

KOTİLEDON AŞAMASINDAKİ M. PALIERİ ÜZÜM ÇEŞİDİNDE KOLHİSİN UYGULAMALARININ MORFOLOJİ VE PLOİDİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Zeliha ORHAN ÖZALP¹, Onur ERGÖNÜL¹, Tamer UYSAL¹, Cengiz ÖZER¹, Metin TUNA², Gülrü YÜCEL³

¹Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, TEKİRDAĞ

²Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, TEKİRDAĞ

³Namık Kemal Üniversitesi, Fen–Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, TEKİRDAĞ

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

ÖZET

Bu çalışma, 2015 yılında Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde çekirdekten yetiştirilen M. Palieri çeşidinde yürütülmüştür. Tetraploid hatların elde edilmesi amacıyla M. Palieri sofralık üzüm çeşidine kolhisin uygulamasının sürgün ucu canlılığına, sürgün uzunluğuna ve ploidi seviyesine etkileri araştırılmıştır. Nisan ayının ilk haftasında çimlenen M. Palieri bitkilerinin ilk gerçek yapraklarının çıktığı dönemde, büyüme ucunun bulunduğu meristematik bölgeye 4 farklı dozda hazırlanmış kolhisin çözeltisi (%0.3, %0.6, %0.9, %1.2) pastör pipet ile birer damla olarak uygulanmıştır. Kontrol bitkilerinde bitkilerin büyüme ucuna saf su damlatılmıştır. Her doz için 3 tekrarlamaya, her tekrarlama 50 bitkiye uygulama yapılmıştır. Uygulama sonrası sürgün uçlarının canlılık oranının %100 olduğu belirlenmiştir. M. Palieri çeşidinde doz arttıkça sürgün uzunluğunda azalma aritmetiksel düzeyde kalmış, fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bitkilerden alınan yaprak örneklerinin flow sitometri incelemeleri sonucunda tüm örneklerde diploid yapının devam ettiği, uygulanan kolhisinin kromozom sayısında değişiklik meydana getirmediği tespit edilmiştir. Örneklerin DNA içeriklerinin 1.00 pg diploid (2n) büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kolhisin, poliploidi, asma, kotiledon

EFFECTS OF COLCHICINE TREATMENTS TO COTYLEDON PLANTS ON MORPHOLOGY AND PLOIDY LEVELS OF M. PALIERI (*Vitis vinifera* L.) GRAPE Cvs.

ABSTRACT

This study was carried out at experimental greenhouse located at Tekirdağ Viticultural Research Institute in 2015. The grape seeds germinated in the first week of April. Four different doses of colchicine solution (0.3%, 0.6%, 0.9%, 1.2%) were dropped to the meristematic region where the growth tip, while the first leaves of M. Palieri were present. In the control plants, pure water is dropped to the growth tips. Colchicine 5 doses (with control) × 3 repetitions × 50 plants and 750 plants were applied. All plants after colchicine treatments were alive. The differences between shoot lengths between colchicine applications were not found significant statistically at the wine of M. Palieri while the length of the shoot decreased with the higher doses of colchicine. According the flow cytometry analyzes of leaf samples, the diploid chromosome number had not been changed with colchicine applications. DNA contents of the samples were determined as 1.00 pg/2C diploid (2n).

Keywords: Colchicine, polyploidy, grape, flow cytometry

GİRİŞ

Özellikle çekirdeksiz sofralık üzüm pazarında söz sahibi olan ülkemizin yeni üzüm çeşitleri geliştirme yönündeki çabalarını sürekli kılması, yeni teknolojileri kullanıma sokması rekabet edebilirliğimiz açısından son derece önemlidir. Stenospermik çeşit eldesine

yönelik olarak yapılan çekirdekli×çekirdeksiz melezlemelerinde elde edilen fertlerin en fazla %30–40'ı çekirdeksiz olmakta, bu popülasyon içerisinde seçim yapma başarı şansını nispeten azaltmaktadır. Embriyo kurtarma tekniğinden yararlanarak çekirdeksiz ebeveynlerin birbiriyle melezlendiği çalışmalarda melez popülasyonun tamamına

yakını çekirdeksiz olmakla birlikte yüksek bitki sayısına ulaşmanın gücünü, ebeveynlerin sınırlı olması seleksiyondaki başarıyı azaltmaktadır. İslah çalışmalarında çekirdeksiz olmakla birlikte iri taneli olan yeni çeşitlerin elde edilmesi önemli hedeflerden biridir.

Asma tür ve çeşitlerinin uzun yıllar vejetatif çoğaltılan popülasyonlar olduğu dikkate alındığında, popülasyon içerisinde yüksek mutasyon birikiminin bulunduğu açıktır. Bununla birlikte, klon düzeyinde yüksek oranda varyasyon gösteren üzüm çeşitlerinde gözlenen bu varyasyonlar, çevre koşullarından kaynaklandığı gibi, kalıcı nitelikte ise somatik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Günümüzde ekonomik öneme sahip birçok üzüm çeşidi, somatik mutasyonların fark edilmesi ve selekte edilmesiyle geliştirilmiştir [10]. Tarımda geçen yetmiş yıl içerisinde 2252 mutant çeşidin elde edildiği resmi olarak kaydedilmiştir [9]. Bu yolla en fazla çeşit üreten ülke Çin (%26.8) olup bu ülkeyi Hindistan, Rusya, Hollanda, Amerika ve Japonya'nın takip ettiği bildirilmiştir [10]. Japonya'da bağcılık araştırma ve geliştirme planları ve devlet politikaları kapsamında asma ıslahı hedeflerinden çekirdeksizlik, tane büyüklüğü, iyi görüntü ve yüksek kalite sofralık çeşitlerde öncelikli çalışmalardandır. Son 50 yıl boyunca Japonya, Çin ve Kore iri taneli çekirdekli ve çekirdeksiz sofralık üzüm ıslahında ilerlemeler göstermiştir. Tane iriliğini tetraploidi sayesinde elde etmişler ve bu şekilde orjinleri 4x×4x melezlemeleri olan Kyoho, Pione, Olimpia, Heukgoosul gibi çekirdekli tetraploid (4x) çeşitler elde etmişlerdir. Bunların diploidlerle melezlenmesi sonucu da triploid (3x) Honey Seedless, King Dela, Mirai gibi çekirdeksiz üzümler meydana gelmiştir. Asya'daki çeşitlerin hemen hemen hepsi triploid ve tetraploiddir. Bunlar *Vitis vinifera* ve *V. labrusca*'dan türemiştir.

Bitkilerde tetraploid gibi ploidi seviyelerinin değiştirilmesi, özellikle süs bitkisi ve yaprağı yenen sebze türlerinde önemli bir ıslah yöntemidir [15]. Tetraploid bitkilerin hücre yapıları diploid bitkilere göre daha büyüktür. Bu nedenle tetraploid bitkilerin bazı vejetatif (gövde uzunluğu, yaprak eni ve boyu, yaprak sayısı) ve çiçek

özelliğinin (çiçek sayısı, stigma uzunluğu, yumurtalık büyüklüğü) diploid bitkilere göre oldukça farklı olduğu bildirilmiştir [5, 19]. Poliploid bitkilerin; gövde, yaprak, çiçek gibi organları diploid olanlara göre daha büyük olup yüzey alanları daha geniştir. Bu bitkiler daha büyük hücrelere ve daha fazla klorofil miktarına sahip olduklarından, koyu yeşil renkleriyle dikkati çekmektedirler. Fotosentez potansiyelleri de diploidlere göre daha fazladır [11, 6].

Yapay olarak bitkilerde kromozom katlama yöntemi ilk kez 1937 yılında Blakes'in bitkilerde kolhisin (*Colchicine*) ($C_{22}H_{25}O_6$) ile yaptığı denemelerde belirlenmiş olup daha sonraları farklı ülkelerde araştırmacılar yapay mutasyon ile poliploidi çalışmaya devam etmişlerdir (Dermen, 1954). 1950'li yıllarda kolhisin kullanılarak bitkilerde sitokimeralar (kromozom sayısı katlanmış ve katlanmamış hücreler veya farklı ploidi seviyesindeki hücreler içeren doku, organ veya bitkiler) elde edilmiştir [4]. Kolhisin, güz çiğdeminin (*Colchicum autumnale* L.) köklerinden elde edilen alkaloid yapısında kuvvetli bir zehir olup; renksiz, alkol, kloroform ve soğuk suda eriyen; sıcak suda ve eterde erimeyen bir maddedir. Kolhisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısı ile replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar [7]. Kolhisin uygulaması ile suni olarak autotetraploid *Brassica* formları oluşturulabilmektedir. Bu formlar autopoloidy, allopoloidy ve amfiploidinin gen düzenlenmesi ve ekspresyonu konularını araştırmak için kullanılabilir [17].

Asmada değişik yollarla elde edilebilen poliploid bitkilerin gövdelerinin daha kalın, yapraklarının geniş ve koyu renkli, köklerinin ise güçlü ve diploidlere göre daha geniş yayılım gösterdiği, çiçek, polen ve tohumlarının ise diploidlere göre daha iri olduğu saptanmıştır [12]. Üzüm sıra içeriklerinin de diploidlerle karşılaştırıldığında, daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Tetraploid çeşitler, tane ve salkım iriliğinin yüksekliğinden dolayı [8, 14]. Üzüm ıslahında önemli yer tutmaktadır. Tetraploid sofralık üzüm çeşitlerinin yetiştiriciliği özellikle

Japonya’da yoğun olarak yapılmaktadır. Bu ülkede *Vitis vinifera* × *V. labrusca* Bailey melezlenmesi sonucu oluşan Kyoho ve Pione çeşitleri toplam bağ alanlarının %40’ını kaplamaktadır [12]. Ancak mevcut tetraploid çeşitlerin verimlerinin düşüklüğü, zayıf gelişimi ve sürgünlerinin kırılğan olması nedeniyle mevcut tetraploid çeşitlerden farklı olarak yeni tetraploid çeşitlerin ıslahına yönelim bulunmaktadır. Aki Queen (Kyoho × Kyoho), Fujiminori (Ikawa 682 × Pione), çeşitleri de bu ülkede ıslah edilen diğer yeni tetraploid çeşitlerdendir. Tetraploid üzüm ıslahına yönelik çalışmaların Çin, Japonya ve Amerika’da yoğunlaştığı ve daha çok uygun kolhisin dozu ve süresinin incelendiği saptanmıştır [20, 8, 14, 13, 12, 1].

Bu çalışmada, çekirdeksiz iri taneli üzüm eldesinde ülkemiz ve dünya için yeni bir metot olan poliploidi ıslahının ilk aşaması olan tetraploid hatların elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kromozom katlamada kolhisin çözeltisi kullanılarak M. Palieri üzüm çeşidinde kotiledon aşamasındaki bitkilerde tetraploid bitki oluşturulması için en uygun kolhisin dozu, uygulama süresi ve şekli belirlenmeye çalışılmıştır. Bitkilerin ploidi seviyeleri flow sitometri analiz yöntemi ile belirlenmiştir. Tetraploid bitki teşhisinde morfolojik gözlemlerden de yararlanılmıştır. Poliploidi, üzümlerin daha iri taneli olmasını sağlayabilmekte, triploidi ise çekirdeksizliği sağlamaktadır. Tetraploidi stenospermik bir genotipte sağlandığında bu genotipin melezlemelerde kullanılmasıyla elde edilen yeni fertlerde çekirdeksizlik oranı çok daha yüksek olacaktır. Doğal olarak elde edilen daha iri taneli yeni çeşitler, hormon kullanımının azaltılmasını da sağlayacaktır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, 2015 yılında Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Araştırma ve Uygulama Serasında gerçekleştirilmiştir. Flow sitometri analizleri ise Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında yürütülmüştür.

Materyal

Projede materyal olarak M. Palieri üzüm çeşidi kullanılmıştır. “M. Palieri”, M. Palieri tarafından İtalya’da A. Lavallée × Red Malaga melezi olarak ıslah edilmiş sofralık bir çeşittir. Tane özellikleri bakımından; morumsu–siyah renkli, oval şekilli ve çok iridir. Salkım özellikleri yönünden; konik–silindirik şekilli, dolgun sıklıkta ve iridir. Ülkemiz için yeni bir çeşit olup, son yıllarda yetiştiriciliğine yoğun ilgi gösterilmektedir (Çelik, 2006).

Metot

Kotiledon aşamasındaki bitkilere kolhisin uygulaması için M. Palieri çeşidinde olgun salkımlar 2014 yılı Ağustos ayında hasat edilmiştir. Çekirdekler çıkarılıp yıkandıktan ve kurulandıktan sonra ekim zamanına (Şubat ayı) kadar 0–5°C’de muhafaza edilmiştir. Çekirdekler, 2015 yılı Şubat ayında bir gün suda bekletilmiş ve ardından 2:1 oranında torf: perlit karışımı bulunan 77’lik viyollere ekilmiştir. Bitkilerin düzenli olarak sulanması ve bakımı gerçekleştirilmiştir.

Kolhisin uygulaması

Asma çekirdeklerinin çimlenmesi Nisan ayında olmuştur. Nisan ayının ilk haftasında çimlenen M. Palieri bitkilerinin ilk gerçek yapraklarının çıktığı dönemde, büyüme ucunun bulunduğu meristematik bölgeye 4 farklı dozda hazırlanmış kolhisin çözeltisi (%0.3, %0.6, %0.9, %1.2) pastör pipet ile birer damla olarak uygulanmıştır (Şekil 1). Kontrol bitkilerinde bitkilerin büyüme ucuna saf su damlatılmıştır. Her doz için 3 tekrarlama, her tekrarlama 50 bitkiye uygulama yapılmıştır. Kolhisin 5 doz (kontrolle birlikte) × 3 tekrar × 50 bitki ile 750 bitkiye uygulanmıştır (Çizelge 1).

Canlılık oranı (%)

Farklı dozlardaki kolhisin çözeltisinin uygulanması sonrası canlılığına devam eden bitkilerin toplam uygulama yapılan bitki sayısına oranlanması ve bu değer 100 ile çarpılması ile elde edilmiştir.



Şekil 1. Kotiledon aşamasında bitkilere kolhisin uygulaması
Figure 1. Application of colchicine to plants in cotyledon stage

Sürgün uzunluğu (cm)

Çalışmada *in vivo* kolhisin uygulamalarındaki bitkilerde, vejetasyon sonunda şerit metre ile kolhisin uygulanan yerin üzerinden işaretli yerden ‘cm’ cinsinden ölçülmüştür.

Flow sitometri yoluyla ploidi analizi

Analizlerde Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarı’nda bulunan Partec Flow Cytometry (Germany) cihazı kullanılmıştır.

Örneklerin hazırlanması (Partec Protokolü) Tuna, 2014’e [18] göre yapılmıştır. Ploidi analizinin yapılabilmesi için 0.5 cm² büyüklüğünde asma yaprağı alınarak petri kabına yerleştirmiştir. Üzerine 400 µl izolasyon buffer (Partec–Nuclei Extraction Buffer) ilave edilerek yaprak dokusu keskin jilet ile 30–60 saniye süresince mekanik olarak küçük parçalara ayrılana kadar parçalanmıştır. Hazırlanmış örnekler petri kabı içerisinde 10–15 saniye çalkalanmıştır. Bu işleminden sonra örnekler Partec–CellTrics 30 µm–green filtre ile süzülerek tüp içerisine

(Partec–Sample Tubes, 3.5 ml, 55×12 mm) transfer edilmiştir. Çalışmada floresan boya olarak DAPI (4,6 diamidino–2–phenylino) kullanılmıştır. Tüplere 1600 µl boyama solüsyonu (Partec–DAPI (4,6 diamidino–2–phenylino) Staining Buffer) ilave edilerek strafor kutularda ışıksız bir ortamda bekletilmiştir. Çalışmanın bitiminde örneklerin DNA içerikleri hesaplanmıştır.

Kolhisin uygulanan bitkilerin DNA içeriğinin belirlenmesi için bitkiler, DNA içeriği bilinen standart bitki ile kıyaslanmıştır. Çalışmada standart bitki olarak domates (*Lycopersicon esculentum*) kullanılmıştır. Asmanın (*Vitis vinifera* L.) genomu ile ilgili bilgiler incelendiğinde asma genomunun 1.00 pga/2C DNA içeriğine sahip olduğu saptanmıştır. Domatesin DNA içeriği 1.88–2.07 pga/2C olarak tespit edilmiştir.

Asmanın DNA içeriği, asma ile seçilen standart domates bitkisinin G1 piklerinin floresan yoğunluklarına ait değerler kullanılarak aşağıdaki formül aracılığıyla pikogram olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Çekirdek DNA içeriği} = \frac{\text{Bilinmeyen örneğin (asma) floresan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}}{\text{Standartın (domates) floresan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}} \times \text{Standartın pikogram olarak bilinen DNA içeriği}$$

İstatistiksel Değerlendirme

Yapılan çalışmada tesadüf parselleri deneme deseni kullanılmıştır. Elde edilen veriler JMP istatistiksel programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuştur. Uygulamalar arasındaki farklılık önemli bulunduğu LSD testi ile gruplandırma yapılmıştır.

Çizelge 1. M. Palieri çeşidinde kotiledon aşamasında bitkilere uygulanan kolhisin doz ve süreleri

Table 1. Colchicine doses and durations applied to plants during the cotyledon stage in M. Palieri variety

Çeşitler Varieties	Uygulama dozu Treatment doses	Uygulama yapılan materyal sayısı Treatment number of materials
M. Palieri	%0	3×50=150
	%0.3	3×50=150
	%0.6	3×50=150
	%0.9	3×50=150
	%1.2	3×50=150
	Toplam / Total	750

BULGULAR VE TARTIŞMA

In vivo kotiledon aşamasındaki bitkilere kolhisin uygulamalarında sürgün ucu canlılık oranı (%)

M. Palieri çekirdeklerinin çimlendirilmesi ile elde edilen bitkilerde farklı dozlardaki kolhisinin (%0.3, %0.6, %0.9, %1.2) kotiledon aşamasında büyüme ucu meristem bölgesine pipetle birer damla damlatılarak uygulama yapılan bitkilerde canlılık oranı %100 olarak tespit edilmiştir.

In vivo kotiledon aşamasında bitkilere kolhisin uygulamaları sonucu bitki boyu ölçümleri

Kotiledon aşamasında bitkilere kolhisin uygulamaları sonucu bitki boyu ölçümleri, 2015 yılı vejetasyon dönemi bitiminde Ekim ayının sonunda şerit metre ile ölçülmüştür. Kolhisin kimyasalının farklı dozlarından etkilenmeyen M. Palieri çeşidinin genç bitki boyları (cm) ölçümlerinden elde edilen veriler Çizelge 2’de sunulmuştur. Fidan boyu, aritmetiksel ortalama olarak en kısa %0.6 dozunda (10.53 cm) iken, en uzun kontrol uygulamasında (15.06 cm) olmuştur. Fidan boyu uzunluğu ölçümlerinde uygulanan doz arttıkça sürgün uzunluğunda azalma aritmetiksel düzeyde kalmış, fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

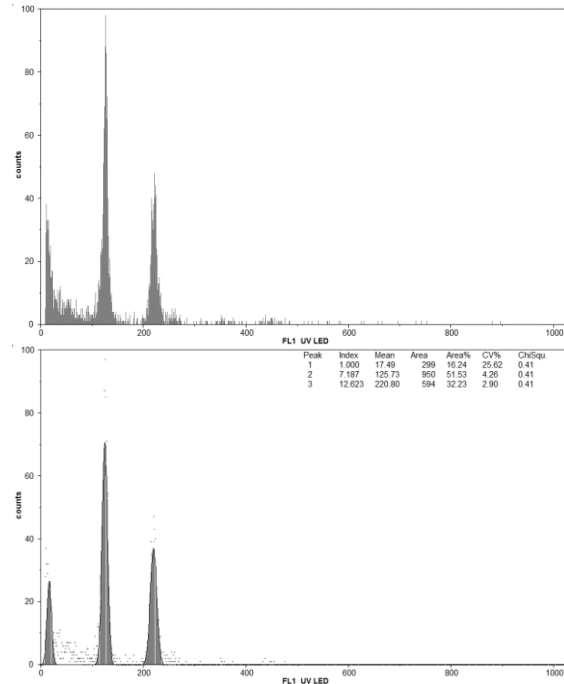
Ham veriler incelendiğinde, uygulamaların aritmetik ortalamasında uygulamalar arasında farklılık görülmekle birlikte her tekerrür de aynı eğilim sağlanamadığı için istatistiksel analiz tekniğinden dolayı farklılıklar istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. Diploid ve tetraploid bitkilerin karşılaştırıldığı çalışmalarda, tetraploid *Vitis labruscana* asmalarının diploid çeşitlere göre daha kısa sürgün ve kök uzunluğuna sahip olduğu bildirilmiştir [16]. Yapılan başka bir çalışmada, diploid ve kolhisin uygulamasıyla elde edilen tetraploid asma anaçlarının büyüme özelliklerini karşılaştırılmıştır [12]. Köklendirme ortamına konulan tetraploid bitkilerin diploidlere göre köklerinin daha kısa; Gloire ve St George anacının tetraploid olanlarında ise sürgünlerin diploidlere göre daha kısa olduğu saptanmıştır. Trakya İlkeren ve Flame Seedless üzüm çeşitlerinde CO⁶⁰ ve kolhisin kullanılarak mutasyon ve poliploidi oluşturma olanaklarının araştırıldığı

çalışmada, sürgün uzunluğu bakımından kontrol uygulamasına kıyasla en düşük sürgün uzunluk değeri Trakya İlkeren çeşidinde %0.75’lik kolhisin dozunun 5 gün süreyle uygulanmasından (10.8 cm) elde edilirken Flame Seedless çeşidinde %0.5 kolhisin dozunun 5 gün süreyle uygulanmasından (76.7 cm) sağlanmıştır [2].

Çizelge 2. M. Palieri çeşidinde kotiledon aşamasındaki bitkilere kolhisin uygulamasının bitki boyu üzerine etkisi
Table 2. Effect of plant application of colchicine application on the vegetative stage of *M. palieri* (cm)

Dozlar / Doses	Ortalama / Average
Kontrol (%0) / Control	15.06
%0.3	12.23
%0.6	10.53
%0.9	11.83
%1.2	10.86
LSD %5 (doz):Ö.D. NS	

Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (LSD) Ö.D.: Önemli değil
Mean separation within columns by LSD multiple test at, 0.05 level N.S.: Nonsignificant



Şekil 2. M. Palieri çeşidinde kolhisin uygulaması sonucu elde edilen diploid (2x) örnek histogramı

Figure 2. A diploid (2x) sample graph obtained after the treatment of colchicine in the *M. palieri* variety

In vivo kotiledon aşamasındaki bitkilere kolhisin uygulamaları sonrası flow sitometri analizi

M. Palieri çeşidinde kolhisin uygulanması sonucu gelişme gösteren bitkilerde, flow sitometri sonucu hesaplanan DNA içeriklerinin 1.00 pg diploid (2n) asma büyüklüğünde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).

Kolhisin uygulama şekli ve dozları ploidi seviyesinde değişiklik meydana getirmemiştir. Kotiledon aşamasındaki bitkilerde kolhisin uygulamaları için benzer bir çalışma, Yamane ve Kurihara [20] tarafından Muscat Bailey B× Muscat of Alexandria, Neo Muscat çöğürleri ve Kosu Sanzyaku çeşitlerinde yapılmıştır. Kotiledon safhasında %0.2 kolhisin uygulamasıyla çok az miktarda tetraploid oluşumu sağlanmıştır. Araştırmada Neo Muscat çeşidinden elde edilen tetraploid bitkilerin 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 miktarda olduğu tespit edilmiştir.

SONUÇ

In vivo kotiledon aşamasındaki M. Palieri çeşidine 4 farklı dozda (%0.3, %0.6, %0.9, %1.2) kolhisin uygulaması sonrası bitki boyları kontrole göre azalmıştır. Bu çeşitte aritmetiksel ortalama olarak en kısa bitki boyu %0.6 dozunda (10.53 cm) iken kontrol uygulamasında en uzun olarak (15.06 cm) tespit edilmiştir. Uygulanan doz arttıkça sürgün uzunluğunda azalma aritmetiksel düzeyde kalmıştır. Kotiledon aşamasındaki bitkilere kolhisin uygulamaları yoluyla tetraploid bitki eldesi çalışmaları genellikle tek yıllık bitkilerde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada asma bitkisi için bu yöntemin uygulanabilirliği test edilmiştir. Flow sitometri analiz sonuçları çalışılan dozların genetik yapıda değişiklik için yetersiz olduğunu göstermiştir. *In vivo* çalışmalarda doz ve süre artışı ile birlikte farklı uygulama yöntemleri denenerek aktif maddenin kaybını önleyici tedbirler konusunda iyileştirmeler yapılması gerekebilir.

Bu projede uygulanan yöntemlerin asma ıslahında ender yapılan çalışmalardan biri

olması önem arz etmektedir. Asma ıslah programlarında yeni çeşitlerin geliştirilmesinde somatik mutasyonu uyuracak bu tip çalışmalara önem verilmelidir. Günümüzde sofralık üzüm ıslahında en önemli iki hedef olan çekirdeksizlik ve iri taneli yeni çeşitlerin eldesinde etkili olarak kullanılabilecek olan bu yöntem ile ilgili araştırmalara devam edilmesi büyük önem taşımaktadır. Çalışmadan elde edilen veri, bilgi birikimi ve edinimler ile hem proje personeline hem de bu konuda çalışacak diğer akademisyen ve araştırmacılara fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Aı Hong, M., Pei Ge, F., Jian She, S., Shao Hua, L., 2005. Study on the Induction of Tetraploid Grapes. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(8):1645–1651.
2. Bilir, E.H., 2010. Trakya İlkeren ve Flama Seedless Üzüm Çeşitlerinde CO⁶⁰ ve Kolhisin Kullanılarak Mutasyon ve Poliploidi Oluşturma Olanakları (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi, Adana.
3. Dermen, H., 1954. Colchicoidy in grape. *J. Hered*, 45:159–172.
4. Elliott, F.C., 1958. *Plant Breeding and Cytogenetics*. McGraw–Hill Book Company, Inc. p.395.
5. El–Morsy, Sh. I., Dorra, M.D.M., Abd El–Hady, E.A.A., Hiaba, A.A.A., Mohammed, A.Y., 2009. Comparativen Studies on Diploid and Tetraploid Levels of Nicotiana alata. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2(3):182–188.
6. İlarslan, İ. H., 1990. Diploid ve Tetraploid Çavdar (*Secale cereale* L.) Bitkisinin Morfolojik, Sitolojik ve Palinolojik Yapılarının Karşılaştırılması (Doktora Tezi). Ankara Ü. Fen Bilimleri Enst., 92s.
7. Köksal, N., 1999. Haploid Kavun Bitkilerinde *in vivo* ve *in vitro* Yöntemlerle Dihaploidizasyon (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi Fen Bil. Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 116s.
8. Luo, Y.W., Qaco, Z.J., Zhu, Z.Y., Huangpu, Z.S., 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.

9. Maluszynski, M., 2001. Officially Released Mutant Varieties the FAO/IAEA Database, Plant Tissue and Organ Culture 65:175–177.
10. Marasalı Kunter, B., Karataş, D.D., 2011. Asmalarda Mutasyonlar ve Mutant *Vitis vinifera* L. Çeşitleri. YYÜ Tar. Bil. Derg. 21(2):146–151.
11. Molin, W.T., Mayers, S.P., Baer, G.R., Schrader, L.E., 1982. Ploidy Effects in Isogenic Populations of Alfalfa. 2. Photosynthesis Chloroplast Number, Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase, Chlorophyll, and DNA in Protoplasts, Plant Physiol. 70:1710–1714.
12. Motosugi, H., Okudo, K., Kataoka, D., Naruo, T., 2002. B. Comparison of Growth Characteristics between Diploid and Colchicine-Induced Tetraploid Grape Rootstocks. J. of the Japanese Society for Horticultural Science 71(3):335–341.
13. Motosugi, H., Motioko, R., 2001. Tetraploid Breeding of Wild Grapes Native to Japan. American Journal of Enology and Viticulture 52(3):282–285.
14. Notsuka, K., Tsuru, T., Shiraishi, M., 2000. Induced Polyploid Grapes Via *in vitro* Chromosome Doubling. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 69(5):543–551.
15. Petersen, K., Hagberg, P., Kristiansen, K., 2003. Colchicine and Oryzalin Mediated Chromosome Doubling in Different Genotypes of Miscanthus Sinensis. Journal of Plant Sciences 73(2):137–146.
16. Rose, J.B., Kubba, J., Tobutt, K.R., 2000. Induction of Tetraploidy in Buuleia Globosa. Plant Cell Tissue and Organ Culture 63:121–125.
17. Snowdon, R.J., 2009. Genome Analysis and Molecular Breeding of Brassica Oilseed Crops. Habilitationsschrift, Institut für Pflanzenzüchtung. Justus–Liebig–Universitaet Giessen.
18. Tuna, M., 2014. Flow Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı Çalıştayı. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 16–17.01.2014, Tekirdağ.
19. Vainola, A., 2000. Polyploidization and Early Screening of Rhododendron Hybrids. Euphytica, 112(3):239–244.
20. Yamane, H., Kurihara, A., 1980. Studies on Polyploidy Breeding in Grapes, 2. Polyploid Induction by Colchicine Application, Bulletin of the Fruit Tree Research Station, E (Kaju Shikenjo Hokoku, E) 3:1–13.