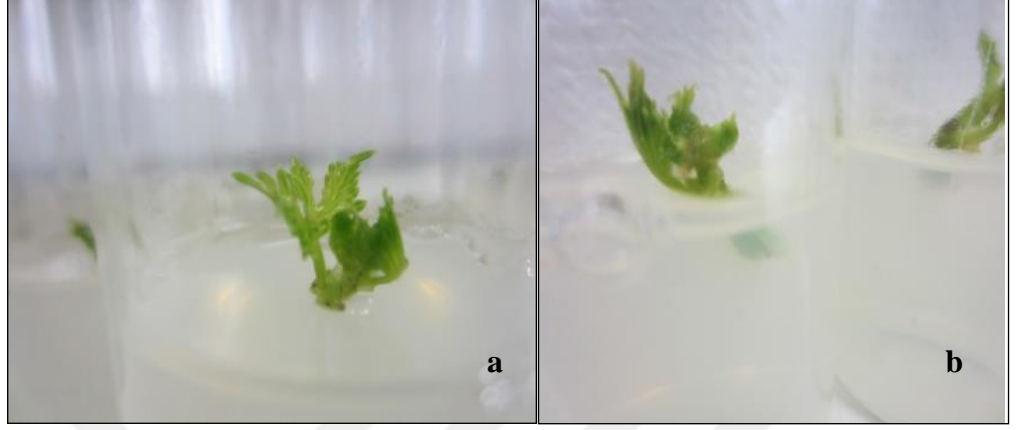
Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{çeşit}: 3.02^*$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{çeşit \times uyg}: 5.24^*$

4.2 Sürgün Ucu Eksplantında Canlılık ve Rejenerasyon Bulguları

Sürgün ucu eksplantının başlangıç ortamındaki (4.4 g/l MS + 30 g/l sukroz + 6.5 g/l agar + 1 mg/l BAP) canlılık oranı ve ana ve yan sürgün oluşturma kapasitesi ile sürgün çoğaltma ortamında (4.4 g/l MS + 30 g/l sukroz + 6.5 g/l agar + 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA) rejenerasyon başarısının ifadesi çizelge 4.3 ve 4.4'de verilmiştir. Sürgün ucu kültüründe canlılık oranı bakımından Sultani Çekirdeksiz çeşidinin, Uslu çeşidine göre daha başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Sürgün ucu kültüründe canlılık oranı Sultani Çekirdeksiz çeşidinde %90.24 olarak gerçekleşirken, Uslu üzüm çeşidinde %80.56 olarak gerçekleşmiştir. Rejenerasyon oranları ise, Sultani Çekirdeksiz çeşidinde %95.24, Uslu çeşidinde %75.46 olarak elde edilmiştir. Hem canlılık oranında hem de rejenerasyon oranı incelendiğinde çeşitler arasında %1 düzeyinde istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmuştur. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sırasıyla başlangıç ortamı ve sürgün çoğaltım ortamından elde edilen sürgünlerdeki ortalama ana sürgün uzunluğu (1.55-1.89 cm) ve eksplant başına yan sürgün oranı (%54.17-25.14) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4). Uslu çeşidi Sultani Çekirdeksiz çeşidi ile karşılaştırıldığında ana sürgün uzunluğu ve eksplant başına yan sürgün oranından daha yüksek bulunmuştur. Eksplant başına ortalama ana sürgün uzunluğuna bakıldığında başlangıç ortamı ve sürgün çoğaltım ortamından elde edilen sürgünlerde çeşitler arasında %1 düzeyinde istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmuştur. Eksplant başına ortalama yan sürgün sayısında ise başlangıç ortamından elde edilen sürgünlerde çeşitler arasında %1 düzeyinde istatistiki bir fark bulunurken; sürgün çoğaltım ortamından elde

edilen sürgünlerde çeşitler arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.3 ve 4.4).



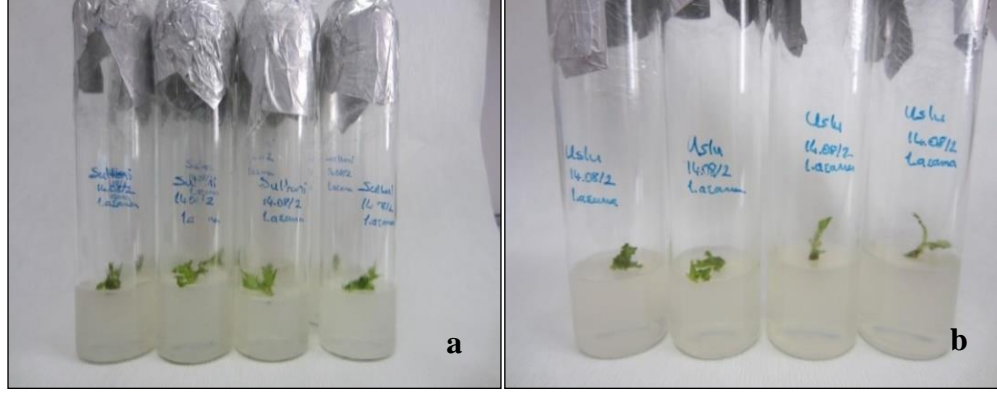
Şekil 4.1 Sultani Çekirdeksiz çeşidi (a) ve Uslu çeşidinde (b) başlangıç ortamındaki eksplantların 7 günlük görünümü

Çizelge 4.3 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitlerinde sürgün ucu eksplantında *in vitro* canlılık oranı (%), eksplant başına ortalama ana sürgün ve yan sürgün uzunlukları (cm) ve eksplant başına yan sürgün oranı (%)

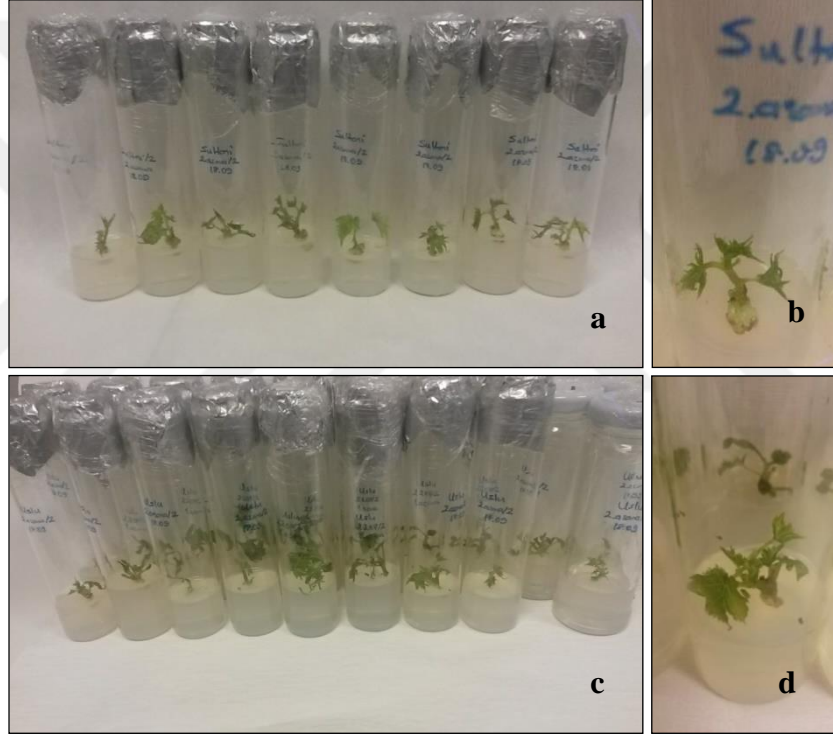
| | Sultani Çekirdeksiz | Uslu | Ortalama | CV (%) ve LSD |
|--------------------------------------|---------------------|----------------|----------|----------------|
| Canlılık Oranı (%) | 90.24 ± 0.62 a | 80.56 ± 1.99 b | 85.40 | 2.99, **5.80 |
| Eksplant Başına Ortalama Ana Sürgün | 1.55 ± 0.60 a | 1.02 ± 0.01 b | 1.29 | 5.89, **0.17 |
| Eksplant Başına Ortalama Yan Sürgün | 0.92 ± 0.09 a | 0.50 ± 0.00 b | 0.71 | 2.79, **0.27 |
| Eksplant Başına Yan Sürgün Oranı (%) | 54.17 ± 4.17 a | 15.48 ± 0.69 b | 34.82 | 14.85, **11.72 |

** %1 düzeyinde önemli, * %5 düzeyinde önemli ve ±: standart hata

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.2 Sultani Çekirdeksiz çeşidi (a) ve Uslu çeşidinde (b) başlangıç ortamındaki eksplantların 10 günlük görünümü



Şekil 4.3 Sürgün çoğaltma ortamına alınan sürgünlerin 10 gün sonraki gelişme durumu; Sultani Çekirdeksiz (a ve b), Uslu (c ve d)

Çizelge 4.4 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitlerinde sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerin sürgün çoğaltım ortamındaki rejenerasyon oranı (%), eksplant başına ortalama ana sürgün ve yan sürgün uzunlukları (cm), eksplant başına ortalama yan sürgün sayısı ve eksplant başına yan sürgün oranı (%)

| | Sultani Çekirdeksiz | Uslu | Ortalama | CV (%) ve LSD |
|--------------------------------------|---------------------|----------------|----------|---------------------------|
| Rejenerasyon oranı (%) | 95.24 ± 0.91 a | 75.46 ± 2.63 b | 85.35 | 3.99, **7.72 |
| Eksplant Başına Ortalama Ana Sürgün | 1.89 ± 0.08 a | 1.16 ± 0.02 b | 1.53 | 6.97, **0.24 |
| Eksplant Başına Ortalama Yan Sürgün | 1.07 ± 0.04 | 0.80 ± 0.10 | 0.94 | 13.97, ^{öd} 0.29 |
| Eksplant Başına Yan Sürgün Oranı (%) | 25.14 ± 7.91 a | 8.41 ± 1.46 b | 12.78 | 13.74, **5.32 |

** %1 düzeyinde önemli, ^{öd} düzeyinde önemli ve ±: standart hata

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.4 *In vitro* sürgün rejenerasyonundan 4 hafta sonra sağlıklı sürgünlerin 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA içeren MS sürgün çoğaltım ortamlarına transfer edilmesi

4.3 Kallus Eksplantında Rejenerasyon Bulguları

Kallus elde etmek üzere üç farklı ortamdan *in vitro* rejenerasyon bulguları uygulamalara göre aşağıda açıklanmıştır.

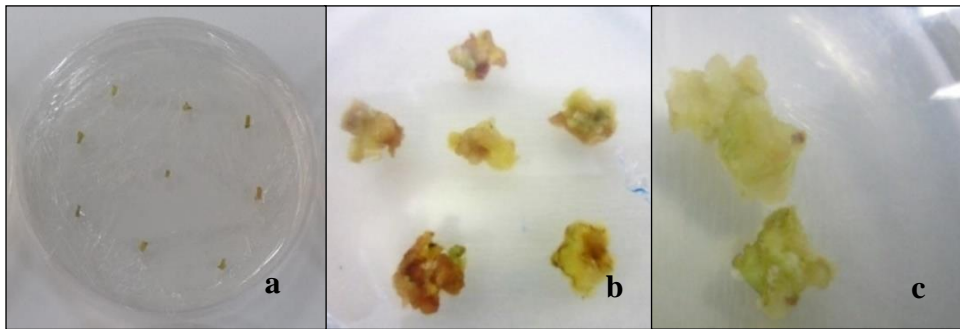
Birinci uygulamada yaprak diskleri ve boğum eksplantları 5.0, 10.0 ve 15.0 mg/l NAA içeren 3 farklı MS ortamına kültüre alınmıştır. 30 gün sonunda her iki çeşitte yaprak disklerinde kallus oluşumu gerçekleşmemiştir. İkinci uygulamada 0.5 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D (Babalık ve Baydar 2008) ve bu kallus gelişim ortamı modifiyesi olan 1 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamlarında 15 gün sonunda kallus oluşumu

gözlenmiştir. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde kallus gelişim oranı bu uygulamada sırasıyla yaprak diskleri üzerinde koyu sarı renkte ve süngerimsi yapıda %93.00 ve %100.00 oranında gerçekleşmiştir. Boğum arası eksplantlarından ise yine bu ortamlarda sırasıyla %57.00 ve %93.00 oranında kallus gelişimi gözlenmiştir. Üçüncü uygulamada ise; 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D (Keskin ve Kunter 2007) ve 2 mg/l BAP + 0.3 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA (Khan vd. 2015) ilave edilmiş iki farklı MS ortamında yaprak ve boğum eksplantları kültüre alınmıştır. Her iki uygulamada da Sultani Çekirdeksiz çeşidinde %100.00 kallus gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde farklı besin ortamı ve eksplant tipine bağlı kallus oluşturma oranı (%)

| Eksplant | BBD dozu (mg/l) | | | Kallus tekstürü | Kallus oluşturma oranı (%) |
|--------------|-----------------|-------|-----|------------------------|----------------------------|
| | BAP | 2,4-D | NAA | | |
| Yaprak diski | 0.5 | 1 | - | Koyu sarı, süngerimsi | 93 |
| | 1 | 2 | - | Koyu sarı, süngerimsi | 100 |
| Boğum arası | 0.5 | 1 | - | Kahverengi, süngerimsi | 57 |
| | 1 | 2 | | Koyu sarı, süngerimsi | 93 |
| | 1 | 0.1 | | Sarı-yeşil, gevrek | 100 |
| | 2 | 0.3 | 0.2 | Sarı-yeşil, gevrek | 100 |

Sonuç olarak 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D ortamındaki kallusların, diğer tüm uygulamalar ile karşılaştırıldığında, tekstür açısından daha sağlıklı, gevrek, yeşil yapıda olduğu bulunmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Sultani Çekirdeksiz çeşidinde 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamındaki boğum arası eksplantları (a) ve boğum arası eksplantından elde edilen kalluslar (b ve c)

4.4 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu Üzüm Çeşitlerinde *in vitro* Orizalin Uygulaması Bulguları

4.4.1 Orizalin uygulamalarının koltuk altı meristem eksplantında canlılık oranına etkisi ve letal dozun belirlenmesi

Sıvı ve katı MS besin ortamlarında (BBD içermeyen MS besin ortamı) koltuk altı meristemi eksplantına 24, 36 ve 48 saat inkübasyon süresinde 0, 20, 30 ve 40 µM dozunda orizalin uygulamasının üzüm çeşitlerindeki canlılık oranı bulguları ile elde edilen letal doz değeri çeşitlere göre açıklanmıştır. Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde sıvı ve katı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişki grafikleri EK-1'de ve canlılık oranına etkilerine ait grafikler ise EK-2'de verilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde canlılık oranı ve letal dozun belirlenmesi: Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristem eksplantının sıvı MS besin ortamında orizalin dozu × inkübasyon süresi uygulamaları arasında, canlılık oranı bakımından istatistik olarak önemli bir interaksiyon bulunmamıştır. Tüm inkübasyon süreleri incelendiğinde canlılık oranının %55.57-97.50 arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Kontrol uygulamasında en yüksek canlılık oranı elde edilmiş olup, bu beklenen bir sonuçtur. En düşük doz olan 20 µM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek canlılık oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%88.90) ve inkübasyon süresine bağlı olarak canlılık oranı azalarak 36 saat için %80.00, 48 saat için %78.42 olarak belirlenmiştir. İkinci doz olan 30 µM uygulamasında canlılık oranında süreye bağlı olarak azalma gerçekleşmiş ve sırasıyla %90.00, 75.93 ve 72.23 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 40 µM uygulamasında ise 24 saat sürede %55.57 olarak belirlenen canlılık oranı; 36 saat uygulamada %73.33 ve 48 saatte de %60.00 olarak tespit edilmiştir. Bu değerlerden %73.33 canlılık oranı beklenenin üzerinde elde edilen bir sonuç olarak kaydedilmiştir. 24 saat ve 48 saat değerleri arasındaki farklılık ise istatistik olarak önemli değildir. Orizalinin 24, 36 ve 48 saat olmak üzere her üç inkübasyon süresinde orizalin dozu arttıkça canlılık oranının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek orizalin dozu olan 40 µM dozunun 24, 36 ve 48 saat süre inkübasyona

bırakılması sonucunda canlılık oranlarının doz sırasıyla %55.57, 73.33 ve 60.00 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde canlılık oranı açısından letal orizalin dozu değerleri incelendiğinde; koltuk altı meristemi eksplantı için sıvı besin ortamında ise uygulanan dozlarda %50'nin altında bir canlılık oranına rastlanmamıştır. Letal doz değerlendirmesi yapıldığında, sıvı MS ortamında orizalinin 40 µM dozunun 24 ve 48 saatlik uygulaması %50 canlılık oranı için en uygun doz olarak kabul edilebilir bulgu olarak yorumlanabilir.

Çizelge 4.6 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-------------|--------------------------|--------------|--------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 97.50 ± 2.50 | 97.50 ± 2.50 | 97.50 ± 2.50 | 97.50 a |
| 20 | 88.90 ± 3.88 | 80.00 ± 0.00 | 78.42 ± 0.80 | 82.44 b |
| 30 | 90.00 ± 0.00 | 75.93 ± 0.93 | 72.23 ± 9.10 | 80.50 b |
| 40 | 55.57 ± 5.57 | 73.33 ± 6.67 | 60.00 ± 0.00 | 62.97 c |
| Ortalama | 83.82 | 81.70 | 77.04 | |

CV (%):11.58, **%1 düzeyinde önemli^{öd} önemli değil, ±: standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz}: :8.79**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: , LSD_{süre}^{öd}:-

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz×süre}^{öd}:-

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristem eksplantının katı MS besin ortamında orizalin dozu × inkübasyon süresi uygulamaları bakımından istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. Tüm inkübasyon süreleri incelendiğinde canlılık oranları %28.89-100.00 arasında değişmiştir (Çizelge 4.7). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristem eksplantına katı besin ortamında en yüksek canlılık oranı kontrol grubu ile beraber 20 µM orizalin dozunda 24 saat süre uygulamasından elde edilmiştir. En düşük doz olan 20 µM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek canlılık oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%100.00) ve inkübasyon süresine bağlı olarak canlılık oranı 36 saat için %66.67, 48 saat için %66.70 olarak belirlenmiştir. İkinci doz olan 30 µM uygulamasında canlılık oranında süreye bağlı olarak azalma gerçekleşmiş ve sırasıyla %75.00, 55.57 ve 53.33 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 40 µM uygulamasında ise 24 saat sürede %70.00 olarak belirlenen canlılık oranı; 36 saat uygulamada %60.00 ve 48 saatte de %28.89 olarak bulunurken; %28.89 canlılık oranı beklenen canlılık oranının altında bir sonuç

olarak kaydedilmiştir. İnkübasyon süreleri ve dozlar arasındaki farklılık istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Her üç sürede de (24, 36 ve 48 saat) Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristem eksplantına katı MS besin ortamında uygulanan orizalin dozu arttıkça genel olarak canlılık oranı azalmıştır (Çizelge 4.7) Sultani Çekirdeksiz çeşidinde canlılık oranı açısından orizalin mutageni için letal doz değerlendirmesi yapıldığında, katı MS ortamında orizalinin 40 µM × 48 saat uygulaması %50 canlılık oranı için en uygun doz × inkübasyon süresi olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-------------|--------------------------|-----------------|-----------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 100.00 ± 0.00 a | 100.00 ± 0.00 a | 100.00 ± 0.00 a | 95.24 a |
| 20 | 100.00 ± 0.00 a | 66.67 ± 8.34 bc | 66.70 ± 0.00 bc | 77.78 b |
| 30 | 75.00 ± 0.00 b | 55.57 ± 5.57 d | 53.33 ± 3.34 d | 61.30 c |
| 40 | 70.00 ± 5.01 bc | 60.00 ± 0.00 cd | 28.89 ± 4.45 e | 52.96 d |
| Ortalama | 85.06 a | 69.37 b | 61.04 c | |

CV (%):9.04, **%1 düzeyinde önemli, ±: standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{doz}:6.08^{**}$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{süre}:5.26^*$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{doz \times süre}:10.53^{**}$

Uslu çeşidinde canlılık oranı ve letal dozun belirlenmesi: Uslu çeşidinde koltuk altı meristem eksplantına sıvı besin ortamında uygulanan orizalin dozu × inkübasyon süreleri arasında bitki canlılık bakımından istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. Tüm inkübasyon süreleri incelediğinde canlılık oranları %50.00-100.00 arasında değişmiştir (Çizelge 4.8). Uslu çeşidinde koltuk altı meristem eksplantında sıvı besin ortamında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. En düşük doz olan 20 µM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek canlılık oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%93.33) ve canlılık oranı 36 saat için %85.00, 48 saat için %91.67 olarak belirlenmiştir. İkinci doz olan 30 µM uygulamasında canlılık oranı sırasıyla %90.00, 69.45 ve 78.33 olarak belirlenmiştir. %91.67 ve 78.33 canlılık oranları beklenenin üstünde sonuçlardır. En yüksek doz olan 40 µM uygulamasında ise 24 saat sürede %84.29 olarak belirlenen canlılık oranı; 36 saat uygulamada %76.67 ve 48 saatte de %50.00 olarak kaydedilmiştir. İnkübasyon

süreleri arasındaki ve dozlar arasındaki farklılık istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Uslu çeşidinde canlılık oranı açısından letal orizalin dozu değerleri incelendiğinde; sıvı MS ortamında orizalinin 40 µM × 48 saat uygulaması LD₅₀ değeri olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.8 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-------------|--------------------------|----------------|----------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 94.43 ± 0.57 a | 94.43 ± 0.57 a | 94.43 ± 0.57 a | 94.43 a |
| 20 | 93.33 ± 1.67 a | 85.00 ± 0.00 b | 91.67 ± 1.67 a | 90.00 b |
| 30 | 90.00 ± 0.00 a | 69.45 ± 2.78 d | 78.33 ± 1.67 c | 79.26 c |
| 40 | 84.29 ± 2.86 b | 76.67 ± 1.67 c | 50.00 ± 0.00 e | 70.32 d |
| Ortalama | 90.51 a | 81.39 b | 78.61 c | |

CV (%):6.04, ** %1 düzeyinde önemli, ±: standart hata

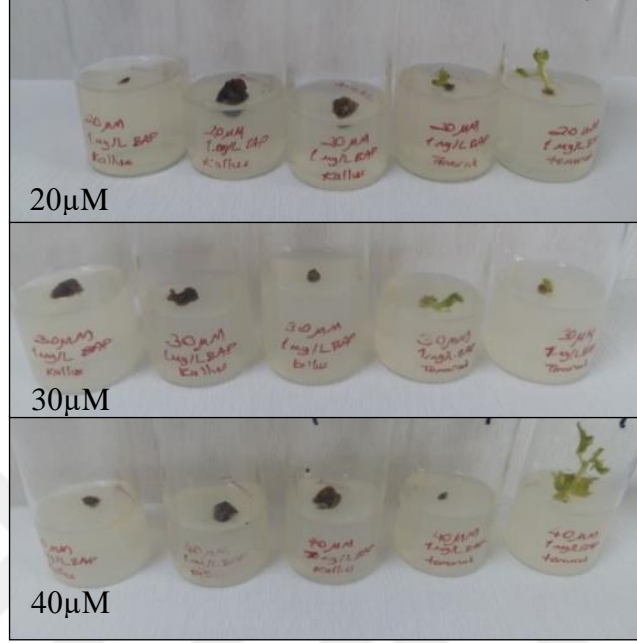
Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:2.57**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{süre}:2.23**

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz×süre}:10.53**

Uslu çeşidinde koltuk altı meristem eksplantına katı besin ortamında uygulanan orizalin dozu × inkübasyon süreleri arasında bitki canlılık bakımından 0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. Tüm inkübasyon süreleri incelendiğinde canlılık oranları %12.51-87.14 arasında değişmiştir (Çizelge 4.9). Uslu çeşidinde koltuk altı meristem eksplantına katı besin ortamında en yüksek canlılık oranı kontrol grubundan elde edilirken, en düşük canlılık oranı ise 40 µM orizalin dozunda 48 saat süre uygulamasından elde edilmiştir. En düşük doz olan 20 µM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek canlılık oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%86.67) ve bu oran 36 saat için %85.00, 48 saat için %61.11 olarak belirlenmiştir. İkinci doz olan 30 µM uygulamasında canlılık oranında süreye bağlı olarak azalma gerçekleşmiş ve sırasıyla %83.33, 80.00 ve 37.12 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 40 µM uygulamasında ise 24 saat sürede %80.00 olarak belirlenen canlılık oranı; 36 saat uygulamada %76.67 ve 48 saatte de %12.51 olarak kaydedilmiştir. İnkübasyon süreleri arasındaki ve dozlar arasındaki farklılık istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.9). Her üç sürede (24, 36 ve 48 saat) Uslu çeşidinde koltuk altı meristem eksplantına katı MS besin ortamında uygulanan orizalin mutageni dozu arttıkça canlılık oranı azalmıştır (Şekil 4.6). Uslu çeşidinde canlılık oranı açısından

orizalin mutageni için letal doz değerlendirmesi yapıldığında, katı MS ortamında orizalinin $30 \mu\text{M} \times 48$ saat uygulaması LD_{50} değeri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.6 Uslu üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında 24 saat süresince farklı dozlarda yapılan orizalin uygulamasından sonra sürgün rejenerasyon ortamına alınmış koltuk altı meristemi ve kallus ekplantlarının 18 günlük görünümü

Çizelge 4.9 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin koltuk altı meristem ekplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)

| Doz (μM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | Ortalama |
|-----------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | |
| 0 (kontrol) | 87.14 ± 2.86 a | 87.14 ± 2.86 a | 87.14 ± 2.86 a | 87.14 a |
| 20 | 86.67 ± 3.34 a | 85.00 ± 0.00 a | 61.11 ± 5.56 b | 77.59 b |
| 30 | 83.33 ± 1.67 a | 80.00 ± 5.01 a | 37.22 ± 3.89 c | 66.85 c |
| 40 | 80.00 ± 0.00 a | 76.67 ± 3.34 a | 12.51 ± 3.33 d | 57.78 d |
| Ortalama | 84.28 a | 82.20 a | 50.54 b | |

CV (%):8.02, ** %1 düzeyinde önemli, \pm : standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}}:6.70^{**}$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{süre}}:5.81^{**}$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz} \times \text{süre}}:11.46^{**}$

4.4.2 Orizalin uygulamalarının kallus eksplantında canlılık oranına etkisi ve letal dozun belirlenmesi

Sıvı ve katı MS besin ortamlarında (BBD içermeyen MS besin ortamı) kallus eksplantına 24, 36 ve 48 saat inkübasyon süresinde 0, 20, 30 ve 40 μ M dozunda orizalin uygulamasının üzüm çeşitlerindeki canlılık oranı bulguları ile elde edilen letal doz değeri çeşitlere göre açıklanmıştır. Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde sıvı ve katı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişki grafikleri EK-1’de ve canlılık oranına etkilerine ait grafikler ise EK-2’de verilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde canlılık oranı ve letal dozun belirlenmesi: Sultani Çekirdeksiz çeşidinde kallus eksplantına sıvı besin ortamında uygulanan orizalin dozu \times inkübasyon süreleri arasında bitki canlılık bakımından istatistik olarak önemli bir interaksiyon bulunmamıştır. Tüm inkübasyon süreleri incelediğinde canlılık oranları %37.50-58.33 arasında değişmiştir (Çizelge 4.10). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde kallus eksplantına sıvı besin ortamında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Kontrol uygulamasında en yüksek canlılık oranı elde edilmiş olup bu beklenen sonuçtur. En düşük doz olan 20 μ M uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek canlılık oranı 48 saat uygulamasından elde edilmiş (%54.17), 36 ve 48 saat için canlılık oranı sırasıyla %50.00 ve 50.00 olarak belirlenmiştir. İkinci doz olan 30 μ M uygulamasında canlılık oranı sırasıyla %42.86, 44.44 ve 44.44 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 40 μ M uygulamasında ise 36 saat sürede %50.00 olarak belirlenen canlılık oranı; 24 saat uygulamasında %37.50 ve 48 saatte de %38.72 olarak tespit edilmiştir. İnkübasyon süreleri arasında istatistik anlamda önemli bir fark bulunmazken; uygulama dozları arasında 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Orizalinin 24, 36 ve 48 saat olmak üzere her üç sürede de Sultani Çekirdeksiz çeşidinin kallus eksplantına MS besin ortamındaki en yüksek canlılık kontrol grubunda ve 20 μ M orizalin dozunun 36 ve 48 saat süresinden elde edilmiştir. Daha yüksek dozdan düşük doza nazaran yüksek canlılık oranı gerçekleşmesi beklenmeyen bir sonuçtur (Çizelge 4.10). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde canlılık oranı açısından letal doz değerlendirmesi yapıldığında, sıvı MS ortamında LD₅₀ değeri açısından %50’nin altında canlılık oranı

belirlenmemiştir. LD₅₀ değeri açısından için en uygun doz × inkübasyon süresi olarak 40 µM × 48 saat inkübasyon süresi kabul edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-------------|--------------------------|--------------|--------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 58.33 ± 8.34 | 58.33 ± 8.34 | 58.33 ± 8.34 | 58.33 a |
| 20 | 50.00 ± 1.45 | 50.00 ± 3.85 | 54.17 ± 4.17 | 51.39 a |
| 30 | 42.86 ± 0.00 | 44.44 ± 5.56 | 44.44 ± 5.56 | 43.92 b |
| 40 | 37.50 ± 2.50 | 50.00 ± 2.89 | 38.72 ± 1.89 | 42.07 b |
| Ortalama | 47.17 | 50.69 | 48.92 | |

CV (%):15.06, **%1 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil, ±: standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:6.70**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{süre}^{öd}:-

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz×süre}^{öd}:-

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde kallus eksplantına katı besin ortamında uygulanan orizalin dozu × inkübasyon süreleri arasında bitki canlılık bakımından istatistik olarak önemli bir interaksiyon bulunmamıştır. Tüm inkübasyon süreleri incelendiğinde canlılık oranları %25.00-82.23 arasında değişmiştir (Çizelge 4.11). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde kallus eksplantına katı besin ortamında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Kontrol uygulamasında en yüksek canlılık oranı elde edilmiş olup bu beklenen sonuçtur. En düşük doz olan 20 µM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek canlılık oranı 36 saat uygulamasında elde edilmiş (%66.67), 24 saat için %50.00 ve 48 saat için %58.34 olarak belirlenmiştir. İkinci doz olan 30 µM uygulamasında canlılık oranı sırasıyla %50.00, 53.33 ve 46.67 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 40 µM uygulamasında ise 24 saat sürede %50.00 olarak belirlenen canlılık oranı; 36 saat uygulamada %25.00 ve 48 saatte de %29.44 olarak kaydedilmiştir. İnkübasyon süreleri arasında istatistik anlamda önemli bir fark bulunmazken; uygulama dozları arasında 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde kallus eksplantında canlılık oranı açısından letal orizalin dozu değerleri incelendiğinde; katı besin ortamında 48 saat uygulama süresinde 30 µM orizalin dozu LD₅₀ değeri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.7).

Çizelge 4.11 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)

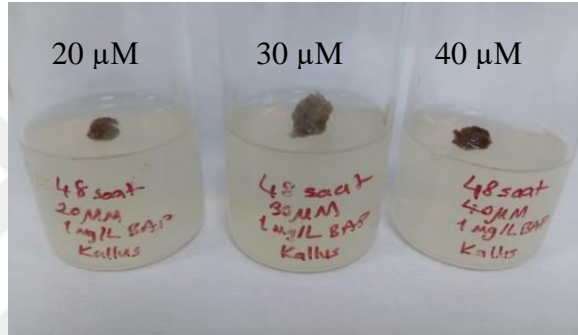
| Doz (μM) | İnkübasyon süresi | | | |
|-----------------------|-------------------|------------------|------------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 83.23 \pm 1.23 | 83.23 \pm 1.23 | 83.23 \pm 1.23 | 83.23 a |
| 20 | 50.00 \pm 0.00 | 66.67 \pm 3.34 | 58.34 \pm 6.68 | 58.34 b |
| 30 | 50.00 \pm 2.89 | 53.33 \pm 0.00 | 46.67 \pm 4.82 | 50.00 c |
| 40 | 50.00 \pm 2.89 | 25.00 \pm 0.00 | 29.44 \pm 2.42 | 34.81 d |
| Ortalama | 58.31 | 57.06 | 54.42 | |

CV (%):8.55, ** %1 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil, \pm : standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}}:4.73^{**}$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{süre}}^{\text{öd}}:-$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}\times\text{süre}}^{\text{öd}}:-$



Şekil 4.7 Sultani Çekirdeksiz çeşidinde 48 saat süresince sıvı besin ortamında farklı dozlarda bekletilen kallus eksplantlarının 7 günlük görünümü

Uslu Çeşidinde canlılık oranı ve letal dozun belirlenmesi: Uslu çeşidinde kallus eksplantına sıvı besin ortamında uygulanan orizalin dozu \times inkübasyon süreleri arasında bitki canlılık bakımından istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli interaksiyon bulunmuştur. Tüm inkübasyon süreleri incelediğinde canlılık oranları %25.55-100.00 arasında değişmiştir (Çizelge 4.12). Uslu çeşidi kallus eksplantına sıvı besin ortamında yapılan orizalin uygulamasında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. En yüksek canlılık oranının kontrol uygulamasında elde edilmesi beklenen bir sonuçtur. En düşük doz olan 20 μM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek canlılık oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%100.00) ve inkübasyon süresine bağlı olarak canlılık oranı azalarak 36 saat için %72.22, 48 saat için %55.00 olarak belirlenmiştir. İkinci doz olan 30 μM uygulamasında canlılık oranı sırasıyla %50.00, 50.00 ve 53.33 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerden %53.33 canlılık oranı değeri beklenenin üzerinde elde edilen bir sonuç olarak kaydedilmiştir. En yüksek doz olan 40

μM uygulamasında ise 24 saat sürede %40.00 olarak belirlenen canlılık oranı; 36 saat uygulamada %44.44 ve 48 saatte de %25.55 olarak tespit edilmiştir. Bu değerlerden %44.44 canlılık oranı beklenenin üzerinde elde edilen bir sonuçtur. İnkübasyon süreleri arasında 0.05 düzeyinde, uygulama dozları arasında ise 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 4.12). Uslu çeşidinde kallus eksplantında canlılık oranı açısından letal orizalin dozu değerleri incelendiğinde sıvı besin ortamında 48 saat uygulama süresinde 30 μM orizalin dozu LD_{50} değeri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)

| Doz (μM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 100.00 \pm 0.00 a | 100.00 \pm 0.00 a | 100.00 \pm 0.00 a | 100.00 a |
| 20 | 100.00 \pm 0.00 a | 72.22 \pm 1.11 b | 55.00 \pm 5.01 c | 68.33 b |
| 30 | 50.00 \pm 2.89 cd | 50.00 \pm 0.00 cd | 53.33 \pm 3.34 c | 49.26 c |
| 40 | 40.00 \pm 5.78 d | 44.44 \pm 0.56 cd | 25.55 \pm 7.79 e | 45.92 c |
| Ortalama | 72.50 a | 66.67 a | 58.47 b | |

CV (%):10.61, ** %1 düzeyinde önemli, * %5 düzeyinde önemli, \pm : standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz} :6.83 **

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{süre}}$:5.92*

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}\times\text{süre}}$:11.84**

Uslu çeşidinde bitki canlılık bakımından kallus eksplantına katı besin ortamında uygulanan orizalin dozu \times inkübasyon süreleri arasında istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. Tüm inkübasyon süreleri incelendiğinde canlılık oranları %27.78-96.83 arasında değişmiştir (Çizelge 4.13). Uslu çeşidinde kallus eksplantına katı besin ortamında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. En düşük doz olan 20 μM uygulamasında en yüksek canlılık oranı 24 saat uygulamasından elde edilmiş (%95.08) ve inkübasyon süresine bağlı olarak canlılık oranı azalarak 36 saat için %93.33, 48 saat için %83.33 olarak belirlenmiştir. İkinci doz olan 30 μM uygulamasında canlılık oranı sırasıyla %69.45, 50.00 ve 61.11 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerden %61.11 canlılık oranı beklenenin üzerinde elde edilen bir sonuç olarak kaydedilmiştir. En yüksek doz olan 40 μM uygulamasında ise 24 saat sürede %61.11 olarak belirlenen canlılık oranı inkübasyon süresine bağlı olarak canlılık oranı azalarak 36 saat uygulamada %30.55 ve 48 saatte de %27.78 olarak tespit edilmiştir. Aynı ayrı inkübasyon süreleri arasında ve uygulama dozları arasında 0.05

düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 4.13). Uslu çeşidinde kallus eksplantında canlılık oranı açısından letal orizalin dozu değerleri incelendiğinde; katı MS besin ortamında LD₅₀ değeri açısından için en uygun doz × inkübasyon süresi olarak 40 µM × 24 saat olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-------------|--------------------------|-----------------|-----------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 96.83 ± 1.59 a | 96.83 ± 1.59 a | 96.83 ± 1.59 a | 96.83 a |
| 20 | 95.08 ± 2.89 a | 93.33 ± 3.34 ab | 83.33 ± 8.34 b | 90.58 a |
| 30 | 69.45 ± 2.78 c | 50.00 ± 0.00 d | 61.11 ± 5.56 cd | 60.17 b |
| 40 | 61.11 ± 5.56 cd | 30.55 ± 2.78 e | 27.78 ± 2.78 e | 39.81 c |
| Ortalama | 80.62 a | 67.68 b | 67.26 b | |

CV (%):9.53, ** %1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli; ±: standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:6.70*

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{süre}:5,80*

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz×süre}:11.60**

4.4.3 Orizalin uygulamalarının koltuk altı meristemi eksplantının rejenerasyon oranına etkisi

Sıvı ve katı MS besin ortamlarında (BBD içermeyen MS besin ortamı) koltuk altı meristemi eksplantına 24, 36 ve 48 saat inkübasyon süresinde 0, 20, 30 ve 40 µM dozunda orizalin uygulamasının üzüm çeşitlerindeki rejenerasyon oranı bulguları açıklanmıştır. Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde yapılan orizalin uygulamasının koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerdeki rejenerasyon oranı üzerine etkilerine ait grafikler ise EK-2’de verilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde rejenerasyon oranı: Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı MS besin ortamında uygulanan orizalin dozu × inkübasyon süreleri arasında rejenerasyon oranı bakımından istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristem eksplantına sıvı besin ortamında elde edilen en yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubunda bulunmuştur ve bu beklenen bir sonuçtur. En düşük doz olan 20 µM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek rejenerasyon oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş

(%83.33); 36 saat için %52.23, 48 saat için %54.44 olarak belirlenmiştir. İkinci doz olan 30 μM uygulamasında rejenerasyon oranı sırasıyla %50.00, 21.11 ve 37.23 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 40 μM uygulamasında ise 24 saat sürede %24.08 olarak belirlenen rejenerasyon oranı 36 saat uygulamada %17.78 ve 48 saatte de %33.33 olarak tespit edilmiştir. Tüm dozlarda 36 saat inkübasyon süresinden elde edilen bulgular beklenen değerlerin üstündedir. İnkübasyon süreleri arasında 0.01 düzeyinde ve uygulama dozları arasında 0.05 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 4.14). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristem eksplantlarının sıvı MS besin ortamında orizalin dozundaki artışa paralel olarak rejenerasyon oranının genel olarak azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.8 ve 4.9).

Çizelge 4.14 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin koltuk altı meristemi eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%)

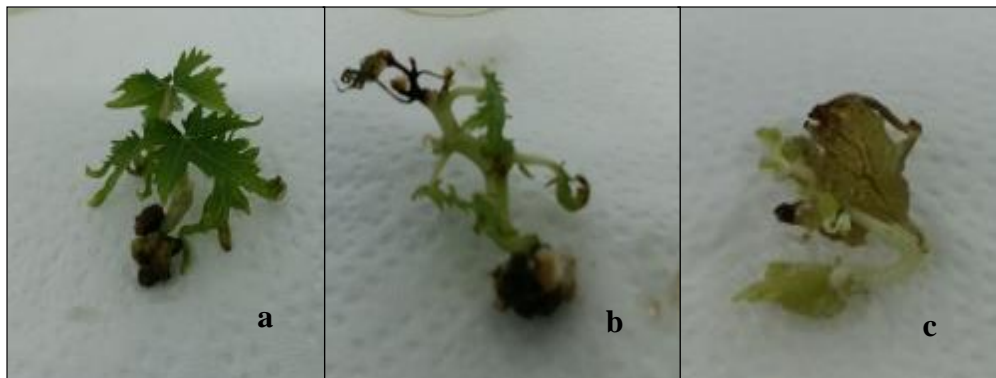
| Doz (μM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-----------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 93.95 \pm 3.25 a | 93.95 \pm 3.25 a | 93.95 \pm 3.25 a | 93.95 a |
| 20 | 83.33 \pm 6.67 a | 52.23 \pm 4.00 c | 54.44 \pm 2.94 c | 63.34 b |
| 30 | 50.00 \pm 0.92 c | 21.11 \pm 1.11 f | 37.23 \pm 0.00 f | 36.11 c |
| 40 | 24.08 \pm 0.00 f | 17.78 \pm 3.10 f | 33.33 \pm 2.24 f | 25.06 d |
| Ortalama | 62.84 a | 46.27 c | 54.74 b | |

CV (%):10.11,, **%1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli; \pm : standart hata

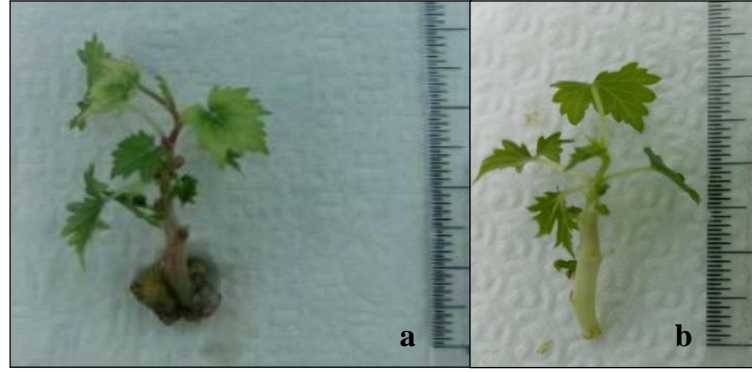
Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}}:5.40^*$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{süre}}:4.67^{**}$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}\times\text{süre}}:9.34^{**}$



Şekil 4.8 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında 36 saat süresince 20 μM (a), 30 μM (b) ve 40 μM (c) dozundaki orizalin uygulamasından sonra sürgün rejenerasyon ortamındaki sürgünlerin durumu



Şekil 4.9 Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında 24 saat süre 20µM orizalin dozu uygulamasının ardından rejenerere olmuş koltuk altı meristem eksplantı

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde katı besin ortamında uygulanan orizalin dozu × inkübasyon süreleri arasında rejenerasyon oranı bakımından istatistik olarak %0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. Rejenerasyon oranları %00.00-94.63 aralığında değişiklik göstermiştir. En yüksek rejenerasyon oranı ise kontrol grubundan elde edilmiştir (Çizelge 4.15). En düşük doz olan 20 µM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek rejenerasyon oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%92.96), 36 saat için %41.67 ve 48 saat için ise %53.33 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerden %53.33 canlılık oranı beklenenin üzerinde elde edilen bir sonuç olarak kaydedilmiştir. İkinci doz olan 30 µM uygulamasında inkübasyon süresine bağlı bir azalma ile rejenerasyon oranı sırasıyla %75.00, 44.44 ve 17.78 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 40 µM uygulamasında ise 24 saat sürede %70.00 olarak belirlenen rejenerasyon oranı inkübasyon süresine bağlı olarak azalarak 36 saat uygulamada %46.67 olarak tespit edilmiştir. En yüksek inkübasyon süresi olan 48 saatte ise rejenerasyon gerçekleşmemiştir (%00.00). Ayrı ayrı inkübasyon süreleri arasında ve uygulama dozları arasında 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.10). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristem eksplantına katı MS besin ortamındaki her muamele ile orizalin dozu arttıkça rejenerasyon oranının azaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.15 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin koltuk altı meristemi eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%)

| Doz (μM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 94.63 \pm 0.37 a | 94.63 \pm 0.37 a | 94.63 \pm 0.37 a | 94.63 a |
| 20 | 92.96 \pm 2.04 a | 41.67 \pm 4.41 d | 53.33 \pm 3.34 c | 62.65 b |
| 30 | 75.00 \pm 0.00 b | 44.44 \pm 5.56 d | 17.78 \pm 1.11 e | 45.74 c |
| 40 | 70.00 \pm 5.01 b | 46.67 \pm 3.34 cd | 00.00 \pm 0.00 f | 38.89 d |
| Ortalama | 85.06 a | 69.37 b | 41.04 c | |

CV (%):8.01, **%1 düzeyinde önemli, \pm : standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}}:4.10^{**}$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{süre}}:4.73^{**}$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}\times\text{süre}}:8.20^{**}$



Şekil 4.10 Sultani Çekirdeksiz çeşidinde katı besin ortamında 48 saat süre 40 μM doz orizalin uygulanmış koltuk altı meristemi eksplantlarının gelişme durumu

Uslu çeşidinde rejenerasyon oranı: Uslu çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan orizalin dozu \times inkübasyon süreleri arasında rejenerasyon oranı bakımından istatistik olarak önemli bir interaksiyon bulunmamıştır. Rejenerasyon oranları %00.00-28.89 aralığında bulunmuştur. Kontrol grubundan rejenerasyon elde edilirken, orizalin muamelesi yapılan eksplantların hiçbirinde rejenerasyon elde edilememiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin koltuk altı meristemi eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%)

| Doz (μM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-----------------------|--------------------------|------------------|------------------|--------------------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 28.89 \pm 0.56 | 28.89 \pm 0.56 | 28.89 \pm 0.56 | 28.89 \pm 0.56 a |
| 20 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 \pm 0.00 b |
| 30 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 \pm 0.00 b |
| 40 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 \pm 0.00 b |
| Ortalama | 7.22 | 7.22 | 7.22 | |

CV (%):6.04, ** %1 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil \pm : standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz} : 0.42**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{süre}}^{\text{öd}}$:-

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz} \times \text{süre}}^{\text{öd}}$:-

Uslu çeşidinde rejenerasyon oranı bakımından katı besin ortamında uygulanan orizalin dozu \times inkübasyon süreleri arasında istatistik olarak 0.01 oranında önemli bir interaksiyon bulunmuştur. Rejenerasyon oranları %00.00-35.18 aralığında bulunmuştur. En yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubundan elde edilmiştir (Çizelge 4.17). En düşük doz olan 20 μM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek rejenerasyon oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%28.52) ve inkübasyon süresine bağlı olarak rejenerasyon oranı azalarak 36 saat için %17.04 olarak belirlenmiştir. 20 μM uygulamanın 48 saat süre uygulamasından ise rejenerasyon elde edilmemiştir. İkinci doz olan 30 μM uygulamasında da hiçbir rejenerasyona rastlanmazken; en yüksek doz olan 40 μM uygulamasında sadece 36 saat uygulamasında %7.41 oranında rejenerasyon kaydedilmiştir. İnkübasyon süreleri arasında ve uygulama dozları arasında 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin koltuk altı meristemi eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%)

| Doz (μM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-----------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 35.18 \pm 1.62 a | 35.18 \pm 1.62 a | 35.18 \pm 1.62 a | 35.18 a |
| 20 | 28.52 \pm 2.86 b | 17.04 \pm 2.97 c | 00.00 \pm 0.00 e | 15.17 b |
| 30 | 00.00 \pm 0.00 e | 00.00 \pm 0.00 e | 00.00 \pm 0.00 e | 0.00 d |
| 40 | 00.00 \pm 0.00 e | 7.41 \pm 1.85 d | 00.00 \pm 0.00 e | 2.29 c |
| Ortalama | 15.92 a | 14.91 a | 8.66 b | |

CV (%):16.07, **%1 düzeyinde önemli, \pm : standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz} : 2.14**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{süre}}$:1.92**

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}\times\text{süre}}$:3.72**

4.4.4 Orizalin uygulamalarının kallus eksplantının rejenerasyon oranına etkisi

Orizalin uygulanan kalluslarda canlılık oranları belirlendikten sonra rejenerasyon sağlanabilmesi için farklı ortamlar denenmiştir. Denemelerde 1.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA + 0.1 mg/l GA₃, 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA içeren katı MS besin ortamına alınmış rejenerasyon sağlanamamıştır. Daha sonra rejenerasyon olmayan canlı kalluslar 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA ortamına alınmıştır. 30 gün sonra herhangi bir rejenerasyona uğramayan kalluslar bu kez 3 ve 6 mg/l BAP içeren ortamlarda 1 hafta süre ile bekletilmiş, daha sonra 0.8, 1.0 ve 1.2 mg/l BAP içeren katı MS besin ortamlarına aktarılmış ve yine neredeyse hiç rejenerasyon sağlanamamıştır. *In vitro* rejenerasyonda canlılık oranı belirlenebilmiş; fakat sürgün gelişimi gerçekleşemediği için canlılık oranına kıyasla rejenerasyon oranı belirlenememiştir.

Sıvı ve katı MS besin ortamlarında (BBD içermeyen MS besin ortamı) kallus eksplantına 24, 36 ve 48 saat inkübasyon süresinde 0, 20, 30 ve 40 μM dozunda orizalin uygulamasının üzüm çeşitlerindeki rejenerasyon oranı bulguları açıklanmıştır. Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde yapılan orizalin uygulamasının kallus eksplantından gelişen sürgünlerdeki rejenerasyon oranı üzerine etkilerine ait grafikler ise EK-2'de verilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde rejenerasyon oranı: Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan orizalin dozu × inkübasyon süreleri arasında kallus eksplantının rejenerasyon oranı bakımından istatistik olarak 0.05 düzeyinde bir interaksiyon bulunmuştur. En yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubundan elde edilmiştir (Çizelge 4.18). En düşük doz olan 20 µM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek rejenerasyon oranı 48 saat uygulamasında elde edilmiş (%29.17) (Şekil 4.11), 24 saat için %17.50, 36 saat için %16.67 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerden %29.17 canlılık oranı beklenenin üzerinde elde edilen bir sonuç olarak kaydedilmiştir. İkinci doz olan 30 µM uygulamasında inkübasyon süresine bağlı olarak sırasıyla %12.50, 10.75 ve 11.11 oranında belirlenmiştir. En yüksek doz olan 40 µM uygulamasında ise 24 ve 36 saat inkübasyon süresinde rejenerasyon oranı %5.56 olarak belirlenmiştir; fakat 48 saat süre uygulamasından rejenerasyon elde edilmemiştir. İnkübasyon süreleri arasındaki istatistik anlamda önemli bulunmazken; uygulama dozları arasında 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 4.18). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde kallus eksplantına sıvı MS besin ortamındaki her uygulama ile orizalin dozu arttıkça rejenerasyon oranı azalmıştır.

Çizelge 4.18 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-------------|--------------------------|-----------------|----------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 44.44 ± 5.56 a | 44.44 ± 5.56 a | 44.44 ± 5.56 a | 44.44 a |
| 20 | 17.50 ± 2.50 c | 16.67 ± 3.21 cd | 29.17 ± 4.17 b | 21.11 b |
| 30 | 12.50 ± 1.45 de | 10.75 ± 0.37 e | 11.11 ± 2.78 e | 11.45 c |
| 40 | 5.56 ± 0.00 f | 5.56 ± 0.00 f | 00.00 ± 0.00 g | 3.71 d |
| Ortalama | 21.18 | 20.00 | 19.35 | |

CV (%):14.29, **%1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil ve ±: standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz}: 2.82**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{süre}^{öd}:-

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz×süre}:4.88*

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde rejenerasyon oranı bakımından katı besin ortamında kallus eksplantına uygulanan orizalin dozu × inkübasyon süreleri arasında istatistik olarak 0.01 düzeyinde interaksiyon bulunmuştur. En yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubundan elde edilmiştir (Çizelge 4.19). En düşük doz olan 20 µM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek rejenerasyon oranı 36 saat uygulamasında elde

edilmiş (%41.67), 24 saat için ise %36.11 olarak belirlenmiştir. Bu değerlerden %41.67 canlılık oranı beklenenin üzerinde elde edilen bir sonuç olarak kaydedilmiştir. İkinci doz olan 30 μM uygulamasında inkübasyon süresine bağlı olarak en yüksek rejenerasyon oranı 36 saat uygulamasında elde edilmiş (%33.33), 24 saat için ise %16.67 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 40 μM uygulamasında ise 24 ve 36 saat inkübasyon süresi için sırasıyla %30.00 ve 22.22 rejenerasyon oranı belirlenmiştir. Aynı ayrı inkübasyon süreleri arasında ve uygulama dozları arasında istatistik açıdan 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur. En yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubundan elde edilmiştir (Çizelge 4.19). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde kallus eksplantına katı MS besin ortamındaki her üç dozda 48 saat uygulamasından rejenerasyon elde edilememiştir.



Şekil 4.11 Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında 20 μM orizalin dozunda 48 saat inkübe edilen kallus eksplantında sürgün rejenerasyonu

Çizelge 4.19 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%)

| Doz (μM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | Ortalama |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | |
| 0 (kontrol) | 45.00 \pm 0.00 a | 45.00 \pm 0.00 a | 45.00 \pm 0.00 a | 45.00 a |
| 20 | 36.11 \pm 2.78 bc | 41.67 \pm 1.67 ab | 00.00 \pm 0.00 f | 25.93 b |
| 30 | 16.67 \pm 0.00 e | 33.33 \pm 0.00 cd | 00.00 \pm 0.00 f | 16.67 c |
| 40 | 30.00 \pm 5.01 d | 22.22 \pm 2.78 e | 00.00 \pm 0.00 f | 17.41 c |
| Ortalama | 35.55 a | 31.95 b | 11.25 c | |

CV (%):12.8, **%1 düzeyinde önemli, \pm : standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: LSD_{doz} : 2.85**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{süre}}$:3.29**

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}\times\text{süre}}$:5.70**

Uslu çeşidinde rejenerasyon oranı: Uslu çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan orizalin dozu × inkübasyon süreleri arasında kallus eksplantının rejenerasyon oranı bakımından istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. En yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubundan elde edilmiştir. Uslu çeşidinde kallus eksplantına sıvı MS besin ortamındaki 36 ve 48 saat süre uygulamalarının her üç orizalin dozunda da rejenerasyona rastlanmamıştır. En kısa süre olan 24 saat inkübasyon süresinde ise 20, 30 ve 40 µM orizalin dozlarındaki artışa bağlı olarak rejenerasyon oranında azalma gerçekleşerek bu oranlar sırasıyla %25.00, 22.22 ve 5.77 olarak belirlenmiştir. Aynı ayrı inkübasyon süreleri arasında ve uygulama dozları arasında istatistik açıdan 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20 Sıvı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-------------|--------------------------|----------------|----------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 50.00 ± 0.00 a | 50.00 ± 0.00 a | 50.00 ± 0.00 a | 50.00 a |
| 20 | 25.00 ± 2.89 b | 00.00 ± 0.00 e | 00.00 ± 0.00 e | 8,33 b |
| 30 | 22.22 ± 2.78 c | 00.00 ± 0.00 e | 00.00 ± 0.00 e | 7.41 b |
| 40 | 5.77 ± 0.00 d | 00.00 ± 0.00 e | 00.00 ± 0.00 e | 1.92 c |
| Ortalama | 25.75 a | 12.50 b | 12.50 b | |

CV (%):8.21, **%1 düzeyinde önemli, ±: standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{doz}: 1.17^{**}$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{süre}: 1.36^{**}$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında LSD testine göre: $LSD_{doz \times süre}: 2.35^{**}$

Uslu çeşidinde kallus eksplantlarına katı besin ortamında 24, 36 ve 48 saat orizalin uygulaması sonrasında rejenerasyon sağlanamamıştır (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21 Katı besin ortamında farklı doz ve sürede orizalin muamelesi ile Uslu çeşidinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | |
|-------------|--------------------------|--------------|--------------|----------|
| | 24 saat | 36 saat | 48 saat | Ortalama |
| 0 (kontrol) | 50.00 ± 0.00 | 50.00 ± 0.00 | 50.00 ± 0.00 | 50.00 |
| 20 | 00.00 ± 0.00 | 00.00 ± 0.00 | 00.00 ± 0.00 | 00.00 |
| 30 | 00.00 ± 0.00 | 00.00 ± 0.00 | 00.00 ± 0.00 | 00.00 |
| 40 | 00.00 ± 0.00 | 00.00 ± 0.00 | 00.00 ± 0.00 | 00.00 |
| Ortalama | 12.50 | 12.50 | 12.50 | |

CV (%):Veri alınmadı ve ±: standart hata

4.5 Sultani Çekirdeksiz ve Uslu Üzüm Çeşitlerinde *in vitro* Kolhisin Uygulamaları

4.5.1 Kolhisin uygulamalarının tek boğumlu mikro çelik eksplantında canlılık oranı ile başlangıç sürgün uzunluğuna etkisi ve letal dozun belirlenmesi

Sıvı MS besin ortamlarında (BBD içermeyen MS besin ortamı) koltuk altı meristemi eksplantına ½ saat inkübasyon süresinde 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 µM dozunda kolhisin uygulamasının ve 24-48 saat inkübasyon süresindeki 0, 1000, 1250, 1500 µM dozunda kolhisin uygulamasının üzüm çeşitlerindeki canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu bulguları ile elde edilen letal doz değeri çeşitlere göre açıklanmıştır. Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan kolhisin muamelesinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişki grafikleri EK-1’de ve canlılık oranına etkilerine ait grafikler ise EK-2’de verilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde canlılık oranı ile başlangıç sürgün uzunluğu ve letal dozun belirlenmesi: Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile bitki canlılık oranı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.05 düzeyinde fark bulunmuştur (Çizelge 4.22). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına sıvı besin ortamında ½ saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Kontrole kıyasla en yüksek canlılık 250 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük canlılık oranı ise 2000 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde tek boğumlu mikro çeliklere ½ saat süresince muamele edilen kolhisin dozları ile başlangıç sürgün uzunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Başlangıç sürgün uzunluğu, tüm dozlar incelendiğinde 0.22-1.90 cm aralığında değişiklik göstermiştir. En yüksek başlangıç sürgün uzunluğu kontrol grubunda bulunmuştur. Kontrole kıyasla en yüksek başlangıç sürgün uzunluğu 250 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük başlangıç sürgün uzunluğu ise 2000 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. Kolhisin dozu arttıkça ters orantılı bir şekilde bitki canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu azalmıştır (Çizelge 4.22 ve Şekil 4.12).

Çizelge 4.22 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (μM) | Canlılık oranı (%) | Başlangıç sürgün uzunluğu (cm) |
|-----------------------|---------------------|--------------------------------|
| 0 (kontrol) | 86.10 \pm 1.40 a | 1.90 \pm 0.08 a |
| 250 | 83.00 \pm 0.49 ab | 0.83 \pm 0.10 b |
| 500 | 83.70 \pm 1.40 a | 0.80 \pm 0.15 b |
| 750 | 73.50 \pm 0.00 c | 0.76 \pm 0.20 b |
| 1000 | 72.03 \pm 4.73 bc | 0.46 \pm 0.09 c |
| 1250 | 73.38 \pm 4.60 bc | 0.45 \pm 0.05 c |
| 1500 | 69.80 \pm 2.02 bc | 0.44 \pm 0.03 c |
| 1750 | 67.85 \pm 1.74 c | 0.33 \pm 0.09 c |
| 2000 | 66.70 \pm 4.54 c | 0.22 \pm 0.08 c |

** %1 düzeyinde önemli, * %5 düzeyinde önemli \pm : standart hata

Sırasıyla canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu için değerler: CV (%):5.98, CV (%):6.31

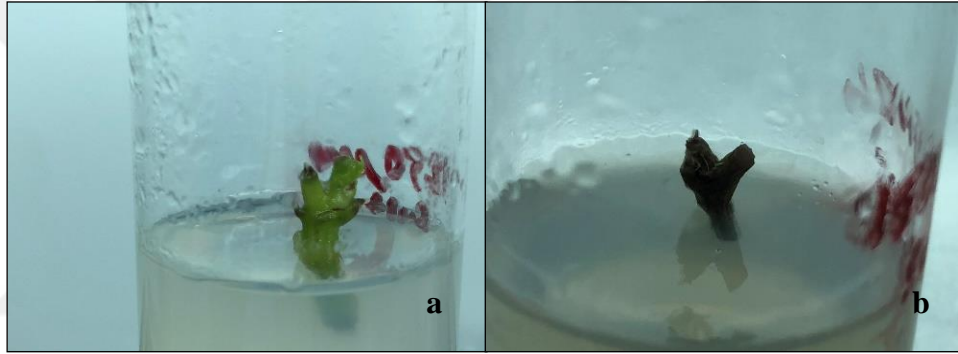
Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}}: 11.71^*$, $\text{LSD}_{\text{doz}}: 8.77^{**}$

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu \times inkübasyon süreleri arasında tek boğumlu mikro çelik eksplantının bitki canlılık oranı bakımından istatistik olarak bir interaksyon bulunmamıştır. Tüm dozlar incelendiğinde canlılık oranları %65.95-86.10 arasında değişmiştir (Çizelge 4.23). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına sıvı besin ortamında 24-48 saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Dozlara bağlı olarak ortalamalar arasında da 0.05 düzeyinde bir farklılık görülmüştür. En yüksek canlılık oranı 1250 μM uygulamasında 24 saat inkübasyon süresinde (%79.63) gerçekleşmiştir ve süreye bağlı olarak 48 saat inkübasyon süresinde (%68.33) canlılık oranında azalma meydana gelmiştir. Bu değerlerden %79.63 canlılık oranı beklenenin üzerinde elde edilen bir sonuç olarak kaydedilmiştir. En düşük doz olan 1000 μM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek canlılık oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%76.67) ve inkübasyon süresine bağlı olarak canlılık oranı azalarak 48 saat için %65.95 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 1500 μM uygulamasında ise 24 saat sürede %75.00 olarak belirlenen canlılık oranı; 48 saat inkübasyon süresinde %66.67 olarak tespit edilmiştir. 24 saat ve 48 saat değerleri arasındaki farklılık 0.01 düzeyinde önemlidir.

Tek boğumlu mikro çelik eksplantında canlılık oranı açısından letal kolhisin dozu değerleri incelendiğinde; Sultani Çekirdeksiz çeşidinde 24 ve 48 saat inkübasyon

sürelerinin her ikisinde de uygulanan dozlarda LD₅₀ değeri açısından %50'nin altında bir canlılık oranına rastlanmamıştır (Çizelge 4.23).

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında tek boğumlu mikro çelik eksplantının başlangıç sürgün uzunluğu bakımından istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. En yüksek başlangıç sürgün uzunluğu kontrol grubunda bulunmuştur. Başlangıç sürgün uzunluğu, 0.13-1.90 cm aralığındadır (Çizelge 4.23). Aynı uygulama dozları arasındaki ilişki ve inkübasyon süreleri arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bir farklılık belirlenmiştir.



Şekil 4.12 Sultani Çekirdeksiz çeşidinde 750 ve 1500 µM dozda ½ saat süre kolhisin uygulaması ardından canlı kalan (a) ve canlılığını yitiren (b) tek boğumlu mikro çelik eksplantları

Çizelge 4.23 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | Uygulama süresi (saat) | | | | | |
|-------------|------------------------|----------------|-------|--------------------------------|-------------|--------|
| | Canlılık oranı (%) | | | Başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | | |
| | 24 saat | 48 saat | Ort. | 24 saat | 48 saat | Ort. |
| 0 (kont.) | 86.10 ± 1.40 a | 86.10 ± 1.40 a | 81.93 | 1.90±0.08 a | 1.90±0.08 a | 1.90 a |
| 1000 | 76.67 ± 3.34 a | 65.95 ± 5.33 c | 71.31 | 0.53±0.05 b | 0.57±0.06 b | 0.55 b |
| 1250 | 79.63 ± 5.46 a | 68.33 ± 1.67 | 73.99 | 0.60±0.11 b | 0.54±0.13 b | 0.57 b |
| 1500 | 75.00 ± 0.00 | 66.67 ± 4.41 | 70.83 | 0.51±0.12 b | 0.13±0.02 c | 0.32 c |
| Ortalam | 78.31 a | 70.72 b | | 0.88 a | 0.78 b | |

** %1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil ve ±: standart hata

Sırasıyla canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu için değerler: CV (%):7.92, CV (%):10.51

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:7.31*, LSD_{doz}:0.11**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{süre}:5.17*, LSD_{süre}:0.08**

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{süre×doz}^{öd}:-, LSD_{süre×doz}:0.15**

Uslu çeşidinde canlılık oranı, başlangıç sürgün uzunluğu ve letal dozun belirlenmesi: Uslu üzüm çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına ½ saat süresince muamele edilen kolhisin dozları ile bitki canlılık oranı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde canlılık oranları %42.85-90.48 arasında değişmiştir (Çizelge 4.24). Uslu çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına sıvı besin ortamında ½ saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Kontrole kıyasla en yüksek canlılık 250 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük canlılık oranı ise 2000 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir.

Uslu üzüm çeşidinde tek boğumlu mikro çeliklere ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile başlangıç sürgün uzunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde 0.05 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur. En yüksek başlangıç sürgün uzunluğu kontrol grubundan elde edilmiş, kontrole kıyasla en yüksek başlangıç sürgün uzunluğu 500 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. En düşük başlangıç sürgün uzunluğu ise 1750 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. Tüm dozlar incelendiğinde başlangıç sürgün uzunluğu 0.33-1.02 cm aralığında değişmiştir (Çizelge 4.24).

Çizelge 4.24 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | Canlılık oranı (%) | Başlangıç sürgün uzunluğu(cm) |
|----------|--------------------|-------------------------------|
| 0 | 90.48 ± 4.53 a | 1.02 ± 0.13 a |
| 250 | 90.00 ± 3.34 a | 0.54 ± 0.04 b |
| 500 | 90.00 ± 0.00 a | 0.55 ± 0.04 b |
| 750 | 81.11 ± 1.11 a | 0.55 ± 0.10 b |
| 1000 | 66.11 ± 5.56 b | 0.54 ± 0.12 b |
| 1250 | 62.50 ± 7.22 b | 0.50 ± 0.06 bc |
| 1500 | 57.14 ± 0.00 b | 0.47 ± 0.09 bc |
| 1750 | 62.22 ± 2.22 b | 0.33 ± 0.08 d |
| 2000 | 42.85 ± 0.00 c | 0.40 ± 0.06 cd |

**%1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli ±: standart hata

Sırasıyla canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu için değerler: CV (%): 8.91, CV (%): 13.85

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:10.92**, LSD_{doz}:0.13*

Uslu üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında tek boğumlu mikro çelik eksplantının bitki canlılık oranı bakımından 0.05 düzeyinde bir interaksiyon bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde canlılık oranları %38.10-90.48 arasında değişmiştir (Çizelge 4.25). Uslu çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına sıvı besin ortamında 24-48 saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Dozlar arasında istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur. En düşük doz olan 1000 µM uygulamasında inkübasyon sürelerine göre en yüksek canlılık oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%76.67) ve inkübasyon süresine bağlı olarak canlılık oranı azalarak 48 saat için %44.44 olarak belirlenmiştir. 1250 µM uygulamasında 24 ve 48 saat inkübasyon süresinde canlılık oranı sırasıyla %58.33 ve 44.82 olarak gerçekleşmiştir. En yüksek doz olan 1500 µM uygulamasında ise 24 saat sürede %50.00 olarak belirlenen canlılık oranı; 48 saat inkübasyon süresinde %38.10 olarak tespit edilmiştir. 24 saat ve 48 saat değerleri arasındaki farklılık 0.01 düzeyinde önemlidir.

Tek boğumlu mikro çelik eksplantında canlılık oranı açısından LD₅₀ değerleri incelendiğinde; Uslu çeşidinde sıvı besin LD₅₀ değeri açısından için en uygun doz × inkübasyon süresi olarak 1250 µM × 48 saat inkübasyon süresi belirlenmiştir (Çizelge 4.25).

Uslu üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında tek boğumlu mikro çelik eksplantının başlangıç sürgün uzunluğu bakımından 0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. Başlangıç sürgün uzunluğunun tüm dozlar incelendiğinde 0.20-1.30 cm aralığında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.25). En yüksek başlangıç sürgün uzunluğu 1000 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. 1250 µM (1.27 cm) ve 1500 µM (1.10 cm) kolhisin dozunda kontrol grubundan daha uzun sürgün oluşumu gerçekleşmiş ve bu beklenmeyen bir sonuç olarak kabul edilmiştir. 48 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000, 1250 ve 1500 µM kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları da sırasıyla 1.03, 0.60 ve 0.20 cm olarak azalmıştır. Başlangıç sürgün uzunluğu açısından dozlar arasında da, inkübasyon süreleri arasında da 0.01 düzeyinde önemli bir fark vardır.

Çizelge 4.25 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (μM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|------------------|----------|--------------------------------|-----------------|--------|
| | Canlılık oranı (%) | | | Başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | | |
| | 24 saat | 48 saat | Ort. | 24 saat | 48 saat | Ort. |
| 0 | 90.48 \pm 2.49 | 90.48 \pm 2.49 | 90.48 a | 1.02 \pm 0.13 c | 1.02 \pm 0.13 | 1.02 b |
| 1000 | 76.67 \pm 1.69 | 44.44 \pm 5.56 | 60.55 b | 1.30 \pm 0.06 a | 1.03 \pm 0.00 | 1.16 a |
| 1250 | 58.33 \pm 8.34 | 44.82 \pm 5.76 | 51.59 bc | 1.27 \pm 0.11 a | 0.60 \pm 0.17 | 0.94 c |
| 1500 | 50.00 \pm 0.00 | 38.10 \pm 2.75 | 44.05 c | 1.10 \pm 0.20 b | 0.20 \pm 0.03 | 0.65 d |
| Ortalama | 68.87 a | 54.46 b | | 1.17 a | 0.60 b | |

** %1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli ve \pm : standart hata

Sırasıyla canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu için değerler: $CV_{\text{canlılık}}(\%)$: 12.86, $CV_{\text{bsu}}(\%)$: 2.69

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $LSD_{\text{doz}}:9.82^{**}$, $LSD_{\text{doz}}:0.06^{**}$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $LSD_{\text{süre}}:6.94^{**}$, $LSD_{\text{süre}}:0.04^{**}$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD test. göre: $LSD_{\text{süre}\times\text{doz}}:13.89^{*}$ $LSD_{\text{süre}\times\text{doz}}:0.04^{**}$

4.5.2 Kolhisin uygulamalarının sürgün ucu eksplantında canlılık oranı ile başlangıç sürgün uzunluğuna etkisi ve letal dozun belirlenmesi

Sıvı MS besin ortamlarında (BBD içermeyen MS besin ortamı) sürgün ucu eksplantına ½ saat inkübasyon süresinde 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 μM dozunda kolhisin uygulamasının ve 24-48 saat inkübasyon süresindeki 0, 1000, 1250, 1500 μM dozunda kolhisin uygulamasının üzüm çeşitlerindeki canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu bulguları ile elde edilen letal doz değeri çeşitlere göre açıklanmıştır. Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan kolhisin muamelesinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişki grafikleri EK-1’de ve canlılık oranına etkilerine ait grafikler ise EK-2’de verilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde canlılık oranı ile başlangıç sürgün uzunluğu ve letal dozun belirlenmesi: Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sürgün ucu eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile bitki canlılık oranı arasındaki ilişki incelendiğinde 0.01 düzeyinde bir fark bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde canlılık oranları %38.33-87.88 arasında değişmiştir (Çizelge 4.26). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sürgün ucu eksplantına sıvı besin ortamında ½ saat inkübasyon süresinde kolhisin uygulanması sonucunda en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda

bulunmuştur. Kontrole kıyasla en yüksek canlılık 500 µM kolhisin dozundan, en düşük canlılık oranı ise 1750 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir (Çizelge 4.26)

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sürgün ucu eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile başlangıç sürgün uzunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde de istatistik açıdan 0.01 düzeyinde bir fark bulunmuştur. En yüksek başlangıç sürgün uzunluğu kontrol grubundan elde edilmiştir. Kontrole kıyasla en yüksek başlangıç sürgün uzunluğu 250 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük başlangıç sürgün uzunluğu ise 2000 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. Başlangıç sürgün uzunluğu, tüm dozlar incelendiğinde 0.10-2.28 cm aralığında olduğu gözlenmiştir. Kolhisin dozu arttıkça ters orantılı bir şekilde bitki canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu azalmıştır (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.26 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | Canlılık oranı (%) | Başlangıç sürgün uzunluğu (cm) |
|-------------|--------------------|--------------------------------|
| 0 (kontrol) | 87.88 ± 4.29 a | 2.28 ± 0.08 a |
| 250 | 70.00 ± 5.78 b | 1.02 ± 0.06 b |
| 500 | 80.00 ± 3.34 a | 0.55 ± 0.08 cd |
| 750 | 60.00 ± 0.00 c | 0.50 ± 0.04 d |
| 1000 | 55.83 ± 4.64 cd | 0.69 ± 0.18 c |
| 1250 | 50.00 ± 0.00 de | 0.50 ± 0.07 d |
| 1500 | 45.19 ± 2.89 ef | 0.68 ± 0.11 c |
| 1750 | 38.33 ± 1.67 f | 0.23 ± 0.09 e |
| 2000 | 40.00 ± 2.89 f | 0.10 ± 0.00 e |

**%1 düzeyinde önemli ve ±: standart hata

Sırasıyla canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu için değerler: CV (%):8.90, CV (%):12.17

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $LSD_{doz}:9.02^{**}$, $LSD_{doz}:0.16^{**}$

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında sürgün ucu eksplantının bitki canlılık oranı bakımından önemli bir interaksiyon bulunmamıştır. Tüm dozlar incelendiğinde canlılık oranları %31.67-87.88 arasında değişmiştir (Çizelge 4.27). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sürgün ucu eksplantına sıvı besin ortamında 24-48 saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Dozlara bağlı olarak canlılık oranı arasında 0.01 düzeyinde bir farklılık görülmüştür. En yüksek canlılık oranı 1000 µM

uygulamasında 24 saat inkübasyon süresinde (%75.00) gerçekleşmiştir ve süreye bağlı olarak 48 saat inkübasyon süresinde (%58.34) canlılık oranında azalma meydana gelmiştir. 1250 μ M kolhisin uygulamasında en yüksek canlılık oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%68.23) ve inkübasyon süresine bağlı olarak canlılık oranı azalarak 48 saat için %46.67 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 1500 μ M uygulamasında ise 24 saat sürede %55.00 olarak belirlenen canlılık oranı; 48 saat inkübasyon süresinde %31.67 olarak tespit edilmiştir. 24 saat ve 48 saat değerleri arasındaki istatistik bakımdan farklılık 0.01 düzeyinde önemlidir. Her muamele ile kolhisin dozu arttıkça ters orantılı bir şekilde bitki canlılık oranı azalmıştır. Sürgün ucu eksplantında canlılık oranı açısından LD₅₀ değerleri incelendiğinde; Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında 24-48 saat uygulamasında ise 1250 μ M \times 48 saat süre interaksyonu LD₅₀ değeri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.27).

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu \times inkübasyon süreleri arasında tek boğumlu mikro çelik eksplantının başlangıç sürgün uzunluğu bakımından istatistik olarak 0.01 önemlilik düzeyinde bir interaksiyon bulunmuştur. En yüksek başlangıç sürgün uzunluğu kontrol grubunda bulunmuştur. 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000, 1250 ve 1500 μ M kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları sırasıyla 1.75, 0.98 ve 0.75 cm olarak azalan bir oranda kaydedilmiştir. 48 saat inkübasyon süresinde de uygulanan 1000, 1250 ve 1500 μ M kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları sırasıyla doz artışına bağlı olarak 0.62, 0.84 ve 0.55 cm şeklinde azalmıştır (Çizelge 4.27). 24 ve 48 saat inkübasyon süresinin canlılık oranı açısından incelendiğinde 0.01 düzeyinde bir farklılık söz konusudur.

Çizelge 4.27 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (μM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|-------------|---------|--------------------------------|-------------------|--------|
| | Canlılık oranı (%) | | | Başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | | |
| | 24 saat | 48 saat | Ort. | 24 saat | 48 saat | Ort. |
| 0 | 87.88 \pm | 87.88 \pm | 87.88 a | 2.28 \pm 0.08 a | 2.28 \pm 0.08 a | 2.28 a |
| 1000 | 75.00 \pm | 58.34 \pm | 66.67 b | 1.75 \pm 0.03 b | 0.62 \pm 0.03 | 1.18 b |
| 1250 | 68.23 \pm | 46.67 \pm | 57.50 c | 0.98 \pm 0.08 c | 0.84 \pm 0.11 | 0.91 c |
| 1500 | 55.00 \pm | 31.67 \pm | 43.3 d | 0.75 \pm 0.05 | 0.55 \pm 0.07 e | 0.65 d |
| Ortalama | 71.55 a | 56.14 b | | 1.44 a | 1.07 b | |

** %1 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil ve \pm : standart hata

Sırasıyla canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu için değerler: $CV_{\text{canlılık}}(\%):1.57$, $CV_{\text{bsu}}(\%):12.52$

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $LSD_{\text{doz}}:8.47^{**}$, $LSD_{\text{doz}}:0.19^{**}$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $LSD_{\text{süre}}:5.99^{**}$, $LSD_{\text{süre}}:0.14^{**}$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD test. göre: $LSD_{\text{süre} \times \text{doz}}^{\text{öd}}:-$, $LSD_{\text{süre} \times \text{doz}}:0.38^{**}$

Uslu çeşidinde canlılık oranı ile başlangıç sürgün uzunluğu ve letal dozun belirlenmesi: Uslu üzüm çeşidinde sürgün ucu eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile bitki canlılık oranı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde canlılık oranları %00.00-71.85 arasında değişmiştir (Çizelge 4.28). Uslu çeşidinde sürgün ucu eksplantına sıvı besin ortamında ½ saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Kontrole kıyasla en yüksek canlılık 500 μM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük canlılık oranı ise 1500 μM kolhisin dozlarından elde edilmiştir. 1750 ve 2000 μM kolhisin dozlarında ise canlılığa rastlanmamıştır. ½ saat inkübasyon süresinde kolhisin dozları arasında 0.01 düzeyinde bir farklılık vardır.

Uslu üzüm çeşidinde sürgün ucu eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile başlangıç sürgün uzunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur. En yüksek başlangıç sürgün uzunluğu kontrol grubundan elde edilmiştir. Kontrole kıyasla en yüksek başlangıç sürgün uzunluğu 250 μM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük başlangıç sürgün uzunluğu ise 1500 μM kolhisin dozundan elde edilmiştir. Başlangıç sürgün uzunluğu, tüm dozlar incelendiğinde 00.00-1.19 cm aralığında olduğu gözlenmiştir. Kolhisin dozu arttıkça ters orantılı bir şekilde bitki canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu

azalmıştır (Çizelge 4.28). Başlangıç sürgün uzunluğu açısından dozlar arasında da 0.01 düzeyinde önemli bir farklılık bulunmuştur.

Çizelge 4.28 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | Canlılık oranı (%) | Başlangıç sürgün uzunluğu (cm) |
|-------------|--------------------|--------------------------------|
| 0 (kontrol) | 71.85 ± 5.93 a | 1.19 ± 0.07 a |
| 250 | 60.00 ± 0.00 b | 1.17 ± 0.03 b |
| 500 | 66.67 ± 0.00 ab | 1.10 ± 0.07 b |
| 750 | 66.60 ± 0.00 ab | 0.83 ± 0.07 c |
| 1000 | 62.50 ± 7.23 b | 0.81 ± 0.10 c |
| 1250 | 65.00 ± 0.00 ab | 0.76 ± 0.02 c |
| 1500 | 50.00 ± 0.00 c | 0.60 ± 0.06 d |
| 1750 | 00.00 ± 0.00 d | 0.00 ± 0.00 e |
| 2000 | 00.00 ± 0.00 d | 0.00 ± 0.00 e |

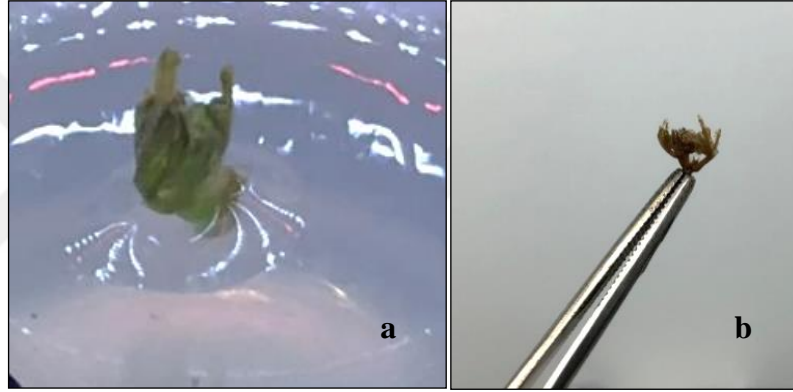
** %1 düzeyinde önemli ve ±: standart hata

Sırasıyla canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu için değerler: CV (%):10.36, CV (%):6.28

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{doz.}:8.82**, LSD_{doz.}:0.08**

Uslu üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında sürgün ucu eksplantının bitki canlılık oranı bakımından 0.01 düzeyinde bir interaksiyon bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde canlılık oranları %21.67-71.85 arasında değişmiştir (Çizelge 4.29). Uslu çeşidinde sürgün ucu eksplantına sıvı besin ortamında 24-48 saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek canlılık oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Dozlara bağlı olarak canlılık oranı arasında 0.01 düzeyinde bir farklılık görülmüştür. En yüksek canlılık oranı 1000 µM uygulamasında 24 saat inkübasyon süresinde (%59.23) gerçekleşmiştir ve süreye bağlı olarak 48 saat inkübasyon süresinde (%25.00) canlılık oranında azalma meydana gelmiştir. 1250 µM kolhisin uygulamasında en yüksek canlılık oranı 24 saat uygulamasında elde edilmiş (%50.00) ve inkübasyon süresine bağlı olarak canlılık oranı azalarak 48 saat için %25.00 olarak belirlenmiştir. En yüksek doz olan 1500 µM uygulamasında ise 24 saat sürede %25.00 olarak belirlenen canlılık oranı; 48 saat inkübasyon süresinde %21.67 olarak tespit edilmiştir. 24 saat ve 48 saat değerleri arasındaki istatistik bakımdan farklılık 0.01 düzeyinde önemlidir. Her muamele ile kolhisin dozu arttıkça ters orantılı bir şekilde bitki canlılık oranı azalmıştır. Uslu çeşidinde sürgün ucu eksplantında

canlılık oranı açısından LD₅₀ değerleri incelendiğinde 24-48 saat uygulamasında 1250 µM × 48 saat süre boyunca uygulanan kolhisin dozu LD₅₀ değeri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.29). Uslu üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında sürgün ucu eksplantının başlangıç sürgün uzunluğu bakımından istatistik olarak önemli bir interaksyon bulunmamıştır. En yüksek başlangıç sürgün uzunluğu kontrol grubunda bulunmuştur. 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000, 1250 ve 1500 µM kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları sırasıyla 0.83, 0.43 ve 0.33 cm olarak azalmıştır. 48 saat inkübasyon süresinde de uygulanan 1000, 1250 ve 1500 µM kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları sırasıyla 0.60, 0.35 ve 0.27 cm olarak azalmıştır. Her muamele ile kolhisin dozu arttıkça ters orantılı bir şekilde başlangıç sürgün uzunluğu düşmüştür (Çizelge 4.29 ve Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Uslu çeşidinde 24-48 saat kolhisin uygulaması ardından canlı kalan (a) ve canlılığını yitiren (b) sürgün ucu eksplantının 7 günlük görünümü

Çizelge 4.29 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranı (%) ve başlangıç sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | | | |
|-------------|--------------------------|----------------|---------|--------------------------------|-------------|--------|
| | Canlılık oranı (%) | | | Başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | | |
| | 24 saat | 48 saat | Ort. | 24 saat | 48 saat | Ort. |
| 0 (kontrol) | 71.85 ± 5.93 a | 71.85 ± 5.93 a | 71.85 a | 1.19 ± 0.07 | 1.19 ± 0.07 | 1.19 a |
| 1000 | 59.23 ± 4.69 ab | 25.00 ± 0.00 c | 42.11 b | 0.83 ± 0.08 | 0.60 ± 0.10 | 0.72 b |
| 1250 | 50.00 ± 0.00 b | 25.00 ± 0.00 c | 37.50 b | 0.43 ± 0.08 | 0.35 ± 0.07 | 0.39 c |
| 1500 | 25.00 ± 0.00 c | 21.67 ± 7.65 c | 20.00 c | 0.33 ± 0.03 | 0.27 ± 0.03 | 0.30 c |
| Ortalama | 34.21 b | 51.52 a | | 0.70 a | 0.60 b | |

**%1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil ve ±: standart hata

Sırasıyla canlılık oranı ve başlangıç sürgün uzunluğu için değerler: CV(%):17.62, CV(%):12.18

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:9.38**, LSD_{doz}:0.1**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{süre}:6.63**, LSD_{süre}:0.07*

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD test. göre: LSD_{süre×doz}: 13.27**, LSD_{süre×doz}^{öd}:-

4.5.3 Kolhisin uygulamalarının tek boğumlu mikro çelik eksplantında rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğuna etkisi

Sıvı MS besin ortamlarında (BBD içermeyen MS besin ortamı) tek boğumlu mikro çelik eksplantına ½ saat inkübasyon süresinde 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 µM dozunda kolhisin uygulamasının ve 24-48 saat inkübasyon süresindeki 0, 1000, 1250, 1500 µM dozunda kolhisin uygulamasının rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu bulguları çeşitlere göre açıklanmıştır. Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde yapılan kolhisin uygulamalarının tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerdeki rejenerasyon oranı ile gelişen sürgünlerin uzunluğuna etkilerine ait grafikler EK-2'de verilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu: Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile rejenerasyon oranı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Rejenerasyon oranı tüm dozlar arasında %17.14-54.16 arasında değişmiştir (Çizelge 4.30). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına sıvı besin ortamında ½ saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Kontrole kıyasla en yüksek rejenerasyon 250 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük rejenerasyon oranı ise 1750 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile sürgün uzunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. En yüksek sürgün uzunluğu kontrol grubundan elde edilmiştir. Kontrole kıyasla en yüksek sürgün uzunluğu 250 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük sürgün uzunluğu ise 1500 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. Sürgün uzunluğunun, tüm dozlar incelendiğinde 0.77-2.28 cm aralığında olduğu gözlenmiştir. Canlılık oranında olduğu gibi doz artışı ile ters orantılı bir şekilde rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğunda da düşüş gözlenmiştir (Çizelge 4.30 ve Şekil 4.14).

Çizelge 4.30 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (μM) | Rejenerasyon oranı (%) | Sürgün uzunluğu (cm) |
|-----------------------|------------------------|----------------------|
| 0 (kontrol) | 54.16 \pm 3.22 a | 2.28 \pm 0.13a |
| 250 | 42.85 \pm 0.00 ab | 1.40 \pm 0.06 b |
| 500 | 40.47 \pm 3.34 abc | 1.22 \pm 0.17 bcd |
| 750 | 41.64 \pm 0.00 abc | 1.34 \pm 0.21 bc |
| 1000 | 38.18 \pm 1.67 a-d | 1.00 \pm 0.17 cde |
| 1250 | 30.21 \pm 1.67 b-e | 0.85 \pm 0.08 de |
| 1500 | 24.28 \pm 0.00 de | 0.77 \pm 0.12 e |
| 1750 | 17.14 \pm 4.45 e | 1.00 \pm 0.08 cde |
| 2000 | 26.67 \pm 0.00 cde | 0.80 \pm 0.12 e |

**%1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli ve \pm : standart hata

Sırasıyla rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu için değerler: CV(%):9.37, CV(%):12.43

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}}:8.51^*$, $\text{LSD}_{\text{doz}}:0.25^{**}$

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu \times inkübasyon süreleri arasında tek boğumlu mikro çelik eksplantının rejenerasyon oranı bakımından önemli bir interaksiyon bulunmamıştır. Tüm dozlar incelendiğinde rejenerasyon oranının %00.00-56.67 arasında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.31). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına sıvı besin ortamında 24-48 saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubunda bulunmuştur. 1500 μM kolhisin dozunda 24 ve 48 saat süre uygulamalarının her ikisinde de rejenerasyon belirlenmemiştir. 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000 ve 1250 μM kolhisin dozlarındaki rejenerasyon oranı doz arttıkça azalmıştır ve sırasıyla %53.33 ve 49.88 olarak tespit edilmiştir. 48 saat inkübasyon süresinde de uygulanan 1000 ve 1250 μM kolhisin dozlarındaki rejenerasyon oranı sırasıyla %49.28 ve 51.00 olarak belirlenmiştir. 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri arasında önemli bir fark bulunmazken, dozlar arasında 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur.

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu \times inkübasyon süreleri arasında tek boğumlu mikro çelik eksplantının sürgün uzunluğu bakımından istatistik olarak 0.05 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. En yüksek sürgün uzunluğu kontrol grubunda bulunmuştur (Çizelge 4.31 ve Şekil 4.15). 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000 ve 1250 μM kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları sırasıyla 1.01 ve 1.03 cm olarak azalmıştır. 48 saat inkübasyon süresinde de

uygulanan 1000 ve 1250 μM kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları sırasıyla 0.60 ve 0.74 cm olarak belirlenmiştir. 1500 μM kolhisin dozunda 24 ve 48 saat süre uygulamalarının her ikisinde de rejenerasyon belirlenemediği için sürgün uzunluğu da tespit edilememiştir. 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri arasında 0.05 düzeyinde, dozlar arasında ise 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur.



Şekil 4.14 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde ½ saat süresinde 750 ve 1250 μM kolhisin dozu uygulanmış tek boğumlu mikro çelik eksplantından elde edilen sürgün rejenerasyonu

Çizelge 4.31 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (μM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|------------------|----------|----------------------|--------------------|---------|
| | Rejenerasyon oranı (%) | | | Sürgün uzunluğu (cm) | | |
| | 24 saat | 48 saat | Ort. | 24 saat | 48 saat | Ort. |
| 0 (kontrol) | 56.67 \pm 4.65 | 56.67 \pm 4.65 | 56.67 a | 2.28 \pm 0.13a | 2.28 \pm 0.13 a | 2.28 a |
| 1000 | 53.33 \pm 3.34 | 49.28 \pm 0.72 | 51.31 ab | 1.01 \pm 0.14 b | 0.60 \pm 0.09 c | 0.80 b |
| 1250 | 50.00 \pm 2.89 | 51.00 \pm 1.00 | 50.00 b | 1.03 \pm 0.05 b | 0.74 \pm 0.14 c | 0.89 b |
| 1500 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 \pm 0.00 | 00.00 c | 00.00 \pm 0.00 d | 00.00 \pm 0.00 d | 00.00 d |
| Ortalama | 40.00 | 39.24 | | 1.08 a | 0.91 b | |

**%1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil ve \pm : standart hata

Sırasıyla rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu için değerler: CV(%):11.56, CV(%):12.34

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{doz}}:5.67^{**}$, $\text{LSD}_{\text{doz}}:0.15^{**}$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $\text{LSD}_{\text{süre}}^{\text{öd}}:-$, $\text{LSD}_{\text{süre}}:0.11^*$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD test. göre: $\text{LSD}_{\text{süre}\times\text{doz}}^{\text{öd}}:-$, $\text{LSD}_{\text{süre}\times\text{doz}}:2.14^*$



Şekil 4.15 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde 1250 µM kolhisin dozunda kontrol, 24 saat ve 48 saat inkübasyon sürelerindeki tek boğumlu mikro çelik eksplantından sürgün rejenerasyonu

Uslu çeşidinde rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu: Uslu üzüm çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına ½ saat sürede muamele edilen kolhisin dozları ile rejenerasyon oranı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde rejenerasyon oranının %00.00-47.88 arasında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.32). En yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubunda, kontrole kıyasla en yüksek rejenerasyon oranı ise 1000 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. En düşük rejenerasyon oranı 1750 µM kolhisin dozundan elde edilirken; 2000 µM kolhisin dozunda ise rejenerasyona rastlanmamıştır.

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile sürgün uzunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. En yüksek sürgün uzunluğu kontrol grubundan elde edilmiştir. Kontrole kıyasla en yüksek sürgün uzunluğu 250 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük sürgün uzunluğu ise 1750 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu, tüm dozlar incelendiğinde 0.50-1.06 cm aralığındadır. Canlılık oranında olduğu gibi doz artışı ile ters orantılı bir şekilde rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğunda da azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.32).

Çizelge 4.32 Sıvı besin ortamında ½ saat süresince farklı dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | Rejenerasyon oranı (%) | Sürgün uzunluğu (cm) |
|-------------|------------------------|----------------------|
| 0 (kontrol) | 47.88 ± 1.40 a | 1.06 ± 0.10 a |
| 250 | 33.33 ± 0.00 b | 0.90 ± 0.06 b |
| 500 | 33.33 ± 0.00 b | 0.70 ± 0.00 d |
| 750 | 34.44 ± 2.94 b | 0.83 ± 0.03bc |
| 1000 | 44.44 ± 5.56 a | 0.77 ± 0.02 cd |
| 1250 | 23.33 ± 1.69 c | 0.72 ± 0.02 d |
| 1500 | 31.19 ± 3.10 b | 0.75 ± 0.03 d |
| 1750 | 14.29 ± 0.00 d | 0.50 ± 0.00 e |
| 2000 | 00.00 ± 0.00 e | 00.00 ± 0.00 f |

**%1 düzeyinde önemli ve ±: standart hata

Sırasıyla rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu için değerler: CV(%):15.00, CV(%):6.73

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:7.56**, LSD_{doz}:0.08**

Uslu üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında tek boğumlu mikro çelik eksplantının rejenerasyon oranı bakımından istatistik olarak 0.05 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. Uslu çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantına sıvı besin ortamında 24-48 saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubunda bulunmuştur. 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000, 1250 ve 1500 µM kolhisin dozlarındaki rejenerasyon oranı doz arttıkça azalmıştır ve sırasıyla %48.33, 40.00 ve 17.71 olarak kaydedilmiştir. 48 saat inkübasyon süresinde de uygulanan 1000 ve 1250 µM kolhisin dozlarındaki rejenerasyon oranı sırasıyla 31.10 ve 26.20 olarak belirlenmiştir. 1500 µM kolhisin dozunda 48 saat süre uygulamasında rejenerasyon belirlenmemiştir (Çizelge 4.33). Rejenerasyon oranı bakımından 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri arasında ve dozlar arasında 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur.

Uslu üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında tek boğumlu mikro çelik eksplantının sürgün uzunluğu bakımından istatistik olarak 0.05 düzeyinde bir interaksiyon bulunmuştur. En yüksek sürgün uzunluğu kontrol grubundan elde edilmiştir (Çizelge 4.33). 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000, 1250 ve 1500 µM kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları sırasıyla 0.74, 0.64 ve 0.47 cm olarak tespit edilmiştir. 48 saat inkübasyon süresinde de uygulanan 1000 ve 1250 µM kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları sırasıyla 0.65 ve

0.50 cm olarak belirlenmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından hem 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri arasında hem de dozlar arasında 0.05 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.33 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | | | |
|-------------|--------------------------|----------------|---------|----------------------|---------------|--------|
| | Rejenerasyon oranı (%) | | | Sürgün uzunluğu (cm) | | |
| | 24 saat | 48 saat | Ort. | 24 saat | 48 saat | Ort. |
| 0 (kontrol) | 48.41 ± 0.97 a | 48.41 ± 0.97 a | 49.07 a | 1.06 ± 0.10 a | 1.06 ± 0.10 a | 1.06 a |
| 1000 | 48.33 ± 1.67 a | 31.10 ± 3.10 c | 39.72 b | 0.74 ± 0.03 b | 0.65 ± 0.09 c | 0.69 b |
| 1250 | 40.00 ± 5.01 b | 26.20 ± 3.13 c | 33.10 c | 0.64 ± 0.07 c | 0.50 ± 0.00 d | 0.57 b |
| 1500 | 17.78 ± 1.11 d | 00.00 ± 0.00 e | 8.89 d | 0.47 ± 0.05 d | 00.00 ± 0.00 | 0.24 c |
| Ortalama | 38.96 a | 26.42 b | | 0.73 a | 0.55 b | |

** %1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli ve ±: standart hata

Sırasıyla rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu için değerler: CV (%):13.70, CV (%):7.98

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $LSD_{doz}:5.58^{**}$, $LSD_{doz}:0.13^{*}$

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $LSD_{süre}:3.93^{**}$, $LSD_{süre}:0.09^{*}$

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: $LSD_{süre \times doz}:7.80^{*}$, $LSD_{süre \times doz}:0.9^{**}$

4.5.4 Kolhisin uygulamalarının sürgün ucu eksplantında rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğuna etkisi

Sıvı MS besin ortamlarında (BBD içermeyen MS besin ortamı) sürgün ucu eksplantına ½ saat inkübasyon süresinde 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 µM dozunda kolhisin uygulamasının ve 24-48 saat inkübasyon süresindeki 0, 1000, 1250, 1500 µM dozunda kolhisin uygulamasının rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu bulguları çeşitlere göre açıklanmıştır. Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde yapılan kolhisin uygulamalarının sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerdeki rejenerasyon oranı ile gelişen sürgünlerin uzunluğuna etkilerine ait grafikler EK-2’de verilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz çeşidinde rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu: Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sürgün ucu eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile rejenerasyon oranı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde rejenerasyon oranları %00.00-94.63 arasında bulunmuştur (Çizelge 4.34). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde

sürgün ucu eksplantına sıvı besin ortamında ½ saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Kontrole kıyasla en yüksek rejenerasyon 250 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük rejenerasyon oranı ise 1500 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. 2000 µM kolhisin dozundan rejenerasyon sağlanamamıştır.

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sürgün ucu eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile sürgün uzunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. En yüksek sürgün uzunluğu kontrol grubundan elde edilmiştir. Kontrole kıyasla en yüksek sürgün uzunluğu 250 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük sürgün uzunluğu ise 1750 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. Tüm dozlar incelendiğinde sürgün uzunluğunun 0.13-2.36 cm aralığında olduğu gözlenmiştir. Canlılık oranında olduğu gibi doz artışı ile ters orantılı bir şekilde rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğunda da düşüş gözlenmiştir. (Çizelge 4.34).

Çizelge 4.34 Sıvı besin ortamında ½ saat boyunca farklı dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | Rejenerasyon oranı (%) | Sürgün uzunluğu (cm) |
|-------------|------------------------|----------------------|
| 0 (kontrol) | 94.63 ± 3.21 a | 2.36 ± 0.20 a |
| 250 | 70.00 ± 0.00 b | 1.45 ± 0.00 b |
| 500 | 43.33 ± 3.34 cd | 0.80 ± 0.05 c |
| 750 | 40.00 ± 0.00 d | 0.72 ± 0.04 c |
| 1000 | 48.33 ± 1.67 c | 0.85 ± 0.08 c |
| 1250 | 41.66 ± 1.67 cd | 0.84 ± 0.09 c |
| 1500 | 16.43 ± 0.00 e | 0.82 ± 0.10 c |
| 1750 | 21.11 ± 4.45 e | 0.13 ± 0.03 d |
| 2000 | 0.00 ± 0.00 f | 0.00 ± 0.00 d |

** %1 düzeyinde önemli ve ±: standart hata

Sırasıyla rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu için değerler: CV (%):9.78, CV (%):11.79

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:7.06**, LSD_{doz}:0.18**

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında sürgün ucu eksplantının rejenerasyon oranı bakımından istatistik açıdan 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde rejenerasyon oranının %00.00-94.63 arasında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.35). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sürgün ucu eksplantına sıvı besin ortamında 24-48 saat

süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubunda bulunmuştur. 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000 ve 1250 µM kolhisin dozlarındaki rejenerasyon oranı sırasıyla %55.55, 11.11 olarak bulunmuştur. En yüksek doz olan 1500 µM kolhisin dozunda ise rejenerasyon oranı %00.00 olarak tespit edilmiştir. 48 saat inkübasyon süresinde de uygulanan 1000, 1250 ve 1500 µM kolhisin dozlarındaki rejenerasyon oranı sırasıyla %50.00, 27.78 ve 22.22 olarak belirlenmiştir. Rejenerasyon oranı bakımından 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri arasında 0.05 düzeyinde; dozlar arasında ise 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur. Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında sürgün ucu eksplantının sürgün uzunluğu bakımından istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. En yüksek sürgün uzunluğu kontrol grubunda bulunmuştur. Her muamele ile kolhisin dozu arttıkça genel olarak sürgün uzunluğu düşmüştür (Çizelge 4.35). 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000 ve 1250 µM kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları sırasıyla 1.85, ve 1.10 cm olarak tespit edilmiştir. 48 saat inkübasyon süresinde de uygulanan 1000, 1250 ve 1500 µM kolhisin dozlarındaki sürgün uzunlukları sırasıyla 1.31, 0.90 ve 1.03 cm olarak belirlenmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri arasında önemli bir fark bulunmazken; dozlar arasında 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.35 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Sultani Çekirdeksiz çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | | | |
|-------------|--------------------------|----------------|---------|----------------------|---------------|--------|
| | Canlılık oranı (%) | | | Sürgün uzunluğu (cm) | | |
| | 24 saat | 48 saat | Ort. | 24 saat | 48 saat | Ort. |
| 0 (kontrol) | 94.63 ± 3.22 a | 94.63 ± 3.22 a | 94.63 a | 2.36 ± 0.20 a | 2.36 ± 0.20 a | 2.36 a |
| 1000 | 55.55 ± 5.56 b | 50.00 ± 0.00 b | 52.78 b | 1.85 ± 0.03 b | 1.31 ± 0.09 d | 1.38 b |
| 1250 | 11.11 ± 1.11 d | 27.78 ± 4.01 c | 19.44 c | 1.10 ± 0.00 cd | 0.90 ± 0.00 c | 1.21 c |
| 1500 | 00.00 ± 0.00 e | 22.22 ± 0.00 c | 11.11 d | 00.00 ± 0.00 e | 1.03 ± 0.12 d | 0.52 d |
| Ortalama | 40.32 b | 48.66 a | | 1.40 | 1.33 | |

** %1 düzeyinde önemli, * %5 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil ve ±: standart hata

Sırasıyla rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu için değerler: CV (%):3.64, CV (%):8.98

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:5.15**, LSD_{doz}:0.15**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{süre}:3.64*, LSD_{süre}:^{öd}

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre:LSD_{süre×doz}:7.28*, LSD_{süre×doz}:0.21**

Uslu çeşidinde rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu: Uslu üzüm çeşidinde sürgün ucu eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile rejenerasyon oranı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde rejenerasyon oranının %00.00-71.85 arasında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.36). Uslu çeşidinde sürgün ucu eksplantına sıvı besin ortamında ½ saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubunda bulunmuştur. Kontrole kıyasla en yüksek rejenerasyon 500 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük rejenerasyon oranı ise 1250 µM kolhisin dozundan elde edilmiş, 1500-2000 µM kolhisin doz aralığında ise rejenerasyona rastlanmamıştır.

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sürgün ucu eksplantına ½ saat süre muamele edilen kolhisin dozları ile sürgün uzunluğu arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik açıdan 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. En yüksek sürgün uzunluğu kontrol grubundan elde edilmiştir. Kontrole kıyasla en yüksek sürgün uzunluğu 250 µM kolhisin dozundan elde edilirken, en düşük sürgün uzunluğu ise 1250 µM kolhisin dozundan elde edilmiştir. Tüm dozlar incelendiğinde sürgün uzunluğunun 0.00-1.48 cm aralığında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.36).

Çizelge 4.36 Sıvı besin ortamında ½ saat süresince farklı dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | Rejenerasyon oranı (%) | Sürgün uzunluğu (cm) |
|-------------|------------------------|----------------------|
| 0 (kontrol) | 71.85 ± 5.93 a | 1.22 ± 0.02 b |
| 250 | 60.00 ± 0.00 b | 1.48 ± 0.01 a |
| 500 | 64.44 ± 2.22 ab | 1.15 ± 0.00 b |
| 750 | 62.22 ± 2.22 ab | 0.88 ± 0.01 d |
| 1000 | 55.00 ± 7.51 b | 0.96 ± 0.09 cd |
| 1250 | 16.66 ± 3.34 c | 1.02 ± 0.02 c |
| 1500 | 00.00 ± 0.00 d | 00.00 ± 0.00 e |
| 1750 | 00.00 ± 0.00 d | 00.00 ± 0.00 e |
| 2000 | 00.00 ± 0.00 d | 00.00 ± 0.00 e |

** %1 düzeyinde önemli ve ±: standart hata

Sırasıyla rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu için değerler: CV (%):16.43, CV (%):7.218

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:10.43**, LSD_{doz}:0.09**

Uslu üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında sürgün ucu eksplantının rejenerasyon oranı bakımından 0.05 düzeyinde

önemli bir interaksiyon bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde rejenerasyon oranının %00.00-65.92 arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.37). Uslu çeşidinde sürgün ucu eksplantına sıvı besin ortamında 24-48 saat süre kolhisin muamelesi sonrasında en yüksek rejenerasyon oranı kontrol grubunda bulunmuştur. 1500 µM kolhisin dozunda 24 ve 48 saat süre uygulamaların her ikisinde de rejenerasyon belirlenememiştir. 24 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000 ve 1250 µM kolhisin dozlarındaki rejenerasyon oranı doz arttıkça azalmıştır ve sırasıyla %25.00 ve 10.00 olarak tespit edilmiştir. 48 saat inkübasyon süresinde uygulanan 1000 µM kolhisin dozunda rejenerasyon oranı %22.22 olarak bulunurken; 1250 µM kolhisin dozundan rejenerasyon elde edilmemiştir. Rejenerasyon oranı bakımından 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri arasında önemli bir fark bulunmazken; dozlar arasında ise 0.01 düzeyinde bir fark bulunmuştur.

Uslu üzüm çeşidinde sıvı besin ortamında uygulanan kolhisin dozu × inkübasyon süreleri arasında sürgün ucu eksplantının sürgün uzunluğu bakımından istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bir interaksiyon bulunmuştur. En yüksek sürgün uzunluğu kontrol grubunda bulunmuştur. Tüm dozlar incelendiğinde sürgün uzunluğunun 00.00-1.22 cm aralığında olduğu gözlenmiştir. 1000 µM kolhisin dozundan 24 ve 48 saat inkübasyon süresinde sırasıyla 0.85 ve 0.80 cm sürgün uzunluğu belirlenmiştir (Çizelge 4.37). Sürgün uzunluğu bakımından hem 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri arasında hem de dozlar arasında 0.01 düzeyinde bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.37 Sıvı besin ortamında farklı süre ve dozda kolhisin muamelesi ile Uslu çeşidinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranı (%) ve sürgün uzunluğu (cm)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | | | | | |
|-------------|--------------------------|----------------|---------|--------------------------------|----------------|---------|
| | Canlılık oranı (%) | | | Başlangıç sürgün uzunluğu (cm) | | |
| | 24 saat | 48 saat | Ort. | 24 saat | 48 saat | Ort. |
| 0 | 65.92 ± 5.93 a | 65.92 ± 5.93 a | 65.92 a | 1.22 ± 0.02 a | 1.22 ± 0.02 a | 1.22 a |
| 1000 | 25.00 ± 8.34 b | 22.22 ± 2.78 b | 23.61 b | 0.85 ± 0.03 b | 0.80 ± 0.00 b | 0.83 b |
| 1250 | 10.00 ± 5.01 c | 00.00 ± 0.00 d | 5.00 bc | 0.50 ± 0.03 c | 00.00 ± 0.00 d | 0.25 c |
| 1500 | 00.00 ± 0.00 d | 00.00 ± 0.00 d | 00.00 c | 00.00 ± 0.00 d | 00.00 ± 0.00 d | 00.00 d |
| Ortalama | 22.31 | 22.04 | | 0.64 a | 0.51 b | |

** %1 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil ve ±: standart hata

Sırasıyla rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu için değerler: CV (%):16.77, CV (%):1.65

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{doz}:9.10**, LSD_{doz}:0.04**

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD testine göre: LSD_{süre}^{öd}:-, LSD_{süre}:0.03**

Aynı blokta farklı harflerle ifade edilen ort. arasında LSD test. göre: LSD_{süre×doz}:6.91*, LSD_{süre×doz}: 0.05**

4.6 Çekirdek DNA İçeriğine Ait Bulgular

4.6.1 Orizalin uygulamaları ile elde edilen *in vitro* bitkiciklerde çekirdek DNA içeriği

Sıvı ve katı MS besin ortamlarında (BBD içermeyen MS besin ortamı) koltuk altı meristemi eksplantına 0, 20, 30 ve 40 μM dozunda orizalin uygulamasının flow sitometri analizi Çekirdek DNA içerik bulguları çeşitlere göre açıklanmıştır.

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde kontrol grubunda DNA içeriği ortalama 1.11 pg bulunmuştur (Şekil 4.38). Orizalin uygulamaları sonrasında Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde koltuk altı meristem eksplantında kontrole kıyasla sıvı besin ortamında çekirdek DNA içerik miktarının 1.16-1.28 pg arasında, katı besin ortamında ise 1.12-2.32 pg arasında değiştiği gözlenmiştir. Yapılan analizlerde koltuk altı meristem eksplantı açısından bakıldığında sıvı besin ortamında anlamlı bir fark bulunamazken; katı besin ortamında uygulamalar arasında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0.01$) belirlenmiştir. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde kallus eksplantında yalnızca 24 saat süresince 40 μM kolhisin uygulamasından sonra sağlıklı bir şekilde rejenerasyonu sağlanan bitkilerde canlılığın devamı sürdürülebilmiş ve yapılan analizlerde çekirdek DNA içerik miktarının ortalaması 1.21 pg olarak bulunmuştur (Çizelge 4.38). Her iki eksplant için Sultani Çekirdeksiz çeşidinde orizalin uygulamaları sonrasında ploidi düzeylerinde bir değişim saptanmamıştır.

Uslu üzüm çeşidinde kontrol grubunda DNA içeriği ortalama 1.14 pg bulunmuştur. Orizalin uygulamaları sonrasında Uslu üzüm çeşidinde koltuk altı meristem eksplantında kontrole kıyasla sıvı besin ortamında çekirdek DNA içerik miktarının 1.09-1.16 pg arasında, katı besin ortamında ise 1.20-1.22 pg arasında değiştiği gözlenmiştir. Sıvı ve katı besin ortamında 30 ve 40 μM kolhisin uygulamalarında yalnızca 24 saat süresince 40 μM kolhisin uygulamasında analiz yapılabilmektedir. Yapılan analizlerde her iki besin ortamı için ayrı ayrı bakıldığında uygulamalar arasında istatistik analiz yapılamamıştır. Uslu üzüm çeşidinde kallus eksplantında kolhisin uygulamalarından sonra sağlıklı bir şekilde rejenerasyonu sağlanan bitkilerde canlılığın

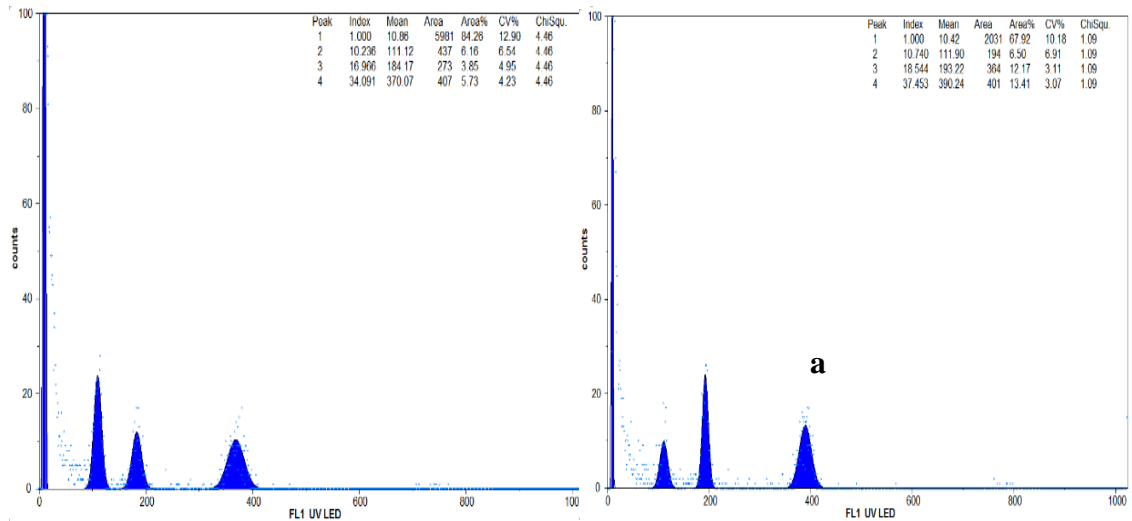
devamı sürdürülememiş çekirdek DNA içerikleri ve ploidi düzeyleri çoğu uygulamada belirlenememiş ve istatistik açıdan bir karşılaştırma yapılamamıştır (Çizelge 4.39).

Çizelge 4.38 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinin koltuk altı meristemi ve kallus eksplantına sıvı ve katı besin ortamlarında uygulanan orizalinin farklı doz ve uygulama sürelerinde kolhisin uygulamasının ardından çekirdek DNA içerik ortalamaları (pg/2C)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | Koltuk altı meristemi | | Kallus | |
|-------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | | Sıvı besin ortamı | Katı besin ortamı | Sıvı besin ortamı | Katı besin ortamı |
| 0 (kontrol) | | 1.11 ± 0.01 | 1.11 ± 0.01 b | 1.11 ± 0.01 | 1.11 ± 0.01 |
| 20 | 24 | 1.17 ± 0.00 | 1.22 ± 0.01 b | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 36 | 1.21 ± 0.00 | 1.15 ± 0.00 b | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 48 | 1.22 ± 0.02 | 1.16 ± 0.05 b | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 30 | 24 | 1.28 ± 0.03 | 1.17 ± 0.01 b | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 36 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 48 | 1.16 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 40 | 24 | 1.23 ± 0.01 | 2.32 ± 0.00 a | 1.21 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 36 | 0.00 ± 0.00 | 1.12 ± 0.03 b | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 48 | 1.21 ± 0.03 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| Ortalama | | 1.18 ± 0.01 | 1.28 ± 0.01 | 1.16 ± 0.00 | 1.11 ± 0.01 |
| %CV ve LSD | | 5.49, ^{öd} | 6.01, 0.13** | 5.12, ^{öd} | Veri alınmadı |

** %1 düzeyinde önemli,, ^{öd} önemli değil ve ±: standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasındaki fark LSD testine göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.16 Kontrol grubu diploid Sultani Çekirdeksiz ve standart bitkinin (Domates) G1 piki Sultani Çekirdeksiz (a) ve Uslu (b)

Çizelge 4.39 Uslu üzüm çeşidinin koltuk altı meristemi ve kallus eksplantlarına sıvı ve katı besin ortamında uygulanan orizalinin farklı doz ve inkübasyon sürelerinde kolhisin uygulamasının ardından çekirdek DNA içerik ortalamaları (pg/2C)

| Doz (µM) | İnkübasyon süresi (saat) | Koltuk altı meristemi | | Kallus | |
|-------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Sıvı besin ortamı | Katı besin ortamı | Sıvı besin ortamı | Katı besin ortamı |
| 0 (kontrol) | | 1.14 ± 0.01 | 1.14 ± 0.01 b | 1.14 ± 0.01 | 1.14 ± 0.01 |
| 20 | 24 | 1.09 ± 0.01 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 36 | 1.16 ± 0.01 | 1.22 ± 0.01 a | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 48 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 30 | 24 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 36 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 48 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| 40 | 24 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 36 | 0.00 ± 0.00 | 1.20 ± 0.01 a | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| | 48 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| Ortalama | | 1.13 | 1.19 | 1.14 | 1.14 |
| %CV ve LSD | | 0.36, ^{öd} | 1.63, 0.44* | Veri alınmadı | Veri alınmadı |

* %5 düzeyinde önemli, ve ±: standart hata

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasındaki fark LSD testine göre değerlendirilmiştir.

4.6.2 Kolhisin uygulamaları ile elde edilen *in vitro* bitkiciklerde çekirdek DNA içeriği

Sıvı MS besin ortamlarında (BBD içermeyen MS besin ortamı) sürgün ucu eksplantına ½ saat inkübasyon süresinde 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 ve 2000 µM dozunda kolhisin uygulamasının ve 24-48 saat inkübasyon süresindeki 0, 1000, 1250, 1500 µM dozunda kolhisin uygulamasının flow sitometri analizi Çekirdek DNA içerik bulguları çeşitlere göre açıklanmıştır.

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde kontrol grubunda DNA içeriği ortalama 1.32 pg bulunmuştur. ½ saat kolhisin uygulamaları sonrasında ise çekirdek DNA içeriklerinin tek boğumlu mikro çelik eksplantında kontrole kıyasla 1.14-1.21 pg arasında, sürgün ucu eksplantında ise 1.18-1.23 pg arasında değiştiği gözlenmiştir. Yapılan analizlerde Sultani Çekirdeksiz çeşidinde ½ saat kolhisin uygulamaları arasında tek boğumlu mikro çelik eksplantı açısından anlamlı bir fark bulunamazken; sürgün ucu eksplantı açısından anlamlı bir fark olduğu (p<0.05) belirlenmiştir (Çizelge 4.40). 24-48 saat kolhisin uygulamasında çekirdek DNA içeriklerinin tek boğumlu mikro çelik eksplantında

kontrole kıyasla 1.07-1.49 pg arasında, sürgün ucu eksplantında 1.12-1.20 pg arasında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 4.41). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde 24-48 saat uygulamasında en yüksek çekirdek DNA içerik miktarı 48 saat süresince 1000 µM kolhisin uygulaması sonucu meydana gelmiştir. Yapılan analizlerde Sultani Çekirdeksiz çeşidinde 24-48 saat süresince kolhisin dozları arasında doz × süre interaksyonuna bakıldığında tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantı açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Çizelge 4.41). Sultani Çekirdeksiz çeşidinde her iki sürede uygulamalar sonrasında ploidi düzeylerinde bir değişim saptanmamıştır.

Uslu üzüm çeşidinde kontrol grubunda DNA içeriği ortalama 1.26 pg bulunmuştur. ½ saat kolhisin uygulamaları sonrasında ise çekirdek DNA içeriklerinin tek boğumlu mikro çelik eksplantında kontrole kıyasla 1.00-1.22 pg arasında, sürgün ucu eksplantında ise kontrole kıyasla 1.18-1.21 pg arasında değiştiği gözlenmiştir. Yapılan analizlerde Uslu çeşidinde ½ saat süresince kolhisin dozları arasında doz × süre interaksyonuna bakıldığında tek boğumlu mikro çelik eksplantı açısından anlamlı bir fark olduğu ($p<0.01$) bulunurken; sürgün ucu eksplantı açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Çizelge 4.40). Uslu çeşidinde 24-48 saat kolhisin uygulamasında çekirdek DNA içeriklerinin tek boğumlu mikro çelik eksplantında 1.13-1.15 pg arasında değiştiği gözlenmiştir. Sürgün ucu eksplantında ise yalnızca 48 saat süresince 1000 µM kolhisin uygulamasından sonra analiz yapılan örneklerde çekirdek DNA içerik miktarının ortalaması 1.10 pg olarak bulunmuştur (Çizelge 4.41). Yapılan analizlerde Uslu çeşidinde ½ saat süresince kolhisin dozları arasında doz × süre interaksyonuna bakıldığında tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantı açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Çizelge 4.41). Uslu çeşidinde her iki sürede uygulamalar sonrasında ploidi düzeylerinde bir değişim saptanmamıştır.

Çizelge 4.40 Uslu ve Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşitlerinde tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantına ½ saat süresince farklı dozda kolhisin uygulamasının ardından çekirdek DNA içerik ortalamaları (pg/2C)

| Doz (µM) | Tek boğumlu mikro çelik | | Sürgün ucu | |
|------------|-------------------------|----------------|---------------------|--------------------------|
| | Sultani Çekirdeksiz | Uslu | Sultani Çekirdeksiz | Uslu |
| Kontrol | 1.32 ± 0.02 a | 1.26 ± 0.02 a | 1.32 ± 0.02 a | 1.26 ± 0.02 |
| 250 | 1.21 ± 0.01 b | 1.17 ± 0.02 b | 1.19 ± 0.02 bc | 1.21 ± 0.00 |
| 500 | 1.19 ± 0.01 b | 1.22 ± 0.01 ab | 1.22 ± 0.04 bc | 1.21 ± 0.02 |
| 750 | 1.20 ± 0.01 b | 1.19 ± 0.01 b | 1.23 ± 0.03 b | 1.18 ± 0.02 |
| 1000 | 1.15 ± 0.01 b | 1.21 ± 0.01 ab | 1.18 ± 0.00 c | 1.19 ± 0.01 |
| 1250 | 1.14 ± 0.02 b | 1.20 ± 0.02 ab | 1.18 ± 0.02 c | 1.20 ± 0.00 |
| 1500 | 1.14 ± 0.02 b | 1.08 ± 0.05 c | 1.20 ± 0.02 bc | 0.00 ± 0.00 |
| 1750 | 1.15 ± 0.01 b | 0.00 ± 0.00 | 1.18 ± 0.01 c | 0.00 ± 0.00 |
| 2000 | 1.16 ± 0.04 b | 1.00 ± 0.00 d | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |
| %CV ve LSD | 3.62, 0.07* | 3.66, 0.07** | 2.16, 0.04* | 3.22, 0.07 ^{öd} |

** %1 düzeyinde önemli, *%5 düzeyinde önemli, ^{öd} önemli değil ve ±: standart hata
Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasındaki fark LSD testine göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.41 Uslu ve Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinin tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantlarına 24-48 saat süresince farklı dozda kolhisin uygulamasının ardından çekirdek DNA içerik ortalamaları (pg/2C)

| Doz(µM)/ İnkübasyon süresi (saat) | Tek boğumlu mikro çelik | | Sürgün ucu | |
|---|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Sultani Çekirdeksiz | Uslu | Sultani Çekirdeksiz | Uslu |
| 0 | 1.32 ± 0.02 b | 1.26 ± 0.02 a | 1.32 ± 0.02 a | 1.26 ± 0.02 a |
| 1000-24 | 1.11 ± 0.02 c | 1.17 ± 0.01 b | 1.12 ± 0.00 c | 0.00 ± 0.00 c |
| 1250-24 | 1.12 ± 0.03 c | 1.17 ± 0.01 b | 0.00 ± 0.00 d | 0.00 ± 0.00 c |
| 1500-24 | 1.07 ± 0.01 c | 0.00 ± 0.00 d | 0.00 ± 0.00 d | 0.00 ± 0.00 c |
| 1000-48 | 1.49 ± 0.35 a | 1.13 ± 0.02 b | 1.20 ± 0.01 b | 1.10 ± 0.03 b |
| 1250-48 | 0.00 ± 0.00 d | 1.15 ± 0.01 b | 0.00 ± 0.00 d | 0.00 ± 0.00 c |
| 1500-48 | 0.00 ± 0.00 d | 0.00 ± 0.00 d | 0.00 ± 0.00 d | 0.00 ± 0.00 c |
| Ortalama | 1.22 | 1.18 | 1.21 | 1.18 |
| %CV ve LSD | 20.03, 0.62 ^{öd} | 2.42, 0.05 ^{öd} | 2.22, 0.06 ^{öd} | 4.00, 0.04 ^{öd} |

^{öd}önemli değil ve ±: standart hata
Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ort. arasındaki fark LSD testine göre değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Doku kültürü tekniği mutasyonun uyarılma etkinliğinin artırılmasında aktif rol oynamaktadır. Mutasyonun uyarılmasında *in vivo* kaynaklı eksplantlardan daha çok *in vitro* kaynaklı doku, organ, hücre vb. eksplantlar daha geniş uygulama materyal seçeneği sunmaktadır (Predieri 2001). Ayrıca doku kültürü, seçilen çeşitlerde mutagen uygulamasının ardından seleksiyon ve klonlama yapılabilmesi için geniş populasyonların kullanılmasına da olanak verir. Bu da eksplantların hızlı bir şekilde çoğaltımının yapıp alt kültüre alınması ile mutasyona uğramamış kısımlarının yeniden mutasyona uğrama şansını artırmaktadır (Ahloowalia 1998).

In vitro poliploidizasyon için öncelikle doğru doku kültürü tekniğini seçmek ve bunun için de ilk başta doğru ve maksimum düzeyde başarı sağlayacak eksplantın seçimi gereklidir. *In vitro* kromozom katlama çalışmalarında eksplant tipinin önemli olduğu ve başarının da bununla ilişkili olduğu vurgulanmaktadır (Kermani vd. 2003, Petersen vd. 2003). Başarı farklılıklarının dokunun geçirgenliğine ve meristemdeki antimitotik ajanın taşınma kabiliyetine bağlı olduğu kabul edilmektedir (Allum vd. 2007).

Antimitotik ajanın aynı bitki türünde hatta aynı çeşitteki bitkinin farklı doku ya da organına uygulanması da farklı sonuçlar doğurmaktadır (Sinski vd. 2014). Örneğin; *Miscanthus*'da sürgün ucu, yaprak ve olgunlaşmamış çiçek salkımı (Petersen vd. 2002), *Rosa*'da sürgün ucu (Kermani vd. 2003), şeftalide mikro çelik (Bouvier vd. 2002), *Lilium*'da soğan pulu (Takamura vd. 2002), *Solanum* türlerinde tepe tomurcuğu, (Chauvin vd. 2003), *Alocasia*'da sürgün ucu (Thao vd. 2003), *Rosa rugosa*'da boğum (Allum vd. 2007), *Ranunculus*'da sürgün (Dhooghe vd. 2009) gibi farklı cins ve türlerde farklı eksplantlar kullanılmıştır. Asmada ise *in vitro* kromozom katlama amacıyla daha çok sürgün ucu kültürü, boğum kültürü, koltuk altı meristem kültürü gibi organogenez yöntemleri, embriyo kültürü ve somatik embriyogenez yöntemleri kullanılmıştır (Notsuka vd. 2000, Aihong vd. 2005, Prado vd. 2010, Guo vd. 2011, Acanda vd. 2013, Chang vd. 2014, Sinski vd. 2014). Bu amaçla genelde olgunlaşmamış zigotik embriyodan geliştirilen embriyogenik kallus (Yang vd. 2006), anter ve embriyogenik

kallustan oluşan somatik embriyo (Prado vd. 2010, Xie vd. 2015), sürgün ucu (Sinski vd. 2014), koltuk altı meristemi (Notsuka vd. 2000) vb. eksplant olarak kullanılmıştır.

Eksplant seçiminden sonra *in vitro*da virüsten, hastalıktan arı bir şekilde sağlıklı bitkilerin rejenerasyonu önemlidir. Bunun için doku kültürünün ilk adımı eksplant sterilizasyonudur. *In vitro* poliploidizasyon çalışmalarında fiziksel ve kimyasal mutagen uygulamalarından sonra en yüksek canlılık ve rejenerasyonun sağlanması ile ploidi seviyesini artırmak için daha fazla eksplanta sahip olma avantajını getirmektedir. Bu tez çalışmasında Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde orizalin ve kolhisin uygulamalarında kullanılan eksplantlara ayrı ayrı yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Öncelikle orizalin uygulaması yapılan koltuk altı meristemi ve kallus eksplantlarına ulaşmak için başlangıç eksplantı olarak *in vivo* kaynaklı sürgün ucu kullanılmıştır. Uygulamalarda kullanılan eksplantlar bu sürgün ucunun rejenerasyonundan elde edilmiştir. Bu nedenle orizalin uygulamasında yalnızca sürgün ucu sterilizasyonu yapılmıştır. Etil alkol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) uygulaması *in vitro* eksplant yüzey sterilizasyonu çalışmalarında dezenfektan kullanımından önce yapılan genel bir uygulamadır. Etil alkolün uygulama süresi ve uygulama dozu eksplantın orijinine ve genotipe göre değişiklik göstermektedir. Bu tez çalışmasında Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinin sürgün ucu eksplantında yapılan eksplant yüzey sterilizasyon denemelerinde dezenfektan kullanımından önce etil alkol muamelesi yapılmayan eksplantlarda daha yüksek canlılık (sırasıyla; %90.00-%92.30) elde edildiği görülmüştür. Bu çalışmaya benzer şekilde Stamp vd. (1990) sürgün ucu eksplantının, Salunkhe vd. (1997) ise asma sülüklerinin sterilizasyonunda dezenfektan kullanımından önce etil alkol muamelesi yapmamıştır. Laslo vd. (2010)'nin çalışmasında etil alkol muamelesi yapılmadan %0.1 HgCl_2 çözeltisi dezenfektan olarak kullanılmıştır. Literatür incelemesi yapıldığında eksplanta dezenfektan uygulamadan önce %70-75 oranlarında etil alkol muamelesi yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmalarda kullanılan etil alkolün inkübasyon sürelerine bakıldığında ise; sürgün ucu, lateral tomurcuk, aksiller tomurcuk, boğum ve petiyol vb. eksplantlara 8-10 sn (Zhang vd. 2007), 30 sn (Akbaş vd. 2004, Mukherjee vd. 2010), 1 dk (El-Agamy vd. 2009, Diab vd. 2011), 2 dk (Tassoni vd. 2005), 3 dk (Roubelakis-Angelakis ve Zivanovitc 1991) ve 5 dk (Jaskani vd. 2008) gibi sürelerde uygulama yapıldığı görülmüştür. Bu çalışmalar etil alkolün fitotoksik özelliğine dikkat

çekerek *in vitro* çalışmalarındaki canlılık oranını üzerinde olumsuz etki yaratabileceğini sonucunu ortaya koymuştur (Oyebanji vd. 2009). Sterilizasyon aşamasında etil alkolün dışında dezenfektan olarak 8-HQC (8-hydroxy quinnoline citrate) (Singh vd. 2004, Alizadeh ve Singh 2009), HgCl₂ (Mhatre vd. 2000, Laslo vd. 2010, Mukherjee vd. 2010, Krizan vd. 2012), NaOCl ve Ca(OCl)₂ (kalsiyum hipoklorit) (Lee ve Wetzstein 1990, Oyebanji vd. 2009) gibi kimyasallar kullanılmaktadır. Bunların içinde asmada en yaygın ve en etkili yüzey dezenfektanının sodyum hipoklorit tuzu olduğu ifade edilmiştir (Oyebanji vd. 2009).

Etil alkol uygulaması yapılmaksızın Actijen kimyasalının dezenfektan olarak kullanıldığı tez çalışmasında Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitleri sürgün ucu canlılık oranı bulgularına (sırasıyla; %90.00-92.30) benzer bulgular Jaskani vd. (2008), Diab vd. (2011) ve Abido vd. (2013) tarafından elde edilmiştir. Jaskani vd. (2008), %70'lik etil alkolde 5 dk bekletilen sürgün ucu eksplantlarında en yüksek canlılık oranını (%96.30) %10'luk NaOCl dezenfektanında 15 dk süresince yapılan uygulamadan elde ettiklerini bildirmişlerdir. Diab vd. (2011), 1 dk etil alkol uygulaması ardından %1.5 NaOCl dezenfektanı uygulanan sürgün ucu eksplantından %90.00'a yakın bir canlılık elde ettiğini vurgulamıştır. Abido vd. (2013)'nin çalışmasında ise en yüksek canlılığı (%80.00) %0.52 dozundaki NaOCl çözeltisinde 15 dk süresince bekletilmiş sürgün ucu eksplantından elde ettiğini bildirmiştir. Zhang vd. (2007)'nin çalışmasında sürgün ucu canlılık oranının (%44.44-75.00) bu tez çalışmasındaki sürgün ucu canlılık oranından daha düşük oranda olduğu bulunmuştur. Çeşme suyu ve etil alkol uygulaması yapılmayan çalışmalarda en yüksek canlılığı (%48) %0.1 HgCl₂ çözeltisinde 10 dk süre uygulamasından (Laslo vd. 2010) ve birkaç damla %0.01'lik Tween 20 içeren %10'luk NaOCl çözeltisinde 15 dk süre ile yapılan sterilizasyondan (Babalık ve Baydar 2008) elde edildiği rapor edilmiştir.

Kolhisin uygulamasında ise eklant olarak *in vivo* kaynaklı sürgün ucu ve tek boğumlu mikro çelik seçilmiştir. Sürgün ucu eksplantı için optimize edilen sterilizasyon protokolü uygulanmıştır; fakat tek boğumlu mikro çelik eksplantında Actijen dezenfektanı ile yapılan sterilizasyon yönteminde yüksek kontaminasyon varlığı saptanmıştır. Bu nedenle *in vivo*'dan alınan tek boğumlu mikro çelikler, çeşme suyunun

altında 2-3 saat durulandıktan sonra yine her iki çeşitte sürgün ucu eksplantında olduğu gibi etil alkol muamelesi olmadan %20'lik NaOCl'de 15 dk boyunca yapılan sterilizasyon işleminden en yüksek canlılık (%86.6) elde edilmiştir. Her iki çeşitte sürgün ucunda yapılan sterilizasyon uygulamaları ile canlılık oranı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur. Çeşitler değerlendirildiğinde benzer çalışmalarda ki bulgulara paralel bulgulardaki canlılık oranı sonuçları ile *in vivo* kaynaklı sürgün ucu eksplantının tez çalışması için etkili bir başlangıç materyali olduğu ortaya konmuştur. Tek boğumlu mikro çelik eksplantına yapılan sterilizasyon uygulamaları ile canlılık oranı arasındaki ilişki incelendiğinde de istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur. Bu çalışmada hem sürgün ucunda hem de tek boğumlu mikro çelik eksplantında her iki çeşit için de arasında canlılık oranı açısından benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Fakat eksplantın etkisinin sterilizasyon aşamasında genotipe bağlı olarak değerlendirildiği çalışmalar da mevcuttur (Chauvin vd. 2003; Khosravi vd. 2008, De Mello E Silva vd. 2000, Stanys vd. 2006, Dhooghe vd. 2011).

Tez çalışmasında orizalin denemesinde kullanılan koltuk altı meristemi *in vivo* kaynaklı sürgün ucunun başlangıç materyali olarak kullanıldığı sürgün kültürü sonucu elde edilmiştir. Orizalin çalışmasında kullanılan bir diğer eksplant olan kallus ise yine sürgün ucu başlangıç materyalinden elde edilmiştir. Kallus gelişimi için yapılan ön denemelerde kallus indüksiyonu için *in vivo* kaynaklı boğum arası eksplant en uygun eksplant seçilmiştir. Tekstür açısından en sağlıklı kallus örnekleri ise 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l 2,4-D ortamından elde edilmiştir. Bu ortamdaki kalluslar daha sağlıklı, gevrek, yeşil yapıdadır. Araştırmacılar *Vitis* cinsinin farklı tür ve çeşitlerinde kallus oluşturmak ya da somatik embriyo geliştirmek için yaprak, petiol eksplantı (Martinelli vd. 1993, Robacker 1993, Keskin ve Kunter 2007, Babalık ve Baydar 2008), olgunlaşmamış çiçek salkımı (Petersen vd. 2002, Yang vd. 2006), tam çiçek, anter ve ovaryum (Gambino vd. 2007), gövde (Babalık ve Baydar 2008) ve boğum (Khan vd. 2015) vb. eksplantlarını kullanmışlardır. Bu tez çalışmasında yapılan denemelerde farklı eksplantlar kallus rejenerasyonu için kullanılmıştır. Çalışmada yaprak disk eksplantından elde edilen kallus rejenerasyon oranı boğum arası eksplantından elde edilen rejenerasyon oranına göre daha düşük kaldığı belirlenmiştir Buna karşın farklı eksplantlar aracılığıyla kallus

gelişimi sağlamaya çalışan Babalık ve Baydar (2008) ve Passos vd. (1999) en iyi kallus gelişimin oranının yaprak diski eksplantından gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Babalık ve Baydar (2008) en iyi kallus gelişim oranını (%97.56) 1 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D + 1 g/l kazein hidrolizat içeren MS ortamından sağlarken; Passos vd. (1999) ise en iyi kallus gelişim oranını (%100) 4 mg/l NAA + 0.9 mg/l TDZ içeren MS ortamından elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Kullanılan antimitotik ajanın bitki hücrelerine iyi bir şekilde nüfuz etmesi için DMSO (Dimetil sülfoksit) veya NaOH (Sodyum hidroksit) vb. yardımcı kimyasallar kullanılmaktadır. Örneğin; kolhisin çözeltisinin içine %1-2 gibi oranlarda DMSO eklenmesi kolhisinin etkinliğini artırarak hücreye daha iyi nüfuz etmesini sağlamaktadır (Ganga ve Chezhiyan 2002, Yang vd. 2006, Sinski vd. 2014, Eng ve Ho 2019). Yapılan bir çalışmada DMSO eklenen besin ortamında kolhisin uygulamasına tabi tutulan bu bitkilerde %50'lik bir kimerizm görüldüğü ve bununla beraber DMSO'nun tetraploid ve kimerik bitki oluşum oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Petersen vd. 2002). DMSO'nun bitki dokularına verdiği zararlar nedeniyle; mutagen olarak kolhisin kullanmak yerine NaOH veya etanolde (C₂H₅OH) çözünebilme avantajına sahip olan orizalin (Hamill vd. 1992) mutageni (antimitotik ajan) kullanımı artış göstermiştir. Antimitotik ajanların hazırlanması ve sterilizasyonu aşamalarındaki farklılıkların bitki canlılığı ve ploidi seviyesini etkilediği görülmektedir. Mutagen çalışmalarında kolhisin çözeltisinin sterilizasyonu incelendiğinde soğuk filtre sterilizasyonu (Wu ve Mooney 2002, Petersen vd. 2002, Shao vd. 2003, Yang vd. 2006) şeklinde veya kolhisinin besin ortamına otoklavlanmadan hemen önce eklenmesi (Gmitter ve Ling 1991) şeklinde yapıldığı görülmüştür. Zhang vd. (2007) çalışmasında her iki sterilizasyon metodunu karşılaştırmıştır. Kolhisin sterilizasyonları karşılaştırıldığında otoklavlanarak sterilize edilen kolhisinin uygulandığı kallus hücrelerinin DNA'sında daha çok (%59) farklılaşmış DNA içeriğine rastlandığı ve daha fazla tetraploid bitki elde edildiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da kolhisin ve orizalinin steril şırınga filtreden geçirilerek soğuk sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca uygulanan bitki dokularında emilimini artırmak adına orizalin çözeltisine 1-2 damla NaOH, kolhisin çözeltisine ise %1 oranında DMSO eklenmiştir.

*In vitro*da antimitotik ajanın katı, yarı katı ya da sıvı besin ortamında uygulanması (Kermani vd. 2003, Guo vd. 2011, Sinski vd. 2014), uygulama süresinin uzunluğu (Ganga ve Chezhiyan 2002, Allum vd. 2007, Escandon vd. 2007, Glowacka vd. 2010, Chen vd. 2014) ve doz seviyesi (Ganga ve Chezhiyan 2002, Notsuka vd. 2000, Xie v d. 2015) canlılığı ve ploidi seviyesini değiştiren faktörler arasındadır.

Bu tez çalışmasında Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde orizalin uygulamasında koltuk altı meristemi ve kallus eksplantı canlılık oranları değerlendirildiğinde; sıvı besin ortamı katı besin ortamına göre genel olarak daha yüksek canlılık gösterdiği belirlenmiştir. Koltuk altı meristeminden elde edilen sürgün rejenerasyonu incelendiğinde Sultani Çekirdeksiz çeşidi için 48 saat süre orizalin muamelesi için uygun besin ortam tipinin sıvı besin ortamı olduğu görülmüştür. Katı besin ortamında rejenerasyon oranı daha düşük kalmış ve ek olarak yüksek dozdaki orizalin uygulamasında hiç rejenerasyon sağlanamamıştır. Uslu çeşidinde de genele baktığımızda koltuk altı meristeminde katı ve sıvı besin ortamlarının her ikisinde rejenerasyon neredeyse hiç gerçekleşmemiş; fakat katı besin ortamında 20 µM orizalinden rejenerasyon kısmen de olsa sağlanabilmiştir. Özellikle kallus rejenerasyonuna bakıldığında Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında rejenerasyon tüm dozlar ve sürelerde %50'nin altında da olsa görülmüştür. Fakat katı besin ortamında 48 saat süre uygulamasında rejenerasyon elde edilememiştir. Uslu çeşidi incelendiğinde kallus eksplantında da koltuk altı meristeminde olduğu gibi rejenerasyon sağlanamamıştır. Yalnızca sıvı besin ortamında 24 saat süre uygulamalarında tüm dozlarda %25'in altında bir rejenerasyona rastlanmıştır. Benzer şekilde sıvı ve katı besin ortamının karşılaştırıldığı bir çalışmada orizalin Rosa cinsinde orizalin sürgün ucu eksplantına sıvı besin ortamında 5 ve 15 µM dozunda 14 ve 28 saat, yarı-katı besin ortamında 5 ve 15 µM dozunda 14, 21 ve 28 saat olmak üzere iki farklı uygulama yapılmıştır. Yarı-katı besin ortamında inkübasyon sürelerine göre sırasıyla %50.00 (14 saat), %35.00 (21 saat) ve %20.00 (28 saat) canlılık tespit edilmiştir. 15 µM orizalinden ise hiç canlılık elde edilemediği görülmüştür. Sıvı besin ortamında ise 14 ve 28 saat süreleri karşılaştırıldığında katı besin ortamına göre daha yüksek canlılık görüldüğü bildirilmiştir (Kermani vd. 2003). Xie vd. (2015)'nin sürgün ucu ve pre-embriyogenik kallus eksplantına orizalin uygulaması yaptıkları çalışmasında bu

çalışmada kullanılan eksplant ve dozlarda olduğu gibi sürgün ucu eksplantında 250, 625 ve 1250 µM dozunda kolhisin katı MS besin ortamında, 5, 15 ve 30 µM dozundaki orizalin ise sıvı besin ortamında uygulanmıştır. Embriyogenik kalluslara yapılan uygulama bu tez çalışmasından farklı olarak petri kabında orizalin çözeltisi emdirilmiş iki adet filtre kağıdının arasına konulmak suretiyle gerçekleştirilmiş ve daha sonra kallus gelişim ortamına aktarılmıştır. Kallustan rejenere olup en az iki yapraklı hale gelen sürgünlerden flow sitometride ploidi belirlenmesi amacıyla yaprak örneği alınmıştır. Canlılık oranlarına baktığımızda en yüksek canlılık oranı (%97.78) sıvı besin ortamında orizalin uygulanmış sürgün ucu eksplantında görülmüştür. Aynı çalışmada orizalinin katı besin ortamında uygulanmadığı için bu tez çalışması ile bir karşılaştırmaya gidilememiştir. Kallus eksplantında ise hem kolhisin hem de orizalinin en düşük dozunda eşit seviyede canlılık görülmüştür. Bu tez çalışmasında sıvı besin ortamında koltuk altı meristeminde 30 µM orizalin dozunda rejenerasyon sağlanamazken Xie vd. (2015)'nin bu dozda sürgün ucu ve kallustan rejenerasyon sağladığı görülmüştür. Bu noktada da eksplant ile doz arasındaki ilişki yine ön plana çıkmaktadır. Nadler vd. (2012)'nin çalışmasında sıvı ve katı besin ortamlarda sürgünlere orizalin uygulaması yapılmıştır. Sıvı besin ortamında yapılan uygulamadan daha fazla poliploid bitki üretimi olduğu; katı besin ortamından ise tetraploid bitki meydana gelmediği bildirilmiştir. Tetraploid bitkiye ulaşmak için en etkili orizalin uygulamasının sıvı besin ortamının içine orizalin eklenmesi şeklinde olduğu vurgulanmıştır. Bu bulguların tez çalışmasını doğrular nitelikte olduğu görülmüştür. Zhang vd. (2007)'nin *Citrus sinensis* türünde yaptıkları mutasyon çalışmasında eksplant olarak kallus kullanmışlardır. İlk uygulamada kolhisin kallus eksplantlarına sıvı besin ortamına eklenerek direkt uygulanmıştır. Bir diğer uygulamada ise katı besin ortamında kültüre alınan kalluslar 6 gün sonra 0, 2, 4, 6 ve 10 gün süre boyunca kolhisin içeren katı besin ortamına alınmıştır. Sıvı besin ortamında, katı besin ortamına göre daha fazla kallusun canlılığını yitirdiğini ve bunun da büyük ölçüde orizalin çözeltisinin etil alkol ile hazırlanmış olmasından kaynaklandığını bildirmiştir. Sıvı ve katı besin ortamlarında uygulanan kolhisin sonrası rejenere olan sürgünlerde eşit sayıda diploid ve poliploid bireylerin tespit edildiği ve istatistik anlamda bir fark olmadığına dikkat çekmişlerdir. Mitotik bir inhibitör olan orizalin, tübülüne bağlanarak ve mikrotübül polimerizasyonunu inhibe ederek hücre bölünmesi ve uzamasını önlemeye etki eder

(Morejohn vd. 1987, Hugdahl ve Morejohn 1993). Yapılan çalışmalar sonucunda orizalin mutageni eksplanta uygulandıktan sonra bitki gelişiminde bir gerileme olduğu ve yeni yaprak çıkışının azaldığı ve bununla beraber uygulama süresinin de önemli bir etkisi olmadığı vurgulanmıştır. Bu noktada orizalinin eksplantlar tarafından hızlı bir şekilde emildiği görüşü ileri sürülmektedir (Morejohn vd. 1987, Sinski vd. 2014). Sinski vd. (2014) tarafından bildirildiğine göre; orizalinin bitkilerde henüz mekanizması bilinmeyen bir şekilde endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtının morfolojisini etkilediği görülmektedir (Langhans vd. 2009). Benzer şekilde kolhisinin de bitki sistemlerinde pleiotroik etkisi (Luckett 1989, Liu vd. 2009, Sinski vd. 2014) olduğu ve anafaz safhasında mitozu yakalayabilen oldukça başarılı bir antimotitik ajan (Thao vd. 2003) olduğu belirtilmiştir. Kolhisinin bitki hücrelerindeki farklılaşma sürecini değiştirip, iğ ipliklerini yok ettiği; bu nedenle kolhisin uygulamasının ardından embriyoların yenilenmesi ve sürgün üretimi sürecinde gecikmelerin meydana geldiği belirtilmektedir (Yang vd. 2006). Farklı türlerde orizalin ve kolhisinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, *Lilium* ve *Nerine*'de orizalinin hem daha etkili ve hem de daha az fitotoksik olduğunu ve kolhisine alternatif olabileceği (Van Tuyl vd. 1992), *Rosa helleborus*'da kromozom katlamada kolhisin dozlarının etkisiz olduğu; orizalinin ise tetraploidiyi uyardığı (Dhooghe vd. 2009) vurgulanmıştır. Carvalho vd. (2005) çalışmalarında *Bixa orellana* (arnatto) bitkisinin *in vitro*da yetiştirilmiş bitkiciklerinin hipokotil ve kotiledon boğumlarını B5 vitaminlerini içeren katılaştırılmış MS besin ortamında 4 farklı dozda kolhisin (0, 25, 250 ve 1250 μ M) ve 4 farklı dozda orizalin (0, 5, 15 ve 30 μ M) kültüre almışlardır. Kolhisin ve orizalin içeren ortamlarda 15 gün sonra yalnızca 25 μ M kolhisin dozu uygulaması yapılan eksplantlarda canlılık görülürken, uygulanan tüm orizalin dozlarında canlılık saptandığı bildirilmiştir. Petersen vd. (2002)'nin çalışmasında *Miscanthus*'da farklı eksplant tiplerine kolhisin uygulamasının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisi olmadığı; orizalin uygulamasında ise eksplant tipi ve orizalin dozuna bağlı olarak uygulanan orizalin dozunun kallus oluşumunu azalttığı ya da hiç etkilemediği sonucuna varmışlardır. Uygulanan en uzun süre (42 saat) ve en yüksek dozdaki (2504 μ M) orizalinin bitkilerin neredeyse tamamını öldürdüğü bildirilmiştir. Aynı çalışmada orizalin ve kolhisin uygulamaları karşılaştırıldığında her üç eksplantta da orizalin uygulamalarından sonra 30 μ M orizalin dozunda canlılık gözlenmediğini ve *M. sinensis* bitkisinin sürgün uçlarına en etkili

orizalin uygulamasının 15 µM dozunda sıvı orizalin çözeltisinde 96 saat süre boyunca yapılan muameleden elde ettiklerini bildirmişlerdir. Zhang vd. (2007), kolhisinsiz ortamda 6 gün boyunca bekletildikten sonra kolhisin içeren ortama alınan kallus eksplantlarına farklı sürelerde uygulanan kolhisinin oluşturduğu canlılık oranı ile kolhisinsiz ortamda bekletmeden direkt kolhisin uygulanan eksplant canlılık oranlarının arasında istatistik açıdan önemli bir fark olduğu belirtilmiştir. Kalluslara 6 gün sonra uygulanan kolhisin uygulamasından gelişen bitkiciklerde direkt yapılan uygulamaya göre daha fazla DNA içeriğinde değişim meydana geldiği ifade edilmiştir. Tetraploid bitki elde edebilmek için en etkili uygulama süresinin ise 4-6 gün aralığında olduğu ve 1 ve 2 günlük inkübasyon sürelerinin tetraploidiyi uyarmada etkili olmadığı ortaya konmuştur. Yapılan tez çalışmasından elde edilen bulgular Zhang vd. (2007)'nin yapmış oldukları bu çalışmayı desteklemektedir. Uygulama Xie vd. (2015)'in yaptığı çalışmada ise orizalin uygulamasından 4-8 hafta sonra orizalinin eksplantlar üzerindeki toksik etkisi değerlendirilmiş ve bazı eksplantlarda bileşiğin toksisitesinden dolayı nekroz oluşumu gözlemlendiği bildirilmiştir. Araştırmacılar eksplant canlılığını antimitotik ajanın dozuna ve uygulama süresine bağlamıştır. Çalışmanın sonucunda aynı uygulama yapılmış olan üç farklı eksplantta en yüksek canlılığın sürgün ucu ve daha sonra sırasıyla embriyogenik kallus ve anter eksplantından elde edildiği bildirilmiştir. Bouvier vd. (2002) şeftalide eksplant canlılığı için en uygun aralığın 200-300 µM orizalin dozu olduğunu ve Chauvin vd. (2003) ise patateste tepe tomurcuklarında tetraploid bitki oluşturmak için en etkin uygulamanın 28.8 µM dozundaki orizalin çözeltisinin 24 saat süre uygulamasından elde edildiği rapor etmişlerdir. Orizalinin kallus canlılığı üzerindeki etkisine bakılan bir çalışmada (Nadler vd. 2012) 150 µM dozundaki sıvı orizalin çözeltisinde yapılan uygulama ile 40 gün boyunca 150 µM dozunda orizalin eklenmiş katı besin ortamında yapılan uygulamanın her ikisinin de kallus canlılığına etki etmediği ve bunun yanında orizalin uygulanan genç bitkilerde yaprak üretiminin de önemli ölçüde azaldığını ($p<0.01$) ifade etmişlerdir. Bu tez çalışmasında koltuk altı meristemi eksplantında katı besin ortamında orizalin uygulama sınırı (LD₅₀ değeri) Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitleri için 48 saat uygulama süresince sırasıyla 40 ve 30 µM orizalin dozu olarak belirlenmiştir. Sıvı besin ortamında ise her iki çeşit için 40 µM orizalin dozunun 48 saat süresince uygulanması uygulama sınır olarak belirlenmiş ve yüksek dozların koltuk altı meristemi eksplantı için uygulanabilir bir doz olduğu tespit

edilmiştir. LD₅₀ değeri açısından kallus eksplantı değerlendirildiğinde; Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristem eksplantında olduğu gibi sıvı besin ortamında yine %50'nin altında seyreden bir canlılığa rastlanmamıştır. İnkübasyon süresi ele alındığında 48 saatte Sultani Çekirdeksiz çeşidinde (40 µM doz × 48 saat), Uslu çeşidine göre orizalinin yüksek dozlarına daha iyi dayanım gösterdiği söylenebilir. Katı besin ortamında ise her iki çeşitte de doz × süre kombinasyonuna dayanımın sıvı besin ortamına nazaran azaldığı görülmüştür. Sultani Çekirdeksizde LD₅₀ değeri 30 µM doz × 48 saat olarak bulunurken, Uslu çeşidinde bu değer 40 µM doz × 24 saat bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak katı besin ortamında yapılan orizalin uygulamasının eksplant üzerindeki etkinliğinin sıvı besin ortamındaki etkinliğinden daha yüksek olduğu şeklinde yorumlanabilir. Diğer çalışmalarla karşılaştırdığımızda uygulanan orizalin dozu eksplanta göre farklılık göstermekle birlikte uygulama dozlarının düşük olmasına rağmen çalıştığımız çeşitler için toksik oldukları görülmektedir. Bu noktada sıvı besin ortamında yapılan orizalin uygulamasının koltuk altı meristemi ve kallus eksplantı için daha yüksek dozlar denenebileceği ya da düşük dozda daha uzun sürede deneme yapılabileceği dokulara mutagenin nüfuzunun sağlanması için etkili olabileceği söylenebilir.

Kolhisin dozu ve uygulama süresinin canlılık oranına etkisinin araştırıldığı çalışmalarda kolhisin doz aralıklarına bakıldığında; Notsuka vd. (2000)'nin 3 farklı diploid kültür çeşidinde %0.2 ve %0.05 dozundaki kolhisini 1, 2, 3 ve 5 saat süresince uyguladığı görülmüştür. Çalışma sonucunda 2 gün süre ile %0.2 dozundaki kolhisinden en yüksek oranda tetraploid birey elde edildiği bildirilmiştir. 5 gün süre ile yapılan kolhisin uygulamasının sonucunda canlılık elde edilememiştir. Acanda vd. (2015)'nin çalışmasında şaraplık Mencia üzüm çeşidinde (*V. vinifera*) 4 farklı dozdaki kolhisin (%0, 0.1, 0.2 ve 0.4) 24 saat süresince süspansiyon kültüründe embriyogenik hücre kümelerine uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda en etkili kolhisin dozunun Notsuka vd. (2000)'de olduğu gibi %0.2'lik kolhisin doz uygulamasında olduğu ve bu dozda %25 oranında tetraploid bitkiye ulaşıldığı belirtilmiştir. Ekbiç ve Tangolar (2016)'ın çalışmasında Trakya İlkeren ve Flame Seedless çeşitlerinde kolhisin uygulaması *in vivo*'da sürgün ucu eksplantına 1, 3 ve 5 gün süresince %0.5, 0.75 ve 1'lik dozdaki kolhisin çözeltisine batırılmış pamuklara sarılarak yapılmıştır. Trakya İlkeren çeşidinde

%1; Flame Seedless çeşidinde ise %0.75 ve %1'lik kolhisin dozlarının sürgün ucu eksplantı için toksisite ve kurumaya neden olduğu bildirilmiştir. Her iki çeşitte de sürgün ucundaki canlılık oranına bakıldığında kontrol grubuna en yakın sonuçlar %0.5'lik kolhisin dozunun 1 ya da 3 günlük sürelerle uygulanmasından elde edildiği belirtilmiştir. Sinski vd. (2014)'nin çalışmasında canlılık için en iyi doz \times süre sürgün ucunda 250 μ M kolhisin dozunun 48 saat uygulamasından elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşidi için ½ saat kolhisin uygulamasında en yüksek canlılık 500 μ M kolhisin dozunda elde edilmiştir. Benzer çalışmalarda olduğu gibi her iki çeşitte 24 saat uygulamasında 48 saate göre daha yüksek canlılık görülmüştür. Dozlara bakıldığında ise en iyi canlılık 1000 μ M orizalin dozunda 24 saat süresinde elde edilmiştir. Letal dozlarda uygulama sınırları çeşide göre farklılık göstermiştir. Sürgün ucunda uygulama sınırı ½ saat uygulamasında Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde sırasıyla 1500 ve 1750 μ M kolhisin dozu olarak bulunmuştur. 24-48 saat inkübasyon süre uygulaması değerlendirildiğinde; her iki çeşit için LD₅₀ değeri 1250 μ M doz \times 48 saat olarak belirlenmiştir. Tek boğumlu mikro çelik eksplantına ait bulgulara bakıldığında; Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşidi için ½ saat kolhisin uygulamasında en yüksek canlılık 250 μ M kolhisin dozundan elde edildiği görülmüştür. Her iki çeşitte 24 saat uygulamasında 48 saate göre daha yüksek canlılık görülmüştür. Dozlara bakıldığında ise en iyi canlılık oranı Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde 24 saat süresinde sırasıyla 1250 ve 1000 μ M kolhisin dozunda elde edilmiştir. Tek boğumlu mikro çelik eksplantına uygulanan kolhisin mutageninin LD₅₀ değerine bakıldığında yine sürgün ucunda olduğu gibi çeşide göre farklılık göstermiştir. Sürgün ucunda Sultani Çekirdeksiz çeşidinde yapılan ½ saat ve 24-48 saat uygulamalarında %50'nin altında bir canlılık görülmemiştir. Uslu çeşidinde ise ½ saat uygulaması için uygulama sınırı 2000 μ M bulunurken, 24-48 saat süre uygulaması için LD₅₀ değeri 1250 μ M doz \times 48 saat süre olarak belirlenmiştir.

Van Duren vd. (1996)'de muzda sürgün rejenerasyonu ve gelişimine yüksek kolhisin dozlarının olumsuz etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Petersen vd. (2002), 60 μ M dozda orizalin uygulamasının *M. Sinensis* bitkisinin olgunlaşmamış çiçek salkımlarının rejenerasyonu esnasında kallus oluşumunu önlediğini rapor etmişlerdir. Carvalho vd. (2005), kolhisin uygulamasının rejenerasyon esnasında arnatto bitkisinin kotiledon

boğumlarındaki çimlenmeyi geciktirdiğini ve rejenerasyonda hipokotilde kısmi ya da tamamen bozulmalar olduğunu vurgulamışlardır. Xie vd. (2015)'nin çalışmasında ise kromozom katlama çalışmalarının eksplantlardaki büyüme ve gelişmeyi önemli ölçüde geciktirdiğini vurgulamıştır. Sürgün uçlarında uygulama sonrasında ilk rejenerasyon 4 hafta sonra, kontrolde ise 3 hafta içinde gerçekleşmiştir. Embriyogenik kalluslarda 3-4 hafta daha gecikme olmuş, kontrol grubunda ise rejenerasyon yaklaşık iki ay sonunda gerçekleşmiştir. Anterden embriyogenik kallus üretiminde ise bu süre 5 aylık bir sürede gerçekleşmiştir. Sinski vd. (2014), Crimson Seedless ve BRS Clara ticari sofralık üzüm çeşitlerinde bu tez çalışmasına benzer şekilde sürgün ucu eksplantına öncelikle sıvı C2D4B besin ortamında 5 farklı uygulama süresinde (0, 12, 24, 36 ve 48 saat) 5 farklı dozda (0, 20, 100, 250 ve 1250 µM) kolhisin muamelesi yapmışlardır. Daha sonra eksplantlar agarlı ortama transfer edilmiştir. Uygulama sonrasında elde edilen sürgün ucu rejenerasyonunda çeşitler arasında (sırasıyla; %11.55 ve %9.56) bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Buna karşın bu tez çalışmasında Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinde sıvı besin ortamında yapılan kolhisin uygulamasında rejenerasyon oranlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Kolhisin ve orizalin uygulamalarının bitki rejenerasyonu üzerindeki farklılığın nedeninin farklı etki mekanizmalarının bir sonucu olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Nadler vd. 2012, Sinski vd. 2014). Her iki bileşik iğ ipliklerinin oluşumuna etki etse de kolhisin, polimerleşmeyi önleyen proteinin alt birimine doğrudan bağlanır veya daha yüksek dozlarda mikrotübül depolimerizasyonunu artırır (Caperta vd. 2006). Orizalin ise korunmuş bir treonin kalıntısı (Thr239) vasıtasıyla tübüline bir alt ünite bağlar ve bu yolla mikrotübül polimerizasyonunu önler (Anthony ve Hussey 1999). Sinski vd. (2014), *in vitro* organogenez veya somatik embriyogenez teknikleri ile bitki rejenerasyonu sağlanmasında antimikrotübül bileşiklerin hücre içi katmanlarına daha iyi şekilde eriştiğini ve yeni organları meydana getirmek için farklılaşan yetişkin hücrelerde gerçekleşecek olan mitotik kromozom ayrışmasını durdurduğunu bildirmiştir. Bu nedenle Sinski vd. (2014) çalışmalarında kullanmış olduğu sürgün ucu ve somatik embriyo eksplantlarının poliploid yapıya dönüştürülmeye uygun eksplantlar olduğunu vurgulamıştır. Somatik embriyogenez tekniği ve sürgün ucu karşılaştırıldığında; sürgün ucu meristematik hücrelerinden meydana gelen organogenezin genotip üzerindeki

göreceli bağımsızlığının daha kısa sürede ve daha yüksek oranda rejenerasyon avantajı sağladığı ortaya konmuştur. Martinelli ve Gribaudo (2009)'da asmada somatik embriyogenezin indüksiyonu üzerinde genotipin belirleyici bir faktör olduğunu vurgulamıştır.

Sürgün ucu ve embriyogenik kallusta yapılan uygulamalarda benzer oranlarda tetraploidiye ulaşıldığı; sürgün ucunda yapılan uygulamalarda ise tetraploid bitkiye ulaşmanın zaman açısından neredeyse yarı yarıya daha hızlı olduğu vurgulanmıştır (Xie vd. 2015). %4 oranında kimerik bitkiye, %0.3 oranında tetraploid bitkiye rastlanan bir diğer çalışmada sürgünler için en iyi kolhisin dozunun 313 μ M olduğu ve 18 ile 42 saat inkübasyon sürelerinin gözle görülür bir farklılık yaratmadığı belirtilmiştir. Çalışmada en yüksek tetraploidi oranı (%59) sürgün ucuna 313 μ M kolhisin dozundan elde edilirken, en uygun doz \times süre interaksyonu 313 μ M dozda 7 gün süre olarak belirlendiği rapor edilmiştir (Petersen vd. 2002). Bu tez çalışmasında orizalin uygulaması yapılan Uslu çeşidi eksplantlarından neredeyse hiç rejenerasyon sağlanamamış, Sultani Çekirdeksiz çeşidinde ise rejenerasyon sonrası alt kültürlerde canlılığın sürdürülmesi sağlanamadığı için ploidi seviyeleri kısmen belirlenebilmiştir. Kolhisin uygulamasında ise rejenere olan sağlıklı sürgünlerde flow sitometri analizi ile ploidi seviyeleri belirlenmiştir. Kontrol grubu ile birlikte yapılan tüm doz \times süre uygulamaları sonrasında analizi yapılan bitkilerin hepsi ($2n=2x$) diploid yapıda bulunmuştur. Yalnızca DNA içeriklerinde bazı farklılıklar görülmüştür. Orizalin ve kolhisinin karşılaştırıldığı çalışmalara baktığımızda; Xie vd. (2015)'nin kolhisin ile yaptıkları çalışmadaki tetraploid bireye ulaşma oranının (%16), orizalin ile yaptıkları çalışmadaki orana (%11) göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Farklı türlerde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmıştır (Awolaye vd. 1994, Petersen vd. 2003). Bu noktada bu çalışmada varılan sonuç ploidi seviyeleri belirlenememiş bile olsa daha yüksek rejenerasyon oranı ile kolhisinin orizaline göre daha etkin bir antimitotik ajan olduğu yönündedir. Sinski vd. (2014)'nin yaptıkları çalışmada ise sürgün ucu ve pre-embriyogenik kallus eksplantlarında orizalin uygulaması sonrası kolhisine göre %20'ye yakın oranda daha fazla tetraploid bitkiye ulaşıldığı bildirilmiştir. Genelde düşük doz \times kısa uygulama süresinde daha yüksek oranda canlılık sağlandığını; fakat tetraploid bitki

oluşturma açısından tam tersi düşük bir oran sergilediğini ortaya koyan birçok çalışma mevcuttur (Chakraborti vd. 1998, Vainola 2000 ve Zhang vd. 2008).

Petersen vd. (2002)'nin çalışmalarına gore 156 ve 313 μM dozdaki kolhisin çözeltisinde çeşitli sürelerde yapılan uygulamadan 9 veya 12 hafta sonra flow sitometri denemesi yapılmıştır. Aynı genotipte 12. haftada ploidi analizi yapılan sürgünlerde 9. haftada yapılanlara gore daha yüksek oranda tetraploid bitki elde edildiği bildirilmiştir. Xie vd. (2015)'nin flow sitometri çalışmaları sonucunda bitkinin ploidi seviyesini göstermek için boyanan çekirdeklerin histogramlarında açığa çıkan baskın bir pik ortaya çıkmıştır. (2x) diploid DNA'ya sahip kontrol grubu standart olarak alınmıştır. Veriler analiz edildiğinde DNA içeriği bakımından kolhisinin ve orizalin arasında istatistik açıdan ($p < 0.05$) bir farklılık bulunmuştur. Sürgün ucu eksplantı için kolhisin dozları içinde; tetraploid bitki elde etmek için en uygun doz \times süre uygulamasının 625 μM doz \times 24 saat uygulaması (%30.34) olduğu bildirilmiştir. 48 ve 72 saat uygulama sürelerinde de tetraploid bitkiye ulaşma şansının yüksek olduğu; fakat sürgün ucu eksplantına zarar verdiği görülmüştür. 250 μM dozundaki kolhisin uygulamasında yüksek ölçüde tetraploid bireye ulaşılamamıştır. Orizalin uygulamasına bakıldığında ise; en etkili uygulamanın 24 saat inkübasyon süresinde 30 μM dozundaki orizalin olduğu ve bu kombinasyonda %22.09 oranında tetraploid bitkiye ulaşıldığı bildirilmiştir. Düşük dozdaki orizalin uygulamalarının etkisiz kaldığı görülmüştür. Embriyogenik kallusların tetraploidi üretimi için iyi bir doku kaynağı olduğunu bildiren Xie vd. (2015) tetraploid çeşit geliştirilmesi için bu eksplant üzerinde en başarılı uygulamaların 72 saat süresindeki 625 μM kolhisin (%35.08) ve 48 saat süresince 30 μM orizalin (%26.11) uygulamasından elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Leal vd. (2006), *Vitis vinifera* L. 'Viosinho' kültür çeşidinin iki farklı klonunda anter indüksiyonu ile geliştirilen somatik embriyodan sürgün elde etmişlerdir. Çalışmadan elde edilen sürgünlerden alınan yaprak örnekleri ile 9 farklı *V. vinifera* eşidinin ekirdek DNA içerikleri ve ploidi seviyeleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda çeşitler ve uygulama yapılan 'Viosinho' kültür çeşidi arasında önemli bir farklılık görülmediği rapor edilmiş olup, DNA içerik aralığı 1.17 pg/2C (Viosinho) ile 1.26 pg/2C (Cabernet Sauvignon) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ortaya konulan ekirdek

DNA içerik aralığı bu tez çalışmasındaki DNA içerik aralığı ile benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitlerinde poliploid bireylere ulaşmak için *in vitro* kromozom katlama tekniğinin çeşitlere özgü olarak geliştirilmesine yönelik uygun eksplant, uygulama şekli, uygulanacak antimitotik ajanın dozu ve süresinin eksplant canlılığına, LD₅₀ değerine, sürgün uzunlukları ve rejenerasyon oranlarına etkisi araştırılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda eksplant, antimitotik ajan, dozu, inkübasyon süresi ve uygulama şeklinin getirdiği sonuçların çeşide bağlı olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır. Birden çok parametrenin olduğu bu çalışmalarda asıl amaç canlılık oranını artırmak ve bu yolla poliploidi oluşturmak için gerekli örnek potansiyelini artırabilmektir. Tez çalışmasında, orizalin ve kolhisin uygulamasından elde edilen sonuçlar iki alt bölümde maddeler halinde verilmiştir.

Orizalin çalışmasında;

- Orizalin uygulaması yapıldıktan sonra en düşük canlılık oranları Sultani Çekirdeksiz çeşidi için katı besin ortamında 36 saat süre ile 40 µM dozda; Uslu çeşidinde yine katı besin ortamında 48 saat süre ile 40 µM dozda koltuk altı meristem eksplantından elde edilmiştir.
- Her iki çeşit için koltuk altı meristemi ve kallus eksplantında canlılık oranı açısından kontrol grubuna en yakın sonuçlar 20 µM orizalin dozunun hem sıvı hem de katı besin ortamında 24 saat uygulamasından elde edilmiştir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda 20 µM dozdan daha yüksek dozlar ile uygulama yapılması gerektiği söylenebilir.
- Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristemi eksplantı için letal doz incelendiğinde sıvı ve katı besin ortamında 40 µM orizalin dozunun × 48 saat süre uygulamasında; kallus eksplantında ise sıvı ve katı besin ortamlarında sırasıyla 30 ve 40 µM orizalin dozunda 48 saat süre uygulaması LD₅₀ değeri olarak belirlenmiştir. Uslu çeşidi incelendiğinde; koltuk altı meristemi eksplantında yapılan

tüm orizalin muameleleri içinde 30 ve 40 µM orizalin dozunda 48 saat süre uygulamasının dışında canlılık oranının %50'nin altına düşmediği gözlenmiştir.

- Her iki çeşitte katı ve sıvı besin ortamlarında hem kallus hemde koltuk altı meristemi eksplantı için 20 µM orizalin doz uygulamasından en yüksek rejenerasyon sağlanmıştır. Koltuk altı meristemi eksplantında her iki çeşitte de en fazla rejenerasyon sağlanabilmesi için en uygun ortam 24 saattir. Kallus eksplantından rejenerasyonda Sultani Çekirdeksiz çeşidinin daha uzun süredeki orizalin dozunu tolere edebildiği söylenebilir.
- Her iki çeşitten *in vitro* sürgün çoğaltımından sonra 3-4 yapraklı hale gelmiş sürgünlerden alınan yaprak örneklerinin flow sitometri analizleri sonucunda yalnızca bir örnekte (2.32 pg) diğer örneklerden daha yüksek sayıda çekirdek DNA içeriğine rastlanmıştır, bunun da miksploid yapıda olabileceği düşünülmüştür. Bu örnek dışında orizalin uygulanmış *in vitro* sürgünlerden alınan tüm örneklerde yapılan çekirdek DNA analizi sonucunda diploid yapının devam ettiği belirlenmiştir.
- Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşidinde mutagen çalışmalarında orizalin uygulaması için en uygun eksplantın koltuk altı meristemi olduğu söylenebilir. Kallus eksplantının mutasyon oluşturma frekansının daha yüksek olmasına rağmen her iki çeşit için hem canlılık hem de rejenerasyon açısından düşük oranlara sahip olması mutagen çalışmalarının sürdürülebilirliğini olumsuz yönde etkilediği sonucuna varılmıştır.
- Canlılık ve rejenerasyon oranının düşmesi istenmeyen bir durum olmakla birlikte uygulanan mutagenin etki ettiğini de göz önüne sermektedir. Sıvı besin ortamı daha yüksek canlılık sergilese de katı besin ortamındaki eksplantlara mutagenin daha iyi nüfuz ettiği söylenebilir.
- Orizalin mutageninin uygulandığı eksplantların tümünde yapılan flow sitometri analizi bulgularına göre diploid yapının devam ettiği belirlenmiştir. Yapılan uygulamalar sonucunda orizalin mutageni için en uygun eksplantın iyi bir meristem dokuya sahip olan, mutagenden en iyi oranda etkilenen ve kısmen de olsa DNA içeriğinde bir değişim gerçekleşen koltuk altı meristemi eksplantı olduğu sonucuna varılmıştır.
- Daha sonra yapılacak çalışmalarda *in vitro* orizalin mutageni uygulanması esnasında mutagenin etkinliğini artırmak için eklenen DMSO seviyesinin düşürülmesi ya da DMSO eklenmemesi gerekliliği önerilebilir.

Kolhisin çalışmasında;

- Kolhisin uygulaması yapıldıktan sonra tek boğumlu mikro çelik eksplantında en düşük canlılık oranı her iki çeşitte ½ saat yapılan uygulama sonucunda 2000 µM kolhisin dozundan elde edilirken; 24-48 süre uygulamasında yine en yüksek doz ve en yüksek sürede (1500 µM/ 48 saat) elde edilmiştir.
- Her iki çeşit için de koltuk altı meristemi ve sürgün ucu eksplantlarında canlılık oranı açısından kontrol grubuna en yakın sonuçlar ½ saat uygulaması için en düşük dozdaki kolhisin uygulamalarından elde edildiği tespit edilmiştir. 24-48 saat uygulamasında; genel olarak en düşük doz ve süreden kontrol grubuna en yakın sonuçlara ulaşılmıştır.
- Sultani Çekirdeksiz çeşidinde tek boğumlu mikro çelik eksplantında her iki süre uygulamasında canlılık oranının %50'nin altına düşmediği gözlenmiştir. Letal doz incelendiğinde sürgün ucu eksplantında 1250 µM kolhisin dozunun yalnızca 48 saat süre uygulaması LD₅₀ değeri olarak saptanmıştır.
- Sultani Çekirdeksiz çeşidinde tek boğumlu mikroçelik daha büyük bir eksplant olmasından kaynaklı olarak mutagenenden etkilenme olasılığı düştüğü için mutagen uygulaması için sürgün ucunun tercih edilmesi önerilebilir.
- Uslu çeşidinde ½ saat uygulamasında her iki eksplanta 1750 ve 2000 µM kolhisin dozu LD₅₀ değeri olarak belirlenmiştir. 24-48 saat süre uygulamasının LD₅₀ değerlerinde ise tek boğumlu mikro çelik eksplantının sürgün ucuna göre daha uzun süreli kolhisin uygulamasına daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda tek boğumlu mikro çelik ve sürgün ucu eksplantları için 48 saat inkübasyon süresinde 1250 µM kolhisin dozundan daha yüksek bir doz kullanımının canlılık açısından dezavantajlı olacağı söylenebilir. Daha düşük dozdaki kolhisin mutageninin 48 saatten daha uzun inkübasyon süresinde uygulanması önerilebilir.
- Rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğu eksplanttan ziyade çeşide göre farklılık göstermiştir. Sultani çeşidi her iki eksplantı için en düşük dozda en iyi rejenerasyon sağlanmıştır. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde Uslu çeşidine göre daha yüksek dozdaki kolhisin uygulamasından rejenerasyon sağlanmış olsa bile Sultani Çekirdeksiz çeşidi Uslu çeşidine göre genel olarak oransal olarak daha iyi rejenerasyon göstermiştir.

- Her iki çeşitten *in vitro* sürgün çoğaltımından sonra 3-4 yapraklı hale gelmiş sürgünlerden alınan yaprak örneklerinin flow sitometri analizleri sonucunda kolhisin uygulanmış *in vitro* sürgünlerden alınan tüm örneklerde yapılan çekirdek DNA analizi sonucunda diploid yapının devam ettiği belirlenmiştir.



KAYNAKLAR

- Abido, A.I.A., Aly, M.A.M., Hassanen, S.A. and Rayan, G.A. 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.
- Acanda, Y., Prado, M.J., González, M.V. and Rey, M. 2013. Somatic embryogenesis from stamen filaments in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Mencía): Changes in ploidy level and nuclear dna content. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 49; 276-284.
- Acanda, Y., Martínez, Ó., González, M.V., Prado, M.J. and Rey, M. 2015. Highly efficient *in vitro* tetraploid plant production via colchicine treatment using embryogenic suspension cultures in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Mencía). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123(3); 547-555.
- Acquaah, G. 2007. Principles of plant genetics and breeding. Wiley-Blackwell, 568, Malden.
- Ahlowalia, B.S.1998. *In vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. In: *Somaclonal Variation and Induced Mutation in Crop Improvement*. Jain, S.M., Brar, D.S. and Ahloowalia, B.S. (eds), Kluwer Academic Publishers, 293-309, Dordrecht, Netherlands.
- Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M. and Nichterlein, K.2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135(2); 187-204.
- Aihong, M., Parga, F., JIarshe, S. and Shaohua, L. 2005. Study on the induction of tetraploid grapes. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(8); 1645-1651.
- Akbaş, F.D, Işıkan, Ç., Kara, Y. and Başaran, D. 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.
- Alizadeh, M. and Singh, S.K. 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.
- Allum, J.F., Bringloe, D.H. and Roberts, A.V. 2007. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* thunb. Hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: The effects of node length, Oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Rep* 26; 1977-1984
- Anonymous. 2018.<http://mvgs.iaea.org/Search.aspx>. Erişim tarihi: 27.06.2019.
- Anthony, R.G. and Hussey, P.J. 1999. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. *Trends Plant Sci.*, 4; 112-116.

- Awoleye, F., van Duren, M., Dolezel, J. and Novak, F.J., 1994. Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. *Euphytica*, 76; 195-202.
- Babalık, Z ve Göktürk, B.N. 2008. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Gövde ve Yaprak Sapı Eksplantlarından Adventif Sürgün Oluşumu Üzerine Bir Araştırma. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 21(2); 231-240.
- Baker, R.E. 1943. Induced polyploid, periclinal chimeras in *Solanum tuberosum*. *Am. J. Bot.*, 30; 187-195.
- Bali, P.N. and Tandon, S.L. 1959. Morphological and cytological studies of the induced polyploids in *Alyssum maritimum* Lam. *Genetic*, 30; 129-139.
- Beck, S.L., Dunlop, R.W. and Fossey, A. 2003. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 41; 177-181.
- Beck, S.L., Visser, G. and Dunlop, R.W. 2005. A comparison of direct (flowcytometry) and indirect (stomatal guard cell lengths and chloroplast numbers) techniques as a measure of ploidy in black wattle, *Acaciamearnsii* (de Wild). *South African Journal of Botany*, 71; 354-358.
- Bessho, H., Miyake, M. and Kondo, M. 2000. Grape breeding in Yamanashi, Japan Present and future. *Acta Hort.*, 538; 493-496.
- Blasco, M., Badenes, M.L. and Naval, M.M. 2015. Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Plant Cell Tiss Org.*, 120(2); 453-461.
- Botta, R., Vallania, R. and Me, G. 1988. Grapevine breeding by gamma radiation: Results and Prospects. *Acta Horticulture*, 224; 421-423.
- Bouquet, A. and Torregrosa, I. 2003. Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.). In: S. M. Jain, K. Ishii (eds): *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, 75; 319-352. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Netherlands.
- Bouvier, L.P., Guerif, P., Djulbic, M., Durel, C., Chevreau, E. and Lespinasse, Y. 2002. Chromosomedoubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. *Euphytica*, 123; 255-262.
- Bozhinova-Boneva, L. and Kondarev, M. 1973. The Effect of Gamma- Rays on The Seeds and Shoots of Certain Grapevine Cultivars. *Gradinarska I Lozarska Nauka*, 10(6); 115-124.
- Bozhinova-Boneva, L. 1975. The Effect of X Rays on The Growth and Development of Vine Seedlings. *Genetika I Seleksiya*, 8(2); 106-114.

- Caperta, A.D., Delgado, M., Ressurreicao, F., Meister, A., Jones, R.N., Viegas, W. and Houben, A. 2006. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma*, 227; 147-153.
- Carvalho, J.F., Carvalho, C.R. and Otoni, W.C. 2005. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa Orellana*). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 80; 69-75.
- Chakraborti, S.P., Vijayan, K. and Roy, B.N. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Cell Rep.* 17; 799-803
- Chang, Y.Y., Ji, X., Zhu, J.L. and Hao, Y. 2014. Polyploidy induction of mutation by using colchicine on tube seedlings of Victoria grape. Xth Intl. Conf. On Grapevine Breeding and Genetics, 1-5 August, Proceedings, 265-270, United States of America.
- Chauvin, J.E., Souchet, C., Dantec, J.P. and Ellisseche, D. 2003. Chromosome doubling of 2x Solanum species by oryzalin: Method development and comparison with spontaneous chromosome doubling *in vitro*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 73(1), 65-73.
- Chen, C., Guo, W., Yi, H. and Deng, X. 2008. Citrus somatic hybridization with potential for direct tetraploid scion cultivar improvement. *Plant Breeding*, 123; 332-337.
- Chen, Z. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science*, 15; 57-71.
- Chen, J., Tang, X., Ma, X., Zhao, Q. and Dong, Z. 2014. Generation of a new polyploid grape cultivar by using hybrid seeds induced with colchicine. *Acta horticulturae*, 1046; 251-258.
- Cimo, G. 2017. Ploidy manipulation for genetic improvement in some Mediterranean fruit crops. Doctoral Dissertaiton, Palermo University, 127, Palermo.
- Costacurta, A., Cancellier, L., Donini, B. and Mannino, P. 1978. The Germination of Irradiated Seeds Belonging to Several Grapevines Cultivars. *Rivista Di Viticoltura E Di Enologia*, 31(10); 411-419.
- Çoban, H. 1998. Yuvarlak çekirdeksiz üzüm çeşidinde farklı dozlarda uygulanan ⁶⁰Co kaynaklı gamma ışınlarının meydana getirdiği değişimler üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 102, Bornova, İzmir.
- Çoban, H., Kara, S. ve İlter, E. 2002. Investigations on radiosensitivity of some grape varieties. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(5); 601-603.
- Dart, S., Kron, P. and Mable, B.K. 2004. Characterizing polyploidy in *Arabidopsis lyrata* using chromosome counts and flowcytometry. *Can J Bot.*, 82; 185-197.

- Değirmenci Karataş, D. ve Kunter, B. 2012. Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik Karası üzüm çeşitlerinde uyarılmış mutasyon etkisinin sitolojik incelenmesi. Uludağ Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 26(2); 59-64.
- De Mello E Silva, M., Callegari, J. and Zanettini, B. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* lindl (*Orchidaceae*) by *in vitro* techniques. *Ciencia Rural*, 30;105-111.
- Dhawan, O. P. And Lavania, U. C. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*, 87(2); 81-89.
- Dhooghe, E., Denis, S., Eeckhaut, T., Reheul, D. and Van Labeke, M.C. 2009. *In vitro* induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. *Euphytica*, 168(1); 33-40.
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L. and Van Huylenbroeck, J. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 104; 359-373.
- Diab, A. A., Khalil, S. M. and Ismail, R. M. 2011. Regeneration and micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) through shoot tips and axillary buds. *IJABR*, 2(4); 484-491.
- Doležel, J., Sgorbati, S. and Lucretti, S. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia plantarum*, 85(4); 625-631.
- El-Agamy, S.Z., El-Mahdy, T.K. and Mohamed, A.A. 2009. *In Vitro* Propagation of Some Grape Rootstocks. *Acta Horticulture*, 839; 125-132.
- Eigsti, O.J. and Dustin Jr, P. 1955. Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry. The Iowa State College Press, 470, Ames, Iowa, USA.
- Einset, J. and Pratt, C. 1975. Grapes. (In: *Advances in Fruit Breeding*. Ed.: J. Janick and J.N. Moore). Purdue University Press. West Lafayette; Indiana, 130-153.
- Ekbiç, H.B. and Tangolar, S. 2016. Trakya İlkeren ve Flame Seedless üzüm çeşitlerinde farklı kolhisin dozları kullanılarak poliploidi oluşturma olanakları. *Akademik Ziraat Dergisi*, 5(2); 69-76.
- Eng, W.H. and Ho, W.S. 2019. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. *Scientia horticulturae*, 246; 604-617.
- Escandón, A.S., Alderete, L.M. and Hagiwara, J.C. 2007. *In vitro* polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. *Scientia horticulturae*, 115(1); 56-61.
- Fideghelli, C. 1990. Plant mutation breeding for crop improvement, Held in Vienna, 24.

- Fong, S.W. 2008. *In vitro* induction of polyploidy in *Nepenthes gracilis*. Master's Degree, University of Malaya Kuala Lumpur, Faculty of Science,95, Kuala Lumpur.
- Freisleben, R.A. and Lein, A. 1944. Möglichkeiten und praktische durchführung der mutationszüchtung. Kühn-Arhiv. 60; 211-222.
- Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R. and Gribaudo, I. 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). Plant cell, tissue and organ culture, 90(1); 79-83.
- Ganga, M. and Chezhiyan, N. 2002. Influence of the antimitotic agents colchicine and oryzalin on *in vitro* regeneration and chromosome doubling of diploid bananas (*Musa* spp.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 77(5); 572-575.
- Gao, S.L., Zhu, D.N., Cai Z.H. and Xu, D.R. 1996. Autotetraploid plants from colchicines-treated bud culture of *Salvia Miltiorrhiza* Bge. Plant Cell Tissue and Organ Culture,47; 73-77.
- Genç, İ. ve Yağbasanlar, T. 1994. Bitki Islahı. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi. Genel Yayın, No: 59, 150 s., Adana.
- Glowacka, K., Jezowski, S. and Kaczmarek, Z. 2010. Impact of colchicine application during callus induction and shoot regeneration on micropropagation and polyploidisation rates in two miscanthus species. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 46; 161-171.
- Gmitter, F.G.Jr. and Ling, X.B. 1991. Embryogenesis *in vitro* and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicine. J Amer Soc Hort Sci.,116; 317-321.
- Godfree, R.C., Marshall, D.J., Young, A.G., Miller, C.H., Mathews, S. 2017. Empirical evidence of fixed and homeostatic patterns of polyploid advantage in a keystone grass exposed to drought and heat stress. Royal Soc. Open Sci., 4(11); 170934.
- Gucker, Jr.F.T., O'Dozki, C.T., Pickard, H.B. and Pitts Jr.J.N. 1947. A photoelectronic counter for colloidal particles. J. Am. Chem. Soc., 69; 2422-2431.
- Guo, W.W., Prasad, D., Serrano, P., Gmitter, F.G. and Grosser, J.W. 2004. Cytogenetic analysis of two interspecific *Citrus* allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. J. Hort. Sci. Biotechnol., 79; 400-405.
- Guo, Y., Zhao, Y., Li, K., Liu, Z., Lin, H., Guo, X. and Li. C. 2011. *In vitro* embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between tetraploid grape and *Vitis amurensis* Rupr. African Journal of Agricultural Research, 6(21); 4906-4909.

- Guo, W.W., Liang, W.J., Xie, K.D., Xia, Q.M., Fu, J., Guo, D.Y., Xie, Z.Z., Wu, X.M., Xu, Q., Yi, H.L., Deng, X.X., 2016. Exploitation of polyploids from 39 citrus seedling populations. *Acta Hort.* 1135; 11-16.
- Haas, H.U. and Alleweldt, G. 2000. The karyotype of grapevine (*Vitis vinifera* L.). VII. Int. Sym. on Grapevine Genetics and Breeding. *Acta Horticulturae*, 528; 247-250.
- Hamill, S.D., Smith, M.K. and Dodd, W.A., 1992. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. *Aust. J. Bot.* 40; 887-896.
- Haüntzschel, K. and Weber, G. 2010. Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. *Protoplasma*, 241; 99-104.
- Heller, F.O. 1973. DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulseytophotometrie. *Ber. Deutsch. Bot. Gesellschaft*, 86; 437-441.
- Hollister, J.D. 2014. Polyploidy: adaptation to the genomic environment. *New Phytol.*, 205(3); 1034-1039.
- Hu.Y. and Wang, P.J. 1983. Meristem, shoot tip and hud culture. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, vol.1 (Eds) Evans D.A, Sharp, W.R. Ammirato, P.V. and Yamada, Y. Macmillan Pub. Co., Newyork, 177-227.
- Hugdahl, J.D. and Morejohn, L.C. 1993. Rapid and reversible high-affinity binding of the dinitroaniline herbicide oryzalin to tubulin from *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, 102; 725-740.
- Jain, S.M. 2010. Mutagenesis in crop improvement under the climate change. *Roman Biotechnol. Lett.*, 15(2); 88-106.
- 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.
- Kara, Z., Doğan, O., Yazar, K. ve Sabır, A. 2018. 41 B Asma Anacına *In Vivo* Kolhisin Uygulamalarının Morfolojik ve Sitolojik Etkileri. *Selçuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 32(1); 8-13.
- Kaya, M.M. 2010. *Medicago sativa* subsp. *Varia* populasyonlarının ploidi seviyesinin flow sitometri yöntemiyle belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Kermani, M., Sarasan, V., Roberts, A., Yokoya, K., Wentworth, J. and Sieber, V. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theor Appl Genet.*, 107; 1195-1200.

- Keskin, N. ve Kunter, B. 2007. Erciş Üzüm Çeşidinin Kallus Kùltürlerinde UV Işını Etkisiyle Resveratrol Üretimini Uyarılması. Tarım Bilimleri Dergisi, 13; 379-384.
- Khan, N., Ahmed, M., Hafiz, I., Abbasi, N., Ejaz, S. and Anjum, M. 2015. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. OENO One, 49(1); 37-45.
- Khawale, R.N., Singh, S.K. and Vimala, Y. 2006. Gamma Rays Induced *In Vitro* Mutagenesis and Molecular Marker-Assisted Selection of Mutants in Grapevine. Acta Horticulturae, 725(2); 643-651.
- Khosravi, P. Kermani, M., Nematzadeh, G., Bihamta, M. and Yokoya, K. 2008. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of Rosa. Euphytica, 160; 267-275.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. ve Spencer, C.A. 2009. Genetik Kavramlar. (Editörler: Öner, C., Sümer, S., Öner, R., Ögüş, A. ve Açık, L.), Palme Yayıncılık, 677 sf., Ankara.
- Köksal, N. 1999. Haploid Kavun Bitkilerinin *in vitro* ve *in vivo* Yöntemlerle Dihaploidizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Krizan, B., Ondrusikova, E., Moudra, J. and Pidra, M. 2012. Effect of Genotype on Organogenesis in Six Grape Rootstocks. Acta Horticulturae, 961; 225-230.
- Kuksova, V.B., Piven, N.M. and Gleba, Y.Y. 1997. Somaclonal variation and *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. Plant Cell, Tissue And Organ Culture, 49; 17-27.
- Kuliev, V.M. 2011. Induced autotetraploid grape mutants. Cytology and Genetics, 45(3); 163.
- Kunter, B. ve Karataş Değirmenci D. 2011. Asmalarda Mutasyonlar ve Mutant *Vitis vinifera* L. Çeşitleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 21(2); 146-151.
- Langhans, M., Niemes, S., Pimpl, P. and Robinson, D.G. 2009. Oryzalinbodies: in addition to its anti-microtubule properties, the dinitroaniline herbicide oryzalin causes nodulation of the endoplasmic reticulum. Protoplasma, 236; 73-84.
- Laslo, V., Zapartan, M. and Vicas, S. 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.

- Leal, F., Loureiro, J., Rodriguez, E., Pais, M.S., Santos, C. and Pinto-Carnide, O. 2006. Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant Cell Rep.*, 25; 978-985.
- Lee, N. and Wetzstein, H.Y. 1990. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(2); 324-329.
- Lima Da Silva, A. and Doazan, J.P. 1995. Gamma-Ray Mutagenesis on Grapevine Rootstocks Cultivated *In Vitro*. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin*, 29(1); 1-9.
- Lima da Silva, A., Hariscain, P., Ollat, N. and Doazan, J.P. 2000. Comparative *in vitro* development of five grapevine rootstock varieties and mutants from the cultivar 'Grevesac'. *Acta Horticulture*, 528; 351-357.
- Liu, P., Zhao, Z.H., Dai, L., Liu, X.Y., Peng, J.Y., Peng, S.Q. and Zhou, Z.J. 2009. Genetic variations of *Ziziphus* cultivar 'Zanhuangdazao' by using RAPD technique. *Acta Hort.*, 840; 149-154.
- Lodhi, M.A., and Reisch, B.I. 1995. Nuclear DNA content of *Vitis* species, cultivars, and other genera of the Vitaceae. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(1); 11-16.
- Luckett, D. 1989. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. *Euphytica*, 42; 177-182.
- Luo, G.G., Wei, L.Z. and Li, Y.B. 1989. Heredity and breeding on grape-part translation of essays. Second International Conference of Grape Breeding. China Agricultural Press, 28-32; Beijing.
- Luo, Y.W., Qaco, Z.J., Zhu, Z.Y., Huangpu, Z.S. and Cheng, J.H. 1995. Study on the induction of a tetraploid mutant from diploid grape cultivar Muscat hamburg by treatment with colchicine. *China Fruits*, 2; 5-7.
- Luo, Y. W., Qiao, Z., Zhu, Z., Huangpu, Z. and Chang, J. 1997. Study on Autotetraploid Grape cv. Muscat Hamburg with Good Quality. *Acta Horticulturae Sinica*, 24(2); 125-127.
- Maluszynski., K. Nichterlein, L.Z. Van and Ahloowali, B.S. 2000. Official released mutant varieties-the FAO/IAEA database. *Mut. Breed.*, 12; 1-88.
- Marasalı, B., Kunter, B., Değirmenci, D., Keskin, N., Taner, Y., Çelik, H., Tutluer, Uslu, N., Sagel, Z. ve Peskircioglu, H. 2003. Yerli Üzüm Çeşitlerinde Mutasyon Islahına Yönelik Olarak Etkili Mutasyon Dozunun Belirlenmesi ve M1V1 Generasyonunda Görülen İlk Etkiler. Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 8-12 Eylül 2003. Bildiri Kitabı, (467-469); Antalya.

- Maritz, T. 2008. Induction of polyploidy in Eucalyptus species and interspecific hybrids. Master of Thesis. School of Biochemistry, Genetics, Microbiology and Plant Pathology, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg.
- Martinelli, L., Bragagna, P., Poletti, V. and Scienza, A. 1993. Somatic embryogenesis from leaf and petiole-derived callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell Rep.*, 12; 207-210.
- Martinelli, L. and Gribaudo, I. 2009. Strategies for effective somatic embryogenesis in grapevine: an appraisal. In: Angelakis- Roubelakis KA (ed) *Grapevine molecular physiology & biotechnology*. Springer, Dordrecht, 461-493.
- Mathura, S., Fossey, A. and Beck, S.L. 2006. Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*). *Forestry*, 79(4); 381-388.
- Mhatre, M., Salunkhe, C.K. and Rao, P.S. 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: Towards an improved protocol. *Sci. Hort.*, 84; 357-363.
- Mitani, N., Ban, Y., Sato, A. and Kono, A. 2014. Tetraploid table grape breeding in Japan. Xth Intl. Conf. on Grapevine Breeding and Genetics. 1-5 August 2010. *Proceedings*, 225-230.
- Morejohn, L.C., Bureau, T.E., Mole-Bajer, J., Bajer, A.S. and Fosket, D.E. 1987. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. *Planta*, 172; 252-264.
- Motosugi, H. and Motioko, R. 2001. Tetraploid breeding of wild grapes native to Japan. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(3); 282-285.
- Motosugi, H., Naruo, T., Komazaki, S. and Yamada, M., 2002a. Resistance of autotetraploids of grapevine rootstock cultivars to Phylloxera (*Dactulosphaira Vitifoliae* Fitch). *Vitis*, 41(2); 103-106.
- Motosugi, H., Okudo, K., Kataoka, D. and Naruo, T. 2002b. Comparison of growth characteristics between diploid and colchicine-induced tetraploid grape rootstocks. *Journal of The Japanese Society for Horticultural Science*, 71(3); 335-341.
- Mukherjee, P., Husain, N., Misra, S.C. and Rao, V.S. 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.
- Munir, N., Safdar, I., and Naz, S. 2015. Effect of growth regulators on callus induction and micropropagation of three grape varieties. *J. Agric. Res*, 53(2); 233-245.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15; 473-479.

- Murashige, T. and Nakano, R. 1966. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. *J Hered.*,57; 114-118.
- Nadler, J.D. 2009. *In vitro* induction of polyploidy in *Cercis yunnanensis* Hu et Cheng. PhD Thesis. Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park, Maryland.
- Nadler, J.D., Pooler, M., Olsen, R.T. and Coleman, G.D. 2012. *In vitro* induction of polyploidy in *Cercis glabra* Pamp. *Scientia Horticulturae*,148; 126-130.
- Nitsch, J.P. and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163(3862); 85-87.
- Notsuka, K., Tsuru, T. and Shiraishi, M. 2000. Induced polyploid grapes via ‘*in vitro*’ chromosome doubling. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 69(5); 543-551.
- Olmo, H.P. 1952. Breeding tetraploid grapes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 59; 284-290.
- Oyebanji, O.B., Nweke, O., Odebunmi, O., Galadima, N.B., Idris, M.S., Nnodi, U.N., Afolabi, A.S. and Ogbadu, G.H. 2009. Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology*, 8(20); 5395-5399.
- Özler, H. 2014. Endemik *Centaurea Tchihatcheffii* Fish.& Mey. (Yanardöner) bitkisinde *in vitro* koşullarda poliploid bitki elde etme üzerinde araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Park, S., Wakana, A., Hiramatsu, M. and Uresino, K. 2002. A tetraploid hybrid plant from 4X x 2X crosses in *Vitis* and its origin. *Euphytica*, 126; 345-353.
- Passos, I.R.S., B. Appezato-Da-Glória and M.L.C. Vieira. 1999. Embryogenic responses of *Vitis* spp.: Effects of genotype and polyvinylpyrrolidone. *Vitis*, 38; 47-50.
- Paterson, A.H. 2005. Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. In *Genetics of Adaptation*, 191-196.
- Patil, V.P. and Jadhav, A.S. 1985. Karyomorphology of three varieties of *Vitis vinifera*. *Cytologia*, 50; 83-88.
- Patil, S.G. and Patil, V.P. 1992. Karyomorphology of *Vitis vinifera*, *V. rotundifolia* and their hybrid. *Cytologia*, 57; 91-95.
- Petersen, K.K., Hagberg, P. and Kristiansen, K. 2002. *In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. *Plant Breed* 121:445-450.

- Petersen, K.K, Hagberg, P. and Kristiansen, K. 2003. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus Sinensis*. Plant Cell Tissue Organ Cult., 73:137-146.
- Planchais, S., Glab, N., Inzé, D. and Bergounioux, C. 2000. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. FEBS Letters, 476(1-2); 78-83.
- Ponnuswami, V., Iralappon, I. and Anomugam, R. 1991. Sensitivity of Muscat Grape Cuttings to Gamma Irradiation. South Indian Horticulture, 39(5); 317-318.
- Prado, M.J., Rodriquez, E., Rey, L., Gonzalez, M.V., Santoz, C. and Rey, M. 2010. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. Plant Cell Tiss Organ Cult., 103; 49-59.
- Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 64; 185-210.
- Rego, M., Reigo, E., Bruckner, C., Finger, F. and Otoni, W. 2011. *In vitro* induction of autotetraploids from diploid Yellow Passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. Plant Cell Tiss Organ Cult., 107; 451-459.
- Robacker, C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from muscadine grape leaf explants. HortScience, 28; 53-55.
- Rosati, P., Silvestroni O., Intrieri, C. and Murri, G. 1990. Effects of *in vitro* gamma irradiation on two grapevine cultivars, *Vitis vinifera* L. Vitis, Special Issue; 471-477.
- Roubelakis-Angelakis, K. A. and Zivanovitch, S. B. 1991. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. HortScience, 26(12); 1551-1553.
- Roy, A.T., Leggett, G. and Koutoulis, A. 2001. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Rep., 20(6); 489-495.
- Salunkhe, C.K., Rao, P.S. and Mhatre, M. 1997. Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L. Plant Cell Reports, 17(1); 65-67.
- Sattler, M.C., Carvalho, C.R. and Clarindo, W.R. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. Planta, 243(2); 281-296.
- Shao, J., Chen, C. and Deng, X. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell Tissue Organ Cult., 75; 241-246.
- Shetty, B.V. 1958. Cytotaxonomical studies in *Vitaceae*. Bibliogr. Genet., 28; 167-172.

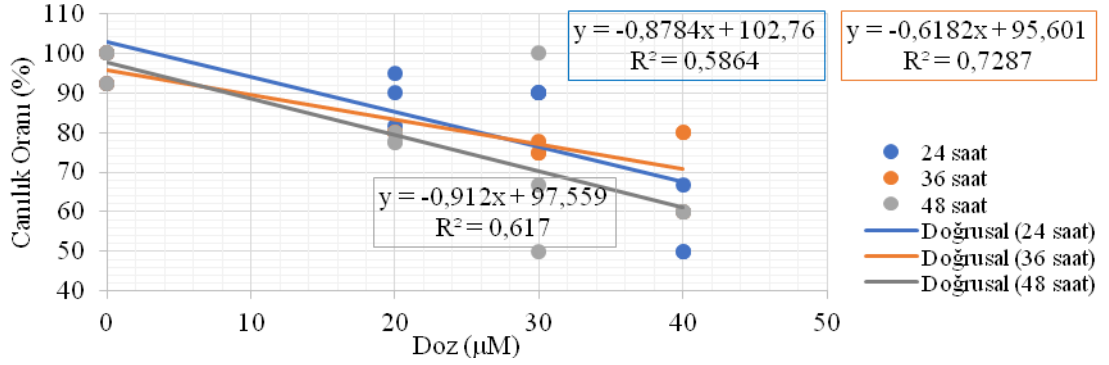
- Sim, S.T. 2006. Virus elimination from grape selections using tissue culture. FPS Grape Program Newsletter, Foundation Plant Services, University of California, Davis, 30-31.
- Singh, S.K., Khawale, R.N. and Singh, S.P. 2004. Techniques for rapid *in vitro* multiplication of *Vitis vinifera* L. cultivars. J. Hort. Sci. Biotech., 19; 267-272.
- Shu, Q.Y., Forster, B.P., Nakagawa, H. and Nakagawa, H. (Eds.). 2012. Plant mutation breeding and biotechnology. CABI, 607 p., London.
- Sinski, I., Bosco, D.B., Pierozzi, N.I., Maia, J.G.D., Ritschel, P.S. and Quecini, V. 2014. Improving *in vitro* induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars. Euphytica, 196; 299-311.
- Slobodnick, A., Shah, B., Pillinger, M. H. and Krasnokutsky, S. 2015. Colchicine: old and new. The American journal of medicine, 128(5); 461-470.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Tate, J.A. 2004. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. New Phytologist, 161(1); 173-191.
- Stamp, J.A., Colby, S.M. and Meredith, C.P. 1990. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis* spp.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 22(2); 127-133.
- Stanys, V., Weckman, A., Staniene, G. and Duchovskis, P. 2006. *In vitro* induction of polyploidy in Japanese Quince (*Chaenomeles Japonica*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 84; 263-268.
- Suprasanna, P., Patade, V.Y., Desai, N.S., Devarumath, R.M., Kavar, P.G., Pagariya, M.C., Ganapathi, A., Manickavasagam, M. and Babu, K. H. 2011. Biotechnological developments in sugarcane improvement: an overview. Sugar Tech., 13(4); 322-335.
- Şehirali, S. ve Özgen, M. 2013. Bitki Islahı (Düzeltilmiş 5. Baskı). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, No: 1582. 270 s., Ankara.
- Takamura, T., Lim, K.B. and Van Tuyl, J.M. 2002. Effect of a new compound on the mitotic polyploidisation of *Lillium longiflorum* and Oriental hybrid lilies. Acta Hort., 572; 37-40.
- Tambong, J.T., Sapra, V.T. and Garton, S. 1998. *In vitro* induction oftetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. Euphytica, 104(3); 191-197.
- Tassoni, A., Fornale, S., Franceschetti, M., Federica, M., Michael, A., Perry, B. and Bagni, N. 2005. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. New Phytologist, 166; 895-905.

- Tepe, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Yenice, N. and Tipirdamaz, R. 2002. *In Vitro* kolhisin uygulaması ile poliploid nane (*Mentha Longifolia* L.) bitkilerinin elde edilmesi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15(2); 63-69.
- Thao, N., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y. and Okubo, H. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchine and oryzalin treatments. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 72; 19-25.
- Tuna, G.S., Keleş, H., Göçmen, D., Güteryüz, V., Nizam, İ., Cabi, E. ve Tuna, M. 2016. Flow Sitometri ile Çok Yıllık Buğdaygil Yem Bitkisi Genetik Kaynaklarının Karakterizasyonu. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(Özel Sayı-2); 7-12.
- Urwin, N.A.R., Horsnell, J. and Moon, T. 2007. Generation and characterization of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica*, 156; 257-266.
- Vainola, A. 2000. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica*, 112; 239-244.
- Van Duren, M., Morpurgo, R., Dolezel, J. and Afza, R. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. *Euphytica*, 88; 25-34.
- Van Tuyl, J., Meijer, B. and Van Dien, M. 1992. The use of oryzalin as an alternative for colchicines *in vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerina*. *Acta Horticulture*, 325; 625-630.
- Wood, T.E., Takebayashi, N., Barker, M.S., Mayrose, I., Greenspoon, P.B. and Rieseberg, L.H., 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 106(33); 13875-13879.
- Wu, J.H. and Mooney, P. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 70; 99-104.
- Xie, X., Agüero, C.B., Wang, Y. and Walker, M.A. 2015. *In vitro* induction of tetraploids in *Vitis* × *Muscadinia* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3); 675-683.
- Xu, X., Lu, J. and Bradley, F. 2014. Applications of polyploids in Muscadine grape (*Vitis Rotundifolia* michx.) breeding. Xth Intl. Conf. on Grapevine Breeding and Genetics. *Proceedings*, 411-417.
- Yamane, H. and Kurihara, A. 1980. Studies on Polyploidy Breeding in Grapes. II. Polyploid Induction by Colchicine Application. *Bulletin of The Fruit Tree Research Station, E (Kaju Shikenjo Hokoku, E)*, 3; 1-13.

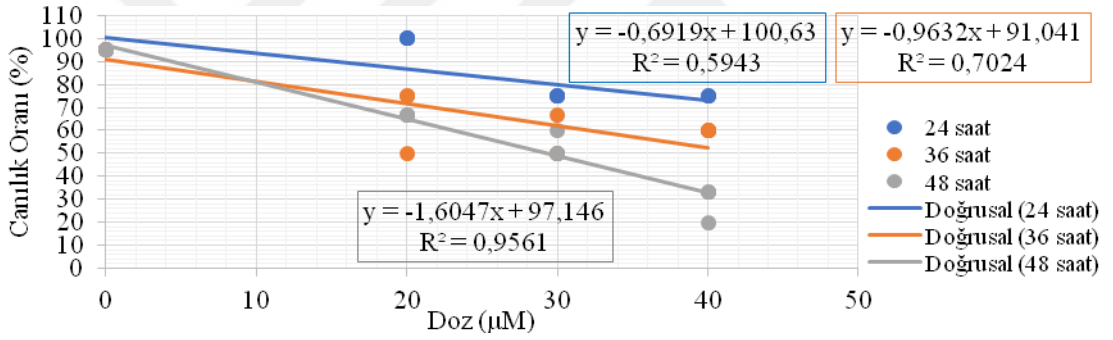
- Yang, X.M., Cao, Z.Y., An, L.Z., Wang, Y.M. and Fang, X.W. 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*, 152; 217-224.
- Yang, X., Ye, C. Y., Cheng, Z. M., Tschaplinski, T. J., Wullschleger, S. D., Yin, W., ... A. 2011. Genomic aspects of research involving polyploid plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*,104(3); 387-397.
- Yılmaz, G. 2018. Kokulu üzümün (*Vitis Labrusca* L.) tek boğumlu mikro çelik kültürü ile *In Vitro* çoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Yu, D.H. and Meredith, C.P.1986. The influence of explant origin of tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111; 972-975.
- Yun, H.K., Park, K.S., Roh, J.H., Kwack, Y.B., Jeong, J., Kim, S.H., Jang, H.I. and Shin, Y.U. 2008. Table Grape Suok'. *Hort. Sci.*, 43, 2224-2225.
- Yücel, A.Z. 2008. Use of different colchicine doses for effect of chromosome duplication in an aquarium plant, waterpurslane (*Ludwigia repens* Forster). Master of Thesis. University of Ankara, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara.
- Zhang, S.A., Qi, Y.S., Wei, B.F. and Wang, E.C. 1989. Polyploid micropropagation plants of grapes induced by colchicines. *China Fruits*, 3; 28-30.
- Zhang, J., Zhang, M. and Deng, X. 2007. Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(2-3); 211.
- Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M. and Liu, X. 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. *Euphytica*, 159(1-2); 59-65.

EKLER

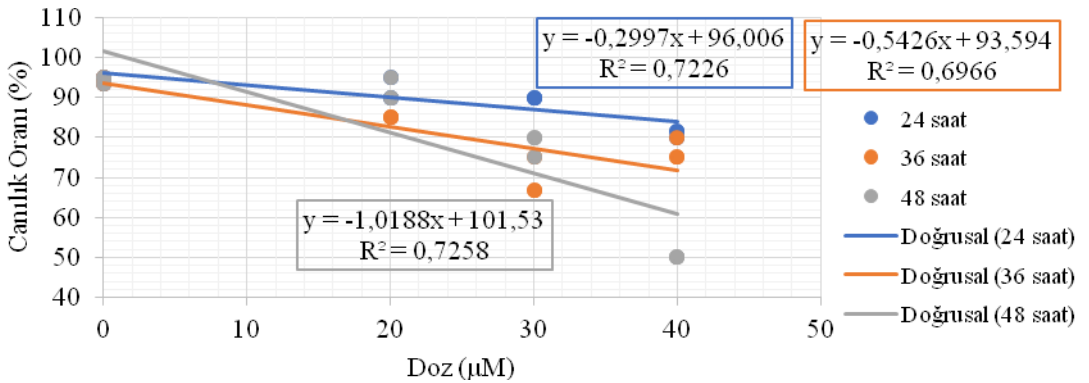
EK 1 Regresyon Analizleri



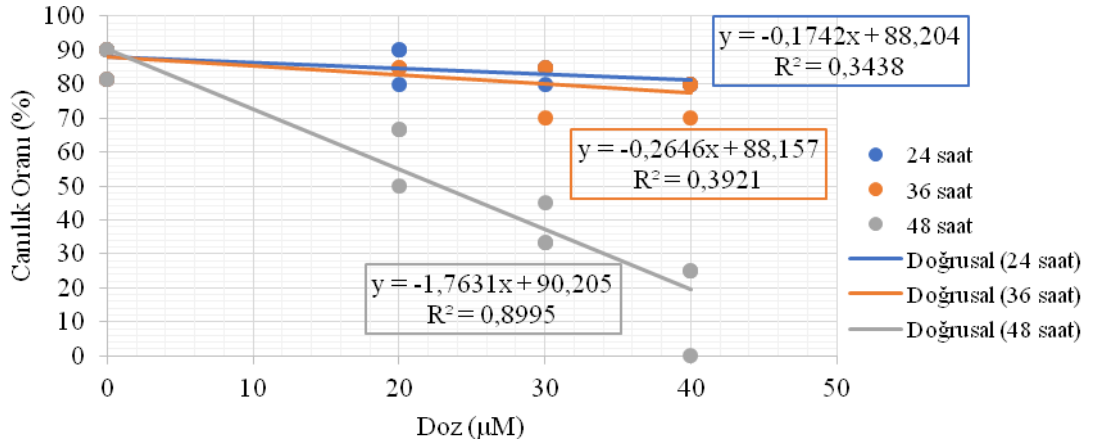
Şekil 1. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişkisi grafiği



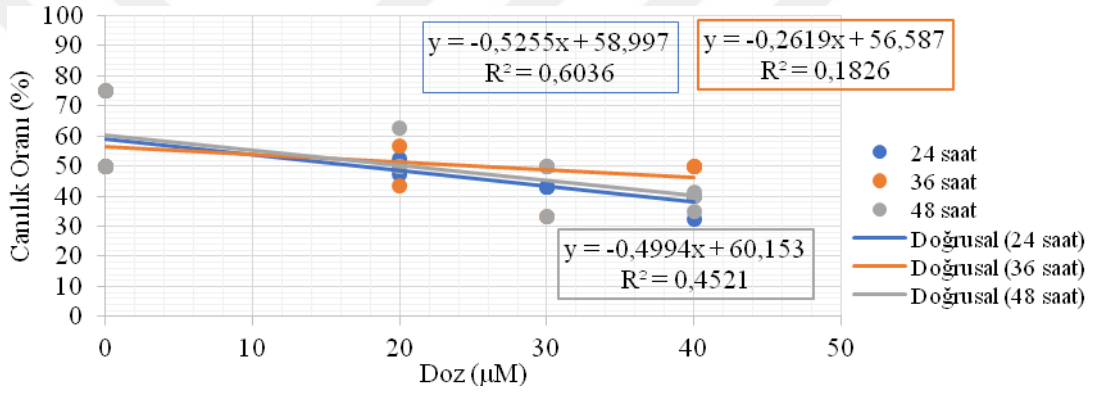
Şekil 2. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde katı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişkisi grafiği



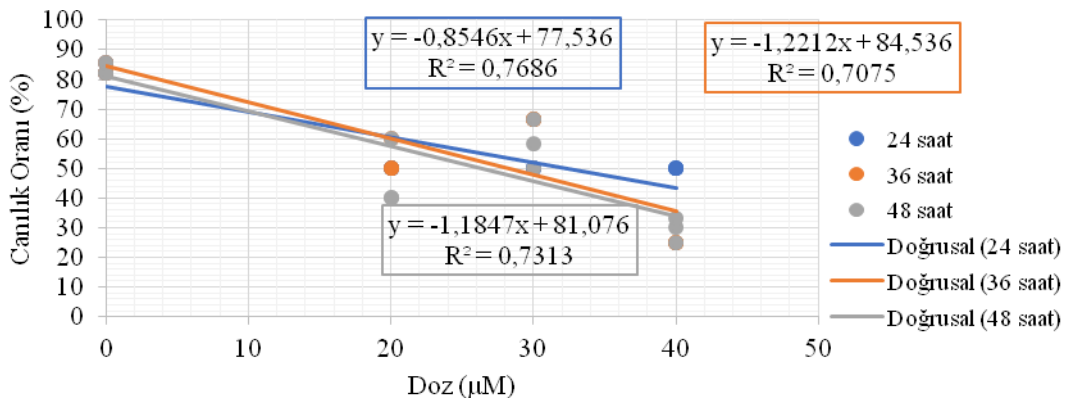
Şekil 3. Uslu çeşidinde sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişkisi grafiği



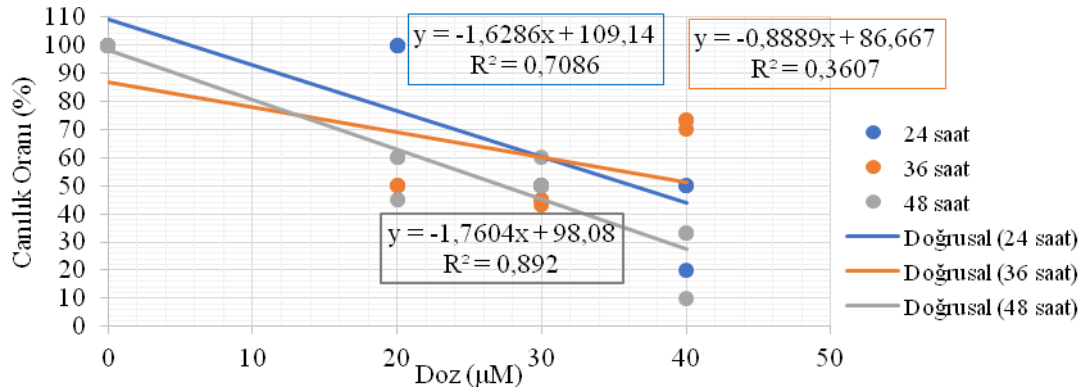
Şekil 4. Uslu çeşidinde katı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişkisi grafiği



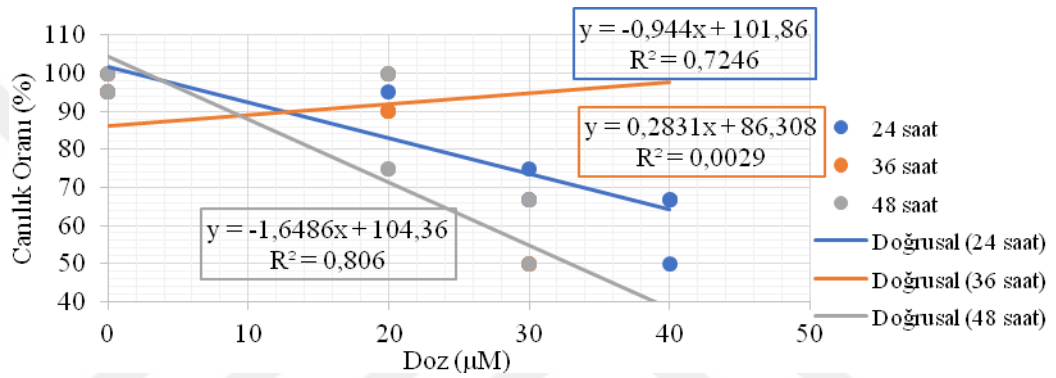
Şekil 5. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişkisi grafiği



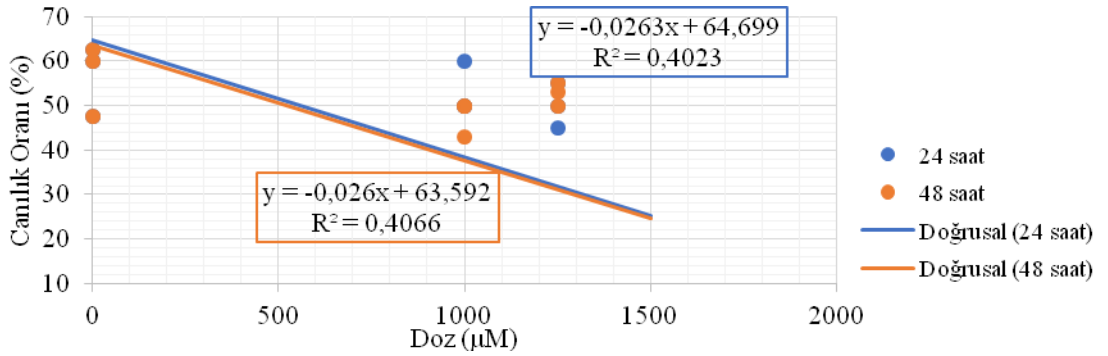
Şekil 6. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde katı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı lineer regresyon ilişkisi grafiği



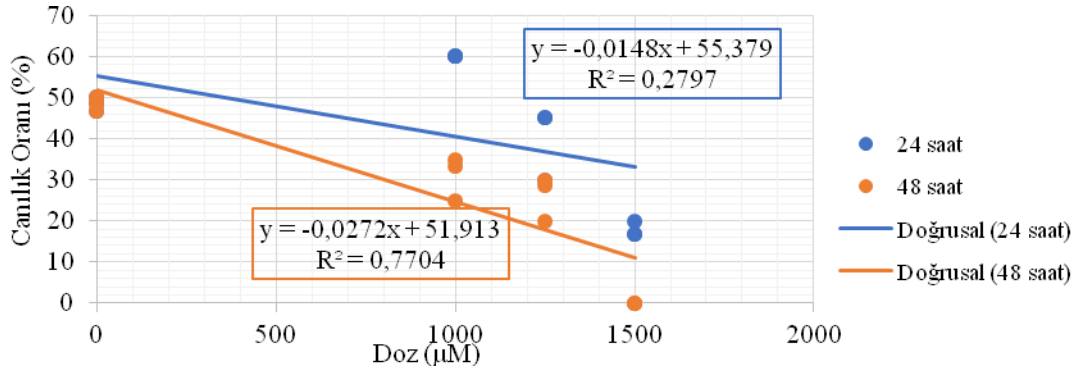
Şekil 7. Uslu çeşidinde sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişki grafiği



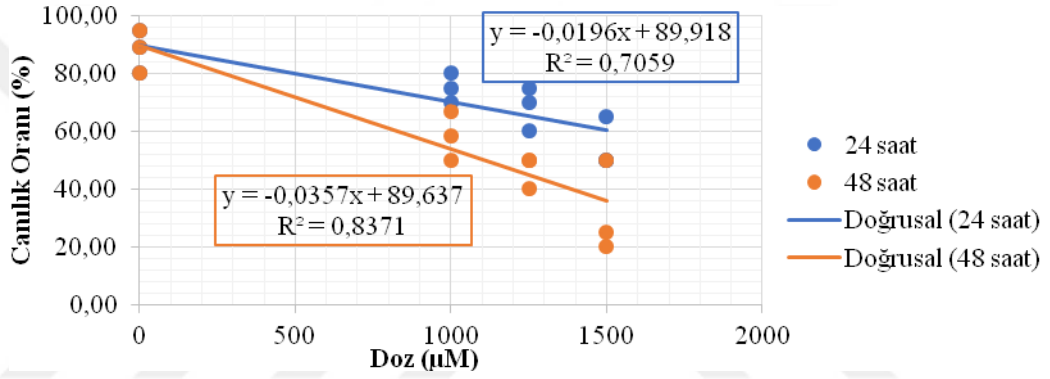
Şekil 8. Uslu çeşidinde katı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişki grafiği



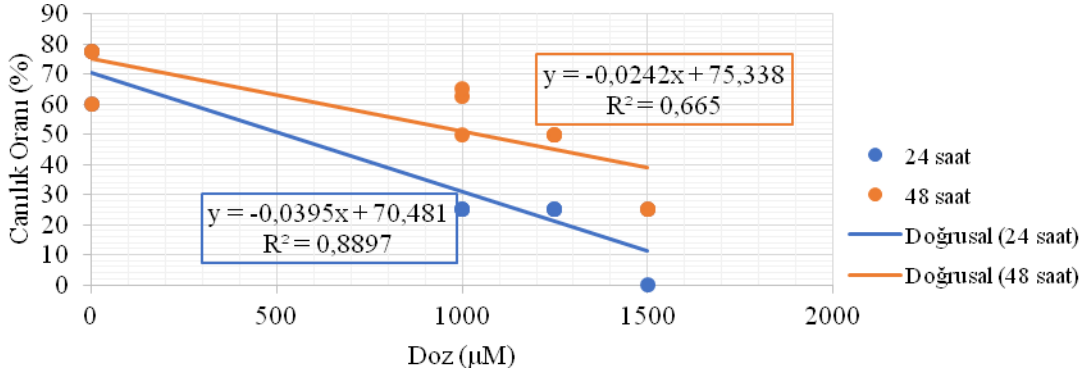
Şekil 9. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan kolhisin muamelesinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişki grafiği



Şekil 10. Uslu çeşidinde sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan kolhisin muamelesinin tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişki grafiği

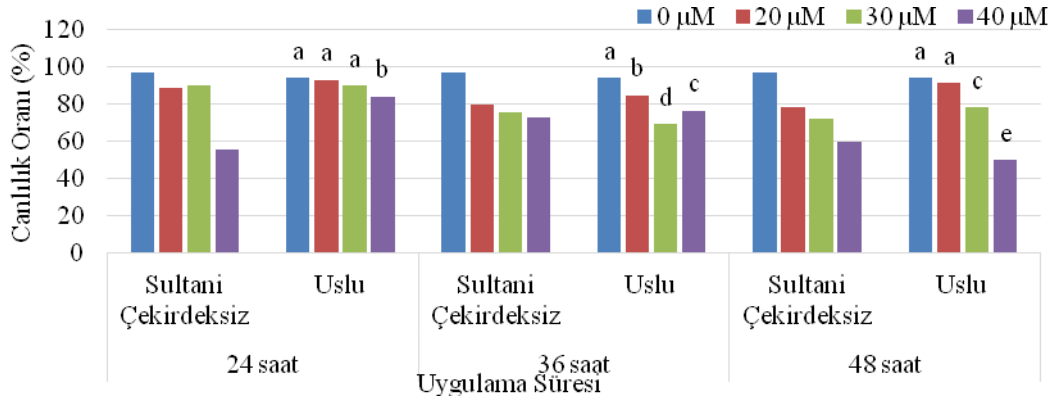


Şekil 11. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan kolhisin muamelesinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişki grafiği

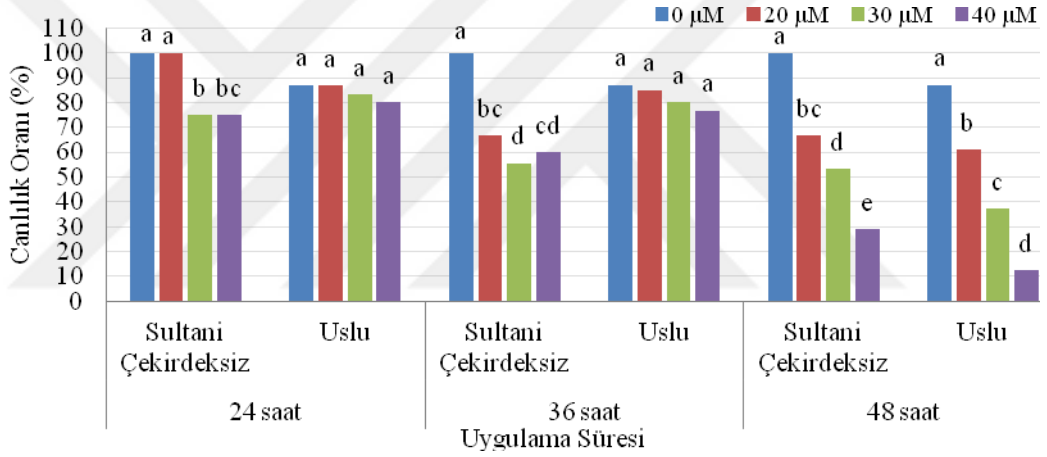


Şekil 12. Uslu çeşidinde sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan kolhisin muamelesinin sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerdeki canlılık oranı regresyon ilişki grafiği

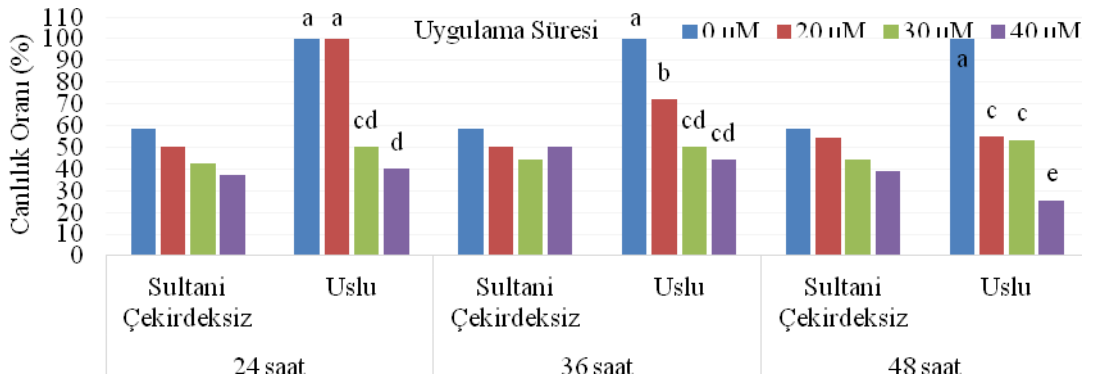
EK 2 Grafikler



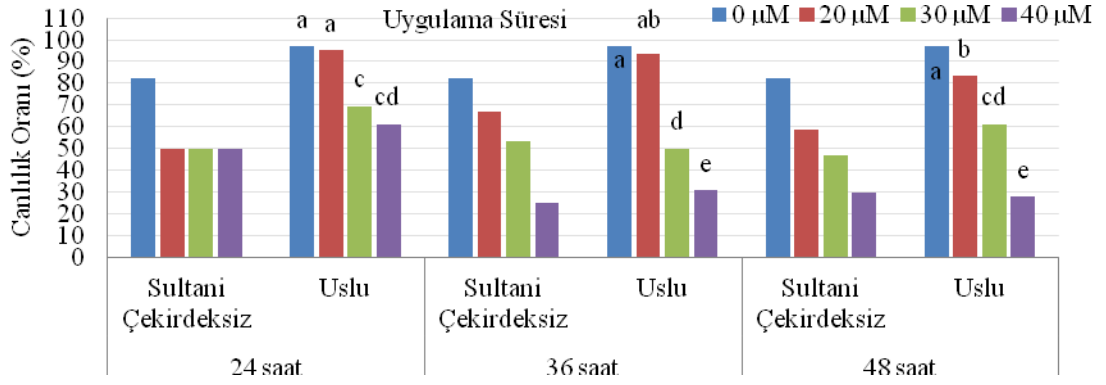
Şekil 1. Sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranına etkisi



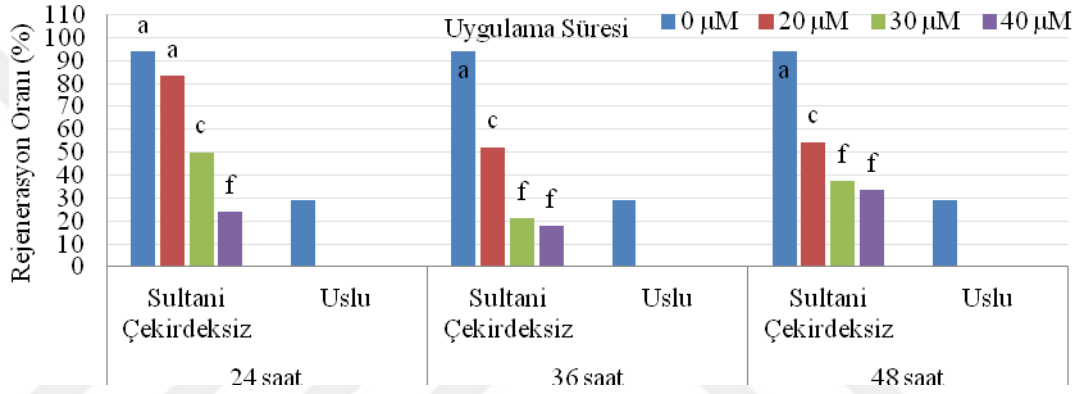
Şekil 2. Katı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranına etkisi



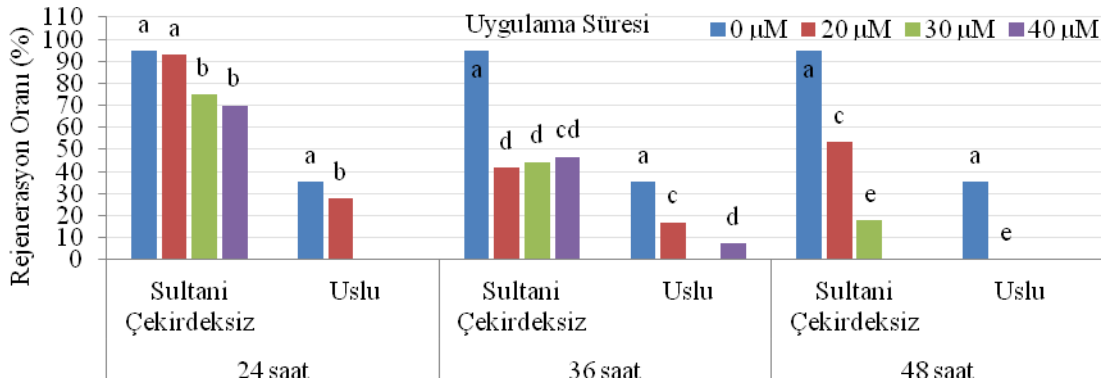
Şekil 3. Sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranına etkisi



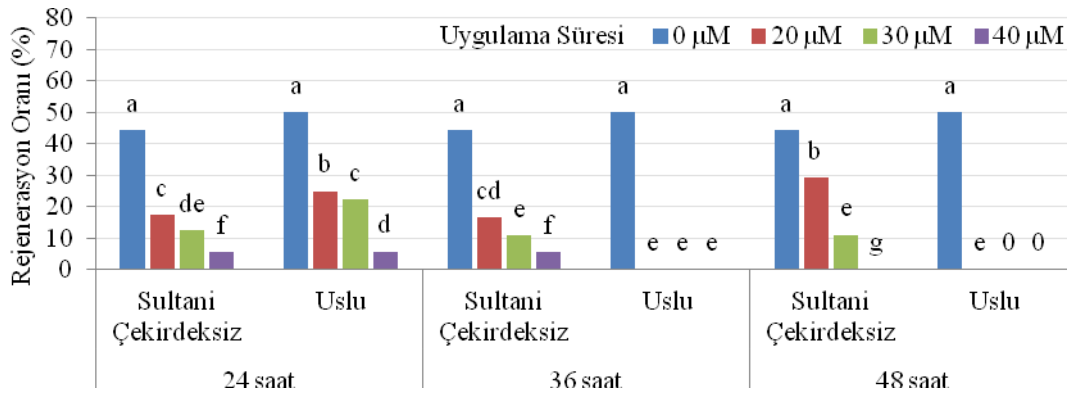
Şekil 4. Katı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde canlılık oranına etkisi



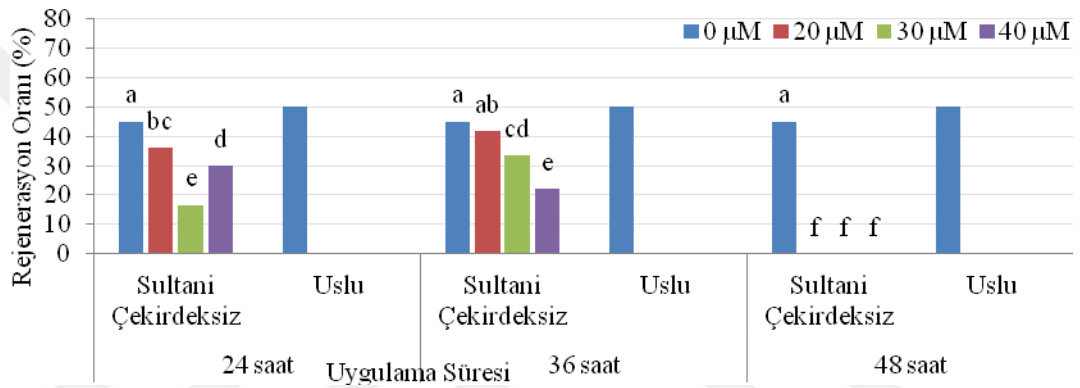
Şekil 5. Sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranına etkisi



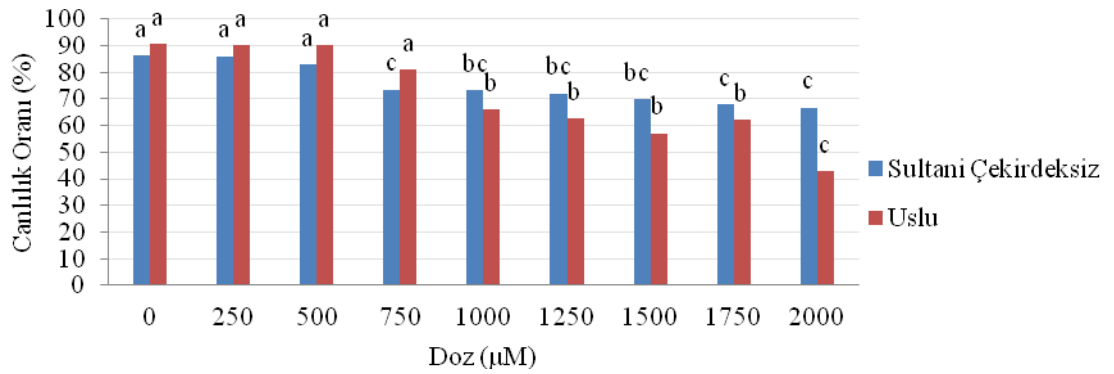
Şekil 6. Katı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinin koltuk altı meristem eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranına etkisi



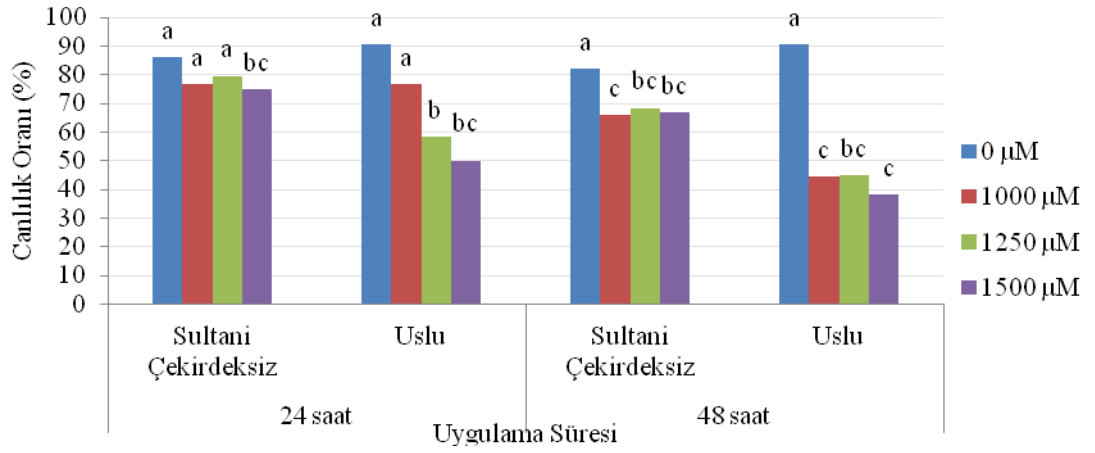
Şekil 7. Sıvı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranına etkisi



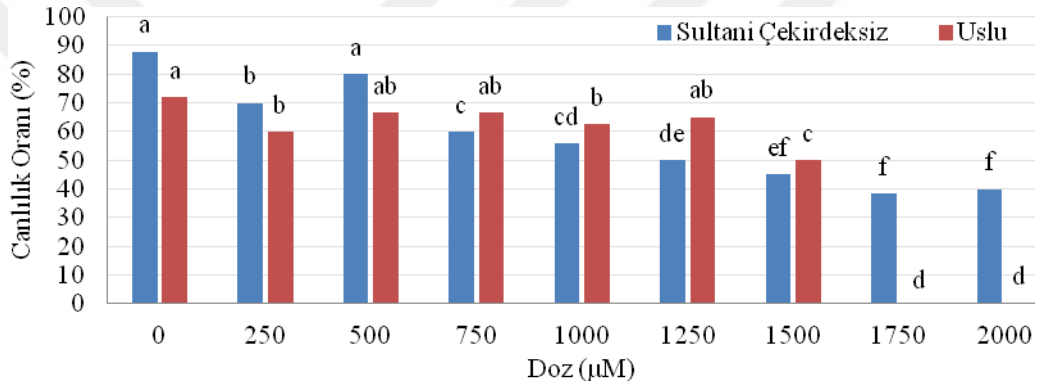
Şekil 8. Katı besin ortamında farklı konsantrasyon ve sürede uygulanan orizalin muamelesinin Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşitlerinin kallus eksplantından gelişen sürgünlerde rejenerasyon oranına etkisi



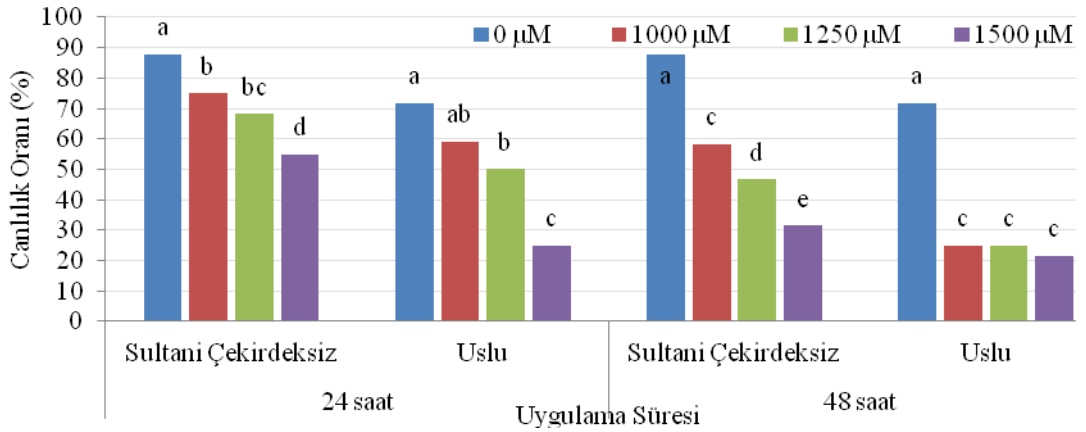
Şekil 9. ½ saat uygulama süresinde kolhisin dozunun çeşitlere göre tek boğumlu mikro çelik eksplantı canlılık oranı üzerine etkisi



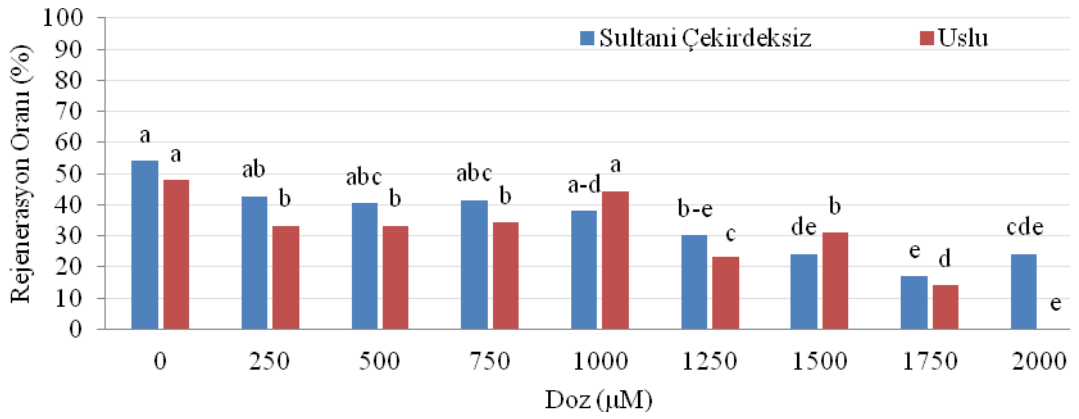
Şekil 10. Farklı süre ve dozda kolhisin uygulamasının çeşitlere göre tek boğumlu mikro çelik eksplanti canlılık oranı üzerine etkisi



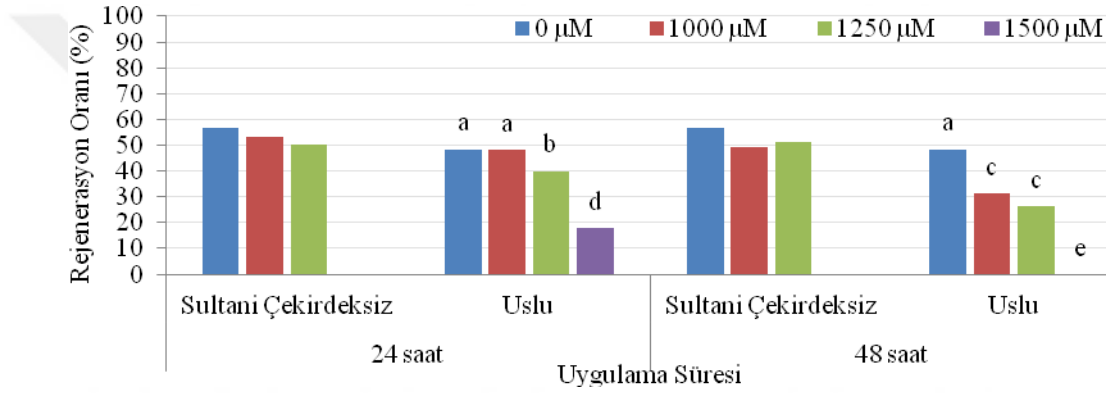
Şekil 11. ½ saat uygulama süresinde kolhisin dozunun çeşitlere göre sürgün ucu eksplanti canlılık oranı üzerine etkisi



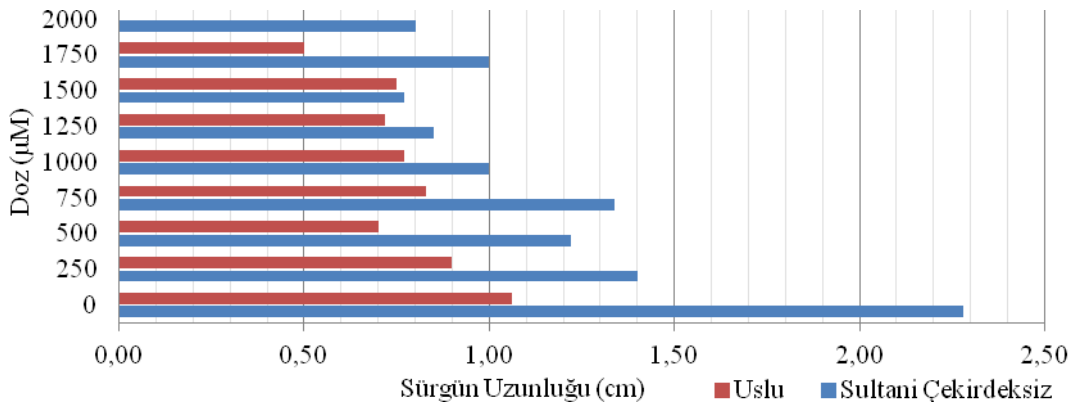
Şekil 12. Farklı süre ve dozda kolhisin uygulamasının çeşitlere göre sürgün ucu eksplanti canlılık oranı üzerine etkisi



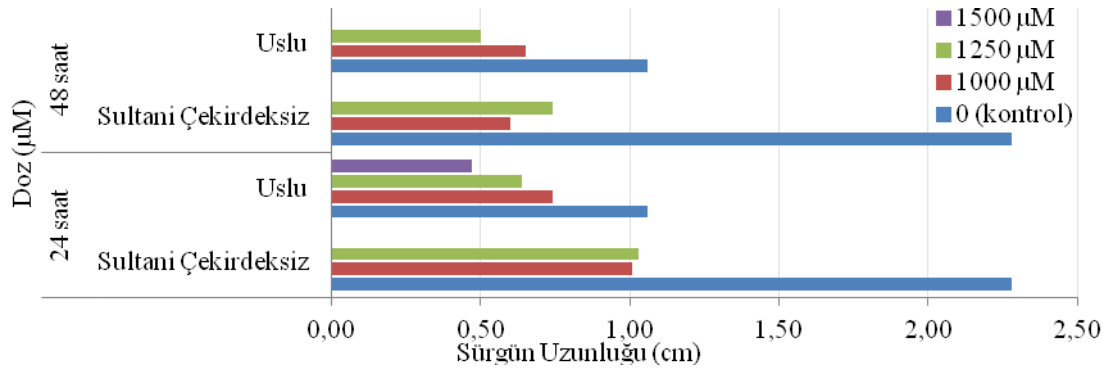
Şekil 13. ½ saat uygulama süresinde kolhisin dozunun çeşitlere göre tek boğumlu mikro çelik rejenerasyon oranı üzerine etkisi



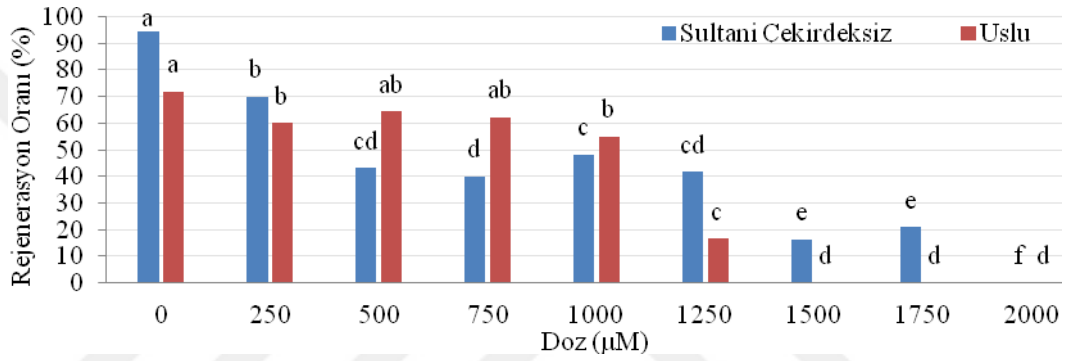
Şekil 14. Farklı süre ve dozda kolhisin uygulamasının çeşitlere göre tek boğumlu mikro çelik rejenerasyon oranı üzerine etkisi



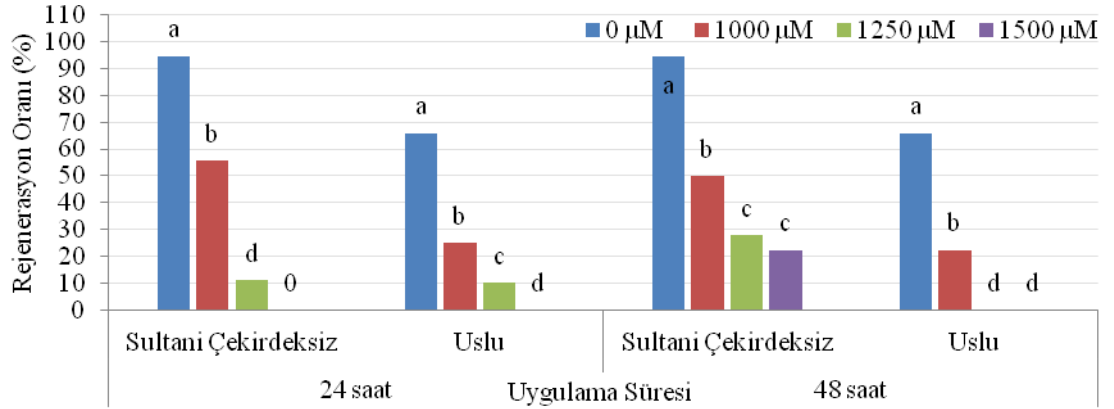
Şekil 15. ½ saat sürede uygulanan kolhisin dozlarının Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşidi tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgün uzunluğuna etkisi



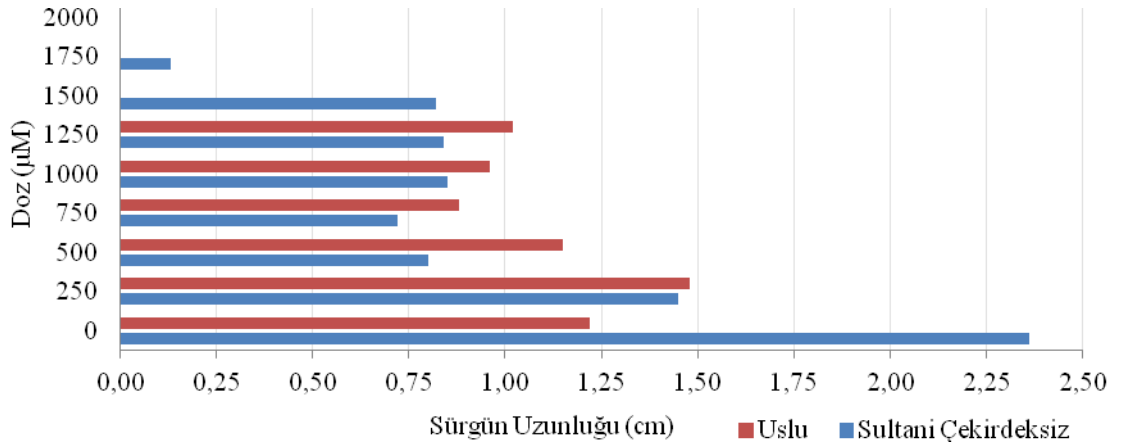
Şekil 16. Farklı kolhisin dozu ve uygulama sürelerinin Sultani Çekirdeksiz ve Uslu çeşidi tek boğumlu mikro çelik eksplantından gelişen sürgün uzunluğuna etkisi



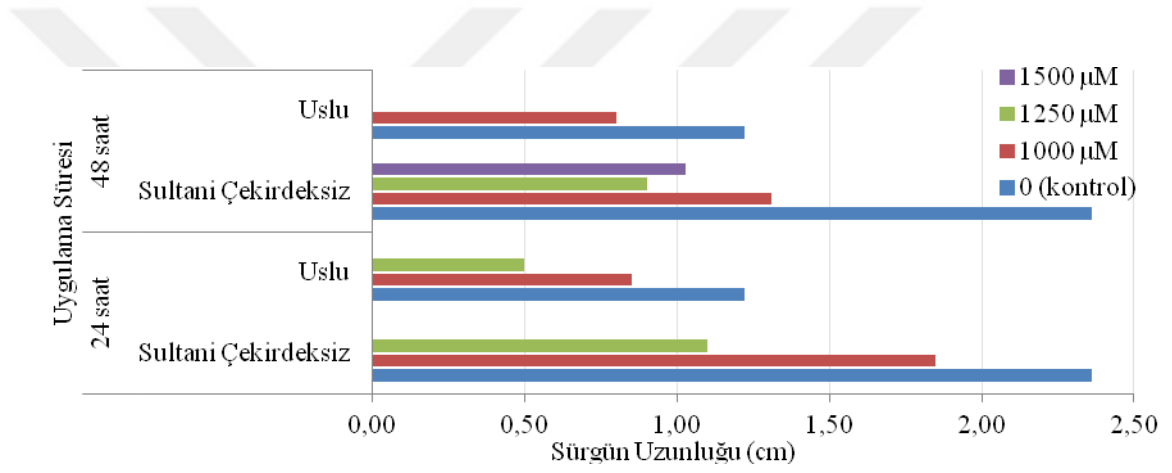
Şekil 17. ½ saat uygulama süresinde kolhisin dozunun çeşitlere göre sürgün ucu rejenerasyon oranı üzerine etkisi



Şekil 18. Farklı süre ve dozda kolhisin uygulamasının çeşitlere göre sürgün ucu rejenerasyon oranı üzerine etkisi



Şekil 19. ½ saat sürede uygulanan kolhisin dozlarının Sultanı Çekirdeksiz ve Uslu çeşidi sürgün ucu eksplantından gelişen sürgün uzunluğuna etkisi



Şekil 20. Kolhisin dozu ve uygulama sürelerinin Sultanı Çekirdeksiz ve Uslu çeşidi sürgün ucu eksplantından gelişen sürgün uzunluğuna etkisi

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif Ceren PEHLİVAN (KALINKARA)
Doğum Yeri : Altındağ/ ANKARA
Doğum Tarihi : 28/05/1987
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Denizli Lisesi (2004)
Lisans : Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü (2009)
Yüksek Lisans : Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü (2009)
(Eylül, 2009 – Temmuz 2012)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nde
Araştırma Görevlisi (2012-halen)

Yayınlar (SCI)

- Gozlekci, S., Balci, F., Ayala-Silva, T. and Kalinkara, E.C. 2012. Some physical and chemical changes of pomegranate fruit characteristics during storage shelf-life conditions. *Planta Medica*. Vol.78; 136.
- Barut Gök, S., Kalinkara, E.C., Erdoğan, Y., 2013. The use of plant secondary metabolites as food additives. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 24, pp.89.
- Kalinkara, E.C., Erdoğan, Y. and Barut Gök, S. 2013. Production of Secondary Metabolites by Biotechnological Methods. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 24, pp.129-130.

Hakemli Dergiler

- Daneshvar Royandazagh, S., Pehlivan, E.C., Teykin, E.E. ve Çiftçi, H.S. 2014. *Lilium candidum* L.'da *In Vitro* Mikroçoğaltım ile Kozmetik Sanayisine Ham Madde Temini. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences, Special Issue:2*, 1911-1916.
- Pehlivan, E.C. ve Uzun, H.İ. 2015. Shiraz Üzüm Çeşidinde Salkım Seyreltmesinin Verim Özellikleri Üzerine Etkileri. *YYÜ Tarım Bilimleri Dergisi*, 25(2): 119-126.
- Daneshvar Royandazagh S., Pehlivan E. C. 2016. *Lilium Candidum* L.'da *In Vitro* Mikroçoğaltım ve Alkaloidler. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, Vol. 13, Pp. 100-110.
- Pehlivan E.C., Kunter B., Daneshvar Royandazagh S., Keskin, N. 2016. Asma Hücrelerine Biyoteknolojik Bakış ve Yeni Çalışmalar. *Bahçe, Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 45, 805-811.

•Pehlivan, E.C., Daneshvar Royandazagh S., Kunter, B. 2018. Asmada (*Vitis Vinifera* L) Eksplant Yüzey Sterilizasyon Protokolünün Oluşturulması. Bahçe, 47(1), 195-200.

•Pehlivan E. C., Kunter B., Daneshvar Royandazagh S., Choise of Explant Material and Media for *In Vitro* Callus Regeneration in Sultana Grape Cultivar (*Vitis Vinifera* L.), Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, Pp. 30-34, 2017.

Uluslararası Kongre Sunum

•Daneshvar Royandazagh S., Pehlivan E.C., Parmak H. and Yıldırım H.T. 2017. Establishment of *In Vitro* Micropropagation Protocol of Axillary and Lateral Bud Explants in Laurel (*Laurus Nobilis* L.), International Molecular Biology and Biotechnology Congress (22.12.2017-25.12.2017).

•Pehlivan E.C., Daneshvar Royandazagh S., Keskin N. and Kunter B. 2018. Effect of Oryzalin Treatment on *In Vitro* Regeneration in cv. Sultana (*Vitis Vinifera* L.), I. International Agricultural Science Congress (09.05.2018-12.05.2018).

•Daneshvar Royandazagh S., Pehlivan E. C. 2019. Establishment of *In Vitro* Clonal Cutting Production Protocol of Bay Laurel (*Laurus Nobilis* L.). Agrofood (Yayın No:5119548).