

Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik Karası Üzüm Çeşitlerinde Uyarılmış Mutasyon Etkilerinin Sitolojik İncelenmesi

Dilek DEĞİRMENCİ KARATAŞ^{*1}, Birhan KUNTER²

¹Dicle University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Diyarbakır

²Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Ankara

*e-mail: degirmencidilek@yahoo.com

Geliş Tarihi: 17.02.2012, Kabul Tarihi: 17.09.2012

Özet: Bu araştırmada, Sultani Çekirdeksiz (SÇ) ve Kalecik karası (KK) üzüm çeşitlerinde 5 farklı dozda (20, 25, 30, 40 ve 45 Gy) gama radyasyonu uygulamaları ile uyarılmış mutasyon etkileri sitolojik olarak incelenmiştir. Her iki çeşide ait populasyon içerisinde, mutasyon etkilerinin oluşturduğu fenotipik değişimler, birinci (M1V1), ikinci (M1V2) ve üçüncü (M1V3) vejetasyonlarda morfolojik gözlemlerle belirlenmiştir. Sitogenetik çalışmalarda her iki çeşitte, diploid (2x) yapılı hücreler gözlenmiştir. Sadece SÇ 30Gy 34 nolu bireyde 2n diploid kromozom yapısından farklı olarak ploid yapılı hücre yapısı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., gama radyasyonu, sitoloji, kromozom.

Cytologic Investigations on Identification of Induced Mutation Effects in Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik Karası Grape cvs. (*Vitis vinifera* L.)

Abstract: The effects of induced mutation applied by 5 different doses of gamma irradiation (20, 25, 30, 40 ve 50 Gy) were cytologic investigated on *Vitis vinifera* L. cultivars, Sultani Çekirdeksiz (SÇ) ve Kalecik karası (KK). Mutant candidates were selected through the morphological observations of the mutation-induced phenotypic changes in the first (M1V1), second (M1V2) and third (M1V3) vegetations. In cytological studies, diploid cells (2n=38) were observed for both cultivars. Cells showing ploidy level other than diploidy were found only in the individual SÇ 30 Gy 34.

Key Words: *Vitis vinifera* L., gamma radiation, cytology, chromosome.

* This study is a part of the PhD thesis of the first author.

Giriş

Asmalarda kromozomların son derece küçük olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar kromozomların karyotip analizleri üzerine yapmış oldukları çalışmalar sonucunda üzerinde çalıştıkları çeşitlere bağlı olarak ortalama kromozom uzunluğunu 0.5-2.450 mikron arasında değiştiğini belirtmişlerdir (Ghimpu 1929, Shetty 1958, Raj ve Seethaiah 1968, Patil ve Jadhav 1985, Patil ve Patil 1992). Asma kromozomlarının son derece küçük yapıya sahip olması nedeniyle oldukça az sayıda kromozom morfolojisine yönelik çalışma bulunmaktadır.

Mutasyon ıslahına yönelik çalışmalarda, mutagenik uygulamaların etkileri sitolojik olarak incelenmektedir. Radyasyonun bitkilerdeki öldürücü etkisi genellikle hücre bölünmesinin inhibe edilmesi olayı sonucu ortaya çıkmaktadır. Asmalarda mutasyonların uyarılması ile elde edilen başarılı sonuçların mutant bitkilerin seçimi aşamasında da sürdürülmesi gerekmektedir. Bu aşamada, *Vitis* türlerinin yüksek kromozom sayısı ile birlikte son derece küçük kromozomlara sahip olması, aşılması gereken teknik bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (Skene ve ark. 1988, Park ve ark. 2002). Asma kromozomlarının son derece küçük yapıya sahip olması nedeniyle oldukça az sayıda kromozom morfolojisine yönelik çalışma bulunmaktadır. Mutagen etkilerinin araştırıldığı sitolojik çalışmalarda, kimerik, diploid ve ploid hücre yapıları gözlenmiştir (Thompson ve Olmo 1963, Patil ve Jadhav 1985, Skene ve ark. 1988, Patil ve Patil 1992, Yadav ve Grumet 1994, Viljoen ve Spies 1995).

Radyasyon uygulamaları ile elde edilen popülasyondaki varyasyonlarda sitogenetik karakterizasyon çalışmaları önem kazanmaktadır. Bu kapsamda araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda; bir mutantın sitokimerik (poliplod) yapısının; stoma büyüklüğü, tane büyüklüğü, tohum büyüklüğü ve kromozom sayısı ile doğrudan ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Sacerdote ve ark. 1981, Kuksova ve ark. 1997, Fanizza ve ark. 2003).

Bu araştırmada, Sultani Çekirdeksiz (SÇ) ve Kalecik karası (KK) üzüm çeşitlerinde 5 farklı dozda (20, 25, 30, 40 ve 45 Gy) gama radyasyonu (Co^{60}) uygulamaları ile uyarılmış mutasyon etkileri sitolojik olarak incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinde popülasyon içerisinde varyasyonu arttırmak amacıyla gama radyasyonu uygulanmıştır. Bu amaçla araştırma materyalleri, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK), Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde bulunan Co^{60} gama kaynağında ışınlanmıştır. Gama radyasyonu uygulamalarında beş farklı doz (20, 25, 30, 40 ve 45 Gray) kullanılmıştır. Her radyasyon dozu için 100 adet olmak üzere, iki çeşitte toplam 1000 adet tek gözlü çelik ışınlanmıştır. Her radyasyon dozu için 100 adet olmak üzere, iki çeşitte toplam 1000 adet tek gözlü çelik ışınlanmıştır. Gama radyasyonu uygulamalarının ardından çevresel ve radyasyon etkisinin oluşturduğu fizyolojik zararlanma nedeni ile ortaya çıkan kayıplar sonucu araştırma parseline dikilen ve başlangıç popülasyonunu oluşturan toplam birey sayısı Sultani Çekirdeksiz için 207 adet, Kalecik karası için 315 adet olmuştur. Mutant koleksiyon parseline aktarılan bitkilerde, ışınlamayı izleyen birinci (M1V1), ikinci (M1V2) ve üçüncü vejetasyon (M1V3) dönemlerinde, toprak üstü organlarında çıplak gözle görülebilen bazı

vejetatif özellikler dikkate alınmış ve kontrol bitkileri ile karşılaştırmalı olarak morfolojik değişimler incelenmişlerdir.

Fenotipik gözlem sonuçlarına göre, kontrol bitkilerinden farklı bulunan ve iki vejetasyon (M1V1 ve M1V2), vejetasyonda yapılan morfolojik gözlemler sonucu kuvvetli gelişme ile beraber iri yaprak gelişimine sahip bireylerde ploidy seviyesinin araştırılması amacıyla her iki çeşide ait seçekte edilen aday bireylerde mitoz bölünmede kromozom yapıları ve dağılımları incelenmiştir. Sultani Çekirdeksiz’de 26 adet, Kalecik karası’nda 18 adet birey seçilerek, gama radyasyonunun kromozom sayısı bakımından oluşturabileceği etkiler sitolojik olarak incelenmiştir.

Sitolojik incelemelerde kromozom dağılımı ve sayısı incelenmiştir. Kromozomlar kök uçlarında incelenmiştir. Kromozom sayımı için, mitoz bölünmenin metafaz safhasında sayılabilir nitelikte kromozomların gözlenebileceği bir yöntemin belirlenmesi esastır. Asmalarda kromozom boyutları oldukça küçük (0.5-2.450 mikron) olması nedeniyle kromozom çalışmaları büyük güçlükle yapılabilmektedir. Çok küçük yapıları kromozomların eldesi için çalışmalar hassasiyetle sürdürülmüştür. Kromozomların metafaz safhasında görüntülenebilmesi için kök uçlarının alınma zamanı büyük önem taşımaktadır. Mikroskopik incelemelerde çeşitli araştırmacılar (Patil ve Jadhav 1985, Patil ve Patil 1992, Yamashita ve ark. 1998, Park ve ark. 1999) tarafından da mitoz bölünmenin en yoğun olarak gözlenebildiği zaman olarak önerilen, sabah saat 10:30-11:00 arasındaki örneklemenin en uygun zaman olduğu saptanmıştır. Sitolojik incelemelerde ön deneme çalışmaları sonucunda uygulama kolaylığı ve başarılı sonuçların elde edilmesi nedeniyle Kuksova ve ark. (1997) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek sitolojik çalışmalar sürdürülmüştür. Sitolojik çalışmalarda izlenen yöntem aşamaları ile aşağıda verilmiştir.

- Kök örnekleri 10:30-11:00 arasında alınmıştır.
- Ön işlem uygulaması olarak 2 saat süreyle kök örnekleri % 0.03 kolkisin’de bekletilmiştir.
- Tespit için Carnoy çözeltisi kullanılmıştır. Kökler +4°C’de 4-5 saat bekletilerek tespit edilmiştir.
- Hidroliz, 1 N HCl içerisinde 60 °C’de 15 dakika süre ile yapılmıştır.
- Boyama, % 2’lik asetoorsein ile kökün yapısına bağlı olarak 1 veya 2 gün süreyle bekletilme şeklinde uygulanmıştır.
- 1-2 mm’lik boyanmış kök uçlarında 1 damla asetik asit (% 45) yardımıyla ezme yöntemiyle preparat yapılmıştır.

Mikroskop İncelemeleri ve Devamlı Preparatların Hazırlanması

Ezme preparatlar Zeiss Axiolab mikroskop ile incelenmiş ve mikrofotografaları çekilmiştir. Mikroskopta fotoğraflanacak olan preparatlar devamlı hale getirilmişlerdir. Devamlı preparatlar sıvı azot tekniği kullanılarak hazırlanmıştır (Yüzbasioğlu vd. 1997).

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

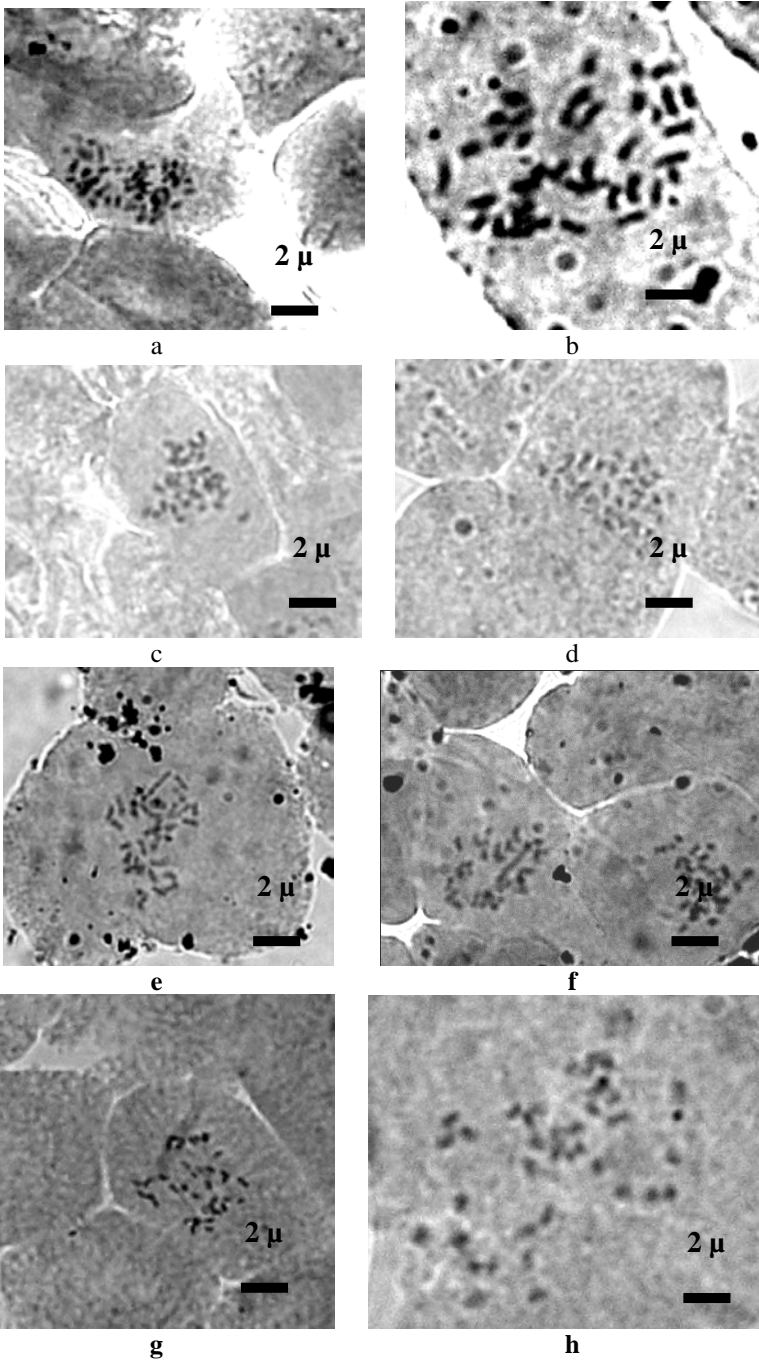
Sitolojik incelemelerde, gama radyasyonu uygulamalarını izleyen ikinci ve üçüncü vejetasyonda yapılan morfolojik gözlemler sonucu, kuvvetli gelişme ile beraber iri yaprak gelişimine sahip bireylerde ploidy seviyesinin araştırılması amacıyla her iki çeşide ait

selekte edilen aday bireylerde mitoz bölünmede kromozom yapıları ve dağılımları incelenmiştir. Sitogenetik çalışmalarda kimerik (2x-4x), tam mutant diploid (2x), veya tetraploid (4x) yapıların tanımlanmasına yönelik çalışılmıştır.

Genel olarak değerlendirildiğinde mutasyonların seleksiyonu, mutasyon ıslahının en zor aşamasıdır. Gen ve kromozom mutasyonları kalıcı genetik değişiklikler olup M1V1 generasyonundan diğer generasyonlara aktarılabilmektedir. Bu nedenle ikinci vejetasyondan (M1V2) itibaren gözlemler önem kazanmaktadır. Mutasyonla morfolojik değişimleri büyük ölçüde etkileyen; büyüme gücü, büyüme tipi, yaprak şekli, yaprak rengi gibi özellikleri tanımlamak güç olmamakla beraber, kalıcı nitelik taşıyanların seleksiyonu önemli aşamayı oluşturmuştur. Bitkilerin vejetatif organlarında meydana gelen bir diğer önemli değişim, yapraklarda şekil anormalliklerinin oluşmasıdır. Şekil anormallikleri bakımından, yapraklarda dilim yapısı ve şeklinin değişmesi, yaprak ayasının dalgalı ve sert bir yapı kazanması ve iri yaprak oluşumunun gerçekleşmesi gibi özellikler gözlenmiştir. Körösi ve ark. (1995), Çoban (1998) ve Sangsiri ve ark. (2005)'da mutagen uygulamaları sonucunda iri yaprak oluşumu ve yaprak ayasında sert yapılanmanın meydana geldiğini bildirilmektedirler. Bu çalışma kapsamında Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşidine ait mutant adayı bireylerde yapılan morfolojik gözlemler sonucu iki yıl (M1V1-M1V2) boyunca tekrar eden özellikleri taşıyan bireyler sitolojik incelemelerde kullanılmıştır. *Vitis vinifera* L.'nin kromozom yapısının oldukça küçük olması, sayıca fazla olması (2n=38) ve sitoplazmanın yoğun yapısı kromozom çalışmalarını güçleştiren en önemli faktörlerdir (Thompson ve Olmo 1963, Patil ve Patil 1992, Viljoen ve Spies 1995, Haas ve Alleweldt 2000). Sitolojik incelemelerde özellikle sitoplazmanın içerdiği yoğun alkaloidler kromozom görüntülerinin elde edilmesinde büyük sorun oluşturmaktadır. Ezme preparasyon sırasında, metafaz safhasında bir düzlem üzerinde, sayılabilir nitelikte net bir kromozom dağılımının gözlenmesi tüm bu nedenlerden dolayı oldukça güç olmuştur.

Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası mutant adaylarının diploid ve ploid mutant olma özellikleri kromozom sayımları yapılarak incelenmiştir. Ploid bireylere ulaşma oranını arttırmak amacıyla her iki çeşitte genel ortalamanın üzerinde çok kuvvetli gelişme eğiliminde olan ve çok iri yaprak oluşturmaları ile farklı bulunan bireyler seçilerek kromozom sayımları yapılmıştır. Buna göre, Sultani Çekirdeksiz'e ait 26, Kalecik karası üzüm çeşidinde ise 18 adet mutant adayı birey üzerinde sitolojik incelemeler yapılmıştır.

Sitolojik çalışmalar sonucunda, Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sadece SÇ 30 Gy 34 no'lu birey, 2n=2x=38 kromozom sayısından daha fazla ancak sayılmayan nitelikte ploid kromozom sayısı bulunan tek genotip olarak önem kazanmıştır (Şekil 1). Kalecik karası üzüm çeşidinde ise seçilen bireylerin tümünde yapılan sitolojik incelemeler sonucunda diploid (2x) yapılu hücreler gözlenmiştir (Şekil 1). Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası mutant adayı bireylerinden elde edilen kromozom sayısını gösteren mikrofotograflar Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. a:Ploid yapılı (>2x) kromozom görüntüsü (SÇ 30Gy 34), Diploid (2n) yapılı hücre görüntüleri: b: SÇ 30Gy 35, c: SÇ 25Gy 17, d: SÇ 30Gy 3, e: KK25Gy 60, f:KK 25Gy 58; g: SÇ 30Gy 33; h:KK30Gy 7

Teşekkür

Doktora tezi kapsamında sitolojik çalışmaların yürütüldüğü aşama “Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik Karası Üzüm Çeşitlerinde Uyarılmış Mutasyon Etkilerinin Sitogenetik Tanımlanması” TOGTAG 3091 nolu proje ile TÜBİTAK tarafından desteklendiği için teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Çoban H (1998). Investigations on the variations caused by gamma-rays originating from Co⁶⁰ treated to Round Seedless grape variety in different doses, Ege Üniv. Fen Bilimleri Ens. Doktora tezi. Bornova, İzmir.
- Fanizza F, Chaabane R, Ricciardi L & Resta P (2003). Analysis of a spontaneous mutant ve selected clones of cv. Italia (*Vitis vinifera*) by AFLP markers. *Vitis*, 42 (1), 27-30.
- Ghimpu MV (1929). Sur les chromosomes de *Vitis*. *Medicago et Hordeum*. Comp. R. de I ssoc. des Anat. 111-114.
- Haas HU, Alleweldt G (2000). The karyotype of grapevine (*Vitis vinifera* L.). VII. Int. Sym. on Grapevine Genetics ve Breeding. *Acta Horticulturae*, 528, 247-250.
- Körösi F, Hajdu E, Jezeierska SE. 1995. Emperical modelling of radiosensitivity of some grape clone to X-ray irradiation. I. Int. Sym. On Agric. ve Bio-Industries, Brussels (Belgium), 1-8.
- Kuksova VB, Pieven NM & Gleba YYU (1997). Somaclonal variation ve *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell Tissue ve Organ Culture* 49: 17-27.
- Park SM, Wakana A, Hiramatsu M. & Uresino K (2002). A tetraploid hybrid plant from 4x X 2x crosses in *Vitis* ve its origin. *Euphytica*, 126; 345-353.
- Patil SG & Patil VP (1992). Karyomorphology of *Vitis vinifera*, *V. rotundifolia* ve their hybrid. *Cytologia* 57; 91-95.
- Patil VP & Jadhav AS (1985). Karyomorphology of three varieties of *Vitis vinifera*. *Cytologia* 50; 83-88.
- Raj AS & Seethaiah L (1968). Karyotype analysis ve meiotic studies in three varieties of grape (*Vitis vinifera* L.). *Cytologia* 34; 475-483.
- Sacerdote J, Radicati L, Me G. & Donini B (1981). Investigations on two cases of induced poliploidy in *Vitis vinifera* L. (cv. Barbera). *Vitis* 20; 335-340.
- Sangsiri C, Sorajjapinun W, Srinives P (2005) Gamma radiation induced mutations in Mungbean, *Science Asia*, 31, 251-255, (2005).
- Shetty B. V. 1958. Cytotaxonomical studies in *Vitaceae*, *Bibliogr. Genet.*, 28, 167-172.
- Skene KGM, Goodwins DR & Barlas M (1988). Ploidy stability in grapevine following longterm storage *in vitro*. *Vitis*, 27; 41-46.
- Thompson M & Olmo HP (1963). Cytohistological studies of cytochimeric ve tetraploid grapes. *American Journal of Botany*. 901-950.
- Viljoen TA & Spies JJ (1995). Cytogenetical studies of three *Vitis* species. *Vitis*, 34(4); 221-224.
- Yadav RC & Grumet R (1994). Tendrils as an alternate tissue source for chromosome visualization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119 (4); 850-852.
- Yamashita H, Shigehara I, Haniuda T (1998). Production of triploid grapes by *in ovulo*_embryo culture, *Vitis*, 37(3), 113-117.
- Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. and Duman, H. 1997. Giemsa c-banding analysis of *Sternbergia lutea* (L.) Ker-Gawl. Ex Sprengel and *S. sicuta* Tiroe ex Guss from Turkey. The Japan Mendel Society. *Cytologia*, 62; 1-6.