

DİPLOİT VE TETRAPLOİT ASMA GENOTİPLERİNDE POLİPOLİDİ DOĞRULAMA YÖNTEMLERİNİN TESTİ

Osman DOĞAN^{1*}, Zeki KARA², Kevser YAZAR³, Heydem EKİNCİ⁴, Sabit YAZICI⁵

¹Dr., Selçuk Üniversitesi, Konya; ORCID: 0000-0002-3264-5925

²Prof. Dr., Selçuk Üniversitesi, Konya; ORCID: 0000-0003-1096-8288

³Dr. Öğr. Üyesi, Selçuk Üniversitesi, Konya; ORCID: 0000-0002-0390-0341

⁴Arş. Gör., Harran Üniversitesi, Şanlıurfa; ORCID: 0000-0002-1828-7367

⁵Zir. Müh., Selçuk Üniversitesi, Konya; ORCID: 0000-0001-8895-3161

ÖZ

Poliploidizasyon yüksek bitkilerde evrimi yönlendiren ana faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Poliploidizasyonun bazı bitki fenotiplerini değiştirdiği ve temel özelliklerin çoğuna dokunmadan bırakması nedeniyle üzüm çeşitlerinin kalite, verim veya çevresel adaptasyon gibi belirli özelliklerin geliştirilmesinde faydalı olması beklenmektedir. Bu çalışmada iki diploit Ekşi Kara ve Gök Üzüm çeşitleri ile iki tetraploit Kyoho ve Heuk Boseok üzüm çeşitlerinin ploidi düzeylerinin tespitinde ön eleme verileri için kullanılan stoma özellikleri (yoğunluk, uzunluk, genişlik), kloroplast sayıları (adet stoma), yaprak klorofil içerikleri (SPAD değeri) ve yaprak kalınlıkları (µm) karşılaştırılmıştır. Bitkisel materyal örnekleri serada vejetatif olarak çoğaltılmış 35 litrelik saksı içerisindeki 2 yaşlı bitkilerden alınmıştır. Sitolojik çalışmada, denemede kullanılan çeşitlerin tümünde Flow Sitometri (FC) analizi yapılarak veriler karşılaştırılmıştır. Diploit üzüm çeşitlerinin stoma sayıları tetraploit çeşitlerinden önemli ölçüde fazla, stomaları daha yoğun, stoma uzunluk ve genişlik değerleri daha düşüktür. Tetraploit çeşitlerin yaprak klorofil içerikleri ile yaprak kalınlıkları diploit çeşitlerinden önemli ölçüde daha fazla, kloroplast sayıları ise diploit çeşitlerin yaklaşık iki katıdır. FC analizlerinde tetraploit çeşitlerin pik seviyesi diploitlerin iki katıdır. Yapılan incelemeler sonucunda tetraploit çeşitler ile diploit çeşitler arasındaki farklar tüm parametrelerde önemlidir. Stoma, kloroplast, klorofil ve yaprak kalınlığı parametrelerinin poliploit bitki ıslahı çalışmalarında, çok sayıda örnekle çalışırken poliploit bitkilerin tespitinde araştırmacılara zaman kazandırmaktadır. Ploidi düzeylerini doğrulama için FC analizi gerekli görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Asma, poliploit, klorofil, kloroplast, stoma

TESTING OF POLYPOLYDY CONFIRMATION METHODS IN DIPLOIT AND TETRAPLOIT GRAPEVINE GENOTYPES

ABSTRACT

Polyploidization is accepted as one of the main factors driving evolution in higher plants. Because polyploidization alters some plant phenotypes and leaves many of the essential traits untouched, grape varieties are expected to be beneficial in improving certain traits such as quality, yield or environmental adaptation. Stomatal characteristics (density, length, width), chloroplast numbers (number stomata), leaf chlorophyll contents (SPAD value) and leaf thicknesses (m) are the pre-screening data in determining the ploidy levels and in this study, two diploid Ekşi Kara and Gök Üzüm varieties and two tetraploid Kyoho and Heuk Boseok grape varieties were compared to these methods. Plant materials samples were taken from 2-year-old plants in 35-liter pots, which were propagated vegetatively in the greenhouse. In the cytological study, Flow Cytometry (FC) analysis was performed on all cultivars used in the experiment and the data were compared. The number of stomata of diploid grape varieties is significantly higher than that of tetraploid varieties, the stomata are denser, and the stomatal length and width values are lower. Leaf chlorophyll contents and leaf thicknesses of tetraploid cultivars are significantly higher than those of diploid cultivars, and chloroplast numbers are approximately twice that of diploid cultivars. In FC analyses, the peak level of tetraploid cultivars is twice that of diploids. As a result of the examinations, the differences between tetraploid varieties and diploid varieties are important in all parameters. Stoma, chloroplast, chlorophyll, and leaf thickness parameters save time for researchers in the detection of polyploid plants while working with many samples in polyploid plant breeding studies. FC analysis is considered necessary to confirm ploidy levels.

Keywords: Grapevine, polyploid, chlorophyll, chloroplast, stoma

GİRİŞ

Poliploit bireyler tabiatla yaygın olarak bulunmakta olup, türleşme ve adaptasyon için büyük

bir mekanizma sağlar. Birçok kültür bitkisini içine alan angiospermlerin yaklaşık %50-70'i evrimsel süreçte poliploidi geçirmektedir [10]. Çiçekli

*Sorumlu yazar / Corresponding author: osmandogan@selcuk.edu.tr

bitkilerin 1/100.000'i önemli ölçüde poliploid bitkiler oluşturmaktadır [13].

Poliploidi, somatik hücre başına ikiden fazla genomun varlığını ifade eder. Poliploid organizmalar, somatik hücrelerin kromozom katlaması ile kendiliğinden ortaya çıkabilir veya diploid gametlere yol açan homolog kromozomların ayrılmaması nedeniyle mayoz bölünme sırasında ortaya çıkabilirler [41].

Poliploid bitkilerin gövdeleri daha kalın, yaprakları geniş ve koyu renkli, kökleri güçlü ve diploidlere göre daha geniş yayılım gösterir, çiçek, polen ve tohumları diploidlerden daha iridir [36].

Mutajenite, bir fiziksel veya kimyasal ajanın bir hücre veya organizmanın genetik içeriğinde kalıcı olarak aktarılabilir varyasyonları teşvik etme derecesidir. Mutasyonlar olarak adlandırılan bu genetik değişiklikler kalitatif veya kantitatif olabilir. Bir kromozomu, bir gen grubunu, bir gen segmentini veya tek bir geni etkileyebilirler. Mutajenitenin canlı organizmaların evrimi, gelişimi ve çeşitliliğinde hayati bir rol oynadığı da bilinmektedir. DNA duplikasyonuna veya transpozonlara bağlı olarak mutajenite hem bitkilerde hem de hayvanlarda yeni genler, genomlar ve genetik çeşitlilik geliştirmiştir. Doğal mekanizmaların dışında, mutajenite geniş çapta benimsenmiştir ve kültür bitkileri ıslahında tercih edilen teknolojidir [4, 21].

Bitki ıslah yöntemleri arasında, mutasyonlar ve doğal seleksiyon, geleneksel ıslahtan çok daha hızlı bir oranda kültür bitkilerinin hem fenotipik hem de genotipik düzeyde arzu edilen değişikliklerin sağlanmasıyla dünya gıda talebinin karşılanmasında dikkate değer bir başarı göstermiş [52], bitki evriminin temel taşı olmuştur [39]. Mutajenler, mutasyonları çok daha hızlı oranlarda teşvik ederek doğadaki yavaş mutasyon oranına bir çözüm sağlamıştır [52]. Mutasyonlar, canlı hücrelerdeki DNA'da genetik ayrışma veya genetik rekombinasyondan kaynaklanmayan ani kalıtsal değişiklikler olup, intragenik (nokta mutasyonları), yapısal (kromozom yeniden düzenlemeleri) veya genom mutasyonları (kromozom sayısındaki değişiklikler) olabilir [39]. Ayrıca, fenotipi önemli ölçüde etkilemeden tek bir kusurlu özellik için kabul edilebilir elit bir çeşit geliştirme avantajına sahiptir [2]. Mutasyon teknikleri kullanılarak, yeni bir patojene duyarlılık gibi elit çeşitlerdeki kusurlar daha hızla düzeltilebilir [39].

Bugüne kadar, teşvik edilen mutajenez, tahıllar, baklagiller, süs bitkileri, tıbbi-aromatik bitkilerde, birçok fiziksel ve biyokimyasal özellik iyileştirmeleri dahil olmak üzere birçok üründe kullanılmıştır. Etil metan sülfonat, X-ışınları veya γ -ışınları gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal mutajenler, bitki mutasyonu

ıslahında önemlerini kanıtlamıştır [2]. Germplazmada ilgili bir gen yoksa mutasyon teşviki, yeni bir özelliği oluşturmak için genetik modifikasyon olmayan tek yol olabilir. Mutasyon ıslahı, çekirdeksiz bitkileri ve çeşitleri geliştirmek için tek basit alternatiftir [39].

Kromozom katlanmayı teşvik ettikten sonra, poliploid bitkilerin elde edilmesinde çalışmanın başarısını doğrulamak önemlidir. Poliploid bireylerin tanımlanmasına yönelik yöntemler doğrudan ve dolaylı olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Dolaylı yöntemler, özellikle stoma ile ilgili olanlar olmak üzere fizyolojik ve/veya morfolojik özelliklerin incelenmesini içerir. Poliploid bitkiler, diploid akrabalarına kıyasla genellikle daha düşük yoğunlukta ve daha büyük stomalar içerir ve koruyucu hücre başına kloroplast sayısı daha yüksektir. Bu tür stoma özellikleri, kırmızı yonca [18], Kara çayır [49], orkideler [47], armut [25], üzüm [28], Afrika kadife çiçeği [46] ve Balady mandarin [1] gibi çeşitli bitki türlerinin poliploid rejenerantlarını ayırt etmek için verimli bir şekilde kullanılmıştır.

Poliploidi tespiti için dolaylı prosedürler genellikle hızlı ve basittir. Bununla birlikte, FC analiziyle nükleer genom boyutu ölçümü gibi doğrudan yöntemlerle doğrulama genellikle gereklidir. Kromozom sayımı, poliploid varyantları tespit etmek için en doğru yöntem olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, sitogenetik teknikler genellikle zahmetlidir ve her tür için oldukça spesifik protokoller gerektirir [14].

Bu çalışmada poliploidi düzeyini belirlemede kullanılan dolaylı (stoma yoğunluğu, stoma uzunluğu, stoma genişliği, kloroplast sayısı klorofil içeriği ve yaprak kalınlığı) ve doğrudan (Flow sitometri) yöntemler iki diploid (Ekşi Kara ve Gök Üzüm) ve iki tetraploid (Heuk Boseok ve Kyoho) üzüm çeşitlerinde incelenmiştir. Ülkemizde çok sayıda poliploidi çalışması olmasına rağmen diploid ve tetraploid bitkilerin incelenmesi ve farklarının ortaya konması hususunda mevcut çalışma yokken Dünyada ise çok az sayıdadır. Bu sebeple çalışmanın orijinal olması ve gelecek çalışmalara kaynak niteliği taşıması kaçınılmazdır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

•*Ekşi Kara*: Antik ve otokton üzüm çeşidi Ekşi Kara (*Vitis vinifera* L.), Konya-Karaman illeri ve Orta Toroslarda antik çağlardan beri yetiştirilmektedir. Bu ekolojiye iyi uyum sağlamıştır. Çeşidin çiçek yapısı fonksiyonel dişidir. Bu nedenle bağ tesisinde mutlaka dölleyici çeşide gereksinim duyar. Yörede Gök Üzüm

en önemli tozlayıcısıdır. Döllenme için gelen polene bağlı olarak tane şeklinde farklılıklar ortaya çıkabilmekte ve bunlar da farklı tipler olarak değerlendirilebilmektedir. Ekşi Kara üzümü sofralık, kurutmalık ve şıralık olarak değerlendirilmektedir. Çeşidin az derin loplu yaprakları salamuralık asma yaprağı olarak Mayıs sonundan Temmuz ortalarına kadar lokal pazara arz edilmektedir. Omcaları kuvvetli, verimli, kısa veya karışık budamaya uygundur [26, 27].

•*Gök Üzüm*: Konya ili Hadim ve Bozkır ilçelerinde yetiştiriciliği yoğun olarak yapılan Gök Üzüm, Ekşi Kara çeşidinin tozlanmasında kullanılan en önemli çeşit niteliğindedir [26, 27]. Orta geç mevsimde sofralık olarak pazara sunulmakta ve çekirdekli kuru üzüm tüketiminde doğal yeşil renkli olması ile önemli bir konumdadır. Konik-kanatlı salkımları orta iri 300-400 g, dolgun yapılıdır. Taneleri ince kabuklu, narın yapılı, etli, sulu, yeşil-sarı renkli, küresel şekilli, orta iri 5-6 g, 1-2 çekirdeklidir. Salkımın iyi ışık alan kısımlarında tane rengi kehribara dönmektedir. İleri olgunluk safhasında yapılan hasatlarda salkımların işlenmesi sırasında tane saplarının kırılması gibi sorunlar ortaya çıkar [26].

•*Heuk Boseok*: 1992 yılında NHRI'da (Ulusal Bahçe Bitkileri Araştırma Enstitüsü) Beniizu (4×, *Vitis* sp.) × Kyoho (4×, *Vitis* sp.) melezlemesi sonucunda elde edilmiştir. 2003 yılında tanelerinin iri mükemmel renkte ve kalite özelliklerinin yüksek oluşuyla selekte edilmiştir. Ortalama tane ağırlığı 10.6 g ve ortalama çözünür kuru madde 18.4°Brix'dir [38].

•*Kyoho*: 1945 yılında Y. Ohinoue, tarafından Ishihara Wase × Centennial melezlemesi sonucunda elde edilmiştir [56]. Ishihara Wase ve Centennial çeşitleri sırasıyla Campbell Early (*V.labruscana*) ve Razakı (*V.vinifera*) çeşitlerinden meydana gelen tetraploit somatik mutantlardır [31, 56]. Kyoho, taneleri iri (12 ila 14 g), mor renkte ve foxy aromasına sahiptir. Tanelerde tam olgunluk döneminde çatlama görülebilir. Taneleri kısa raf ömrüne sahiptir. Hastalıklara dayanımı orta derecedir [55].

Metot

Çalışmada kullanılan iki diploit (Ekşi Kara ve Gök Üzüm) ve iki tetraploit (Heuk Boseok ve Kyoho) üzüm çeşitlerinde dolaylı (stoma yoğunluğu, stoma uzunluğu, stoma genişliği, kloroplast sayısı, klorofil içeriği ve yaprak kalınlığı) ve doğrudan (Flow Sitometri analizi) poliploidi belirleme yöntemleri incelenmiştir.

Yaprak epidermal izleri bitkilerde uçtan 4-6. yaprağın abaksiyal tarafında üç farklı bölgeye şeffaf

oje uygulanmasıyla elde edilmiştir. Alt epidermis sıyrılıp lam üzerine yerleştirilerek örneklerde stoma yoğunluğu, genişliği ve uzunluğu ×40 büyütmeleli objektif ve ×10 büyütmeleli oküler mikro metre gözlemine bağlı olarak belirlenmiştir [35]. Stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısı uçtan 4-6. yapraklardan alınan yaprak kesitlerinde sayılmıştır. İlk olarak, taze yaprakların Carnoy solüsyonunda (3 kısım etil alkol: 1 kısım glasiyal asetik asit) rengi açılmıştır. Solüsyondan çıkartılan yaprak kesitleri 2-5 dakika steril suda bekletilmiş ve ardından 30 saniye süre ile %1 dozunda I-KI solüsyonu ile boyanmıştır. Her örnek için 30 adet stomada kloroplast sayımı yapılmıştır. Kloroplast sayısı mikroskopta ×400 kat büyütülerek sayılmıştır [29, 57]. Uygulama yapılan bitkilerin yaprakları arasındaki kalınlık farklılıkları, ×10 büyütmeleli objektif ve ×10 büyütmeleli ışık mikroskobu kullanılarak gözlenmiştir. Araştırma kapsamındaki tüm sürgünlerin uçtan 4-6. yapraklarının klorofil içeriği klorofil metre (SPAD-502, Minolta, Japan) ile ölçülmüştür.

Diploit ve tetraploit bitkilerden elde edilen veriler SPSS 17.0 istatistik programında (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) Duncan çoklu karşılaştırma testi ile $p < 0.05$ önem seviyesinde karşılaştırılmıştır [58].

•*Flow sitometri (FC) yoluyla ploidi analizi*: Ploidi düzeyini belirlemek için FC analizi diploit ve tetraploit üzüm çeşitlerinin taze yaprak örneklerinde (3-4 haftalık) yapılmıştır. Yaprak örneklerinden 0.5 cm² büyüklüğündeki kesitler alınarak petri kabına yerleştirilmiş ve 500 µL izolasyon buffer (Partec-Nuclei Extraction Buffer) ilave edilerek yaprak dokusu küçük parçalara ayrılncaya kadar jilet kullanılarak parçalanmıştır. İzolasyon buffer eklenecek yapılan parçalama işlemi sonucunda hücre çekirdeklerinin serbest kalması sağlanmış ve çekirdek zarı üzerinde açıklıklar oluşturulmuştur. Petri kabındaki örnekler 10-15 saniye çalkalanmış ve Partec- CellTrics 30 µm- green filtre ile süzülerek tüp içerisine (Partec-Sample Tubes, 3.5 ml, 55×12 mm) aktarılmıştır. Tüplere 1600 µL boyama solüsyonu [Partec-DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole) Staining Buffer] ilave edilerek ışık izolasyonu olan bir ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Sonrasında örnekler FC cihazında analiz edilmiştir [28].

BULGULAR VE TARTIŞMA

Stoma Sayısı

Yapılan incelemeler sonucunda Ekşi Kara, Gök Üzüm, Heuk Boseok ve Kyoho çeşitlerinin stoma sayıları arasındaki farklar önemli bulunmuştur. Ekşi Kara, Gök Üzüm, Heuk Boseok ve Kyoho çeşitleri stoma sayıları sırasıyla 297.95±15.77, 318.15±15.15, 186.85±4.37 ve 202.00±4.37 adet olarak

belirlenmiştir. Diploit çeşitler tetraploitlere göre daha fazla stoma sayısına sahip olurken diploit çeşitlerde Gök Üzüm çeşidi, tetraploitlerde ise Kyoho çeşidi stoma yoğunluğu bakımından öne çıkmaktadır (Şekil 1-a).

Stoma Uzunluğu

Ekşi Kara, Gök Üzüm, Heuk Boseok ve Kyoho çeşitleri stoma uzunlukları arasındaki farklar önemli bulunmuştur. Ekşi Kara, Gök Üzüm, Heuk Boseok ve Kyoho çeşitleri stoma uzunlukları sırasıyla 28.33 ± 0.72 , 30.42 ± 0.72 , 40.83 ± 1.91 ve 41.25 ± 1.25 μm olarak tespit edilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda diploit çeşitlerdeki stoma uzunluğu öne çıkmakta olup Gök üzüm çeşidi Ekşi Kara'ya göre daha uzun stomalara sahiptir. Tetraploit çeşitlerde ise Kyoho çeşidi Heuk Boseok'a göre daha uzun stomalara sahiptir. Ayrıca tetraploit çeşitlerin (Heuk Boseok ve Kyoho) stoma uzunlukları diploit çeşitlerinkinden (Ekşi Kara ve Gök Üzüm) önemli derece daha büyük olduğu da tespit edilmiştir (Şekil 1-b).

Stoma Genişliği

Yapılan incelemeler sonucunda Ekşi Kara, Gök Üzüm, Heuk Boseok ve Kyoho çeşitlerinin stoma genişlikleri arasındaki farklar önemli bulunmuştur. Bu çeşitlerin stoma genişlikleri sırasıyla 17.92 ± 0.72 , 20.42 ± 0.72 , 27.08 ± 0.72 ve 28.33 ± 1.91 μm olarak tespit edilmiştir. Diploit çeşitlerin stoma genişlikleri arasında önemli farklar ortaya çıkarken Gök üzüm çeşidinin stomaları Ekşi Kara'dan daha geniştir. Tetraploit çeşitlerde ise stoma uzunluğunda olduğu gibi küçük farklar oluşmasına rağmen aradaki fark önemsizdir. Stoma uzunluklarında olduğu gibi tetraploit çeşitler diploit çeşitlerden daha büyük stoma genişliğine sahiptir (Şekil 1-c).

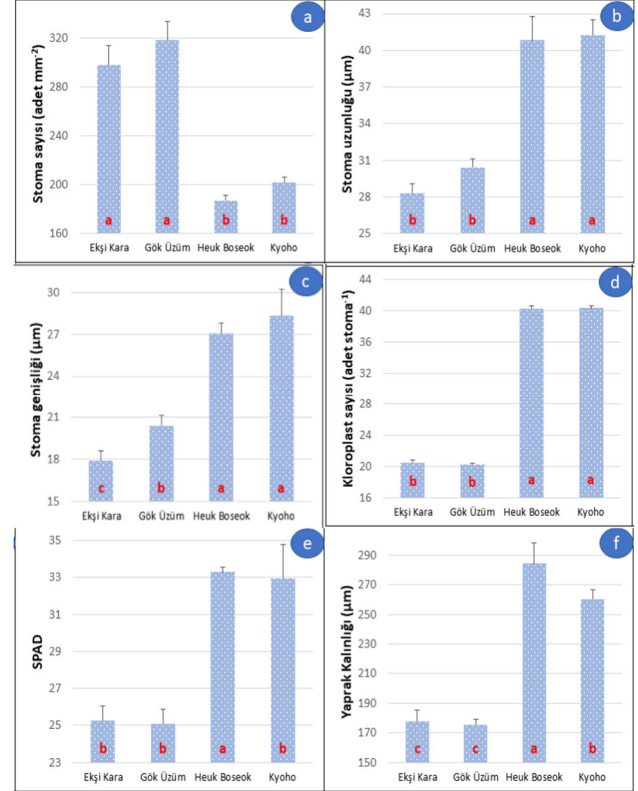
Kloroplast Sayısı

Ekşi Kara, Gök Üzüm, Heuk Boseok ve Kyoho çeşitlerinin kloroplast sayıları arasındaki farklar önemli bulunmuştur. Bu çeşitlerin kloroplast sayıları sırasıyla 20.47 ± 0.31 , 20.27 ± 0.12 , 40.27 ± 0.42 ve 40.33 ± 0.36 adet olarak belirlenmiştir. Diploit ve tetraploit çeşitlerin kendi arasındaki kloroplast sayım sonuçları birbirine yakın olup aralarındaki farklar önemsizdir. En düşük stoma sayısı Gök üzüm çeşidinde belirlenirken en yüksek kloroplast sayısı ise Kyoho çeşidinde tespit edilmiştir. Ayrıca tetraploit çeşitlerin kloroplast sayısı diploit çeşitlerin yaklaşık iki katıdır (Şekil 1-d).

Yaprak Klorofil İçeriği

Yapılan çalışmalar sonucunda Ekşi Kara, Gök Üzüm, Heuk Boseok ve Kyoho çeşitlerinin yaprak

klorofil içerikleri arasındaki farklar önemli bulunmuştur. Bu çeşitlerin klorofil içerikleri sırasıyla 25.28 ± 0.78 , 25.08 ± 0.88 , 33.30 ± 0.26 ve 32.97 ± 1.83 olarak belirlenmiştir. Diploit ve tetraploit çeşitlerin kendi aralarındaki farklar kloroplast sayısında olduğu gibi önemsizdir. En düşük klorofil içeriği Gök Üzüm çeşidinde belirlenirken en yüksek klorofil içeriği Heuk Boseok çeşidinde tespit edilmiştir. Tetraploit çeşitlerin yaprak klorofil içeriği diploitlere kıyasla daha fazladır (Şekil 1-e).



Şekil 1. Diploit ve tetraploit çeşitlerin stoma sayısı (a), stoma uzunluğu (b), stoma genişliği (c), kloroplast sayısı (d), yaprak klorofil içeriği (e) ve yaprak kalınlığı (f) verileri

Figure 1. Stomata number (a), stomata length (b), stomata width (c), chloroplast number (d), leaf chlorophyll content (e) and leaf thickness (f) data of diploid and tetraploid cultivars

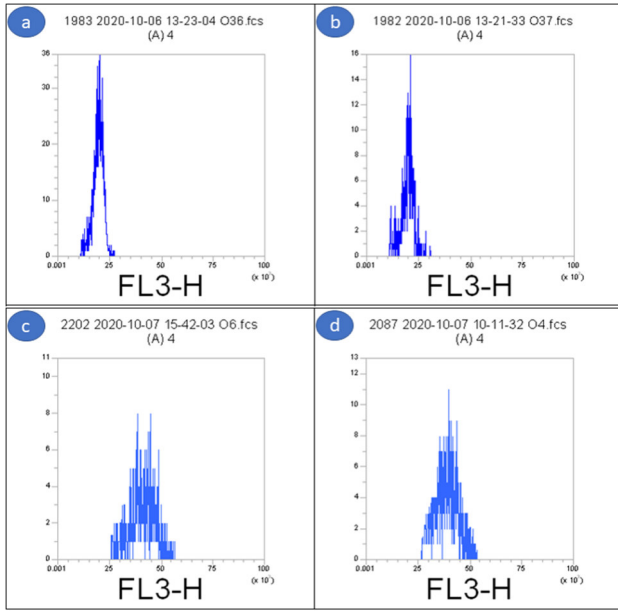
Yaprak Kalınlığı

Ekşi Kara, Gök Üzüm, Heuk Boseok ve Kyoho çeşitleri yaprak kalınlıkları arasındaki farklar önemli bulunmuştur. Ekşi Kara, Gök Üzüm, Heuk Boseok ve Kyoho çeşitlerinin yaprak kalınlıkları sırasıyla 177.78 ± 7.70 , 175.56 ± 3.85 , 284.44 ± 13.88 ve 260.30 ± 6.64 μm olarak belirlenmiştir. Diploit çeşitler arasındaki yaprak kalınlığı farkları küçük ölçüde olmasına rağmen tetraploit çeşitlerde Heuk Boseok çeşidinin yaprak kalınlığı Kyoho'ya göre önemli düzeyde fazladır. En düşük yaprak kalınlığı Gök

Üzüm çeşidinde belirlenirken en kalın yapraklar ise Heuk Boseok çeşidinde belirlenmiştir. Ayrıca tetraploit çeşitlerin yaprak kalınlığı diploit çeşitlerden önemli ölçüde daha küçüktür (Şekil 1-f).

Flow Stometri (FC) Analizi

FC analizi tüm diploit ve tetraploit çeşitlerde yapılmış (Şekil 2). Diploit çeşitler olan Ekşi Kara (Şekil 2-a) ve Gök Üzüm (Şekil 2-b) çeşitlerinin FC analizi sonucunda pik seviyesi 20 civarında çıkarken tetraploit çeşitler olan Heuk Boseok (Şekil 2-c) ve Kyoho (Şekil 2-d) üzüm çeşitlerinde ise pik seviyesi 40 civarında çıkmıştır. Tetraploit çeşitlerin pik seviyesi diploit çeşitlerin iki katıdır.



Şekil 2. Ekşi Kara (a), Gök Üzüm (b), Heuk Boseok (c) ve Kyoho (d) üzüm çeşitlerinin FC analiz sonuçları

Figure 2. FC analysis results of Ekşi Kara (a), Gök Üzüm (b), Heuk Boseok (c) and Kyoho (d) grape varieties

Poliploit bitkilerin tanımlanmasında stoma özellikleri dolaylı bir yöntem olarak bilinmekte [35] olup stoma özellikleri, poliploitlerin hızlı ve erken tanımlanması için kullanılır ve stoma özelliklerini tespit için kullanılan yöntem basit olup pahalı aletler gerektirmez [12, 20, 50]. Ploidi seviyesini belirlemede en ekonomik ve verimli yöntemlerin stoma boyutları ve kloroplast sayılarının tespiti olduğunu [53] ancak daha kesin sonuçlar için bu yöntemin FC analizi gibi modern yöntemlerle birlikte uygulanması gerektiğini bildirmişlerdir [23].

Yaptığımız çalışma sonucunda diploit çeşitlerin stoma sayıları tetraploit çeşitlerden önemli ölçüde fazla iken stoma uzunluk ve genişlikleri ise daha küçüktür. Zeng ve ark. [59] yaptıkları çalışmada

katlanan bitkilerde stoma uzunluğu ve genişliğinde artış stoma yoğunluğunda ise azalış tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise birim alandaki stoma yoğunluğu katlanan bitkilerde azalmış stoma uzunluğu ve genişliği ise artmıştır [6]. Çalışmamız verileri stoma özellikleri yönüyle literatürle benzerlik göstermektedir.

Kloroplast sayısının ploidi seviyesini tanımlamada etkili yöntem olduğu [50], ayrıca kromozom sayısı ile kloroplast sayısı arasında pozitif bir ilişki olduğu da bilinmektedir [48]. Yaptığımız çalışma sonucunda tetraploit çeşitlerin kloroplast sayısı diploit çeşitlerin yaklaşık iki katıdır. Birçok çalışmada tetraploit bitkilerin kloroplast sayısının diploitlerin iki katı olduğu bildirilmektedir [42, 43].

Klorofil, bitkide fotosentezin temel maddesidir ve bitkinin büyüme ve gelişme durumunu, fizyolojik metabolizmasını ve beslenme durumunu yansıtır [42]. Ayrıca, fotosentezden sorumlu olan klorofil gibi fotosentetik pigmentler esas olarak bitkinin fizyolojik durumunun iyi bir göstergeleridir [3]. SPAD değeri, klorofil içeriği ile pozitif ilişkilidir [33, 37]. Genel olarak, tetraploit bitkilerin SPAD değeri, diploidinkinden anlamlı olarak daha yüksek olduğu [42] bilinmekle birlikte Atichart ve Bunnag [5] poliploit *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl'in yaprağındaki klorofil içeriği orijinal diploitlerinkinden önemli ölçüde daha az olduğunu belirlemişlerdir. Literatür bu yönüyle farklılıklar arz etmektedir.

Yaptığımız çalışma sonucunda diploit ve tetraploit çeşitlerin SPAD değerleri arasındaki fark önemli olup tetraploit çeşitlerin SPAD değeri diploit çeşitlerden fazladır. Birçok poliploidi çalışmasında da bizim çalışmamıza benzer şekilde tetraploit bitkilerin klorofil içeriği diploitlerden fazla olup Sabzehzari ve ark. [45] tetraploit çeşitlerin yaprak klorofil içeriği değerini diploitlerden 1.13 kat, Fu ve ark. [19] 1.76 kat, Li ve ark. [32] ise 1.40 kat daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Poliploit bitkilerin yaprakları diploit orijinlerine göre daha kalın [40, 60], daha koyu yeşil [9, 22], daha geniş [24, 60] ve daha büyük [16, 54] yapıya sahiptirler.

Önceki çalışmalarda tetraploit bitkilerin yaprak kalınlığının diploit orijinlerine kıyasla daha büyük olduğu bilinmektedir [34, 59]. Bae ve ark. [6] ise, tetraploit bitkilerin yapraklarının diploitlerine göre daha küçük, kalın ve buruşuk bir yapı gösterdiğini bildirmiştir. Yaprak büyüklüğü yönüyle tetraploit bitkilerin yapraklarının diploit orijinlerine göre farklılık gösterdiği fakat kalınlık yönünden daha kalın yapıya sahiptir. Yaptığımız çalışma sonucunda tetraploit çeşitlerin yaprak kalınlığı diploit çeşitlerden daha kalın olur literatürü doğrular niteliktedir.

Poliploidi tespiti için dolaylı prosedürler genellikle hızlı ve basittir. Bununla birlikte, genellikle yanlışlıklar ve kromozom sayımı ve FC analizi ile nükleer genom boyutu ölçümü gibi doğrudan yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir. Kromozom sayımı, poliploit bitkileri saptamak için en doğru yöntem olarak kabul edilmiştir. Ancak kromozom sayım teknikleri genellikle zahmetli olması ve her tür için oldukça spesifik protokoller gerektirmesi [14] nedeniyle asmada kromozom sayımı zordur. Alternatif olarak, FC analizi, ploidi seviyesini ölçmek ve poliploidi teşvikinin başarısını doğrulamak için hızlı, güvenilir ve basit bir yöntemdir ve kısa sürede çok sayıda hedef bitkinin analizine izin verir [44].

FC analiz protokolüne günümüzde kolaylıkla ulaşılması nedeniyle FC analizi poliploidi çalışmalarında vazgeçilmez hale gelmiştir [17]. FC analizi tüm numunenin her çekirdeğinde yer alan genomun homojenliği tespit etmesi nedeniyle [7, 15] miksploitlerin tespitinde de vazgeçilmez bir ploidi doğrulama aracı olarak kullanılmaktadır [8, 9, 40, 51, 60].

Diploit ve tetraploit bitkilerle yaptığımız FC analizi sonucunda tetraploit bitkilerin pik seviyesi diploit bitkilerin yaklaşık iki katıdır. Yaptığımız çalışma bu yönüyle literatüre [11, 29, 30, 42] benzerdir.

SONUÇ

Diploit çeşitlerin stoma sayıları tetraploit çeşitlerin stomalarından önemli ölçüde fazla, stoma uzunluk ve genişlikleri daha kısadır. Diploit çeşitlerdeki stoma genişliği çeşitlere göre farklı olmakla birlikte farklılıklar diploit ve tetraploit çeşitler arasındakiler kadar değildir. Ayrıca, tetraploit çeşitlerin kloroplast sayıları, yaprak klorofil içerikleri ve yaprak kalınlıkları diploit çeşitlerinkinden önemli ölçüde daha fazladır. İki tetraploit çeşidin yaprak kalınlıkları arasındaki fark da önemlidir. Heuk Boseok çeşidi Kyoho'dan daha kalın yapraklara sahiptir. Stoma genişliği ve yaprak kalınlığı aynı ploidi düzeyindeki çeşitlerde de farklı olup ploidi düzeyi artınca farklılık artmıştır. FC analizinde tetraploit çeşitlerin grafikteki pik seviyesi diploit çeşitlerin iki katı olduğu açıkça görülmektedir. Diğer taraftan tetraploit çeşitler ile diploit çeşitlerin incelenen özellikleri arasındaki farklar tüm parametrelerde önemlidir. Poliploit bitki ıslahı çalışmalarında dolaylı ploidi belirleme yöntemlerinin kullanımı, çok sayıda örnekle çalışırken poliploit olmayan bitkilerin eliminasyonunda kolaylık sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Abou Elyazid, D.M., El-Shereif, A.R. 2014. *In vitro* induction of polyploidy in *Citrus reticulata* Blanco. American J. of Plant Sciences 5(11):1679.
2. Agrawal, L., Kumar, M., 2021. Improvement in ornamental, medicinal, and aromatic plants through induced mutation. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 9(4):1-6.
3. Alvarez, C., Sáez, P., Sáez, K., Sánchez-Olate, M., Ríos, D., 2012. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. PCTOC, 110(1):93-101.
4. Aminetzach, Y.T., Macpherson, J.M., Petrov, D.A., 2005. Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in *Drosophila*. Science, 309(5735):764-767.
5. Atichart, P., Bunnag, S. 2007. Polyploid induction in *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. by *in vitro* techniques. Thai J. Agric. Sci., 40(1-2):91-95.
6. Bae, S.-J., Islam, M.M., Kim, H.-Y., Lim, K.-B., 2020. Induction of Tetraploidy in Watermelon with Oryzalin Treatments. Hort. Sci. Technol., 38(3):385-393.
7. Bohanec, B. 2003. Ploidy determination using flow cytometry. In: Doubled haploid production in crop plants, Eds.: Springer, pp:397-403.
8. Carmona-Martin, E., Regalado, J., Raghavan, L., Encina, C. 2015. *In vitro* induction of auto octoploid asparagus genotypes. PCTOC 121(1):249-254.
9. Chen, C., Hou, X., Zhang, H., Wang, G., Tian, L. 2011. Induction of *Anthurium andraeanum* "Arizona" tetraploid by colchicine *in vitro*. Euphytica, 181(2):137-145.
10. Chen, L., Lou, Q., Zhuang, Y., Chen, J., Zhang, X., Wolukau, J.N. 2007. Cytological diploidization and rapid genome changes of the newly synthesized allotetraploids *Cucumis* × *hytivus*. Planta, 225(3):603-614.
11. Cimen, B., 2020. Induction of polyploidy in C35 citrange through *in vitro* colchicine treatments of seed-derived explants. Int. J. Fruit Sci., pp:1-13.
12. Cohen, D., Yao, J.L. 1996. *In vitro* chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. PCTOC, 47(1):43-49.
13. Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. Nat. Rev. Genet., 6(11):836-846.
14. Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. 2007. Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. In: Flow cytometry with plants: an overview, Eds., pp:41-65.

15. Doležel, J., Vrána, J., Šafář, J., Bartoš, J., Kubaláková, M., Šimková, H. 2012. Chromosomes in the flow to simplify genome analysis. *Funct. Integr. Genomics*, 12(3):397-416.
16. Dudits, D., Török, K., Cseri, A., Paul, K., Nagy, A. V., Nagy, B., Sass, L., Ferenc, G., Vankova, R., Dobrev, P. 2016. Response of organ structure and physiology to auto tetraploidization in early development of energy willow *Salix viminalis*. *Plant Physiol.* 170(3):1504-1523.
17. Eng, W.H., Ho, W.S. 2019. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. *Sci. Hortic.* 246:604-617.
18. Evans, A.M. 1955. The production and identification of polyploids in red clover, white clover and lucerne. *The New Phytologist*, 54(2):149-162.
19. Fu, L., Zhu, Y., Li, M., Wang, C., Sun, H. 2019. Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar. *PCTOC* 139(2):237-248.
20. Gu, X., Yang, A., Meng, H., Zhang, J. 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. *Plant Cell Rep.* 24(11):671-676.
21. Hastings, P.J., Lupski, J.R., Rosenberg, S.M., Ira, G. 2009. Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews Genetics* 10(8):551-564.
22. He, L., Ding, Z., Jiang, F., Jin, B., Li, W., Ding, X., Sun, J., Lv, G. 2012. Induction and identification of hexadecaploid of *Pinellia ternate*. *Euphytica*, 186(2):479-488.
23. Huy, N.P., Luan, V.Q., Tung, H.T., Hien, V.T., Ngan, H.T.M., Duy, P.N., Nhut, D.T. 2019. In vitro polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine. *Sci. Hort.* 252:283-290.
24. Ishfaq, M., Nasir, I.A., Mahmood, N., Saleem, M. 2012. In vitro induction of mutation in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cv. Roma by using chemical mutagens. *Pak J. Bot.* 44:311-314.
25. Kadota, M., Niimi, Y. 2002. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). *Plant Cell Rep.*, 21(3):282-286.
26. Kara, Z., Sabır, A., Doğan, O., Ömer, E. 2016. 'Gök Üzüm' (*Vitis vinifera* L.) çeşidinin ticari potansiyeli ve ampelografik özellikleri. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi* 5:395-410.
27. Kara, Z., Sabır, A., Yazar, K., Doğan, O., Khaleel, A. 2017. Fertilization biology of ancient grape 'Ekşi Kara' (*Vitis vinifera* L.). *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 31(2):92-97.
28. Kara, Z., Doğan, O., Yazar, K., Sabır, A. 2018. 41 B asma anacına in vivo kolhisin uygulamalarının morfolojik ve sitolojik etkileri. *Selcuk J. Agr. Food Sci.* 32(1):8-13.
29. Kara, Z., Yazar, K. 2021. Effects of shoot tip colchicine applications on some grape cultivars. *JAEFS*, 5(1):78-84.
30. Kara, Z., Yazar, K. 2022. Induction of polyploidy in grapevine (*Vitis vinifera* L.) seedlings by in vivo colchicine applications. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 46(2):152-159.
31. Kunter, B., Karataş, D.D. 2011. Asmalarda mutasyonlar ve mutant *Vitis vinifera* L. Çeşitleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(2):146-151.
32. Li, X., Zhang, Z., Ren, Y., Feng, Y., Guo, Q., Dong, L., Sun, Y., Li, Y. 2021. Induction and early identification of tetraploid black locust by hypocotyl in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 57(3):372-379.
33. Ling, Q., Huang, W., Jarvis, P. 2011. Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research* 107(2):209-214.
34. Lu, M., Zhang, P., Wang, J., Kang, X., Wu, J., Wang, X., Chen, Y. 2014. Induction of tetraploidy using high temperature exposure during the first zygote division in *Populus adenopoda* Maxim. *Plant Growth Regul.* 72(3):279-287.
35. Moghbel, N., Borujeni, M.K., Bernard, F. 2015. Colchicine effect on the DNA content and stomata size of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* and *Carthamus tinctorius* L. cultured in vitro. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 13(1):1-6.
36. Motosugi, H., Yamamoto, Y., Naruo, T., Kitabayashi, H., Ishii, T. 2002. Comparison of the growth and leaf mineral concentrations between three grapevine rootstocks and their corresponding tetraploids inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Vitis* 41(1):21-25.
37. Neufeld, H.S., Chappelka, A.H., Somers, G.L., Burkey, K.O., Davison, A.W., Finkelstein, P.L. 2006. Visible foliar injury caused by ozone alters the relationship between SPAD meter readings and chlorophyll concentrations in cut leaf coneflower. *Photosynthesis Research* 87(3):281-286.
38. Park, K., Yun, H., Rho, J., Kim, K. 2006. Major characteristics of grape cultivars bred by a grape breeding program in Korea. 9. International Conference on Grape Genetics and Breeding 827:511-514.
39. Pathirana, R. 2021. Mutations in plant evolution, crop domestication and breeding. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 24(3).

40. Rameshsing, C.N., Hegde, S.N., Wallalwar, M., Vasundhara, M. 2015. Crop improvement in stevia (*Stevia rebaudiana* Beroni) through colchicine. *Res. Environ. Life Sci.*, 8(2):393-396.
41. Ramsey, J., Schemske, D.W. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 33(1):589-639.
42. Rao, S., Kang, X., Li, J., Chen, J. 2019. Induction, identification and characterization of tetraploidy in *Lycium ruthenicum*. *Breed. Sci.* 69(1):1-9.
43. Rêgo, M.d., Rêgo, E., Bruckner, C., Finger, F., Otoni, W. 2011. *In vitro* induction of auto tetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. *PCTOC*, 107(3):451-459.
44. Roy, A., Leggett, G., 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.
45. Sabzehzari, M., Hoveidamanesh, S., Modarresi, M., Mohammadi, V. 2019. Morphological, anatomical, physiological, and cytological studies in diploid and tetraploid plants of *Plantago psyllium*. *PCTOC*, 139(1):131-137.
46. Sajjad, Y., Jaskani, M.J., Mehmood, A., Ahmad, I., Abbas, H. 2013. Effect of colchicine on *in vitro* polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). *Pak. J. Bot.* 45(3):1255-1258.
47. Silva, P.A.K.X.d.M., Callegari-Jacques, S., Bodanese-Zanettini, M.H. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. *Ciência Rural*, 30:105-111.
48. Sinski, I., Dal Bosco, D., Pierozzi, N.I., Maia, J.D.G., Ritschel, P.S., Quecini, V. 2014. Improving *in vitro* induction of auto polyploidy in grapevine seedless cultivars. *Euphytica*, 196(2):299-311.
49. Speckmann, G., Post, J., Dijkstra, H. 1965. The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye-grasses. *Euphytica*, 14(3):225-230.
50. Tang, Z.Q., Chen, D.L., Song, Z.J., He, Y.C., Cai, D.T. 2010. *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. *PCTOC*, 102(2):213-220.
51. Tavan, M., Mirjalili, M.H., Karimzadeh, G. 2015. *In vitro* polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *PCTOC*, 122(3):573-583.
52. Udage, A. 2021. Introduction to plant mutation breeding: Different approaches and mutagenic agents. *Journal of Agricultural Sciences-Sri Lanka* 16(03):466-483.
53. Xie, X., Agüero, C.B., Wang, Y., Walker, M.A. 2015. *In vitro* induction of tetraploids in *Vitis* × *Muscadinia* hybrids. *PCTOC*, 122(3):675-683.
54. Xu, C., Huang, Z., Liao, T., Li, Y., Kang, X. 2016. *In vitro* tetraploid plants regeneration from leaf explants of multiple genotypes in *Populus*. *PCTOC*, 125(1):1-9.
55. Yamada, M., Sato, A. 2016. Advances in table grape breeding in Japan. *Breed. Sci.* 66(1):34-45.
56. Yamane, H. 1996. Grape variety developed in Japan. *Nihon Budougaku*, pp:371-383.
57. Yuan, S.X., Liu, Y.-M., Fang, Z.Y., Yang, L.M., Zhuang, M., Zhang, Y.Y., Sun, P.T. 2009. Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in *Brassica oleracea*. *Agric. Sci. China*, 8(8):939-946.
58. Yue, Y., Zhu, Y., Fan, X., Hou, X., Zhao, C., Zhang, S., Wu, J. 2017. Generation of octoploid switchgrass in three cultivars by colchicine treatment. *Ind. Crops Prod.* 107:20-21.
59. Zeng, Q., Liu, Z., Du, K., Kang, X. 2019. Oryzalin-induced chromosome doubling in triploid *Populus* and its effect on plant morphology and anatomy. *PCTOC* 138(3):571-581.
60. Zhou, H.W., Zeng, W.D., Yan, H.B. 2017. *In vitro* induction of tetraploids in cassava variety ‘Xinxuan 048’ using colchicine. *PCTOC*, 128(3):723-729.